

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07804

研究課題名(和文) 運動と食品因子の併用によるマイオカイン(IL-6)を介した褐色脂肪細胞化の研究

研究課題名(英文) Induction of brown-like adipocytes by exercise and food-derived factors

研究代表者

津田 孝範(TSUDA, Takanori)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：90281568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、運動と食品因子の併用によるマイオカイン分泌の増強を介した白色脂肪組織中での褐色脂肪細胞化誘導の促進作用を明らかにし、新しい肥満予防研究の視点と基盤を提示することを目的とした。その結果、運動と食品因子の併用は褐色脂肪細胞化を誘導することを明らかにすることができた。さらにその機構としては、血中IL-6濃度の上昇の関与を示唆する結果を得た。本研究により運動と食事の併用による新たな効果を提示することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動と食品因子の併用によるマイオカイン分泌の増強を介した褐色脂肪細胞化による新たな抗肥満、関連疾患予防・治療の研究アプローチを食品機能学分野に提示できた。さらに本研究はマイオカインを標的とした運動と食事の組み合わせを活用する新たな肥満予防・介入法の開発のきっかけとなり得るものであり、食品因子の新機能開発に繋がり、これをきっかけに新規な食品開発など産業界での利用、イノベーション創出が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the induction of brown-like adipocyte formation in white adipose tissue through the enhancement of myokine secretion by the combination of exercise and food factors, and to present the viewpoint and basis of a novel anti-obesity study. As a result, we demonstrated that the combination of exercise and administration of food factor induces brown-like adipocytes formation in mice. Furthermore, the plasma IL-6 concentration was significantly increased in the combination of exercise and food factor group. These results was able to show a novel effect of combining exercise and diet.

研究分野：食品機能学、栄養生化学

キーワード：食品因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の脂肪組織には、白色脂肪組織と褐色脂肪組織がある。白色脂肪組織がエネルギーの貯蔵庫であるのに対し、褐色脂肪組織は脂肪を消費して体熱産生を行い、体温維持を担う。さらに白色脂肪組織に褐色脂肪細胞様の細胞（褐色脂肪細胞化の誘導）が増加し従来知られている褐色脂肪細胞と同様の機能を有することが知られている。研究代表者は、これまでに褐色脂肪細胞化の誘導に関わる食品由来因子の研究を行い、その誘導機構をはじめとするいくつかの成果を得ている。他方、Exercise is Medicine の言葉に象徴されるように、運動は多様な面で恩恵をもたらすことが知られている。例えば運動はエネルギー代謝を亢進させるだけでなく、脳機能やがん予防など多方面にわたる多くの報告がある。中でも運動によるエネルギー代謝の亢進は、肥満をはじめとする疾患予防の重要なツールと考えられている。運動が皮下白色脂肪組織において褐色脂肪細胞化を誘導することが、げっ歯類に加えて、相反する結果もあるものの、ヒトでも報告されている。さらに近年、運動により骨格筋からマイオカインと呼ばれるホルモン様の生理活性物質が分泌され、このシグナルを介して運動の効果が得られるのではないかと考えられている。ヒトで運動により骨格筋から分泌され、血中濃度が上昇することが明確となった最初のマイオカインはインターロイキン-6 (IL-6) である。元来 IL-6 は炎症を惹起し、インスリン抵抗性やサルコペニア（加齢による筋肉減弱）を上昇させると考えられていた。ところが、最近の研究から IL-6 は一方で、抗炎症的役割を持ち、筋への糖取り込みを上昇させる、などの作用がわかってきた。さらに興味深いことに、運動による骨格筋からの IL-6 が白色脂肪組織で前述のエネルギー消費を高める褐色脂肪細胞への分化を促進することが報告されている。なお、数年前に注目されたマイオカインとしてイリシンがある。イリシンは運動により骨格筋から分泌され、白色脂肪組織に作用して褐色脂肪細胞化を誘導し熱産生によるエネルギー消費を高めるとして注目された。しかしその後懐疑的報告が相次ぎ、現在はその寄与が否定的である。このような背景から、研究代表者は以下に示すような研究目的にたどり着いた。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本研究では、運動と食品由来因子の併用による褐色脂肪細胞化誘導の促進作用とマイオカイン (IL-6) の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マイオカイン分泌を促す食品由来因子を明らかにするため、骨格筋モデルのマウス由来 C2C12 細胞を用いた。細胞は定法により筋管細胞へ分化させ食品由来因子とマイオカイン分泌作用を調べた。

マウスを用いてトレッドミルによる本研究に最適な運動負荷条件を、走行速度、時間、運動期間などを変化させて検討した。この運動負荷条件を用いて食品由来因子の一定期間投与を併用し、その後白色脂肪組織において褐色脂肪細胞のマーカーである UCP1 のタンパク質発現レベルの測定、白色脂肪組織の組織学的検討から併用による褐色脂肪細胞化の誘導を評価した。さらにこの時のマイオカイン分泌（血漿濃度）と骨格筋での遺伝子発現レベルの変化を調べ、その関与を検討した。

4. 研究成果

当初の予定では、マウス由来の骨格筋モデルの細胞である C2C12 細胞を用いてマイオカイン分泌に関する評価法と適切な条件を検討しようと試みたが、細胞のロットや培地の影響で予想以上に大きな影響があることが分かった。細胞レベルでマイオカイン分泌促進作用の予備的なデータを得たものの、細胞実験での限界があることから、動物個体での検討を進めることにした。

マウスを用いてトレッドミルでの運動負荷条件を様々に変えて検討を行った結果、本実験に合致した適切な長期運動負荷条件を確立することができた。運動負荷条件に関しては、マイオカイン分泌促進作用に関する適切な一過性の運動負荷条件も確立した。次に本研究の目的に合致した食品由来因子の選定に着手し、予備検討からアミノ酸混合物を選定した。そこでこのアミノ酸混合物について、まず運動負荷を行わない場合の褐色脂肪細胞化誘導の可能性を検討したところ、単独では褐色脂肪細胞化には関与しないことが分かった。

これらの結果を踏まえてアミノ酸混合物の投与と先に確立した条件を用いた運動負荷を併用して褐色脂肪細胞化誘導作用を調べた。その結果、この併用群では単独群と比較して褐色脂肪細胞化の誘導を示唆する白色脂肪組織の多房化と抗 UCP1 抗体を用いた免疫組織染色において強い陽性像を示した。また併用群で白色脂肪組織での UCP1 タンパク質発現量は有意に上昇した。以上の結果から運動負荷とアミノ酸混合物の併用は褐色脂肪細胞化を誘導することが明らかになった。

次にこの併用による褐色脂肪細胞化誘導の機序解明を試みた。研究背景で述べたように、ヒトで運動により骨格筋から分泌され、血中濃度が上昇することが明確となった最初のマイオカインは IL-6 である。最近の研究から運動による骨格筋からの IL-6 が白色脂肪組織でエネル

ギー消費を高める褐色脂肪細胞への分化を促進することが報告されている。そこで併用による褐色脂肪細胞化の誘導における IL-6 の関与を検討した。その結果、併用群では骨格筋の IL-6 遺伝子発現量には群間の有意な差はないものの、血漿 IL-6 濃度は併用群で有意な上昇を示した。このことから当初の予測通り IL-6 が関与するものと考えられた。

以上の結果から運動と食事の併用による褐色脂肪細胞化誘導という新たな効果を明らかにし、さらにこの作用に IL-6 の関与を示唆する結果を提示できたので、本研究の目的は達成できたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iizuka, Y., Ozeki, A., Tani, T., Tsuda, T.	4. 巻 64
2. 論文標題 Blackcurrant extract ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic mice in association with increased basal secretion of glucagon-like peptide-1 and activating AMP-activated protein kinase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Nutr. Sci. Vitaminol.	6. 最初と最後の頁 258-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.3177/jnsv.64.258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 津田孝範	4. 巻 22
2. 論文標題 クルクミン：有効な機能性成分、あるいはニセの機能性成分なのか？ 食品機能研究からの課題を整理する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Food Style21	6. 最初と最後の頁 25-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 津田孝範	4. 巻 60
2. 論文標題 クルクミン：化学と代謝・吸収、生理機能発現と食品機能研究からの課題	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New Food Industry	6. 最初と最後の頁 9-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishikawa, S., Hyodo, T., Nagao, T., Nakanishi, A., Tandia, M., Tsuda, T.	4. 巻 67
2. 論文標題 -Monoglucosyl hesperidin but not hesperidin induces brown-like adipocyte formation and suppresses white adipose tissue accumulation in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Agric. Food Chem.	6. 最初と最後の頁 1948-1954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi/10.1021/acs.jafc.8b06647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tani, T., Nishikawa, S., Kato., M., Tsuda, T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Delphinidin 3-rutinoside-rich blackcurrant extract ameliorates glucose tolerance by increasing the release of glucagon-like peptide-1 secretion.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Food Sci. Nutr.	6. 最初と最後の頁 929-933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1002/fsn3.478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ozawa, H., Imaizumi, A., Sumi, Y., Hashimoto, T., Kanai, M., Makino, Y., Tsuda, T., Takahashi, N., Kakeya, H.	4. 巻 40
2. 論文標題 Curcumin -D-glucuronide plays an important role to keep high levels of free-form curcumin in the blood.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 1515-1524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00339.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuda, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Curcumin as a functional food-derived factor: degradation products, metabolites, bioactivity, and future perspectives.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Food Funct.	6. 最初と最後の頁 705-714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7fo01242j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuda, T.	4. 巻 66
2. 論文標題 Curcumin: an effective or deceptive dietary factor? Challenges for functional food scientists.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Agric. Food Chem.	6. 最初と最後の頁 1059-1060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.7b05878	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa, S., Kamiya, M., Aoyama, H., Nomura, M., Hyodo, T., Ozeki, A., Lee, H., Takahashi, T., Imaizumi, A., Tsuda, T.	4. 巻 62
2. 論文標題 Highly dispersible and bioavailable curcumin but not native curcumin induces brown-like adipocyte formation in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Nutr. Food Res.	6. 最初と最後の頁 1700731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mnfr.201700731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa, S., Kamiya, M., Aoyama, A., Yoshimura, K., Miyata, R., Kumazawa, K., Tsuda, T.	4. 巻 65
2. 論文標題 Co-administration of curcumin and artemisinin C induces development of brown-like adipocytes in association with local norepinephrine production by alternatively activated macrophages in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Nutr. Sci. Vitaminol.	6. 最初と最後の頁 328-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.3177/jnsv.65.328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honda, M., Nakayama, Y., Nishikawa, S., Tsuda, T.	4. 巻 84
2. 論文標題 Z-Isomers of lycopene exhibit greater liver accumulation than the all-E-isomer in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 428-431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1677144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa, S., Hyodo, T., Aoyama, H., Miyata, R., Kumazawa, S., Tsuda, T.	4. 巻 68
2. 論文標題 Artemisinin C, a key component of Brazilian propolis, induces thermogenesis in inguinal white adipose tissue of mice through a creatine metabolism-related thermogenic pathway.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Agric. Food Chem.	6. 最初と最後の頁 1007-1014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.9b07080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計28件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 青山広樹、兵頭拓真、神谷美沙、西川翔、宮田涼、吉村一輝、熊澤茂則、津田孝範
2. 発表標題 プロポリス成分による褐色脂肪細胞化の誘導と体温変化
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯塚 讓、尾関 葵、西川 翔、谷 翼、津田 孝範
2. 発表標題 ブラックカラント果実抽出物の耐糖能改善作用と作用機構の解明
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川 翔、兵頭 拓真、青山 広樹、長尾 つばさ、中西 章仁、タンジャ マハマドゥ、津田 孝範
2. 発表標題 高生体内吸収性の α -グルコシルヘスペリジンによる褐色脂肪細胞化の誘導
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川 翔、神谷美沙、青山広樹、野村真美、兵頭拓真、尾関 葵、Lee Hyunjin、高橋 司、今泉 厚、津田孝範
2. 発表標題 高水分散性・高生体内吸収性クルクミンによる褐色脂肪細胞化の誘導と作用機構
3. 学会等名 日本食品科学工学会第65 回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takanori Tsuda
2. 発表標題 Curcumin as a functional food-derived factor: Highly dispersible and bioavailable curcumin but not native curcumin effectively induces brown-like adipocyte formation in mice.
3. 学会等名 The 256th ACS National Meeting (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津田孝範
2. 発表標題 「紫」と「黄」のサイエンス：食用植物色素と健康機能
3. 学会等名 第49回中部化学関係学協会支部連合秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津田孝範
2. 発表標題 アントシアニンとクルクミン - 紫と黄の健康機能研究
3. 学会等名 植物色素研究会第30回集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川翔、青山広樹、兵頭拓真、神谷美沙、宮田涼、吉村一輝、熊澤茂則、津田孝範
2. 発表標題 プロポリス成分による褐色脂肪細胞化の誘導と脂肪組織温度の変化
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会中部支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津田孝範
2. 発表標題 プロボリスの健康機能研究～「ミツバチの恵み」のサイエンス～
3. 学会等名 第41回ミツバチ科学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兵頭 拓真、西川 翔、長尾 つばさ、中西 章仁、Tandia Mahamadou、津田 孝範
2. 発表標題 -グルコシルヘスペリジンによる褐色脂肪細胞化誘導と体脂肪蓄積抑制
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川 翔、兵頭 拓真、青山 広樹、神谷 美沙、宮田 椋、吉村 一輝、熊澤 茂則、津田 孝範
2. 発表標題 プロボリス成分による褐色脂肪細胞化と組織温度上昇機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神谷美沙、西川 翔、青山広樹、加藤愛子、曾我実、吉村一輝、熊澤茂則、津田孝範
2. 発表標題 食品由来因子の組み合わせによる褐色脂肪細胞化誘導作用の解明
3. 学会等名 第71回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西川翔、神谷美沙、青山広樹、野村真美、高橋司、今泉厚、津田孝範
2. 発表標題 食用黄色色素クルクミンによる褐色脂肪細胞化の誘導と作用機構解明
3. 学会等名 第71回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯塚讓、西川翔、香川志帆、尾関葵、谷翼、津田孝範
2. 発表標題 ブラックカラント果実抽出物の耐糖能改善作用と作用機序解明
3. 学会等名 日本食品科学工学会第64回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青山広樹、兵頭拓真、神谷美沙、西川翔、宮田涼、吉村一輝、熊澤茂則、津田孝範
2. 発表標題 プロポリス成分による褐色脂肪細胞化の誘導と体温変化の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川翔、兵頭拓真、青山広樹、長尾つばさ、中西章仁、タンジャマハマドゥ、津田孝範
2. 発表標題 糖転移ヘスペリジンによる褐色脂肪細胞化の誘導
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津田孝範、西川翔
2. 発表標題 高水分散性・高生体内吸収性クルクミンと褐色脂肪細胞化誘導
3. 学会等名 第73回 日本栄養・食糧学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川翔、神谷美沙、青山広樹、宮田棕、熊澤茂則、津田孝範
2. 発表標題 食品由来因子の組み合わせによる褐色脂肪細胞化誘導の増強作用
3. 学会等名 第73回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兵頭拓真、西川翔、青山広樹、神谷美沙、宮田棕、熊澤茂則、津田孝範
2. 発表標題 プロポリス成分による褐色脂肪細胞化の誘導と組織温度上昇機構の解明
3. 学会等名 第73回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島拓也、加藤大樹、西川翔、津田孝範
2. 発表標題 食品由来因子と運動の併用による褐色脂肪細胞化の誘導
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川翔、兵頭拓真、長尾つばさ、中西章仁、Tandia Mahamadou、津田孝範
2. 発表標題 糖転移ヘスペリジンによる褐色脂肪細胞化の誘導と体脂肪蓄積抑制作用
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島拓也、加藤大樹、西川翔、津田孝範
2. 発表標題 食品由来因子と運動の併用による褐色脂肪細胞化の誘導と機序解明
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会中部支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuda, T., Nishikawa, S.
2. 発表標題 Curcumin as a functional dietary factor: Curcumin induces brown-like adipocyte formation in mice.
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuda, T.
2. 発表標題 Possible abilities of dietary factors to prevent and treat diabetes via the stimulation of glucagon-like peptide-1 secretion.
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishikawa, S., Hyodo, T., Aoyama, H., Miyata, R., Kumazawa, S., Tsuda, T.
2. 発表標題 Artepillin C induces thermogenesis in inguinal white adipose tissues of mice in association with a creatine metabolismrelated thermogenic pathway.
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hyodo, T., Nishikawa, S., Nagao, T., Nakanishi, A., Tandia, M. Tsuda, T.
2. 発表標題 Alpha-Monoglucosyl hesperidin but not hesperidin induces brown-like adipocyte formation and suppresses white adipose tissue accumulation in mice.
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田孝範
2. 発表標題 糖転移ヘスペリジンによる褐色脂肪細胞化誘導と体脂肪蓄積抑制
3. 学会等名 ヘスペリジン研究会 第11回研究発表会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兵頭拓真、西川翔、青山広樹、宮田棕、熊澤茂則、津田孝範
2. 発表標題 プロポリス成分の褐色脂肪細胞化誘導と組織温度上昇機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 津田孝範	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 316
3. 書名 食品機能性成分の吸収・代謝・作用機序	

1. 著者名 西川翔、津田孝範	4. 発行年 2017年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 366
3. 書名 機能性食品開発のための初期評価試験プロトコール集	

1. 著者名 津田孝範	4. 発行年 2017年
2. 出版社 建帛社	5. 総ページ数 212
3. 書名 食べ物と健康 1 : 食品の化学と機能	

1. 著者名 津田孝範	4. 発行年 2017年
2. 出版社 建帛社	5. 総ページ数 200
3. 書名 食べ物と健康 2 : 食品の成分と加工	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----