

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09790

研究課題名(和文)体外受精した初期胚において染色体数的異常胚を誘発する要因の解明

研究課題名(英文)Risk factors related to chromosomal aneuploidy in human blastocysts

研究代表者

宮井 俊輔 (Miyai, Shunsuke)

藤田医科大学・総合医科学研究所・研究員

研究者番号：50563350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、染色体数的異常胚の出現に影響する暴露要因を解明するために、廃棄する胚盤胞から生検した試料を網羅的染色体解析(PGT-A)して正倍数胚、染色体数的異常胚、モザイク胚の出現率を算出し、様々な要因との因果関係を調査した。本研究において、卵巣刺激法によってモザイク胚の出現率が優位に異なる可能性、精子の濃度減少と運動率低下が正倍数胚の減少と関連する可能性、初期分割不良は胚盤胞到達後の正倍数性を低下させない可能性が示唆された。また、PGT-Aの解析において、モザイクと判定されるコピー数変化の一部が技術的なノイズであり、バイオプシー技術の向上がノイズの発生を軽減できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から示唆された初期胚における染色体数的異常の出現に影響する暴露要因について、その後の介入研究にて検証できれば、染色体異常胚の出現を減少できる不妊治療の確立に役に立つ可能性がある。また、本研究から示されたPGT-Aにおけるノイズの要因は、TEバイオプシー技術の標準化に有用な情報である。適切なPGT-A結果を得ることは、胚移植の成功率向上や生児獲得までの期間を短縮し、生児獲得率の向上に結びつくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed chromosomal analysis of blastocyst(PGT-A) in order to investigate the factors relating to patients, ART, or both, affect the incidence of chromosomal aneuploidy in human blastocysts.

In this study, it is suggested that (1) ovarian stimulation protocol may affect the appearance rate of mosaic embryos, (2) low sperm concentration and poor sperm motility is probably associated with decreased euploidy rate, (3) irregular dividing by observing time-lapse monitoring images of embryos do not reduce blastocyst euploidy. Also, we suggest that biopsy technique may contribute to artificial mosaicism as an extrinsic factor.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：染色体異常 着床前染色体検査 モザイク

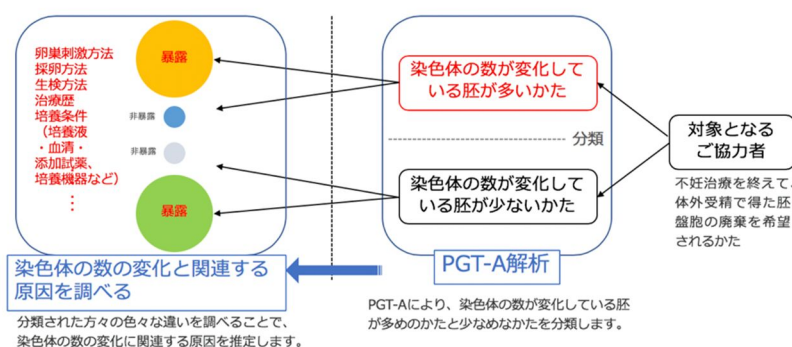
1. 研究開始当初の背景

配偶子形成における減数分裂不分離による染色体の数的異常の発生は極めて多いことが知られており、反復 ART 不成功や、流産、胎児異常の原因となっていると推定されている。また、染色体数的異常の出生前診断の後に人工妊娠中絶を余儀なくされることもあり、海外ではこれらを回避する目的で遺伝的非保因者に対して ART の際に着床前染色体数的異常検査 (Preimplantation Genetic Test for Aneuploidy; 以下 PGT-A) が実施されている。わが国では、妊娠年齢の高齢化などにより繰り返し ART を行っても成功に至らない夫婦が増加し、この点に配慮した対応が迫られているという事情から、PGT-A の有用性を科学的に検証するために、日本産科婦人科学会が主導して行う多施設共同無作為化比較試験 (Randomized Controlled Trial; 以下 RCT) が 2016 年から施行されている。

これまでに PGT-A に関する様々な RCT の結果が報告されているが、その有効性はまだ議論中である。一方で、いくつかの RCT において、クリニックや主治医、ラボによって正倍数体胚の率が異なることが示されており、卵巣刺激方法などの要因が染色体数的異常胚の出現に影響する可能性が示唆されている。実際、我々も、分割停止胚や廃棄胚の網羅的染色体解析から、卵巣刺激法によって染色体数的異常がモザイクで認められる胚の出現率が優位に異なる結果を得られている。その他、single-step の培養液では sequential の培養液と比較して、染色体数的異常がモザイクで認められる胚の出現頻度が高くなることが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、染色体数的異常胚の出現に影響する暴露要因を解明するために、多施設共同の症例対照研究を行う。廃棄する胚盤胞から生検した試料を網羅的染色体解析 (PGT-A) して正倍数体胚、染色体数的異常胚、モザイク胚の出現率を算出し、様々な要因 (卵巣刺激方法、採卵方法、生検方法、治療歴、臨床的背景など) との因果関係を調査する。本研究から暴露要因を特定し、その後の介入研究にて検証できれば、染色体異常胚の出現を減少できる不妊治療を確立することが可能となる。



3. 研究の方法

多施設共同研究によって行われるもので、体外受精実施施設と PGT-A 実施施設に分けられる。体外受精実施施設は日本着床前診断コンソーシアム (JAPCO) に所属する施設に割り当てられる。症例登録については、染色体数的異常の出現率は母体の年齢に依存するため、35 歳未満と 35 歳以上の 2 群において、染色体数的異常胚の出現率が高い群と低い群を 40 症例ずつ登録する (計 160 症例)。脱落率を 20% と推定し、総計 200 例と設定する。

1. 症例登録

- (ア) 不妊治療を終了して、体外受精した受精卵の廃棄を希望する症例を登録する。なお、卵巣刺激、採卵は各施設が行っている通常の方法で実施する。
- (イ) 登録した症例の臨床情報等（年齢、流産歴、卵巣刺激方法、採卵方法、受精方法、培養液・血清・添加試薬、培養条件（培養機器など）、採卵数と胚盤胞到達率、胚のグレード、胚盤胞到達時間、生検状況など）を収集する。

2. 生検

- (ア) 胚盤胞から生検した試料を使用する。
- (イ) PGT-A実施施設である当研究室所定の容器と専用の溶液を用いて生検した試料を移送する。
- (ウ) 1.-(イ)で収集した臨床情報等をJAPCO事務局に提出する。

3. PGT-A結果の判定

- (ア) 生検された試料のDNAを全ゲノム増幅する。次世代シーケンサーを用いた解析を行い、染色体数的異常の判定を行う。
- (イ) 判定は正倍数体と異数体、モザイク型の3種類と、異数体とモザイク型に関しては複数の染色体に異数性があるのかで分類する。

<判定>

正倍数体：染色体数的異常を全く認められない。

異数体：染色体数的異常が認められる。

モザイク型：数的異常細胞がモザイクで認められる。

- (ウ) 判定結果は検体IDと一緒にJAPCO事務局に提出する。

4. 症例対照研究

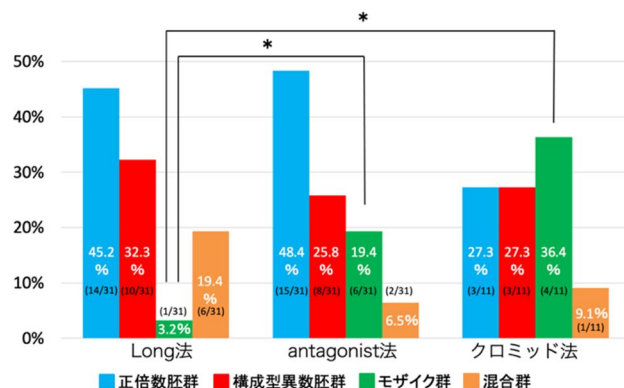
- (ア) 体外受精実施施設とPGT-A実施施設から報告されるデータを集計するデータベースを構築する。
- (イ) JAPCO事務局において、体外受精実施施設から報告された各症例の臨床情報等とPGT-A実施施設から報告された染色体解析結果を結合する。
- (ウ) 結合したデータを当研究室にて、染色体数的異常もしくは正倍数体胚の出現頻度と関連する要因を解析する。

4. 研究成果

本研究において、一部の共同研究施設とは小規模で染色体数的異常胚と暴露要因の解析を進め、以下の結果が示唆された。

1. 卵巣刺激法によって染色体数的異常がモザイクで認められる胚の出現率が優位に異なる可能性が示唆された。

Long法、アンタゴニスト法、クロミッド法を比較した結果を図に示す。Long法が他の刺激方法より有意にモザイクが少ないという結果が得られた。なお、C-IVFとICSI、ICSI施行者の違い、HMG投与量では差を認めなかった。



Long法ではモザイク異常が少なか

ったことから、Long法を行える患者にはLong法を第一選択とするのがよい可能性が示唆さ

れた。

2. 精子の濃度減少と運動率低下が正倍数胚の数を減少させる要因である可能性が示唆された。精子濃度は 5.0×10^6 個/mL (A群) $5.0 \sim 10.0 \times 10^6$ 個/mL (B群) $10.0 \sim 15.0 \times 10^6$ 個/mL (C群) $15.0 \sim 20 \times 10^6$ 個/mL (D群) $20.0 \sim 30.0 \times 10^6$ 個/mL (E群) 30×10^6 個/mL (F群) の6群、運動率は<20%、20~30%、40%で分類した。胚盤胞109個を解析した結果、正倍数胚71個、モザイク異数性胚38個であった。正倍数胚、モザイク異数性胚ともに夫年齢、妻年齢に有意差はなかった。精子濃度別の正倍数胚率の比較では、A、B、C、D、E、F群それぞれ50.0%、100%、46.2%、50.0%、80.8%、64.3%であり、A群とE群、C群とE群でそれぞれ有意差があった($p < 0.05$)。運動率別の正倍数胚率は、<20%、20~30%、40%でそれぞれ20.0%、100%、63.8%であり、<20%と比較して20~30%で有意に高かった。

少ない精子濃度と低い運動率が正倍数胚の数を減少させる要因である可能性があり、裸化やICSIを行う際の手法を見直すことによってモザイク異数胚率を減少できる可能性が示唆された。

3. タイムラプスモニタリングによって検出される初期分割不良は、胚盤胞到達後の正倍数率を低下させないことが示された。

胚をsecond cleavageまでの動態により、normal cleavage (NC) 群、direct cleavage (embryos with one cell dividing into three cells) (DC) 群、reverse cleavage (embryos with fused cells once divided) (RC) 群の3つに分類した。胚盤胞107個を解析した結果、正倍数性の割合は、NC群35.4%、DC39.5%、RC群81.3%であった。RC群はNC群($p < 0.01$)およびDC群($p < 0.05$)に比べ有意に高かった。

なお、胚盤胞形成率は、NC群95.1%、第1割球のDCに由来するもの55.7%、第2割球の正常分割に由来するもの89.3%、第2割球のDCに由来するもの48.1%といずれも後者が有意に低く($p < 0.01$)、RC群の場合は融合胚、非融合胚がそれぞれ60.7%と86.1%となり有意差はなかった。

| | NC group (48) | DC group (43) | RC group (16) | P value |
|-----------|---------------|---------------|---------------|--|
| Euploid | 35.4% (17) | 39.5% (17) | 81.3% (13) | 0.0046 NC vs DC = 1.000 NC vs RC = 0.009 DC vs RC = 0.022 |
| Aneuploid | 45.8% (22) | 48.8% (21) | 12.5% (2) | 0.0278 NC vs DC = 1.000 NC vs RC = 0.057 DC vs RC = 0.046 |
| Mosaic | 18.8% (9) | 11.6% (5) | 6.3% (1) | 0.448 |

DCで生成された割球は、胚盤胞形成から除外されることが多く、その分割が胚盤胞の倍数性を低下させない一因であると推測された。しかし、RC群ではなぜ胚盤胞の正倍数性率が高いのかは明らかにできなかった。

また、PGT-Aの解析において、モザイクと判定されるコピー数変化の多くがノイズである可能性が示唆された。ノイズとモザイクを誤判定すると、染色体数的異常胚の出現に影響する暴露要因の解明にも影響すると考えられるため、ノイズの要因を検討した。

生検細胞数、生検実施施設や実施者、パイオプシー時の胚の状況(凍結胚および新鮮胚)、胚のグレード等とノイズ発生率や判定不能率を集計した結果、ノイズの要因として以下が考えられた。

1. 生検細胞数が少ないと、全ゲノム成功率が低くなり（判定不能率が高くなり）、ノイズの発生頻度が高くなるという傾向が示された。

生検細胞数が3個や4個の場合の判定不能率はそれぞれ2.2%や2.0%であるのに対し、5個以上の場合は1.5%であった。また、ノイズの発生頻度も、生検細胞数が5個以上の場合と比較して、3個で1.6倍、4個で1.3倍に上昇した。

生検細胞数は5個以上とするのが望ましい運用であると考えられた。

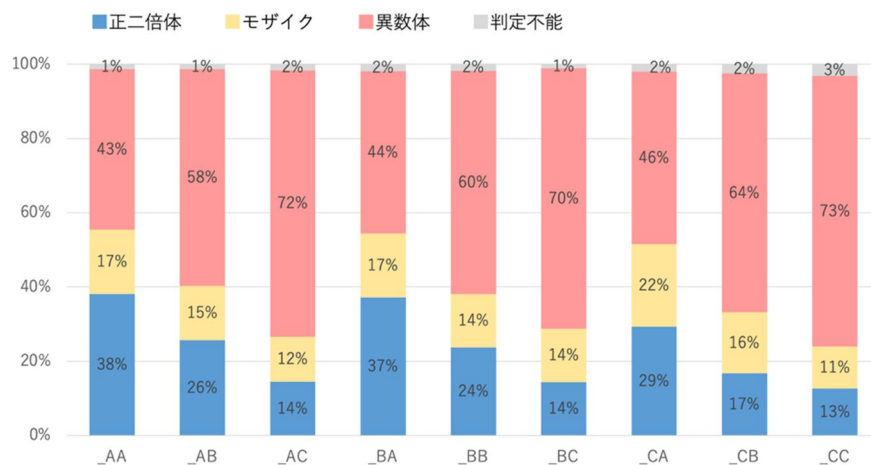
2. 医療機関や生検実施者によってノイズ発生頻度に明確な違いが見られることから、TE生検の技術や品質がノイズに影響する事が示された。

なお、生検実施者へのインタビューにより、生検細胞の洗浄とチューピングでノイズの発生を軽減できる可能性が示された。

3. 凍結胚と新鮮胚で判定不能やノイズの発生頻度は変化しなかった。

4. 胚の形態学的評価とPGT-Aの結果は相関することが示唆された。

ガードナー分類に基づいた胚盤胞のグレードとPGT-Aの結果を集計した。その結果、TEの評価が低い胚盤胞は異数性の割合が高くなる傾向を認め、一方、ICMの評価はPGT-Aの結果



との相関を認めなかった。

また、断片化したDNAを鋳型とするとノイズが高くなる傾向がある事が示され、アポトーシスを起こしている細胞を解析するとノイズが高い結果になる可能性が考察された。

本研究から、いくつかの染色体数的異常胚の出現に影響する暴露要因やPGT-A解析におけるノイズの要因が示唆された。ただし、小規模の解析から得られたデータであることから、より大規模な多施設共同の症例対照研究を行うことで検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9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 5件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Seo H, Masuda H, Asagoshi K, Uchiki T, Kawata S, Sasaki G, Yabuki T, Miyai S, Takahashi N, Hashimoto SI, Sawada A, Takaiwa A, Koyama C, Tamai K, Kurosawa K, Lin KY, Ohta K, Nakazaki Y. | 4. 巻 18(6) |
| 2. 論文標題 Streamlined human antibody generation and optimization by exploiting designed immunoglobulin loci in a B cell line. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cell Mol Immunol. | 6. 最初と最後の頁 1545-1561 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-020-0440-9 | 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 Kato T, Inagaki H, Miyai S, Suzuki F, Naru Y, Shinkai Y, Kato A, Kanyama K, Mizuno S, Muramatsu Y, Yamamoto T, Shinya M, Tazaki Y, Hiwatashi S, Ikeda T, Ozaki M, Kurahashi H. | 4. 巻 139(11) |
| 2. 論文標題 The involvement of U-type dicentric chromosomes in the formation of terminal deletions with or without adjacent inverted duplications. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Hum Genet. | 6. 最初と最後の頁 1417-1427 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-020-02186-8 | 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 Kawamura R, Kato T, Miyai S, Suzuki F, Naru Y, Kato M, Tanaka K, Nagasaka M, Tsutsumi M, Inagaki H, Ioroi T, Yoshida M, Nao T, Conlin LK, Iijima K, Kurahashi H, Taniguchi-Ikeda M. | 4. 巻 65(8) |
| 2. 論文標題 A case of a parthenogenetic 46,XX/46,XY chimera presenting ambiguous genitalia. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J Hum Genet. | 6. 最初と最後の頁 705-709 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-0748-4. | 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 Kato T, Kawai M, Miyai S, Suzuki F, Tsutsumi M, Mizuno S, Ikeda T, Kurahashi H. | 4. 巻 160(3) |
| 2. 論文標題 Analysis of the Origin of Double Mosaic Aneuploidy in Two Cases. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cytogenet Genome Res. | 6. 最初と最後の頁 118-123 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000507177. | 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 Toshimitsu M, Nagaoka S, Kobori S, Ogawa M, Suzuki F, Kato T, Miyai S, Kawamura R, Inagaki H, Kurahashi H, Murotsuki J. | 4. 巻 Oct 2;2019 |
| 2. 論文標題 Exome-First Approach in Fetal Akinesia Reveals Chromosome 1p36 Deletion Syndrome. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Case Rep Obstet Gynecol. | 6. 最初と最後の頁 6753184 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/6753184. | 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 Shibata K, Kunisada M, Miyai S, Kawamori S, Kurahashi H, Nishigori C. | 4. 巻 Dec;48(12) |
| 2. 論文標題 Incontinentia pigmenti in a female infant with somatic mosaicism due to the IKBKG variant | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Dermatol. 2021 | 6. 最初と最後の頁 e577-e578 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16141 | 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 Muto Y, Sasaki H, Sumitomo M, Inagaki H, Kato M, Kato T, Miyai S, Kurahashi H, Shiroki R. | 4. 巻 9(1) |
| 2. 論文標題 Genotype-phenotype correlation of renal lesions in the tuberous sclerosis complex | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Hum Genome Var . | 6. 最初と最後の頁 5 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-022-00181-1 | 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 Kato T, Miyai S, Suzuki H, Murase Y, Ota S, Yamauchi H, Ammae M, Nakano T, Nakaoka Y, Inoue T, Morimoto Y, Fukuda A, Utsunomiya T, Nishizawa H, Kurahashi H. | 4. 巻 21(1): |
| 2. 論文標題 Usefulness of combined NGS and QF-PCR analysis for product of conception karyotyping | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Reprod Med Biol . | 6. 最初と最後の頁 e12449 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12449 | 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 Mariya T, Kato T, Sugimoto T, Miyai S, Inagaki H, Ohye T, Sugihara E, Muramatsu Y, Mizuno S, Kurahashi H. | 4. 巻 67(6) |
| 2. 論文標題 Target enrichment long-read sequencing with adaptive sampling can determine the structure of the small supernumerary marker chromosomes | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 J Hum Genet . | 6. 最初と最後の頁 363-368 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-01004-x | 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9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 宮井俊輔 |
| 2. 発表標題 着床前遺伝学的検査 (PGT) の解析について |
| 3. 学会等名 第17回東海ARTカンファレンス (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 渡辺 真一、吉貝 香里、富田 麻莉、鈴木 篤智、野呂 麻理子、松田 有希野、宮井 俊輔、加藤 武馬、中野 英子、倉橋 浩樹、澤田 富夫 |
| 2. 発表標題 初期分割不良は胚盤胞到達後の正倍数率に影響しない |
| 3. 学会等名 第61回 日本卵子学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡辺 真一、吉貝 香里、富田 麻莉、鈴木 篤智、松田 有希野、宮井 俊輔、加藤 武馬、中野 英子、倉橋 浩樹、澤田 富夫 |
| 2. 発表標題 タイムラプスモニタリングで胚発生能と正倍数性はどこまで評価できるか |
| 3. 学会等名 第38回 日本受精着床学会 (ワークショップ) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 河村理恵, 森山育実, 加藤麻希, 河合美紀, 宮井俊輔, 倉橋浩樹 |
| 2. 発表標題 Genetic counseling for preimplantation genetic diagnosis |
| 3. 学会等名 第43回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉貝香里, 松田有希野, 加藤武馬, 宮井俊輔, 新井千登勢, 鈴木篤智, 富田麻莉, 中野英子, 倉橋浩樹, 澤田富夫 |
| 2. 発表標題 NGS解析データより胚移植順位の基準を再構築する |
| 3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木篤智, 吉貝香里, 加藤武馬, 宮井俊輔, 松田有希野, 新井千登勢, 富田麻莉, 中野英子, 倉橋浩樹, 澤田富夫 |
| 2. 発表標題 精子因子が異数性に与える影響 |
| 3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松田有希野, 吉貝香里, 加藤武馬, 宮井俊輔, 新井千登勢, 鈴木篤智, 富田麻莉, 中野英子, 倉橋浩樹, 澤田富夫 |
| 2. 発表標題 凍結融解胚移植において異数胚を避けるための条件 |
| 3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松田有希野、吉貝香里、加藤武馬、宮井俊輔、新井千登勢、鈴木篤智、富田麻莉、中野英子、倉橋浩樹、澤田富夫 |
| 2. 発表標題 NGS分析を用いた胚発育の後方視的解析 |
| 3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 宮井俊輔 |
| 2. 発表標題 着床前遺伝学的検査(PGT)の実施状況について |
| 3. 学会等名 第4回JAPCO会議(招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|-----------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 倉橋 浩樹 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 診断と治療社 | 5. 総ページ数 144 |
| 3. 書名 これでわかる 網羅的手法による着床前診断のすべて | |

| | |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 関沢明彦 編著 / 佐村 修 編著 / 中岡義晴 編著 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 中外医学社 | 5. 総ページ数 166 |
| 3. 書名 生殖医療遺伝カウンセリングマニュアル | |

〔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 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 加藤 武馬 (Kato Takema) (20387690) | 藤田医科大学・総合医科学研究所・助教 (33916) | |
| 研究分担者 | 河村 理恵 (Kawamura Rie) (20735534) | 藤田医科大学・総合医科学研究所・助教 (33916) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |