

令和 3 年 4 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17296

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた早産児敗血症に対する臍帯由来間葉系幹細胞治療の開発

研究課題名(英文) Development of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy for neonatal sepsis using a preterm mouse model

研究代表者

西田 浩輔(Nishida, Kosuke)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40837697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目的は、神戸大学小児科新生児研究グループが確立した糞便懸濁液(Cecal slurry, CS)を腹腔内投与する早産児マウス敗血症モデルに対してMSCsを投与し治療効果を検討することで、早産児敗血症に対する新規治療法の開発を目指すことであった。現在までの研究成果では、成獣マウス敗血症モデルではMSCs投与の敗血症保護効果を証明できていない。一方、敗血症モデルマウスの尿検体を用いた酸化ストレス動態の実験系、および早産児マウス敗血症モデルに対する薬物治療実験系の樹立には成功しており、今後はMSCs投与量・経路の調節を行い敗血症保護効果を検証していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児敗血症、全身性炎症反応に加えて、酸化ストレスなどの複数の侵襲因子が関与し、従来の抗菌薬治療単独では十分な治療効果が得られていない。一方、間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells、以下MSCs)は傷害組織に集積し、種々の因子を放出して治療効果を発揮する点において、多臓器不全を本態とする早産児敗血症の理想的な治療法といえる。本研究では、ヒト臍帯から分離・培養したMSCsを、我々が独自に確立した早産児マウス敗血症モデルに投与し治療効果を検討した。

研究成果の概要(英文)：The ultimate goal of this study is to examine the protective effect of umbilical cord-derived MSCs for neonatal sepsis using preterm sepsis mouse model.

The research results to date have not proved the sepsis-protective effect of MSCs administration in the adult sepsis mouse model. Whereas, we have succeeded in establishing an experimental system of oxidative stress dynamics using urine samples of sepsis model mice, and a drug treatment experimental system for preterm sepsis mouse model. Thus, we will verify the protective effect of MSCs by using these protocols in future research.

研究分野：新生児学

キーワード：新生児敗血症 間葉系幹細胞 早産児マウス敗血症モデル 酸化ストレス MSCs sepsis Neonate マウスモデル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

新生児の敗血症は早産児に高率に発症し、生命及び神経学的予後に影響する重篤な疾患である。早産児敗血症は、感染侵襲への免疫応答の破綻に起因する全身性炎症反応に加えて、酸化ストレス、アポトーシスなどの複数の侵襲因子が関与する多因子疾患と考えられ、従来の抗菌薬治療単独では十分な治療効果が得られていない。近年、周産期医療の発達により早産、低出生体重児の出生率が上昇しており、本疾患の新規治療法開発は喫緊の課題である。一方、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells、以下 MSCs) の多彩な臓器保護作用は、肺・肝臓・腎臓など多臓器不全を本態とする早産児敗血症の治療法として極めて有利であると推測される。それゆえ、本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「MSCs 投与は早産児敗血症の新規治療法となるか？」である。

古くから、敗血症研究においては盲腸結紮穿刺モデルが標準モデルとして用いられてきたが、手術を要し高侵襲のため新生仔マウスへの適応は不可能であった。2007年に、成獣マウスから摘出した虫垂内容物から糞便懸濁液 (Cecal slurry, CS) を作成し、対象マウスに腹腔内投与することで腹膜炎性敗血症を誘導する CS モデルが報告されたのを機に、研究協力者の藤岡は、免疫学的にヒト早産児相当である4日齢マウスにCS法を応用することで、早産児敗血症モデルマウスを確立した (Fujioka et al. Shock, 2017)。本モデルは、CS用量依存性の死亡率増加、全身臓器における細菌定着、重症例における肝・腎機能障害、血液学的異常、肝臓サイトカイン、パターン認識受容体、免疫調節遺伝子の有意な発現増加を呈し、近年では標準的な新生児敗血症モデルマウスとして評価されている (Fujioka et al. Shock, 2017, Ped Res. 2018)。

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells、以下 MSCs) は、傷害組織に特異的に集積・適応する能力を持ち、種々のサイトカインや栄養因子を産生することにより、抗炎症・組織保護作用を発揮することが知られている。また、MSCs のなかでも胎児由来の MSCs は、ES細胞や iPS細胞に比べて腫瘍原性・免疫原性が低いとされ、臨床上大きな利点を有する。現在まで、低酸素性虚血性脳症・慢性肺疾患などの新生児疾患モデル動物を用いた MSCs 治療の研究報告が散見されるが、早産児敗血症を対象とした MSCs 治療研究の報告はない。また我々の研究室では、本学医学倫理委員会の承認を得て、既に胎児付属物から MSCs (FACS解析により CD105・90・73陽性かつ CD14・19・34陰性を確認、分化培養キットにより Adipocyte、Osteoblast、Chondrocyte に分化することを確認) の分離・培養に成功しており (Iwatani S, Nishida K, et al. Stem Cells Int. 2017)、速やかに治療実験に臍帯由来 MSCs を使用することが可能である。

加えて、我々は以前より MSCs の早産児敗血症治療応用に向けて、その治療効果増強のための標的分子としてストレス応答蛋白である Heme Oxygenase-1 (HO-1) に着目した研究を行っており、4日齢マウスに対する Heme を用いた薬物的 HO-1 誘導システムを確立している (Fujioka et al. Ped Res. 2016)。HO-1 の MSCs 増強効果に関しては、HO-1 が MSCs の免疫制御効果を媒介し、MSCs の細胞生存に保護的に作用するとの報告がある。そこで、MSCs 単独で治療効果が不十分な場合は、HO-1 誘導後に MSCs を投与することで治療効果の増強を図る。本研究は、ヒト臍帯由来の MSCs を早産児敗血症治療に応用し、また効果不十分な場合も HO-1 誘導を介した強化 MSCs 療法を計画している点で、学術的創造性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、早産児マウス敗血症モデルに MSCs を投与し治療効果を検討することで、早産児敗血症に対する新規治療法の開発を目指すことである。

## 3. 研究の方法

早産児敗血症における臍帯由来 MSCs の防御効果を明らかにすることを目的に、早産児マウス敗血症モデルに対して、臍帯由来 MSCs または Vehicle を投与し、治療効果を検討する。

### (1) CS 保存液および早産児マウス敗血症モデルの作成 (図 1)

成獣マウスから虫垂を摘出し、その内容を 15%glycerol-PBS に溶解して Cecal Slurry (CS, 100mg/mL) を作成し、1mL 毎に分注し-80℃で保存する。次いで、異なった用量 (1.0-5.0mg/g) の CS 保存液または Veh を、4 日齢の FVB/NJ マウスに腹腔内投与し、投与後 7 日までの生存率、体重変化率を検討し、CS 40%致死量 (LD<sub>40</sub>) を決定する。ヒト早産児敗血症の致死率が約 40%であ

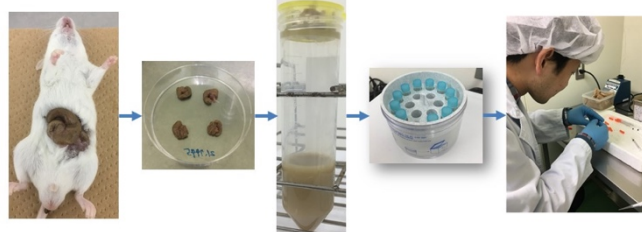


図 1: Cecal Slurry法を用いた早産児マウス敗血症モデルの作成  
成獣マウス(n=10-15)を安楽死後、虫垂を摘出し、その内容を 15%glycerol-PBSに溶解してCS(100mg/mL)を作成し、1mL毎に分注し-80℃で保存する。次いで、4日齢マウスに異なった用量(1.0-4.0mg/g)を腹腔内投与し、敗血症を誘導する。

ることから、以降の早産児敗血症モデルの作成は CS LD<sub>40</sub> を用いて行う。

### (2) 胎児付属物(臍帯)からの間葉系幹細胞(MSCs)の分離・培養

神戸大学医学部附属病院において分娩を予定する妊婦に対して、説明書を用いて本研究を説明する。文書による同意を得られた妊婦から、分娩時に胎児付属物を採取する。胎児付属物(臍帯)からの MSCs の分離・培養は、神戸大学小児科研究室において既に確立されている方法を用い、間葉系幹細胞培地で接着培養する。次に免疫蛍光染色によって、得られた細胞の表面マーカー (CD73, CD81, CD105 等) の発現解析を行い、MSCs の分離率を評価する

### (3) 成獣マウス敗血症モデルを用いた治療効果の検討

早産児マウス敗血症モデルを用いた治療効果の検討を実施する前段階として、上記(2)で分離・培養した MSCs を、(1)と同様の手法で作成した成獣マウス敗血症モデルに腹腔内投与し、生存率の評価を行う。

### (4) 早産児マウス敗血症モデルを用いた治療効果の検討

上記(2)で分離・培養した MSCs の早産児敗血症に対する効果を、(1)で作成した早産児マウス敗血症モデルを用いて検討する。まず、(1)の方法に基づき 4 日齢マウスに CS LD<sub>40</sub> を腹腔内投与し、敗血症を誘導する。その 30 分後に上記(2)で分離・培養した MSCs (1x10<sup>5</sup>) または Veh を腹腔内投与し、MSCs 群と対照群で投与後 7 日までの **a. 生存率、体重変化率** を比較検討する。次いで、以下の項目につき比較検討する。

**b. 臓器障害の検討** MSCs (1x10<sup>5</sup>) または Veh を投与 24 時間後、1 週間後に血液を採取し、臓器障害マーカーとして血清 AST (肝臓)、BUN (腎臓)、CK (心臓)、KL-6 (肺) を測定する。また同時に、肺・肝臓・腎臓を採取し、HE 染色および TUNEL 染色で病理学的に検討し、組織障害の重症度を両者で比較検討する

**c. 酸化ストレス動態の解析** MSCs (1x10<sup>5</sup>) または Veh を投与 24 時間後に、尿を採取し、尿中 8-OHdG/クレアチニン比を測定することで、酸化ストレスの重症度を両者で比較検討する。

d. 網羅的遺伝子発現の解析 MSCs ( $1 \times 10^5$ ) または Veh を投与 6、24 時間後に、肺・肝臓・脾臓を採取し、PCR アレイ法を用いて、網羅的に Innate and adaptive immune responses 関連遺伝子発現を解析し、両者で比較検討することで MSCs 投与により誘導される炎症制御の一端を明らかにする。

#### (5) 薬物的 HO-1 誘導併用による強化 MSCs 療法の保護効果の検討

上記(4)で十分な保護効果が得られなかった場合、HO-1 誘導薬である Heme ( $30 \mu\text{mol/kg}$ , Fujioka et al. *Pediatr Res* 2016) を、3 日齢マウスに皮下投与する。ついで HO-1 誘導のピークである 24 時間後 (4 日齢) に(3)の方法で MSCs ( $1 \times 10^5$ ) を投与し、前述の a-d. の項目につき Veh 群、MSCs 単独群と比較検討し、有効性および作用機序を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### 成獣マウス敗血症モデルを用いた MSCs の治療効果の検討

- CS 保存液の作成：動物実験施設の承認後、10 週齢の成獣マウスを安楽死し、虫垂を摘出し、虫垂内容を 15% glycerol-PBS に溶解し糞便懸濁液 (Cecal Slurry, CS 100mg/ml) を作成した。全実験を通じ同一起源の CS 保存液を用いた。
- マウス敗血症モデルの作成：CS 20mg (0.2ml) を 32 週齢 (成獣) の野生型 FVB マウスに腹腔内投与し、敗血症を誘導した。
- MSCs 投与実験：敗血症誘導 24 時間後に、MSCs ( $0.1 \times 10^6$  cell, 0.5ml,  $n=18$ ) または PBS (0.5ml,  $n=9$ ) をマウスに腹腔内投与し、敗血症誘導後 5 日目の体重変化率および 5 日間生存率を比較検討した。

結果は、MSCs 投与群と PBS 投与群で、体重変化率 (MSCs 群:  $-11.4 \pm 7.6\%$  vs. PBS 群:  $-9.0 \pm 5.7\%$ ,  $p=0.4$ ) および、生存率 (MSCs 群: 94% vs. PBS 群: 100%,  $p=0.5$ ) に差を認めなかった (図2, 図3)。

図2 MSCs 投与群と PBS 投与群の体重変化率

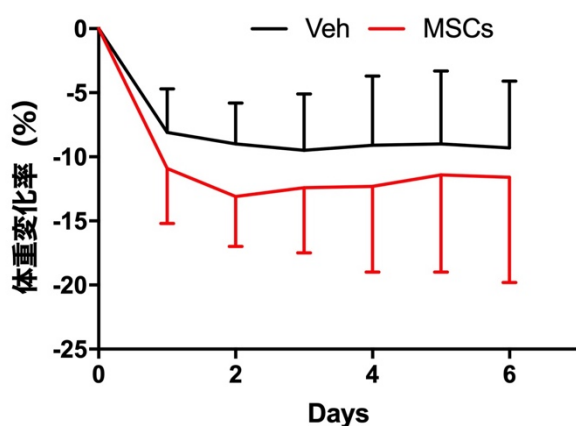
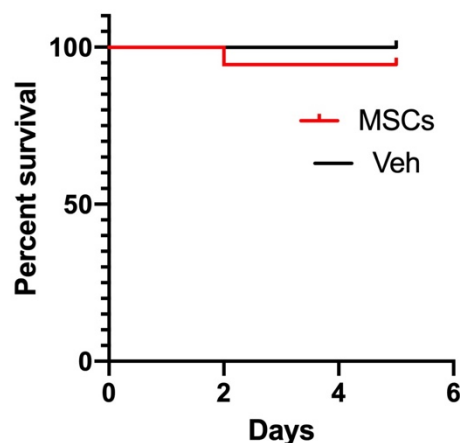


図3 MSCs 投与群と PBS 投与群の生存率



以上の成獣マウス敗血症モデルを用いた検討では、MSCs 投与の敗血症保護効果を証明出来なかった。本検討では両群とも生存率が高く、敗血症重症度の調整に失敗した。条件を変更しての再検討を試みたが、新型コロナウイルス感染症の影響に伴う動物実験の制限により本研究期間中での実施は困難であった。引き続き次年度以降での検討を考慮している。

#### 成獣マウス敗血症モデルを用いた酸化ストレス動態の検討

また、**実験(4)-c**の予備実験として、成獣マウス敗血症モデルを用いた尿採取→酸化ストレス(8-OHdG/Cre)測定を行った。結果としCS群2検体、Veh群2検体を測定し得たが、成獣マウスであっても安楽死後の膀胱穿刺ではコンスタントに一定の最尿量を確保することが困難であり、新生仔マウスの測定においては複数マウスの検体の混合が必要であることがわかった。また結果は、CS群  $102.7 \pm 27.2$  ng/mg Cre、Veh群  $85.5 \pm 41.6$  ng/mg Cre と敗血症群においてやや高い傾向を認め、尿中8-OHdG/Creは敗血症モデル動物研究の有用なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。今後は、MSCsを投与した敗血症モデルマウスにおける尿中酸化ストレス動態の検討を行っていく。

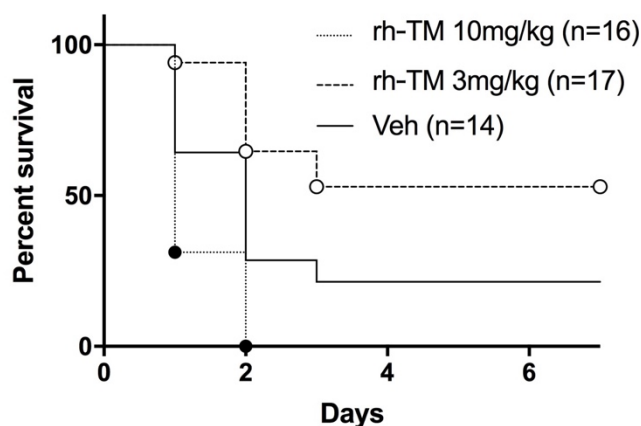
#### 早産児マウス敗血症モデルに対する薬物治療実験系の樹立

一方、**実験(5)**の薬物治療実験系の樹立を目的に、敗血症治療薬として合目的な薬理作用を有するヒトリコンピナントトロンボモジュリン(rh-TM)を用いて以下の実験を行った。

方法は、(1)動物実験施設の承認後、10週齢の成獣マウスを安楽死し、虫垂を摘出し、虫垂内容を15%glycerol-PBSに溶解し糞便懸濁液(Cecal Slurry, CS 100mg/ml)を作成した。全実験を通じ同一起源のCS保存液を用いた。CS 1.5mg/g体重をヒト早産相当である4日齢の野生型FVBマウスに腹腔内投与し作成した。(2)rh-TM(10.0mg/kg)を4日齢マウスに皮下投与し、有害事象を検討した。(3)生食およびrh-TM(3.0mg/kg群または10.0mg/kg群)を皮下投与した6時間後にCS投与により敗血症を誘導し、投与後7日間の死亡率を比較した。

結果は、敗血症死亡率は、rh-TM 3mg/kg群では生食群と比して有意に低下した。一方、rh-TM 10mg/kg群では生食群と比して死亡率が有意に高かった(図4)。

図4 rh-TM(3mg/kg, 10mg/kg)投与群とPBS投与群の生存率



Ashina M, et al.

Sci Rep. 2020;10(1):333より引用

結論として、早産児マウス敗血症モデルにおいて、rh-TM 3.0mg/kgの適量投与は保護的に作用する一方、rh-TM 10.0mg/kgの過量投与は凝固障害を助長し悪影響を及ぼす可能性が示唆された。薬物的HO-1誘導併用療法を実施するには、本実験系を用いて行っていく。

#### 今後の展望

前述のごとく、新型コロナウイルス感染症の影響もあったが、早産児マウス敗血症モデルに対するMSCs治療実験の基盤を確立することができた。今後は、社会情勢も鑑みながら更なる研究の発展を目指していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10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 3件）

1. 著者名 Ashina Mariko, Fujioka Kazumichi, Nishida Kosuke, Okubo Saki, Ikuta Toshihiko, Shinohara Masakazu, Iijima Kazumoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Recombinant human thrombomodulin attenuated sepsis severity in a non-surgical preterm mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-57265-2	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 Miyachi Harunori, Fujioka Kazumichi, Okubo Saki, Nishida Kosuke, Ashina Mariko, Ikuta Toshihiko, Okata Yuichi, Maeda Kosaku, Iijima Kazumoto, Bitoh Yuko	4. 巻 -
2. 論文標題 Insulin Therapy for Hyperglycemia in Neonatal Sepsis Using a Preterm Mouse Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14126	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 Ohyama Shohei, Fujioka Kazumichi, Fukushima Sachiyo, Abe Shinya, Ashina Mariko, Ikuta Toshihiko, Nishida Kosuke, Matsumoto Hisayuki, Nakamachi Yuji, Tanimura Kenji, Yamada Hideto, Iijima Kazumoto	4. 巻 20
2. 論文標題 Diagnostic Value of Cytomegalovirus IgM Antibodies at Birth in PCR-Confirmed Congenital Cytomegalovirus Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3239 ~ 3239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20133239	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 Fukushima Sachiyo, Morioka Ichiro, Ohyama Shohei, Nishida Kosuke, Iwatani Sota, Fujioka Kazumichi, Mandai Tsurue, Matsumoto Hisayuki, Nakamachi Yuji, Deguchi Masashi, Tanimura Kenji, Iijima Kazumoto, Yamada Hideto	4. 巻 41
2. 論文標題 Prediction of poor neurological development in patients with symptomatic congenital cytomegalovirus diseases after oral valganciclovir treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 743 ~ 750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2019.04.016	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 Ohyama Shohei, Morioka Ichiro, Fukushima Sachiyo, Yamana Keiji, Nishida Kosuke, Iwatani Sota, Fujioka Kazumichi, Matsumoto Hisayuki, Imanishi Takamitsu, Nakamachi Yuji, Deguchi Masashi, Tanimura Kenji, Iijima Kazumoto, Yamada Hideto	4. 巻 20
2. 論文標題 Efficacy of Valganciclovir Treatment Depends on the Severity of Hearing Dysfunction in Symptomatic Infants with Congenital Cytomegalovirus Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1388 ~ 1388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20061388	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 市川 裕大, 藤岡 一路, 阿部 真也, 芦名 満理子, 福嶋 祥代, 生田 寿彦, 大山 正平, 西田 浩輔, 野津 寛大, 飯島 一誠	4. 巻 49
2. 論文標題 第2子に偽性低アルドステロン症を認め、第1子にも高レニン・高アルドステロン血症を認めた二絨毛膜二羊膜双胎例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 1675-1678
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 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 西田 浩輔, 藤岡 一路, 森沢 猛, 米谷 昌彦, 飯島 一誠	4. 巻 55
2. 論文標題 母体の尾骨突出を認めた新生児頭蓋骨陥没骨折の2例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本周産期・新生児医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 848-851
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 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 西田 浩輔, 森本 紗代, 藤岡 一路	4. 巻 -
2. 論文標題 【新生児医療67の臨床手技とケア タイミング、流れ&コツ、評価まで見える】(第2章)治療・検査の手技 (5節)検査【エコー、生理機能検査】聴性脳幹反応 ABRとaABR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 with NEO	6. 最初と最後の頁 111-115
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 市川 裕太, 藤岡 一路, 芦名 満理子, 阿部 真也, 福嶋 祥代, 生田 寿彦, 大山 正平, 西田 浩輔, 野津 寛大, 飯島 一誠	4. 巻 72
2. 論文標題 出生後初回の採血で著明な高K血症を呈した尿路奇形を伴わない続発性偽性低アルドステロン症の1新生児例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児科臨床	6. 最初と最後の頁 1030-1034
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 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 軽度の片側性水腎症に合併した続発性偽性低アルドステロン症の1新生児例	4. 巻 72
2. 論文標題 西田 浩輔, 藤岡 一路, 芦名 満理子, 阿部 真也, 福嶋 祥代, 生田 寿彦, 大山 正平, 飯島 一誠	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児科臨床	6. 最初と最後の頁 337-341
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 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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西田浩輔、藤岡一路、芦名満理子、阿部真也、福嶋祥代、大山正平、生田寿彦、飯島一誠
2. 発表標題 当院で経験した新生児偽性低アルドステロン症 (Pseudohypoaldosteronism: PHA) 13例の検討
3. 学会等名 日本周産期・新生児医学会第55回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田浩輔、杉岡勇典、仲宗根瑠花、永井貞之、菅秀太郎、阿部真也、芦名満理子、福嶋祥代、大山正平、生田寿彦、藤岡一路、飯島一誠
2. 発表標題 先天性サイトメガロウイルス感染症児における生後早期の頭部MRI所見
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔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
連携研究者	藤岡 一路  (KAZUMICHI FUJIOKA)  (20568810)	神戸大学・医学部附属病院・講師   (14501)	研究指導
連携研究者	芦名 満理子  (Ashina Mariko)  (50836442)	神戸大学・医学部附属病院・助教   (14501)	動物実験、分子生物学的実験

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
---------	---------