

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10306

研究課題名(和文) 口腔バイオフィームに対するイオン徐放性資材のプレバイオティクスとしての応用研究

研究課題名(英文) Study on an application of ion-releasing materials as a prebiotics against oral biofilm

研究代表者

加藤 一夫 (KATO, KAZUO)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：60183266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：S-PRGフィラーは、Al、B、F、SiおよびSrなどの無機イオンを徐放する特性をもつ。ブラッシングによるS-PRGフィラー5wt%配合歯磨剤からのミネラル溶出率は、Al、BおよびSrで2～3%、FとSiは20%以上で、ミネラルにより溶出速度に差が見られた。S-PRGフィラー抽出液に暴露した口腔バイオフィームでは、*S. anguinus*に対する*S. mutans*の密度比が20～40%低下するとともに、AlとSrの濃度は2.74～4.48倍および114～146倍に上昇したことから、S-PRGフィラー由来ミネラルが口腔バイオフィームに対してプレバイオティクスとして作用することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔バイオフィーム感染症である齲蝕の発症リスクは、砂糖の頻回摂取や唾液流量の減少などで、酸産生菌や酸耐性菌が選択的に増加することで上昇する。酸産生を減少させる微生物群の成長を促進し、多様でバランスのとれた生態系へバイオフィームを回復させる作用を持つプレバイオティクスの開発は、高齢者などの齲蝕を予防管理する上で重要である。広く国民に定着した保健行動であるブラッシングで、プレバイオティクスという新たな要素を付加した歯磨剤を使用できれば、バイオフィームの除去が困難な幼児、障害者および高齢者を中心に、特別な対応を取ることなく、齲蝕に対するリスクを大きく低下させることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The surface of pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) fillers has the ability to release mineral ions, such as Al, B, F, Si and Sr.

Mineral releasing rates from the tooth paste containing 5wt% of S-PRG fillers during tooth brushing were 2 - 3 % in Al, B and Sr, and were more than 20% in F and Si, indicating differences in releasing rates among minerals.

In the oral biofilms exposed to the filtrate of S-PRG fillers, the density ratio of *S. mutans* to *S. sanguinis* decreased by 20 - 40%, and the concentrations of Al and Sr increased respectively by 2.74 - 4.48 fold and by 114 - 146 fold. These results indicated that S-PRG filler-derived minerals act as a prebiotic against an oral biofilm.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：S-PRGフィラー配合歯磨剤 口腔バイオフィーム プレバイオティクス 齲蝕予防 Streptococcus mutans Streptococcus sanguinis フッ化物 ミネラル

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

(1) 口腔バイオフィルム感染症としての齲蝕の発症リスクは、砂糖の頻回摂取や唾液流量の減少などにより、バイオフィルム内で酸産生菌や酸耐性菌が選択的に増加し、多様性の低下した齲蝕誘発性の高い状態 (dysbiosis) へシフトすることで増加する。プレバイオティクスは、宿主の健康維持に関連する共生微生物叢の成長を促進する物質であり、酸産生を減少させる微生物群の成長を促進し、多様でバランスのとれた生態系 (symbiosis) へバイオフィルムを回復させる作用を持つプレバイオティクスの開発は、バイオフィルムの除去が困難な幼児、障害者および高齢者などでの齲蝕リスクの低下が期待でき、齲蝕の予防管理を行う上で重要なツールになる可能性がある。

(2) 一方、S-PRG フィラーは、ガラスコアの表層に安定化したガラスアイオノマー相を形成させたもので、Al、B、F、Si、Na および Sr という 6 種類の無機イオンを徐放する性質をもつ。主に S-PRG フィラーを配合した医療機器 (歯科材料) を用いた研究を通じて、S-PRG フィラーには、口腔バイオフィルムの形成阻害や酸産生の抑制、緩衝能あるいは抗菌活性といった齲蝕予防に有用な様々な生理活性のあることが明らかにされている。最近では、S-PRG フィラーを配合した試験歯磨剤の濾過液を作用させた口腔バイオフィルムでは、フッ化物停滞性が促進されることが明らかとなった¹⁾。

2. 研究の目的

(1) S-PRG フィラーの口腔への輸送手段 (vehicle) として歯磨剤を応用し、ブラッシングにより S-PRG フィラーから放出される無機イオンが、効率よく口腔内に拡散できれば、口腔バイオフィルムや歯面等への作用が期待できる。しかし、S-PRG フィラーを配合した試験歯磨剤の有効性を検討した過去の研究では、S-PRG フィラーから徐放された無機イオンを高濃度で含有する歯磨剤スラリーの濾過液が使用されてきた。そこで、S-PRG フィラー配合歯磨剤の効果的な使用方法を明らかにする目的で、ブラッシング時に歯磨剤から徐放されるミネラルの溶出速度や溶出特性を検討した。また、S-PRG フィラーから放出したフッ化物イオンの口腔環境中での停滞性を、従来のフッ化物応用による場合と比較検討した。

(2) 口腔細菌によるアルカリ産生は、バイオフィルムの pH に直接影響し、齲蝕原性菌の出現を抑制する。塩基性アミノ酸であるアルギニンは、細菌の arginine deiminase system (ADS) により、オルニチン、アンモニアおよび二酸化炭素に代謝される。このアルカリ生成の主要な経路の一つである ADS を発現する *Streptococcus sanguinis* を symbiosis 状態の指標細菌に、代表的な齲蝕関連菌である *Streptococcus mutans* を dysbiosis 状態の指標とし、S-PRG フィラーに由来する無機イオンを作用させた in situ 口腔バイオフィルムを試料として、バイオフィルム内における両菌種の密度や比率、生息域の変化などを分析することにより、プレバイオティクスとしての利用可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 被験者 19 名を対象に、S-PRG フィラー 5% 配合試験歯磨剤を用いて、使用量 2 群 (0.5 と 1.0g) およびブラッシング時間 3 群 (1、3 および 5 分) の組合せで、計 6 回ブラッシングを実施した。安静時唾液 (ベースライン) を採取後、通常の方法でブラッシングを行い、貯まった唾液および蒸留水 10mL による 2 回の漱ぎ液を容器に回収した。回収した吐出液は、直ちに秤量し、遠沈 (2,000rpm、3 分) 後、上清から試料 (0.6mL) を 2 検体採取し、凍結乾燥させ、分析まで保存した。一方の凍結乾燥試料には酢酸緩衝液 (pH5.2) を添加しイオン電極法で F を定量した。もう一方には、濃硝酸 1% を含む 1N 過塩素酸を添加し、ICP 発光分光分析法で Na を除く Al、B、Si および Sr を定量した。回収した吐出液の容量とミネラル濃度から、ブラッシング時に溶出したミネラル量を算出し、歯磨剤スラリー (歯磨剤:水 = 1:3) の濾過液中のミネラル濃度を基準に、歯磨剤からのミネラル溶出率 (%) を推定した。

(2) S-PRG フィラー配合歯面研磨材とフッ化ナトリウム配合歯磨剤のスラリー濾過液および 2% フッ化ナトリウム歯面塗布液から、3 種類の 100ppm フッ化物溶液 (以下、溶液 A、B および C) を調整した。被験者 22 名を対象に、各溶液 10mL で 1 分間洗口させ、洗口液の吐出から、0、10、20、30、60 および 90 分後の計 6 回、無刺激下で 3 分間口腔底に貯留した混合唾液を回収した。唾液試料の回収は、期間を空けて、ランダムに 3 回実施した。回収した唾液は、直ちに秤量し、遠沈後の上清から分析用試料を採取し、予備凍結後、凍結乾燥試料として分析まで保存した。回収した唾液量に相当する酢酸緩衝液 (pH5) を添加し、F を抽出した後、イオン電極法により F の定量を行った。一部のケースでは、洗口後に頬粘膜から唾液を回収し、フッ化物濃度を測定した。(1) と (2) の結果は Kruskal-Wallis test とその後の多重比較で検定した。

(3) S-PRG フィラー配合歯面研磨材(松風、PRG プロケアジェル)または S-PRG フィラー配合前の研磨剤ベースに重量比 1 対 3 で蒸留水を加えたスラリーの濾過液を実験処理液および対照処理液とした。被験者 10 名の左右上顎臼歯部に 1 対のエナメル質スラブを装置で固定し、スラブ上にバイオフィルムを 5 日間堆積させた。その間、dysbiosis の環境を創出するため、1 日 3 回、口腔外で 5% ショ糖溶液に 1 分間浸漬し、更にこの操作の間(1 日 2 回)、一方を実験処理液に、もう一方を対照処理液に浸漬した。装置を凍結乾燥後、包埋し、2 組の実験群と対照群試料を作製した。1 組の試料は、表層、中層および内層域から試料分画(厚さ 100 μm)を採取し、*S. sanguinis* と *S. mutans* をそれぞれ symbiosis と dysbiosis の指標として、両者の細菌密度を定量的リアルタイム PCR で分析した。もう 1 組は、表層から切片(2 μm または 4 μm)を交互に反復採取し、3 層の試料分画(厚さ 300 μm)に分離した。濃硝酸 1% 添加 1N 過塩素酸で 4 μm 切片から抽出した Al、B、Si、Sr を ICP 発光分光分析法で定量し、結果は染色した 2 μm 切片の面積と切片の厚さから推定したバイオマス量で補正した。統計的検討はノンパラメトリック法で行った。

表1 歯磨剤濾過液中のミネラル濃度と推定された歯磨剤含有ミネラル量

| Element | Al | B | F | Si | Sr |
|---|-------|--------|-------|------|--------|
| Concentrations in the filtrate of toothpaste slurry* (ppm) | 315.8 | 428.5 | 208.7 | 10.6 | 1042.7 |
| Estimated minerals (μg) per gram of dentifrice | 947.4 | 1285.5 | 626.1 | 31.8 | 3128.1 |

*: prepared by mixing 1 part dentifrice and 3 parts distilled water

4. 研究成果
 (1) 歯磨剤スラリーの濾過液中のミネラル濃度とその濃度から推定された歯磨剤中のミネラル量を表 1 に示した。

4. 研究成果

(1) 歯磨剤スラリーの濾過液中のミネラル濃度とその濃度から推定された歯磨剤中のミネラル量を表 1 に示した。

吐出液中のミネラル量を、歯磨剤の使用量で比較すると、Al、B、Sr、0.5g \times 3 分および 0.5g \times 5 分群と 1.0g \times 1 分群との間を除く F、および、0.5g \times 1 分群と 1.0g \times 1 分および 1.0g \times 3 分群との間の Si で、1.0g 群の方が有意に多く、ミネラルの溶出は、歯磨剤の量に依存したが、ブラッシング時間による有意な差は認められなかった(図 1)。

ミネラル溶出率に関しては、F では、歯磨剤 0.5g で 53~55%、歯磨剤 1g で 30~34% となり、ブラッシング時間に関わらず、歯磨剤 0.5g の群で有意に上昇していた。Si は、ブラッシング条件により 20~38% の範囲で変動し、歯磨剤 0.5g の 3 分および 5 分群で 1.0g \times 1 分群より有意に高かった。一方、Al、B および Sr の溶出率はいずれも 2% 前後で、ブラッシング条件に

図1 吐出液中のミネラル量 (μg , mean \pm SD, n = 19)

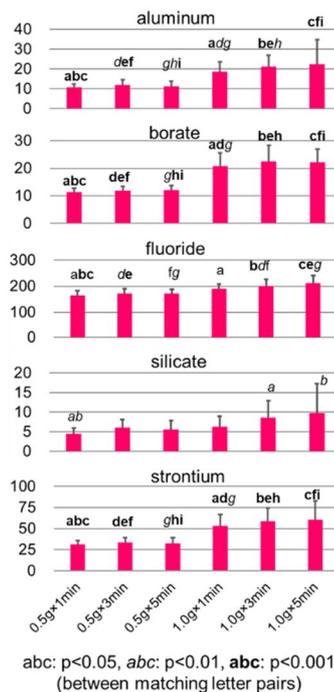


図2 ミネラルの推定溶出率 (% , mean \pm SD, n = 19)

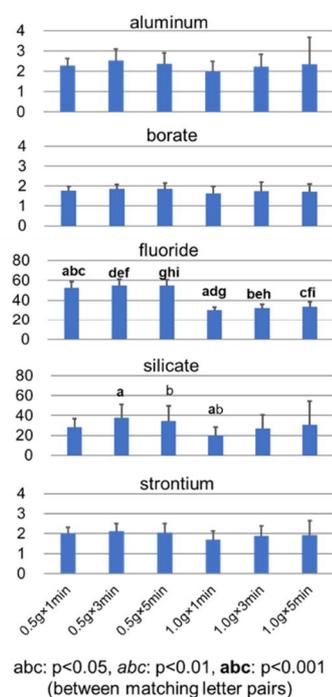
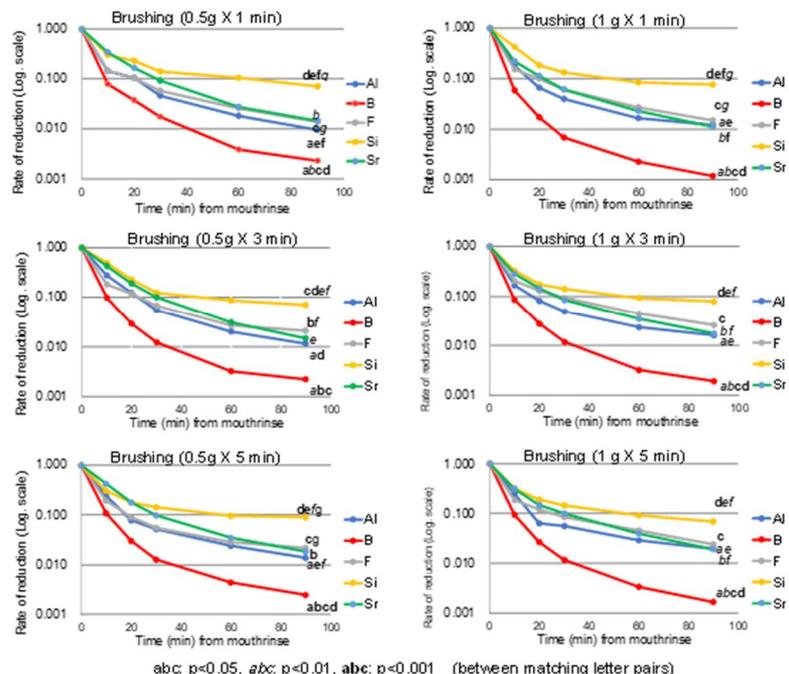


図3 ミネラルの口腔からの減少率 (% , mean \pm SD, n = 19)



関わらず差は見られなかった（図2）。

S-PRG フィラーに由来するミネラルは、5分以内のブラッシングで歯磨剤から口腔内に徐放されることが明らかになった。しかし、F と Si の歯磨剤からの溶出率は比較的高く、歯磨剤の使用量が増すと低下する傾向を示したが、Al、B および Sr では、いずれのブラッシング条件でもミネラル溶出率が低かったことから、ミネラル間でフィラーから溶出する特性に違いのある可能性が示唆された。

一方、口腔環境中に放出されたミネラル濃度は経時的に低下したが、その減少速度はAl、F および Sr ではほぼ同じ割合で低下したのに対し、Si では有意に遅く ($p < 0.01$)。一方、B では有意に早く減少した ($p < 0.001$) ことから、口腔粘膜との親和性がミネラルによって異なることが示唆された（図3）。

(2) S-PRG フィラー配合歯面研磨材スラリーの濾過液から調整した溶液 A では、洗口から 0 分および 10 分後に回収した唾液中のフッ化物濃度が、溶液 B または C におけるフッ化物濃度よりも有意に低下していた（図4）。

洗口後に粘膜面から採取した唾液中のフッ化物濃度は、溶液 B で A 液および C 液より有意に高く、A 群と C 群の間に有意な差は認められないものの、A 群が最も低い値を示した（図5）。

ラウリル硫酸ナトリウム（SLS）を添加したフッ化物溶液で洗口すると、洗口 1 時間後に採取したブラークや唾液中のフッ化物濃度が有意に上昇していたという報告がある²⁾。そのため、図5に見られる歯磨剤から調製した溶液 B に曝露した粘膜面における唾液フッ化物濃度の増加は、歯磨剤に配合されていた SLS の効果によって生じた可能性がある。

一方、図4と5の所見は、S-PRG フィラーに由来するフッ化物が、従来のフッ化物応用と比較して、短時間のうちに口腔環境から消失する可能性を示唆している。各洗口により口腔内に持ち込まれるフッ化物量は同じであることから、洗口後に溶液を

吐き出す時点で、溶液 A では、吐出液中にフッ化物がより多く残留していた可能性がある。

表2および3に洗口液に対する唾液サンプルのミネラル濃度の比“ / ”を示した。溶液 A で洗口後、直ちに（0分後）に採取した唾液では、フッ化物を除く各ミネラルの濃度比“ / ”は互いに類似していた（表2）ことから、各ミネラルは3分間に貯留した唾液によりほぼ均等に希釈されていた。一方、洗口液の吐出から3分後の粘膜面唾液では、B、Al、Si の“ / ”は、Sr に比べて低く、ミネラル間で大きな差が見られた（表3）。

S-PRG フィラーに由来するフッ化物で、口腔環境からのクリアランスが加速した原因は不明

図4 唾液中フッ化物濃度の経時変化

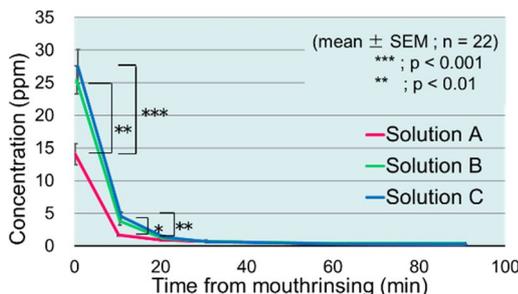


図5 粘膜面唾液中のフッ化物濃度

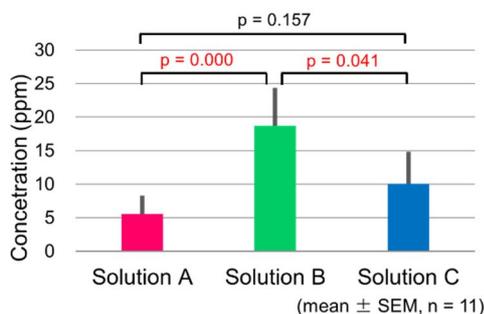


表2 唾液中のミネラル濃度の経時変化

| ミネラル濃度 (ppm) | 溶液 A | | | | | 溶液 B | | | | | 溶液 C | | | | | 洗口からの経過時間 (分) |
|--------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|---------------|
| | F | Al | B | Si | Sr | F | Al | B | Si | Sr | F | Al | B | Si | Sr | |
| 洗口液 (α) | 101.0 | 190.1 | 233.3 | 6.55 | 507.3 | 97.1 | 0.00 | 0.24 | 17.4 | 0.12 | 101.0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0 |
| 唾液 (β) | 14.05 | 42.66 | 54.49 | 1.18 | 111.2 | 35.73 | 0.10 | 0.02 | 3.10 | 0.04 | 29.67 | 0.16 | 0.02 | 0.55 | 0.10 | 10 |
| | 1.72 | 4.17 | 7.02 | 0.50 | 21.7 | 3.99 | 0.07 | 0.01 | 0.77 | 0.03 | 3.76 | 0.10 | 0.01 | 0.54 | 0.10 | 20 |
| | 0.99 | 1.34 | 2.26 | 0.54 | 10.7 | 1.39 | 0.09 | 0.02 | 0.84 | 0.03 | 0.89 | 0.09 | 0.03 | 0.58 | 0.00 | 30 |
| | 0.74 | 0.70 | 0.95 | 0.60 | 6.8 | 0.67 | 0.04 | 0.03 | 0.97 | 0.02 | 0.47 | 0.13 | 0.01 | 0.59 | 0.01 | 60 |
| | 0.29 | 0.32 | 0.18 | 0.57 | 2.2 | 0.32 | 0.18 | 0.03 | 0.75 | 0.01 | 0.20 | 0.10 | 0.01 | 0.61 | 0.00 | 90 |
| | 0.17 | 0.20 | 0.07 | 0.62 | 0.8 | 0.33 | 0.06 | 0.01 | 0.74 | 0.01 | 0.15 | 0.10 | 0.01 | 0.56 | 0.00 | 90 |
| β / α (%) | 13.9 | 22.4 | 23.4 | 18.0 | 21.9 | 36.8 | - | 7.7 | 17.8 | 31.4 | 29.4 | - | - | - | - | 0 |
| | 1.7 | 2.2 | 3.0 | 7.6 | 4.3 | 4.1 | - | 4.4 | 4.4 | 25.0 | 3.7 | - | - | - | - | 10 |
| | 1.0 | 0.7 | 1.0 | 8.3 | 2.1 | 1.4 | - | 6.5 | 4.8 | 25.0 | 0.9 | - | - | - | - | 20 |
| | 0.7 | 0.4 | 0.4 | 9.1 | 1.3 | 0.7 | - | 12.5 | 5.5 | 20.3 | 0.5 | - | - | - | - | 30 |
| | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 8.7 | 0.4 | 0.3 | - | 11.0 | 4.3 | 12.6 | 0.2 | - | - | - | - | 60 |
| | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 9.4 | 0.2 | 0.3 | - | 4.5 | 4.2 | 7.4 | 0.1 | - | - | - | - | 90 |

表3 粘膜面唾液のミネラル濃度

| ミネラル濃度 (ppm) | 溶液 A | | | | | 溶液 B | | | | | 溶液 C | | | | |
|--------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|
| | F | Al | B | Si | Sr | F | Al | B | Si | Sr | F | Al | B | Si | Sr |
| 洗口液 (α) | 102.3 | 165.2 | 222.7 | 4.3 | 419.8 | 101.4 | 0.0 | 0.0 | 15.3 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 粘膜面唾液 (β) | 5.55 | 5.13 | 18.14 | 0.00 | 82.07 | 18.72 | 0.00 | 0.00 | 3.79 | 0.00 | 10.05 | 0.00 | 0.00 | 0.51 | 0.01 |
| β / α (%) | 5.4 | 3.1 | 8.1 | 0.0 | 19.6 | 18.5 | - | - | 24.8 | - | 10.1 | - | - | - | - |

であるが、粘膜面の唾液におけるミネラル間の“ / ”の相違は、粘膜表面でのフッ化物の保持に対して負の影響（例えば、フッ化物との結合）を反映した可能性がある。今後、口腔粘膜と唾液の界面におけるミネラルの動態や洗口後の吐出液のミネラル濃度を検討する必要がある。こうした結果は、S-PRG フィラーから放出される複数の無機イオンが、従来のフッ化物応用に由来するフッ化物よりも、口腔環境中のフッ化物の停滞性に影響を与える可能性があることを示唆した。

(3) S-PRG フィラー由来の無機イオンを含む実験処理液と対照処理液の作用したバイオフィーム内における層別の細菌密度を図6に示した。細菌の密度は、バイオフィームの内部に向かって低下する傾向が見られた。

表層、中層および内層域における *S. sanguinis* に対する *S. mutans* の密度の比は、実験群で 0.0359、0.0254 および 0.0157、対照群で 0.046、0.0325 および 0.0255 となり、3層を合わせた実験群の比 0.0257 は、対照群の 0.0355 よりも有意 ($p=0.004$) に低下した (図7)。S-PRG フィラー由来の無機イオンで処理されたバイオフィームでは、齲蝕関連菌である *S. mutans* の比率が低下し、ADS を発現する *S. sanguinis* が相対的に増加することが明らかとなった。また、バイオフィーム内層における両菌種の密度比は、実験群 ($p=0.011$)、対照群 ($p=0.005$) とともに表層より有意に低下していた。

実験群におけるバイオフィームの表層、中層および内層のミネラル濃度には大きな差は見られず、S-PRG フィラー由来の無機イオンはバイオフィーム内部まで浸透していた (図8)。対照に対する実験群の Al と Sr の各層における濃度比は、2.74 ~ 4.48 倍 ($p=0.005 \sim 0.017$) および 114.3 ~ 146.1 倍 ($p=0.005 \sim 0.012$) を示した。B と Si については有意な差は認められず、ミネラルの種類により濃度に大きな差が認められた。

しかし、結果は、S-PRG フィラーに由来する一部のミネラルが口腔バイオフィームに対してプレバイオティクスとして作用することを示唆した。

<参考文献>

- [1] Kato K et al. Archs oral Biol, 117 (2020) 104777.
- [2] Vogel GL et al. Caries Res, 49, 291-6, 2015.

図6 バイオフィーム容積で補正した細菌密度の分布

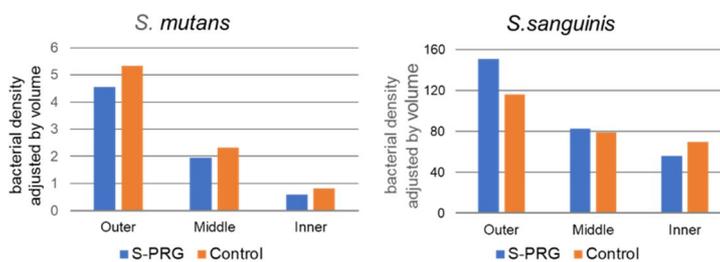


図7 バイオフィーム内の細菌密度比

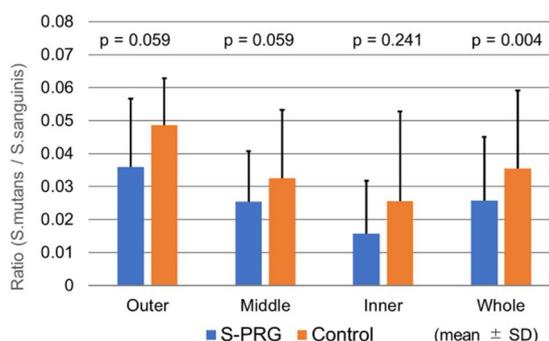
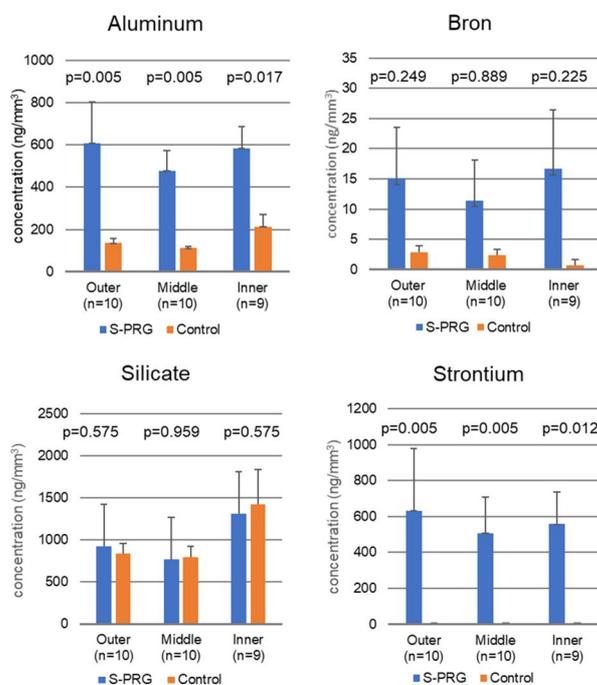


図8 バイオフィーム内のミネラル濃度



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 加藤一夫、嶋崎義浩 |
| 2. 発表標題 ブラッシング時のS-PRGフィラー配合歯磨剤からの無機イオン溶出速度の検討 |
| 3. 学会等名 第80回日本公衆衛生学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuo Kato, Yoshihiro Shimazaki |
| 2. 発表標題 Mineral release from toothpaste containing S-PRG fillers during toothbrushing and subsequent oral retention |
| 3. 学会等名 The 69th ORCA Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 加藤一夫、嶋崎義浩 |
| 2. 発表標題 S-PRG フィラー由来フッ化物イオンの口腔内停滞性の検討 |
| 3. 学会等名 第81回日本公衆衛生学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuo Kato, Yoshihiro Shimazaki |
| 2. 発表標題 Fluoride clearance from the oral environment after rinsing with an eluted solution of S-PRG fillers |
| 3. 学会等名 The 70th ORCA Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤一夫 |
| 2. 発表標題 S-PRGフィラー抽出液による洗口後の口腔環境中のフッ化物停滞性 |
| 3. 学会等名 第64回日本歯科医療管理学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuo Kato, Ryo Kutsuna, Yoshiaki Kawamura, Yoshihiro Shimazaki |
| 2. 発表標題 Prebiotic caries preventing effects of mineral ions released from S-PRG fillers on oral biofilm |
| 3. 学会等名 The 71st ORCA Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤一夫、嶋崎義浩 |
| 2. 発表標題 S-PRGフィラー由来ミネラルのプレバイオティクスとしての齲蝕予防効果の検討 |
| 3. 学会等名 第83回日本公衆衛生学会 |
| 4. 発表年 2024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 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|