

原 著

培養細胞を用いたルイボス茶葉ポリフェノールの腸炎症抑制作用

奥和之^{*1} 三浦紀称嗣^{*1} 宮田富弘^{*1}

要 約

近年患者数の増加が懸念されている炎症性腸疾患は、腸管免疫系を制御するサイトカインの異常亢進に起因することが知られている。本研究では、腸管上皮細胞が産生する炎症性サイトカインに対する健康茶葉ポリフェノール (PP) の影響を検討した。ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を用いて、TNF- α による細胞障害性とサイトカイン分泌亢進に対する健康茶葉 PP の作用を検討したところ、ルイボス茶葉 PP および緑茶カテキンを添加することによって、細胞障害性および炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8, IL-1 β) 産生を顕著に抑制することが見出された。その作用は、TNF- α による炎症性サイトカイン遺伝子発現の転写因子 NF- κ B の遊離と活性化 (リン酸化) 抑制によることが明らかとなった。以上の結果から、ルイボス茶および緑茶ポリフェノールは、強い炎症抑制効果があることが示唆された。

1. 緒言

炎症性腸疾患 (IBD : inflammatory bowel disease) は、主に若年層を中心にその罹患率が急激に増加している疾患である。IBD は潰瘍性大腸炎とクローン病が含まれるが、いずれもストレスなど外的因子に対する腸管自律神経あるいは腸管免疫の異常による炎症メディエーターを介した腸管の微小循環障害・組織破壊によると考えられる^{1,2)}。すなわち異常亢進した腸管マクロファージなどが産生する tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 β (IL-1 β) といった炎症性サイトカインが腸管上皮細胞に作用し、腸管上皮細胞はこれらの刺激によってさらに好中球の遊走に関与する interleukin-8 (IL-8) を分泌する。その結果、腸管粘膜組織に好中球が浸潤・集積し腸管上皮に細胞傷害をもたらすことによって、腸炎症状が進展する³⁾。

現在、健康長寿を目指し様々な健康茶の摂取が行われている。ルイボス (*Aspalathus linearis*) は、アフリカ原産のマメ科植物で、その葉と茎を発酵したものはルイボスティーとして飲用されている。現地では、ぜんそく、腹痛、頭痛などに、伝統的な薬

草茶として用いられてきた。また、ルイボス茶葉には種特有のポリフェノール (アスパラチンやノトファギン) を含んでおり、抗酸化作用も強い^{4,6)}。一方、茶 (*Camellia sinensis* L.) は、カフェイン、テアニン (アミノ酸類)、フラボノイドを多く含んでおり、特に緑茶はカテキン類を多く含有することを特徴とする。その中でも、緑茶カテキン類の主成分であるエピガロカテキンガレート (EGCG) は、免疫系に対して抑制的に作用する報告が多い⁷⁾。一方 Wonhwa & Jong⁸⁾ は、LPS 活性化ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた敗血症モデルにて、ルイボス茶葉に含まれる 2 種のジヒドロカルコン構造物が、LPS 誘発性バリア破壊、細胞接着分子 (CAM) の発現およびヒト内皮細胞への好中球の接着 / 経内皮遊走を阻害すること、LPS による腫瘍壊死因子- α (TNF- α) またはインターロイキン-6 (IL-6) の産生、および核因子- κ B (NF- κ B) または細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 1/2 の活性化を抑制し、炎症機能を有することを示唆している。TNF- α 誘導による炎症性サイトカイン分泌には、炎症性サイトカイン遺伝子発現の転写因子 NF- κ B の遊離と核内

*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科

(連絡先) 奥和之 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学

E-mail : okukaz1803@mw.jkawasaki-m.ac.jp

移行して遺伝子応部位に結合しさらにリン酸化による NF- κ B の活性化が必要である⁹⁾。

本研究では、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞 F-hiSIEC を用いた TNF- α 誘導腸管炎症モデルによる各種健康茶葉のポリフェノールの炎症抑制効果を比較検討した。

2. 方法

2.1 実験材料

各種健康茶葉は、グリーンルイボス (*Aspalathus linearis*, 未発酵ルイボス, 以下 GRT), 発酵ルイボス (RT), 緑茶 (*Camellia sinensis*, Green T), 紅茶 (*Camellia sinensis*, ダージリン, Black T), 烏龍茶 (*Camellia sinensis*, Oolong T), 杜仲茶 (*Ecommia ulmoides*, ET), 桑の葉茶 (*Morus alba*, Mulberry Leaves Tea : MLT) を市販購入して用いた。ポリフェノール (PP) の抽出は、各健康茶葉25g を70% アセトン水溶液500mL にて一晩攪拌抽出したものをろ過して残渣を除き、ロータリーエバポレーターでアセトンを除去了。その後、80%エタノール水溶液になるようエタノールを添加して再溶解したものを、陽イオン交換樹脂 HP-1 を用いた分取カラムクロマトグラフィーに供し、80%エタノール水溶液で PP を溶出させ、溶出液を PP 粗画分として回収した。ロータリーエバポレーターで乾固したものを、細胞培養用 DMSO (富士フィルム・和光株) に溶解したものを実験使用まで -30℃ で凍結保存した。

2.2 培養細胞

培養細胞は、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞 F-hiSIEC (富士フィルム・和光株) を用いた¹⁰⁾。実験開始の2週間前に凍結保存した F-hiSIEC を解凍し、付属の播種用培地を加えて遠心分離 (190×g, 5min) して上清を除去する操作を2回繰り返して凍結保存液を除いた。その後、播種用培地を加え懸濁した F-hiSIEC をコラーゲンコーティングされた 24well プレートに 1×10^5 cell/well になるように分注し、24時間の接着培養した。接着培養後、培地を 10% 牛胎児血清 (FCS, 不働化済), 2mM 非必須アミノ酸混合液, ペニシリン (100 U/mL), ストレプトマイシン (100 μ g/mL) 含有 D-MEM 培地に交換し 37℃・5% CO₂ 下で 14日間培養した (小腸上皮細胞に分化)。

2.3 TNF- α 誘導による F-hiSIEC の炎症反応に及ぼす健康茶葉ポリフェノールの影響

TNF- α を炎症メディエーターとした腸管炎症モデルを用いて、健康茶葉ポリフェノール (PP) 添加の影響を検討した。小腸上皮細胞に分化させた F-hiSIEC 細胞培養プレート (24well プレート) を

D-MEM 培地で培地交換 (1mL) したのち、各健康茶葉 PP の DMSO 溶解液を、市販の高カテキン含有緑茶 (500~1500 μ g/mL) 飲用時を想定して、ポリフェノールとして終濃度 100 μ g/mL となるよう添加し、24時間培養した。また、ポジティブコントロールとして、抗炎症性を示す interleukin 10 (IL-10) を終濃度 20ng/mL 添加区を設けた。次に、炎症メディエーターとして TNF- α を 200 μ g/mL-PBS (-) を 50 μ L (1well あたり 10ng) 添加し、37℃・5% CO₂ 下で、24時間培養した。培養後培養上清を回収し、TNF- α 誘導による細胞障害性の指標として乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を細胞毒性試験キット (LDH Assay, 富士フィルム・和光株) にて、培養上清中のサイトカイン (炎症性サイトカイン IL-6, IL-8, IL-1 β) 分泌量は、ELISA kit (Human IL-6, IL-8, IL-1 β ELISA kit, Biotechne 社製) を用いて測定した。また、NF- κ B (p65) / 活性型 NF- κ B (pp65) 測定用は TNF- α 添加後 8 時間培養する系を別途設け、培養後細胞を回収し、細胞溶解液 (M-PER, Thermo scientific 社製) 1mL で溶解後、遊離型 / 活性型 NF- κ B (p65/pp-65) を ELISA キット (NF- κ B p65 (Total/ Phospho) ELISA kit, ENZO life science 社製) を用いて測定した。

2.4 統計処理

本研究では、各実験群を n=5 で行った。結果は平均値 $\pm$ SD (標準偏差) で示した。各データは、統計処理ソフト SPSS (Ver. 22) を用いて、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Tukey-Kramer 法を用いて平均値を比較した。いずれの統計結果も危険率が 5% 未満 ($p < 0.05$) を有意とみなした。

3. 結果

3.1 TNF- α 誘導細胞障害性に及ぼす健康茶葉ポリフェノールの影響

TNF- α 刺激による細胞障害性について、培養上清に逸脱酵素として分泌される乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性で評価した。細胞上清中の LDH 活性が高いほど細胞障害性が高く、活性が低いほど障害性も低いことを示す。培養上清中の LDH 活性を表1に示した。培養上清中の LDH 活性は、グリーンルイボス (GRT) でコントロール (PP 無添加) の 17%, 発酵ルイボス (RT) で 52%, 緑茶 (Green T) で 34% と有意に低下した (いずれも $p < 0.001$)。また、GRT の細胞障害抑制効果は容量依存的であった。

3.2 TNF- α 誘導炎症性サイトカイン分泌に及ぼす健康茶葉添加の影響

培養上清中の炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8 および IL-1 β) 濃度を図1に示した。杜仲茶 PP (ET)

表1 培養上清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性

PP		LDH活性 U/mL	
Cont.	0 μ g/mL	61.2 $\pm$ 1.9	(100)
GRT	100 μ g/mL	10.5 $\pm$ 1.2	(17) ***
	10 μ g/mL	34.9 $\pm$ 3.1	(57) ***
	1 μ g/mL	44.9 $\pm$ 3.7	(72) ***
RT	100 μ g/mL	31.6 $\pm$ 1.8	(52) ***
Green T	100 μ g/mL	20.9 $\pm$ 1.3	(34) ***
Black T	100 μ g/mL	49.2 $\pm$ 5.0	(80) **
Oolong T	100 μ g/mL	58.8 $\pm$ 1.6	(96)
ET	100 μ g/mL	61.4 $\pm$ 1.5	(100)
MLT	100 μ g/mL	62.3 $\pm$ 1.4	(102)

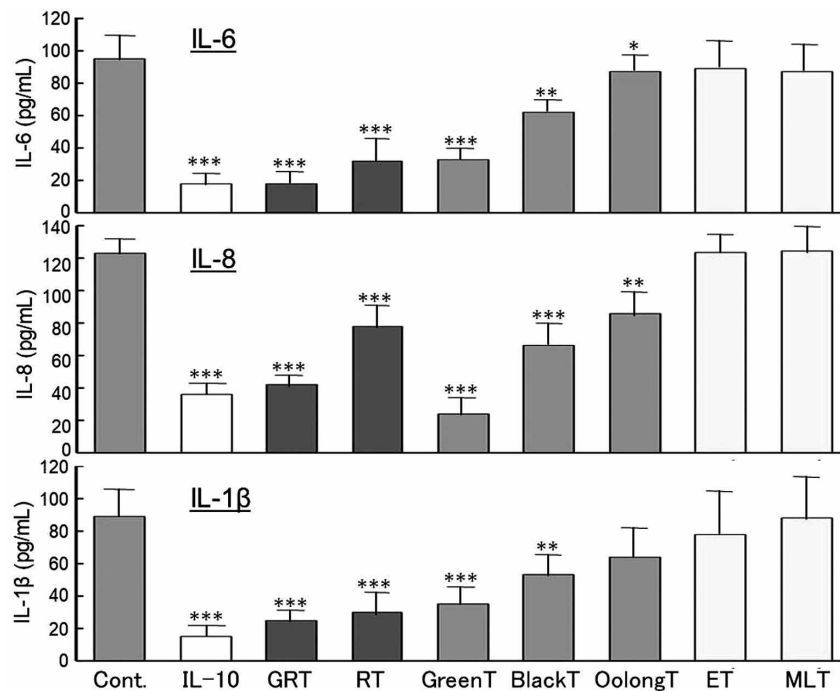
Mean $\pm$ SD, () :% of Cont.** Cont. に対して $p < 0.01$ で有意差あり.*** Cont. に対して $p < 0.001$ で有意差あり.

図1 培養上清中の炎症性サイトカイン濃度及ぼす健康茶葉 PPの影響

Cont. PP 無添加, GRT グリーンルイボス, RT ルイボス, Green T 緑茶, Black T 紅茶, Oolong 烏龍茶, ET 杜仲茶, MLT 桑の葉茶

* Cont. に対して $p < 0.05$ で有意差あり.** Cont. に対して $p < 0.01$ で有意差あり.*** Cont. に対して $p < 0.001$ で有意差あり.

および桑の葉茶 PP (MLT) 添加による炎症性サイトカイン濃度はコントロール (PP 無添加) と差がなかった. TNF- α 処理後の培養上清中炎症性サイトカイン IL-6濃度は, コントロールと比べ健康茶葉 PP 添加により減少し, 特に GRT でコントロールの19%, Green T 添加で35%とコントロー

ルに比べ有意に低下した (いずれも $p < 0.001$). マクロファージや好中球, 単球などの遊走性に関与するケモカイン IL-8では, GRT (コントロールの44%), Green T (25%) と有意に低かった (いずれも $p < 0.001$). また茶葉が同じ GRT (未発酵) と RT (発酵), Green T (未発酵) と紅茶 (Black T,

完全発酵), 烏龍茶 PP (Oolong T, 半発酵) で炎症性サイトカイン濃度を比較すると, IL-6濃度では GRT (RT の53%, $p<0.05$), Green T (Black T の53%, $p<0.01$, Oolong T の36%, $p<0.001$), IL-8濃度では GRT (RT の54%, $p<0.001$), Green T (Black T の26%, $p<0.001$, Oolong T の38%, $p<0.001$) と発酵茶葉に比べ未発酵茶葉 PP で IL-6濃度および IL-8濃度が低かった。

TNF- α と同様に炎症を惹起する IL-1 β 濃度は, IL-6濃度および IL-8濃度と同様に, GRT (コントロールの19%, $p<0.001$), 発酵ルイボス RT (34%, $p<0.001$), Green T (35%, $p<0.001$) と有意に低値を示した。添加濃度がポリフェノールの1/5000の抗炎症性サイトカイン IL-10 20ng/mL 添加では, IL-6 (コントロールの19%), IL-8 (29%), IL-1 β (17%) と有意に低かった (いずれも $p<0.001$)。

3.3 TNF- α 誘導による炎症性サイトカイン遺伝子発現の転写因子 NF- κ B の遊離と活性化 (リン酸化) に及ぼす健康茶葉ポリフェノール添加の影響

TNF- α 刺激による転写因子 NF- κ B について, TNF- α 刺激8時間後の細胞を回収し, 細胞溶解液中の溶解後の溶解液中に遊離した NF- κ B (p65) とリン酸化された活性型 NF- κ B (pp65) 濃度を ELISA 法で測定した。細胞溶解液中の遊離 NF- κ B (p65) と活性型 NF- κ B (pp65) 濃度を図2に示した。杜

仲茶や桑の葉茶ポリフェノールの p65 や pp65 濃度は, コントロール (ポリフェノール無添加) と差がなかった。細胞溶解液中の遊離 NF- κ B (p65) と活性型 NF- κ B (pp65) 濃度は, コントロールと比べルイボス茶葉 PP および茶 PP (カテキン類) 添加により減少し, 特に遊離 NF- κ B (p65) は GRT (コントロールの41%), Green T (38%), IL-10 (28%), 活性型 NF- κ B (pp65) は GRT (コントロールの10%), Green T (21%), IL-10 (8%) といずれも有意に低下した ($p<0.001$)。また, 遊離 NF- κ B / 活性型 NF- κ B 比 (p65/pp65) は, コントロール (1.15 ± 0.03) に対し, IL-10 (3.20 ± 0.09 , $p<0.01$), GRT (4.68 ± 1.65 , $p<0.01$), RT (1.70 ± 0.22 , $p<0.01$), Green T (2.12 ± 0.31 , $p<0.01$), Black T (1.39 ± 0.11 , $p<0.01$), Oolong T (1.22 ± 0.10 , n.s.), ET (桑の葉茶, 1.23 ± 0.11 , n.s.), MLT (杜仲茶, 1.35 ± 0.20 , n.s.) となった。

4. 考察

IBD は, 潰瘍性大腸炎及びクローン病に代表される難治性の消化器疾患であり, 主に若年者を中心にその罹患率は急激に増加している^{1,2)}。IBD は, 腸管免疫の異常による炎症メディエーターを介した腸管の微小循環障害・組織破壊によると考えられ, 異常亢進した腸管マクロファージ (M Φ) など分泌する炎症性サイトカインが腸炎症状の進行に関与す

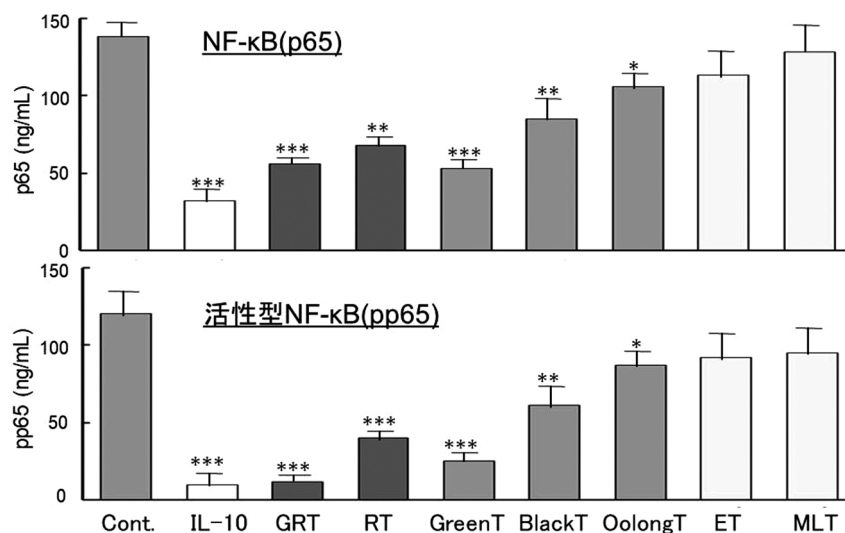


図2 TNF- α 刺激による転写因子 NF- κ B の遊離と活性化 (リン酸化) に及ぼす健康茶葉 PP の影響

Cont. PP 無添加, GRT グリーンルイボス, RT ルイボス, Green T 緑茶, Black T 紅茶, Oolong 烏龍茶, ET 杜仲茶, MLT 桑の葉茶

* Cont. に対して $p<0.05$ で有意差あり.

** Cont. に対して $p<0.01$ で有意差あり.

*** Cont. に対して $p<0.001$ で有意差あり.

る³⁾。本研究では、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を用いて、各種健康茶葉のポリフェノールの炎症抑制効果とその作用機構について検討した。

健康茶葉として、グリーンルイボス、発酵ルイボス（市場に広く流通されているルイボス茶）、緑茶、紅茶（ダージリンを使用）、烏龍茶、杜仲茶、桑の葉茶を用い、各茶葉のポリフェノールを HP-20 カラムクロマトグラフィーにより粗分画した PP 画分を用いて炎症抑制効果を調べた。腸管モデルとして、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を使用し、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子- α (TNF- α) を炎症メディエーターとして使用した系を用いた。まず、TNF- α による細胞障害性を培養上清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性から評価したところ、グリーンルイボス、発酵ルイボス、緑茶ポリフェノール添加で細胞障害性を強く抑制した。また、TNF- α 誘導炎症性サイトカイン分泌 (IL-6, IL-8, IL-1 β) は、主要なジヒドロカルコンを有するルイボス茶葉ポリフェノールと緑茶カテキン類で強く抑制された。また茶葉が同じグリーンルイボス（未発酵）と発酵ルイボス、緑茶（未発酵）と紅茶（完全発酵）、烏龍茶（半発酵）で炎症性サイトカイン濃度を比較すると、発酵茶葉 PP に比べ未発酵茶葉 PP で炎症性サイトカイン IL-6, IL-8 濃度が低く、発酵過程でのポリフェノールの重合によるものと考えられた。

ルイボス茶葉ポリフェノールおよび緑茶カテキンの炎症性サイトカイン分泌抑制機構の解明のため、TNF- α 処理8時間後の小腸上皮細胞を回収し、細胞内の遊離 NF- κ B とリン酸化（活性化）した NF- κ B を測定したところ、杜仲茶や桑の葉茶ポリフェノールの p65 や pp65 濃度は、ポリフェノール無添加と差がなく、NF- κ B の遊離および活性化（リン酸化）には影響を及ぼさないことがわかった。一方、ルイボス茶葉ポリフェノール（GRT, RT）および緑茶カテキン添加で有意に低値を示し、TNF- α に

よる NF- κ B の遊離および活性化を抑制することにより、炎症性サイトカイン遺伝子の発現を制御していると示唆された。TNF- α 刺激による炎症性サイトカイン遺伝子発現の転写因子 NF- κ B の遊離には、NF- κ B に結合している抑制因子 I κ B が I κ B をリン酸化する酵素 I κ B キナーゼによりリン酸化され、さらにユビキチン-プロテアソーム系で I κ B が分解され NF- κ B が遊離する。遊離した NF- κ B は核内に移行し、炎症性サイトカイン遺伝子の応答部位（エンハンサー）に結合し、さらに NF- κ B キナーゼによるリン酸化（活性化）されて遺伝子発現が開始される⁹⁾。遊離 NF- κ B / リン酸化 NF- κ B 比 (p65/pp65) は、ポリフェノール無添加（コントロール）で 1.15 であり、遊離された NF- κ B の大部分が核内に移行し、さらにリン酸化され転写因子として炎症性サイトカイン遺伝子発現に作用する。一方、GRT, RT および Green T で遊離 NF- κ B / 活性化型 NF- κ B 比 (p65/pp65) が高値を示したことは、これらのポリフェノール添加が TNF- α / MAP キナーゼ経路 (I κ B キナーゼによる NF- κ B の遊離, NF- κ B キナーゼによる NF- κ B のリン酸化・遺伝子発現の開始) の作用を制御していると考えられる。また抗炎症性サイトカイン IL-10 の抗炎症作用にはいくつかの経路があり、IL-10 receptor/STAT3 を介した TNF- α の炎症経路の抑制 (TAK1 の抑制)¹¹⁾、p38/MAPK カスケードを介した NF- κ B の遊離抑制¹²⁾ など、細胞内のシグナル伝達系に作用して炎症反応をコントロールする。グリーンルイボス PP や緑茶カテキンによる炎症抑制効果は、抗炎症性サイトカイン IL-10 と同様に TNF- α 刺激による細胞内のシグナル刺激キナーゼを制御することによって考えられた。

以上の結果から、グリーンルイボス茶および緑茶カテキンに強い腸炎症抑制効果があることが示唆された。

謝 辞

本研究は、川崎医療福祉大学の令和4年度医療福祉研究費の助成により行われた。

利益相反 (COI)

本研究は、開示すべき利益相反 (COI) 関係にある企業等はない。

文 献

- 1) Shanahan F : Inflammatory bowel disease, immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology*, 120(3), 622-635, 2001.
- 2) Baggiolini M, Loetscher P and Moser B : Interleukin-8 and the chemokine family. *International Journal of Immunopharmacology*, 17(2), 103-108, 1995.
- 3) 金井隆典 : 腸炎とサイトカイン. 医学のあゆみ, 234(5), 532-537, 2010.

- 4) 畠修一：グリーンルイボスエキスの機能性. 日本食品新素材研究会雑誌, 12(2), 73-77, 2009.
- 5) 村上海, 永澤健：発酵および非発酵ルイボスティーの抽出条件がポリフェノール含量および抗酸化活性へ及ぼす影響 日本食品科学工学会誌, 68, 84-91, 2021.
- 6) Baba H, Ohtsuka Y, Haruna H, Lee T, Nagata S, Maeda M, Yamashiro Y and Shimizu T : Studies of anti-inflammatory effects of Rooibos tea in rats. *Pediatrics International*, 51(5), 700-704, 2009.
- 7) Ohishi T, Goto S, Monira P, Isemura M and Nakamura Y : Anti-inflammatory action of green Tea. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 15(2), 74-90, 2016.
- 8) Wonhwa L and Jong S.B : Anti-inflammatory Effects of Aspalathin and Nothofagin from Rooibos (*Aspalathus linearis*) In Vitro and In Vivo. *Inflammation*, 38, 1502-1516, 2015.
- 9) 日比紀文, 緒方晴彦, 芳沢茂雄：炎症性腸疾患における TNF- α を中心としたサイトカインの動態と治療戦略. 炎症・再生, 22(2), 115-121, 2002.
- 10) 富士フィルム F-hiSIEC アプリケーション資料, 3-2消化管炎モデル.
https://asset.fujifilm.com/www/jp/files/202403/ffc1cfc4ef93456b197e9aef7af92b4f/f_hisie_c_application_202402.pdf, 2024. (2024.7.31確認)
- 11) Hop HT, Reyes AWB, Huy TXN, Arayan LT, Min W, Lee HJ, Rhee MH, Chang HH and Kim S : Interleukin 10 suppresses lysosome-mediated killing of *Brucella abortus* in cultured macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 293(9), 3134-3144, 2018.
- 12) Jun G, Qi Y, Yingjie W, Xiaoqiang C, Dawei S, Cen hao W, Hao Y, Huilin Y and Jun Zou : IL-10 delays the degeneration of intervertebral discs by suppressing the p38 MAPK signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 147, 262-270, 2020.

(2025年5月7日受理)

Inhibitory Effect of Rooibos Tea Leaf Polyphenols on Intestinal Inflammation Using Cultured Cells

Kazuyuki OKU, Kiyoshi MIURA and Tomihiro MIYADA

(Accepted May 7, 2025)

Key words : rooibos tea leaf polyphenols, small intestinal epithelial cells, intestinal inflammation, inflammatory cytokine, nuclear factor-kappa B (NF- κ B)

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) has been understood to be caused by dysregulation of inflammatory cytokines. In this study, we investigated the effects of healthy tea leaf polyphenols (PP) on inflammatory cytokines produced by intestinal epithelial cells. Using human iPS cell-derived small intestinal epithelial cells, we examined the effects of healthy tea leaf PP on cytotoxicity induced by TNF- α and cytokine hypersecretion, and found that the addition of rooibos tea leaf PP and green tea catechins markedly suppressed cytotoxicity and inflammatory cytokine (IL-6, IL-8, IL-1 β). The effect of the addition of rooibos tea leaves PP and green tea catechins on the production of cytotoxic and inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, IL-1 β) was significantly suppressed. The inhibitory effect was attributed to the suppression of the release and activation (phosphorylation) of NF- κ B, a transcription factor for inflammatory cytokine gene expression induced by TNF- α . These results suggest that rooibos tea and green tea polyphenols strongly inhibit the intestinal inflammation.

Correspondence to : Kazuyuki OKU

Department of Clinical Nutrition

Faculty of Health Science and Technology

Kawasaki University of Medical Welfare

288 Matsushima, Kurashiki, 701-0193, Japan

E-mail : okukaz1803@mw.kawasaki-m.ac.jp

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.35, No.1, 2025 147–153)