鼻アレルギー下甲介粘膜の免疫組織学的検討 —— B リンパ球サブセット (主に CD20 と CD40) について ——

長崎大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 小林俊光教授)

高 崎 賢 治

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON SUBPOPULATIONS OF B CELLS IN THE NASAL MUCOSA

KENJI TAKASAKI, M.D.

Department of Otolaryngology, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki

The subpopulations of B-lymphocytes in the inferior turbinates of 12 patients with allergic rhinitis and 3 patients with nonallergic nasal disease were studied by immunohistochemical procedures. The specimens were frozen at -70°C and sliced at $4\mu\text{m}$ with a cryostat. The LSAB method with monoclonal antibodies (CD4, CD8, CD20, CD40) was used to detect subpopulations of T-lymphocytes and B-lymphocytes. In every subject the number of CD4 (+) cells dominated over that of CD8 (+) cells in the lamina propria. CD20 (+) cells were seen mainly in the border between the subepithelial layer and the nasal gland layer. CD40 (+) cells were found among the epithelial cells, the gland cells and the round mononuclear cells. In the serial sections CD20 (+) CD40 (+) cells were found in the inferior turbinates. We did not observe any difference in the distribution of CD20 (+) cells and expression of CD40 between allergic patients and nonallergic patients. Further study seems to be necessary to elucidate the relationship between CD20 (+) CD40 (+) cells and T-lymphocytes and some cytokines.

Key words: immunohistochemical study, nasal mucosa,
B cell, CD20, CD40

A 99—0695—32831

はじめに

鼻アレルギーは IgE の関与する典型的な 1 型の気道アレルギーとされている。鼻アレルギー症例の IgE 抗体の産生は、アレルギー性鼻炎の鼻粘膜に IgE 抗体産生細胞が極めて少なく、リンパ濾胞を持つリンパ組織, nose associated lymphoid tissue (NALT) に相当するものが見当たらないので、咽頭扁桃にて産生されていると推定されている¹⁾。外界から鼻粘膜に付着した抗原粒子は線毛運動にて扁桃に達し、扁桃にて抗原提示細胞が抗原を認識する。抗原を認識した抗原提示細胞の抗原情報は、抗原提示細胞とヘルパー T リンパ球 (CD4 陽性細胞) が接合することにより、ヘルパー T リンパ球に伝達される。抗原情報を獲得したヘル

パー T リンパ球は、抗体産生能をもつ B リンパ球に働きかけ、B リンパ球は抗原に特異的な抗体を産生すると考えられている。

最近 B リンパ球の IgE 産生の誘導、増強に関与する B リンパ球、T リンパ球の相互作用において、それらの膜分子である CD40 と CD40 リガンド (CD40L) が注目されている²⁾。抗原情報を獲得したヘルパー T リンパ球が、抗体産生能をもつ B リンパ球に働きかける際、CD40 と CD40L を介する接合ではリンパ球のサイトカインの一種である Interleukin-4 (IL-4) の存在下では B リンパ球の IgE 産生が増強するが、IL-10 の存在下では IgA, IgG1, 2, 3 の産生が増強することが明らかになっている³⁾。

ヒト下甲介粘膜にもヘルパーT リンパ球や B リンパ球が存在していることは過去に報告されている⁴⁾⁵⁾。しかし、このヘルパーT リンパ球や B リンパ球が下甲介局所においていかなる働きをしているかは不明な点が多い。

今回は、ヒト下甲介粘膜における B リンパ球に注目し、B リンパ球が下甲介粘膜においていかに分布しているか、また、膜抗原として CD40 を発現しているか否かを、免疫組織学的に検討したので報告する。

方法・対象

対象は平成5年から7年に長崎大学医学部耳鼻咽喉科及びその関連病院（長崎市立市民病院、佐世保市立総合病院、日赤長崎原爆病院）を受診した鼻アレルギー患者、男性2名、女性10名、非アレルギー鼻副鼻腔疾患（慢性副鼻腔炎、術後性頬部嚢腫）患者で男性2名、女性1名、年齢は6歳から43歳までであった（表1）。鼻アレルギーの診断は、鼻症状を示し、鼻汁好酸球検査、鼻粘膜誘発試験、皮内テストもしくは RAST のうち少なくとも2項目以上陽性の者とし、非アレルギー症例はこれらを満たさない者とした。今回の鼻アレルギー症例においては、すべてハウスダストもしくはダニ抗原陽性であったため、通年性鼻アレルギーと診断した。また重複抗原にスギを持つものにおいては、鼻

粘膜の切除の時期はスギの非飛散時期とした。なお鼻粘膜の切除は患者の承諾（患者が未成年の場合は保護者の承諾）を得た後に行った。

下甲介粘膜の切除は下甲介粘膜を4%のリドカインにて表面麻酔後、截除鉗子にて行った。O. C. T. COMPOUND, TISSUE- TEK を用い、直ちにアセトンドライアイスにて-70°Cに凍結、クライオスタットにて4μmの凍結切片を作製、室温乾燥10分間、アセトン固定10分間ののち、内因性 peroxidase を除去し LSAB 法にて免疫組織染色を行った。使用したモノクローナル抗体は、抗 CD4 抗体（ヘルパー/インデューサーT リンパ球を認識）、抗 CD8 抗体（サブプレッサー/サイトキニック T リンパ球を認識）、抗 CD20 抗体（全 B リンパ球を認識）、＜以上 DACO 社＞、抗 CD40 抗体＜SEROTEC 社＞とした。また CD40 に対する陽性コントロールをとるために、通年性鼻アレルギーを合併し慢性扁桃炎にて扁桃摘出術を行った症例の口蓋扁桃を用いた。陰性コントロールとしては一次抗体の代わりにウサギ正常血清を使用し、染色されないことを確認した。4μmの凍結切片は可能な限り連続切片とし、各抗体に対する陽性細胞の関係を調べた。CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞に関して連続切片を得ることができた症例においては検鏡を200倍にて行い、陽性細胞が比較的一様に分布している部位を選び、粘膜固有層における一視野当たりの陽性細胞数をカウントし、CD4 陽性細胞数と CD8 陽性細胞数の比（以下CD4/8比）を求めた。

表1 症 例

症例	年齢	性別	疾患名	抗原名
1. YH	30	女性	鼻アレルギー	HD
2. KY	20	女性	鼻アレルギー	HD
3. MH	23	女性	鼻アレルギー	HD
4. MM	20	女性	鼻アレルギー	HD ダニ スギ
5. YA	36	女性	鼻アレルギー	HD ダニ スギ
6. SN	31	男性	鼻アレルギー	HD
7. KN	20	女性	鼻アレルギー	HD
8. YI	6	男性	鼻アレルギー	HD ダニ
9. TK	24	女性	鼻アレルギー	HD
10. NT	20	女性	鼻アレルギー	HD ダニ スギ
11. KM	21	女性	鼻アレルギー	HD ダニ
12. TN	20	女性	鼻アレルギー	ダニ
13. YT	43	女性	術後性頬部嚢腫	(-)
14. MY	16	男性	慢性副鼻腔炎	(-)
15. SF	16	男性	慢性副鼻腔炎	(-)

注 HD: ハウスダスト

また症例1-7はCD4/8比を検討した。

結 果

1. CD20 陽性細胞について

鼻アレルギー患者、非アレルギー患者の下甲介粘膜における CD20 陽性細胞は、下甲介粘膜の粘膜固有層浅層、及び腺組織の周辺を中心に存在していた（図1, 2）。大部分の症例で CD20 陽性細胞は散在して認められたが、一部の症例においては CD20 陽性細胞が群集するものも認められた（図4）。

2. CD40 陽性細胞について

陽性コントロールである通年性鼻アレルギーを合併した扁桃炎患者の扁桃腺組織においては、CD40 の発現を示していた。下甲介粘膜における CD40 の発現は、粘膜上皮細胞、腺細胞、小円形細胞に認められた（図3, 5）。

下甲介粘膜の4μmの連続切片において CD20 陽性細胞、CD40 陽性細胞を検討すると、大部分の CD20 陽

表2 鼻アレルギー症例における
Tリンパ球サブセット

症例	年齢	CD4	CD8	CD4/8 比
1. YH	30	148	72	2.06
2. KY	20	226	124	1.82
3. MH	23	371	165	2.48
4. MM	20	219	93	2.35
5. YA	36	236	143	1.65
6. SN	31	148	113	1.31
7. KN	20	184	72	2.56

CD4: 下甲介粘膜固有層一視野当たりの
CD4 陽性細胞数

CD8: 下甲介粘膜固有層一視野当たりの
CD8 陽性細胞数

CD4/8 比: CD4, CD8 陽性細胞数の比

性が CD40 陽性に染色されることが確認された (図 2 と 3, 図 4 と 5)。

3. CD4 陽性細胞, CD8 陽性細胞について

鼻アレルギー患者において 4 μ m の連続切片が可能な症例においては検鏡を 200 倍にて行い、陽性細胞が比較的一様に分布している部位を選び、粘膜固有層における一視野あたりの陽性細胞数をカウントした (表 2)。CD4 陽性細胞は 371 から 148 個, CD8 陽性細胞数は 165 から 72 個であり、カウントしたすべての症例で CD4 陽性細胞数が CD8 陽性細胞数より多く存在していた。CD4/8 比は 1.31 から 2.56 であった。

考 察

鼻粘膜における局所免疫に関する、鼻アレルギーを中心としたリンパ球サブセットの報告は、我々の報告も含めいくつか認められる⁴⁾⁶⁾⁷⁾。以前我々は⁴⁾正常ヒト下甲介粘膜における B リンパ球及び T リンパ球サブセットについて免疫組織染色法を用い報告したが、B リンパ球は粘膜固有層浅層と腺組織の境界部に比較的多く認められたが、粘膜上皮層と粘膜固有深層には、ほとんど認められなかった。T リンパ球は CD4 陽性細胞, CD8 陽性細胞とも、粘膜上皮層, 粘膜固有層ともに認められ、粘膜固有層における CD4/8 比は 1.66 で CD4 陽性細胞が優位な T リンパ球の浸潤を認めた。吉見⁷⁾の検討ではスギ花粉症患者の下甲介粘膜においては、CD4/8 比が平均 2.33 と CD4 陽性細胞が優位な T リンパ球の浸潤を認めているとの報告がある。ほかに、粘膜上皮層における CD4/8 比は約 0.5 であるが、粘膜固

有層における CD4/8 比は約 1.3 であり、鼻粘膜組織においてもその組織の部位の違いにより、CD4/8 比が異なるという報告もある⁸⁾。しかしながら、粘膜固有層においては、いずれも CD4 陽性細胞が優位に浸潤している。今回 CD4 陽性細胞, CD8 陽性細胞について検討してきた症例においても、CD4 陽性細胞が優位に浸潤していたことを考えると、局所免疫反応において CD4 陽性細胞が何らかの関与を行っていることが推定された。

ヒトの組織における CD40 は B リンパ球, 樹状細胞, 上皮細胞, 一部の癌細胞に発現するが、形質細胞には発現しないことが知られている⁹⁾。今回の症例においては鼻アレルギー、非アレルギー症例とも下甲介粘膜では粘膜上皮細胞, 腺細胞, 小円形細胞に認められた。免疫組織染色法のみでは、この小円形細胞がいかなる細胞か不明である。この細胞を明確にするために連続切片による検討を行った。鼻粘膜における連続切片による検討としては、高村¹⁰⁾の鼻アレルギー下甲介粘膜の好酸球の検討や、吉見¹¹⁾のアスピリン喘息鼻茸における好酸球の検討が行われている。CD20 抗原, CD40 抗原とも膜抗原として存在しているので、免疫組織二重染色法における検討では発色が重なり陽性、陰性の判定が困難な場合も考えられ、今回は連続切片による検討を行った。リンパ球の大きさは 6-10 μ m であり¹²⁾、4 μ m の連続切片においての比較検討は、同一のリンパ球を検討していることが考えられる。CD20 は B リンパ球に発現することが知られている¹³⁾ので、下甲介粘膜の連続切片において CD20 陽性、CD40 陽性の小円形細胞は下甲介粘膜の B リンパ球が CD40 を発現しているものと考えられた。

CD40 を介した B リンパ球への刺激は B リンパ球の ICAM-1 (CD54) の発現が増強され、LFA-1 との相互作用を介して B リンパ球の凝集が促進される¹⁴⁾ことが知られている。今回の一部の症例においては、下甲介粘膜における CD20 陽性 B リンパ球が群集するものも認められた (図 4)。この現象は、B リンパ球への CD40 を介した刺激が ICAM-1 (CD54) の発現を増強し LFA-1 との相互作用を介して B リンパ球間の凝集が促進した、とも考えられる。今後は下甲介粘膜における B リンパ球上の CD40 と ICAM-1, LFA-1 などの細胞接着分子との関連の検討も必要である。

また、CD40 は最近 IgE 産生の誘導及び増強に関係する B リンパ球の膜分子として ICAM-1, CD21, CD23, CD72 と共に注目を浴びている¹⁵⁾。CD40 を抗 CD40 抗体にて刺激すると IL-4 存在下においては IgE

産生を増強し、IL-10 の存在下では IgA, IgG1, 2, 3, の産生が増強するという B リンパ球のクラススイッチへの関与が明らかになっている³⁾。

今回は、非アレルギー症例が少なかったものの、下甲介粘膜における CD20 陽性細胞の大部分が CD40 陽性に染色されることが非アレルギー、鼻アレルギー症例ともに確認された。非アレルギー、鼻アレルギー症例を比較すると、B リンパ球の CD40 の発現の程度や B リンパ球の凝集の程度については光学顕微鏡下での観察においては明らかな差は認めなかった。このことは、B リンパ球を中心に考察すると、鼻アレルギー症例の下甲介粘膜と、非アレルギー症例の下甲介粘膜においては抗体産生（特に IgE 産生）の機序に明らかな差が少ないことが推定された。

しかしながら、下甲介粘膜において CD4 陽性 T リンパ球が IL-4, IL-4 の mRNA を発現することも報告されている¹⁶⁾。また、CD40L の発現は活性化 T リンパ球に限られており、B リンパ球やマクロファージ、単球などには認められておらず¹⁷⁾、ヒトの T リンパ球を抗 CD3 抗体で刺激すると CD4 陽性 T リンパ球は CD40L を発現することも報告されている。T リンパ球における CD40L の発現や、T リンパ球と B リンパ球の接触像、IL-4 の存在を鼻アレルギー症例の下甲介粘膜において確認できれば、下甲介粘膜局所においての抗体産生 (IgE 産生) の可能性が推定される。今後はこれらの膜抗原やサイトカインとの関連も検討する必要があると考えられた。

ま と め

鼻アレルギー、非アレルギー患者の下甲介粘膜における T リンパ球及び、B リンパ球について、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD40 抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。

1. 鼻アレルギー、非アレルギー患者の下甲介粘膜において CD20 陽性細胞は粘膜固有層浅層、腺組織を中心に存在した。

2. 下甲介粘膜における CD40 の発現は粘膜上皮細胞、腺細胞にも認められたが、円形の単核球にも認められた。

3. 4 μ m の連続切片において検討すると下甲介粘膜における B リンパ球の大部分は、CD20 陽性 CD40 陽性細胞であった。

4. 鼻アレルギー、非アレルギー患者の下甲介粘膜において CD20 陽性細胞の分布や CD40 の発現は明ら

かな差を認めなかった。

5. 今回の検討においては鼻アレルギー症例の下甲介粘膜局所における IgE 産生の可能性は少ないと考えられたが、今後、CD20 陽性 CD40 陽性細胞と、T リンパ球、各種サイトカイン等との関連を検討する必要があると考えられた。

文 献

- 1) 奥田 稔: 1 型アレルギーとリンパ球。アレルギーの領域 1: 23-29, 1994.
- 2) 川部 勤, 菊谷 仁: T-B 細胞間相互作用に関する膜分子、免疫 1993-94.
- 3) Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, et al: The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome: Cell 72: 291-300, 1993.
- 4) 高崎賢治, 吉見龍一郎, 隈上秀伯: 正常ヒト下鼻甲介粘膜における B リンパ球及び T リンパ球サブセットについて。耳鼻免疫アレルギー 10: 49-53, 1992.
- 5) Winther B, Innes DJ, Mills SE, Mygind N, Zito D, et al: Lymphocyte subsets in normal airway mucosa of the human nose. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 113, 59-62, 1987.
- 6) 斎藤博子, 朝倉光司, 成田慎一郎, 小笠原英樹, 形浦昭克: 鼻アレルギー鼻粘膜における T-cell サブセットと細胞接着分子 ICAM-1 の関与について。日耳鼻 95: 180-1807, 1992.
- 7) 吉見龍一郎: スギ花粉症患者の下甲介粘膜における T リンパ球サブセットについて。耳鼻免疫アレルギー 8: 27-32, 1990.
- 8) Pawankar R, Okuda M: A comparative study of the characteristics of intraepithelial and lamina propria lymphocytes of the human nasal mucosa. Allergy 48: 99-105, 1993.
- 9) Muller P, Mielke B: Extensive analysis of tissue distribution of antigens defined by new clustered and unclustered B-cell antibodies. In Leucocyte Typing IV, Oxford, 175, 1989.
- 10) 高村博光: 鼻アレルギー患者の下甲介粘膜における好酸球の免疫組織学的検討。日耳鼻 97: 61-66, 1994.
- 11) 吉見龍一郎, 高村博光, 高崎賢治, 弦本日芳, 隈上秀伯: アスピリン喘息鼻茸における浸潤好酸球の免疫組織学的検討。日耳鼻 96, 1922-1925, 1993.
- 12) Roitt I, Brostoff L, Male D: IMMUNOLOGY Mosby, St. Louis, 1993.

図1 下甲介粘膜におけるCD20陽性細胞(弱拡大)
粘膜固有層浅層と腺組織の境界に陽性細胞を認める。

図2 下甲介粘膜におけるCD20陽性細胞(強拡大)
腺組織の周辺に陽性細胞を認める。

図3 下甲介粘膜におけるCD40陽性細胞(強拡大)
図2との連続切片。CD40の発現は腺細胞、小円形細胞に認められるが図2と比較してCD20陽性、CD40陽性であることがわかる(矢印)。

図4 下甲介粘膜におけるCD20陽性細胞(弱拡大)
一部凝集している部分が認められる。

図5 下甲介粘膜におけるCD40陽性細胞(弱拡大)
図4との連続切片。CD40の発現は粘膜上皮細胞にも認められる。図4で一部凝集している部分でもCD40は陽性である。

- 13) Cartun RW, Coles FB, Pastuszak WT: Utilization of monoclonal antibody L26 in the identification and confirmation of B-cell lymphomas. A sensitive and specific marker applicable to formalin- and B5-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am J Pathol* 129: 415-421, 1987.
- 14) Parrett TB, Shu G, Clark EA: CD40 signaling activates CD 11a/ CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *J Immunol*: 146, 1722, 1991.
- 15) 柳原行義, 梶原景一, 生澤公一: IgE 産生を増強するサイトカイン, 分子群. *臨床免疫* 25: 1619-1630, 1993.
- 16) Durham SM, Sun Y, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, et al: Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia. *J Immunol* 148: 2390-2394, 1992.
- 17) Gauchat JF, Aubry JP, Mazzei G, Life P, Jomotte T, et al: Human CD40-ligand: molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production. *FEBS* 315: 259-266, 1993.
-
- 稿を終るに臨み, ご指導, ご校閲を賜りました長崎大学医学部耳鼻咽喉科学教室小林俊光教授, 隈上秀伯名誉教授に深謝いたします。また, 本研究にご協力下さった耳鼻咽喉科学教室の皆様にお礼申し上げます。本論文の一部は第12回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(1994年, 東京), 第44回日本アレルギー学会(1994年, 東京), 第34回日本鼻科学会(1995, 札幌)にて発表した。
-
- (1996年1月9日受稿 1996年3月7日受理)
別刷請求先 〒852 長崎市坂本1-7-1
長崎大学医学部耳鼻咽喉科学教室 高崎賢治

A 99-0689-22401

日耳鼻

指関節強直症と遠視を伴った

先天性アブミ骨固着症の1例

小川和昭・鯉島篤史 (鹿児島県立鹿屋)

廣田常治 (ひろた耳鼻咽喉科)

昇 卓夫 (今給黎総合)

徳重栄一郎・牛飼雅人・福田勝則 (鹿大)

先天性両側アブミ骨固着症に両側第5指指関節間節強直症と両側遠視を合併した、32歳女性の1例を報告した。Vessellは、1960年に伝音性難聴に近位指関節間節強直症と斜視を合併した最初の例を報告した。著者等の例は、先天性アブミ骨固着症に指関節間節強直症を合併した本邦における19例目の症例である。

今回および過去の報告例より、遠視は本疾患の重要な一症状であると思われる。著者らの報告例では真性小眼球症が遠視の原因であり、本疾患に合併した遠視の原因が明らかになったのは今回が初めてである。

両耳ともに stapedotomy が行われ、術後聴力は正常域にまで改善した。

A 99-0695-32831

日耳鼻

鼻アレルギー下甲介粘膜の免疫組織学的検討

——Bリンパ球サブセット (主に CD20 と CD40) について——

高崎賢治 (長崎大)

鼻アレルギー、非アレルギー鼻副鼻腔疾患患者の下甲介粘膜における、Bリンパ球について、抗CD20抗体、抗CD40抗体を用いてLSAB法にて免疫組織学的検討を行った。

鼻アレルギー、非アレルギー患者の下甲介粘膜においてCD20陽性細胞は粘膜固有層浅層、腺組織を中心に存在した。CD40の発現は粘膜上皮細胞、腺細胞にも認められ、円形の単核球にも認められた。4μmの連続切片において検討すると下甲介粘膜におけるBリンパ球の大部分は、CD20陽性CD40陽性細胞であった。鼻アレルギー、非アレルギー患者の下甲介粘膜においてCD20陽性細胞の分布やCD40の発現は明らかな差を認めなかった。

A 99-0675-33199

日耳鼻

異なる下気道病変に合併する慢性副鼻腔炎の臨床的特徴

石川淳一・小川直彦・王 娜亜・鳥山 稔

(国立国際医療センター) 王 娜亜 一郎 (同・呼吸器科)

異なる下気道病変を伴う慢性副鼻腔炎を、喘息合併例と慢性気管支炎、副鼻腔炎支拡張症またはびまん性汎細気管支炎を合併する慢性副鼻腔炎 (副鼻腔炎支拡張症候群, SBS) の2群に分け、その臨床的特徴を検討した。喘息合併例では上顎洞よりも篩骨洞の陰影が高度で、鼻汁中には好中球より好酸球が優位であり、サッカリンテストは正常例が多かった。一方、SBS症例では上記の特徴がすべて反対であった。以上より、異なる病態の下気道病変を合併する慢性副鼻腔炎は、異なる臨床的特徴を示し、慢性副鼻腔炎の病態にも相違があることが示唆された。また、上気道病変と下気道病変の合併には患者の素因が重要であると考えられた。

A 99-0681-10501

日耳鼻

耳鳴を主訴とした頭蓋内疾患5症例の検討

矢部多加夫・吉本 裕・山根 仁・平川治男

(帝京大)

耳鳴を主訴とした頭蓋内疾患5症例について臨床的に検討し、頭蓋内疾患に伴う耳鳴について考察した。症例は小脳橋角部髄膜腫2例、小脳橋角部類表皮腫1例、テント上大脳鎌髄膜腫1例、側頭骨硬膜動静脈奇形1例であった。拍動性耳鳴、あるいは頑固に持続する耳鳴のために、頭蓋内疾患を疑いCT・MRI検査を行った。耳鳴検査では、耳鳴は低音性で、大きさは中等度であった。拍動性耳鳴症例では、血流の異常が末梢の聴覚系に影響を及ぼしたために、小脳橋角部腫瘍の非拍動性耳鳴症例では、腫瘍による中枢聴覚系への障害の結果、耳鳴が生じたものと考えられた。