全身性エリテマトーデス患者血清中の 可溶性インターロイキン2レセプター (IL-2 R)

戸 叶 嘉 明・関 川 巖

橋 本 博 史・奥 村 康*・廣 瀬 俊 一

Jpn. J. Clin. Immun., 11(6): 559~565, 1988.

Soluble interleukin-2 receptor in sera of patients with systemic lupus erythematosus

Yoshiaki Tokano, Iwao Sekigawa,
Hiroshi Hashimoto, Ko Okumura* and Shunichi Hirose

*Department of Internal Medicine (Rheumatology of Internal Medicine) and *Immunology,
Juntendo University School of Medicine*

[Summary]

We examined soluble IL-2 R in sera of patients with SLE by ELISA using two monoclonal anti IL-2 R antibodies. When we examined sera of forty patients with SLE, soluble IL-2 R in sera of them significantly increased as compared with normal controls, (SLE; 337.8 ± 188.2 U/ml, Normal control; 150.0 ± 35.0 U/ml). Sixteen patients (40%) had high titer of soluble IL-2 R (more than mean + 2 S.D. of normal controls). And then we investigated the clinical findings of patients with high titer of soluble IL-2 R. Although in these patients, the peripheral pattern of anti nuclear antibody and pericarditis appeared more frequently than patients with normal titer of soluble IL-2 R, there was no significance in anti DNA antibody, CH50, renal involvement (proteinuria, urine cast), skin involvement, pleuritis, central nervous system involvement, hematological findings. It is known that soluble IL-2 R appeared in the culture supernatant of normal peripheral blood lymphocyte stimulated by mitogen (PHA, anti OKT 3 etc.) or in sera of patients with adult T cell leukemia, it is said that soluble IL-2 R relate to activated T cells. On the other hand, although it was reported that activated T cells appeared in peripheral blood lymphocytes of patients with SLE, the fact that many patients with SLE had soluble IL-2 R in our examination may relate to activated T cells. And therefore, we confirmed them by using various activated T cell marker (HLA-DR positive T cell, HLA-DP positive T cell, IL-2 R positive T cell). The patients with high titer of soluble of IL-2 R tended to have high positive rate of HLA-DP positive T cells, HLA-DR positive T cells, but not so much IL-2 R positive T cell. This results suggest the existence of

activated T cells and the relationship between soluble IL-2 R and activated T cells. It is said that patients with SLE have T cells abnormality (ex. the decrease of mitogen response, auto mixed lymphocyte reaction, IL-2 production, IL-2 response) and activated T cells, and it is suggested that these abnormality related to the pathogenesis of SLE. Our results confirm the existence of activated T cells, in patients with SLE and suggest the possibility that soluble IL-2 R could be used as the marker of activated T cells or the new barometer of disease activity, although it is not clear how activated T cells relate to pathogenesis or clinical findings of SLE. And, although the immunological role of soluble IL-2 R is not clear, it may be one of clue in the investigation of pathogenesis of SLE.

Key words : SLE,
soluble IL-2 receptor

【概 要】

40例のSLE患者の血清中可溶性IL-2RをELISA法を用いて検索した。その結果、SLE患者の可溶性IL-2Rは正常人に比ベ有意に増加していた。正常人のmean+2 S.D.以上の症例を可溶性IL-2R高値群として臨床所見を検討してみると、高値群では心外膜炎および抗核抗体 peripheral patternの頻度が有意に高かったが、腎病変、抗DNA抗体の力価、CH50の値では差がなかった。可溶性IL-2Rは活性化T細胞が存在すると出現するといわれていることから、可溶性IL-2Rの力価と他の活性化T細胞のマーカーとの関連を検討してみると、可溶性IL-2Rが高値の症例ではHLA-DR、HLA-DP陽性T細胞が多い傾向にあった。これらの結果はSLE患者における活性化T細胞の存在を示唆すると同時に、可溶性IL-2Rが活性化T細胞の指標として臨床に応用できる可能性があると思われた。

I. はじめに

全身性エリテマトーデス(SLE)は高力価の自己抗体が多彩に出現し、多臓器障害をきたす疾患であるが、病因はいまだ不明である。しかし、近年、自己抗体やリンパ球の解析が進み、特に細胞性免疫の分野では polyclonal B cell activation といわれるB細胞の異常が注目されている。また、T細胞についても、Leu 3a, 2a陽性細胞数の変動など数の異常^{1,2)}や各種 mitogen に対する反応の低下、自己リンパ球混合培養(AMLR)の無反応^{3,4)}、インターロイキン2(IL-2)産生能の低下⁵⁻⁷⁾などの機能異常も報告されている。さらに、HLA-DR陽性T細胞の出現など、活性化したT細胞の存在を示唆する報告⁸⁾もある。

一方、IL-2レセプター(IL-2R)は特に mitogen 刺激を加えたT細胞⁹⁾やATLの腫瘍細胞の膜表面に多く発現される¹⁰⁾が、最近これらの培養上清あるいは血清中に soluble IL-2 R(可溶性IL-2R)が出現することが報告され^{11,12)}、活性化T細胞の存在を示す1つのマーカーと考えられるようになってきている。そして、IL-2産生能の低下やIL-2に対する反応性の低下をみるSLEにおいては、血清中の可溶性IL-2Rがいかなる動態を示

すのかを知ることはきわめて重要と考えられる。

我々はすでにSLE患者の活性化T細胞をHLA-DR抗原の発現などを指標として検索し、臨床経過との関連を検討してきた。しかし、この方法は手技が複雑で、日常のルーチン検査には適さないため、できるだけ簡易な方法で活性化T細胞の存在をスクリーニングできる方法が求められてきた。今回我々は可溶性IL-2Rが活性化T細胞の存在のマーカーとなりうるという報告に着目し、SLEにおける活性化T細胞の存在が可溶性IL-2Rの検索により知ることができるかどうかを検討する目的で、SLE患者の血清中の可溶性IL-2Rと活性化T細胞との関連について検討を行い、さらに臨床との関連も検討したので報告する。

II. 対象および方法

1. 対象患者

アメリカリウマチ協会の診断基準(1982年)を満たすSLE患者40例(男性2例・女性38例、平均年齢28.5歳)および正常人10例を対象とした。SLE患者は平均罹患期間約9年で、平均14 mg/日のステロイドの投与を受けていた。

図1 Soluble IL-2 R in sera of patients with SLE and normal controls

2. 可溶性 IL-2 R の測定

可溶性 IL-2 R の測定は T cell サイエンス社のキットを用い、以下の ELISA 法で行った。すなわち、120 倍に希釈した抗 IL-2 R 抗体 (抗 Tac 抗体) を 100 μ l/well 96 穴の multiplate に coating し、4°C で 48 時間 incubate した。次に 1% Bovine serum albumin (BSA) in phosphate buffer saline (PBS) で 37°C で 2 時間 blocking したあと、4 倍に希釈した血清を 100 μ l/well 加え、37°C で 2 時間 incubate した。さらに、coating で用いた抗体と認識するエピトープの異なるペルオキシダーゼ標識抗 IL-2 R 抗体 (7G7/B6) を加え、37°C で 2 時間 incubate したあと、O-フェニレンジアミン (O.P.D.) を加えた。30 分後、2.5 M H_2SO_4 で反応を止め、standard の可溶性 IL-2 R を用いて作製した標準曲線と比較して、可溶性 IL-2 R の量をユニット化して求めた。

3. リンパ球表面マーカー

リンパ球の表面マーカーはフローサイトメトリー

(two color) で調べた。末梢静脈血をヘパリン入りで採血し、Ficoll-Hypaque による比重遠心法により単核球を分離した。3 回洗浄後、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 Tac, HLA-DR 抗体 (Becton Dickinson) を加え、アイスバスの中で 30 分 incubate し、3 回洗浄した。さらに、phycoerythrin (PE) 標識抗 Leu 4 抗体を加え、30 分 incubate して洗浄したあと FACS tar (Becton Dickinson) で測定した。HLA-DP 抗体については、マウス抗ヒト HLA-DP 抗体を加え、アイスバスの中で 30 分 incubate し、3 回洗浄した。次に F(ab)₂' にした FITC 標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン (Cappel) を加えて、30 分 incubate して洗浄したあと、この 2 次抗体の Free の Fab の部分があとで加える抗 Leu 4 抗体と反応するのを block する目的で、正常マウス血清を加えて 15 分 incubate して洗浄した。さらに PE 標識抗 Leu 4 抗体を加えた。

4. 有意差検定

有意差検定には Wilcoxon 順位和検定、 χ^2 検定を用いた。

III. 結 果

1. SLE 患者における可溶性 IL-2 R

図 1 は SLE 患者 40 例、正常人 10 例の血中可溶性 IL-2 R を測定した結果を示す。正常人では 150.0 ± 35.0 U/ml (95~210 U/ml) であるのに対し、SLE 患者では 337.8 ± 188.2 (100~880 U/ml) で正常人に比べ有意に増加していた ($p < 0.05$; Wilcoxon 順位和検定)。正常人の mean + 2 S.D. 以上を可溶性 IL-2 R 高値群、それ以下を正常群としてみると、SLE 患者では 40% の症例が高値群に属していた。

2. 活性化 T 細胞との関連

以上のように、一部の SLE 患者の血中に高力価の可溶性 IL-2 R の存在が示されたが、さらにこの高力価の可溶性 IL-2 R が SLE についても活性化 T 細胞の存在を示唆するものであるかどうか検討するため、一部の症例で血中可溶性 IL-2 R と活性化 T 細胞の表面マーカーとの関連を検討した。活性化 T 細胞の表面マーカーとしては、IL-2 R (Tac), HLA-DR, HLA-DP の 3 つを用いた。表 1 はその結果を示したもので、それぞれの比率は、T 細胞中に占める割合 (Leu 4⁺ Tac⁺ / Leu 4⁺, Leu 4⁺ HLA-DR⁺ / Leu 4⁺, Leu 4⁺ HLA-DP⁺ / Leu 4⁺) で示した。Tac 陽性 T 細胞、HLA-DR 陽性 T 細胞、HLA-DP 陽性 T 細胞は、いずれも IL-2 R 高値群で多い

表 1 The relationship between soluble IL-2 R and Tac, HLA-DR, HLA-DP positive T cell

	Leu4(+) Tac(+) /Leu4(+)	Leu4(+) HLA-DR(+) /Leu4(+)	Leu4(+) HLA-DP(+) /Leu4(+)
High value of soluble IL-2R (n = 4)	4.3±1.3%	30.2±12.7%	58.8±14.7%
Normal range of Soluble IL-2R (n = 3)	2.1±0.8%	26.0±15.3%	46.6±13.8%
Normal control	2.0±0.7%	6.3± 2.1%	26.6± 8.9%

表 2 Clinical manifestation of patients with high value of free IL-2 R and patients with normal range of free IL-2 R

	free IL-2R		significance
	high value (n = 12)	normal range (n = 20)	
Malar rash	91.7%	95.0%	P<0.05
Discoid	25.0	20.0	
Photosensitivity	45.5	31.6	
Oral ulcer	58.3	50.0	
Joint involvement	91.7	95.0	
Serositis			
Pleuritis	16.6	10.0	
Pericarditis	50.0	0	
CNS			
Seizure	16.6	5.0	
Psychosis	16.6	10.0	
Raynaud's phenomenon	50.0	55.0	
Thrombophlebitis	0	10.0	
Aseptic bone necrosis	8.3	10.0	
Leg ulcer	16.7	5.0	
Livedo	16.7	15.0	

傾向が認められた。

このことから、可溶性 IL-2 R 高値の症例では活性化 T 細胞の存在することが示唆された。

3. 可溶性 IL-2 R と臨床所見

さらに活性化 T 細胞の存在を示唆する可溶性 IL-2 R と SLE の臨床像との間に関連性があるかどうかを検討するために、可溶性 IL-2 R 高値群と正常群で臨床所見の比較検討を行った。結果は表 2 に示したが、可溶性 IL-2 R 高値群では心外膜炎の頻度が有意に高かった ($p>0.05$)。しかし、蝶形紅斑・円板紅斑・光線過敏症・口腔内潰瘍・レイノーなどの皮膚粘膜症状、関節症状、中枢神経障害、胸膜炎などの他の臨床症状では両者に有

意差はなかった。

次に、検査所見に関して同様の検討を行い、表 3 の結果をえた。可溶性 IL-2 R 高値群では抗核抗体の peripheral pattern の頻度が有意に高かった ($p<0.05$)。しかし、抗 DNA 抗体、抗 RNP 抗体、抗 Sm 抗体などの抗核抗体の陽性率や、蛋白尿・尿円柱などの腎病変や、白血球減少・溶血性貧血・血小板減少などの血液病変では有意差はなかった。また、表には示していないが、補体価も両群間に差はなかった。

IV. 考 案

T 細胞は抗原あるいは mitogen 刺激を受けて、IL-2 を産生すると同時に、細胞表面上に IL-2 R を発現し、

表 3 Laboratory findings of patients with high value of free IL-2 R and patients with normal range of free IL-2 R

	free IL-2R		significance
	high value (n=12)	normal range (n=20)	
Hemolytic anemia	33.3%	40.0%	P<0.05
Leukopenia	25.0	20.0	
Lymphopenia	83.3	85.0	
Thrombocytopenia	25.0	15.0	
Renal involvement			
Cellular cast	50.0	40.0	
Protein uria (>3.5 g/day)	33.3	20.0	
ANA			
homogenous	54.6	58.8	
peripheral	45.5	5.9	
speckled	0	35.5	
nucleolar	0	0	
Anti DNA antibody	100.0	94.1	
Anti Sm antibody	9.1	31.3	
Anti RNP antibody	27.3	50.0	
Anti SS-A antibody	75.0	45.5	
Anti SS-B antibody	12.5	0	

それらの相互作用により増殖していくことはよく知られている⁹⁾。また、増殖の過程では IL-2 R のみならず、トランスフェリンレセプターあるいは HLA-DR 抗原・HLA-DP 抗原などの class II 抗原も発現するともいわれ^{13,14)}、これらのレセプターや抗原は、活性化 T 細胞のマーカーとしても使われている。一方、最近、IL-2 R は T 細胞の増殖の過程で、細胞表面だけでなく、培養上清中や血清中にも存在していることが報告されており¹¹⁾、細胞表面の IL-2 R のみならず、この可溶性 IL-2 R も活性化 T 細胞のマーカーとなりうる可能性が示唆されている。

可溶性 IL-2 R の assay は認識するエピトープの異なった 2 つの抗 IL-2 R 抗体を用いた ELISA 法で測定できるようになっており、それが IL-2 R のみを特異的に検出することもすでに証明されている¹¹⁾。また、死細胞の遺残などによって検出されるものではなく、細胞から分泌して出てきたものであることも証明されている¹¹⁾。

可溶性 IL-2 R は特に正常人リンパ球を PHA あるいは抗 OKT 3 抗体などで刺激したあとの培養上清中や¹¹⁾、ATL 患者の血清中に高力価で存在するといわれている¹⁵⁾。また、AIDS¹⁶⁾、T 細胞系の悪性リンパ腫¹⁶⁾、Hodgkin 病¹⁶⁾の患者の血中にも存在するとの報告がある。これらの疾患やリンパ球を mitogen 刺激した状

態では、腫瘍性に増殖した T 細胞あるいは活性化 T 細胞の存在が知られており、可溶性 IL-2 R が活性化 T 細胞と関連していることが考えられる。

我々は SLE 患者で活性化 T 細胞の存在を示唆する報告がいくつかあることに着目し、SLE 患者 40 例の血清中の可溶性 IL-2 R を検索した。その結果、SLE 患者では、可溶性 IL-2 R の力価が正常人に比べ有意に増加しており、正常人の mean+2 S.D. 以上である可溶性 IL-2 R 高値の症例は 16 例 (40%) にみられた。このことは、これらの患者において活性化 T 細胞が存在していることを示唆している可能性がある。一方、SLE のモデルマウスの 1 つである MRL マウスの血中可溶性 IL-2 R が高値であるとの報告¹⁷⁾もあり、我々の結果もあわせ興味深い。ただし、SLE 患者で高値を示した血中可溶性 IL-2 R の力価は、リンパ球の PHA 刺激や ATL 患者にみられる力価 (1,000~10,000 U/ml) ほど高くはなかった。これは、我々が今回検索した症例の疾患活動性がそれほど高くないこと、T 細胞の増殖が ATL のように腫瘍性でないことによるのかもしれない。また、SLE の T 細胞では IL-2 R の発現が減少していることが指摘されており、このことも関係している可能性もある。

次に、我々は可溶性 IL-2 R が SLE 患者においても活性化 T 細胞の存在と関連しているかどうかを確かめるた

め、活性化T細胞と関連の深いリンパ球の表面マーカー (Tac, HLA-DR, HLA-DP) との関係について検討した。その結果、可溶性 IL-2 R 高値群では、HLA-DP 陽性T細胞, HLA-DR 陽性T細胞, Tac 陽性T細胞の比率はいずれも高い傾向にあり、可溶性 IL-2 R が活性化T細胞の存在と関連していることが示唆された。ただし、これらの表面マーカーが活性化T細胞を直接示していることは証明されておらず、また、可溶性 IL-2 R がこれらのマーカーを持った細胞から出てきたという証拠もないため、今後、IL-2 R を発現しているT細胞や他の活性化T細胞のマーカーとの関連の検索、cell cycle の解析も含めて、さらに詳細な検討が必要と思われる。しかし、いずれにしろ、可溶性 IL-2 R が活性化T細胞の存在とある程度の関連があること、そして、他の活性化T細胞のマーカーと比べ測定法が簡単なことより、活性化T細胞の存在を知る1つの指標として臨床に応用できる可能性もあると思われる。

SLE の活動性や臨床病態の指標として、DNA 抗体を含む各種抗核抗体、他の自己抗体、血清補体価など多種あげられる。その中で最も病態とよく相関するものに活動性ループス腎炎における抗 DNA 抗体高値と血清低補体価があげられるが、これも全ての症例にあてはまるわけではない。そのため、新たな免疫学的指標の検索は常に必要と思われる。この観点から、今回、我々は可溶性 IL-2 R の存在と SLE の臨床像との関連性についてもあわせて検討を試みた。その結果、臨床症状では心外膜炎が可溶性 IL-2 R 高値群で有意に多いことを認めたが、それ以外は特に差が認められなかった。また、検査所見では、抗核抗体の peripheral pattern が可溶性 IL-2 R 高値群で有意に多いことを認めたが、抗 DNA 抗体、補体価などの疾患活動性を示す所見でも差はなかった。このことは可溶性 IL-2 R が病像・疾患活動性に関係なく存在している可能性もあるが、同一症例の治療経過から

みた可溶性 IL-2 R の変動が観察されていないため、今後さらに詳細な検討が必要と思われる。

可溶性 IL-2 R の発現調節・役割については種々の推察がされているが、いまだに不明である。発現調節に関しては、細胞表面の IL-2 R が出てくるという説¹⁰⁾と m-RNA レベルですでに異なっているという説¹¹⁾があるが、詳細はいまだにわかっていない。また、可溶性 IL-2 R は *in vitro* で抗原あるいは mitogen 刺激した状態では細胞表面の IL-2 R と同時に出現するといわれるが¹²⁾、経過を追った研究では、時期によって出現の度合いが異なるという報告もある¹³⁾。我々の検索した SLE 患者においても、高力価の可溶性 IL-2 R が出現しているにもかかわらず、T細胞表面の IL-2 R がそれほど増加していない症例 (2例; 細胞表面の IL-2 R を調べた可溶性 IL-2 R 高値群の50%) もみられ、出現時期の差が関連しているのかもしれない。

さらに、従来可溶性 IL-2 R はほとんどがT細胞と関連しているといわれてきたが、B細胞の関与は皆無でないとの報告も出てきている¹⁹⁾。すなわち、正常B細胞を SAC と IL-2 あるいは LPS で刺激すると培養上清中に可溶性 IL-2 R が出現してくる^{17,19)}。そして、活性化B細胞も IL-2 R を発現することなども考え合わせると、ポリクローナルにB細胞が活性化していると考えられる SLE では、B細胞由来の可溶性 IL-2 R も無視はできないと思われる。しかしながら、B細胞由来の可溶性 IL-2 R はT細胞由来のものに比べて量的に少ないといわれており¹⁹⁾、血中に出現する IL-2 R はほとんどT細胞由来と考えられるが、活性化したB細胞との関連についても検討が必要と思われる。

本論文の要旨は第15回日本臨床免疫学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Smolen, J.S., Chused, T.M., Leiserson, W.M. et al.: Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.*, 72: 783~790, 1982.
- 2) 谷口 修: ヒト免疫異常とリンパ球サブセット異常. *日臨免誌*, 9: 398~403, 1986.
- 3) Smith, J.B., Talal, N.: Significance of self-recognition and interleukin-2 for immunoregulation, autoimmunity and cancer. *Scand. J. Immunol.*, 16: 269~278, 1982.
- 4) Sakane, T., Steinberg, A.D., Green, I.: Failure of autologous mixed lymphocyte reactions between T and non T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 3464~3468, 1978.
- 5) Alcocer-Varela, J., Alarcon-Segovia, D.: Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients

- with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.*, 69 : 1388~1392, 1982.
- 6) Horwitz, D.A., Linker-Israeli, M., Bakke, A. et al. : Defective interleukin 2 production in systemic lupus erythematosus: relationship with T helper cell lymphopenia and depressed interleukin 1 activity. *Arthritis Rheum.*, 25 : S 28, 1982.
 - 7) 村川洋子・坂根 剛・恒松徳五郎・他 : 全身性エリテマトーデスにおけるインターロイキン 2 の産生ならびにインターロイキン 2 に対する反応性の欠陥. *アレルギー*, 32 : 386~391, 1983.
 - 8) Hirano, T., Hashimoto, H., Okumura, K. et al. : The appearance of Ia⁺ T cell in systemic lupus erythematosus. *Cellular, Molecular and Genetic Approaches to Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 1987, pp. 441~445.
 - 9) Smith, K.A. : T-cell growth factor. *Immunol. Rev.*, 51 : 337~357, 1980.
 - 10) Tsudo, M., Uchiyama, T., Yodoi, J. et al. : Failure of regulation Tac antigen / TCGF receptor on adult T cell leukemia cell by anti-Tac monoclonal antibody. *Blood*, 61 : 1014~1016, 1983.
 - 11) Rubin, L.A., Boutin, B., Nelson, D.L. et al. : Soluble interleukin 2 receptor are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J. Immunol.*, 135 : 3172~3177, 1985.
 - 12) Reske-kunz, A.B., Osawa, H., Diamantstein, T. et al. : Soluble interleukin 2 receptors are released by long term cultured insulin-specific T cells transiently after contact with antigen. *J. Immunol.*, 138 : 192~196, 1987.
 - 13) Trowbridge, I.S., Omary, M.B. : Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78 : 3039~3043, 1981.
 - 14) Ko, H.S., Fu, S.M., Winchester, R.J. et al. : Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 150 : 246~255, 1979.
 - 15) Mackeen, L., Hinuma, Y., Purtilo, D. et al. : Serum interleukin 2 receptor as marker for active T cell malignancies. *Fed. Proc.*, 45 : 454, 1986.
 - 16) Nelson, D.L. : Soluble interleukin-2 receptors : Analysis in normal individuals and in certain disease states. *Fed. Proc.*, 45 : 377, 1986.
 - 17) Balderas, R.S., Diamantstein, T., Theofilopoulos, A.N. et al. : Elevated titers of cell-free interleukin 2 receptor in serum of lupus mice. *J. Immunol.*, 139 : 1496~1500, 1987.
 - 18) Osawa, H., Josimovic-Alasevic, O., Diamantstein, T. : Interleukin 2 receptors are released by cells in vitro and in vivo I. Detection of soluble IL-2 receptors in cell culture supernatants and in the serum of mice by an immunoradiometric assay. *Eur. J. Immunol.*, 16 : 467~469, 1986.
 - 19) Nelson, D.L., Rubin, L.A., Boutin, B. et al. : An analysis of the cellular requirements for the production of soluble interleukin-2 receptor in vitro. *J. Clinical. Immunol.*, 6 : 114~120, 1986.