沖縄産カンショ茎葉の一酸化窒素 ラジカル消去作用

平良淳誠^{1*}, 大嶺和可奈¹, 大見のり子²,
平良和代³, 永田純一⁴

¹ 国立沖縄工業高等専門学校生物資源工学科

² 沖縄県農業研究センター

³ 沖縄県企業局

⁴ 独立行政法人国立健康・栄養研究所

Nitric Oxide-scavenging Activity of Okinawan Sweet
Potato (*Ipomoea batatas* L.) Leave Extracts

Junsei Taira^{1*}, Wakana Ohmine¹, Noriko Ohmi²,
Kazuyo Taira³ and Junichi Nagata⁴

¹ Okinawa National College of Technology, Department
of Bioresource Technology, 905 Henoko,
Nago, Okinawa 905-2192

² Okinawa Prefectural Agricultural Research Center,
832 Makabe, Itoman, Okinawa 901-0336

³ Okinawa Prefectural Enterprise Bureau, Water Quality
Control Office, 1-27 Miyagi, Chatan, Okinawa 904-0113

⁴ National Institute of Health and Nutrition, Laboratory
of Assessment of Food Component Division of
Health and Nutrition, 1-23-1 Toyama,
Shinjyuku, Tokyo 162-8636

Leaves of nine Okinawan sweet potato cultivars (*Ipomoea batatas* L.) and two comparable sweet potato cultivars were examined for their ability to induce nitric oxide (NO) production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. All of these varieties suppressed nitrite production, an index of NO. In addition, the sweet potato leave extracts decreased the amount of nitrite ions generated from NOR3, an NO donor, indicating that they have NO-scavenging activity. This NO-scavenging activity of sweet potato leaves was correlated with the total amount of polyphenol and its main constituents of caffeoylquinic acid (CQA) derivatives, such as 5-monoCQA, 4,5-diCQA, 3,5-diCQA, 3,4-diCQA and 3,4,5-triCQA. Therefore, the CQA derivatives may be responsible for the NO-scavenging activity. This study demonstrated that sweet potato leaves may be promising functional food materials for preventing various inflammatory diseases that cause excess NO production.

(Received Sep. 6, 2011; Accepted Mar. 7, 2012)

Keywords : sweet potato, caffeoylquinic acid, polyphenol, nitric oxide (NO), Okinawa

キーワード : カンショ, カフェオイルキナ酸, ポリフェノール, 一酸化窒素, 沖縄

活性酸素の過剰な発生による酸化ストレスは、細胞傷害を引き起こし、動脈硬化、糖尿病、癌などの要因になることから、酸化ストレスを軽減させる抗酸化剤の探索研究と開発が活発に展開されている。カンショ茎葉部は抗酸化作用を有するポリフェノール含量が高く、ラジカル消去作用を有することも明らかにされている^{1)~3)}。カンショ茎葉に含まれるポリフェノールのカフェ酸やカフェオイルキナ酸 (caffeoylquinic acid (CQA)) 誘導体には、肝障害抑制、抗変異原性、抗癌作用および抗 LDL 酸化活性の生理活性が明らかにされている^{4)~7)}。また、高血圧発症モデル動物 SHRSP ラットにカンショ茎葉粉末を飼餌とした投与実験で、血流改善効果が認められている⁸⁾。

一酸化窒素ラジカル (NO) は、内皮細胞由来平滑筋弛緩因子であることが発見されて以来、神経伝達物質など、多くの生理作用を有することが明らかになってきた。一方で、炎症に伴う生体傷害には、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) により産生される NO が関与していることが知られている。iNOS は、細菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) や、炎症性サイトカインである TNF- α や IL-6 などによって活性化したマクロファージにおいて発現誘導される⁹⁾¹⁰⁾。慢性炎症部位で過剰に産生された NO は、活性酸素のスーパーオキシド (O_2^-) と反応して、より酸化力の強いペルオキシナイトライト ($ONOO^-$) となり、タンパク質の変性や DNA の損傷などを引き起こすことで、炎症性疾患や心筋梗塞、腫瘍などを発症する危険性を高めると考えられている^{11)~15)}。過剰な NO 産生を抑制することは、酸化ストレスが要因で引き起こされる疾患の予防に繋がる。これまでの研究で、植物に含まれるフラボノイド化合物の aromadendrin や quercitrin は NO 捕捉作用を示すこと¹⁶⁾、また rutin や quercetin, oroxylin は iNOS 発現阻害による NO 産生抑制作用を有することが報告されている¹⁰⁾¹⁷⁾。

本研究では、カンショ茎葉抽出物が LPS 刺激によるマクロファージの NO 産生を抑制することを明らかにした。また、NOR3 由来の NO に対する消去作用も見出し、抽出物に含まれるポリフェノールがその作用に関与することを示唆する結果を得たので報告する。

1. 実験方法

(1) 実験試薬

没食子酸, lipopolysaccharide (LPS), L-arginine および interferon- γ (IFN- γ) は、和光純薬工業から購入した。NO 供与剤 4-ethyl-2-hydroxyamino-5-nitro-3-hexenamide (NOR3) は、同仁化学研究所から購入した。その他の試薬類は、分析レベルの高純度のものを用いた (ナカライテスク株式会社および和光純薬工業)。

(2) カンショ試料と調製

カンショ (*Ipomoea batatas* L.), ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) およびエンサイ (*Ipomoea aquatica*) は沖縄県農業研究センター圃場で 2007 年 12 月に採取したものを実

¹ 〒905-2192 沖縄県名護市字辺野古 905

² 〒901-0036 沖縄県糸満市字真壁 820

³ 〒904-0113 沖縄県中頭郡北谷町字宮城 1-27

⁴ 〒162-8636 東京都新宿区戸山 1-23-1

* 連絡先 (Corresponding author), taira@okinawa-ct.ac.jp

験に供した。カンショは、沖縄在来系統由来の9品種（沖縄紫、オキヒカリ、備瀬、沖育01-1-1、宮農36号、八重山カズラ、名護マサリ、春コガネ、コガネユタカ）と比較品種として宮崎系統由来の‘スイオウ’と‘アヤマラサキ’を用いた。また、カンショ茎葉の葉野菜としての利用を想定していることから、緑色葉野菜である沖縄産の‘ハウレンソウ’と‘エンサイ’も比較品種として用いた。試料の茎葉部は凍結乾燥後に、ミキサーで粉末にして1gを秤量し、20mlエタノールを加えてオーバーナイトで振とう抽出した。抽出試料は、ろ過後に遠心濃縮した（東京理科株式会社製、EYELAUNITRAPUT-1000）後にエタノール1mlに溶解し、これを0.45 μ mフィルター（ミリポア社）でろ過したものを試料溶液として、分析用およびアッセイ用試料に用いた⁷⁾。試料濃度は、1ml試験溶液中の乾燥重量（mg-dry weight/ml）として表記した。

(3) ポリフェノールの定量

試料中のポリフェノール含量は、Folin-Ciocalteu法により測定した。マイクロプレートリーダー（パイオラッド社、モデル680XRマイクロプレートリーダー）を用いて波長655nmの吸光度を測定し没食子酸を標準液としてポリフェノール含量を算出した³⁾⁷⁾。ポリフェノール含量は乾燥重量中の没食子酸相当量で表記した（ μ mol-gallic acid equivalent/g-dry weight）。

(4) 亜硝酸イオン濃度の定量

NOの産生量は、その酸化物である亜硝酸イオン濃度を指標として、Griess法により定量した¹⁸⁾。試料（80 μ l）を96穴マイクロプレートにとり、PBS（20 μ l）、1% sulfanilamide / 5% リン酸溶液（50 μ l）および1% *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine 溶液（50 μ l）を添加して10分間反応させた。マイクロプレートリーダーにより波長540nmでの吸光度を測定し、亜硝酸ナトリウムを標準液として、亜硝酸イオン濃度を算出した。

(5) RAW264.7マクロファージ細胞を用いたNO産生抑制試験

RAW264.7マクロファージ細胞は、DMEM培地（10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin）を用いて、CO₂インキュベーター（5%CO₂, 37℃）にて継代培養した。NO産生抑制試験は、細胞を96穴マイクロプレート（5 $\times$ 10⁵ cells/well）にまき、CO₂インキュベーター（5%CO₂, 37℃）で24時間培養したのちに行った。培養細胞に試料（最終濃度0.5, 1.25, 2.5 mg-dry weight / ml）、LPS（100 ng/ml）、L-arginine（2 mM）およびIFN- γ （100 U/ml）を処理し、17時間後の培養上清を採取して、亜硝酸イオン濃度をGriess法により測定した¹⁷⁾¹⁸⁾。

(6) 細胞毒性試験（MTT法）

細胞毒性は、MTT法で生存率を測定することにより評価した¹⁶⁾。培養細胞に0.05%MTT溶液（100 μ l）を添加して、CO₂インキュベーターで2時間培養した後に培地を取

り除き、生存細胞によって代謝されたMTTの還元物質であるホルマゼンをDMSO（50 μ l）で抽出して、吸収波長540nmと対照波長655nmの吸光度を測定した¹⁶⁾。細胞生存率は、LPS処理細胞（コントロール）の値（A540nm-655nm）を100%として算出した。

(7) NO消去試験

カンショ茎葉抽出物のNO消去活性は、NO供与剤であるNOR3由来の亜硝酸イオンを指標として評価した。PBS（pH7.4）96 μ lに前述（2）の調製試料をエタノールで50倍希釈した試料2 μ l（最終濃度0.4 mg-dry weight/ml）、および10 mM NOR3溶液を2 μ l添加（最終濃度200 μ M）して、室温で60分間反応させた後¹⁶⁾、反応液（80 μ l）を用いて亜硝酸イオン濃度をGriess法で測定した¹⁸⁾。

(8) カフェ酸誘導体の成分分析

カフェ酸誘導体は、生鮮なカンショ茎葉のメタノール抽出物から分離した⁷⁾。各品種のカンショ茎葉におけるカフェ酸誘導体の含量は、各々の標準物質の検量線から、LC/MS（アジレント製、Agilent1200）を用いて定量した⁷⁾。分析はC18カラム（YMC社製、YMC-Pack ProC18, 4.6 I.D. X 100 mm）を用いて0.5% 蟻酸にアセトニトリルを2%（15 min）、45%（50 min）および100%（60 min）のグラジエントで、流速0.8 ml/min、カラムオープン40℃、検出器326 nmの条件で行った。質量分析（MS）は、ESI法でnegativeモード、ネブライザー温度300℃、ドライガス流量10.01 ml/min およびネブライザー圧60 psigで行った。各アッセイにおける各種カフェ酸誘導体含量およびその総量は、乾燥重量1gに含まれる濃度で（ μ mol/g-dry weight）表記した。

(9) 測定値の統計処理

各試料は4回の測定を行い、その平均値と標準偏差で示した。有意差の検定はDunnett法で行い、 $p < 0.05$ （有意水準）を有意差ありと判定した¹⁾。

2. 実験結果と考察

沖縄在来のカンショ品種系統が、LPS刺激で誘導されるRAW264.7細胞からのNO産生に対して抑制作用を示すか検討した（図1）。今回検討した11品種すべてがNO産生抑制作用を有することを確認し、処理濃度0.5 mg-dry weight / mlにおいて、‘沖縄紫’と‘オキヒカリ’、‘春コガネ’を除く8品種は、葉野菜の‘ハウレンソウ（spinach）’や‘エンサイ（water-spinach）’よりも比較的強い活性を示した。‘沖育01-1-1’は、他のカンショ品種に比べて高いNO産生抑制を示したが、高濃度（1.25 および 2.5 mg-dry weight / ml）では細胞毒性が認められた（図2）。また、‘備瀬’、‘スイオウ’、‘名護マサリ’および‘コガネユタカ’についても、2.5 mg-dry weight / mlで細胞毒性が認められた。カンショ品種のNO産生抑制活性は、細胞毒性を考慮すると、‘宮農36’が最も有用品種であり、次いで‘八重山カズラ’と‘春コガネ’が有用であることが示唆された。カンショ茎葉はポリフェノール含量が高く、カフェ酸誘導体を多く含んでいることが明らかにされ

Fig. 1 Inhibitory action of sweet potato leaves on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages

The effect of the various concentrations (0.5, 1.25 and 2.5 mg-dry weight/ml) of sweet potato leaf extracts on the NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells was evaluated. Data were expressed as mean $\pm$ SD. The significant difference was analyzed by dunnett method. * $P < 0.05$ indicated as significant difference from the LPS treated cells (control).

ている⁴⁾⁷⁾¹⁹⁾。細胞試験より見出した NO 産生抑制作用は、カンショ茎葉抽出物による iNOS 発現抑制と NO 消去、あるいは両作用機構によることが考えられる。本研究ではポリフェノールが有するラジカル消去作用に注目し、カンショ茎葉抽出物の NO 消去活性を検討した。NO 発生剤 NOR3 と各種カンショ茎葉抽出物を PBS 中にて混合し、NOR3 由来の亜硝酸イオンを Griess 法により測定した。その結果、図 3 に示したように全品種で NO 消去活性が認められ、これはカンショ茎葉中のポリフェノール含量と正の相関を示した ($r = 0.88$)。また、カンショ茎葉の NO 消去活性は、ホウレンソウに比べて備瀬とスイオウを除く品種で有意に高く、また‘沖育 01-1-1’、‘八重山カズラ’、‘名護マサリ’、‘春コガネ’の 4 品種が‘エンサイ’と同程度の NO 消去活性を示し、‘コガネユタカ’は、エンサイよりも有意に高い活性を示した。カンショ茎葉の NO 産生抑制作用には、ポリフェノール類の NO 消去活性が一部寄与していることが示唆される。カンショ茎葉のポリフェノール類は、主にカフェ酸とキナ酸との結合からなるクロロゲン酸などのカ

フェオイルキナ酸誘導体であることが知られている⁴⁾⁷⁾¹⁹⁾。我々は、本研究でも用いているカンショ品種の茎葉部には、カフェ酸、クロロゲン酸 (5-monoCQA)、ジカフェオイルキナ酸 (4,5-diCQA, 3,5-diCQA, 3,4-diCQA) およびトリカフェオイルキナ酸 (3,4,5-triCQA) が含まれ、その中でも 4,5-diCQA と 3,5-diCQA の含量は高く、品種間の差が大きいことを報告している⁷⁾。これらの結果から、NO 消去作用にはカフェ酸誘導体の関与が示唆される。図 4 には、カンショ各品種におけるカフェ酸誘導体の総含量と NO 消去活性の相関図を示した。これは、図 3 と非常に類似した結果 ($r = 0.82$) を示したことから、カフェオイルキナ酸誘導体が NO 消去活性に大きく関与していることが示唆された。そこで次に、カンショ各品種に含まれる個々のカフェオイルキナ酸誘導体含量と NO 消去活性の相関を検討した (図 5)。その結果、カフェ酸は若干弱いものの、検討したカフェオイルキナ酸誘導体は正相関を示し、ジカフェオイルキナ酸誘導体は比較的強い相関を示した。以上の結果から、NO 消去活性にはカフェオイルキナ酸誘導体が関与

Fig. 2 Cytotoxicity of sweet potato leaves in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages

Cell viability treated with the various concentrations (0.5, 1.25 and 2.5 mg-dry weight/ml) of sweet potato leaf extracts was examined by an MTT assay. The cell viability was expressed as % of the LPS treated cells (control). Data were expressed as mean $\pm$ SD. The significant difference was analyzed by dunnett method. * $P < 0.05$ indicated as significant difference from the control cells.

し、特に含量が多く活性相関の高い 4,5-diCQA と 3,5-diCQA の関与が大きいことが示唆された。これまでの研究で、薬用植物に含まれるフラボノイド化合物に NO 消去活性が明らかにされている¹⁶⁾。フラボノイド化合物の B 環にある水酸基、特にカテコールは、NO あるいは ONOO⁻の捕捉に寄与する¹⁶⁾²⁰⁾。カンショ茎葉に含まれるカフェオイルキナ酸は、カフェオイル基にカテコール構造を有していることから、NO を消去することが推察され、各種カフェオイルキナ酸誘導体の NO 消去活性は、ESR 法等を用いて、より正確に測定する必要がある。一方、フラボノイド類は、iNOS 発現抑制作用も報告されている¹⁰⁾¹⁷⁾²¹⁾。本研究においても、宮濃 36 は、RAW264.7 細胞の NO 産生を顕著に抑制したが、NO 消去活性は中程度であった(図 1 および 3)ことから、同様な作用機構はカンショ茎葉抽出物およびカフェオイルキナ酸誘導体にも予測され、今後の検討課題として進める必要がある。

本研究では、カンショ茎葉抽出物およびカフェオイルキナ酸誘導体の機能性として^{4)~7)}、新たに NO 産生抑制作用を見出し、そのメカニズムの一旦として NO 消去作用の可

能性を明らかにした。過剰な NO 産生は、酸化ストレスの要因となり、炎症性疾患や心筋梗塞および腫瘍など様々な疾患の発症に関与することから^{13)~15)}、沖縄産カンショは、これら疾病の予防に役立つ機能性食品素材として有望であることが示された。

3. 要約

沖縄在来系統由来 9 品種と比較品種系統 2 品種のカンショ茎葉について、LPS 刺激した RAW264.7 細胞より誘導される一酸化窒素ラジカル (NO) 産生に対する抑制作用を評価した。全品種のカンショ茎葉抽出物に NO 産生抑制作用が認められ、同様の葉野菜であるホウレンソウやエンサイよりも比較的高活性であった。NO 発生剤 NOR3 を用いて、カンショ茎葉抽出物の NO 消去活性を検討したところ、その主要ポリフェノールであるカフェオイルキナ酸誘導体の総含量と正相関したことから、NO 産生抑制メカニズムとして NO 消去作用が寄与している可能性が示唆された。本研究からカンショ茎葉は、過剰な NO 産生に伴う様々な炎症性疾患の予防機能性食品として有用食素材になることが示された。

Fig. 3 Correlation between NO scavenging activity and total amounts of polyphenol

1. okiyumemurasaki, 2. okihikari, 3. bise, 4. suioh, 5. aya-murasaki, 6. okiiku01-1-1, 7. miyanoh 36, 8. yaeyamakazura, 9. nagomasari, 10. harukogane, and 11. koganeyutaka. Data were expressed as mean $\pm$ SD ($n = 4$).

Fig. 5 Correlation between NO scavenging activity and the content of individual caffeic acid derivatives in sweet potato leaves

Each content of caffeic acid derivatives obtained from all sweet potato leave extracts and their NO scavenging activity was plotted. Data were expressed as mean $\pm$ SD.

Fig. 4 Correlation between NO scavenging activity and total amounts of caffeic acid derivatives in sweet potato leaves

1. okiyumemurasaki, 2. okihikari, 3. bise, 4. suioh, 5. aya-murasaki, 6. okiiku01-1-1, 7. miyanoh 36, 8. yaeyamakazura, 9. nagomasari, 10. harukogane, and 11. koganeyutaka. Data were expressed as mean $\pm$ SD ($n = 4$).

文 献

- 1) 須田郁夫, 沖 智之, 西場洋一, 増田真美, 小林美緒, 永井沙樹, 比屋根理恵, 宮重俊一, 沖縄県実類・野菜類のポリフェノール含量とラジカル消去活性, 日本食品科学工学会誌, **52**, 462-471 (2005).
- 2) 沖 智之, 増田真美, 納美由紀, 小林美緒, 吉田 収, 西場洋一, 須田郁夫, サツマイモ「シモン1号」葉部抽出液のラジカル消去活性, 日本食品科学工学会誌, **49**, 683-687 (2002).
- 3) 平良淳誠, 大見のり子, 上地邦彦, 沖縄産カンショ茎葉部の葉酸とポリフェノール含量, 日本食品科学工学会誌, **54**, 215-221 (2007).
- 4) Yoshimoto, M., Yahara, S., Okuno, S., Islam, M., Ishiguro, S. and Yamakawa, O., Antimutagenicity of mono-, di-, and tricaffeoylquinic acid derivatives isolated from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2336-2341 (2002).
- 5) Yamakawa, O. and Yoshimoto, M., Sweetpotato as food material with physiological functions. *Acta. Hort.*, **583**, 179-184 (2002).
- 6) Islam, S., Yoshimoto, M., Ishiguro, K. and Yamakawa, O., Bioactive compounds in *Ipomoea batatas* leaves. *Acta. Hort.*, **628**, 693-699 (2003).
- 7) 平良淳誠, 大嶺和可奈, 沖縄産カンショ茎葉のカフェ酸誘導体含量と抗 LDL 酸化作用, 日本食品科学工学会誌, **58**, 16-20 (2011).
- 8) 平良淳誠, 血流改善剤, 特許公開 2010-111600, (2010).
- 9) Caradonna, L., Amati, L., Magrone, T., Pellegrino, N.M., Jirillo, E. and Caccavo, D., Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J. Endotoxin. Res.*, **6**, 205-214 (2000).
- 10) Shen, S.C., Lee, W.R., Lin, H.Y., Huang, H.C., Ko, C.H., Yang, L.L. and Chen, Y.-C., In vitro and in vivo inhibitory activities

本研究は, JST「シーズ発掘試験」委託研究で得られた成果である。

- of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production. *Eur. J. Pharmacol.*, **446**, 187–194 (2002).
- 11) Stefen, Y., Jung, T., Klotz, L.O., Schewe, T., Grune, T. and Sies, H., Protein modification elicited by oxidized low-density lipoprotein (LDL) in endothelial cell. Protection by (-)-epicatechin. *Free Radical Biol. Med.*, **42**, 955–970 (2007).
- 12) Buney, S., Caufield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S. and Tannbaum, S.R., The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.*, **424**, 37–49 (1999).
- 13) Beckman, J.S. and Koppenol, W.H., Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.*, **271**, C1424–C1437 (1996).
- 14) Hobbs, A.J., Higgs, A. and Moncada, S., Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Ann. Res. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 191–220 (1999).
- 15) Pacher, P., Joseph, S., Beckman, J.S. and Liaudet, L., Nitric oxide and peroxynitrite in Health and disease. *Physiol. Rev.*, **87**, 315–424 (2007).
- 16) Taira, J., Nanbu, H. and Ueda, K., Nitric oxide-scavenging compounds in *Agrimonia pilosa* Ledeb on LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Food Chem.*, **115**, 1221–1227 (2009).
- 17) Chen, Y.C., Yang, L.L. and Lee, T.J.F., Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor- κ B activation. *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 1445–1457 (2000).
- 18) Taira, J., Miššik, V. and Riesz, P., Nitric oxide formation from hydroxylamine by myoglobin and hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1336**, 502–508 (1997).
- 19) Ishiguro, K. and Yamakura, O., Identification and characterization of foliar polyphenolic composition in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) genotype. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3718–3722 (2002).
- 20) Nakagawa, T. and Yokozawa, T., Direct scavenging of nitric oxide by green tea. *Food. Chem. Toxicol.*, **40**, 1745–1750 (2002).
- 21) Taira, J., Ohmine, W., Ogi, T., Nanbu, H. and Ueda, K., Suppression of nitric oxide production on LPS/IFN- γ -stimulated RAW264.7 macrophages by a novel catechin, pilosanol N, from *Agrimonia pilosa* Ledeb, 2012, in press

引用 URL

- i) <http://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/testdocs/tomocom/welcome.html>

(平成 23 年 9 月 6 日受付, 平成 24 年 3 月 7 日受理)