

地域一般集団コホート研究でみられた喫煙の健康影響

中地 敬*、今井 一枝*

はじめに

喫煙はヒトの健康を考える上で、必ず考慮しなければいけない重要な環境要因である。本研究は、埼玉県地域一般集団を対象としたコホート研究に基づき、1) 喫煙とがん及び心疾患の関係を明らかにし、2) 喫煙者の免疫・血清学的特徴を示した上で、3) 喫煙者の中での発がん高危険群を同定した。さらに、4) 緑茶飲用が喫煙者及び非喫煙者の発がんに与える影響を検討した。緑茶1日10杯以上の飲用群のがん罹患年齢はそれ以下の飲用群より高く、このがん発生の遅延は喫煙者においても見出されることを示した。

対象と方法

埼玉県地域一般住民8,552人を対象としたコホート研究を、1986年から行っている。基礎調査は20歳代から調査時点までの食習慣・喫煙歴・飲酒歴・労働などの身体活動・睡眠・病歴・常用薬・血縁のがん既往・性格・ストレスなど90項目について疫学調査を行った。そのうちの3,625人については生活習慣などに関する質問票調査だけでなく、末梢血サンプルを用いて血清脂質、リポ蛋白、グロブリン・アルブミン画分、ビタミンA、過酸化脂質、セレンウム、血清トランスアミナーゼ、フェリチン、AFP、CEAなどの測定に加え、末梢血リンパ球のナチュラルキラー活性、PHAによるリンパ球幼若化反応、CD4・CD8陽性リンパ球サブセットの免疫マーカーの測定も行った。現在もがん罹患と全死亡の追跡調査を継続しており、2000年までにがん罹

患者（死亡も含む）625人、全死亡者1,531人（内、心疾患294人、脳血管疾患267人）を見出した。

喫煙とがん及び心疾患

1) 喫煙者のがん

対象者8,552人のうち、男性対象者（喫煙者2,587、禁煙者791、非喫煙者727人）の2000年までの14年間の追跡調査（全がん罹患患者363、たばこ関連がん122、肺がん59人）に基づき、喫煙者の全がん、たばこ関連がん、肺がんの相対危険を男性について評価した。その際、喫煙に関連する生活習慣の影響はコックスハザードモデルにより考慮した。全がんでは、非喫煙者と比べ、喫煙者、禁煙者の相対危険はそれぞれ1.48（95%信頼区間、1.07-2.06）、1.31（0.90-1.91）であった。さらに、たばこ関連がん（口腔、咽頭、食道、肺、膵、膀胱がん）では、非喫煙者に比べ、喫煙者、禁煙者の相対危険は、2.80（1.34-5.87）、2.40（1.08-5.36）とリスクは増加した。肺がん単独では、それぞれ2.70（1.04-6.98）、1.27（0.41-3.91）であった。発がん促進因子はがんの発症を早くし、発がん抑制因子はがんの発症を遅らせると考えられることから、がん罹患年齢も重要ながんリスクの指標である。男性喫煙者のがん罹患年齢は平均67.9 ± 0.7歳（全がん、220人）であり、非喫煙者の罹患年齢71.3 ± 1.5歳（48人）より3歳低いことを見出した。

喫煙は肺がんだけでなく、さまざまながんのリスクを高くしていることから、化学発がんだけでは説明できないリスク関連要因として、喫煙に関連した生活習慣を次に検討した。8,552

* (財)放射線影響研究所

表-1 男性喫煙者と非喫煙者（禁煙者を除く）の生理学的特性の比較

PHA によるリンパ球幼若化反応以外は統計学的に有意な差が認められた生体マーカーのみを示した。

生体マーカー	喫煙者 (n=855) 平均値 ± SE	非喫煙者 (n=227) 平均値 ± SE	
血清マーカー			
血清総タンパク (g/dl)	7.42 ± 0.42	7.57 ± 0.44	P < 0.001
血清アルブミン/グロブリン比	1.88 ± 0.27	1.80 ± 0.28	P = 0.001
グロブリン画分 α1 (%)	2.57 ± 0.41	2.37 ± 0.46	P < 0.001
α2 (%)	7.02 ± 1.11	6.63 ± 1.21	P < 0.001
β* (%)	9.54 ± 1.27	9.81 ± 1.44	P < 0.001
γ (%)	15.73 ± 2.89	16.85 ± 3.01	P < 0.001
アルブミン (%)	64.95 ± 3.29	63.90 ± 5.33	P < 0.001
血清トリグリセライド (mg/dl)	139.44 ± 104.93	122.90 ± 67.76	P < 0.01
血清 LDL-コレステロール* (%)	40.92 ± 9.05	42.33 ± 6.62	P < 0.05
血清過酸化脂質 (nmol/ml)	8.99 ± 3.58	8.32 ± 3.00	P < 0.01
免疫学的マーカー			
末梢血リンパ球のNK活性 (%)	48.25 ± 17.00	50.74 ± 16.30	P < 0.05
PHAによるリンパ球幼若化反応* (×10 ⁴ cpm)	3.466 ± 0.931	3.398 ± 0.968	n. s.
CD4/CD8陽性T細胞比	1.75 ± 0.86	1.44 ± 0.74	P < 0.001
CD4陽性(ヘルパー)T細胞 (%)	39.93 ± 9.14	35.46 ± 8.24	P < 0.001
CD8陽性(サプレッサー)T細胞 (%)	26.01 ± 7.88	27.76 ± 8.24	P < 0.005

* 女性では有意の差が見られなかった。それ以外のすべてのマーカーでは男女共通して有意の差が観察された。

人の断面研究により、喫煙と関連した生活習慣及び体格を検討した。その結果、喫煙者では比体重が小さい(男)、飲酒者が多い(男女)、緑茶の飲用量が多い(男女)、果物の摂取頻度が少ない(男女)、さまざまな野菜の摂取頻度が少ない(女)、食事・睡眠が不規則である(女)、ストレスが高い(女)、という特徴が見出された。緑茶は発がんを抑制するが、それ以外の生活習慣はがん・心疾患のリスクを上げるものが多かった。しかし、これらの生活習慣の影響を考慮しても、喫煙は依然として発がんのリスク要因であった。

2) 喫煙者の心疾患及び全死亡リスク

非喫煙者に比べ、喫煙者の虚血性心疾患罹患に対する相対危険は男女あわせて 1.72 (95% 信頼区間、1.01-2.90) であった。しかし、心疾患死亡については、喫煙による有意なリスク増加は見出されなかった。全死亡について見ると、喫煙者の相対危険は、男性 1.24 (1.02-1.50)、女性 1.29 (1.02-1.64) と有意に高かった。全

死因による平均死亡年齢は、男性で非喫煙者、禁煙者、喫煙者それぞれ 77.2 ± 1.0 (死亡者 131 人)、74.1 ± 0.8 (180 人)、72.2 ± 0.6 歳 (456 人) であり、喫煙ががんだけでなく他の加齢病の発症にいたる段階を加速していると考えられる。

喫煙者の免疫・血清学的特徴

生体マーカーを測定した 3,625 人のうち、男性喫煙者 855 人と非喫煙者 228 人、女性喫煙者 172 人と非喫煙者 2,023 人の断面研究により、喫煙者の生理学的特性を、非喫煙者との比較により明らかにした。多くの血清成分及び免疫能に喫煙者と非喫煙者で有意の違いが見られた(表-1)。これらの違いに、喫煙自体あるいは関連した生活習慣がそれぞれどの位の割合で寄与しているかは、予防を考える上で重要な問題であるが、それは次の課題としたい。血清中のビタミンA、フェリチン、AFPなど女性喫煙者だけに見られる特性もあるが、男女共通して見出された喫煙者の特性は、血清総タンパク濃度、

タンパク画分の濃度（グロブリン α_1 、 α_2 、 γ 、アルブミン）が低く、アルブミン/グロブリン比、血清トリグリセライド、過酸化脂質が高いことであった。血清トリグリセライドと過酸化脂質は 40・50 歳代の喫煙者で特に高く、この年代での喫煙者の虚血性心疾患の発生に関与している可能性がある。さらに、喫煙者の免疫能は非喫煙者と大きな違いを示した。血清 γ -グロブリンは特に女性喫煙者で低く、抗体産生能が低下していることを示唆している。また、CD4（ヘルパー）/CD8（サプレッサー）陽性Tリンパ球比は自己免疫疾患、慢性活動性肝炎、全身へのストレス刺激で高くなることが知られているが、喫煙者でも高くなる。喫煙というストレスへの反応なのかその解釈は難しいが、T-T 細胞間及び T-B 細胞間での免疫情報の伝達における促進と抑制のバランスが崩れている可能性を示唆する。さらに、がんに対する主要な免疫防御機構である末梢血リンパ球のNK活性¹⁾も喫煙者で低かった²⁾。喫煙が免疫的宿主防御の減弱を介して、がんなどの疾患発生に関与している可能性がある。

喫煙者の中での発がん高危険群

喫煙者の発がんリスクが非喫煙者に比べて高いことは、本研究を含め多くの研究で見出されている。喫煙者の発がんリスクを示す生体マーカーの検討は、喫煙者の中でさらに発がんリスクの高い集団を見出すという高危険群の同定のみならず、禁煙あるいは化学予防などの介入を行う上で予防効果を示す指標として重要である。

生体マーカーを測定した 3,625 人の 14 年間の追跡調査（全がん罹患者 259 人）に基づいて、生体マーカーと発がんとの関連を評価した。なお、臨床診断前の担がん状態が生体マーカーへ与える影響を除くため、生体マーカーを測定後 2 年未満にがんと診断された患者を除外して解析した。その結果、PHA によるリンパ球幼若化反応と血清 α_2 グロブリンが喫煙者の発がんリスクと強く関連することを見出した。このうち、

血清 α_2 グロブリンについて述べる。

1) 血清 α_2 グロブリンと喫煙状況別に見た発がんリスク

血清 α_2 グロブリンは、年齢によらず、一貫して喫煙者のほうが非喫煙者に比べ高い。そこで、 α_2 グロブリンの 3 分位（低：6.6% 未満、中：6.6% 以上 7.5% 未満、高：7.5% 以上）に基づき、低・中値群と α_2 グロブリン高値群の 2 群に分け、非喫煙・禁煙者と喫煙者の 2 群と組み合わせて 4 群とし、全がん及びたばこ関連がんの相対危険を算出した。非喫煙・禁煙者の α_2 グロブリン低・中値群を基準として、非喫煙・禁煙者の高値群、喫煙者の低・中値群、喫煙者の高値群の全がんに対する相対危険は、それぞれ、0.88 (0.45-1.70)、0.95 (0.57-1.56)、1.64 (1.02-2.66) であった。また、喫煙者の中で比べても、高値群の相対危険 1.64 は、低・中値群に比べ有意に高く、喫煙者で血清 α_2 グロブリンが高い者は、喫煙者の中でも高い発がんリスクを示す。さらに、たばこ関連がんでは、非喫煙・禁煙者の低・中値群に比べて、非喫煙・禁煙者高値群、喫煙者低・中値群、喫煙者高値群の相対危険は、1.72 (0.50-5.99)、1.71 (0.58-5.01)、3.88 (1.42-10.63) と、全がんより高くなった。

2) 喫煙者の血清 α_2 グロブリンと発がんリスク

血清 α_2 グロブリンが喫煙者の発がん高危険群を同定できるかどうかを確認するために、男性喫煙者のみを対象として、血清 α_2 グロブリン量による全がんの相対危険を算出した。相対危険の解析には、年齢、比体重、飲酒量に加えて喫煙量を考慮した。喫煙者低値群に比べ、中値群、高値群の相対危険は、それぞれ 1.29 (0.65-2.53)、2.05 (1.10-3.82) となり、喫煙者高値群の発がんリスクは明らかに高かった。血清 α_2 グロブリンは非喫煙者より喫煙者で高く、喫煙量とも相関する。喫煙者のなかに存在する発がん高危険群が血清 α_2 グロブリン量に

よって新たに同定できる。

血清中の $\alpha 2$ グロブリン画分のおよそ 70% を、 $\alpha 2$ マクログロブリン、ハプトグロビンなどの炎症反応タンパクが占めている。 $\alpha 2$ マクログロブリンは、おもに肝臓と一部リンパ球などから産生される血中のタンパク分解酵素阻害タンパクであり、また、免疫抑制作用、IL-6 や成長ホルモンの輸送タンパクの機能も持っている。ハプトグロビンは、肝細胞や白血球（特に好酸球）で産生され、酸化ヘモグロビンと結合してその分解に関与するほか、炎症反応タンパクとして感染、炎症、組織崩壊、悪性腫瘍などで上昇する特性をもつ。喫煙者において、血清 $\alpha 2$ グロブリンとその他の肝機能マーカー、GOT、GPT、フェリチン、AFP との相関は見られなかった。血清 $\alpha 2$ グロブリンは、喫煙者における慢性的な炎症状況を反映し、それが発がんリスクを高める要因ではないかと考えられる。

3) 血清 $\alpha 2$ グロブリンの個人間変動と遺伝要因

さらに、地域住民の健康男性喫煙者ボランティアの血清を用いて、血清 $\alpha 2$ グロブリンの個人差とタンパク画分との関係を検討した。 $\alpha 2$ グロブリンと特に強い関連を示したハプトグロビンは、喫煙者における血清 $\alpha 2$ グロブリンの個人間変動の要因である。ハプトグロビンには機能的な意味を持つ遺伝子多型が知られている。すなわち、ハプトグロビン遺伝子のエクソン 3 と 4 の部分的重複の有無による多型 (*Hp* 2-2、*Hp* 2-1、*Hp* 1-1) であり、その産物である HP2-2、HP2-1、HP1-1 タンパクは高次構造が著しく異なっている。基礎調査時の血清 $\alpha 2$ グロブリン低・中・高値群のうち、各 84 名を合計した 252 名の喫煙対照群と 42 名の喫煙がん患者群についてコーホート内症例対照研究を行った。*Hp* 2-1、*Hp* 1-1 の遺伝子型を持ち、血清 $\alpha 2$ グロブリンが低・中値で喫煙者の発がんリスクを基準として 1 に取ると、同じ *Hp* 2-1、*Hp* 1-1 で血清 $\alpha 2$ グロブリンが高値の喫煙者は 5.5 倍のリスクを示す ($P = 0.01$)。一方、*Hp* 2-2 の喫煙

者では、血清 $\alpha 2$ グロブリンによる発がんリスクの増加は見られたが、有意ではなかった。ハプトグロビンは T リンパ球の増殖能を抑制することが *in vitro* 研究で報告されているが、本コーホート研究でも血清 $\alpha 2$ グロブリンが PHA によるリンパ球幼若化反応と負の相関を示すことが観察されたが、これは *Hp* 2-1、*Hp* 1-1 の遺伝子型に限られていた。PHA によるリンパ球幼若化反応が低値の喫煙者の発がんリスクが高いことは本研究でも観察されており、これらの結果を総合すると、 $\alpha 2$ グロブリンはハプトグロビン遺伝子型 *Hp* 2-1、*Hp* 1-1 を持つ喫煙者の場合、T リンパ球の機能を抑制することにより、喫煙による軽度炎症が持続して発がんのリスクが増大すると考えられる。

緑茶の飲用と発がん

喫煙者のがん予防は、発がんイニシエーション後の段階を標的とした予防のモデルとしても重要である。なぜなら、加齢によるがんなど生活習慣病のリスクの増大を完全に回避することは難しく、試算によると、100 歳まで生きた場合、男性の 3/4、女性の半数以上ががん罹患すると予測される。正常な細胞ががん化し、さらに増殖して臨床的ながんになるまでの長い年月を考えると、喫煙者、非喫煙者を問わず、体内では遺伝子に損傷を受けた異常な（形質転換した）細胞が発生する機会は加齢とともに激増すると考えられる。また、実際のがん罹患の年齢依存性から多段階発がんモデルによって発がんイニシエーションの起こった年齢を推計すると、多くのがんが 20 歳代であった³⁾。したがって、年齢・生活習慣に応じて、発がんプロモーションの予防、体内で形質転換した異常な細胞の免疫学的排除などの新たながん予防を導入することは、喫煙者だけでなく高齢化社会の必然的な要請と考えられる。

緑茶あるいは緑茶成分である (-)-エピガロカテキンガレート (EGCG) は、動物実験によりさまざまな臓器での発がんを抑制することが報告されてきた。EGCG だけでなく緑茶そのものを

用いた研究によっても、たばこに含まれる発がん物質による肺発がんの抑制など、多くの臓器での発がんプロモーション抑制作用が示され⁴⁾⁵⁾、ヒトに換算した投与量も日本人の多量飲用者と同程度であった。緑茶が発がんプロモーションを抑制するのであれば、緑茶飲用のがん予防効果は、がん発症の遅れ、すなわちがん罹患年齢の高齢化として観察されるはずである。我々はこれまで緑茶のがん予防効果について、コホート研究により以下の結果を得た。

1) 1日10杯以上の緑茶の飲用が全がんのリスクを4割減少させる。

1日緑茶飲用量が3杯以下の群を1として、4-9杯、10杯以上の全がん罹患の相対危険を緑茶の飲用と関連するさまざまな生活習慣の影響を考慮して計算したところ、男性がそれぞれ1.0 (0.50-2.04)、0.54 (0.22-1.34)、女性が0.92 (0.64-1.31)、0.57 (0.34-0.98)、男女計では0.81 (0.52-1.27)、0.59 (0.35-0.98)となり、10杯以上の飲用群で発がんリスクが4割減少した(11年の追跡結果)⁶⁾。肺がんでは相対危険が10杯以上の緑茶飲用群で、3杯以下に比べ0.39 (0.15-0.99)と6割減少しており、緑茶が特に肺がん予防に効果的であることが示された⁷⁾。

2) がんのリスクの減少は緑茶によってがんの発症が遅れることによる。

緑茶1日飲用量が3杯以下、4-9杯、10杯以上の群から発生した全がん罹患者の平均罹患年齢±SEは、男性がそれぞれ65.9±1.4、68.0±0.9、68.9±1.0歳、女性が68.3±1.6、67.5±1.1、74.5±2.0歳であり、男性で3年、女性で6年ほどがん罹患年齢が緑

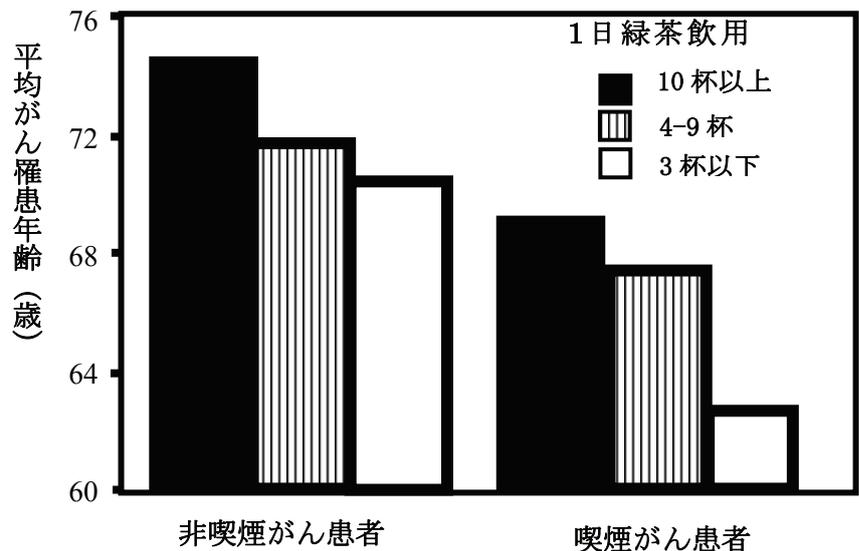


図-1 緑茶飲用量別に見た喫煙者および非喫煙者のがん罹患年齢 (男性)

茶10杯以上の群で高くなっていった(11年の追跡結果)⁶⁾。喫煙者は非喫煙者に比べより若い年齢でがんを発症している。そこで、喫煙者と非喫煙者を緑茶の飲用量別に分けて平均がん罹患年齢を比較したところ、緑茶を多量に飲用している群は喫煙・非喫煙者を問わずがん罹患年齢が高いことを見出した(図-1)。また、全がんの年齢階級別罹患率を緑茶の飲用量で分けて比較すると、10杯以上飲用群のがん罹患率の加齢による増加は他の群より緩やかであった⁶⁾。大阪府がん登録データに基づいて試算してみると、5歳発症が遅れるとがん罹患率が25%減少し、10年ならば50%の減少となり、緑茶の飲用による相対危険の減少とつじつまがあう。

3) 緑茶は全死亡にも影響するのか。

緑茶の飲用はがんだけでなく心疾患も予防することが本研究で見出されている⁷⁾⁸⁾。そこで緑茶飲用と全死亡について死亡年齢と累積生存割合を調べた結果、緑茶を多く飲む群で死亡の遅れと生存割合の増加が見られた(14年の追跡結果)⁹⁾。すなわち、男性喫煙者の平均死亡年齢±SEは、緑茶の飲用量が1日3杯以下の群で67.7±1.2(死亡者104人)、4-9杯で72.0±0.9(203人)、10杯以上で75.2±0.8歳(153人)と緑茶飲用量の増加とともに高くなった。男性非喫煙者では、緑茶の飲用量が3杯

以下の群で 74.8 ± 2.1 (死亡者 40 人)、4-9 杯で 77.9 ± 1.2 (70 人)、10 杯以上で 79.4 ± 2.4 歳 (21 人) であった。女性全体では、1 日 3 杯以下の群で 76.1 ± 0.9 (186 人)、4-9 杯で 78.2 ± 0.6 (357 人)、10 杯以上で 80.9 ± 0.8 歳 (126 人) と緑茶飲用量の増加とともに高くなった。

おわりに

一般集団を 14 年間にわたって追跡したコーホート研究により、喫煙ががん、心疾患、全死亡に影響を与えていることを示した。喫煙者の生理的特徴を生体マーカーを用いて検討することにより、喫煙が多くの生理的機能、特に免疫機能にも影響を与えていること、また、重要な免疫指標の一つであるリンパ球幼若化反応及び炎症の指標である血清 $\alpha 2$ グロブリンが、喫煙者の発がんリスクを表すことを見出した。これらは、喫煙者の発がん宿主の免疫反応、喫煙

による炎症反応が関与していることを意味している。さらに、緑茶によるがん予防の可能性をコーホート研究により検討した。我々の周りにはさまざまな発がん因子 (発がんイニシエーター) が低濃度であっても存在し、また内因性の発がん因子も存在するため、喫煙者、非喫煙者を問わず発がんリスクは年齢とともに増加する。喫煙者のがん予防は発がんイニシエーション後の予防という点で、喫煙者以外のヒト集団にも応用できる、優れたがん予防モデルとなる可能性がある。緑茶の発がん抑制効果については、藤木らの先駆的な研究¹⁰⁾を初めとして、多くのがん研究者による *in vitro* 及び *in vivo* の研究の蓄積が当時すでに存在しており、我々のコーホート研究による検討は「緑茶を多く飲む日本人集団」で検証するという意味があった。本研究では、発がんリスクを表すのに相対危険だけでなく、がん罹患年齢、がん罹患率の年齢依存性を用いて、喫煙の発がん効果、緑茶のが

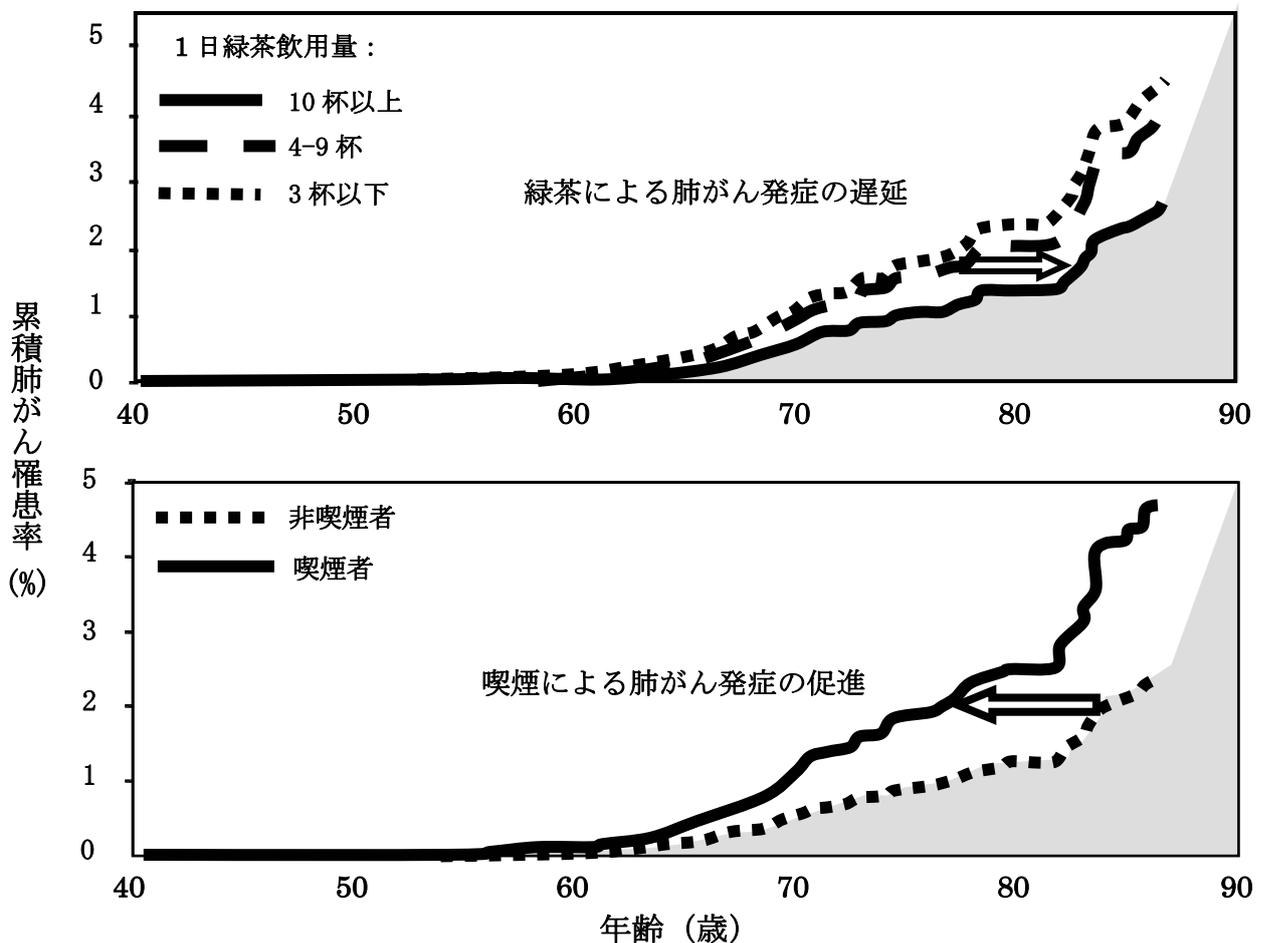


図-2 肺がん罹患に及ぼす緑茶飲用の効果

ん予防効果を検討した。その結果、緑茶の多量飲用は非喫煙者のみならず喫煙者においても、発がんを遅らせることが示唆された。これは我々の考えるがん予防に重要な知見であった。なぜなら、がんは加齢病であり、加齢に伴う発がんの過程を遅らせることにより、寿命内での発症をできるかぎり防ごうというのが、我々のがん予防戦略であるからである。最後に、こうした考えの根拠となる事例を肺がんの場合について示す(図-2)。肺がんの累積罹患率を喫煙状況別に見ると、喫煙者群の肺がん罹患の加齢による増加は非喫煙者群に比べてより急激で、より若年で罹患していることがわかる。一方、緑茶飲用量別に見ると、1日10杯以上飲用群の加齢による肺がん罹患の増加は他の群より緩やかであり、罹患する場合でもより高年齢である。これらの観察は、上に述べたがん予防の考えを支持するものであり、8,552人の方々を14年にわたり観察してきた研究の成果の一つであると考えている。この研究を長年にわたって支えてくださった喫煙科学研究財団の助成に心から感謝を申し上げる。

文 献

- 1) Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000; 356: 1795-9.
- 2) Nakachi K, Imai K. Environmental and physiological influences on human natural killer cell activity in relation to good health practices. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 798-805.
- 3) Nakachi K, Imai K, Suga K. Some evidences of molecular epidemiology in cancer research. *J Epidemiol* 1996; 6: S125-9.
- 4) Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Komori A, Sueoka E, Kozu T, Tada Y, Suga K, Imai K, Nakachi K. Cancer inhibition by green tea. *Mutation Res* 1998; 402: 307-10.
- 5) Fujiki H, Suganuma M, Imai K, Nakachi K. Green tea: cancer preventive beverage and/or drug. *Cancer Lett* 2002; 188: 9-13.
- 6) Imai K, Suga K, Nakachi K. Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population. *Prev Med* 1997; 26: 769-75.
- 7) Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors* 2000; 13: 49-54.
- 8) Imai K, Nakachi K. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *BMJ* 1995; 310: 693-6.
- 9) Nakachi K, Eguchi H, Imai K. Can teatime increase one's lifetime? *Ageing Res Rev* 2003; 2: 1-10.
- 10) Yoshizawa S, Horiuchi T, Fujiki H, Yoshida T, Okuda T, Sugimura T. Antitumor promoting activity of (-)epigallocatechin gallate, the main constituent of "Tannin" in green tea. *Phytother Res* 1987; 1: 44-7.