

〈原著〉

亜鉛源、銅源としてのミネラル酵母とグルコン酸塩の過剰投与がラットのZn、CuおよびFe含量に及ぼす影響

糟谷 健二¹⁾、細見 亮太²⁾、浜田 健一¹⁾、酒本 秀一¹⁾、神前 健¹⁾、吉田 宗弘²⁾

Effects of the overdosage of mineral enriched yeast and gluconate as zinc and copper source on the Zn, Cu and Fe content in rat

Kenji Kasuya¹⁾, Ryota Hosomi²⁾, Kenichi Hamada¹⁾, Shuichi Sakamoto¹⁾,
Ken Kanzaki¹⁾ and Munehiro Yoshida²⁾

Summary Mineral enriched yeast or gluconate was used as zinc and copper source in test diets for rat. The quantity of zinc and copper addition assumed a reasonable standard (Zn: 30 μ g, Cu: 6 μ g/g diet) or high level (Zn: 100 μ g, Cu: 20 μ g/g diet). After 29 days feeding trial, a difference was not produced to growth, a blood property, the organ weight ratio in each group. Regardless of the difference of the zinc source, the difference was not accepted in the high-level zinc dosage ward by a stockpile of zinc to an organ either. And the copper absorption inhibition was not caused either. As for iron, slight absorption inhibition was accepted. On the other hand, when copper was given in a high level, quantity of absorption increased regardless of a source of supply, and an accumulated tendency was accepted by thighbone and kidney. Attention is necessary for copper overdosage. From the above-mentioned result, it was found that the outbreak of the adverse effects did not have a difference with mineral enriched yeast and gluconate.

Key words: Zinc, Copper, Yeast, Gluconate, Overdosage

I. 緒言

濃厚流動食は高齢化や外科手術に伴い咀嚼・嚥下機能が低下した人、胃切除を実施した人などに対して用いられる。この栄養剤には人に必要な栄養素が過不足なく含まれていることが必

要であるが、一部の微量ミネラルに関しては、投与形態（以下供給源と記す）あるいは投与水準に関して未解決な部分が残されている。

亜鉛は皮膚機能や免疫機能の維持にとって重要な微量ミネラルである。特に、寝たきりの高齢者における亜鉛の摂取不足は褥瘡発生の危険

¹⁾オリエンタル酵母工業株式会社
〒174-8505 東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号
²⁾関西大学化学生命工学部
〒564-8680 大阪府吹田市山手町3丁目3番35号
受領日 平成23年2月23日
受理日 平成23年3月3日

¹⁾Oriental Yeast Co., Ltd,
3-6-10 Azusawa, Itabashi-ku, Tokyo 174-8505, Japan
²⁾Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Faculty of
Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai
University,
3-3-35 Yamate-cho, Suita-shi, Osaka 564-8680, Japan

因子であると指摘されている¹⁾。従って、流動食中の亜鉛濃度は極めて重要である。

銅は体内で抗酸化作用や結合組織の生成などを行っており、創傷の治癒や血管を正常に保持するのに重要な役割を担っている。ところが、高齢の入院患者の銅摂取量は低いことが知られており^{2,3)}、流動食中の銅濃度は亜鉛同様極めて重要である。

一方、ミネラルの吸収率や体内での利用率は、ミネラルの摂取形態や共存物の影響を受けて大きく変動することや、特定のミネラルの摂取量の変動は他のミネラルの吸収率や利用率に影響を及ぼすことなどが知られている。特に亜鉛の過剰摂取は銅の吸収阻害を引き起こし、それが更に鉄の利用率を下げ、貧血の原因になると云われている⁴⁾。そのため、食品中に含まれる亜鉛と銅の量には注意を要する。

現在市販されている食品用濃厚流動食の亜鉛源と銅源には強化酵母^{5,6)}またはグルコン酸塩(グルコン酸亜鉛とグルコン酸銅は「栄養機能食品」の表示下で、食品添加物として使用を認められている)が用いられており、強化酵母を用いる場合には亜鉛源も銅源も強化酵母、グルコン酸塩を用いる場合には両ミネラル源ともにグルコン酸塩が用いられるのが一般的である。本研究では、亜鉛と銅の供給源(強化酵母、グルコン酸塩および比較対照としてAIN93G用ミネラル混合に用いられている炭酸塩)と投与水準を変動させた時にラットの成長・血液性状・臓器体重比及び組織の亜鉛・銅・鉄濃度がどの様な影響を受けるかを調べた。

II. 方法と材料

1. 遵守した動物の福祉に関する指針

厚生労働省通知 科発第0601001号(平成18年6月1日付)「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」と株式会社日本バイオリサーチセンターの「実験動物の管理及び福祉に関する指針(平成19年4月2日付)」に従った。

2. 試験飼料

AIN93G飼料(米国国立栄養研究所-American Institute of Nutrition)が、ラット・マウスの栄養研究のための標準飼料としてリコメンドしている飼料で、ミルクカゼイン・コーンスターチ・シクロース等を主成分とする精製飼料。厳密な栄養試験などに用いられる⁷⁾のミネラル混合から亜鉛と銅を除外した飼料を基本飼料とし、それに亜鉛と銅の供給源と投与水準が異なる6種類の試験飼料(表1)を調製した。

亜鉛30 μ g・銅6 μ g/g飼料がAIN93G水準なので、以後これを「適正水準」、亜鉛100 μ g・銅20 μ g/g飼料を「高水準」と表記する。

3. 供試動物と飼育条件

供試動物には薬効薬理試験で一般的に用いられる雄性F344/DuCrIj (Fischer) SPFラット(日本チャールス・リバー株式会社)を用いた。

4週齢の健全な動物を各区の平均体重がほぼ均一になるように7匹ずつ6区に分けた。飼料は

表1 亜鉛、銅の給源と添加量

試験区	1	2	3	4	5	6
Zn・Cu給源	炭酸塩		強化酵母		グルコン酸塩	
Zn・Cu量(μ g/g)	30・6	100・20	30・6	100・20	30・6	100・20
炭酸Zn(%)	0.0058	0.0192				
炭酸Cu	0.0011	0.0038				
強化酵母Zn			0.0533	0.1776		
強化酵母Cu			0.0522	0.1739		
グルコン酸Zn					0.0234	0.0780
グルコン酸Cu					0.0043	0.0143
コーンスターチ	39.7417	39.7256	39.6431	39.3971	39.7209	39.6563

供給源：炭酸塩は試薬特級、強化酵母はオリエンタル酵母工業(株)製Zn強化酵母とCu強化酵母、グルコン酸塩は扶桑化学工業(株)のグルコン酸Znとグルコン酸Cu

動物の区分け直後より給餌器を用いて自由に摂取させ、水も給水瓶を用いて自由に摂取させた。

4. 調査記録項目

飼育期間中毎日動物の状態を観察し、記録した。体重は1週間に1回以上電子天秤を用いて測定した。試験飼料投与期間中、1週間毎に給餌器ごと飼料の重量を測定し、1週間の摂餌量(初期重量-1週間後の重量=摂餌量)を求めた。

5. 試料の採取・調製法と分析法

1)採尿

試験飼料投与25日-29日の間、動物を採尿ケージに入れ、給餌・給水下で毎日24時間に渡って尿を採取し、尿量を記録した。尿には6N塩酸を加えてpHを調整し、採尿期間の終了時まで冷蔵保存した。投与29日目の採尿終了後、個体毎に各採尿日の24時間尿量比に従って5日分の尿を混合した。混合尿は分析まで-80℃で凍結保存した。

なお、上記の方法で採尿を行ったため、尿が糞や食べこぼした飼料などに接触した可能性は否定出来ない。

2)採血と血球検査

試験飼料最終投与日の翌日、ペントバルビタールナトリウム腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈からEDTA-2Kコーティングチューブで採血し、直ちに多項目自動血球分析装置XT-2000iV(シスメックス株式会社)で赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値

(HCT)、血小板数(PLT)及び白血球数(WBC)を測定した。また、RBC・HGB・HCTから赤血球指数(平均赤血球容積:MCV、平均赤血球血色素量:MCH、平均赤血球血色素濃度:MCHC)を求めた。

3)血漿の分離

上記の方法で腹大動脈から採取した血液を直ちに4℃、3,000 rpm(約1,972 × g)で15分間遠心して血漿を分離した。血漿は分析まで-80℃で凍結保存した。

今回の試験では、採血直前の摂餌が血漿成分含量に及ぼす影響を取り除く為の絶食期間を設けることが出来なかった。従って、各動物毎に摂餌から採血までの時間が一定しておらず、血漿成分にもバラツキが出ている可能性が高い。

4)臓器摘出

採血後、肝臓・腎臓・脾臓・胸腺及び大腿骨(右)を摘出して重量を測定し、体重比を求めた。各臓器は分析まで個体別に液体窒素にて凍結保存した。

5)亜鉛・銅及び鉄の測定法

各臓器は硝酸と過塩素酸を用いて湿式灰化し、フレーム式原子吸光(亜鉛、鉄、肝臓と大腿骨の銅)または誘導結合プラズマ質量分析機(ICP-MS)(上記臓器以外の銅)で分析した。また、尿は0.1Mの硝酸で10倍に稀釈し、ICP-MSで測定した。ICP-MSではスカンジウムを内部標準物質として用いた。

6)統計解析

測定結果は二元配置分散分析⁸⁾を行い、ミネラルの供給源と投与水準の影響を検討した。

表2 成長と飼料効率

試験区	1	2	3	4	5	6
Zn・Cu給源	炭酸塩		強化酵母		グルコン酸塩	
Zn・Cu量(μg/g)	30・6	100・20	30・6	100・20	30・6	100・20
平均体重(g)						
開始時	57.8±1.3	57.9±1.3	57.8±1.6	58.1±1.6	57.3±1.6	58.2±1.3
終了時	191.6±7.4	185.6±5.6	183.4±5.8	184.0±7.7	185.9±9.3	183.7±22.8
平均増重(g/匹)	133.8	127.7	125.6	125.9	128.6	125.5
摂餌量(g/匹)	342.1	343.7	332.6	357.6	327.2	329.0
飼料効率(%)	39.1	37.2	37.8	35.2	39.3	38.1
終了時外観	正常	正常	正常	正常	正常	正常

平均体重: Mean±S.D.

Ⅲ. 結果と考察

1. 成長と飼料効率

飼育期間中各区の動物に外見上異常は認められなかった。

表2に飼育結果を示す。飼育終了時の体重は、適正水準の亜鉛と銅を炭酸塩の形態で与えた区がやや高値を示す傾向があったが、有意な差ではなかった。強化酵母とグルコン酸塩では適正水準・高水準共に違いは認められなかった。

強化酵母の高水準区は成長に差が無いのに、1匹当たりの摂餌量が多く、飼料効率（体重増加量×100/摂餌量）がやや低い。

酵母は食物繊維としての効果を有しており、食物から脂質やコレステロールの吸収を抑制する作用や整腸効果、更には免疫賦活効果などを示すことが知られている。これらの効果は酵母添加量が0.1%程度でも認められる。これから推測するに、強化酵母の高水準区は栄養素の吸収率が多少低い可能性があり、これを補う為にラットが摂餌量を増やすことによって対応しているのではないかと考えられる。

グルコン酸塩の高水準区は他区より体重のバラツキが大きいのが、これは特定の1匹の摂餌量が特に少なく、体重も小さいことが原因である。理由は不明であるが、グルコン酸塩区は適正水準区でも摂餌量がやや少ない傾向が認められる。

2. 血液性状

表3に血液性状を示す。適正水準・高水準ともに炭酸塩・強化酵母・グルコン酸塩と進むに従ってRBC・HGB・HCTの何れも値が高くなり、炭酸塩区とグルコン酸塩区に危険率5%未満で有意差が認められた。ところが赤血球指数には各区分で全く違いが認められない。RBC・HGB・HCTは何れも1区→6区と進むにつれて値が少しずつ高くなっており、血液濃縮が起こっている可能性が考えられる。血液濃縮は動物が興奮したり運動したりすると容易に起こることが知られている。採血時の動物を処理した順番を調べてみると1区No.1→2区No.1→→6区No.1→1区No.2→→6区No.2→→6区No.7と進んでおり、分析値を平均値として考えると、1区から6区の順に採血しているのと同じことになる。飼育室での人の動き他で試験区が進むにつれ（＝時間の経過につれ）で動物の動きが活発になっていたのではないかと推定出来る。単位赤血球数に対する血小板数と白血球数に区間差は認められなかった。以上の結果から、RBC・HGB・HCTで認められた有意差は動物の取扱による単純な血液濃縮ではないかと考えられる。

3. 臓器重量と体重比

採取した肝臓・腎臓・脾臓・胸腺および大腿骨の重量ならびに体重比に区間差は認められなかった。

表3 血液性状

試験区	1	2	3	4	5	6
Zn・Cu給源	炭酸塩		強化酵母		グルコン酸塩	
Zn・Cu量 (μg/g)	30・6	100・20	30・6	100・20	30・6	100・20
RBC (10 ⁴ /μL)	722±42.4	728±29.2	738±50.4	752±50.4	767±34.5	762±29.2
HGB (g/dL)	13.0±0.8	13.0±0.5	13.2±0.8	13.5±0.8	13.7±0.5	13.7±0.5
HCT (%)	36.6±2.1	36.9±1.3	37.3±2.4	38.0±2.1	38.8±1.3	38.5±1.3
MCV (fL)	50.7±0.3	50.8±0.5	50.5±0.5	50.6±0.5	50.5±0.5	50.5±0.5
MCH (pg)	18.0±0.0	17.9±0.0	17.9±0.3	17.9±0.3	17.9±0.0	17.9±0.3
MCHC (g/dL)	35.6±0.3	35.3±0.3	35.4±0.3	35.4±0.3	35.4±0.3	35.5±0.3
PLT (10 ⁴ /μL)	75.9±5.6	76.7±4.0	78.9±3.2	78.0±6.6	76.2±5.3	74.0±3.4
WBC (10 ² /μL)	45.6±8.5	42.1±8.2	44.8±8.0	41.1±5.8	43.6±15.9	51.0±11.4
PLT/RBC (%)	10.5	10.5	10.7	10.4	9.9	9.7
WBC/RBC (個/1万個)	6.3	5.8	6.1	5.5	5.7	6.7

4. 尿量

飼育最終日の体重を用いて求めた体重100 g当たりの1日尿量はグルコン酸塩の適正水準区(5区)のみ高値(2.25 ml)を示した(他区は1.36 - 1.72 ml)。尿量は個体によるバラツキが大きく、何れの区にも1 - 2匹低値を示す個体が存在したが、5区には認められなかったのが原因である。

5. 各臓器の亜鉛濃度

肝臓・腎臓・胸腺の亜鉛濃度は区間で有意な差は認められなかった。表4に示すように大腿骨では供給源の違いによる差は無かったが、何れの供給源でも有意差は認められないものの適正水準区より高水準区が高い傾向を示した。脾臓では、1区→2区→→6区と試験区が進むにつれて値が低くなる傾向が認められる。これは血液性状のRBC・HCT・MCHとは全く逆の傾向である。脾臓は赤血球の貯蔵器官であり、血液濃縮は脾臓から血管中に赤血球が放出されることによって起こることを考えると、脾臓中の亜鉛濃度は貯蓄されている赤血球量の影響を受け

るのかも知れない。

血漿の亜鉛濃度は適正水準の炭酸塩区と高水準のグルコン酸塩区で高値が認められ、供給源と投与水準の交互作用で有意差が認められた。「血漿の分離」の項で記したように、採血前の絶食期間を設けられなかったため、各個体によって摂餌から採血までの時間が違っていった可能性が高い。血漿中の亜鉛濃度は摂餌後経時変化をすることや、個体間の変動幅が個体内変動幅より大きいことが知られている。よって、今回の結果は参考程度に留めて欲しい。

6. 尿への亜鉛排泄量

尿量と尿の分析値から求めた尿中への亜鉛排泄量は、供給源とは無関係に高水準区で有意に増加していた。その増加倍率は、炭酸塩が1.98倍、強化酵母が3.31倍、グルコン酸塩が5.74倍であったが、個体差が大きく、有意な差ではなかった。亜鉛高水準の影響が尿に認められたことは、高水準投与区で亜鉛が多く吸収されたことを意味しているとも考えられる。しかしながら、高水準投与区の亜鉛濃度の上昇がいずれの臓器においても明確でないことや、生体内の亜

表4 大腿骨、脾臓、血漿の亜鉛濃度

Zn・Cu量 (μg/g)	大腿骨 (μg/g)		脾臓 (μg/g)		血漿 (μg/mL)	
	30・6	100・20	30・6	100・20	30・6	100・20
炭酸塩	122±5	126±6	22.1±0.4	21.6±0.5	1.85±0.06	1.55±0.04
強化酵母	118±7	126±7	21.6±0.3	20.6±0.4	1.49±0.05	1.65±0.06
グルコン酸塩	118±5	128±7	19.6±0.3	18.6±0.7	1.53±0.04	1.80±0.08
二元配置分散分析						
ミネラル源	NS		<i>p</i> <0.001		NS	
添加水準	NS		<i>p</i> =0.030		NS	
交互作用	NS		NS		<i>p</i> <0.001	

表5 大腿骨と腎臓の銅濃度

Zn・Cu量 (μg/g)	大腿骨 (μg/g)		腎臓 (μg/g)	
	30・6	100・20	30・6	100・20
炭酸塩	0.72±0.06	1.15±0.12	3.95±0.42	4.14±0.39
強化酵母	0.86±0.04	1.18±0.08	3.67±0.19	3.77±0.25
グルコン酸塩	0.86±0.43	0.96±0.03	2.46±0.28	3.16±0.30
二元配置分散分析				
ミネラル源	NS		NS	
添加水準	<i>p</i> <0.001		<i>p</i> =0.001	
交互作用	NS		NS	

生物試料分析

表6 大腿骨、肝臓、腎臓の鉄濃度

Zn・Cu量 (μg/g)	大腿骨 (μg/g)		肝臓 (μg/g)		腎臓 (μg/g)	
	30・6	100・20	30・6	100・20	30・6	100・20
炭酸塩	64.6±2.5	59.3±2.0	37.2±1.4	34.4±1.6	49.6±1.5	42.2±1.6
強化酵母	58.0±1.5	53.4±1.3	34.6±1.6	36.3±0.5	45.5±2.0	44.1±1.7
グルコン酸塩	54.1±1.6	51.4±1.5	38.1±1.4	30.8±2.0	42.6±1.0	41.3±1.0
二元配置分散分析						
ミネラル源	p<0.001		NS		p=0.036	
添加水準	p=0.007		p=0.027		p=0.011	
交互作用	NS		p=0.019		NS	

鉛の平衡維持は胆汁を介した大便への排泄で調節されており、腎臓からの排泄は微量で、亜鉛摂取量の影響も認められないとする報告もある⁹⁾。また、増加倍率が水溶性が高い亜鉛源ほど大きいことから、高水準区における尿中の高亜鉛濃度は、尿採取時に糞便もしくは飼料からの亜鉛汚染が起こっていた可能性が高いとも考えられる。

7. 各臓器の銅濃度

表5に示すように、大腿骨と腎臓の銅濃度は供給源とは関係なく高水準区の方が有意に高値を示し、銅の高水準投与の影響が認められた。これに対し、肝臓と血漿の銅濃度は、高水準区において若干高値となる傾向はあるものの、有意な区間差は認められず、肝臓および血漿において銅濃度の恒常性を保つ機構が強く働いていることが考えられる。以上の結果から、適正水準の3.3倍量の銅を投与された高水準区では、投与銅の形態とは関係なく銅が多く吸収され、その銅は骨と腎臓に蓄積するのではないかと考えられる。

亜鉛も銅も大腿骨に蓄積される傾向が認められるので、今回の高水準亜鉛濃度程度で銅の吸収阻害が起こる可能性が有るか否かを大腿骨の亜鉛濃度と銅濃度の関係から調べてみたところ、全く相関が認められなかった。今回の試験では、亜鉛の高水準区は銅も高水準であるので断言は出来ないが、この程度の飼料亜鉛濃度では銅の吸収阻害は起こっていない可能性が高い。

8. 尿への銅排泄量

尿への銅の排泄量は、強化酵母の高水準区と

グルコン酸塩の適正水準区で有意に高い値を示した。しかし、この区間差は、供給源とは関係なく高水準区において大腿骨と腎臓に銅が蓄積しているという結果と矛盾している。また、銅は大部分が胆汁中に排泄され、少量のみが尿へ排泄されることも知られている⁹⁾。これらのことから、銅の場合にも採尿時に糞便あるいは飼料からの汚染が有ったのかも知れない。

9. 各臓器の鉄濃度

表6に示すように、大腿骨・肝臓・腎臓では高水準区、すなわち亜鉛と銅を適正水準の3.3倍量投与した区において、有意な鉄濃度の低下が起こっている。亜鉛の大量投与が、消化管において他の2価金属イオンの吸収と拮抗することは良く知られており、今回の高水準区の飼料亜鉛濃度程度でも消化管からの鉄吸収が阻害されている可能性が高い。一方、脾臓・胸腺・血漿では高水準投与の影響は認められなかった。脾臓の鉄は赤血球のヘモグロビンや組織貯蔵鉄であるヘモジデリン由来と考えられる。脾臓の鉄濃度が亜鉛の高水準投与の影響を受けていないことは、「血液性状」の項で述べたようにMCHやMCHCが亜鉛の高水準投与の影響を全く受けていないことと整合している。

摂餌後の時間の問題は有るものの、血漿の鉄濃度にも影響が無いと云うことは、この程度の亜鉛の投与量であれば、比較的鉄の吸収阻害が軽微であることを示すものと思われる。

10. 尿への鉄排泄量

尿への鉄の排泄量と排泄率では有意な区間差は認められなかった。

Ⅳ. 結語

亜鉛と銅源として炭酸塩・強化酵母あるいはグルコン酸塩を用い、亜鉛量と銅量が適正水準（30 μ g、6 μ g/g飼料）あるいは高水準（100 μ g、20 μ g/g飼料）とした6飼料でラットを29日間飼育した。亜鉛と銅の供給源と添加水準が違って、成長・血液性状・臓器体重比などに差を生じなかった。また、亜鉛を高水準に投与しても臓器への亜鉛蓄積量には違いが認められず、銅の吸収阻害も起こしていなかった。しかしながら、鉄の吸収は僅かながらも阻害されていた。一方、銅を高水準に投与すると、供給源とは関係なく吸収量が増加し、大腿骨と腎臓に蓄積される傾向が認められた。銅の過剰投与には注意が必要である。以上の結果から、過剰症の発生に強化酵母とグルコン酸塩で差が無いことと、亜鉛・銅共に適正量以上に添加する必要は無いことが分かった。

謝辞

関西大学化学生命工学部生命・生物工学科食品工学研究室の学生、岩下裕紀、小野寺佳奈、木村朋加の諸氏にはサンプルの分析で大変お世話になった。記して感謝の意を表します。

文献

- 1) 倉澤隆平, 久保周治郎, 奥泉宏康: 亜鉛基礎研究の最前線と亜鉛欠乏症の臨床. *Biomed Res Trace Elements*, 21(1): 1-12, 2010.
- 2) 糸川嘉則: 最新ミネラル栄養学 微量ミネラル銅. 113-123, 健康産業新聞社, 2000.
- 3) 齋藤 昇: 高齢入院患者における銅などの微量元素の適正摂取量の推定. *Biomed Res Trace Elements*, 19(1): 7-12, 2008.
- 4) 糸川嘉則: 最新ミネラル栄養学 微量ミネラル亜鉛. 103-112, 健康産業新聞社, 2000.
- 5) 鈴木啓三, 神前 健, 岡 治, 松雄雄志: 亜鉛強化ミネラル酵母の開発とその特徴. *生物試料分析*, 31(2): 139-146, 2008.
- 6) 増田佳史, 嶋田昇二, 鈴木康生: 銅高含有酵母及びその製造方法、銅高含有酵母破砕物、並びに、食品. 特許第4284038号, 2009.
- 7) Philip G. Reeves, Forrest H. Nielsen and George C. Fahey, Jr.: AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr*, 123: 1939-1951, 1993.
- 8) 市原清志: 二元配置分散分析法. 174-183, バイオサイエンスの統計学, 南江堂, 1996.
- 9) 齋藤 昇: 銅代謝と加齢. *Biomed Res Trace Elements*, 20(1): 3-18, 2009.