

原 著

日本人健常者の尿中ポルフィリン濃度に関する研究

網中雅仁¹⁾ 山内博¹⁾ 木村慎吾²⁾
千葉啓子³⁾ 吉田勝美¹⁾

1) 聖マリアンナ医科大学医学部予防医学教室

2) 金沢大学大学院医学系研究科環境生態医学

3) 岩手県立大学盛岡短期大学部生活科学科

Study on the porphyrin levels in urine on
the Japanese healthy peopleMasahito Aminaka¹⁾ Hiroshi Yamauchi¹⁾ Shingo Kimura²⁾
Keiko Chiba³⁾ Katsumi Yoshida¹⁾

1) Department of Preventive Medicine, St.Marianna University School of Medicine

2) Department of Environmental and Preventive Medicine, Graduate School of
Medical Science, Kanazawa University3) Science of Living Department, Morioka Junior College Division, Iwate Prefectural
University

要約

本研究は日本人健常者の尿中ポルフィリン濃度の解明を目的に全国調査を実施した。健常者220名の性差と年齢を考慮した尿中ポルフィリン濃度は実測値、そして、尿中クレアチニン濃度と尿比重で補正して求めた。3者の結果にはそれぞれに特徴があり、実測値では uroporphyrin (UP)、coproporphyrin-I (CP-1)、coproporphyrin-III (CP-3) の値が加齢による低下傾向を示し、一方、性差は認められなかった。尿中クレアチニンおよび尿比重補正した値では、性差と年齢による相違は認められなかった。尿中クレアチニン補正により年齢差が消失したが、その原因は年齢の若い人は高齢者に比較して尿中クレアチニン濃度の高値であった。

尿中ポルフィリン濃度はクレアチニン補正した値が最も信頼性されると判断された。しかし、尿中クレアチニン濃度が極端に低値や高値の場合、尿中ポルフィリン濃度は実測値を参考にする必要が感じられた。この研究から得られた健常者の尿中のポルフィリン濃度は、臨床診断や有害物質曝露の生物学的モニタリ

受付：平成14年3月25日 採用：平成14年4月19日

別刷請求宛先：網中雅仁

〒216-8511 川崎市宮前区菅生2-16-1 聖マリアンナ医科大学予防医学教室

Received: March 25, 2002 Accepted: April 19, 2002

Reprint Requests to Masahito Aminaka, Department of Preventive Medicine, St.Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa 216-8511 Japan

ングに貢献できると考えられた。

(臨床環境11:29~35, 2002)

Abstract

The object of this research was to elucidate porphyrin concentrations in the urine of Japanese healthy people. There were 220 subjects (121 male, 99 female) who adjusted the sex difference with the ages. Porphyrin concentrations in urine were corrected by urinary creatinine and urinary specific gravity. There were no sex- or age-based differences in porphyrin concentrations after creatinine correction and urinary specific gravity. Age differences disappeared after creatinine correction in the urine. The cause originated in the high of the creatinine concentration in urine in the person with a young age. It was thought that creatinine correction was more effective in correcting porphyrin concentrations in urine than urinary specific gravity. However, urine creatinine concentrations should extremely refer to those values for a low value and the high. It was thought that the porphyrin concentrations in urine of a healthy people who had obtained it from this research was able to contribute to clinical diagnosis and a biological monitoring of toxic substance exposure.

(Jpn J Clin Ecol 11:29~35, 2002)

《Key words》 porphyrin, urine, biological monitoring, metabolism, healthy people

I. 緒言

ヒトの尿中ポルフィリン濃度の測定は、ヘム代謝への影響を生じさせる疾患の臨床診断や鉛中毒の生物学的曝露指標¹⁾として確立されている。さらに、最近の研究により、砒素^{2,3)}や水銀⁴⁾などの曝露による生物学的曝露指標としての有用性が注目されている。他方、金属元素以外の酸化的ストレス⁵⁾をはじめ、様々な化学的有害因子の曝露による生物学的曝露指標への有用性も期待されている^{6,7)}。

尿中ポルフィリン濃度は臨床診断や生物学的曝露指標に用いる有効性は理解されつつあるが、これに対して、我が国や諸外国においても信頼性のある健常者における正常値が求められていない現状が存在する。現在までに報告された正常値は、環境中毒や特異疾患など各報告者の研究領域から抽出した小規模集団からのものがほとんどである。従って地域や年齢、性差などを正確に考慮した研究成果はほとんど検討されていないと考えられる。

本研究では、一般健常者の尿中ポルフィリン濃度を求める全国調査を実施した。正常値(参考値)を求める上で、測定値に対する尿中クレアチニンや尿比重による補正の問題、そして、正常値に関

する性差と年齢差の特徴などを検討した。

II. 対象と方法

1. 調査対象者

対象者は全国6地区に居住するボランティアを性差、年齢別に選出し、健康診断(問診・血液検査・尿検査)の後、不適格者を除外した。不適格者は、医師による問診および生化学検査で正常者と診断されなかった者であった。対象者は男性121名、女性99名、合計220名である。年齢は20~79歳で、20、30、40、50、60歳代別(一部70歳以上を含む)に約50名づつ区分されるように設定した。

2. 試料の採取および輸送方法

対象者は、当日朝食を摂らない状態で、また、採尿は午前中に実施し、25ml程度を容器に採取した。試料は遮光してドライアイスで凍結状態のまま輸送し、測定まで-80℃で保存した。

3. 測定方法

尿中ポルフィリン濃度の測定は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)蛍光検出法を用いた。分析装置はJAS.CO GULLIVER SERIES(日本分光, 東京)を使用した。また、分析条件は表1

に示した。全ての試薬は特級およびクロマトグラフィ用特級(和光純薬, 東京)を使用した。

表1 HPLC-蛍光検出法による尿中ポルフィリンの分析条件

Column: Finepak C18-5 (4.6mm I.D. X 150mm, JAS.CO)
Column Filter: pore size 0.45 μ m (Irika CO.)
Wavelength: Ex 404nm Em 620nm
Solvent: A 7% Acetic Acid 80% Acetonitrile 50mM Ammonium Acetate
B 4% Acetic Acid 10% Acetonitrile 50mM Ammonium Acetate
Gradient: A/B(45/55)→(80/20)6min→(100/0) 7.5 min linear gradient A/B(100/0)6.5min hold
Flow rate: 1.0ml/min

試料は、0.08%ヨウ素含有酢酸を等量加えて混和し、試料中に含まれるポルフィリノーゲンを酸化させた。その後、10000rpm、10分間の遠心分離を行い、上清をHPLC測定試料とした。

尿中ポルフィリンは、uroporphyrin (8-carboxylate porphyrin)(UP)、heptacarboxylate porphyrin(HeptaP)、hexacarboxylate porphyrin(HexaP)、pentacarboxylate porphyrin(PentaP)、

coproporphyrin I (4-carboxylate porphyrin I isomer)(CP-1), coproporphyrin III (4-carboxylate porphyrin III isomer)(CP-3)として測定した。標準試料には、Porphyrin Products社製 Porphyrin marker Kitを使用した。

尿中ポルフィリン濃度は実測値の他、尿中クレアチニン(Cr)濃度および尿比重(S.G.)1.022でそれぞれ補正した。尿中Cr濃度の測定は、Jaffe反応によるFolin-Wu法を用いた。尿比重は尿屈折計による屈折率法を用いた。

III. 結果

健常者220名から求めた実測値の尿中ポルフィリン濃度の結果を表2に示した。実測値ではすべてのポルフィリン濃度で性差による違いは示されなかった。これに対して、各ポルフィリン濃度は加齢と共に低下傾向が示され、分散分析の結果、統計学的な有意差が認められた(Kruskal-Wallis test, UP, HeptaP, HexaP, CP-1, CP-3; $P < 0.001$, PentaP; $P < 0.01$)。

表3には健常者220名の尿中Cr濃度を示した。尿中Cr濃度は女性に比較して男性の値が高くなる傾向が示された(t-test, $p < 0.01$)。また、尿中Cr濃度は、分散分析の結果、加齢の因子によって有意に低下したことが確認された ($P < 0.001$)。

表2 健常者220名における尿中ポルフィリン濃度(実測値)

	尿中ポルフィリン濃度実測値 (μ g/l)					
	UP	HeptaP	HexaP	PentaP	CP-1	CP-3
全体 (n=220)	12.67 \pm 7.12	3.37 \pm 2.60	0.92 \pm 1.38	1.13 \pm 1.17	19.99 \pm 16.99	26.70 \pm 26.49
性別						
男性 (n=121)	12.61 \pm 7.35	3.52 \pm 2.79	0.95 \pm 1.44	1.14 \pm 1.24	20.52 \pm 17.75	26.55 \pm 29.41
女性 (n=99)	12.74 \pm 6.87	3.19 \pm 2.34	0.88 \pm 1.30	1.11 \pm 1.08	19.36 \pm 16.08	26.88 \pm 22.56
年齢						
20-29 (n=45)	18.72 \pm 9.49	5.21 \pm 3.37	1.56 \pm 1.74	1.86 \pm 1.61	31.44 \pm 22.78	37.29 \pm 27.78
30-39 (n=47)	11.71 \pm 5.97	2.79 \pm 1.62	0.55 \pm 0.38	0.98 \pm 1.05	19.77 \pm 16.10	31.15 \pm 30.97
40-49 (n=47)	11.27 \pm 5.72	2.98 \pm 2.67	0.82 \pm 1.54	0.87 \pm 0.92	15.47 \pm 13.45	23.76 \pm 27.71
50-59 (n=44)	10.42 \pm 5.20	2.97 \pm 2.41	1.00 \pm 1.66	0.99 \pm 0.99	16.69 \pm 12.34	19.48 \pm 16.41
60-70 (n=37)	10.97 \pm 4.50	2.86 \pm 1.58	0.48 \pm 0.27	0.90 \pm 0.71	16.04 \pm 12.55	20.48 \pm 22.70

年齢による多重比較 (Kruskal-Wallis test) PentaP ; $p < 0.01$ UP, HeptaP, HexaP, CP-1, CP-3 ; $p < 0.001$
UP ; uroporphyrin, HeptaP ; heptacarboxylate porphyrin, HexaP ; hexacarboxylate porphyrin
PentaP ; pentacarboxylate porphyrin, CP-1 ; coproporphyrin-I, CP-3 ; coproporphyrin-III

表3 健常者における尿中クレアチニン濃度

		尿中クレアチニン値 (g/l)
全体	(n=220)	1.038±0.628
性別		
男性	(n=121)	1.154±0.671**
女性	(n=99)	0.912±0.553
年齢		
20-29	(n=45)	1.535±0.841
30-39	(n=47)	1.054±0.502**
40-49	(n=47)	0.941±0.511***
50-59	(n=44)	0.851±0.450***
60-79	(n=37)	0.803±0.487***

性別の比較(student's-t); **, p<0.01
 年齢の比較 (20歳代に対して student's-t)
 ; *, p<0.05 **, p<0.01 ***, p<0.001
 年齢の比較 (一元配置分散分析法) ; p<0.001

このうち、20歳代の値は他の年齢群に比較して高くなる特徴が認められた。

表4には尿中Cr濃度で補正した健常者220名の尿中ポルフィリン濃度の結果を示した。尿中Cr濃度で補正した尿中ポルフィリン濃度は分散分析の結果、年齢差は認められなかった。一方、UPとCP-3では、女性が男性の値に比較して有意な高値を示したが、その他の尿中ポルフィリン濃度には、性差は認められなかった。すなわち、尿中Cr濃度で補正した尿中ポルフィリン濃度は

その補正効果によって、実測値の尿中ポルフィリン濃度の特徴であった年齢差が消失された。

尿中の各ポルフィリン濃度の分布は、いずれのポルフィリン濃度も正規分布する傾向は示されなかった。図1には尿中CP-1とCP-3の分布パターンを示した。両者とも正規分布を示さず、また、散発的な高値が観察された。

表5にはS.G.値およびS.G.補正した健常者220名の尿中ポルフィリン濃度の結果を示した。S.G.補正した尿中ポルフィリン濃度に性差の違いは示されなかった。これに対して年齢による違いが、分散分析の結果から確認された (Kruskal-Wallis test, UP, HeptaP; P<0.001, HexaP, CP-1, CP-3; P<0.01)。S.G.値はCr濃度と同様に加齢の因子によって有意に低下したことが確認された (P<0.001) が、補正した尿中ポルフィリン濃度では、実測値のパターンに類似する傾向が認められた。

IV. 考察

はじめに実測値、Cr補正值、S.G.補正值の尿中ポルフィリン濃度について検討を行い、尿中ポルフィリン濃度における補正の問題を考察する。表2および表4の比較から明らかなように実測値の尿中ポルフィリン濃度で認められたUP、CP-1、CP-3濃度の年齢差は、尿中Cr補正をおこなうこ

表4 健常者220名における尿中ポルフィリン濃度 (尿中クレアチニン補正值)

		尿中ポルフィリン濃度クレアチニン補正值 ($\mu\text{g/g cr.}$)					
		UP	HeptaP	HexaP	PentaP	CP-1	CP-3
全体	(n=220)	11.83±4.19	3.20±2.31	0.86±1.44	1.03±0.92	18.06±11.06	25.52±22.27
性別							
男性	(n=121)	10.96±3.98	3.13±2.43	0.86±1.57	0.98±0.94	17.05±10.36	22.53±20.43
女性	(n=99)	12.89±4.20***	3.29±2.15	0.87±1.27	1.08±0.90	19.30±11.79	29.17±23.93**
年齢							
20-29	(n=45)	12.10±4.36	3.53±2.30	1.09±1.24	1.13±0.88	19.05±9.15	25.05±16.71
30-39	(n=47)	11.14±3.52	2.65±1.18	0.55±0.40	0.94±0.69	18.91±11.60	29.72±22.33
40-49	(n=47)	11.29±3.69	2.94±2.20	0.78±1.41	0.87±0.81	15.36±11.43	23.63±23.65
50-59	(n=44)	12.08±5.00	3.63±3.47	1.28±2.49	1.14±1.30	18.63±10.08	25.91±26.32
60-79	(n=37)	12.77±4.27	3.34±1.63	0.50±0.22	1.09±0.83	18.55±13.02	22.69±21.44

性別の比較(student's-t); **, p<0.01 ***, p<0.001
 UP; uroporphyrin, HeptaP; heptacarboxylate porphyrin, HexaP; hexacarboxylate porphyrin
 PentaP; pentacarboxylate porphyrin, CP-1; coproporphyrin-I, CP-3; coproporphyrin-III

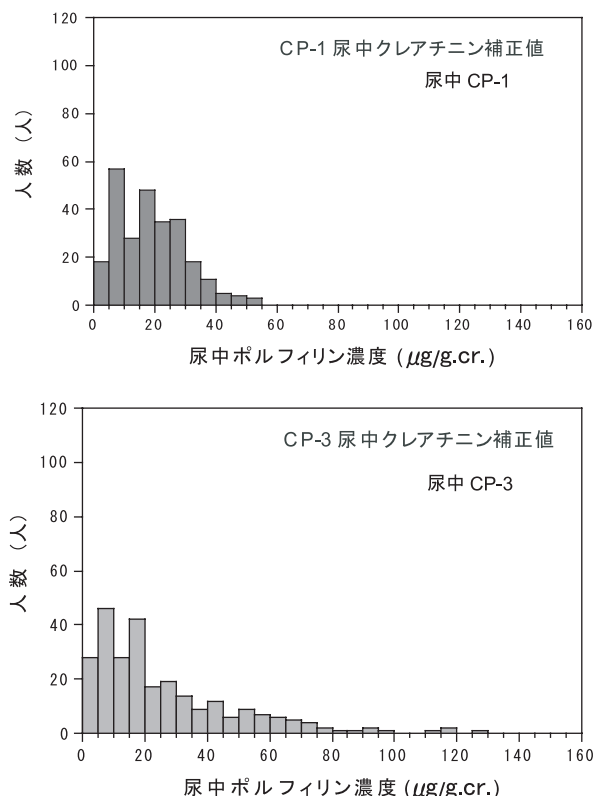


図1 尿中コプロポルフィリン(CP-1, CP-3)濃度の尿中クレアチニン補正值(μg/g.cr)後のヒストグラム

上は尿中 CP-1濃度(尿中クレアチニン補正值)分布を、下は尿中 CP-3濃度(尿中クレアチニン補正值)分布を示した。(n=220)

とで有意差が相殺され、全体の平均値へ収束する効果が見いだされた。一方、S.G.補正では、Cr補正のような明らかな補正効果は認められなかった。このことから、尿中ポルフィリン濃度では、Cr補正が年齢の生理的影響を取り除く効果が確認された。他方、補正に用いられた尿中Cr値には、体格の違いから生じる筋肉量の差や肉食の多様など、食生活に起因する影響要因があることに注視しなければならない。

図1にはCr補正值のCP-1、CP-3濃度のヒストグラムを示した。分布からも明らかであるがCr補正に伴う逸脱した値が生じた。これら逸脱した値のCr値は、0.282-0.599g/lであり、Cr値の平均に比べて27.2-57.7%程度であった。このような場合、Cr補正によるCP-3濃度は平均的なCr値をもつCP-3に比較して1.73-3.68倍の高値を示すこととなる。つまり、尿中Cr値の極端な低値や高値の場合、尿中ポルフィリン濃度では、実測値を参考にする必要性が示唆された。

次に、実測値、Cr補正值、S.G.補正值の尿中ポルフィリン濃度について性差および年齢差に関する検討をおこなった。性差では実測値およびS.G.補正值で全てのポルフィリン濃度に有意差は生じていなかった。一方、表4のCr補正值ではUPおよびCP-3で有意差が確認された。女性が

表5 健常者220名における尿中ポルフィリン濃度(尿比重補正值)

	尿中ポルフィリン濃度尿比重補正值 (μg/g S.G.)						
	尿比重値	UP	HeptaP	HexaP	PentaP	CP-1	CP-3
全体 (n=220)	1.021±0.007	11.76±4.76	3.14±2.10	0.85±1.23	1.03±0.91	18.35±13.09	24.66±21.51
性別							
男性 (n=121)	1.021±0.007	11.68±4.66	3.28±2.21	0.88±1.30	1.04±0.93	18.59±12.83	24.10±22.90
女性 (n=99)	1.020±0.006	11.85±4.91	2.98±1.96	0.81±1.16	1.01±0.89	18.05±13.47	25.36±19.78
年齢							
20-29 (n=45)	1.025±0.007	15.05±6.00	4.27±2.57	1.31±1.41	1.47±1.17	25.12±16.65	30.21±20.40
30-39 (n=47)	1.021±0.006	11.13±4.05	2.64±1.17	0.54±0.36	0.91±0.75	18.86±12.43	29.54±24.41
40-49 (n=47)	1.020±0.006	10.73±3.99	2.81±2.06	0.73±1.21	0.81±0.72	14.47±10.82	21.90±22.17
50-59 (n=44)	1.019±0.006	10.60±4.43	3.07±2.52	1.05±1.81	1.00±1.02	16.78±10.46	20.44±17.44
60-79 (n=37)	1.019±0.006	11.22±3.46	2.92±1.37	0.48±0.25	0.91±0.62	16.24±11.88	20.26±20.81

年齢による多重比較 (Kruskal-Wallis test) HexaP, PentaP, CP-1, CP-3 ; p<0.01 UP, HeptaP ; p<0.001
UP ; uroporphyrin, HeptaP ; heptacarboxylate porphyrin, HexaP ; hexacarboxylate porphyrin
PentaP ; pentacarboxylate porphyrin, CP-1 ; coproporphyrin- I, CP-3 ; coproporphyrin- III

男性に比較して高値となった原因は、性差によるCr値の違い、つまり表3に示されたCr値の有意差が原因と思われる。女性に比較して男性の尿中Cr値が有意に高く、前述の筋肉量による要因を反映した結果であった。また、実測値およびS.G.補正值では、加齢に伴い全てのポルフィリンで有意な低下もしくは低下傾向が確認された。現在のところ、加齢とポルフィリン代謝の関係については、ほとんど検討されていない。しかし、主なヘム代謝が骨髄細胞でのTCA cycleのグリシンとサクシニルCoAに起因した反応であること、そして8つの酵素反応の生成過程が関係することから、健常者の場合、加齢によるホメオスタシスの低下に伴い代謝が下がることは十分に考えられる。

次に尿中ポルフィリン濃度について、現在までの主要な報告値との検討をおこなった。Cr補正の尿中ポルフィリン濃度では、山守ら⁸⁾およびFujiokaら⁹⁾が用いた日本人健常者の報告値とほぼ同様の結果を示した。一方、Kuhnel Aら¹⁰⁾やFranck Mら¹¹⁾の報告とは、異なる結果となった。これは、人種に伴う体格差や食生活の違い、生活環境の違いから生じるヘム代謝の誘導要因などが考えられる。現在のところ、人種差についてもポルフィリン代謝との関係は、ほとんど検討されていない。その理由として二つの問題が考えられる。一つは、健常者の選定が容易ではないことである。尿中ポルフィリン濃度は、疾病ばかりではなく、外的環境因子によっても影響されるため、本研究のように事前調査で健康診断や問診、アンケート調査などを実施し、多くのリスクを取り除く必要がある。もう一つは、ヘム代謝事態のメカニズムにある。元来ヘム代謝は、通常の生体維持に必要な能力以上のかなりの余力を持っている。デルタアミノレブリン酸脱水酵素などは、酵素蛋白の10%程度を使用しているにすぎず、緊急事態に備えている状態である。したがって骨髄細胞が物理的に少ない四肢欠損者であっても、ヘム代謝機構上、問題はない。つまり、ヘム代謝の全能力であれば人種などの遺伝的要因が大きく働き、人種差も重大な影響因子となるが、実際に測定される尿中ポルフィリン濃度は、そのときの個々の生

体維持に必要な十分な条件に依存してしまうと考えられる。したがって、人種差よりも人種差に伴う体格差や運動量、食事、生活環境の中でも特に標高差や気圧などヘム代謝に直接影響する因子によって尿中ポルフィリン濃度は左右されることが推察できる。

以上、本研究の結果より明らかにされた知見と示唆された項目について論述した。元来、本研究で取り上げたUP、heptaP、hexaP、pentaP、CP-1、CP-3は、尿や糞便、血液中に含まれているポルフィリノーゲンの代謝段階の酸化産物である。何らかの原因でヘム合成に影響が生じた場合、その原因に対して特異的に酵素阻害や酵素蛋白出現量の増減などが生じる。その結果、種々の尿中ポルフィリン濃度パターンは、定性的かつ定量的に変動する。この変動パターンをもとにしてポルフィリン症¹²⁾、肝障害¹³⁾、血液疾患⁷⁾、金属中毒¹⁴⁾、化学物質中毒¹⁵⁾の臨床診断がおこなわれている。今後、尿中ポルフィリン濃度を用いた臨床診断の有効性を論じる場合、本研究の成果は、有効なものと考えられる。特に尿中ポルフィリン濃度を生物学的曝露指標として検討するにあたって、不特定の集団を対象とした研究では、尿中Cr補正を行うことで年齢など個々の生理的影響による濃度値の変動を平均値へ収束させることができる。このような年齢階級調整の現象が明らかにされたことは重要であり、Cr補正が一般的に活用されている現在、有害因子暴露や臨床診断に対する尿中ポルフィリン濃度測定を用いた健康影響指標への活用では、その点を十分理解した上での使用が必要である。さらに、本研究の成果が、尿中ポルフィリン濃度測定の応用範囲の拡大にも寄与するものと考えられる。

文献

- 1) Dyer J, Garick DP, et al: Plumboporphyria (ALAD deficiency) in a lead worker. A scenario for potential diagnostic confusion. *Br J Ind Med* 50:1119-1121, 1993
- 2) Garcia Vargas GG, Del Razo LM, et al: Altered urinary porphyrin excretion in a

- human population chronically exposed to arsenic in Mexico. *Hum Exp Toxicol* 13: 839-847, 1994
- 3) Telolahy P, Javelaud B, et al: Urinary excretion of porphyrins by smelter workers chronically exposed to arsenic dust. *Toxicol Lett* 66: 89-95, 1993
 - 4) Miller DM, Woods JS, et al: Urinary porphyrins as biological indicators of oxidative stress in the kidney. Interaction of mercury and cephaloridine. *Biochem Pharmacol* 46: 2235-2241, 1993
 - 5) Afonso S, Vanore G, et al: Protoporphyrin IX and oxidative stress. *Free Radic Res* 31: 161-170, 1999
 - 6) Elder GH: Alcohol intake and porphyria cutanea tarda. *Clin Dermatol* 17: 431-436, 1999
 - 7) 北島晴夫、金子隆、他：赤血球亜鉛プロトポルフィリン/ヘム比測定の臨床的有用性. *臨床血液*33：1199-1203, 1992
 - 8) 山守育雄、近藤雅雄、他：遺伝性コプロポルフィリン症治療における静注用ヘミンの有用性と限界. *ポルフィリン*6：35-40, 1997
 - 9) Yuji Fujioka, Masao Kondo: A study of urinary porphyrin profile from patients with various porphyrin metabolic diseases. *Porphyrins* 7: 263-267, 1998
 - 10) Kuhnel A, Gross U, et al: Studies on coproporphyrin isomers in urine and feces in the porphyrias. *Clin Chem Acta* 282: 45-58, 1999
 - 11) Frank M, Doss M, et al: Diagnostic and pathogenetic implications of urinary coproporphyrin excretion in the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatogastroenterology* 37: 147-151, 1990
 - 12) Ken Nakayama, Masao Kondo, et al : Porphyria in Japan. *Porphyrins* 7: 258-262, 1998
 - 13) Martinelli AL, Villanova MG, et al: Abnormal uroporphyrin levels in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol* 29: 327-331, 1999
 - 14) Sanae Sakaguchi, Takehiro Sakaguchi, et al: Effect of beryllium on porphyrin metabolism of successively pregnant mice. *J Toxicol Environ Health* 50: 507-517, 1997
 - 15) Sinclair PR, Gorman N, et al : CYP1A2 is essential in urine uroporphyrin caused by hexachlorobenzene and iron. *Toxicol Appl Pharmacol* 162 : 60-67, 2000