

peripherin/RDS 遺伝子異常による網膜変性に 脈絡膜新生血管を認めた症例

川越 直顕¹⁾, 高橋 政代²⁾, 万代 道子²⁾, 秋元 正行²⁾, 鈴木 拓也¹⁾
村上 智昭¹⁾, 平見 恭彦¹⁾, 池田 華子²⁾, 吉村 長久¹⁾

¹⁾京都大学大学院医学研究科眼科学, ²⁾京都大学医学部附属病院探索医療センター

要 約

目的: 黄斑部脈絡膜新生血管(CNV)を伴う非定型網膜変性に対し遺伝子診断を行った。

症 例: 47歳女性。初診時は両眼とも視力良好であったが周辺部に散在性の網脈絡膜変性巣と少量の色素沈着を認め、黄斑部に軽度の網膜色素上皮萎縮を認めた。視野は両眼耳側と上方の周辺部が狭窄していた。初診時から7年後に左眼黄斑部にCNVを認め、左眼矯正視力は0.4に低下した。光干渉断層計にてtype 2 CNVを認めたが網膜下液はわずかであり、蛍光眼底撮影では蛍光漏出もほとんど認めなかった。変性高速液体クロマトグラフィー(denaturing high performance liquid

chromatography; DHPLC)を用いた遺伝子診断にてperipherin/RDS 遺伝子 Gly167Ser の変異を認めた。

結 論: 今回の症例では網膜の変性は軽度で高度近視や加齢黄斑変性のCNVと鑑別が難しいと思われた。RDS 遺伝子異常による網膜変性は非定型で、他の疾患に診断されている症例の中にも混在している可能性がある。これらを鑑別するために遺伝子診断が有用である。(日眼会誌 111: 336-342, 2007)

キーワード: 網膜色素変性, 黄斑変性, 遺伝子診断, peripherin/RDS, 脈絡膜新生血管

Peripherin/RDS Gene Mutation in a Patient with Choroidal Neovascularization

Naoaki Kawagoe¹⁾, Masayo Takahashi²⁾, Michiko Mandai²⁾, Masayuki Akimoto²⁾
Takuya Suzuki¹⁾, Tomoaki Murakami¹⁾, Yasuhiko Hirami¹⁾
Hanako Ikeda²⁾ and Nagahisa Yoshimura¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University

²⁾Department of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto University Hospital

Abstract

Purpose: To diagnose an atypical retinal degenerative disease with choroidal neovascularization by means of gene diagnosis.

Case: A 47-year-old woman had good visual acuity at the first examination. She had scattered chorioretinal degeneration and pigmentation in the peripheral retina. There was a symmetrical visual field defect in the upper and temporal periphery in both eyes. Seven years later, choroidal neovascular membrane(CNV) developed in the fovea of her left eye and visual acuity deteriorated to 0.4 in this eye. Optical coherence tomography revealed type 2 CNV with minimal subretinal fluid. Fluorescein angiography showed very little leakage from the CNV. We used denaturing high performance liquid chromato-

graphy(DHPLC) to perform gene diagnosis and found a peripherin/RDS gene mutation of Gly167-Ser.

Conclusion: Our case had moderate peripheral retinal degeneration with CNV. It is possible that cases like this tend to be misdiagnosed as AMD (age-related macular degeneration) or CNV with high myopia. Evaluation of the gene mutation was useful for diagnosis in this case.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi(J Jpn Ophthalmol Soc 111: 336-342, 2007)

Key words: Retinitis pigmentosa, Macular degeneration, Gene diagnosis, Peripherin/RDS, Choroidal neovascularization

別刷請求先: 606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54 京都大学附属病院探索医療センター 高橋 政代

(平成 18 年 3 月 31 日受付, 平成 18 年 10 月 2 日改訂受理) E-mail: masataka@kuhp.kyoto-u.ac.jp

Reprint requests to: Masayo Takahashi, M. D., Ph. D. Department of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto University Hospital, 54 Kawaracho Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

(Received March 31, 2006 and accepted in revised form October 2, 2006)

I 緒 言

網膜色素変性の原因については 1990 年に Dryja ら¹⁾が Rhodopsin 遺伝子の異常によって引き起こされることを報告してから、RP 1 遺伝子や Nrl 遺伝子など続々と原因遺伝子が報告されてきた。その一つである peripherin/RDS 遺伝子は 1991 年に Farrar ら²⁾が報告した原因遺伝子であるが、同一の遺伝子変異であっても網膜色素変性以外に fundus flavimaculatus や pattern macular dystrophy などさまざまな病態を示すことが知られており、さらには同一家系内で異なる病態を示す場合もある³⁾。また、変性が軽度である場合には症状はなく発見されないこともある。今回我々は黄斑変性を伴う非定型網膜色素変性に脈絡膜新生血管(CNV)の合併を認め、遺伝子診断にて peripherin/RDS 遺伝子の Gly167-Ser 変異を認めた症例を経験したのでここに報告する。

CNV は加齢黄斑変性(AMD)以外にもポリープ状脈絡膜血管症、高度近視、あるいはぶどう膜炎などに伴って生じることがある。CNV の発生機序は近年分子レベルで解明が進んでいるが、本症例は遺伝子変異による網膜あるいは網膜色素上皮細胞の変性が誘因となる CNV の可能性を示すと考え考察した。

II 症 例

患 者：47 歳女性。

主 訴：1997 年 9 月近医にて左眼の網膜裂孔に対して光凝固を施行。以後経過観察していたが周辺部の脈絡膜萎縮巣や色素沈着を認め、Goldmann 動的視野検査にて視野欠損を認めたため、当院へ紹介受診となった。夜盲など特に自覚症状はなかった。

既往歴：特になし。

家族歴：母親、おば、祖母が軽度の夜盲を自覚していたが、母親が緑内障で近医にて加療中であったものの網膜色素変性など夜盲性疾患の診断は誰も受けていなかった(図 1)。

初診時所見：矯正視力は右(1.2×S-8.5 D⊙cyl-1.25 D Ax 20°)、左(1.0×S-9.0 D⊙cyl-2.25 D Ax 100°)。両眼の周辺部に脈絡膜萎縮巣と動脈の狭窄、少量の色素沈着を認め、さらに両眼の黄斑部に軽度の網膜色素上皮萎縮を認めた(図 2)。視野は Goldmann 動的量的視野計にて両眼とも耳側と上方の周辺部が狭窄していた(図 3)。

その後近医にて経過観察していたが、2004 年 8 月、再診時には右(1.2×S-8.5 D⊙cyl-1.25 D Ax 20°)、左(0.4×S-9.0 D⊙cyl-2.25 D Ax 160°)と左眼視力の低下を認め、左眼黄斑部に CNV を確認した。大きな視野の変化は認めなかった。非定型ではあったが網膜色素変性を疑い網膜電図(ERG)を施行したところ両眼ともに non-recordable ERG を示した。

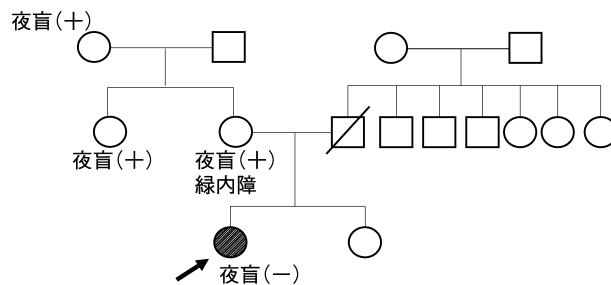
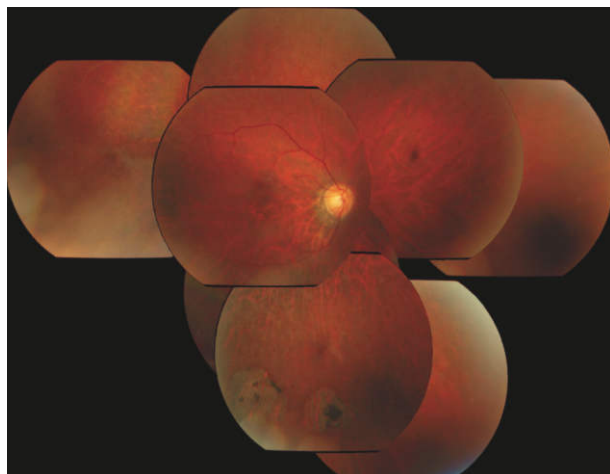


図 1 家系図。

問診から作成した家系図を示す。母方の家系に夜盲の自覚のある者が数人いるが、はっきりと色素変性と診断を受けている者はいなかった。

右眼



左眼

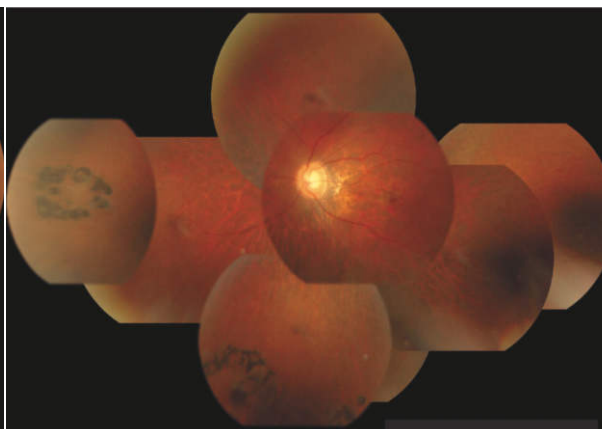


図 2 眼底写真。

再診時眼底写真を示す。両眼の周辺部に脈絡膜萎縮巣、動脈の狭窄、少量の色素沈着が認められ、さらに両眼黄斑部に軽度の色素上皮萎縮を認める。左眼の輪状色素沈着は他院での光凝固斑と思われる。左眼黄斑部に脈絡膜新生血管(CNV)を認める。

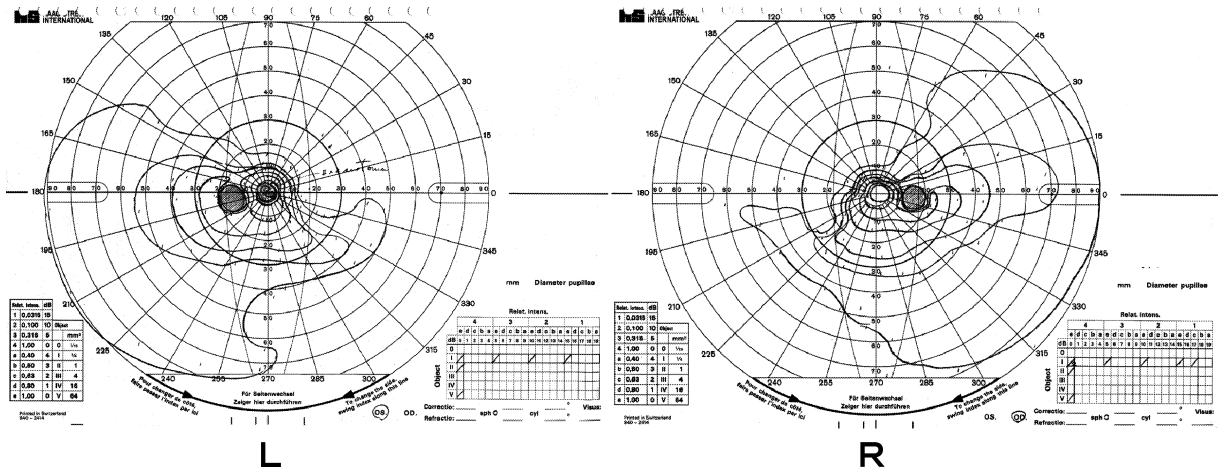


図 3 Goldmann 動的量的視野.

両眼とも上鼻側および下鼻側の視野欠損を認め、蛍光眼底造影で window defect を認めた部位に一致する。

初期

後期

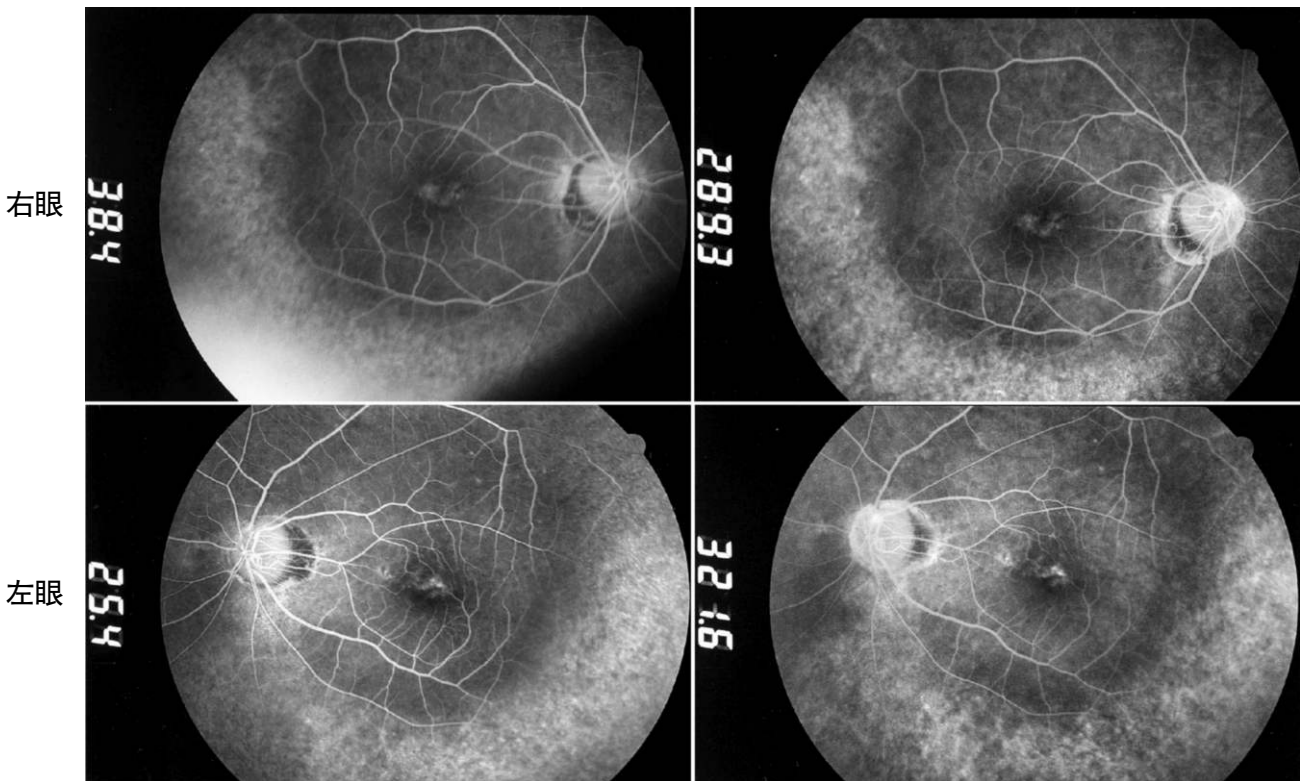


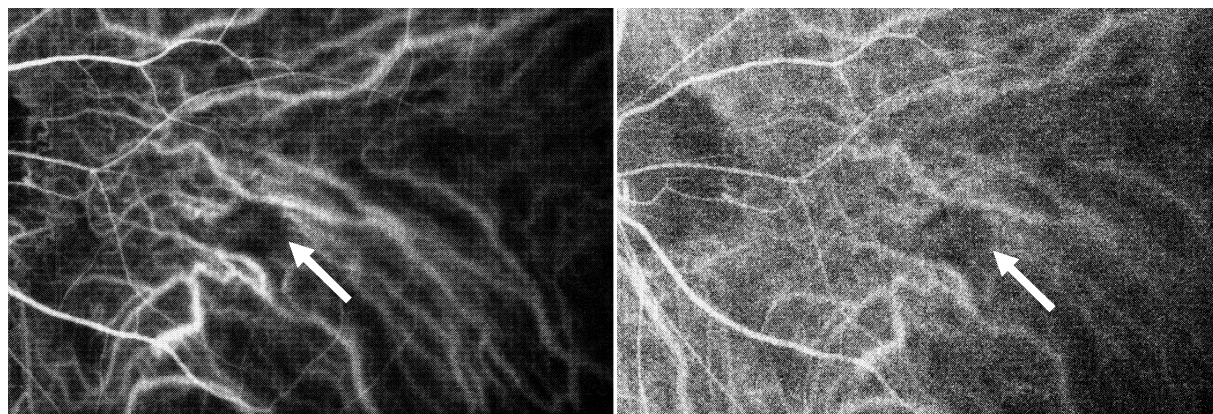
図 4 フルオレセイン蛍光眼底造影(fluorescein fundus angiography ; FA)写真.

上が右眼、下が左眼で左列が初期、右列が後期画像を示す。両眼の黄斑部に window defect を認めるが、CNV からの漏出は顕著ではない。また、両眼とも下方に広く window defect を認め、網膜色素上皮の変性を来していると考えられる。

CNV について蛍光眼底造影(fluorescein fundus angiography ; FA)、インドシアニングリーン蛍光眼底造影(indocyanine green angiography ; IA)、さらに光干渉断層計(optical coherence tomography ; OCT)を施行した。FA にて両眼の黄斑部に window defect を認めたが、左眼 CNV からの蛍光漏出は顕著ではなかった。また、視野欠損に一致した後極部下方の window defect

が明らかになり、網膜色素上皮の変性を表していると考えられた(図4)。IA ではCNV に一致して plaque を認めた(図5)。さらにOCT では左眼に type 2 CNV を認めたが、網膜下液はわずかに存在するのみであった(図6)。これらの結果から、活動性の低いCNV であると考え、経過観察を行うことにした。

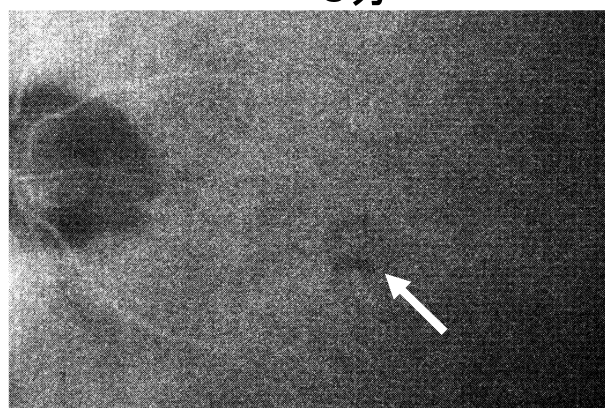
網膜変性の原因遺伝子を探るため患者のインフォーム



30秒

3分

図 5 インドシアニングリーン蛍光眼底造影(indocyanine green angiography ; IA)写真.
左眼の IA 画像を示す. 矢印の部分に CNV が造影されている.



10分

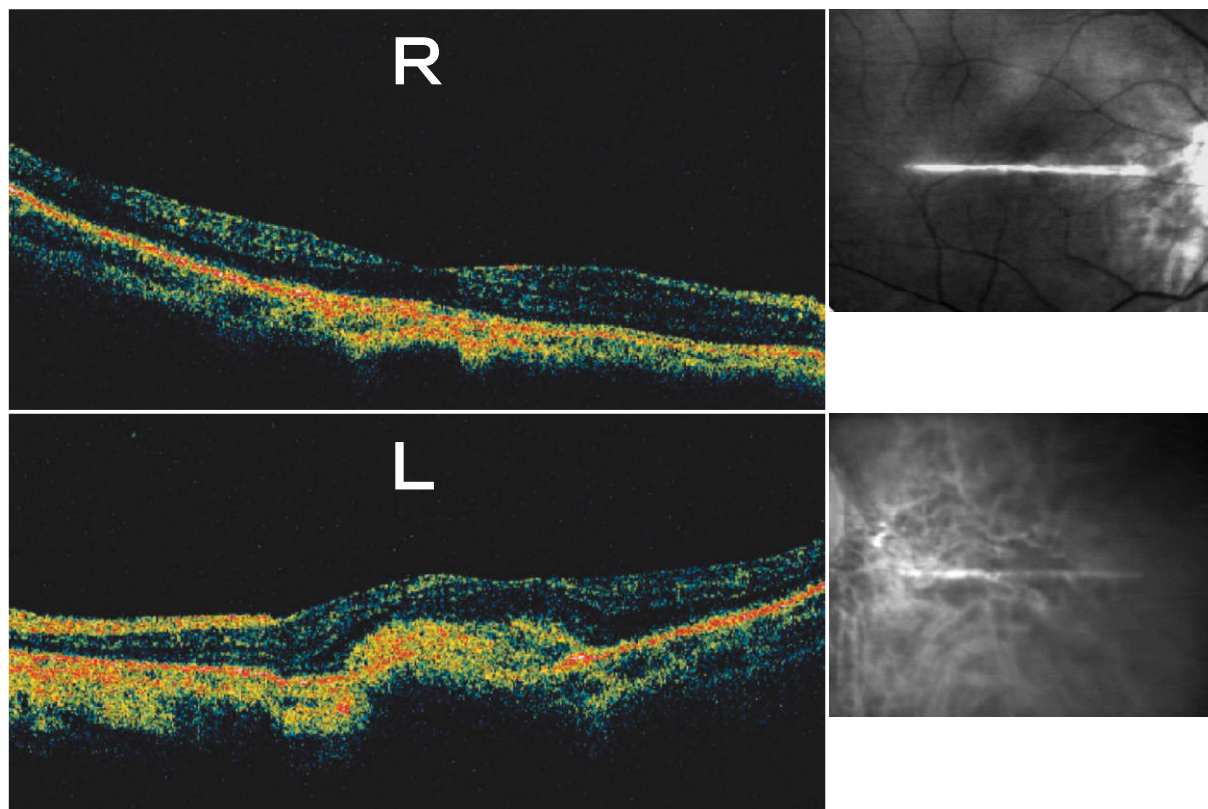


図 6 光干渉断層計(optical coherence tomography ; OCT)画像.
左眼に type 2 CNV を認めるが, 網膜下液はわずかしか認めない.

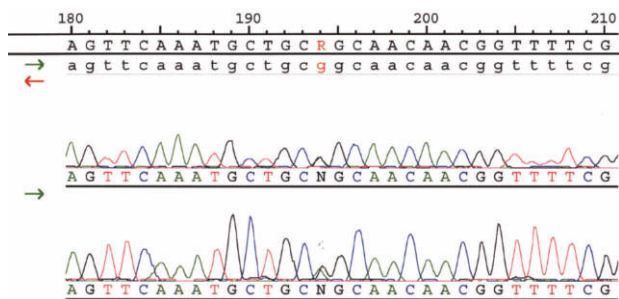


図 7 症例の遺伝子変異を示すシーケンスデータ。peripherin/RDS 遺伝子のコドン 167 において G から G/A のヘテロ変異を認める。

ドコンセントを得たうえで採血し、DNA 抽出後、変性高速液体クロマトグラフィー (denaturing high performance liquid chromatography ; DHPLC) を用いた Transgenomic 社の WAVE[®] system により過去に網膜色素変性の原因遺伝子として報告のあるエクソンのスクリーニングを行い、異常の検出された部位をシーケンスして遺伝子診断⁴⁾を行ったところ、peripherin/RDS 遺伝子の Gly167Ser (499 G→A) の遺伝子変異を認めた (この変異は同部位での報告はされているが、新規変異である) (図 7)。

その後、現在に至るまで両眼に大きな変化は認めず、経過を観察中である。

III 考 按

網膜色素変性は一般的な臨床像としては夜盲や視力低下などを主訴とし、眼底に網膜血管の狭小化や骨小片様色素沈着を認める。次々と原因遺伝子が報告されているが、玉井ら⁵⁾は日本人の常染色体優性網膜色素変性 (ADRP) 患者を対象とした遺伝子検索においてなお 78% の原因遺伝子が不明であると述べており、今後さらに数多くの原因遺伝子が報告されることが予想される。人種間によっても原因遺伝子の頻度に差があり、例えば日本の ADRP では FSCN2 遺伝子の 208DelG の遺伝子異常が高頻度に認められるが、海外ではほとんど報告されず、逆に Rhodopsin 遺伝子の Pro23His や Pro347Leu といった遺伝子異常は海外で多く報告されているが、本邦では頻度は少ない⁶⁾。また同一の遺伝子異常でも異なる臨床像を示す遺伝子として FSCN2 遺伝子^{7,8)} や peripherin/RDS 遺伝子が知られている。特に peripherin/RDS 遺伝子は網膜色素変性以外に fundus flavimaculatus⁹⁾、蝶形黄斑ジストロフィ⁹⁾、central areolar choroidal dystrophy¹⁰⁾、常染色体優性錐体杆体ジストロフィ¹¹⁾、adult vitelliform macular dystrophy¹²⁾ などのさまざまな臨床像をとり、同一家系内においても異なる臨床像をとることが報告されている³⁾。

Peripherin/RDS 遺伝子異常は典型的な網膜色素変性と異なる臨床像をとる場合、診断を誤ることがあるので

注意が必要となる。実際 Lim ら¹³⁾ は受診した常染色体優性型の foveomacular dystrophy の患者のうち 15% が前医に AMD と診断されて紹介されたものだと報告している。現在の日本の社会が核家族化してきたことにより、家族歴を聴取しても祖父母や親戚に眼疾患があるかどうか不明であることも多く、遺伝形式を確定することや遺伝性疾患であるという診断さえも困難になることがある。症状の軽い遺伝性網膜変性疾患は診断されないことも多いと思われる。

これらの困難を克服するための一つとして、我々は Transgenomic 社製の WAVE[®] system を用いて現在報告されている網膜色素変性の原因遺伝子変異部位を網羅する効率的な遺伝子診断システム⁴⁾ を構築し、患者の遺伝子診断を行ってきた。この症例では peripherin/RDS 遺伝子のコドン 167 に G から G/A へのヘテロ変異を認めたが、これは Nichols ら⁹⁾ や Kemp¹⁴⁾ によって報告されている部位の新規変異である。新規であるが、進化の過程でよく保存されているグリシンがセリンに変化することから、重大な影響をもたらす変異と考えられる。本症例と Nicholas や Kemp の報告したコドン 167 の変異 (グリシンがアスパラ酸に置換) を認める症例との臨床上の共通点として両眼に黄斑変性を認め、視力は VA = 0.1 から 1.0 とぼらつきが存在する点が挙げられる。一方、相違点は、Nicholas や Kemp の呈示した症例では視野異常は中心暗点を認めるのみで周辺視野には異常を認めなかったが本症例では耳側および上方の視野狭窄があったことが挙げられる。また、Kemp の症例では ERG は subnormal、Nicholas の症例では normal ERG であったが、本症例では non-recordable ERG となっている。

本症例の場合、患者には夜盲などの自覚症状はなく、家族歴で夜盲の自覚を持つ者が数人いたが網膜色素変性と診断されている者はいなかった。眼底には周辺部に色素沈着が存在していたがわずかであり、黄斑部の萎縮巣は左眼の CNV の存在もあわせて、AMD と診断される可能性がある。また、本症例は高度近視であるので、高度近視に伴う CNV という診断が妥当という意見もあると思われるが、高度近視の CNV に多い後極部のびまん性の萎縮、patchy atrophy や lacquer cracks¹⁵⁾ を認めず、自験例の他の peripherin/RDS 遺伝子変異に伴う黄斑変性に酷似していたため、遺伝子変異に伴うものと考えた。逆に遺伝子変異による網膜変性では高度近視を示すことも多いが、後極部のびまん性の萎縮や patchy atrophy, lacquer cracks などを伴う高度近視性 CNV と区別して考える必要があるかもしれない。

本邦では網膜色素変性に視神経乳頭上の新生血管や網膜新生血管が合併した症例や、さらに硝子体出血を来した症例の報告はある^{16,17)} が、黄斑部 CNV の合併に関する報告はまだない。一方、海外では Marano ら¹⁸⁾ が pa-

tttern dystrophy を含む遺伝性網膜変性疾患に CNV を伴った 8 例を紹介し, Francis¹⁹⁾, Khani ら²⁰⁾が peripherin/RDS 遺伝子変異に伴う黄斑変性に CNV を伴った例を報告している。Francis ら¹⁹⁾の報告では pattern dystrophy 38 例のうち 7 例 18% に CNV が発生し, CNV 発生割合は年齢が高くなると増加し, 70 歳以上では 16 例中 5 例に合併していた。これらの報告に共通しているのは黄斑萎縮だけでは視力は比較的良好に保たれるが, CNV を発症することにより急激に視力が低下する例に言及していることである。我々の症例でも黄斑萎縮のみの右眼は良好な視力が保たれているが, 左眼は初診時には 1.0 と良好だった視力が CNV の出現に伴い 0.4 と低下している。

Francis¹⁹⁾の報告では peripherin/RDS 遺伝子変異では年齢が上がるとともに CNV を来す率も上昇し, それとともに平均視力も低下していることが述べられている。Marano ら¹⁸⁾は遺伝性網膜変性に伴う CNV は比較的活動性が低かったと述べており, 本症例の CNV も活動性は低かった。ただし, ここに網膜色素上皮の加齢性変化が加わると活動性も高くなる可能性があると思われる。

遺伝子診断を行うことにより, このような非定型網膜変性に対して確定診断を行うことができ, その家族に対して網膜色素変性の発症の危険性を予見することができる。さらに peripherin/RDS 遺伝子異常で黄斑変性を認める場合など将来 CNV の合併の危険性を説明することができ, 経過を観察することによって早期に発見, 対応することができると考えられる。

一方, CNV の発生機序の面から考えると, 本症例は CNV 発生原因の一つのカテゴリーを呈示している。すなわち, 遺伝子変異による網膜および網膜色素上皮の変性が端緒となって CNV が発症する可能性である。このような症例は前記の peripherin/RDS 遺伝子変異の症例の他にも Nakamura ら²¹⁾によって S-cone syndrome に伴う CNV が報告されている。近年 CNV の発生機序として, 網膜色素上皮の障害による pigment epithelium-derived factor (PEDF) など新生血管抑制因子の低下²²⁾や vascular endothelial growth factor (VEGF) などの新生血管因子の発現²³⁾²⁴⁾, 慢性炎症によるケモカインの関与²⁵⁾が報告されている。さらにこれら CNV が発症しやすい状況を引き起こす背景因子として, ぶどう膜炎, 感染などによる炎症や, 網膜色素上皮の加齢による代謝産物の蓄積と細胞外マトリックスの変化, 脈絡膜循環不全や酸化ストレスなどによる網膜色素上皮細胞の障害²⁵⁾, 血球系の異常²⁶⁾などが考えられるが, 遺伝性網膜変性においてもこれらの現象が起こっていることが予想され, 特に黄斑に障害を来す peripherin/RDS 遺伝子の変異で黄斑部に新生血管が生じたものと推測され, 遺伝子変異による網膜細胞あるいは網膜色素上皮細胞の異常も原因

の一つになり得ると考えられる。原因によって新生血管の活動性や網膜色素上皮の修復能力, 治療に対する反応が異なることも考えられるため将来は鑑別が必要であるかもしれない。特に peripherin/RDS 遺伝子異常では自覚症状のない軽い黄斑萎縮のみの症例もあり, その頻度は報告されているよりもはるかに多いと思われ, 遺伝子変異が誘因となった CNV が AMD と診断されていることもあり得ると思われた。

文 献

- 1) Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, et al : A point mutation of the Rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 343 : 364—366, 1990.
- 2) Farrar GJ, Kenna P, Jordan SA, Kumar-Singh R, Humphries MM, Sharp EM, et al : A three-base-pair deletion in the peripherin-RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 354 : 478—480, 1991.
- 3) Weleber RG, Carr RE, Murphey WH, Sheffield VC, Stone EM : Phenotypic variation including retinitis pigmentosa, pattern dystrophy, and fundus flavimaculatus in a single family with a deletion of codon 153 or 154 of the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol* 111 : 1531—1542, 1993.
- 4) 万代道子, 平見恭彦, 横田友子, 高橋政代, 小杉真司 : 網膜色素変性全原因遺伝子スクリーニングシステムの導入. 厚生労働省「網膜脈絡膜, 視神経萎縮症に関する研究平成 15 年度総括・分担研究報告書」: 98—100, 2004.
- 5) 玉井 信 : 網膜色素変性と加齢黄斑変性: 病態研究と治療研究の進展. *日眼会誌* 108 : 750—769, 2004.
- 6) 和田裕子, 玉井 信 : 日本人常染色体優性網膜色素変性の分子遺伝学的検討. *日眼会誌* 107 : 687—694, 2003.
- 7) Wada Y, Abe T, Takeshita T, Sato H, Yanashima K, Tamai M : Mutation of human retinal fascin gene (FSCN 2) causes autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 2395—2400, 2001.
- 8) Wada Y, Abe T, Itabashi T, Sato H, Kawamura M, Tamai M : Autosomal dominant macular degeneration associated with 208delG mutation in the FSCN2 gene. *Arch Ophthalmol* 121 : 1613—1620, 2003.
- 9) Nichols BE, Sheffield VC, Vandenberg K, Drack AV, Kimura AE, Stone EM : Butterfly-shaped pigment dystrophy of the fovea caused by a point mutation in codon 167 of the RDS gene. *Nat Genet* 3 : 202—207, 1993.
- 10) Hoyng CB, Heutink P, Testers L, Pinckers A, Deutman AF, Oostra BA : Autosomal dominant central areolar choroidal dystrophy caused by a mutation in codon 142 in the peripherin/RDS gene. *Am J Ophthalmol* 121 : 623—629, 1996.

- 11) **Nakazawa M, Kikawa E, Chida Y, Wada Y, Shiono T, Tamai M** : Autosomal dominant cone-rod dystrophy associated with mutations in codon 244 (Asn244His) and codon 184 (Tyr184Ser) of the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol* 114 : 72—78, 1996.
 - 12) **Felbor U, Schilling H, Weber BH** : Adult vitelliform macular dystrophy is frequently associated with mutations in the peripherin/RDS gene. *Hum Mutat* 10 : 301—309, 1997.
 - 13) **Lim JI, Enger C, Fine SL** : Foveomacular dystrophy. *Am J Ophthalmol* 117 : 1—6, 1994.
 - 14) **Kemp CM, Jacobson SG, Cideciyan AV, Kimura AE, Sheffield VC, Stone EM** : RDS gene mutations causing retinitis pigmentosa or macular degeneration lead to the same abnormality in photoreceptor function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 3154—3162, 1994.
 - 15) **Ohno-Matsui K, Yoshida T, Futagami S, Yasuzumi K, Shimada N, Kojima A** : Patchy atrophy and lacquer cracks predispose to the development of choroidal neovascularisation in pathological myopia. *Br J Ophthalmol* 87 : 570—573, 2003.
 - 16) **平本裕盛** : 網膜色素変性に網膜新生血管を生じた 2 症例. *眼紀* 56 : 128—133, 2005.
 - 17) **林 振民, 林 麗如, 伊勢武比古, 鈴木君代** : 筑田真乳頭上新生血管を伴った網膜色素変性症の硝子体手術の 1 例. *臨眼* 55 : 991—995, 2001.
 - 18) **Marano F, Deutman AF, Leys A, Aandekerck AL** : Hereditary retinal dystrophies and choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238 : 760—764, 2000.
 - 19) **Francis PJ, Schultz DW, Gregory AM, Schain MB, Barra R, Majewski J** : Genetic and phenotypic heterogeneity in pattern dystrophy. *Br J Ophthalmol* 89 : 1115—1119, 2005.
 - 20) **Khani SC, Karoukis AJ, Young JE, Ambasudhan R, Burch T, Stockton R** : Late-onset autosomal dominant macular dystrophy with choroidal neovascularization and nonexudative maculopathy associated with mutation in the RDS gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 3570—3577, 2003.
 - 21) **Nakamura M, Hotta Y, Piao CH, Kondo M, Terasaki H, Miyake Y** : Enhanced S-cone syndrome with subfoveal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 133 : 575—577, 2002.
 - 22) **Renno RZ, Youssri AI, Michaud N, Gragoudas ES, Miller JW** : Expression of pigment epithelium-derived factor in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 1574—1580, 2002.
 - 23) **Yi X, Ogata N, Komada M, Yamamoto C, Takahashi K, Omori K, et al** : Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 : 313—319, 1997.
 - 24) **Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H, Nakagawa K, Sueishi K, Inomata H** : Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 : 159—167, 1997.
 - 25) **Zarbin MA** : Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 122 : 598—614, 2004.
 - 26) **Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, et al** : An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2-or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 9 : 1390—1397, 2003.
-