

機能性表示食品 届出食品情報 様式Ⅶ

■食品関連事業者に関する基本情報

届出者の法人名	株式会社リフレ	届出者の代表者 氏名	安野明子
届出者の住所	埼玉県上尾市仲町 1-7-28		

・製造者の氏名（製造所又は加工所の名称）及び所在地 ※複数ある場合、全てを記載

※	①株式会社 AFC-HD アムスライフサイエンス 本社工場 静岡県静岡市駿河区豊田 3丁目6番36号 ②株式会社 AFC-HD アムスライフサイエンス 第二工場 静岡県静岡市駿河区豊田 2丁目4番3号 ③株式会社 AFC-HD アムスライフサイエンス 国吉田工場 静岡県静岡市駿河区国吉田 2丁目6番7号		
	消費者対応部局 （お客様相談室 等）の連絡先（電 話番号等） ※	情報開示するウ ェブサイトのU RL ※	https://hc-refre.jp/

・届出事項及び開示情報についての問合せ担当部局

部局	商品企画部	電話	048-774-4011
----	-------	----	--------------

■届出食品に関する基本情報

商品名	ひざのみかた W	名称 ※	サケ鼻軟骨抽出物含有加工食品
食品の区分	加工食品(サプリメント形状)		

・錠剤、粉末剤、液剤であって、その他加工食品として扱う場合はその理由

--

・当該製品が想定する主な対象者（疾病に罹患している者、未成年者、妊産婦（妊娠を計画している者を含む。）及び授乳婦を除く。）

※	日常生活の中で筋力の衰えを感じている方、ひざ関節に違和感のある健常な中高年
---	---------------------------------------

・健康増進法施行規則第11条第2項で定める栄養素の過剰な摂取につながらないとする理由

※	プロテオグリカンとは、コアタンパク質にグリコサミノグリカンが共有結合した複合糖質の一種であり、細胞外マトリックスの主要構成成分のひとつである。プロテオグリカンは栄養源としての糖質とは明確に区別されている。 主として栄養源（エネルギー源）となる糖質である単純糖質（でんぷん、アミロース、グルコース（以上ブドウ糖からなる））、ショ糖（グルコースと果糖からなる二糖）は中性糖からなる。一方、複合糖質のプロテオグリカンは、細胞膜、結合組織、細胞外マトリックスの構成成分であり、生物学的意義を単純糖質とは明確に一線を画しており、中性糖だけでなく、酸性糖（ウロン
---	--

別紙様式（Ⅶ）【届出データベース入力画面】

酸、シアル酸)、アミノ糖 (グルコサミン、ガラクトサミン) からなる複雑な糖鎖で、エネルギー源となる糖質とは異なる。

健康増進法施行規則第 11 条第 2 項で定められている栄養素は、(一)脂質、飽和脂肪酸及びコレステロール、(二)糖類(単糖類又は二糖類であって、糖アルコールでないものに限る。)、(三)ナトリウムである。

日本人の食事摂取基準 (2020 年版) において脂質、炭水化物及び食塩相当量の目標量が設定されている。本届出食品が想定している対象者において、総エネルギー必要量は、身体活動レベル、年齢、性別により異なり、1,400～3,050 kcal である。脂質の目標量は総エネルギーの 20～30%、炭水化物の目標量は総エネルギーの 50～65%、食塩相当量の目標量は男性が 7.5g/日未満、女性が 6.5g/日未満となっている。推定エネルギー必要量が最小 1,400 kcal の「身体活動レベルが低い 75 歳以上の女性」では、脂質の目標値は 280～420 kcal、炭水化物の目標値は 700～910 kcal、食塩相当量の目標値は 6.5g である。

本届出食品に含まれる栄養成分は、一日摂取目安量当たり脂質が 0.0078g、炭水化物が 0.1893g、食塩相当量が 0.0042g であり、それぞれの目標値と比較して微量であると言える。従って本届出食品の摂取は、栄養素の過剰な摂取にはつながらない。

販売開始予定日
※ (届出日から 60 日を切らない
販売開始予定日を記入)

※作用機序についてファイルを添付すること

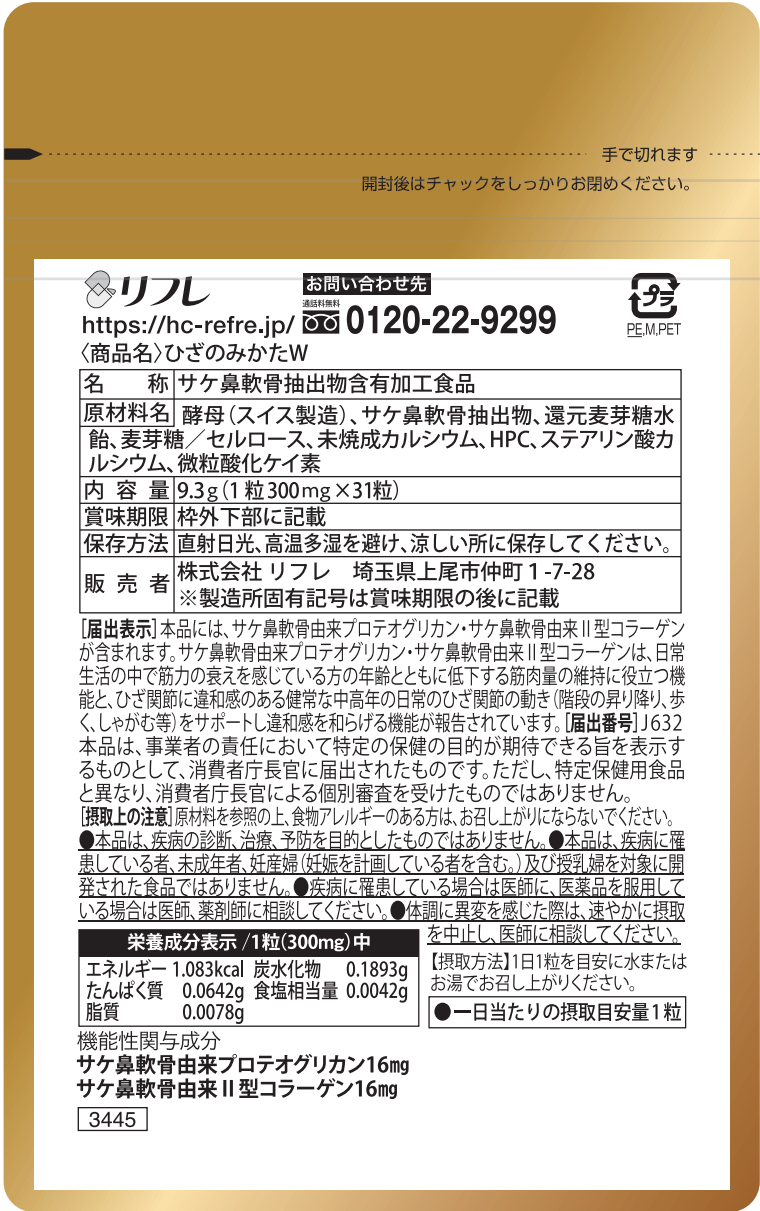
- ・ 別紙様式(Ⅶ)－1 作用機序に関する説明資料 (公開)

※ (別紙様式 (Ⅶ) -1 を添付)

- ・ 公開する添付ファイルにマスキングをしたときはマスキングなしのファイルも添付すること (非公開)

- ・ その他添付ファイル (非公開)

[※ は入力必須項目]



作用機序に関する説明資料

１．製品概要

商品名	ひざのみかた W
機能性関与成分名	サケ鼻軟骨由来プロテオグリカン・サケ鼻軟骨由来Ⅱ型コラーゲン
表示しようとする機能性	本品には、サケ鼻軟骨由来プロテオグリカン・サケ鼻軟骨由来Ⅱ型コラーゲンが含まれます。サケ鼻軟骨由来プロテオグリカン・サケ鼻軟骨由来Ⅱ型コラーゲンは、日常生活の中で筋力の衰えを感じている方の年齢とともに低下する筋肉量の維持に役立つ機能と、ひざ関節に違和感のある健常な中高年の日常のひざ関節の動き（階段の昇り降り、歩く、しゃがむ等）をサポートし違和感を和らげる機能が報告されています。

２．作用機序

【日常生活の中で筋力の衰えを感じている方の年齢とともに低下する筋肉量の維持に役立つ機能】

骨格筋は中胚葉に由来する筋芽細胞から形成され、筋芽細胞は細胞分裂を繰り返して増殖し、一定方向に配列する。その後、筋芽細胞は隣接する細胞同士で融合して筋管細胞になる。さらに筋管細胞に筋芽細胞が融合して成熟した筋細胞が形成される。骨格筋が肥大する際には、骨格筋組織を構成する個々の筋細胞が肥大、逆に委縮する場合は個々の筋細胞が委縮する。しかし、成熟した正常な骨格筋組織には筋芽細胞は存在しない。筋肥大時に増加する筋核の供給源細胞は骨格筋組織幹細胞として知られるサテライト細胞である。このサテライト細胞は、特定の条件下で活性化し増殖して、その多くは筋芽細胞と分化して既存の骨格筋細胞に融合することで、骨格筋細胞の肥大が引き起こされると考えられている¹⁾。骨格筋の再生に重要なサテライト細胞は、筋肉の修復だけでなく、肥大成長への筋肉の適応の調整にも必要であると考えられている。しかし、サテライト細胞は慢性炎症に対して脆弱であることが知られている²⁾。筋肉量は一般に、筋肉タンパク質合成(MPS)と筋肉タンパク質分解(MPB)のバランスによって制御されていて、MPS と MPB のバランスを維持するためには炎症を改善することが重要である。骨格筋に対する抗炎症剤の有益な効果は実証されている³⁻⁶⁾。

プロテオグリカンは、コアタンパク質にグリコサミノグリカンが共有結合した複合糖質の一種であり、細胞外マトリックスの主要構成成分のひとつである。プロテオグリカンの生物化学的機能・役割については、各種細胞の増殖、分化誘導に関与することが近年明らかになり、その生物化学的な重要性が認められるようになった。プロテオグリカンの中でもコンドロイチン硫酸糖鎖含量が多く、分子量が大きいコンドロイチン硫酸プロテオグリカンはアグリカンと呼ばれ、動物の皮膚や軟骨組織に豊富に存在する。

コンドロイチン硫酸は、腸管免疫系を介して抗炎症作用を発揮することから、変形性関節症の機能性食品素材として広く利用されている。サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンは複数のコン

別紙様式（Ⅶ）－１【添付ファイル用】

ドロイチン硫酸を持つ生体分子であり、免疫細胞膜上の白血球免疫反応の必須受容体であり、コンドロイチン硫酸の免疫反応において重要な役割を果たしている L-セクレチンに対してより高い親和性を有することが明らかにされた⁷⁾。したがって、機能性食品としてサケ鼻軟骨由来プロテオグリカンとコンドロイチン硫酸と全く同じ作用機序を持っていると推定され、コンドロイチン硫酸よりも有効な素材であると考えられる。

Ⅱ型コラーゲンは腸粘膜に存在する樹状細胞に取り込まれ、免疫に対して調節的に作用する T 細胞として知られる Treg を誘導するため⁸⁾サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンとサケ鼻軟骨由来Ⅱ型コラーゲンを含むサケ鼻軟骨由来プロテオグリカン複合体は、より高い抗炎症効果を発揮すると考えられる。

加齢や運動不足による筋肉量低下は炎症が鍵となっていることから、生体の免疫応答を調節し、過剰な炎症を抑制することで筋肉量を維持できるものと考えられる。炎症には IL-17A が関与していると考えられており、IL-17A は、滑膜細胞、T 細胞、B 細胞、マクロファージ等広範囲な細胞に作用して、炎症性サイトカインやケモカインの産生、好中球の遊走、破骨細胞の形成を促し、炎症を誘導することが報告されている⁹⁾。また、IL-17 を産生する T 細胞は従来知られていた Th1 細胞や Th2 細胞とは異なる CD4⁺T 細胞サブセットであることが報告され¹⁰⁾、Th17 細胞として認識されている。変形性膝関節症(OA)患者の滑膜線維芽細胞と軟骨細胞を用いた試験では、IL-17 のケモカイン産生を介した軟骨破壊や滑膜浸潤が示唆されている¹¹⁾。なお、Th17 細胞への分化には炎症性サイトカインの一つである IL-6 が関与している。また未成熟なナイーブ T 細胞は、TGF-β存在下において制御性 T (Treg) 細胞、TGF-βと IL-6 両サイトカインの存在下において Th17 細胞へと分化誘導されるため、IL-6 の産生抑制は抗炎症作用に繋がるものと考えられている。

大腸炎モデルマウスを用いた試験においては、プロテオグリカンが Th17 細胞の発現を抑制する T 細胞として知られている制御性 T (Treg) 細胞の発現を亢進させ、大腸炎を抑制することが報告されている¹²⁾。また、自己免疫性脳脊髄炎モデルマウスを用いた試験においては、プロテオグリカンが Th17 関連因子を抑制し、Treg 細胞関連因子を増強することで、症状を改善することが報告されている¹³⁾。更に、Ⅱ型コラーゲン誘導関節炎モデルマウスを用いた試験においては、プロテオグリカンが関節における IL-17A の遺伝子発現や脾臓細胞の IL-17 産生能を抑制し、炎症に関与する好中球やマクロファージ、骨破壊に関与する破骨細胞の関節炎部位への浸潤を抑制することで、関節炎の悪化を抑えることが報告されている¹⁴⁾。

Ⅱ型コラーゲンは 3 本のα1 (Ⅱ型) ペプチド鎖から成り、関節軟骨や目の硝子体等に特徴的に存在する。経口摂取されたⅡ型コラーゲンは腸管関連リンパ組織のパイエル板から取り込まれ、パイエル板内の細胞の IL-10 や TGF-βの産生を促し、CD11c+ CD11b+、IDO+の樹状細胞の割合を増加させる。増加した樹状細胞は T 細胞と相互作用することで Treg 細胞の発現を誘導する。パイエル板内で発現した Treg 細胞は腸間膜リンパ組織に移行し、全身において免疫寛容を誘導し、過剰な炎症を抑制する⁸⁾。パイエル板における免疫は、まずパイエル板を覆う濾胞被蓋上皮の吸収上皮細胞間に散在する M 細胞が抗原を捕捉し、樹状細胞などの抗原提示細胞に譲渡する。抗原提示により T 細胞の活性化、続いて B 細胞の活性化が起こり、液性免疫が亢進する。免疫反応終結時、活性化された T 細胞の大半は死滅するが、一部メモリー T 細胞に分化し生体内に存在することで免疫学的記憶が維持される。つまり特異的

別紙様式（Ⅶ）－１【添付ファイル用】

な抗原(プロテオグリカン断片またはコラーゲン断片)の再暴露に対して、迅速かつ大量のサイトカイン(IL-4)産生が成立する。IL-4はB細胞のクラススイッチ(IgE)やマクロファージの組織修復(M1→M2)へと関与することが知られており、破壊された軟骨組織の修復にも作用するものと考えられる。

プロテオグリカン複合体の経口投与に関しては、免疫系をOVAで刺激・惹起したマウスの脾細胞におけるTh2サイトカイン類(IL-4, IL-5, IL-9, IL-10)の産生減少が早期(3日後)で認められた。これは転写因子GATA3発現抑制を介したTh2分化阻害作用が寄与していると考えられ、同時にTreg細胞における転写因子Foxp3発現上昇の裏付けとなるものと考えられる¹⁵⁻¹⁶⁾。一方、抗原感作7日後にIL-4の産生量増大が認められた。この結果は、脾臓細胞にあるナイーブT細胞の濾胞性T細胞への分化と時間的に一致し、プロテオグリカン複合体の経口投与が、濾胞性T細胞のIL-4産生機構に関与することが強く示唆された。すなわち、プロテオグリカン複合体が抗原として認識を受け濾胞性T細胞を介した液性免疫を活性化していると考えられる。マウスを用いた実験ではあるが、プロテオグリカン複合体の経口投与による抗原としての認識・免疫応答の獲得は、自己の構成タンパク質の損傷に対して過度な炎症反応の抑制ならびに迅速な組織修復効果が期待される。

これらの報告から、プロテオグリカン複合体の経口摂取により筋肉でも同様に抗炎症特性を有し、サテライト細胞に対する炎症関連損傷を減少させ、筋肉量を維持すると考えられる。

また、腸管の軽度な炎症を抑制することで、全身の酸化ストレスバランスを改善し、筋肉量が維持されることが考えられる。近年、日本人の食事は糖質主体から脂質・蛋白質を重視する、いわゆる“西洋化”が進んでいるとの報告があり¹⁷⁾、西洋型の食生活は消化系への付加も大きくなり軽度の腸管炎症に寄与するとの知見もある¹⁸⁾。西洋型食生活は腸内細菌叢の異常を引き起こし、それによって腸管免疫にかかわる短鎖脂肪酸が減少すると¹⁹⁾、腸上皮バリア機能が低下し²⁰⁾、炎症性サイトカインが産生される²¹⁾。炎症は酸化ストレスと密接に関係しており、どちらかいずれかが発生すると、もう片方も発生されやすいと考えられている²²⁾。酸化ストレスは筋肉量の低下に関与することが知られ²³⁾、酸化ストレスは皮膚の細胞外マトリックス分解酵素の発現を増加させることが報告されている²⁴⁾。最近では、食事と栄養素による炎症の制御が食事炎症指数(DII)として注目されるようになり、この指数は低筋肉量と関連つけられている²⁵⁾。Marshallら²⁶⁾により抗炎症効果を含む栄養成分の摂取が、筋肉量の維持に有益である可能性があることが実証されている。

以上示したとおり、サケ鼻軟骨プロテオグリカン及びⅡ型コラーゲンの経口摂取による筋力の維持作用は、これまで報告されている結果をもとにその作用機序を矛盾なく説明することができる。

【参考文献】

- 1) 愛知県理学療法学会誌 第28巻 第2号 2016年12月
- 2) FEES J. 2018;285(11):1973-84.
- 3) J Am Med Dir Assoc.2013;14(8):626,e9-626e13.
- 4) Am J Physiol Integr Comp Physiol.2011;300(3):R655-62.
- 5) Arch Phys Med Rehabil.2011;92(8):1185-93.
- 6) FASEB J.2016;30(6):2266-81.
- 7) Japanese J Food Chem Saf. 2021;28(1):9-15.
- 8) Mod Rheumatol.2009;19(6):581-9.
- 9) Immunity 2011; 34(2): 149-162.
- 10) J Exp Med 2005; 201(2): 233-240.
- 11) Osteoarthritis Cartilage 2002; 10(10): 799-807.
- 12) Biochem Biophys Res Commun 2010; 402(2): 209-215.
- 13) Life Sci 2012; 91(25-26): 1263-1269.
- 14) Biomed Res Int 2014; 2014: 406453.
- 15) Immunity 2011; 35(3): 337-48.
- 16) PloS Biol 2007; 5(12): e329.
- 17) Nutrients2018;10(8):994.
- 18) Gut 2021; 70(7): 1287-98.
- 19) Front Immunol 2019; 10.
- 20) Life Sci 2012; 91(25-26): 1263-1269.
- 21) Microorganisms 2019; 7(8): 271.
- 22) Oxid Med Cell Longev 2016; 2016: 1-9.
- 23) An Bras Dermatol 2017; 92(3): 367-74.
- 24) Int J Mol Sci 2021; 22(22): 12489.
- 25) PloS Biol 2007; 5(12): e329.
- 26) Nutrients2018;10(8):994.

【ひざ関節に違和感のある健常な中高年の日常のひざ関節の動き(階段の昇り降り、歩く、しゃがむ等)をサポートし違和感を和らげる機能】

膝関節は関節包という組織によって包まれており、関節中に関節腔という空間を形成している。関節包表面には滑膜が存在し、ヒアルロン酸や糖タンパク等で構成された滑液を分泌し、関節包内を満たしている。滑液は膝関節の潤滑油、酸素や栄養素の運搬体としての役割がある。膝関節を構成する上下の骨表面は、軟骨組織によって覆われており、骨同士が直接接触しないようクッションの役割を担っている。

加齢に伴う筋力低下等により膝関節にかかる力学的負荷が増加すると、関節腔内の軟骨組織が摩耗し、Ⅱ型コラーゲン等の軟骨構成タンパク質の断片が関節内に放出される。力学的負荷によって生じたⅡ型コラーゲン断片は滑膜細胞や軟骨細胞を刺激し、炎症性サイトカインやケモカイン、炎症メディエーター、プロテアーゼの産生・活性化を誘導し、炎症と共に軟骨破壊を引き起こす。軟骨破壊が進むと、膝関節により力学的負荷がかかるようになるため、関節炎がより悪化するという悪循環に陥る¹⁾。これらの結果、膝関節に違和感が生じるようになると思われる。

上記の通り、軟骨破壊は膝関節内の炎症が鍵となっていることから、生体の免疫応答を調節し、過剰な炎症を抑制することで軟骨破壊を抑制し、膝関節機能を維持できるものと考えられる。関節炎における炎症には IL-17A が関与していると考えられている。IL-17A は、滑膜細胞、T 細胞、B 細胞、マクロファージ等広範囲な細胞に作用して、炎症性サイトカインやケモカインの誘導、好中球の遊走、破骨細胞の形成を促し、炎症を誘導することが報告されている²⁾。また、IL-17 を産生する T 細胞は従来知られていた Th1 細胞や Th2 細胞とは異なる CD4⁺T 細胞サブセットであることが報告され³⁾、Th17 細胞として認識されている。変形性関節症(OA)患者の滑膜線維芽細胞と軟骨細胞を用いた試験では、IL-17 のケモカイン産生を介した軟骨破壊や滑膜浸潤が示唆されている⁴⁾。また、変形性膝関節症(OA)患者は健常者と比べて血中 IL-17A 濃度が有意に高いという報告もある⁵⁾。なお、Th17 細胞への分化には炎症性サイトカインの一つである IL-6 が関与している。また未成熟なナイーブ T 細胞は、TGF- β 存在下において制御性 T (Treg) 細胞、TGF- β と IL-6 両サイトカインの存在下において Th17 細胞へと分化誘導されるため、IL-6 の産生抑制は抗炎症作用に繋がるものと考えられている。

プロテオグリカンとは、コアタンパク質にグリコサミノグリカンが共有結合した複合糖質の一種であり、細胞外マトリックスの主要構成成分のひとつである。プロテオグリカンの生物化学的機能・役割については、各種細胞の増殖、分化誘導に関与することが近年明らかになり、その生物化学的な重要性が認められるようになった。プロテオグリカンの中でもコンドロイチン硫酸糖鎖含量が多く、分子量が大きいコンドロイチン硫酸プロテオグリカンはアグリカンと呼ばれ、動物の軟骨組織に豊富に存在する。

大腸炎モデルマウスを用いた試験においては、プロテオグリカンが Th17 細胞の発現を抑制する T 細胞として知られている制御性 T (Treg) 細胞の発現を亢進させ、大腸炎を抑制することが報告されている⁶⁾。また、自己免疫性脳脊髄炎モデルマウスを用いた試験においては、プロテオグリカンが Th17 関連因子を抑制し、Treg 細胞関連因子を増強することで、症状を改善することが報告されている⁷⁾。更に、Ⅱ型コラーゲン誘導関節炎モデルマウスを用いた試験においては、プロテオグリカンが関節における IL-17A の遺伝子発現や脾臓細胞の IL-17 産生能

別紙様式（Ⅶ）－１【添付ファイル用】

を抑制し、炎症に関与する好中球やマクロファージ、骨破壊に関与する破骨細胞の関節炎部位への浸潤を抑制することで、関節炎の悪化を抑えることが報告されている⁸⁾。

非変性Ⅱ型コラーゲンは３本の $\alpha 1$ （Ⅱ型）ペプチド鎖から成り、関節軟骨や目の硝子体等の特徴的に存在する。経口摂取されたⅡ型コラーゲンは腸管関連リンパ組織のパイエル板から取り込まれ、パイエル板内の細胞の IL-10 や TGF- β の産生を促し、CD11c+ CD11b+、IDO+の樹状細胞の割合を増加させる。増加した樹状細胞は T 細胞と相互作用することで Treg 細胞の発現を誘導する。パイエル板内で発現した Treg 細胞は腸間膜リンパ組織に移行し、全身において免疫寛容を誘導し、過剰な炎症を抑制する⁹⁾。パイエル板における免疫は、まずパイエル板を覆う濾胞被蓋上皮の吸収上皮細胞間に散在する M 細胞が抗原を捕捉し、樹状細胞などの抗原提示細胞に譲渡する。抗原提示により T 細胞の活性化、続いて B 細胞の活性化が起こり、液性免疫が亢進する。免疫反応終結時、活性化された T 細胞の大半は死滅するが、一部メモリー T 細胞に分化し生体内に存在することで免疫学的記憶が維持される。つまり特異的な抗原(プロテオグリカン断片またはコラーゲン断片)の再暴露に対して、迅速かつ大量のサイトカイン(IL-4)産生が成立する。IL-4 は B 細胞のクラススイッチ(IgE)やマクロファージの組織修復(M1→M2)へと関与することが知られており、破壊された軟骨組織の修復にも作用するものと考えられる。

プロテオグリカン複合体の経口投与に関しては、免疫系を OVA で刺激・惹起したマウスの脾細胞における Th2 サイトカイン類(IL-4, IL-5, IL-9, IL-10)の産生減少が早期(3 日後)で認められた。これは転写因子 GATA3 発現抑制を介した Th2 分化阻害作用が寄与していると考えられ、同時に Treg 細胞における転写因子 Foxp3 発現上昇の裏付けとなるものと考えられる¹⁰⁻¹¹⁾。一方、抗原認識 7 日後に IL-4 の産生量増大が認められた。この結果は、脾臓細胞にあるナイーブ T 細胞の濾胞性 T 細胞への分化と時間的に一致し、プロテオグリカン複合体の経口投与が、濾胞性 T 細胞の IL-4 産生機構に関与することが強く示唆された。すなわち、プロテオグリカン複合体が抗原として認識を受け濾胞性 T 細胞を介した液性免疫を活性化していると考えられる。

マウスを用いた実験ではあるが、プロテオグリカンおよびⅡ型コラーゲンの経口投与による抗原としての認識・免疫応答の獲得は、自己の軟骨構成タンパク質の損傷に対して過度な炎症反応の抑制ならびに迅速な組織修復効果が期待される。

なお、本製品の機能性関与成分はサケ鼻軟骨由来プロテオグリカン及びサケ鼻軟骨由来Ⅱ型コラーゲンであり、分析値例では合計 95.0%以上である。それ以外の成分は、サケ鼻軟骨抽出物中には脂質、水分、灰分が含まれるが、含有量は 5.0%未満となる。水分については、ひざ関節の機能性を有しているとの報告はない。また、脂質および灰分についても、一日推奨摂取量 40 mg/日に含まれる量は微量であり、ひざ関節の機能性を有しているとの報告はみられない。以上のことからサケ鼻軟骨中の機能性関与成分以外の成分は機能性を有していないといえる。

【参考文献】

- 1) Arthritis Rheum 2003; 48(3): 602-611.
- 2) Immunity 2011; 34(2): 149-162.
- 3) J Exp Med 2005; 201(2): 233-240.
- 4) Osteoarthritis Cartilage 2002; 10(10): 799-807.
- 5) PLoS One 2016; 11(11): e0164757.
- 6) Biochem Biophys Res Commun 2010; 402(2): 209-215.
- 7) Life Sci 2012; 91(25-26): 1263-1269.
- 8) Biomed Res Int 2014; 2014: 406453
- 9) Mod Rheumatol 2009; 19(6): 581-589.
- 10) Immunity 2011; 35(3): 337-48.
- 11) PloS Biol 2007; 5(12): e329