

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(がん関係研究分野)

難治癌を標的治療できる完全オリジナルのウイルス遺伝子医薬の実用化のための前臨床研究

平成 2 5 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小賤 健一郎

平成 2 6 (2 0 1 4) 年 5 月

目 次

I . 総括研究報告 研究総括 小賤 健一郎	-----	1
II . 分担研究報告 全研究分担者	-----	5
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	6
IV . 研究成果の刊行物・別刷	-----	8

研究総括

研究代表者 小賤 健一郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

独自開発の m-CRA (多因子で癌特異化する増殖制御型アデノウイルスベクター) 作製技術を基盤に開発した、Surv.m-CRA の医師主導治験開始に向け、3 年間の前臨床研究の 2 年目であった。本年は、GMP 製造、非臨床試験、ならびに当局対応を計画通り行った。

研究分担者

三井 薫	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・講師
入江 理恵	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
伊地知 暢広	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
王 宇清	鹿児島大学産学連携推進センター・プロジェクト研究員
小宮 節郎	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
永野 聡	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
夏越 祥次	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
福崎 好一郎	株式会社新日本科学・専務取締役

性) と治療効果を向上した新型 Surv.m-CRA の開発を行った (*Cancer Gene Ther* 2011)。さらに、Surv.m-CRA は既存の治療法が効果を示さない、癌幹細胞を効果的に治療できることを実証した (*J Trans Med* 2014)。

本研究は、Surv.m-CRA の臨床用の GMP 製造、GLP 基準での非臨床試験のデータ取得等を 3 年間で行い、平成 27 年度よりこの分野で本邦初の医師主導治験を開始することを目的とする。

B . 研究方法と C . 研究結果

「本研究終了後の翌(平成 27)年度に本邦初の癌遺伝子治療の医師主導治験を開始」という当初の研究計画通り、本研究は以下のように順調に進んだ。

1. 医師主導治験に使用する本ウイルスの治験薬の製造と品質・安定性試験など
Master Viral bank (MVB) の構築：医薬品製造受託会社である SAFC 社 (米国、カールスバッド) において、本ウイルスの GMP グレードの Master viral bank (MVB) を樹立した。
MVB の品質テスト: ウイルス力価、無菌性及びウイルス安全性試験など ICH (日米欧医薬品規制調和会議) 等のガイドラインで規定された試験を実施し、GMP グレードの治験薬製造に使用可能な品質であることを確認した。
治験薬 (「低」・「中」用量) の GMP 原薬の製造：医師主導治験に使用することを目的として、本ウイルスの GMP 原薬の製造を SAFC 社に委託実施し、治験で想定している「低用量」及び「中用量」に必要な量の原薬を確保した。

A . 研究目的

この研究にいたる背景として、研究代表者は、まず遺伝子治療研究の黎明期 (90 年代初頭) に米国専門施設でアデノウイルスベクターによる癌遺伝子治療法の開発に世界に先駆け成功し (*PNAS* 1995, 1996 等)、米国共同研究者が臨床試験にも成功した。帰国後に本邦の自身の研究室で、完全オリジナルの「多因子で同時に精密に癌特異標的治療できる増殖制御型アデノウイルス」(m-CRA) の作製技術の開発に成功し (*Gene Ther* 2005)、Survivin 依存性 m-CRA (Surv.m-CRA) (第一弾の m-CRA 医薬) を開発した (*Cancer Res* 2005)。さらに癌特異性 (安全

GMP原薬（「低」・「中」用量）の品質試験：GMP原薬の力価、品質試験をSAFC社及びBioReliance社で実施し、治験に使用する上で必要な品質が確保されていることを確認した。試験項目は以下のとおりである。

- 安全性試験（細菌・真菌、エンドトキシン、マイコプラズマ、混入ウイルス等）
- 製造品の確認試験（制限酵素マッピング、GLP対応の全シーケンスの確認）
- 純度試験（宿主DNA・蛋白、Benzonaseなどの工程由来不純物の残存）
- 強度試験（本ウイルスの力価、粒子数、感染ウイルス純度）
- 活性/能力試験（本ウイルスの癌特異的なウイルス増殖能）
- その他（外観、pH）

GLP毒性試験用の原薬製造：治験開始までに実施が必要なGLP毒性試験などの前臨床試験に使用する原薬を、GMP原薬と同一の製造法で製造し、その品質に問題のないことを確認した。

本ウイルスの腫瘍細胞特異性に関する検討：Survivinの発現レベルの異なる腫瘍細胞及び正常細胞由来の株化細胞各2種を用い、本ウイルスがSurvivinの発現レベルに依存して細胞傷害性を発揮することを確認した。

2. 前臨床（非臨床）試験

1) POC (Proof of Concept / Efficacy)試験

*in vitro*試験（対象の癌を特異的かつ効果的に治療する性能を実証）

8種類の癌細胞、3種類の正常細胞で行う。

- 1) 定量RT-PCRによる内因性survivinの癌特異的な発現を実証（今回のウイルス遺伝子医薬のSurv.m-CRAはsurvivin高発現の細胞を特異的に殺傷）

- 2) Surv.m-CRA の*in vitro*での癌特異的な殺傷効果を実証

2) 安全性試験

* いずれもこの分野では実績のある米国のMPI社に委託して行っている。

毒性試験

- ハムスター単回投与予備毒性試験（非GLP）
本ウイルスの 5×10^9 、 5×10^{10} 及び 5×10^{11} virus particle (VP)/kg、並びにvehicle を雄雌各12匹のハムスターに筋肉内投与し、一般状態及び体重変化を記録するとともに、投与後7及び14日に雄雌6匹ずつを安楽死させ、臨床病理学的、病理解剖学的及び病理組織学的検査を実施した。その結果、想定された肝傷害が高用量群でのみ検出されたが、中用量・低用量群で毒性兆候は認められず、治験における最大

投与量（ 2×10^{10} VP/kg）まで安全に投与できることが示唆された。

- ハムスター単回投与毒性試験（GLP）
治験開始までに必要なGLP試験として、本ウイルスの 5×10^9 、 5×10^{10} 及び 5×10^{11} virus particle (VP)/kg、並びにvehicle を雄雌各13匹のハムスターに筋肉内及び皮下投与（皮下投与は高用量群のみ設定）し、一般状態及び体重変化を記録するとともに、投与後及び14日に雄雌各5匹につき眼科学的検査を実施後、安楽死させ、臨床病理学的、病理解剖学的、及び病理組織学的検査を実施した。

薬物動態試験

- 本ウイルスの 5×10^{12} VP/kgを雌雄ハムスター各15匹に単回皮下投与し、7、15、及び30日後に雌雄各5例から各種組織・器官（血液、生殖器、主要臓器、骨髄、注射部）を採取し、定量PCRにてウイルスの生体内分布と経日的変化を検討した結果、雌雄生殖器系を含め安全性面で問題となる分布・残留は観察されなかった。
- 上記2)- のハムスター単回投与毒性試験（GLP）において、高用量投与群で投与7日後に採取した主要組織・器官及び血液についてPCR法によりウイルス濃度を測定し、本ウイルスの生体内分布を検討する。また、各群の雌雄各3例については、投与後4および8時間後に採血し、血中ウイルス濃度を測定する。

* 医師主導治験のための準備状況

当局対応、大学の治験体制整備も以下のように進めた。

1) PMDAとの相談

平成24年度は薬事戦略相談室の個別面談、事前面談を2回実施した。平成25年度（10月10日）の事前面談にて、製造や出荷試験、毒性試験や生体内分布試験、対面助言等の実施時期、を相談した。それにより、今後、製造法、品質及び試験方法、非臨床試験、治験実施計画、を2回の対面助言にて確認すること、その後、施設IRB、治験届けを行う予定も定まった。

2) 大学の治験体制整備

本学に臨床研究支援センターを設置中で、専従スタッフも配置した。よって、平成26年度に、協力している京都大学医学部附属病院臨床研究総合センターの支援ももらいながら、本プロジェクトの本学での医師主導治験の支援体制も具体的に整備していく道筋も定まった。

D . 考察とE . 結論

独自開発の m-CRA (多因子で癌特異化する増殖制御型アデノウイルスベクター) 作製技術を基盤に開発した、Surv.m-CRA の医師主導治験開始に向け GMP 製造、非臨床試験、ならびに当局対応を計画通り行った。平成 27 年度に医師主導治験を開始できる予定で、順調に進捗している。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Yuge K, Takahashi T, Khai NC, Goto K, Fujiwara T, Fujiwara H, Kosai K.: Intramuscular injection of adenoviral hepatocyte growth factor at a distal site ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Int J Mol Med.* 33(5):1064-1074, 2014
2. Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Irie R, Setoguchi T, Komiya S, Natsugoe S, Kosai K.: Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. *J Trans Med.* 12:27.doi: 10.1186/1479-5876-12-27,2014
3. Imamura K, Maeda S, Kawamura I, Matsuyama K, Shinohara N, Yahiro Y, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Enhancer-binding Protein 3 Is Essential for the Expression of Asparagine-linked Glycosylation 2 in the Regulation of Osteoblast and Chondrocyte Differentiation. *J Biol Chem.* 289(14):9865-79,2014
4. Kakoi H, Maeda S, Shinohara N, Matsuyama K, Imamura K, Kawamura I, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S.: Bone Morphogenic Protein (BMP) Signaling Up-regulates Neutral Sphingomyelinase 2 to Suppress Chondrocyte Maturation via the Akt Protein Signaling Pathway as a Negative Feedback Mechanism. *J Biol Chem.* 289(12):8135-50,2014
5. Nakamura S, Nagano S, Nagao H, Ishidou Y, Yokouchi M, Abematsu M, Yamamoto T, Komiya S, Setoguchi T.: Arsenic trioxide prevents osteosarcoma growth by inhibition of GLI transcription via DNA damage accumulation. *PLoS One.* 8(7):e69466,2013
6. Natsugoe S, Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Nakajo A, Matsumoto M, Okumura H, Kijima Y, Sakoda M, Matakai Y, Uchikado Y, Mori S, Maemura K, Ishigami S.: Lymph node micrometastasis in gastrointestinal tract cancer--a clinical aspect. *Int J Clin Oncol.* 18(5):752-61,2013
7. Uenosono Y, Arigami T, Kozono T, Yanagita S, Hagihara T, Haraguchi N, Matsushita D, Hirata M, Arima H, Funasako Y, Kijima Y, Nakajo A, Okumura H, Ishigami S, Hokita S, Ueno S,

Natsugoe S. Clinical significance of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer. *Cancer.*;119(22):3984-91,2013

8. Irie-Maezono R. and Tsuyama S.: Immunohistochemical analysis of the acid secretion potency in gastric parietal cells. *Open journal of Cell biology.* 2:179-185, 2013
9. Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Miyazaki T, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S.: Association of positive EBAG9 immunoreactivity with unfavorable prognosis in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Clin Breast Cancer.* 13(6):465-70. doi: 10.1016/j.clbc.2013.08.015, 2013
10. Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S.: FOXP1 and estrogen signaling in breast cancer. *Vitam Horm.* 93:203-12. doi: 10.1016/B978-0-12-416673-8.00006-X, 2013

2. 学会発表

1. 小賤健一郎: 新しい遺伝子治療ウイルスベクターの開発と基礎・臨床への応用。(国内・ランチョンセミナー) 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日(鹿児島)
2. 三井薫、高橋知之、井手佳菜子、小賤健一郎: アデノウイルスベクターでのヒト多能性幹細胞への効率的遺伝子導入技術の開発。(国内・ポスター) 第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 4-6 日(京都)
3. 井手佳菜子、三井薫、小賤健一郎: 多能性幹細胞の再生医療応用における新規腫瘍化阻止技術の開発(1)ヒト ES 細胞での検証。(国内・口頭発表) 第 7 回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会、2014 年 1 月 16 日(鹿児島)
4. 松下洋平、井手佳菜子、三井薫、小賤健一郎: 多能性幹細胞の再生医療応用における新規腫瘍化阻止技術の開発(2)マウス ES 細胞での検証(国内・口頭発表) 第 7 回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会、2014 年 1 月 16 日(鹿児島)
5. 小賤健一郎: 癌を標的治療する増殖型アデノウイルスの独自技術開発と臨床応用への展望. 鹿児島がんフォーラム 2013 年 11 月 30 日(鹿児島)
6. 小賤健一郎: 革新的ながん治療薬(癌だけを殺すウイルス)の開発と臨床応用に向けて. 鹿児島大学公開講座 2013 年 7 月 27 日(鹿児島)
7. 入江(前衛)理恵、津山新一郎: 「胃底腺壁細胞の腺内分布と酸分泌能の関与」第 69 回日本解剖学会九州支部学術集会、2013 年 11 月 2 日(鹿児島)
8. 宮崎 優美、王 宇清、三井 薫、丁 強、政幸一郎、松原 修一郎、小賤 健一郎、高尾 尊身: Immunohistochemical comparative analysis of the sphere cells of CD133-positive pancreatic cancer cells with iPS cells. CD133+膵がん Sphere 形成細胞と iPS 細胞の免疫組織学的比較解析. 第 72 回

日本癌学会学術総会、2013年10月3-5日(横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

【特許出願・取得】

1. 幹細胞における腫瘍化原因細胞の新たな標識法と治療法
発明者：小賤健一郎、三井薫、井手佳菜子
出願人：鹿児島大学
国内出願：2014年1月14日
(特願 2014-004262)
2. 増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法及びその作製用キット
発明者：小賤健一郎、永野聡
出願人：小賤健一郎(国内)；財団法人 名古屋産業科学研究所(中部 TLO)(米、欧)
国内出願：2003年7月31日(特願 2003-283427)
【国内特許取得】 2010年3月26日
(特許第 4478775号)
国際出願：2004年7月26日
(PCT/JP2004/010998)
【米国特許取得】2011年10月11日
(特許番号：US 8,034,589 B2)
【欧州特許取得】2013年11月20日
(特許番号：EP 1662004)
JST 特許支援事業(採択)により欧州に指定国移行中
3. 癌幹細胞を標的とするウイルスベクター
発明者：小賤健一郎、王宇清
出願人：鹿児島大学
国内出願：2011年3月25日
(特願 2011-068530)
国際出願：2012年3月23日
(PCT/JP2012/002031)
米国出願：2013年9月24日
(US 14/007,227)
4. Aurora キナーゼプロモーターを含む増殖制御型ウイルスベクター
発明者：小賤 健一郎
出願人：鹿児島大学
国内出願：2010年9月30日
(特願 2010-223150)
国際出願：2011年9月29日
(PCT/JP2011/72357)
米国出願：2013年7月5日(US 13/876,916)

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(がん関係研究分野)）
分担研究報告書

研究分担者	三井 薫	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（遺伝子治療・再生医学）・講師
研究分担者	入江 理恵	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（遺伝子治療・再生医学）・助教
研究分担者	伊地知 暢広	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（遺伝子治療・再生医学）・助教
研究分担者	王 宇清	鹿児島大学産学連携推進センター・プロジェクト研究員
研究分担者	小宮 節郎	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（整形外科学）・教授
研究分担者	夏越 祥次	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（消化器・乳腺甲状腺外科）・教授
研究分担者	永野 聡	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科（整形外科学）・助教
研究分担者	福崎 好一郎	株式会社新日本科学・専務取締役

上記研究者の分担報告はすべて研究総括報告書に記載している。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yuge K, Takahashi T, Khai NC, Goto K, Fujiwara T, Fujiwara H, Kosai K	Intramuscular injection of adenoviral hepatocyte growth factor at a distal site ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice.	<i>Int J Mol Med</i>	33(5)	1064-1074	2014
Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Irie R, Setoguchi T, Komiyama S, Natsugoe S, Kosai K	Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny.	<i>J Trans Med</i>	12		2014
Nakamura S, Nagano S, Nagao H, Ishidou Y, Yokouchi M, Abematsu M, Yamamoto T, Komiya S, Setoguchi T	Arsenic trioxide prevents osteosarcoma growth by inhibition of GLI transcription via DNA damage accumulation.	<i>PLoS One.</i>	8(7)	e69466	2013
Imamura K, Maeda S, Kawamura I, Matsuyama K, Shinohara N, Yahiro Y, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S.	Human Immunodeficiency Virus Type 1 Enhancer-binding Protein 3 Is Essential for the Expression of Asparagine-linked Glycosylation 2 in the Regulation of Osteoblast and Chondrocyte Differentiation.	<i>J Biol Chem.</i>	289(14)	9865-79	2014

Kakoi H, Maeda S, Shinohara N, Matsuyama K, Imai M, Yamamura K, Kawamura I, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, <u>Komiya S</u>	Bone Morphogenic Protein (BMP) Signaling Up-regulates Neutral Sphingomyelinase 2 to Suppress Chondrocyte Maturation via the Akt Protein Signaling Pathway as a Negative Feedback Mechanism.	<i>J Biol Chem.</i>	289(12)	8135-50	2014
Natsugoe S, Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Nakajima A, Matsumoto M, Okumura H, Kijima Y, Sakoda M, Mataka Y, Uchikado Y, Mori S, Maemura K, Ishigami S	Lymph node micrometastasis in gastrointestinal tract cancer--a clinical aspect.	<i>Int J Clin Oncol.</i>	18(5)	752-61	2013
Uenosono Y, Arigami T, Kozono T, Yanagita S, Hagihara T, Haraguchi N, Matsushita D, Hirata M, Arima H, Funasako Y, Kijima Y, Nakajima A, Okumura H, Ishigami S, Hokita S, Ueno S, <u>Natsugoe S</u>	Clinical significance of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer.	<i>Cancer</i>	119(22)	3984-91	2013
Irie-Maezono R. and Tsuyama S	Immunohistochemical analysis of the acid secretion potency in gastric parietal cells.	Open journal of <i>Cell biology</i>	2	179-185	2013
Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Miyazaki T, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaka A, Saeki T, Inoue S	Association of positive EBAG9 immunoreactivity with unfavorable prognosis in breast cancer patients treated with tamoxifen.	<i>Clin Breast Cancer.</i>	13(6)	465-70	2013
Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S	FOXP1 and estrogen signaling in breast cancer.	<i>Vitam Horm.</i>	93	203-12	2013

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yuge K, Takahashi T, Khai NC, Goto K, Fujiwara T, Fujiwara H, Kosai K	Intramuscular injection of adenoviral hepatocyte growth factor at a distal site ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice.	<i>Int J Mol Med</i>	33(5)	1064-1074	2014
Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Irie R, Setoguchi T, Komiyama S, Natsugoe S, Kosai K	Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny.	<i>J Trans Med</i>	12		2014
Nakamura S, Nagano S, Nagao H, Ishidou Y, Yokouchi M, Abematsu M, Yamamoto T, Komiya S, Setoguchi T	Arsenic trioxide prevents osteosarcoma growth by inhibition of GLI transcription via DNA damage accumulation.	<i>PLoS One.</i>	8(7)	e69466	2013
Imamura K, Maeda S, Kawamura I, Matsuyama K, Shinohara N, Yahiryo Y, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S.	Human Immunodeficiency Virus Type 1 Enhancer-binding Protein 3 Is Essential for the Expression of Asparagine-linked Glycosylation 2 in the Regulation of Osteoblast and Chondrocyte Differentiation.	<i>J Biol Chem.</i>	289(14)	9865-79	2014

Kakoi H, Maeda S, Shinohara N, Matsuyama K, Imai M, Yamamura K, Kawamura I, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, <u>Komiya S</u>	Bone Morphogenic Protein (BMP) Signaling Up-regulates Neutral Sphingomyelinase 2 to Suppress Chondrocyte Maturation via the Akt Protein Signaling Pathway as a Negative Feedback Mechanism.	<i>J Biol Chem.</i>	289(12)	8135-50	2014
Natsugoe S, Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Nakajima A, Matsumoto M, Okumura H, Kijima Y, Sakoda M, Mataka Y, Uchikado Y, Mori S, Maemura K, Ishigami S	Lymph node micrometastasis in gastrointestinal tract cancer--a clinical aspect.	<i>Int J Clin Oncol.</i>	18(5)	752-61	2013
Uenosono Y, Arigami T, Kozono T, Yanagita S, Hagihara T, Haraguchi N, Matsushita D, Hirata M, Arima H, Funasako Y, Kijima Y, Nakajima A, Okumura H, Ishigami S, Hokita S, Ueno S, <u>Natsugoe S</u>	Clinical significance of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer.	<i>Cancer</i>	119(22)	3984-91	2013
Irie-Maezono R, and Tsuyama S	Immunohistochemical analysis of the acid secretion potency in gastric parietal cells.	Open journal of <i>Cell biology</i>	2	179-185	2013
Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Miyazaki T, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaka A, Saeki T, Inoue S	Association of positive EBAG9 immunoreactivity with unfavorable prognosis in breast cancer patients treated with tamoxifen.	<i>Clin Breast Cancer.</i>	13(6)	465-70	2013
Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S	FOXP1 and estrogen signaling in breast cancer.	<i>Vitam Horm.</i>	93	203-12	2013