

結核集団感染事例における分子疫学的解析法としての
Variable Numbers of Tandem Repeats 法の検討

向川 純, 三宅 啓文, 柳川 義勢, 矢野 一好

**Usefulness of Variable Numbers of Tandem Repeats method as a Molecular
Epidemiological Tool for Outbreak of *Mycobacterium tuberculosis***

Jun MUKAIGAWA, Hirofumi MIYAKE, Yoshitoki YANAGAWA and Kazuyoshi YANO

結核集団感染事例における分子疫学的解析法としての Variable Numbers of Tandem Repeats 法の検討

向川 純*, 三宅 啓文*, 柳川 義勢*, 矢野 一好**

Usefulness of Variable Numbers of Tandem Repeats method as a Molecular Epidemiological Tool for Outbreak of *Mycobacterium tuberculosis*

Jun MUKAIGAWA*, Hirofumi MIYAKE*, Yoshitoki YANAGAWA* and Kazuyoshi YANO**

Keywords : 結核集団感染 outbreak of *Mycobacterium tuberculosis*, IS6110-RFLP 法 IS6110-restriction fragment length polymorphism method, VNTR 法 variable numbers of tandem repeats method

はじめに

結核集団感染事例の感染経路などの解明のため、現在、結核菌特異的な挿入配列である IS6110 を用いた restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法が広く用いられている。しかし、RFLP 法では μg 単位の結核菌 DNA を必要とするため、結果がでるまで一ヶ月以上を要することもあり、迅速な解明が困難になっている。我々は、PCR 法を用いた迅速な結核菌型別法として、arbitrarily primed PCR (AP-PCR) 法¹⁾、variable numbers of tandem repeats (VNTR) 法²⁾を報告してきた。そのうちデータベース化が容易で、手技的に簡単な VNTR 法について、さらに多くの多重反復配列領域について菌株間での分解能などを検討した結果を基に、実際の集団感染事例より分離された菌株の解析結果を RFLP 法と比較検討したので報告する

実験方法

1. 材料

平成 12 年度より 18 年度の 7 年間に、都内で発生した結核集団感染を疑われる事例より分離された結核菌 101 株を用いた。

2. DNA の抽出

DNA 抽出は、既報¹⁾の通りに行った。すなわち、結核菌を小川培地より回収し、80°C で 20 分間加熱殺菌後、プロテナーゼ K・SDS・フェノール・クロロホルム法で DNA を抽出した。

3. RFLP 分析

RFLP 法は、高橋ら³⁾の方法に従い、1.5 μg の DNA を制限酵素 *Pvu*II で切断後、0.8% アガロースゲル電気泳動で分離し、サザンブロット法でメンブレンに転写・固定後、ピ

オチン化 IS6110 プローブとハイブリダイゼーションを行い、アビジン化アルカリフォスファターゼとルミノフォス 530 を反応させ、CCD カメラで映像を撮影し、バンドの検出を行った。

4. VNTR 法

各菌株のゲノム遺伝子を鋳型に、多重反復配列領域のうち、MIRU の 12 領域 (2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40)⁴⁾、ETR の 4 領域 (A, B, C, F)⁵⁾、QUB の 9 領域 (11a, 11b, 18, 26, 1451, 1895, 3232, 3336, 4156)⁶⁾、Mtub の 9 領域 (1, 4, 16, 21, 24, 29, 30, 38, 39)⁷⁾、そして VNTR2372, VNTR3820, VNTR4120⁸⁾ の計 37 領域について、それぞれのプライマーと *Taq* DNA polymerase を用いて PCR 法により領域を増幅し、PCR 産物の DNA サイズから、反復数を測定した。各領域の多様性については、Hunter Gaston diversity index (HGDI 値)⁹⁾ で表記した。

5. 北京型、非北京型結核菌の分別

Warren¹⁰⁾らの方法に従って、北京型結核菌の遺伝子をプライマーセット 1 (5'-TTC AAC CAT CGC CGC CTC TAC-3'、と 5'-CAC CCT CTA CTC TGC GCT TTG-3')、非北京型結核菌の遺伝子をプライマーセット 4 (5'-GGT GCG AGA TTG AGG TTC CC-3'、と 5'-TCT ACC TGC AGT CGC TTG TGC-3') を用いて PCR 法で検出した。

結果及び考察

1. 都内で分離された結核菌の多重反復配列領域の多様性
供試した 101 株のうち RFLP 法でパターン異なる 73 株について、多重反復配列 37 領域の反復数を調査した。表 1 に各領域での反復数の分布を示した。各領域により、菌株間で反復数の多様性に差が認められた。MIRU2, 20, 24,

* 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター微生物部

27, ETR- C, Mtub29 では、領域の多様性を示す HGDI 値が 0.1 以下であり、菌株間の多様性が極めて低い領域であることが判明した。一方、VNTR4120, QUB3232, VNTR3820,

QUB26 等では、HGDI 値が 0.8 以上を示し、菌株間の多様性がきわめて高い領域であることが判明した。これらをまとめて HGDI 値の低い領域、高い領域を図 1 に示した。

表 1. VNTR 法による各領域の反復数別菌株数

反復数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	HGDI値
MIRU2	1	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03
4	1	66	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.18
10	7	4	43	12	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.62
16	6	7	50	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5
20	1	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03
23	2	0	0	1	58	6	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.36
24	72	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03
26	6	0	1	6	3	3	53	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.46
27	0	0	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	2	12	9	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.49
39	4	12	53	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.43
40	4	11	55	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.41
ETR-A	0	3	12	56	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.39
B	4	69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.11
C	0	0	2	70	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08
F	2	15	53	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.43
QUB11a	0	0	5	1	1	5	1	3	39	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.61
11b	0	9	6	3	10	9	30	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.77
18	1	1	0	0	8	1	5	13	8	34	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.74
26	0	14	0	5	1	5	11	25	8	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.81
1451	0	65	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2
1895	2	16	13	40	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.62
3232	0	0	0	1	6	2	2	0	2	8	5	10	10	6	3	10	2	3	1	0	0	1	0	1	0	0.92
3336	0	0	0	3	2	1	40	6	3	9	0	1	4	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.68
4156	0	1	17	21	33	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.67
Mtub1	0	0	0	0	0	0	0	0	65	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.19
4	1	3	20	27	20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.72
16	9	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.27
21	2	5	9	43	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.62
24	6	25	31	5	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.69
29	0	1	1	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05
30	1	16	0	54	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.41
38	55	12	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.41
39	0	2	2	62	0	4	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.26
VNTR2372	3	6	52	11	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.47
VNTR3820	0	0	1	0	6	0	4	3	4	5	2	16	0	17	0	4	4	2	3	0	0	0	1	0	1	0.88
VNTR4120	0	4	4	9	6	1	1	8	11	9	3	8	2	2	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0.92

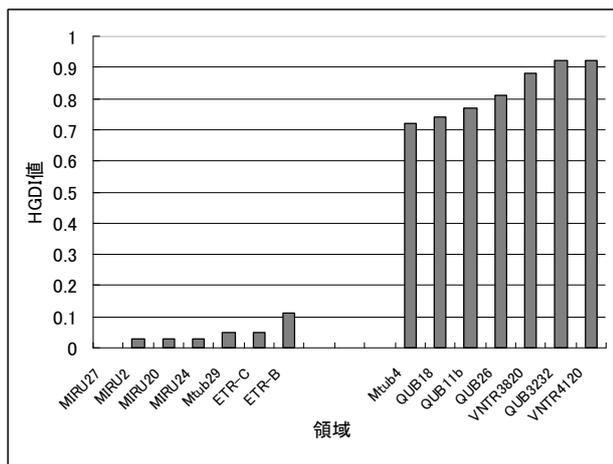


図 1. HGDI 値の低い領域と高い領域

2. 都内で分離された結核菌株の北京型並びに非北京型の分布と各領域の菌株の多様性

都内で分離された菌株を Warren¹⁰⁾らの方法により、

北京型と非北京型に分類した。全菌株の 77%が北京型、残りの 23%が非北京型であり、従来の報告¹¹⁾と一致した。北京型と非北京型で、それぞれの VNTR 法各領域の多様性を検討し、図 2, 図 3 に示した。MIRU, ETR の計 16 領域は、北京型では MIRU10, 16, ETR-F を除き、いずれもきわめて低い HGDI 値を示したが、非北京型では、MIRU10, 16, 23, 26, 39, 40, ETR-A, F は比較的高い HGDI 値を示した。また QUB, Mtub その他の 21 領域では、北京型では QUB1451, Mtub1, 16, 38, 39 の HGDI 値はきわめて低かったが、非北京型では比較的高かった。このように北京型と非北京型では、同程度の多様性を持つ領域 (QUB11b, 18, 26, 1895, 3232, 4156, Mtub4, 24, VNTR3820, 4120 等)がある一方、多様性の著しく異なる領域もあることが判明した。集団感染事例の解明には、菌株をまず北京型、非北京型に分け、それぞれの型で多様性が極端に低い領域を除いた 10~15 領域を選択し、各領域の反復数を比較することで、解析することが可能であると考えられる。

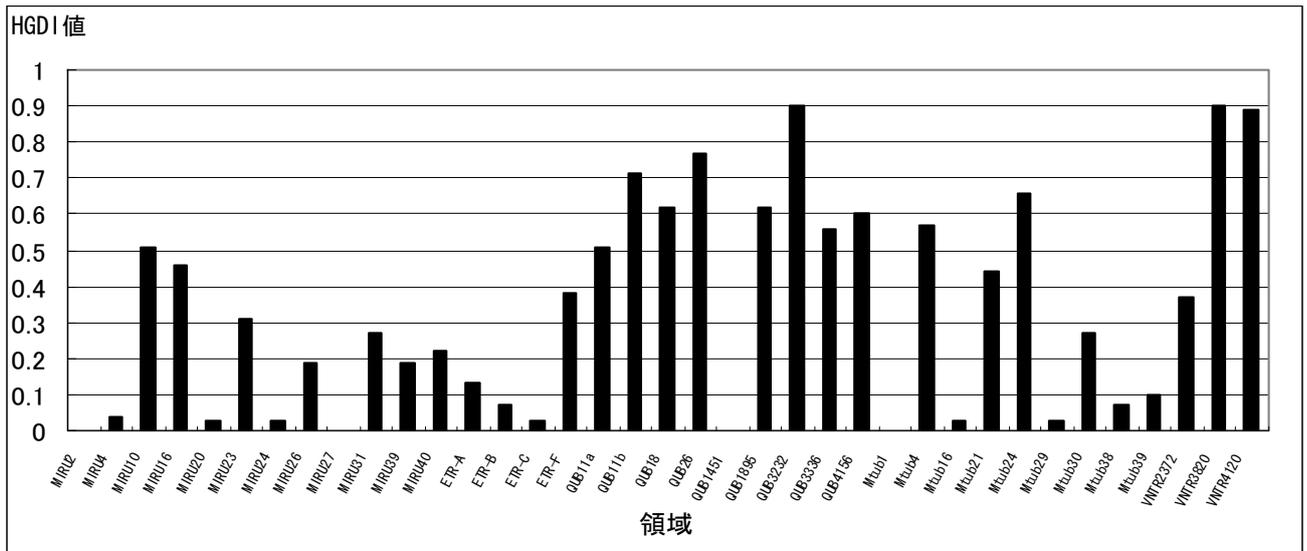


図2. 北京型結核菌株における各領域のHGDI値

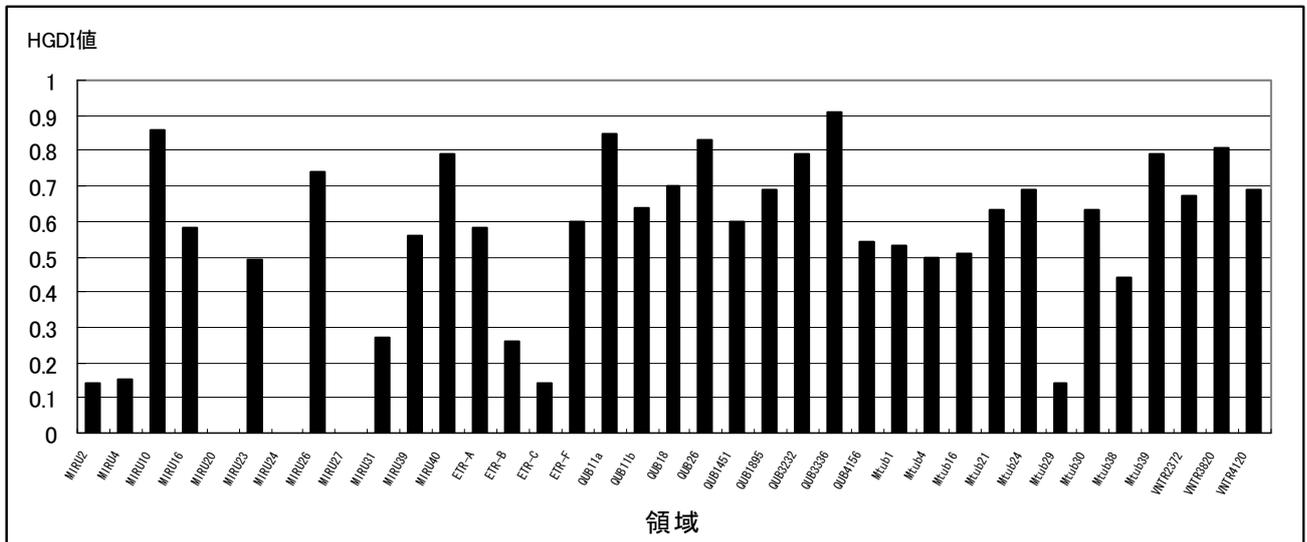


図3. 非北京型結核菌株における各領域のHGDI値

3. 短期間に発生した結核集団感染事例におけるVNTR法による遺伝子解析

平成17年に、都内の学校で、講師が結核を発症し、1年以内に生徒、同僚講師、父兄に多数の患者が発生した事例(A)があった。検査した菌株は図4に示すようにすべてRFLP法で同一パターンであり、表2に示すようにVNTR法でも調査した36領域すべてで同一アレルプロファイルを示した。これらの株は北京型であった。この事例のように、初発患者から短期間に直接的に伝播感染・発症した場合は、VNTR法での結果は同一であることがわかった。

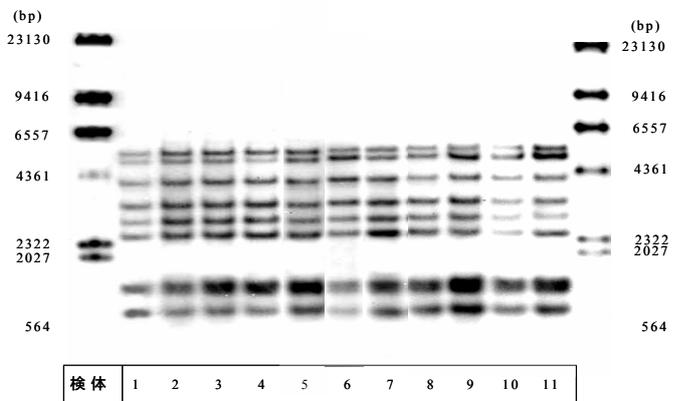


図4. 事例AのRFLP法による型別検査結果

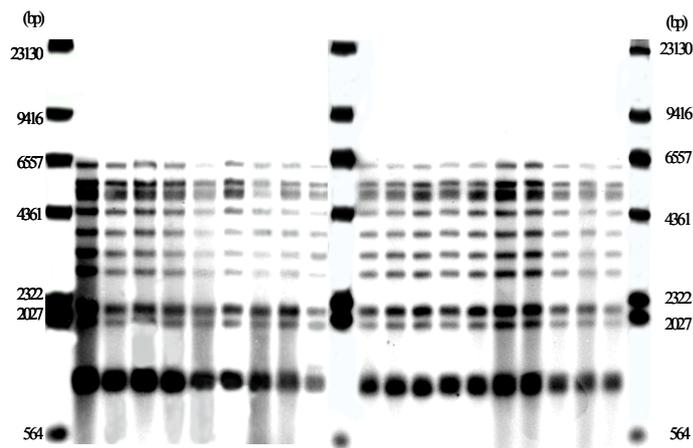
表2. 事例AのVNTR法による型別検査結果

事例	A(17年)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
検本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
MFL2	2*	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
16	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
23	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
27	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
31	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
40	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ETR-A	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
F	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
QUB11b	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
18	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
26	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
1451	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
1895	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3232	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
3336	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
4156	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Mtb01	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
4	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
16	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
21	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
24	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
29	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
30	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
38	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
39	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
VNTR2372	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3820	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
4120	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

※:反復数

4. 長期間に広い地域に発生した結核感染事例におけるVNTR法による遺伝子解析

この5年間に、RFLP法で同一パターンを示す株の分離された感染事例が8事例(B~I)あった。これらの事例は、平成12年から13年、16年、17年にかけて、都内ならびに神奈川県北部で発生したもので、患者は、病院の職員、集合住宅の住居者、病院の患者、遊戯店の常連客、会社社員、24時間営業の飲食店の店員と客、学校の生徒とその関係者とさまざまで、接触関係は不明であった。図5は、そのRFLP法による型別検査結果で、8事例、19株でRFLP法のパターンはすべて一致し、表3に示すように、VNTR法でもほとんどの領域が一致した。一方、各領域で異なる成績を示した菌株が認められた。ETR-Cが異なる株が3株(事例H, 神奈川関連株), QUB1895が1株(事例D), QUB3232が1株(事例B), Mtb21が1株(事例G), VNTR3820が1株(事例G), VNTR4120が1株(事例F)であった。G以外の事例では事例ごとに分離株のアリルプロファイルは一致し、それぞれの事例内における感染と考えられた。一方、24時間営業の飲食店事例で発生したGでは、3株でそれぞれ異なる領域があり、感染経路の解明には今後のさらなる検討が必要である。



検本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
事例	B(12年)			C(12年)			D(13年)		E(16年)		F(17年)		G(17年)			H(16年)			I(17年)	
場所	病院			集合住宅			病院		遊戯店		会社		飲食店			学校			学校	

図5. 事例B~IのRFLP法による型別検査結果

変異のあった領域のうち、ETR-Cは多様性が低く、表1に示したように、我々がこれまで解析した株で、ほとんどが反復数4であり、この領域の相違は、遺伝学的に大きな変異であると示唆され、RFLPのパターンは同一でも、かなり異なる株であると考えられた。一方、他の領域は、菌株間で多様性が高い領域で、変異しやすい領域と考えられる。特にQUB3232は、同一人物由来で時期が異なると分離された菌株間で18から14へと変異していた。これらのことから、この同一のRFLPパターンを持つ株が、以前から都内、首都圏の各地で感染を繰り返す、その過程でVNTRの領域が部分的に変化してきたことが示唆された。

なおこれらの19株はすべてストレプトマイシン耐性であり、北京型であった。

まとめ

VNTR法で、従来検査対象としてSupply⁴⁾や、Frothingham⁵⁾によって提唱されてきたMIRU, ETRの計16領域は、MIRU10, 16, ETR-Fを除くと、日本で蔓延している北京型遺伝子を持つ結核菌株では、多様性は十分でないことが判明した。また、北京型と非北京型では領域によって、多様性に大きな差があることも判明した。結核集団感染事例で、短期間に感染が拡大した事例ではVNTR法の結果は一致したが、異なる事例で同一RFLPパターンを示した株を、VNTR法でも解析した結果、各事例内の株では同じ反復数を示したが、事例が異なると部分的に反復数の異なる領域があることが判明した。これは、感染が拡大する

3. 事例B~IのVNTR法による型別検査結果

事例 検体	B(12年)			C(12年)		D(13年)	E(16年)	F(17年)	G(17年)			H(16年)			I(17年)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
MRLJ2	2※	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
16	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
23	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
27	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
31	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
40	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ETR-A	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	4	4	4
F	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
QUB11a	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
11b	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
18	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
26	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
1451	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
1895	4	4	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3232	18	14+18	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
3336	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
4156	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mtub01	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
4	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6
16	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
21	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5
24	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
29	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
30	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
38	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
39	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
VNTR2372	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3820	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14+15	14	14	14	14	14	14	14	14
4120	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9

※:反復数

うちに、特定の領域が変化し、その株から新たな感染がおきたことを示している。このように、従来法のRFLP法に加えて、VNTR法を併用することで、集団感染事例の事例内、事例間の関連など、よりきめ細かい分子疫学的情報を保健行政の現場に提供できることが可能となった。現在、他の集団感染事例にもVNTR法を応用し、RFLP法の結果と比較し検討を行っている。

謝辞 北里大学医療衛生学部の栗原未来さんに協力いただいた。ここに感謝の意を表す。

文 献

- 1) 向川 純, 下島優香子, 村田以和夫, 他: 感染症誌, 77 (12), 1040-1048, 2003.
- 2) 向川 純, 柳川義勢, 山田澄夫: 東京健安研七報, 57, 55-58, 2006.

- 3) 高橋光義, 安部千代治: 日細誌, 49 (5), 853-857, 1994.
- 4) Supply, P., Lesjean, S. and Savine, E. et al.: J. Clin. Microbiol., 39, 3563-3571, 2002.
- 5) Frothingham, R. and Meeker-O'Connell, W. A.: Microbiology., 39, 3563-3571, 2002.
- 6) Roring, S., Scott, A., Brittain, D. et al.: J. Clin. Microbiol., 40, 2126-2133, 2002.
- 7) Le Fleche, P., Fabre, M., Denoeud, F. et al.: BMC Microbiology, 2, 1-12, 2002.
- 8) Smittipat, N., Billamas, P., Palittapongarnpim, M. et al.: J. Clin. Microbiol., 43, 5034-5043, 2005.
- 9) Hunter, P. R. and Gaston, M. A.: J. Clin. Microbiol., 26, 2465-2466, 2002.
- 10) Warren, R. M., Victor, T. C., Streicher, E. M. et al.: Am. J. resir. Crit. Care. Med., 169, 610-614, 2004.
- 11) 横山栄二, 岸田一則: 結核, 82 (4), 371, 2007.