

## 福井県内における人および鶏肉由来基質特異性拡張型 $\beta$ ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析

石畝 史<sup>1)†</sup> 永田暁洋<sup>1)</sup> 鈴木里和<sup>2)</sup> 山崎史子<sup>1)</sup>  
望月典郎<sup>1)</sup> 荒川宜親<sup>2)</sup>

- 1) 福井県衛生環境研究センター (〒910-8551 福井市原目町39-4)  
2) 国立感染症研究所細菌第二部 (〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1)

(2009年10月21日受付・2010年3月23日受理)

### 要 約

鶏肉由来16株および患者由来22株の基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的性状を比較した。鶏肉由来株の血清型はO78:H9およびO25:H4などが主であったのに対し、患者由来株ではO1:H6、O25:H4およびO86a:H18などであった。O25:H4型株のCTX-M型は鶏肉由来株ではCTX-M-3、患者由来株ではCTX-M-14およびCTX-M-27であった。いっぽう、海外で広がりつつあるCTX-M-15を産生するO25:H4型クローン株は分離されなかった。Ceftriaxoneの最小発育阻止濃度は、患者由来株に対してよりも鶏肉由来株に対しての方が高値を示した ( $P < 0.01$ )。今回、CTX-M型および薬剤感受性に関して、患者由来株と鶏肉由来株との間に直接的な関連性は見られなかった。——キーワード: *bla*<sub>CTX-M</sub>型, 鶏肉, ESBL, 大腸菌, 散発下痢症患者。

----- 日獣会誌 63, 883~887 (2010)

近年、人および鶏肉から、基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の分離報告が増加している [1, 2]。ESBLとはペニシリン等の狭域の $\beta$ -ラクタム薬に限定した基質特異性を示す $\beta$ -ラクタマーゼ (ペニシナーゼ) のアミノ酸配列の一部が変化し、その基質特異性が、Cefotaxime (CTX) やCeftatidime (CAZ) などの第三世代セファロスポリンに対してまで拡張した酵素のことであり、ESBL産生菌は第三世代セファロスポリンに対し耐性を示す。したがって、これらが市中および院内感染の原因菌となった場合、広域セファロスポリンによる治療に抵抗性を示すことから、臨床現場でその動向が警戒されている。

ESBLにはさまざまな型が存在するが、特にこの数年はCTXや血中半減期間が長い小児科領域などで汎用されているCeftriaxone (CTR) に対しても高い耐性を付与するCTX-M型が主流を占めつつある。CTX-M型はアミノ酸の類似度に基づく系統解析で、少なくとも4つの主要なgroup (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8およびCTX-M-9) に型別される。さらに、CTX-M-1 groupにはCTX-M-1型, CTX-M-3型,

CTX-M-15型などの複数の変種が存在する [3]。諸外国では同一クローンで病原性を有するCTX-M-15型の血清型O25:H4 [1] が、人から高頻度に分離されていることから公衆衛生的に注目されている。

ESBL産生大腸菌の人への感染源の一つとして鶏肉が重要視されているが [4]、わが国では鶏肉に関するESBL産生大腸菌の調査報告例は少なく、その分布は不明な部分が多い。そこで、本研究では福井県内の鶏肉におけるCTX-M型のESBL産生大腸菌の分布状態を明らかにするために、CTX-M型 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子である*bla*<sub>CTX-M</sub>を保有する大腸菌の分離を試みた。また、人および鶏肉分離株における血清学的、分子疫学的性状を比較し関連性について検討した。

### 材 料 お よ び 方 法

**供試鶏肉由来株:** 2007年10月から2009年2月に福井市内で購入した鶏肉43検体 (国内産37検体, 外国産6検体) から分離された大腸菌を用いた。

鶏肉からの大腸菌の分離は、25gの鶏肉を225mlのmEC培地 (日水製薬株) で増菌培養 (42℃, 20時間)

† 連絡責任者: 石畝 史 (福井県衛生環境研究センター)

〒910-8551 福井市原目町39-4 ☎0776-54-5630 FAX 0776-54-7667

E-mail: ishigurofubito@fklab.fukui.fukui.jp

人および鶏肉由来のESBL産生大腸菌

表1 散発下痢症患者から分離された*bla*<sub>CTX-M</sub>陽性大腸菌の性状

血清型	分離年	分離 <sup>1)</sup> 機関	年齢/性別	CTX-M group	CTX-M 型	系統発生群	薬剤感受性 (Kirby-Bauer法)										
							CTX	CPFX	NA	ABPC	TC	Su	ST	SM	GM	FOM	KM
O25:HNM	2008	A	67/F	M-1	M-15	B2	R <sup>3)</sup>	R		R	R	R	R	I <sup>4)</sup>			R
O115:HUT	2006	A	29/M	M-2	M-2	B1	R		R	R	R	R	R			I	R
O15:HUT	2007	A	16/M	M-2	M-2	D	R			R	R	R		R			R
O111:HUT	2008	B	7/M	M-2	M-2	D	R			R	R	R		R			
O1:HNM	2005	A	6/F	M-9	M-14	B2	R			R							
O1:HNM	2008	B	7/F	M-9	NT <sup>2)</sup>	D	R			R							
O25:H4	2005	B	87/F	M-9	M-14	B2	R	R	R	R	R	R	R	R			I
O25:H4	2008	A	68/M	M-9	M-27	B2	R	R	R	R							
O25:H4	2008	A	88/F	M-9	M-27	B2	R	R	R	R	R	R	R				I
O1:H6	2004	B	2/M	M-9	M-14	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
O1:H6	2004	B	5/F	M-9	M-14	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
O1:H6	2004	B	63/F	M-9	M-14	D	R	R	R	R	I	R		R			
O1:H6	2004	A	1/F	M-9	M-27	D	R	R	R	R	R	R	R				R
O1:H6	2004	B	83/M	M-9	M-14	D	R	R	R	R	I					R	
O1:H6	2005	B	62/M	M-9	M-14	D	R	R	R	R						R	
O1:H6	2006	A	84/F	M-9	M-14	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
O1:H6	2008	A	69/F	M-9	M-14	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R
O1:HUT	2006	B	5/M	M-9	M-14	D	R	R	R	R	R						I
O86a:H18	2005	B	—/M	M-9	M-14	D	R		R								
O86a:H18 <sup>5)</sup>	2006	A	85/M	M-9	M-14	D	R	I	R	R	R	R	R	R	R		I
O86a:HNM <sup>5)</sup>	2006	A	85/M	M-9	M-14	D	R	I	R	R	R	R	R	R	R		I
O153:HUT	2006	A	2/M	M-9	M-14	D	R		R	R	R	R	R	R	R		R

1) A: A医療機関, B: B医療機関 2) NT: 検査未実施 3) R: 耐性 4) I: 中間の感受性を示す 5) 同一検体から検出

表2 市販鶏肉から分離された*bla*<sub>CTX-M</sub>陰性大腸菌の性状

血清型	CTX-M group	CTX-M 型	系統発生群	薬剤感受性 (Kirby-Bauer法)													
				CTX	CPFX	NA	ABPC	TC	Su	ST	SM	KM	CP				
O25:H4	M-1	M-3	B2	R <sup>2)</sup>				R	R	R	R	I <sup>3)</sup>					
O8:H21	M-1	NT <sup>1)</sup>	A	R				R	R	R	R						
O78:H9	M-1	NT	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R					
O78:H9	M-1	NT	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R					
O18:HUT	M-2	M-2	B1	R				R		R						R	R
O153:H34	M-2	M-2	D	R				R	R	R			R				
O63:H4	M-9	NT	D	R				R	R	R	R	R					
O78:H9	M-9	M-14	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R					
O78:HUT	M-9	M-14	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R					
O78:HUT	M-9	M-14	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R					
O103:H28	M-9	M-14	B1	R	R	R	R	R	R	R	R	R					
O103:H51	M-9	M-14	B1	R	R			R	R	R	R	R		R			R
O103:HUT	M-9	M-14	B1	R	R	R	R	R	R	R	R	R					R
O114:H4	M-9	NT	D	R				R	R								
O119:H4	M-9	M-14	D	R				R	R	R	R	R					R
O153:H51	M-9	M-14	B1	R				R				I					

1) NT: 検査未実施 2) R: 耐性 3) I: 中間の感受性を示す.

後, DHL培地, Ciprofloxacin (CPFX) 6.4 μg/ml 添加 DHL培地およびCTX 6.4 μg/ml 添加 DHL培地に塗抹し37℃, 20~22時間培養した. 各培地上で大腸菌の性状を示した5~10株の生化学的性状を調べ, 大腸菌と同定された株について, 病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研株) によるOおよびH血清型別を実施した. 国内

産鶏肉23検体から分離され, O血清型が判明し, Kirby-Bauer (KB) 法 [5] による薬剤感受性試験でCTXに中間の感受性または耐性を示した36株および外国産鶏肉1検体から分離された1株, 計37株を詳しい解析に用いた.

供試患者由来株: 1997年から2008年までに福井県内

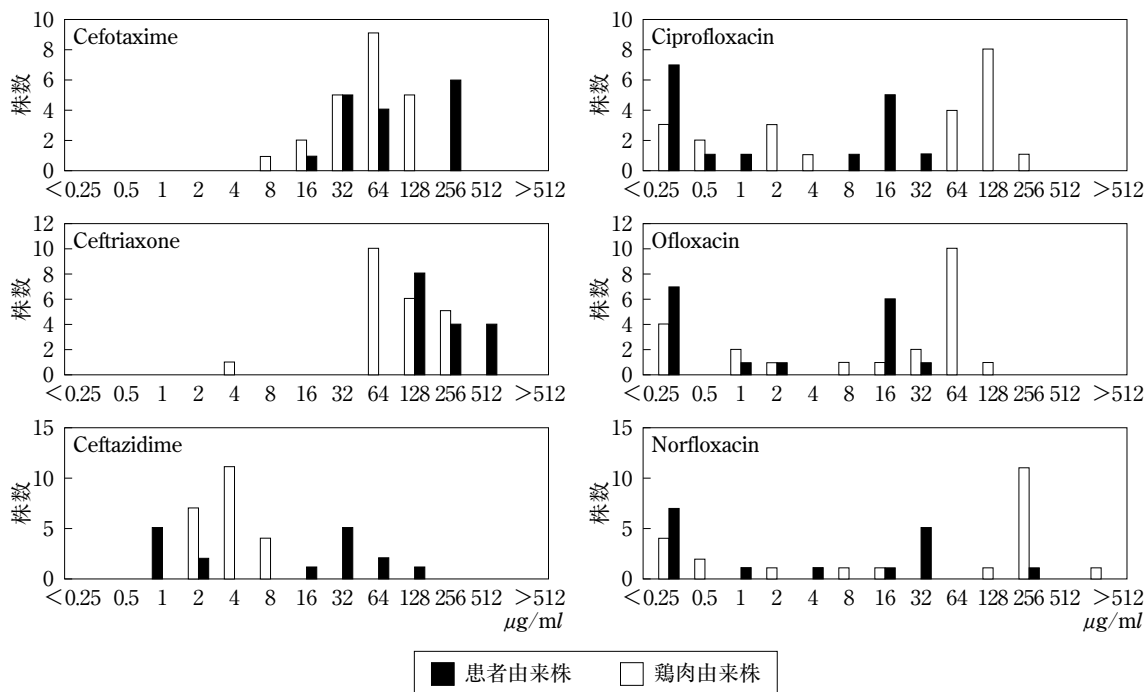


図1 患者および鶏肉由来株におけるβ-ラクタム剤およびフルオロキノロン系薬剤に対する最小発育阻止濃度 (MIC)

で散発下痢症患者から分離され、O血清型が判明した大腸菌のうち、CTXに中間の感受性または耐性を示した25株を用いた。

**薬剤感受性試験：**薬剤感受性試験はCTX, CPF, Ampicillin (ABPC), Tetracyclin (TC), Sulfisoxazole (Su), Sulfamethoxazole/Trimetoprim (ST), Nalidixic acid (NA), Gentamicin (GM), Kanamycin (KM), Streptomycin (SM), Chloramphenicol (CP) および Fosfomycin (FOM) の12種類の薬剤感受性試験用ディスク (BBL) を使用し、KB法により行った。また、CTXに耐性または中間の感受性を示した株に対しては、第三世代セファロsporinであるCTX, CTRX およびCAZ, ならびにFluoroquinolone (FQ) 系薬剤であるCPF, Ofloxacin (OFLX) とNorfloxacin (NFLX) の最小発育阻止濃度 (MIC) を、寒天平板希釈法により測定した [6]。

**CTX-Mの遺伝的型別および系統発生群別：**CTX耐性株が保有する $bla_{CTX-M}$ のPCRによるgroup型別はShibataら [3], さらにCTX-Mのgroupが判定された患者由来21株および鶏肉由来11株の計32株の $bla_{CTX-M}$ 型のシーケンス解析はDutourら [7], 大腸菌の系統発生群の分類はClermontら [8] の方法に準拠した。

**gyrA および parC キノロン耐性決定領域の解析：**患者由来O1:H6の8株, 患者由来O25:H4の3株および鶏肉由来7株について、*gyrA* (DNAジャイレース遺伝子) および*parC* (トポイソメラーゼIV遺伝子) のキノロン耐性決定領域 (QRDR) の塩基配列を解析した [9]。

**有意差の検定：**CTX, CTRX, CAZ, CPF, OFLX

およびNFLXのMIC値の人由来株と鶏肉由来株間の有意差は、Wilcoxonの順位和検定によって調べた。

### 成 績

**$bla_{CTX-M}$ 陽性株の検出状況 (表1, 表2)：**患者由来株では $bla_{CTX-M}$ 陽性株は2004年から確認され、25株中22株 (88%) であり、そのうち2株は同一検体から分離された株であった。鶏肉由来株では、国内産鶏肉12検体由来の16株が $bla_{CTX-M}$ 陽性であった。

**血清型および  $bla_{CTX-M}$  group：**患者由来22株の血清型はO1:H6, O25:H 4およびO86a:H18の3種が13株 (59%) を占めた。CTX-M-9 groupは18株から確認され、それらのCTX-M型は14株がCTX-M-14であった。O25:H4型の3株はCTX-M-14 (1株) およびCTX-M-27 (2株) に型別された。鶏肉由来16株の血清型はO78:H9 およびO25:H4など10種類で、CTX-M-9 groupが10株であった。CTX-M型はCTX-M-14が8株およびCTX-M-2が2株などで、O25:H4型の1株はCTX-M-3産生株であった。系統発生群は患者および鶏肉由来株ともにO25:H4はB2に属していた。

**KB法による薬剤感受性：**患者由来株は平均7.2剤, 鶏肉由来株は6.6剤に耐性を示した。なお、5歳以下の患者5名中4名からCPF耐性株が分離され、それらの株は平均9.3剤に耐性を示した。

**第三世代セファロsporinのMIC値：**試験に用いた3種類の第三世代セファロsporinのMIC値は、いずれも多くの鶏肉由来株に対し高い値を示した (図1)。中で

も鶏肉由来株CTRXのMIC値は患者由来株に比べて高く、有意な差が認められた ( $P < 0.01$ )。

**QRDRのアミノ酸置換とFQ系薬剤のMIC値：**患者由来O1:H6の1株および鶏肉由来7株はGyrAのSer83→LueおよびAsp87→Asn, ParCのSer80→Ileの計3カ所の置換が確認された。これら3カ所の置換に加え、患者由来O1:H6の7株はParCのGlu84→Glyが、患者由来O25:H4の3株ではParCのGlu84→Valがそれぞれ追加され、おのおの4カ所の置換が確認された。3カ所の置換が確認された8株に対するFQ系の3剤のMIC値は、CPFEXでは8-128  $\mu\text{g/ml}$ 、OFLXでは16-32  $\mu\text{g/ml}$  およびNFLXでは16-256  $\mu\text{g/ml}$ であった。4カ所の置換が確認された11株に対するMIC値は、CPFEXでは64-128  $\mu\text{g/ml}$ 、OFLXでは64  $\mu\text{g/ml}$  およびNFLXでは128- > 512  $\mu\text{g/ml}$ と3カ所の置換を示した鶏由来株より有意に高い値を示した(CPFEX :  $P < 0.01$ , OFLX :  $P < 0.01$ , NFLX :  $P < 0.05$ )。

## 考 察

2004年以降、福井県の散発下痢症患者由来大腸菌において、*bla*<sub>CTX-M</sub>陽性株およびFQ系薬剤耐性株が確認されるようになった。本研究では人由来の*bla*<sub>CTX-M</sub>陽性株の割合はO25:H4, O86a:H18およびO1:H6の3種類の血清型が59%を占めた。Suzukiら [10] も、最近の国内の人分離株ではO25:H4およびO86a:H18が60%を占めたと報告しているように、*bla*<sub>CTX-M</sub>陽性株は特定の血清型で多く確認されている。薬剤感受性ではFQ系薬剤のMIC値が高い値を示した株が多かった。特に小児への保険適用が認められていないCPFEX耐性株が小児4名から分離されたことは、これらの株の起源や感染経路を考える上で興味深い知見を与える。

本研究では鶏肉由来の*bla*<sub>CTX-M</sub>陽性株は43検体中12検体 (28%) から分離され、O血清型が判明したのはいずれも国内産で、O78:H9およびO25:H4など多様な血清型が確認された。今回分離されたCTX-M-2産生大腸菌は、すでに国内の牛の糞便と枝肉 [11]、英国におけるブラジル産鶏肉 [2] から分離されている。また、今回多数分離されたCTX-M-14産生大腸菌は、中国の鶏および豚 [12] などからも分離されている。本研究では患者および鶏肉由来株において、血清型の種類および系統発生群の検出頻度に共通性はみられなかった。人、鶏肉の双方から分離された血清型O25:H4はCTX-M型およびCPFEXの感受性に相違がみられたことから、それらの直接的な関連性は乏しいことが示唆された。しかし、今回は比較した株数が少なかったことから、今後、さらに多くの株について検討し、鶏肉がESBL産生大腸菌の人への感染源になるかを明らかにする必要があると思われる。いっぽう、今回、特に高齢者から分離された

ESBL産生大腸菌は、従来から指摘されているように抗生物質の投与により腸管内の大腸菌が薬剤耐性能力を獲得した可能性もあり、それを裏付ける成績も報告 [13] されている。

薬剤感受性ではいずれの株も平均7剤前後の多剤耐性を示し、CTRXのMIC値は患者由来株に比べ鶏肉由来株で有意に高い値を示した。いっぽう、FQ系薬剤のMIC値は、3剤ともに患者由来株で有意に高い値を示した。ParCのQRDR領域におけるGlu84→Valの置換は、下痢症および海外の膀胱炎患者由来のO25:H4で確認 [14] されているのに対し、今回もO25:H4以外のFQ耐性株では確認されなかったが、O25:H4型株特有の置換かどうかについては、さらなる調査が必要である。

諸外国のESBL産生大腸菌の中でクローンとして注目されているCTX-M-15型、系統発生群がB2、およびCPFEX耐性を示すO25:H4型株 [1] は、本研究では患者および鶏肉のいずれからも分離されなかったが、CTX-M-14やCTX-M-3型ESBLを産生するO25:H4型株が両者から分離されていることから、今後の動向に注意すべきであると思われる。

本研究では、患者および鶏肉由来ESBL産生大腸菌株間に明確な関連性、すなわち鶏肉が人への感染源になったという直接的な証拠は認められなかった。しかし、市販鶏肉からCPFEX耐性の*bla*<sub>CTX-M</sub>陽性大腸菌株が多数分離されたことは、*bla*<sub>CTX-M</sub>がプラスミド媒介性に他の病原細菌にも伝達される [15] 可能性を考えると、獣医公衆衛生的にも注目すべき結果であると思われる。今後、人および食肉におけるCTX-M型ESBL産生株の調査や監視を強化することが重要と思われる。

分離菌株の薬剤感受性の確認試験およびシーケンス解析は、平成21年度厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)「新型薬剤耐性等に関する研究 (H21-新興-一般-008)」により実施された。

## 引 用 文 献

- [1] Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR : Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25 : H4-ST131 producing CTX-M-15, J Antimicrob Chemother, 61, 273-281 (2008)
- [2] Warren RE, Ensor VM, O'Neill P, Butler V, Taylor J, Nye K, Harvey M, Livermore DM, Woodford N, Hawkey PM : Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK, J Antimicrob Chemother, 61, 504-508 (2008)
- [3] Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Ishikura S, Kato H, Ozawa Y, Shibayama K, Kai K, Konda T, Arakawa Y : PCR classification of CTX-M-type  $\beta$ -lactamase genes

- identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 791-795 (2006)
- [4] Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, Lopez-Cerero L, Narvarro MD, Adams-Haduch JM, Qureshi ZA, Sidjabat HE, Rodriguez-Bano J : Extended-spectrum and CMY-type  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain, *Clin Microbiol Infect*, 16, 33-38 (2009)
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 9th ed. Approved Standards M2-A9, CLSI, Wayne, PA. (2006)
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 9th ed. Approved Standards M7-Ac7. CLSI, Wayne, PA. (2006)
- [7] Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer M, Chanal C, sirot D, Sirot J : CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14  $\beta$ -lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France, *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 534-537 (2002)
- [8] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E : Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group, *Appl Environ Microbiol*, 66, 4555-4558 (2000)
- [9] Giraud E, Brisabois A, Martel JL, Chaslis-Dancha E : Comparative studies of mutations in animal isolated and experimental in vitro- and in vivo-selected mutations of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field, *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 2131-2137 (1999)
- [10] Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y : Rapid change in the prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread, *J Aniticrob Chemother*, 63, 72-79 (2009)
- [11] Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y : *Escherichia coli* producing CTX-M-2  $\beta$ -lactamase in cattle, Japan, *Emerg Infect Dis*, 10, 69-75 (2004)
- [12] Liu JH, Wei SY, Ma JY, Zeng ZL, Lu DH, Yang GX, Chen ZL : Detection and characterization of CTX-M and CMY-2  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong Province of China, *Int J Antimicrob Agents*, 29, 576-581 (2007)
- [13] Tian SF, Chen BY, Chu YZ, Wang S : prevalence of rectal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among elderly people in community settings in China, *Can J Microbiol*, 54, 781-785 (2008)
- [14] Cagnacci S, Gualco L, Debbia E, Schito GC, Marchese A : European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:K52 : H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis, *J Clin Microbiol*, 46, 2605-2612 (2008)
- [15] Bonnet R : Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases the CTX-M enzymes, *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 1-14 (2004)

Molecular Epidemiological Analyses of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Sporadic Diarrheal Human Cases and Chicken Meats in Fukui Prefecture

Fubito ISHIGURO<sup>\*†</sup>, Akihiro NAGATA, Satowa SUZUKI, Fumiko YAMAZAKI, Michio MOCHIZUKI and Yoshichika ARAKAWA

*\* Bacteriology Division, Fukui Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, 39-4 Harame-cho Fukui, 910-8551, Japan*

SUMMARY

We investigated the molecular-epidemiological characteristics of 16 chicken and 22 human isolates of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. Serotypes of O78:H9 and O25:H4 were mainly found in the chicken isolates. On the other hand, serovars of O1:H6, O25:H4 and O86a:H18 were identified in the human isolates. For serovars O25:H4, the CTX-M type of chicken isolate was CTX-M-3, and those of human isolates were CTX-M-14 and CTX-M-27. No CTX-M-15-producing *E. coli* O25:H4 epidemic strain emerging outside of Japan was isolated. The minimal inhibitory concentrations of Ceftriaxone for chicken isolates were higher than those for human isolates ( $P < 0.01$ ). No clear direct relationship between human and chicken isolates regarding the CTX-M type and antimicrobial susceptibility was observed in the present study.

—Key words : *bla*<sub>CTX-M</sub> type, chicken meat, ESBL, *Escherichia coli*, sporadic diarrheal cases.

† Correspondence to : Fubito ISHIGURO (Bacteriology Division, Fukui Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

39-4 Harame-cho Fukui, 910-8551, Japan

TEL 0776-54-5630 FAX 0776-54-7667 E-mail : ishigurofubito@fklab.fukui.fukui.jp

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 63, 883 ~ 887 (2010)