

15 県内養豚場における *Cryptosporidium* の分子生物学的 手法を用いた疫学調査

中央家畜保健衛生所

○油井 武

I はじめに

クリプトスポリジウム(*Cryptosporidium*)属の原虫はアピコンプレックス門の寄生虫で、ヒトを含む多くの哺乳動物に感染する病原体として知られている³⁾。クリプトスポリジウム属は、極めて堅固なオーシストを持つことから、水や食物などの汚染物を摂取することによって間接的に感染することが知られている¹⁸⁾。

豚のクリプトスポリジウム感染症に関する近年の分子疫学的研究によれば、いくつかの国々で感染の報告がある^{2, 8)}。これまでに、豚は、*Cryptosporidium* sp. Eire w65.5、*Cryptosporidium* rat、および *C. suis*-like の各遺伝子型のほか、*C. parvum*、*C. hominis*、*C. suis*、*C. felis*、*C. meleagridis*、*C. muris*、*C. scrofarum*(*C. parvum* pig genotype II と呼ばれた)⁷⁾、*C. tyzzeri*、など、いくつかの種に対して感染することが報告されている^{9, 29)}。これらの種のうち、豚に最も特異的に見られるのは *C. suis* および *C. scrofarum* である^{7, 17)}。豚のクリプトスポリジウム感染症による下痢の発症は、オーシストの摂取量の程度に依存するとの研究報告もあるが¹⁴⁾、病原性については現在のところ未解明である。

日本の豚のクリプトスポリジウム感染の報告事例は他国と比較して少なく、過去には我々の報告を含む3報のみである。1報告目は、クリプトスポリジウムのオーシストが検出されず⁶⁾、2報告目は、形態学的同定により *C. parvum* の感染が確認されただけで、感染率は33.2%であった³⁾。近年、我々は制限断片長多型(RFLP)解析により、養豚場の豚から検出した株を *C. suis* または *C. scrofarum* と同定し²⁷⁾、さらに感染率が23.7%であると報告した²⁸⁾。これらの結果は、豚のクリプトスポリジウム感染が日本でも蔓延している可能性があることを示唆しているにも関わらず、日本の豚を対象とした分子疫学的調査はこれまでに全く実施されていない。

本報告では、養豚場における *Cryptosporidium* spp. の分布状況を明らかにするための調査を実施し、豚のクリプトスポリジウム感染症の病原性の他、年齢と個体数の関連について遺伝子学的に検討した。

II 材料および方法

- 1 材料：2010年1月から2011年1月の間に、県内の8養豚場で糞便を採取し、糞便

の種類を「正常」、「軟便」、「水様便」の3つに分類した。月齢ごとに、1ヵ月未満の哺乳豚55頭分、1~2ヵ月齢豚65頭分、2~4ヵ月齢豚105頭分、4~6ヵ月齢豚67頭分、雌繁殖豚36頭分、雄繁殖豚16頭分の計344頭分を無作為に採材した。

- 2 方法：エーテル沈殿法による糞便1g当たりのオーシストのOPG算出^{15, 22)}：糞便1gを5 mL PBSに懸濁し、糞便懸濁液を二重ガーゼでろ過して15 mL 遠心分離管に入れ、酢酸エチル2 mL を加えて30秒間振盪させた。1,700×g で10分間遠心後、上澄から順に酢酸エチル、PBS、および沈殿物の3層に分離させた。上2層をデカントし、沈殿層をPBSで100~200 μLに希釈した。この懸濁液を7.5 μLを12穴のスライドガラスに合計10穴まで滴下後、乾燥させ、アセトンで固定した。免疫蛍光抗体染色後にスライドを蛍光顕微鏡で観察した。400倍視野でスライド上のオーシストをカウントし、OPGを算出した。不等分散のStudentのt検定により統計的有意水準を決定した。

遺伝子抽出：OPG10,000を超える糞便材料の遺伝子を抽出した。QIAamp DNA Stool Mini Kit(ドイツQIAGEN社)を使用し、糞便約200 mgからゲノムDNAを抽出した。精製したDNAは-20℃で保存した。

18S rRNA遺伝子の遺伝子解析：*Cryptosporidium* spp. を同定するために、クリプトスポリジウム特異的プライマーを使って18SリボソームRNA(18S RNA)遺伝子(約850bp)を増幅した²⁵⁾。1×PCR緩衝液、2 mM MgCl₂、dNTP各200 μM、プライマー各0.5 μM、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version(宝酒造)0.625 U、テンプレート25 μLについてnested PCRにより遺伝子を増幅した。陽性対照に*C. parvum*、HNJ-1株¹⁾を用いた。QIAquick Gel Extraction(ドイツQIAGEN社)を使ってPCR生成物を精製し、ABI 3130自動シーケンサー(米国Applied Biosystems社)で両方向の配列分析を実施した。得られた遺伝子配列は、ClustalWを日本DNAデータバンク(DDBJ, <http://clustalw.ddbj.njg.ac.jp/top-j.html>)の初期設定パラメータ値を使用して、遺伝子型のヌクレオチド配列をアラインメントした。DDBJのFASTAプログラムを使い、得られた当該部分の遺伝子配列のホモロジー検索を行った。さらに、*C. suis* と *C. scrofarum*の混合感染を検証するために、18S rRNA遺伝子の種特異的プライマーによるnested PCRを実施した⁵⁾。

アクチン遺伝子の系統発生解析：18S rRNA遺伝子の配列解析により種が同定されたクリプトスポリジウム分離株について、アクチン遺伝子座(約1,100 bp)の遺伝子配列解析を実施した²⁰⁾。増幅された生成物の遺伝子配列が得られた後、前述と同様にアラインメントとホモロジー検索を実施した。1,000のブートストラップ標本を使い、Tamura-Neiの遺伝距離から産出した進化距離をもとに近隣接続アルゴリズムにより系統樹を作成した。作成された系統樹はMEGA version 5ソフトウェアにより描画した²¹⁾。

III 成績

Cryptosporidium spp. のオーシストは検査した全養豚場で検出された(表1)。感染率は全材料の平均で32.6%、養豚場により4.9%から58.1%の範囲で検出された。月齢別

の感染率は、離乳後の豚で最も高く、年齢に伴って低下し、繁殖豚で最も低く検出された。OPGは感染率と同様のパターンを示し、離乳後の豚から最大数のOPGが検出され、年齢に依存して低下し、繁殖豚で最も少なく検出された。糞便中に含まれたクリプトスポリジウムのオーシストと糞便性状の関係を表2に示した。下痢を発症した豚ではOPGが比較的多く検出されたが、OPGと糞便性状の間に統計学的有意差は認められなかった。

表1 8農場のクリプトスポリジウムの検出と遺伝子解析

農場No.	哺乳豚	1-2カ月豚	2-4カ月豚	4-6カ月豚	繁殖豚	合計	遺伝子検出	分離株の同定
1	3/5	0/0	10/11	2/5	3/10	18/31 (58.1%)	3 (11)	<i>C. scrofarum</i> 3株
2	3/5	3/6	10/12	6/15	2/11	24/49 (49.0%)	7 (14)	<i>C. suis</i> 3株、 <i>C. scrofarum</i> 3株 Mix 1株
3	5/14	14/17	9/10	1/11	0/8	29/60 (48.3%)	12 (15)	<i>C. suis</i> 6株、 <i>C. scrofarum</i> 4株 Mix 2株
4	2/13	8/11	3/7	0/10	1/3	14/44 (31.8%)	5 (7)	<i>C. suis</i> 1株、 <i>C. scrofarum</i> 2株 Mix 2株
5	0/4	1/6	5/10	4/9	0/5	10/34 (29.4%)	4 (7)	<i>C. suis</i> 2株、 <i>C. scrofarum</i> 1株 Mix 1株
6	2/13	5/25	2/5	—	1/12	10/55 (18.2%)	4 (6)	<i>C. suis</i> 1株、 <i>C. scrofarum</i> 1株 Mix 2株
7	0/0	0/0	5/30	0/0	0/0	5/30 (16.7%)	0 (0)	
8	0/1	-	0/20	2/17	0/3	2/41 (4.9%)	2 (2)	<i>C. scrofarum</i> 2株
合計	15/55 (27.3%)	31/65 (47.7%)	44/105 (41.9%)	15/67 (22.4%)	7/52 (13.5%)	112/344 (32.6%)	37 (62)	<i>C. suis</i> 13株、 <i>C. scrofarum</i> 16株 Mix 8株
OPG	5.00	5.02*	4.51	3.91	3.89			

OPG: 対数値

Mix: *C. suis*と*C. scrofarum*検出

*: 2-4カ月齢、4-6カ月齢 p<0.01

表2 糞便性状とクリプトスポリジウムの感染

区分	検体数	<i>Cryptosporidium</i> 検出	<i>Cryptosporidium</i> 陽性検体例の年齢別の分類	
			月 齢	OPG (例数)
正常便	221	56 (+) 165(+)	>1カ月齢豚	4.90 (4)
			1-2カ月齢豚	4.94 (10)
			2-4カ月齢豚	4.56 (28)
			4-6カ月齢豚	3.89 (8)
			繁殖豚	3.92 (6)
軟便	89	40(+) 49(-)	>1カ月齢豚	4.21 (6)
			1-2カ月齢豚	5.00 (14)
			2-4カ月齢豚	4.22 (12)
			4-6カ月齢豚	3.93 (7)
			繁殖豚	3.70 (1)
水様便	34	16(+) 18(-)	>1カ月齢豚	5.33 (5)
			1-2カ月齢豚	5.24 (7)
			2-4カ月齢豚	4.07 (4)
合計	344	112(+) 232(-)		

OPG: 例数の平均を対数値

PCRおよびシーケンスによる分離株の同定: 分離株の*Cryptosporidium* spp. を同定するために、18S rRNA遺伝子のシーケンスによる遺伝子解析を実施した。その結果、解析試料62検体のうち37検体はPCRで増幅された(表1)。37検体とも*C. suis* と*C.*

*scrofarum*のみ同定されたが、*C. parvum* を含むその他の種は同定されなかった。また、*C. suis*

表3 月齢別のクリプトスポリジウム種の感染

月齢別	総株数	<i>C. suis</i>	Mix (<i>C. suis</i> + <i>C. scrofarum</i>)	<i>C. scrofarum</i>
>1カ月齢豚	3	2	0	1
1-2カ月齢豚	11	6	4	1
2-4カ月齢豚	15	5	3	7
4-6カ月齢豚	7	0	0	7
繁殖豚	1	0	1	0
合計	37	13	8	16

と *C. scrofarum* の混合感染が8検体に認められた。全検体で検出された *C. suis* および *C. scrofarum* の部分配列は、報告された *C. suis* の KC481228、*C. scrofarum* の KC481229 株と遺伝子配列が一致した。これら2種の月齢別感染率を表3に示した。*C. suis* は哺乳豚と1~2カ月齢豚で多数検出された。混合感染を含む *C. scrofarum* の感染は、2カ月齢豚で増加し、4~6カ月齢豚では同定された全ての分離株が *C. scrofarum* であった。

アクチン遺伝子のシーケンス系統発生解析：18S rRNA 遺伝子のシーケンスにより種が同定された標本を用いて、アクチン遺伝子の解析を試みた。その結果、10検体で増幅された。遺伝子が増幅された株は、農場No. 2の分離株3例、農場No. 3で3例、農場No. 4は *C. suis* の1例であった。農場No. 2の2例と農場No. 3の1例は *C. scrofarum* であった。シーケンス後に、農場No. 3および農場No. 4の *C. suis* の全ての分離株は過去のデータ (accession No. F012373) と遺伝子配列が一致したが、農場No. 2の分離株はいずれも、accession No. EF012373

と1 bp ずつ異なった。さらに、農場No. 2および農場No. 3から採取された *C. scrofarum* の全分離株は、過去のデータ (accession No. EF012374) と2カ所塩基配列が異なった。系統発生樹を図1に示した。本報告で確認された *C. suis* (accession No. AB852579)

および *C. scrofarum* (accession No. AB852580) の2種の変異型は、それぞれ

既知の *C. suis* および *C. scrofarum* に由来と同じクレードを構成した(図1)。

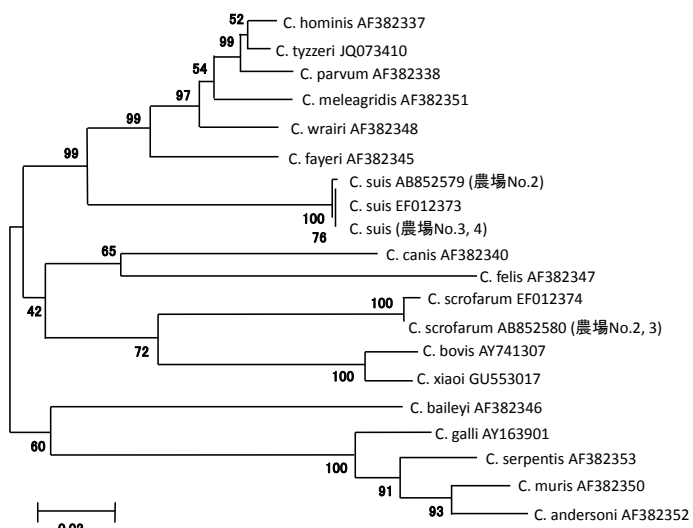


図1 *C. suis* と *C. scrofarum* およびその他のクリプトスポリジウム種の系統樹
同定された *C. suis* 種後の番号は受入番号。目盛りはヌクレオチド1個あたりの塩基置換数、枝上の数字はブートストラップ値(>1,000)

IV まとめと考察

本報告の豚のクリプトスポリジウム感染の感染率は全平均で32.6%であった。これまでに、世界各地の豚の感染率はオーストラリア西部で6.03%、スペイン北東部で22.5%、デンマークでは雌繁殖豚16%、肥育豚31%、離乳直後の豚100%と報告されていた^{10, 14, 16, 19, 24, 29})。他国のデータと比較すると、日本の豚の感染率は特に高くなかった。感染率の差違は、検査豚の月齢、診断方法、ブタの管理体制など、いくつかの要因が寄与していると考えられている¹⁰)。そのため、本報告で養豚場間の感染率の差違(58.1~4.9%)は、敷料などの汚染資材、感染豚の糞便の処理対策など、養豚場の衛

生環境に起因すると推察されたが、その根拠は検討されていなかった。

顕微鏡観察下でクリプトスポリジウム感染豚の糞便中のOPGを算出した。2ヵ月齢豚未満のOPGは比較的高かった。これらの結果は、過去に報告された結果と一致した⁵⁾。日本では、豚のクリプトスポリジウム感染症に関する報告は数少なく、2001年が33.2%、2013年で23.7%と報告されている^{4, 28)}。本報告の結果は過去の報告とほぼ一致したことから、日本の豚におけるクリプトスポリジウムの感染は広く伝播しており、感染率は高いと考えられた。

近年、豚の下痢は、クリプトスポリジウム・オーシスト脱落数と関連した報告¹⁴⁾や下痢の発症率と糞便中のクリプトスポリジウム・オーシストとの間に有意な相関は認めない報告もある^{13, 29)}。本報告では検査対象数が少ないため、他の下痢性病原体との関連を調査できなかったが、下痢の発症豚では、正常便や軟便と比較してオーシスト脱落率が高い傾向があり、その点で過去の見解を追認できると考えられた。

本報告は、18S rRNA遺伝子のシーケンスによって、分離株を*C. suis* または *C. scrofarum*と同定されたが、全試料を増幅させることはできなかった。本例の様に原因不明の遺伝子増幅失敗に関する報告があり²⁹⁾、その原因として、糞便中にPCR増幅阻害因子が含まれているか、保存糞便の状態により精製中に原虫のDNAが失われてしまう可能性を考える必要があった。

現在までに、本報告の2種を除き、*C. parvum*、*C. andersoni*、*C. felis* など、いくつかの種が日本の動物から検出されている^{11, 12, 26)}。しかし本研究では、*C. suis* と *C. scrofarum* の2種しか検出されなかった。従って、他種が豚に感染する可能性は低いと考えられた。本報告では、*C. suis*は比較的若齢豚に多く感染し、*C. scrofarum* は2ヵ月齢豚以上に多く感染した。従って、*C. suis*の感染は月齢に依存し、月齢が進むにつれて、*C. scrofarum*との混合感染に移行する可能性が考えられた。月齢に特異的な易感染性は、近年報告されている他の知見を追認するものと考えられた⁵⁾。

いくつかの分離株でアクチン遺伝子座のシーケンシングを実施した。その結果、*C. suis* および *C. scrofarum* の変異型が、農場No.3および農場No.2で検出された。日本で豚の*Cryptosporidium* spp. の変異型が検出されたのは初めてのことである。農場No.3および農場No.4から検出された*C. suis* の分離株の配列は他国で検出されたもの(ノルウェーの分離株に由来 EF012373)と一致したので、その変異型は、既知の*C. suis* に由来すると考えられた。一方、同定された*C. scrofarum* の分離株は全て、変異型であったため、このタイプが日本に広がっていると考えられた。しかし、日本の豚のクリプトスポリジウムのアクチン遺伝子の特性を評価するためには、さらに例数を増やして検討する必要があった。本報告では日本の豚におけるクリプトスポリジウム感染の感染率を調査し、分離株の遺伝子解析を実施した結果、日本の豚にクリプトスポリジウムの感染が広がっていたこと、他の諸国の分離株とは異なる変異型が存在していたことが明らかとなった。しかし、クリプトスポリジウム感染豚と月齢特異性、

下痢の病原性との関連性をより正確に評価するためには、さらに、広域で大規模な疫学的遺伝子型解析を実施する必要があると考えられた。

最後に、クリプトスポリジウムの遺伝子診断にご協力いただきました(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所の松林誠先生、芝原友幸先生、大阪市立環境科学研究所の阿部仁一郎先生、埼玉県衛生研究所の山本徳栄先生、近真理奈先生に深謝いたします。

IV 参考文献

- 1) Abe N, Kimata I, Iseki M: Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and a dog in Japan, J Vet Med Sci, 64, 165-168 (2002).
- 2) Budu-Amoako E, Greenwood SJ, Dixon BR, Barkema HW, Hurnik D, Estey C, McClure JT: Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in pigs on Prince Edward Island, Canada, Vet Parasitol, 184, 18-24 (2012).
- 3) Fayer R: Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*, Exp Parasitol, 124, 90-97 (2010).
- 4) Izumiyama S, Furukawa I, Kuroki T, Yamai S, Sugiyama H, Yagita K, Endo T: Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infections in weaned piglets and fattening porkers in Kanagawa Prefecture Japan, Jpn J Infect Dis, 54, 23-26 (2001).
- 5) Jeníková M, Němejč K, Sak B, Květoňová D, Kváč M: New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II, Vet Parasitol, 176, 120-125 (2011).
- 6) Koyama Y, Satoh M, Maekawa K, Hikosaka K, Nakai Y: Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughterhouse in the northern island of Japan, Vet Parasitol, 130, 323-326 (2005).
- 7) Kváč M, Kestránová M, Pinková M, Květoňová D, Kalinová J, Wagnerová P, Kotková M, Vítovec J, Ditrich O, McEvoy J, Stenger B, Sak B: *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*), Vet Parasitol, 191, 218-227 (2013).
- 8) Kváč M, Hanzlíková D, Sak B, Kvetonová D: Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic, Vet Parasitol, 160, 319-322 (2009).
- 9) Langkjær, R. B., Vigre, H., Enemark, H. L., Maddox-Hyttel, C., 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. Parasitology 134, 339-350.

- 10) Maddox-Hyttel C, Langkjaer RB, Enemark HL, Vigre H: *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs—occurrence and management associated risk factors, *Vet Parasitol*, 141, 48–59 (2006).
- 11) Matsubayashi M, Nagano S, Kita T, Narushima T, Kimata I, Iseki M, Hajiri T, Tani H, Sasai K, Baba E: Genetical survey of novel type of *Cryptosporidium andersoni* in cattle in Japan, *Vet Parasitol*, 158, 44–50 (2008).
- 12) Murakoshi F, Tozawa Y, Inomata A, Horimoto T, Wada Y, Kato K: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Ishikari district, Hokkaido, Japan, *J Vet Med Sci*, 75, 837–840 (2013).
- 13) Němejc K, Sak B, Květoňová D, Kernerová N, Rost M, Cama VA, Kváč M: Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices, *Parasitol Res*, 112, 1143–1154 (2013).
- 14) Nguyen ST, Honma H, Geurden T, Ikarashi M, Fukuda Y, Huynh VV, Nguyen DT, Nakai Y: Prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* oocysts shedding in pigs in Central Vietnam *Res, Vet Sci*, 93, 848–852 (2012).
- 15) Ritchie LS: An ether sedimentation technique for routine stool examinations, *Bull US Army Med Dep*, 8, 326 (1948).
- 16) Ryan UM, Samarasinghe B, Read C, Buddle JR, Robertson ID, Thompson RC: Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs, *Appl Environ Microbiol*, 69, 3970–3974 (2003).
- 17) Ryan UM, Monis P, Enemark HL, Sulaiman I, Samarasinghe B, Read C, Buddle R, Robertson I, Zhou L, Thompson RC, Xiao L: *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*), *J Parasitol*, 90, 769–773 (2004).
- 18) Smith HV, Cacciò SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson RC: Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans, *Trends Parasitol*, 22, 160–167 (2006).
- 19) Suárez-Luengas L, Clavel A, Quílez J, Goñi-Cepero MP, Torres E, Sánchez-Acedo C, del Cacho E: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain), *Vet Parasitol*, 148, 231–235 (2007).
- 20) Sulaiman IM, Lal AA, Xiao L: Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus, *J Parasitol*, 88, 388–394 (2002).
- 21) Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

- distance, and maximum parsimony methods, *Mol Biol Evol*, 28, 2731-2739 (2011).
- 22) Waldman E, Tzipori S, Forsyth JR: Separation of *Cryptosporidium* species oocysts from feces by using a percoll discontinuous density gradient, *J Clin Microbiol*, 23, 199-200 (1986).
- 23) Wang R, Qiu S, Jian F, Zhang S, Shen Y, Zhang L, Ning C, Cao J, Qi M, Xiao L: Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Henan, China, *Parasitol Res*, 107, 1489-1494 (2010).
- 24) Wieler LH, Ilieff A, Herbst W, Bauer C, Vieler E, Bauerfeind R, Failing K, Klös H, Wengert D, Baljer G, Zahner, H: Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 48, 151-159 (2001).
- 25) Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus, *Appl Environ Microbiol*, 65, 1578-1583 (1999).
- 26) Yoshiuchi R, Matsubayashi M, Kimata I, Furuya M, Tani H, Sasai K: Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan, *Vet Parasitol*, 174, 313-316 (2010).
- 27) Yui T, Shibahara T, Kohmoto M, Yamashina H, Yoshida T, Fukuda M, Watanabe Y, Kubo M: 2010. Detection of *Cryptosporidium parvum* pig genotype II and *Cryptosporidium suis* from growing-fattening pigs infected with porcine circovirus type 2, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in growing-fattening pigs, *J Jpn Vet Med Assoc*, 63, 61-68 [in Japanese] (2010).
- 28) Yui T, Shibahara T, Kon M, Yamamoto N, Kameda M, Taniyama H: 2014. Epidemiological studies on intestinal protozoa in pigs in Saitama Japan, *JARQ*, (2014).
- 29) Zintl A, Neville D, Maguire D, Fanning S, Mulcahy G, Smith HV, De Waal T: Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland, *Parasitology*, 134, 1575-1582 (2007).