

Ⅲ 調査研究

鶏肉およびヒト由来 CTX-M 型基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析

石畝 史・永田暁洋・山崎史子・津持文子・望月典郎・山根一和*¹・荒川宜親*¹

Molecular Epidemiological Analyses of CTX-M-type Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing *Escherichia coli* isolated from Chicken Meats and Sporadic Diarrheal Human Cases

Fubito ISHIGURO, Akihiro NAGATA, Fumiko YAMAZAKI, Fumiko TUJI
Micho MOCHIZUKI, Kunikazu YAMANE*¹, Yoshichika ARAKAWA*¹

鶏肉由来 30 株および患者由来 27 株の CTX-M 型基質特異性拡張型 β-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 O78 : HUT などが主であったのに対し、糞便由来株で O25 : H4、O1 : H6 および O78 : H9 などであった。両者由来の O78 : H9 の各 1 株、薬剤耐性パターン (4 剤耐性)、CTX-Mtype (CTX-M-55)、系統発生群 (A) および PFGE パターンは類似し、MIC 値では CPR 以外はほぼ一致したことから、両者の関連性に注目すべきと思われた。また、当センターで初めてヒト由来株において CTX-M-15 型、シークエンスタイプ 131、系統発生群が B2、および CPFX 耐性を示す O25 : H4 型株が確認された。

1. はじめに

近年、ヒト、家畜および家禽から、基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の分離報告が増加している¹⁻³⁾。ESBL 産生菌は第三世代セファロスポリンに対しても耐性を示すことから、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 には様々な型が存在するが、特にこの数年は Cefotaxime (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 (CTRX) 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⁴⁾。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 : H4⁵⁾が、ヒトから高頻度に分離されていることから公衆衛生学的に注目されている。

ESBL 産生大腸菌への感染源の一つとして鶏肉が重要視されているが⁶⁾、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い。そこで、我々は平成 19 年から 20 年に市販鶏肉から CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌の分離を試み、散发下痢症患者由来の CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌と、分子疫学的性状について比較検討し報告した⁷⁾。今回の報告は、平成 21 年から 22 年に使用薬剤を若干変更して同様の調査を行ったので、その概要を報告する。

2. 方法

2. 1 材料

2. 1. 1 供試鶏肉由来株

平成 21 年 4 月から 22 年 9 月に福井市内で購入した国内産鶏肉 66 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、25 g の鶏肉を 225 mL の mEC 培地で増菌培養 (42°C、20 時間) 後、CTX 6.4 μg/mL 添加 DHL 培地および Ciprofloxacin (CPF) 6.4 μg/mL 添加

DHL 培地を使用し、大腸菌の性状を示した 10 株の生化学的性状を調べた。大腸菌と同定された株の中で異なる性状を示す株について、6 種類の薬剤を用いてスクリーニングを実施した。即ち、CTX、CPF、Nalidixic acid (NA)、Ampicillin (ABPC)、Tetracyclin (TC) および Streptomycin (SM) の 6 種類の薬剤を、別々に 4~8 μg/mL 添加したミューラーヒントン S 培地に菌株を接種し、CTX 耐性株を中心に異なる薬剤耐性パターンを示す株を収集した。

その後、病原大腸菌免疫血清による O および H 血清型別を実施し、O 血清型が判明し、Kirby-Bauer (KB) 法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 71 株を詳しい解析に用いた。

2. 1. 2 供試患者由来株

平成 21 年 3 月から平成 22 年 10 月に、福井県内の医療機関 (主に 3 機関) で散发下痢症患者から分離され、O 血清型が判明し、CTX に中間の感受性または耐性を示した 33 株を用いた。

2. 2 方法

2. 2. 1 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は CTX、CPF、NA、ABPC、TC、SM、Sulfisoxazole (Su)、sulfamethoxazole/Trimetoprim (ST)、Gentamicin (GM)、Kanamycin (KM)、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 に中間の感受性または耐性を示した株に対しては、第三世代セファロスポリンである CTX、CTRX および CAZ、ならびに Fluoroquinolone (FQ) 系薬剤である CPF、Enrofloxacin (ERF) 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⁷⁾。また、第四世代セファロスポリンである Cefpirome (CPR) は Etest で MIC を測定した。

2. 2. 2 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 CTX-M 型 β-ラクタマーゼ遺伝子である *bla*_{CTX-M} の PCR による group 型別は Shibata ら⁸⁾、さらに CTX-M の group が判定された鶏肉由来 30 株および患者由来 27 株の計 57 株の *bla*_{CTX-M} 型のシークエンス解

*¹ 国立感染症研究所細菌第二部

析は Dutour ら⁹⁾、大腸菌の系統発生群の分類は Clermont ら¹⁰⁾の方法に準拠した。また、一部の株についてはシーケエンスタイプの解析を実施した。

2. 2. 3 有意差の検定

CTX、CTR、CAZ、CPR、CPFX および ERFX の MIC 値の鶏肉由来株とヒト由来株間の有意差は、Wilcoxon の順位和検定によって調べた。

2. 2. 4 PFGE パターン

O78 について、鶏肉由来 16 株とヒト由来 1 株のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を、制限酵素 *Bln* I を用いて実施した。

3. 結果

3. 1 血清型および *bla*_{CTX-M} group

3. 1. 1 血清型

ESBL 産生菌は鶏肉由来株で 23 検体 (35%) から 30 株確認され、血清型は O78 : H9 が 9 株、O78 : HUT が 6 株、O25 : HNM、O153 : HUT などの 15 種類が各 1 株であった (表 1)。ヒト糞便由来株は 27 株確認され、血清型は O25 : H4 が 9 株、O1 : H6 が 4 株、O86a : H18 が 3 株、O78 : H9、O125 : HNM などの 6 種類が各 1 株であった。両者からともに確認された血清型は O78 : H9 および O25 : HNM であった。

3. 1. 2 *bla*_{CTX-M} group

CTX-M-1 グループ (以下、G と略す)、CTX-M-2G、CTX-M-8G および CTX-M-9G は、鶏肉由来株ではそれぞれ 21 株、4 株、0 株および 5 株で、ヒト由来株ではそれ

表1 鶏肉およびヒト糞便由来ESBL産生大腸菌のCTX-M型および血清型

由来	CTX-M-group							
	CTX-M-1		CTX-M-2		CTX-M-8		CTX-M-9	
	n	主な血清型	n	血清型	n	血清型	n	主な血清型
鶏肉	21	O78: H9(7) ¹⁾ O78: HUT(6) O8: HNM O91: H28 O103: H51	4	O8: H7 O8: HUT O25: HNM O153: HUT			5	O78: H9(2) O18: H28 O20: H19 O128: HUT
ヒト糞便	3	O25: H4 O78: H9 O146: HUT	2	O111: HUT(2)	2	O1: HUT O125: HNM	20	O25: H4(7) O1: H6(4) O25: HNM(2) O86a: H18(3) O125: H7

1)()内は株数を示す

ぞれ 3 株、2 株、2 株および 20 株であった (表 1)。最も多かった CTX-M-G は鶏肉由来株では CTX-M-1G、ヒト由来株では CTX-M-9G で違いがみられた。

3. 2 薬剤感受性試験結果等

3. 2. 1 KB 法による薬剤感受性

鶏肉由来株とヒト由来株の平均薬剤耐性数は、それぞれ 6.8 剤と 5.4 剤であった (表 2~4)。鶏肉由来の血清型 O78 は 1 株が 4 剤耐性を示し、15 株が 7~8 剤に耐性を示した。そこで、O78 以外の 14 株とヒト由来の 27 株の薬剤別耐性率を示すと図 1 のとおりで、TC および CP 以外はほぼ同様の耐性率を示した。一方、ヒト由来株の中に、4 剤耐性の O78 : H9 が 1 株確認されている。

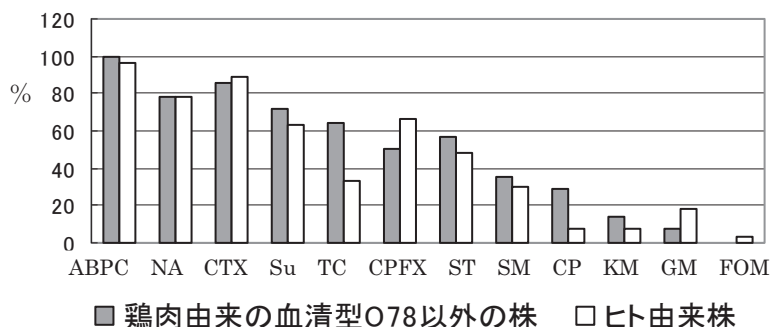


図1 鶏肉およびヒト由来ESBL産生大腸菌における薬剤別耐性率 (KB法) — 耐性のみ集計、中間の感受性は除く —

表2市販鶏肉から分離された*bla*_{CTX-M}陽性大腸菌の性状

No.	血清型	CTX-M group	系統発生群	薬剤感受性 (Kirby-Bauer法)											MIC(μ g/mL) ²⁾			
				CTX	CPFX	NA	ABPC	TC	Su	ST	SM	GM	KM	CP	CAZ	CPR	ERFX	
1	O8:HNM	M-1	A	R ¹⁾		R	R	R	R					R		16	>256	0.5
2	O91:H28	M-1	B1	R	R	R	R	R	R	R	I ²⁾			R		32	96	128
3	O103:H51	M-1	D	R	R	R	R	R	R		R					2	32	32
4	O103:HUT	M-1	D	R			R									16	96	1
5	O115:HNM	M-1	D	R		R	R	R		R	R					32	64	1
6	O148:H28	M-1	B1	R	R	R	R	R	R	R						32	64	32
7	O159:H28	M-1	B1	R	R	R	R	R	R	R						32	64	32
8	O8:H7	M-2	B1	I	R	R	R									2	4	32
9	O8:HUT	M-2	D	R			R	R	R		R					4	>256	1
10	O25:HNM	M-2	A	R		R	R									1	8	0.5
11	O153:HUT	M-2	D	R			R									1	12	1
12	O18:H28	M-9	B1	I	I	R	R	R	R	R	R			R		32	6	8
13	O20:H19	M-9	A	R	R	R	R	R	R	R			R	R		2	12	32
14	O128:HUT	M-9	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R		2	24	32

1)R;耐性 2)I;中間の感受性を示す 3)CAZおよびERFXは奉天平板希釈法、CPRはE testで測定。

表3 市販鶏肉から分離された *bla_{CTX-M}* 陽性大腸菌O78の性状

No.	血清型	株数	CTX-M group	CTX-M 型	系統 発生群	薬剤感受性(Kirby-Bauer法)										MIC(μ g/mL) ^{*)}				
						CTX	CPF	NA	ABPC	TC	Su	ST	SM	KM	CAZ	CPR	ERFX			
1	O78:H9	6	M-1	M-55	A	R ²⁾	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16~32	48~>256	32
2	O78:H9	1	M-1	M-55	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16	96	32
3	O78:H40	1	M-1	M-55	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	32	128	32
4	O78:HUT	5	M-1	M-55	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16~32	32~192	32
5	O78:H9	1	M-9	M-14	A	I ³⁾	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	12	32
6	O78:H9	1	M-9	M-14	A	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	8	32
7	O78:HUT	1	M-9	M-14	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	6	32

1)R;耐性 2)I;中間の感受性を示す 3)CAZおよびERFXは準天平板希釈法、CPRはE testで測定。

表4 散発下痢症患者から分離された *bla_{CTX-M}* 陽性大腸菌の性状

No.	血清型	分離医療機関	年齢/性別	CTX-M group	CTX-M 型	系統 発生群	薬剤感受性(Kirby-Bauer法)										MIC(μ g/mL) ^{*)}			
							CTX	CPF	NA	ABPC	TC	Su	ST	SM	GM	FOM	KM	CP	CAZ	CPR
1	O25:H4	D4 ¹⁾	53/F	M-1	M-15	B2	R ⁶⁾	R	R	R	R	I ⁷⁾	I ⁷⁾	R	I	I	R	32	96	64
2	O78:H9	A ¹⁾	59/M	M-1	M-55	A	R	R	R	R	R	I	I	R	I	I	R	32	24	32
3	O146:HUT	B ²⁾	84/M	M-1	M-15	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	128	>256	64
4	O111:HUT	C ³⁾	7/M	M-2	NT ⁵⁾	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	12	0.25>
5	O111:HUT	C	78/M	M-2	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	8	0.25>
6	O1:HUT	C	28/M	M-8	NT	D	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	8	0.25>
7	O125:HNM	A	38/M	M-8	NT	B1	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	8	128
8	O1:HUT	C	1/M	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	12	8
9	O1:H6	B	80/M	M-9	NT	B1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	64	>512
10	O1:H6	B	78/F	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	96	>512
11	O1:H6	A	65/F	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8	16	>512
12	O1:H6	C	27/F	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	4	256
13	O25:H4	B	88/F	M-9	M-14	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8	96	>512
14	O25:H4	C	88/F	M-9	M-14	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8	192	>512
15	O25:H4	B	84/F	M-9	M-14	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8	192	256
16	O25:H4	A	82/F	M-9	M-27	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8	12	>512
17	O25:H4	B	88/F	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	32	512
18	O25:H4	A	95/F	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16	8	>512
19	O25:H4	C	8/M	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	48	128
20	O25:HNM	B	-	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8	12	>512
21	O25:HNM	B	83/F	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8	8	>512
22	O25:HUT	A	1/F	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	24	0.25>
23	O86a:H18	B	4/M	M-9	NT	D	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	6	0.25>
24	O86a:H18	A	68/F	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	16	0.5
25	O86a:H18	B	2/M	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	48	0.5
26	O125:H7	C	57/M	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	3	0.25>
27	O166:HUT	B	40/M	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	12	0.25>

1)A;A病院 2)B;B検査センター 3)C;C病院 4)D;D病院 5)NT;検査未実施 6)R;耐性 7)I;中間の感受性を示す

8)CAZおよびERFXは準天平板希釈法、CPRはE testで測定。

3. 2. 2 第三、四世代セファロスポリン等のMIC値

試験に用いた4種類の第三、第四世代セファロスポリンのMIC値は、いずれも多くの鶏肉由来株に対し高い値を示し、鶏肉由来株とヒト由来株のMIC値を比較すると、CAZおよびCPRは有意差を示した(p<0.05)(図2-1)。一方、CPFおよびERFXはヒト由来株の方が高い値を示し、CPFでは有意差を示した(p<0.05)(図2-2)。

3. 3 その他の性状

3. 3. 1 系統発生群

鶏肉由来株はA、B1およびDに属したが、O78はすべての株がAに属した。一方、ヒト由来株はAに属したのはO78:H9の1株のみで、B1、B2およびDに属したが、O25:H4、O25:HNMおよびO25:HUTの計11株はすべてB2であった。

3. 3. 2 O78:H9について

鶏肉および糞便由来のO78:H9の各1株は、CTX-M typeはCTX-M-55、系統発生群はA、PFGEパターンは

類似し、MIC値はCPR以外がほぼ一致した。

3. 3. 3 O25:H4について

今回の調査で、当センターで初めてCTX-M-15型、シークエンスタイプ131、系統発生群がB2、およびCPF耐性を示すO25:H4型株が確認された。

4. 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_{CTX-M}*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。*bla_{CTX-M}*陽性株におけるヒト由来株はO25:H4、O1:H6およびO86a:H18の3種類の血清型が43%を占めた。我々の前回の調査結果⁷⁾である59%に比べると若干減少したものの、Suzukiら¹⁾も前二者で60%を占めたと報告しているように、特定の血清型で多く確認されている。*bla_{CTX-M}*陽性株は鶏肉66検体中23検体(35%)から分離され、血清型は12種類確認されたが、中でもO78:H9とO78:HUTで計16株も確認されたのが、

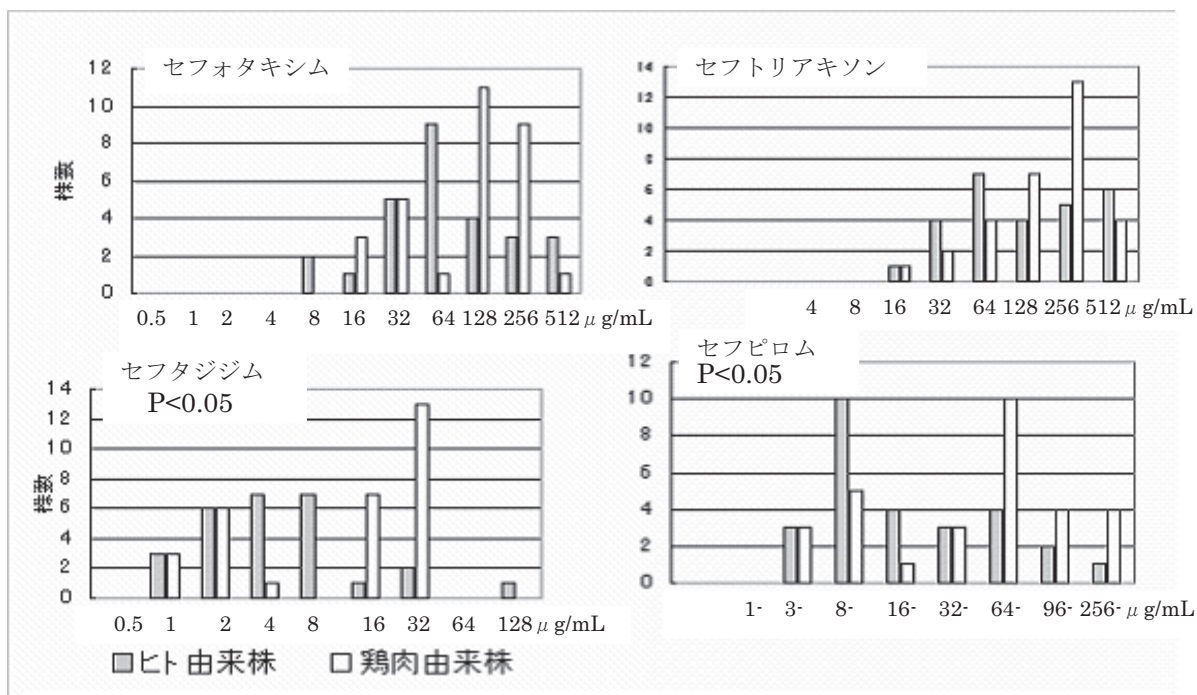


図 2-1 鶏肉およびヒト由来株に対するセファロスポリン系薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC)

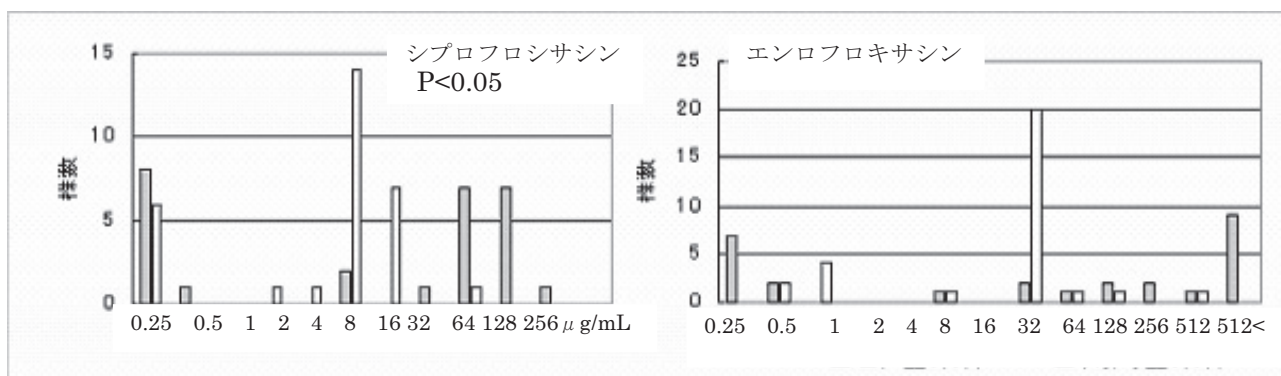


図 2-2 鶏肉およびヒト由来株に対するフルオロキノロン系薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC)

注目された。

Ozawa らは我が国で特別な遺伝型の鶏に病原性のある FQ 耐性 O78 が、広く分布している可能性があるとして報告している¹¹⁾。一方、ヒト由来株ではスペインにおける CTX-M-14 産生の O78 : HNM の報告や、タイにおける CTX-M-55 産生大腸菌や *Klebsiella pneumoniae* の報告がある¹²⁻¹³⁾。今回、鶏肉由来の O78 において CTX-M-14 産生株が 3 株、CTX-M-55 産生株が 13 株確認され、ヒト由来株の O78 : H9 でも CTX-M-55 産生株が 1 株確認された。このように、O78 : H9 において、鶏肉由来株と患者糞便由来株で CTX-M-55 産生で他の各性状も類似した株が確認された。一方、鶏肉とヒト由来株で O78 : H9 の他に共通して分離された血清型 O25 : HNM は、CTX-M 型および CPFX の感受性に相違がみられた。

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、即ち鶏肉が人への感染源になり得るという確証は得られなかったが、鶏肉由来株とヒト糞便由来株において性状が極めて類似した O78 : H9 が確認されたことから関連性に注目すべきと思われる。また、市販鶏肉から CPFX 耐性の *bla*_{CTX-M} 陽性大腸菌が分離されたことは、

*bla*_{CTX-M} がプラスミド媒介性に他の病原細菌にも伝達される¹⁴⁾可能性を考えると、獣医公衆衛生的に注目する必要があると思われる。また、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、シーケンスタイプが 131、系統発生群が B2、および CPFX 耐性を示す O25 : H4 型株⁵⁾が患者から分離されたことから、今後の動向に注意すべきである。

5. まとめ

1. 平成 21 年～22 年に、市販鶏肉 66 検体中 23 検体から 30 株、同時期の散発下痢症患者から 27 株の CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌が分離された。
2. 最も多かった血清型は、鶏肉由来株で O78 : H9、ヒト由来株で O25 : H4 であった。
3. 鶏肉とヒトの両方で確認された血清型は、O78 : H9 および O25 : HNM の 2 種類であった。
4. 鶏肉および糞便由来の O78 : H9 の各 1 株は、CTX-M type は CTX-M-55、系統発生群は A、PFGE パターンは類似し MIC 値は CPR 以外がほぼ一致した。

- 5) CTX-M-15 型, シークエンスタイプが 131、系統発生群が B2、および CPF 耐性を示す O25 : H4 型株が患者から分離された。

謝辞

今回の調査に使用しました菌株を分与して頂きました、県内各医療機関の検査担当者の皆様、および調査研究費の一部を助成して頂きました社団法人福井県獣医師会に感謝します。

参考文献

- 1) Suzuki S *et al.* Change in the prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread, *J Antimicrob Chemother*, 63, 72-79 (2009)
- 2) Warren RE *et al.* Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum- β -lactamases in the UK, *J Antimicrob Chemother*, 61, 504-508 (2008)
- 3) Ho PL *et al.* Extensive dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* with multidrug resistance to 'critically important' antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008-10, *J Antimicrob Chemother*, 66, 765-768 (2011)
- 4) Kiratisin P *et al.* Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic, *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2818-2824 (2008).
- 5) Nicolas-Chanoine MH *et al.* Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15, *J Antimicrob Chemother*, 61, 273-281 (2008)
- 6) Doi Y *et al.* Extended-spectrum and CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain, *Clin Microbiol Infect*, 16:33-38, (2010)
- 7) 石畝 史他, 福井県内における人および鶏肉由来基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析, *日獣会誌*, 63, 883-887 (2010)
- 8) Shibata N *et al.* PCR classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 791-795 (2006)
- 9) Dutour C *et al.* CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 β -lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France, *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 534-537 (2002).
- 10) Clermont O *et al.* Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group, *Appl Environ Microbiol*, 66, 555-4558 (2000).
- 11) Ozawa M *et al.* Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *Avian Diseases*, 52, 392-397 (2008)
- 12) Coelho A R *et al.* Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain), *J Antimicrob Chemother*, 66, 517-526 (2010)
- 13) Kiratisin P *et al.* The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum β -lactamases, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand, *Microbiol Infect Dis*, 58, 349-355 (2007)
- 14) Bonnet R, Growing group of extended-spectrum β -lactamases the CTX-M enzymes, *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 1-14 (2004)