

厚生科学研究費補助金
(医薬安全総合研究事業)

研究報告書

医療機関における安全対策に関する研究

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

医療機関における安全対策に関する研究

主任研究者 一山 智（京都大学医学部）

研究要旨

耐性菌検査の標準化に関する研究の3年計画の1年目として、4菌種12株について17施設における耐性検査を施行した。MRSA（低度耐性2株、高度耐性2株）においてはディスク法よりも微量液体希釈法にて良好な再現性が得られた。VanC陽性腸球菌2株ではディスク法の信頼性は乏しく微量液体法による検査が必須であった。ペニシリン耐性肺炎球菌（中間耐性2株、高度耐性2株）ではMPIPCディスクによるスクリーニングは信頼性があったが、PCGの微量液体法では中間耐性1株を除き施設間格差が著しかった。メタロβラクタマーゼ陽性緑膿菌（比較的感受性菌2株）ではCAZディスク法にてスクリーニングが可能と考えられた。これらの結果より、より安定した腸球菌のVCM耐性検出法ならびに肺炎球菌のPCG耐性検出法の確立が急務と考えられた。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

荒川 宜親 国立感染症研究所
細菌・血液製剤部 部長
岩田 進 日本臨床衛生検査技師会
事務局 会長
飯沼 由嗣 名古屋大学医学部附属病院
検査部 助手

A. 研究目的

わが国においては、薬剤耐性菌検出のための標準化と精度管理は、臨床病理学会あるいは臨床検査技師会が中心となって行っているが、これらは一般的な細菌の同定と薬剤感受性についてである。本研究は耐性菌の検出に目的を絞ったものであり、細菌検査室での薬剤感受性試験の標準化と精度管理を目的としている。さらに、厚生科学研究「新興・再興感染症研究事業：薬剤耐性菌による感染症のサーベイランスシステムの構築に関する研究」の目的に合致させるものである。

B. 研究方法

検討する病原細菌はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）、ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）、広域スペクトラムβラクタマーゼ産性菌（ESBL）、カルバペネム耐性緑膿菌の5菌である。3年計画の1年目においては、このうちESBLを除く4菌種とした。各々の菌種のうち、MRSAについてはオキサシリン低度耐性株2株と高度耐性株2株、VREについてはVanC遺伝子保有株2株、PRSPについてはペニシリン低度耐性株2株と高度耐性株2株、カルバペネム耐性緑膿については2株、合計12株を選定した。

これらの菌株を日本臨床衛生検査技師会に登録されている全国主要17医療施設に配布した。各施設において米国臨床検査標準委員会（NCCLS）で定められた抗菌薬感受性試験方法で正しく判定できるか否かを検討した。具体的な試験方法はディスク拡散法と微量液体希釈法の2法である。試験薬剤はMRSAについてはオキサシリン（MPIPC）、バンコマイシン（VCM）、テイクプラニン（TEIC）、アルベカシン（ABK）の5薬剤、VREについてはVCM、TEIC、アンピシリン（ABPC）、ゲンタマイシン（GM）の4薬剤、PRSPについてはペニシリンG、MPIPCの2薬剤、カルバペネム耐性緑膿菌についてはイミペネム（IPM）、セフトジジム（CAZ）の2薬剤とした。

C. 研究結果

本年度は耐性菌基準株4菌種12株について17施設にて精度管理検査を実施した。MRSAについてはMPIPCのディスク法にて耐性度の低い2株について特定の1施設が共に感受性と判定していた。しかし微量液体法ではすべての施設で4菌株すべてについて耐性と判定された。VCMのディスク法では3菌株で各1施設ずつ非感受性の結果と判定していたが、これも微量液体法ではすべての施設で4菌株すべてについて感受性と判定された。TEICに関しては微量液体法で実施している施設はほとんどないため、ディスク法でのみの判定となったが、すべての施設ですべての菌株が感受性と判定され、安定した結果が得られている。ABKの判定では特定の1施設のみすべての菌株について耐性の結果を報告している（ディスク法）。これは当該施設の検査に使用された培地やディスクの品質管理

に問題がなかったか調査が必要であろう。残りの施設ではすべて感受性の結果が得られている。

D. 考察

腸球菌はVanC陽性*E. casseliflavus*及び*E. gallinarum*それぞれ1株づつもちいた。VCMのディスク法では両菌株についてのべ18施設が感受性と判定していた。これに対して微量液体法では6施設にとどまっている。微量液体法での最低MICは4であり、精度管理株のMIC (8~16) とわずか1管のずれしかないことより、測定の誤りというよりは測定誤差の範囲に入るものかもしれない。しかし2株とも微量液体法にて感受性と判定していた2施設があったことより、施設間格差の存在も否定できない。このことは次年度予定している繰り返し測定の結果も参考とし、結論を出したい。TEICのディスク法はすべての施設で安定した結果(感受性)が出されていた。ABPCとGMのディスク法では特定の施設にIおよびRの判定が集中していた。ABPCの微量液体法では方法によらず安定して感受性の結果を出している。GMの微量液体法ではVITEKのみが耐性の結果を出しており、測定機器間の格差も考慮すべきであろう。

ペニシリン耐性肺炎球菌ではMPIPCのディスク法では全施設耐性と判定していたが、PCGのディスク法ではMICに関係なく安定した結果は得られていない。PCGの微量液体法ではPISPの1株(ATCC49619)以外は施設間格差が著しく、本法では安定した結果が得られがたい。

メタロβラクタマーゼ陽性緑膿菌ではIPMのMIC値にかかわらずCAZに対してディスク法、微粒液体法ともにすべての施設で高度耐性の結果が得られた。但し本菌はCAZに対して非常に高度な耐性をしめすことが知られており(MICが128γ以上)、通常の微量液体法(特に自動機器)においては、そこまでのMICかどうか判定が不可能な場合がある。そのため本菌のスクリーニング法としてディスク法にて阻止円が形成されない場合、更に詳細な検査法(微量液体法によるCAZのMICが128以上あるいはPCR法によるメタロβラクタマーゼ遺伝子の検出など)が必要と考えられた。

E. 結論

各種耐性菌の感受性検査でも特に施設間格差の著しい項目があり、検査精度を高めるためには統一した精度の高い検査手技の確立が重要である。本研究による現時点での推奨される耐性菌検査法は以下の通りである。

1. MRSAにおける微量液体希釈法によるMPIPC及びVCMのMIC測定

2. VanC陽性バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)における微量液体希釈法によるVCMのMIC測定、ディスク拡散法によるTEIC感受性測定、ディスク拡散法及び微量液体希釈法によるABPC感受性検査、VITEK以外の機器による微量液体希釈法によるGM感受性測定

3. MPIPCのディスク拡散法によるペニシリン耐性肺炎球菌のスクリーニング

4. CAZのディスク拡散法によるメタロβラクタマーゼ陽性緑膿菌のスクリーニング。

特に、より安定した結果を示す腸球菌におけるVCM耐性検出法ならびに肺炎球菌におけるPCG耐性検出法の確立が急務と考えられた。

次年度からは、本年度の研究の各施設における複数回測定ならびに保存株による繰り返し測定を行いその結果をもととして、精度管理に適した菌株の選定、より精度の高い耐性菌検出法の確立並びにさらに多くの施設での精度管理検査を実施する予定である。

F. 研究発表

(未発表)

G. 知的所有権の取得状況

(未取得)

厚生省科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

医療機関における安全対策に関する研究
～耐性菌検出精度管理に用いる菌株の選定とその精度管理について～

分担研究者 飯沼 由嗣 （名古屋大学医学部附属病院 検査部助手）

薬剤耐性菌検出のための多施設精度管理を実施するに先立ち、精度管理に用いる菌株の選定を行った。菌はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）4株（低度耐性2株、高度耐性2株）、VanC陽性腸球菌2株（*E. casseliflavus*と*E. gallinarum*）、ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）4株（中等度耐性2株、うち1株はATCC49619、高度耐性2株）、カルバペネム耐性緑膿菌2株（比較的耐性度の低いもの）の4菌種、12株である。名古屋大学医学部附属病院検査部における検査結果では、おおむね良好な耐性結果の判定が可能であった。

A. 研究目的

薬剤耐性菌検出の精度管理を実施するために、標準的な薬剤耐性傾向を示す菌を臨床分離菌あるいはATCC標準株より選定する。

B. 研究方法

今回検討を行った菌は以下の5菌種である。

1. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）
2. バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）
3. ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）
4. カルバペネム耐性緑膿菌
5. 広域スペクトルβラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌（ESBL）

このうち、5. ESBLに関しては、明確なESBLの基準が未だないこと、あるいはその菌種や耐性の多様性などより今年度の精度管理株としては採用しなかった。

1. MRSAに関しては、オキサシリン（MPIPC）耐性株より選択した。
2. VREに関しては、高度耐性菌（VanAあるいはVanB陽性菌）の検査室における取り扱いの問題もあり、今年度はVanC陽性菌のみを精度管理株とした。

3. PRSPに関しては、ペニシリン中間耐性肺炎球菌（PISP）及びペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）から適当な株を選択した。

4. カルバペネム耐性緑膿菌に関しては、メタロβラクタマーゼ陽性緑膿菌より適当な株を選択した。

5. 以上の菌について、NCCLSで定められた抗菌薬感受性試験方法（ディスク法及び微量液体希釈法）で正しく判定可能か否かを名古屋大学医学部附属病院検査部にて検証した。なおディスク法はBBLのKBディスクを使用、培地は肺炎球菌はミューラーヒントン血液寒天培地その他の菌はミューラーヒントンII寒天培地を使用した。また微量液体希釈法はデイドベーリング社のWalk/Awayを使用した。肺炎球菌はWalk/Awayでの判定を推奨されていないため本法での測定を行わなかった。

C. 研究結果

1. MRSA
MPIPCに対するMICが8γ及び16γの耐性度の低い2株及びMICが128γ以上の高度耐性株2株を基準株とした。NCCLSの基準ではMICが4以上がMRSAの診断基準とされており、低耐

低耐性度の株においても±1管までの誤差であれば、MRSAと判定されることを期待している。これらの菌株はすべてバンコマイシン（VCM）感受性（MIC=1 γ ）、アルベカシン（ABK）感受性（MIC=0.5 γ ）であった。

2. VRE

今回研究には、VanC陽性 enterococcus 2株を選定した（*E. casseliflavus*と*E. gallinarum*）。ともにVCMのMICは8～16 γ であり、±1管までの誤差でNCCLS基準で4 γ 以下（すなわち感受性）と誤判定される可能性がある。

3. PRSP

ペニシリン（PCG）に対するMIC値からPISP（MICが0.12～1 γ ）及びPRSP（MICが2 γ 以上）の各々2株ずつ選定した。PISPのうち1株はATCC49619とし、各検査実施施設の判定法がNCCLSの精度管理に合致するか否かの判定も同時に行うこととした。しかし、これらの菌株においても±1管までの誤差で大きく判定が変わる可能性もあり、注意が必要である。

4. カルバペネム耐性緑膿菌

メタロ β ラクタマーゼの有無はPCR法あるいはプラスミド抽出後プローブ法にて行った。これらの緑膿菌のうち、イミペネム（IPM）に耐性度が比較的低い2株を用いた。MICはそれぞれ16と32 γ であり、±1管までの誤差でもIPM感受性とはならない。またセフトジジム（CAZ）に対してはすべてMICが256 γ 以上と高度耐性を示すことが本菌の特徴でもある。

5. 名古屋大学医学部附属病院検査部における検査結果

MRSA：4菌株とも、両法でMIPIC耐性が判定できた。また、VCM、テイコプラニン（TEIC）、ABKの3薬剤はすべて感受性であった。

VRE：ディスク法では共にVCM感受性、微量液体希釈法では*E. casseliflavus*がMIC=8 γ でI判定、*E. gallinarum*がMICが32 γ 以上とR判定となった。

PRSP：ディスク法のみ実施。NCCLS基準通り、MIPICにて阻止円長径が19mm以下（感受性と

は判定できないの意味）となった。またNCCLS株においては、PCGディスク長径が30mm（NCCLS基準24～30）、MIPICディスク長径が10mm（同8～12）とそれぞれの測定誤差範囲内であった。

カルバペネム耐性緑膿菌：比較的IPM耐性の低い2株で行ったためか、1株はディスク法並びに微量液体希釈法にてIPM、CAZともに耐性の結果が得られたが、1株はともにIPM感受性CAZ耐性となった。

D. 考察

MRSAのメチシリン耐性は、表現型としてはオキサシリン（MIPIC）に対する感受性で決定され、遺伝型としてはMEC遺伝子の有無で判定される。本来、表現型と遺伝型は一致しなければならないはずであるが、ときとしてMEC陽性にもかかわらずMIPICに対して低いMIC値を示す株があることが知られている。日常臨床検査にて的確にMRSAを判定するためには遺伝子検査は煩雑であり、適切な表現型の判定法を行う必要がある。NCCLSの基準ではMIPICに対するMIC値が4 γ 以上のものがMRSAとされており、今回選定した菌株（MIC最低値8 γ ）であれば、的確に耐性と判定されねばならない。

VREの耐性検査は、腸内常在菌でもあり日常的には検査室にて行われていない。今後、VanAあるいはVanB型のVREを的確に判定できるためには、VanC型のVREの判定が正しくできることが必要と考えた。ただし、VanC型の耐性は比較的低い（MICが8～16）、ディスク法を主として用いている場合はその判定に注意が必要である。また、微量液体法では、菌の誤同定にも注意しなければならない。たとえばWalk/Awayでは*E. casseliflavus*、*E. gallinarum*の同定ができないため、今回の1株はVRE（*E. faecium* MICが32以上）となり、データの読み違いが重大な誤解を招く結果となる。

PRSPの判定はMIPICディスク法にて容易にスクリーニングが可能であり、耐性菌検出のための必要条件は満たされる。しかし、その後微量液体法あるいは寒天平板法やE-testによるMIC測定は施設毎に様々な方法で実施されており、一定の水準を満たした推奨される方法を決

定することも本研究班の目標となる。このため精度管理の際にNCCLS基準株を用いることにより、施設における判定法が基準にあったものか判断が可能である。

カルバペネム耐性緑膿菌は、メタロβラクタマーゼ遺伝子を保有(多くはプラスミド上)した緑膿菌であり、近年日本における爆発的増加が危惧されている。遺伝子がプラスミド上にあるため、菌から菌への伝播が容易であり、耐性菌の蔓延が比較的短時間に起こりなおかつ院内感染の原因ともなりうると考えられている。しかし、本菌の特徴ともいえるメタロβラクタマーゼはカルバペネム系抗生物質を破壊するとされるが、菌によってその発現効率が異なっているようで、今回使用した2株のうち1株はSの判定となった。しかし、CAZの感受性では、高度耐性(阻止円形成せず、MICは32γ以上)となっており、IPMよりもCAZによる判定が好ましいものと考えられた。

E. 結論

4菌種12株の精度管理用耐性菌を選出した。これらの菌株を用いて、多施設における薬剤耐性菌検出のための精度管理試験を行う予定である。これらの菌を用いて多施設精度管理を実施する場合には特に微量液体希釈法は施設毎に使用機器や手法が異なっており、一定の水準を満たした推奨される方法を決定することも本研究班の目標となる。

F. 研究発表

(未発表)

G. 知的所有権の取得状況

(未取得)

薬剤耐性菌の基礎的検討－薬剤感受性試験の精度管理用耐性菌標準株の選定－

分担研究者 荒川 宜親（国立感染症 細菌・血液製剤部）

研究要旨

薬剤耐性菌感染症サーベイランスを実施する上で、臨床分離菌の薬剤感受性試験の際に対照として用いる標準株が必要である。また、薬剤感受性試験の精度を管理するためにも、各種の薬剤耐性菌の標準株が必要となる。そこで、国内で臨床分離された薬剤耐性菌の中から、耐性遺伝子やその発現が安定であり、数代植え継いだりまた凍結保存した場合にも、薬剤耐性が脱落したり変化しない株を選定し、暫定的な「国内標準株」を選定した。

選定した菌種は、*vanA*型バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)、*vanB*型VRE、*vanC*型VRE、IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌、IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生セラチア、IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生肺炎桿菌、SHV-5a型ESBL産生肺炎桿菌、SHV-5a型ESBL産生大腸菌、SHV-5a型ESBL産生セラチア、Toho-1型β-ラクタマーゼ産生大腸菌、Toho-1とAmpC型β-ラクタマーゼを同時に産生する大腸菌、セフォペラゾン耐性の*Klebsiella oxytoca*、プラスミド性に基質拡張型のβ-ラクタマーゼ(MOX-1)を産生する肺炎桿菌、スルバクタム抵抗性のβ-ラクタマーゼを産生しセフォペラゾン耐性を示す*Klebsiella oxytoca*等である。これらの耐性菌は、国内でしばしば分離されているが、相互に識別することが難しい場合が多く、前記した菌株を対照として用いることにより、それらを各検査室で判別する際の指標とすることが可能となる。

A. 研究目的

我が国では、各種の広域抗菌活性を示す様々な抗菌薬が1980年代から広く用いられ、細菌感染症の治療は大きく進歩した。しかし、最近、それらの抗菌薬に耐性を獲得した様々な薬剤耐性菌が出現し臨床現場で問題となっている。現在、各医療施設の検査室で実施されている薬剤感受性試験は、その方法や判定基準が様々であり、極端な場合、有る施設では耐性と判定された株が他の施設では感受性と判定される場合もあるなど精度管理が十分とは言えない。

また、国内には各種の「新薬」に耐性を獲得した様々な薬剤耐性菌が出現し、場合によっては院内感染や術後感染の起因菌となっている場合があり、適正な抗菌薬療法を行うためには、それらを系統的に識別したり判別したりすることが不可欠となりつつある。しかし、実際にそのようなきめ細かな判定を行うためには、比較対照となる耐性菌の「標準株」が必要である。現在、このような目的のための「標準株」などは国内では選定されておらず、薬剤感受性試験の精度管理のためにもそのような「標準株」を揃える必要が生じている。

B. 研究方法

国内で臨床分離された菌株の中で、特定の抗菌薬に耐性を示す菌について、その耐性機構が分子・遺伝子レベルで解明されているものを選び、耐性遺伝子の安定性などを検討した。

実際には、抗菌薬を含まない培地で5回植えつき耐性遺伝子の脱落や耐性度の変化を調べ、変化の少ない株を選択した。

また、凍結保存後、解凍と再凍結を5回繰り返したのち、菌の生育力や耐性度の変化が少ない株を選択した。

C. 研究結果

耐性遺伝子の安定性が高く、しかも耐性度の変化が少ない株の中から生育力が強い株で有ることを条件に、以下の株を薬剤耐性菌の「標準株」の候補として選定した。

1. *vanA*型バンコマイシン耐性腸球菌
(VRE, *Enterococcus faecium*)
2. *vanB*型VRE(*E. faecium*)
3. *vanC*型VRE(*E. gallinarum*)
4. IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌
5. IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生セラチア
6. IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生肺炎桿菌
7. SHV-5a型ESBL産生肺炎桿菌
8. SHV-5a型ESBL産生大腸菌
9. SHV-5a型ESBL産生セラチア
10. Toho-1型β-ラクタマーゼ産生大腸菌
11. Toho-1とAmpC型β-ラクタマーゼを同時に産生する大腸菌
12. セフォペラゾン耐性の*Klebsiella oxytoca*
13. プラスミド性に基質拡張型のβ-ラクタマーゼ

(MOX-1)を産生する肺炎桿菌

14. スルバクタム抵抗性の β -ラクタマーゼを産生しセフォペラゾン耐性を示す*Klebsiella oxytoca*

D. 考察

MRSAやVREに対する医療関係者の関心が高まっている。しかし、特にVREの場合には国内での分離例は少なく、細菌検査室の検査技師や感染症専門医も直にそれらを手にとって観察したり検査したりする機会や経験は殆ど無い。したがって、VREを疑う菌が分離された場合にも、それらが真にVREか否かを判断するのに躊躇するのが現状である。これまでに国内の医療施設等から、VREの「標準株」の分与依頼が多数寄せられており、その選定を迫られていたが、今回それらを準備することが出来た。そこで今後、分与を希望する施設に対しては、分与先にそれらを安全に扱う事が出来る技術を持った者がおりしかも、施設的にも安全性が確保されていると判断された場合に限り、感染研の所長の決裁を得て順次菌株を配布することを考えている。

国内では、第三世代セフェム薬やセファマイシン薬、カルバペネム薬などの広域抗菌スペクトルを示す β -ラクタム薬に耐性を獲得した、緑膿菌や肺炎桿菌、大腸菌などが各地から分離されるようになった。これまで国内では、最も抗菌スペクトルが広いカルバペネム薬が第1選択薬的に使われてきたが、メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の出現と言う現実に直面し、抗菌薬療法を根本的に考え直す必要に迫られている。具体的には、個々の薬剤耐性菌がどのような種類の β -ラクタマーゼを産生しているかを識別し、それに対し最も効果が期待できる薬剤を選択するというきめ細かは配慮が必要となっている。国内では、Toho-1型 β -ラクタマーゼを産生するCTX耐性の大腸菌が多く分離されているが、欧米で蔓延しているTEM-, SHV-型ESBLを産生する肺炎桿菌、さらに基質拡張型のAmpC型セファロスポリナーゼを過剰産生する肺炎桿菌や大腸菌などが分離されており、その上に、IMP-1型メタロ- β -ラクタマーゼを産生しほぼ全ての β -ラクタム薬に耐性を獲得した緑膿菌なども出現しつつある。それらの「標準株」を準備することにより、検査室での薬剤耐性検査の質的向上を図る事が期待される。また、その結果、「薬剤耐性菌感染症サーベイランス」で収集されるデータの信頼性の向上が期待される。

E. 参考文献

Arakawa Y. Emerging and drug-resistant infectious

diseases--carbapenem resistant bacterial infections. Nippon Naika Gakkai Zasshi. 1997 Nov. 10;86(11):2088-94. Review. Japanese.

Yagi T, et al. Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1-like beta-lactamase genes. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Dec;41(12):2606-11.

Senda K, et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. J Clin Microbiol. 1996 Dec;34(12):2909-13.

Kimura K, et al. Molecular aspects of high-level resistance to sulbactam-cefoperazone in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 1996 Sep;40(9):1988-94.

Senda K, et al. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. 1996 Feb;40(2):349-53.

Ito H, et al. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother. 1995 Apr;39(4):824-9.

Horii T, et al. Characterization of a plasmid-borne and constitutively expressed blaMOX-1 gene encoding AmpC-type beta-lactamase. Gene. 1994 Feb 11;139(1):93-8.

Osano E, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1994 Jan;38(1):71-8.

Arakawa Y, et al. [See Related Articles] Chromosomal beta-lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1989 Jan;33(1):63-70.