

レビュー: 細胞傷害性 T 細胞による感染細胞除去率の推定

中岡慎治* (Shinji Nakaoka), 合原一幸** (Kazuyuki Aihara)
東京大学大学院数理科学研究科*, 東京大学生産技術研究所**

1 はじめに

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は, 適応免疫応答において感染細胞や腫瘍といった標的細胞の除去に中心的な役割を果たしている. CTL がどれ位効率良く標的細胞を除去するかを調べるためには, 数理モデル構築とその定量的な解析が必要である. 本稿では, 免疫学において数理モデルを活用した研究のいくつかをレビューする. 次節では, DNA ラベルを利用した定量的測定実験と細胞増殖過程を記述した数理モデルについて解説し, 3 節では CTL による感染細胞除去率の推定方法をレビューする. 4 節では, 2, 3 節では取り扱わなかった免疫学における理論研究を紹介し, 最後にまとめと今後の展望を述べて締めくくりにする.

2 定量的測定実験と数理モデル

近年, 実験によって経時的に免疫細胞の増殖や細胞分化を計測できるようになったことから, 実験データを定量的に解析するための数理モデル開発が盛んに行われている. 適応免疫応答の中心的な担い手であるエフェクター細胞は, 抗原提示細胞からウィルス・微生物といった抗原の断片と補助刺激を受け取ると活性化し, クローン増殖を行って集団で抗原の除去にあたる.

エフェクター細胞の増殖率は, 効率よく標的細胞の除去が行われているかを知る良い指標となるが, その増殖率を定量的に知るためには, 実験によって細胞個体数を経時的, 定量的に測定する必要がある. さらに, エフェクター細胞の増殖過程を記述した数理モデルを構築することで, 実験データから増殖率を定量的に推定することが可能になる. 以下では, 測定実験とパラメーター推定に用いられる数理モデル研究をそれぞれ解説する.

2.1 定量測定実験

細胞数はフローサイトメーター (FACS) を用いて計測できるが, 集団から測定の対象となる細胞を区別して計数するためには, 細胞を標識する必要がある. 細胞標識の手段はいくつか知られているが, 定量性に優れた方法が 2 つ知られている. 一つは蛍光色素 CFSE を用いる方法 [37, 26] で, 本稿で対象とするのは同位体を標識に用いる方法である.

標識に用いる物質として, BrdU (bromodeoxyuridine: ブロモデオキシリウジン) と呼ばれる合成ヌクレオチドが知られている [21, 4]. BrdU 標識は生体内で DNA をラベルする方法の一つで, 放射性物質を用いない比較的無害な方法として, 動物実験において広く用いられている. ある一定期間,

DNA プールに BrdU を入れておく。プール期間中, BrdU は S 期にある細胞 (分裂中) の DNA に取り込まれて娘細胞に引き継がれる。DNA 中の BrdU は, 抗 BrdU 抗体による抗原抗体反応を可視化した免疫染色によって測定する。

BrdU を DNA ラベルとして用いたリンパ球の増殖率推定に関する研究では, 以下に述べる理由によって推定値にバイアスがかかってしまう可能性が報告されている [3]。細胞集団が定常状態にある場合, 集団の分裂・死亡速度は均衡しているはずである。しかしながら, BrdU でラベルされた細胞集団では, 系が定常状態にあるにも関わらず, 分裂速度が死亡速度よりも有意に小さく見積もられてしまうことがある [4, 3]。このような矛盾に対して, [4] では次のような説明がなされている。BrdU による標識では分裂中 (S 期) の細胞のみがラベリングされるため, プール期間中 S 期にいない細胞は観測されない。又, リンパ球は B 細胞や CD4, CD8 陽性 T 細胞を含んだヘテロなサブセットから構成されているため, 細胞の分裂と死亡速度はサブセット毎に異なることが考えられる。BrdU は原理的に分裂と死亡のサイクル速度 (turnover 率) が速いサブセットに多く取りこまれるが, 推定できるのは細胞集団の平均増殖率である。一方, 死亡率の推定はラベルされた細胞を用いて行われるため, 集団の死亡率はラベルされた細胞の死亡率に偏ってしまう。したがって, もしリンパ球集団の大半がゆっくりした turnover 率をもつ場合, 定常状態にある集団の個体数は一定であるにも関わらず, 測定結果からは分裂速度が死亡速度よりも小さく見積もられてしまうことになる*。

なお, BrdU の利用は突然変異を引き起こす可能性があって潜在的には有毒なので,

ヒトで用いるためには無害な標識が必要とされる。無害な安定同位体として, 重水素 (^2H) で置換したグルコースや水が知られている (それぞれ ^2H グルコース, ^2H 水と表記) [28, 21, 11, 27]。通常, ^2H グルコースは静脈もしくは経口投与し, ^2H 水は経口投与する。 ^2H グルコースは取り込まれる量も少量ですぐに排出されるため, 短期間で効率の良い測定を可能にする。一方, ^2H 水は数週間にわたるような長期間の測定に向いており, turnover 率の遅いナイーブ T 細胞などの増殖率を測定するのに好都合といわれている [3]。

2.2 定量的数理モデル

集団サイズが十分に大きい場合, 個体数のゆらぎは無視できる程小さくなることが予想される。このとき, 細胞増殖過程は微分方程式をはじめとした決定論方程式によって記述できる。一方, 人口学的確率性の影響が無視できない場合, 細胞増殖過程は確率過程として定式化するのが妥当であろう。定量的数理モデルを用いた先行研究で, 決定論アプローチに分類されるものは [34, 31, 12, 18, 8, 17, 25, 24], 確率論アプローチに分類されるものは [13, 22, 20, 42] である。個体数増減を記述する手段として, 決定論アプローチでは微分方程式, 確率論的アプローチでは出生死亡過程 (birth-death process) や分枝過程 (branching process) が用いられている。

先行研究の多くでは, 最小自乗法 (実験データと数理モデル予測の間の誤差を最小にするパラメータの推定) によって, 細胞増殖率を推定している。先行研究 [13, 17] では, 同じ実験データを用いてそれぞれ独立に数理モデルを構築して増殖率を推定している。した

*[4] では, 具体的な数値を与えてわかりやすく解説がなされているので, 詳細は [4] 参照。

がって、数理モデルの違いから生じた推定値の違いを比較・検討することができる。[17]では、データフィットの良さなどいくつかの指標を基に [13] との相違を比較・検討しているが、元となる数理モデルの関係性については述べられていない。数理モデル間の関係性に注目して比較すれば、[13, 17] で構築された数理モデル間には、共通性・類似性がみられることがわかっている (より詳しい解説は、筆者らによる原稿参照 [44])。

3 感染細胞除去率推定

CTL はウイルス感染数日後に活性化され、感染細胞除去に中心的な役割を果たす。CTL による感染細胞除去実験でよく用いられるのは、LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus; リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス) と呼ばれるウイルスである。LCMV による感染実験は知見や材料が多く蓄積しており、たとえば使用する株によって、急性期のみで以後沈静化する感染と慢性化する感染の両方を誘導できる [10, 7, 9]。このような利点を活かして、LCMV 感染の実験データをベースにした定量的数理モデルがこれまでに提案されてきた [1, 33, 32, 16, 43, 19]。これまでの研究動向は [33] にまとめられているので、以下では [33] の内容を解説する。

3.1 *In vitro* 系

in vitro における感染 (標的) 細胞除去の定量的測定実験では、クロム酸ナトリウムの同位体を CTL の標的細胞に取り込ませてラベリングし、CTL によって破壊された場合にラベルが解放される原理を利用する。感染細胞除去率の推定に用いる定量的数理モデルを構築する際、酵素反応論と類似のアイ

ディアに従って CTL による標的細胞の破壊を定式化する方法がしばしば用いられている。すなわち、CTL が標的細胞と複合体を形成して標的細胞を破壊する過程を、酵素を介した複合体形成と化学反応に対比させる。このとき、CTL による標的細胞除去は次のように模式化される。

$$C + T \rightleftharpoons CT \rightarrow C + T^*. \quad (3.1)$$

ここで C は CTL, T は CTL の標的細胞 (target cell), CT は CTL と標的細胞の複合体, T^* は Fas/FasL を介したアポトーシスシグナルや CTL が分泌したパーフォリンやグランザイムによって溶解した標的細胞を表す。(3.1) を定式化することで、目的とする数理モデルが得られる。

近年では、CTL と標的細胞の複合体を顕微鏡で観察することが可能になったため、標的細胞除去率を直接的に求めることが可能になった。これをうけて、標的細胞を破壊するまでの時間を推定する統計モデルも考えられており、酵素反応論によるアプローチでは得られない情報を得ることができる。

3.2 *In vivo* 系

in vivo における感染細胞除去率の定量的な測定は、(i) MHC クラス上のウイルスエピトープを観察することで標的細胞の消失率を測定する方法と (ii) 突然変異株の種数を数える方法が知られている。(i) では、蛍光染色した感染細胞と CTL をマウスに注射し、二次免疫器官である脾臓において CTL の感染細胞除去率を推定する。観測時点毎にマウスから脾臓を摘出してフローサイトメーターで感染細胞数を測定した後、定量的数理モデルによって除去率を推定する。

in vitro 系と比べ、*in vivo* 系では CTL の脾臓への移動を考慮しなければならず、脾臓

への移動がどれだけ成功したかも評価した上で除去率を推定しなければならない。推定値は数理モデルの詳細にも依存し、たとえば CTL と標的細胞との接触を表す項 (接触項) の関数型が違えば、推定値も大きく変化し得る。接触項として (細胞・CTL) 密度に関する双線型 (mass-action 法則)、細胞密度に関する飽和型 (Holling type II 型の飽和関数)、もしくは線型関数がしばしば用いられるが、除去率の推定値は 3 者間で有意に異なることが報告されている [43]。

方法 (ii) では、CTL による免疫応答をエスケープ (抗原エピトープの変異) するウィルスの特性を利用する [5]。\$x\$ を免疫応答からエスケープした mutant の virus load, \$y\$ を免疫応答で抑制されている wild type の virus load とする。CTL による免疫応答のエスケープを考慮したウィルスのダイナミクスは

$$\begin{aligned}\frac{dy}{dt} &= ay - by - cy, \\ \frac{dx}{dt} &= a'x - bx\end{aligned}$$

によって記述される。ここで \$a, a'\$ はそれぞれ wild-type, mutant の増殖率で、両者共に同じ速度 \$b\$ で減少すると仮定する。別のウィルス増殖実験で予め wild-type と mutant 間の増殖率の差 \$a - a'\$ を推定しておく。ここで、mutant のエスケープ率は wild-type と mutant の増殖率の差 \$a' - b - (a - b - c) = c - (a - a')\$ に一致する。virus の減少率 \$b\$ は別の実験や文献から推定することが可能なので、実験で得られた virus load から CTL による感染細胞除去率 \$c\$ を決定できる。

なお、方法 (i) と (ii) それぞれで得られた感染細胞の除去率を比較すると、推定値が 2 桁程違うとの報告がある。これは、結果が実験デザインやモデリング方法の違いに大きく左右されることを示唆している。

4 その他の数理モデル

近年発表された [19] では、3 次元空間セルオートマトンによって脾臓の T 細胞領域における抗原提示細胞と CTL の接触をモデリングし、CTL による感染細胞除去率を推定している。感染細胞除去以外にも、CTL のダイナミクスは多方面から研究されている [38]。たとえば、CTL は抗原刺激を持続的に受けなくても、一度の刺激を受けた後に数回にわたって細胞分裂できるメカニズム (programmed cell proliferation) によって増殖する可能性が示され、実験と数理モデルを用いた研究が行われている [2, 38]。

HIV 感染症における CTL の役割は、M.A. Nowak [30], D. Wodarz [38] や A.S. Perelson グループによって精力的に研究されてきた。その他、SIV (Simian immunodeficiency virus) 感染における CTL の効率を定量的に推定した論文 [29] もある。

T 細胞が十分に活性化されるためには、樹状細胞 (DC) と接触して抗原提示を受ける必要がある。細胞のイメージング技術によって、樹状細胞と T 細胞の接触時間を測定できるようになった。このため、近年では接触時間を推定するための数理モデルと統計モデルがそれぞれ提案されている [6]。

サイトカインの刺激に応じて、シグナル伝達系の上流に位置する JAK/STAT 経路が活性化されるが、局所環境中に存在するサイトカインの種類によって、複数ある JAK と STAT の中から特定の組み合わせが選択され、T 細胞が活性化される。JAK/STAT シグナル伝達経路に関しては、詳細まで取り込んだ大規模な微分方程式系が構築されている [39, 40, 35]。制御性 T 細胞の個体群動態に関する定性的性質を調べた論文として [15] がある。胸腺内における T 細胞の分化に関する数理モデルは [36] が知られている。CTL

や B 細胞が効率よく抗原を除去する上で重要な役割を果たすヘルパー T 細胞 (CD4⁺) に関する理論研究は、とりわけ細胞分化を中心に研究が行われている (たとえば [41] 参照). T 細胞の恒常的な増殖 (homeostatic proliferation) を記述した定量的数理モデルに関する研究は [23] 参照.

5 まとめと今後の展望

3 節では, CTL による感染細胞除去率の推定を意図してデザインされた定量的測定実験と数理モデルを用いた研究を紹介したが, 推定値は実験デザインや数理モデル構築に必要な前提条件に大きく左右される可能性が示唆されている. 一連の先行研究は, 数理モデル活用の可能性を示した一方で, 同時にその適用の難しさも示している.

CTL と感染細胞の接触を表す関数型の違いによっても, 得られる推定値が有意に異なることから, 特定の関数型を仮定せずに感染細胞の除去率を推定し, 結果を比較することが重要だと考えられる. たとえば [19] では, セルオートマトンを用いることで特定の関数型を仮定することなく CTL と感染細胞の接触を表現し, シミュレーションデータから除去率を推定している. その他, 生態学の分野では, 密度依存の増殖や死亡率の関数型を仮定せずにフィールドデータからノンパラメトリック回帰を用いて密度依存の増殖・死亡率を推定する方法が開発されており, semi-mechanistic model と呼ばれている [14]. 今後, 新しい実験デザインと数理科学的手法を活用し, 研究間の違いを比較することで, 推定値の妥当性を検討する研究が更に発展していくと考えられる.

免疫応答の担い手であるその他の重要な細胞群 (マクロファージ, 樹状細胞や制御性

T 細胞) や, 細胞分化途中にあるリンパ球に関して, 定量的数理モデルを用いた研究はほとんど知られていない. すなわち, T 細胞以外の免疫応答を数理モデル化することは, 必然的に新規性の高い仕事になる. 免疫学の分野において, 数理モデルを積極的に活用している実験ラボもまだまだ少ないのが現状である. 今後, 学際的に融合研究を推進していくことがますます重要になっていくと考えられる.

参考文献

- [1] C. L. Althaus, V. V. Ganusov, and R. J. D. Boer. Dynamics of CD8⁺ T cell responses during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol*, **179**, pp.2944–2951, (2007).
- [2] R. Antia, C. T. Bergstrom, S. S. Pilyugin, S. M. Kaech, and R. Ahmed. Models of CD8⁺ responses: 1. What is the antigen-independent proliferation program. *J Theor Biol*, **221**, pp.585–598, (2003).
- [3] B. Asquith, J. A. M. Borghans, V. V. Ganusov, and D. C. Macallan. Lymphocyte kinetics in health and disease. *Trends Immunol*, **30**, pp.182–189, (2009).
- [4] B. Asquith, C. Debacq, D. C. Macallan, L. Willems, and C. R. M. Bangham. Lymphocyte kinetics: the interpretation of labelling data. *Trends Immunol*, **23**, pp.596–601, (2002).
- [5] B. Asquith, C. T. T. Edwards, M. Lipsitch, and A. R. McLean. Inefficient cytotoxic T lymphocyte-mediated killing of HIV-1-infected cells in vivo. *PLoS Biol*, **4**, pp.e90, (2006).
- [6] J. B. Beltman, S. E. Henrickson, U. H. von Andrian, R. J. de Boer, and A. F. M. Marée. Towards estimating the true duration of dendritic cell interactions with T cells. *J Immunol Methods*, **347**, pp.54–69, (2009).
- [7] J. N. Blattman, R. Antia, D. J. D. Sourdive, X. Wang, S. M. Kaech, K. Murali-Krishna, J. D. Altman, and R. Ahmed. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med*, **195**, pp.657–664, (2002).

- [8] R. J. D. Boer, V. V. Ganusov, D. Milutinović, P. D. Hodgkin, and A. S. Perelson. Estimating lymphocyte division and death rates from CFSE data. *Bull Math Biol*, **68**, pp.1011–1031, (2006).
- [9] R. J. D. Boer, D. Homann, and A. S. Perelson. Different dynamics of CD4+ and CD8+ T cell responses during and after acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol*, **171**, pp.3928–3935, (2003).
- [10] R. J. D. Boer, M. Oprea, R. Antia, K. Murali-Krishna, R. Ahmed, and A. S. Perelson. Recruitment times, proliferation, and apoptosis rates during the CD8(+) T-cell response to lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol*, **75**, pp.10663–10669, (2001).
- [11] R. Busch, R. A. Neese, M. Awada, G. M. Hayes, and M. K. Hellerstein. Measurement of cell proliferation by heavy water labeling. *Nat Protoc*, **2**, pp.3045–3057, (2007).
- [12] R. J. De Boer and A. S. Perelson. Estimating division and death rates from CFSE data. *J. Comput. Appl. Math.*, **184**, pp.140–164, (2005).
- [13] E. K. Deenick, A. V. Gett, and P. D. Hodgkin. Stochastic model of T cell proliferation: a calculus revealing IL-2 regulation of precursor frequencies, cell cycle time, and survival. *J Immunol*, **170**, pp.4963–4972, (2003).
- [14] S. P. Ellner, Y. Seifu, and R. H. Smith. Fitting population dynamic models to time-series data by gradient matching. *Ecology*, **83** pp.2256–2270, (2002).
- [15] D. Fouchet and R. Regoes. A population dynamics analysis of the interaction between adaptive regulatory T cells and antigen presenting cells. *PLoS One*, **3**, pp.e2306, (2008).
- [16] V. V. Ganusov and R. J. D. Boer. Estimating in vivo death rates of targets due to CD8 T-cell-mediated killing. *J Virol*, **82**, pp.11749–11757, (2008).
- [17] V. V. Ganusov, D. Milutinović, and R. J. D. Boer. IL-2 regulates expansion of CD4+ T cell populations by affecting cell death: insights from modeling CFSE data. *J Immunol*, **179**, pp.950–957, (2007).
- [18] V. V. Ganusov, S. S. Pilyugin, R. J. de Boer, K. Murali-Krishna, R. Ahmed, and R. Antia. Quantifying cell turnover using CFSE data. *J Immunol Methods*, **298**, pp.183–200, (2005).
- [19] F. Graw and R. R. Regoes. Investigating CTL mediated killing with a 3D cellular automaton. *PLoS Comput Biol*, **5**, pp.e1000466, (2009).
- [20] E. D. Hawkins, M. L. Turner, M. R. Dowling, C. van Gend, and P. D. Hodgkin. A model of immune regulation as a consequence of randomized lymphocyte division and death times. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, pp.5032–5037, (2007).
- [21] M. K. Hellerstein. Measurement of T-cell kinetics: recent methodologic advances. *Immunol Today*, **20**, pp.438–441, (1999).
- [22] K. León, J. Faro, and J. Carneiro. A general mathematical framework to model generation structure in a population of asynchronously dividing cells. *J Theor Biol*, **229**, pp.455–476, (2004).
- [23] C.-R. Li, S. Santoso, and D. D. Lo. Quantitative analysis of T cell homeostatic proliferation. *Cell Immunol*, **250**, pp.40–54, (2007).
- [24] T. Luzyanina, S. Mrusek, J. T. Edwards, D. Roose, S. Ehl, and G. Bocharov. Computational analysis of CFSE proliferation assay. *J Math Biol*, **54**, pp.57–89, (2007).
- [25] T. Luzyanina, D. Roose, T. Schenkel, M. Sester, S. Ehl, A. Meyerhans, and G. Bocharov. Numerical modelling of label-structured cell population growth using CFSE distribution data. *Theor Biol Med Model*, **4** pp.26, (2007).
- [26] A. B. Lyons. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods*, **243**, pp.147–154, (2000).
- [27] D. C. Macallan, B. Asquith, Y. Zhang, C. de Lara, H. Ghattas, J. Defoiche, and P. C. L. Beverley. Measurement of proliferation and disappearance of rapid turnover cell populations in human studies using deuterium-labeled glucose. *Nat Protoc*, **4**, pp.1313–1327, (2009).
- [28] D. C. Macallan, C. A. Fullerton, R. A. Neese, K. Haddock, S. S. Park, and M. K. Hellerstein. Measurement of cell proliferation by labeling of DNA with stable isotope-labeled glucose: studies in vitro, in animals, and in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, pp.708–713, (1998).
- [29] J. N. Mandl, R. R. Regoes, D. A. Garber, and M. B. Feinberg. Estimating the effectiveness of simian immunodeficiency virus-specific CD8+ T cells from the dynamics of viral immune escape. *J Virol*, **81**, pp.11982–11991, (2007).

- [30] M. A. Nowak and R. M. May. *Virus Dynamics: the Mathematical Foundations of Immunology and Virology*. Oxford University Press, (2000).
- [31] S. S. Pilyugin, V. V. Ganusov, K. Murali-Krishna, R. Ahmed, and R. Antia. The rescaling method for quantifying the turnover of cell populations. *J Theor Biol*, **225**, pp.275–283, (2003).
- [32] R. R. Regoes, D. L. Barber, R. Ahmed, and R. Antia. Estimation of the rate of killing by cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, pp.1599–1603, (2007).
- [33] R. R. Regoes, A. Yates, and R. Antia. Mathematical models of cytotoxic T-lymphocyte killing. *Immunol Cell Biol*, **85**, pp.274–279, (2007).
- [34] P. Revy, M. Sospedra, B. Barbour, and A. Trautmann. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol*, **2**, pp.925–931, (2001).
- [35] E. Shudo, J. Yang, A. Yoshimura, and Y. Iwasa. Robustness of the signal transduction system of the mammalian JAK/STAT pathway and dimerization steps. *J Theor Biol*, **246**, pp.1–9, (2007).
- [36] V. Thomas-Vaslin, H. K. Altes, R. J. de Boer, and D. Klatzmann. Comprehensive assessment and mathematical modeling of T cell population dynamics and homeostasis. *J Immunol*, **180**, pp.2240–2250, (2008).
- [37] S. A. Weston and C. R. Parish. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods*, **133**, pp.87–97, (1990).
- [38] D. Wodarz. *Killer Cell Dynamics: Mathematical and Computational Approaches to Immunology*. Springer, (2006).
- [39] S. Yamada, S. Shiono, A. Joo, and A. Yoshimura. Control mechanism of JAK/STAT signal transduction pathway. *FEBS Lett*, **534**, pp.190–196, (2003).
- [40] S. Yamada, J. Tsukada, A. Yoshimura, and M. Kubo. Computer simulation of the role of SOCS family protein in helper T cell differentiation. *Int Immunol*, **18**, pp.335–345, (2006).
- [41] A. Yates, R. Callard, and J. Stark. Combining cytokine signalling with T-bet and GATA-3 regulation in Th1 and Th2 differentiation: a model for cellular decision-making. *J Theor Biol*, **231**, pp.181–196, (2004).
- [42] A. Yates, C. Chan, J. Strid, S. Moon, R. Callard, A. J. T. George, and J. Stark. Reconstruction of cell population dynamics using CFSE. *BMC Bioinformatics*, **8** pp.196, (2007).
- [43] A. Yates, F. Graw, D. L. Barber, R. Ahmed, R. R. Regoes, and R. Antia. Revisiting estimates of CTL killing rates in vivo. *PLoS One*, **2**, pp.e1301, (2007).
- [44] 中岡慎治, 滝久雄, 合原一幸. 免疫系に関する数理モデル研究. *生産研究*, **62**, pp.39–44, (2010).