



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	細菌性腎臓病原因菌 <i>Renibacterium salmoninarum</i> の検出における PCR の限界
Author(s)	奥田, 律子; 西澤, 豊彦; 吉水, 守
Citation	魚病研究, 43(1), 29-33 https://doi.org/10.3147/jsfp.43.29
Issue Date	2008-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38379
Type	journal article
File Information	yoshimizu-281.pdf



細菌性腎臓病原因菌 *Renibacterium salmoninarum* の 検出における PCR の限界

奥田律子^{1,2}・西澤豊彦¹・吉水 守^{1*}

(2007年 8 月22日受付)

Limited Availability of PCR for the Detection of *Renibacterium salmoninarum*, the Causative Agent of Bacterial Kidney Disease

Ritsuko Okuda^{1,2}, Toyohiko Nishizawa¹ and Mamoru Yoshimizu^{1*}

¹Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, 041-8611, Japan

²Japan Fisheries Resource Conservation Association, Tokyo 104-0054, Japan

(Received August 22, 2007)

ABSTRACT—Detection limit of PCR was investigated for *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease, with a logarithmic growth phase. When genomic DNAs from serially diluted bacterial cells were subjected to PCR, the minimum concentration by PCR-detection with 30, 35 and 40 cycles of amplification were all 10^5 cells/mL, and the sensitivity was not improved by treatments of the bacteria with lysozyme, achromopeptidase and/or SDS. The extraction rate of genomic DNAs from the bacterial cells was approximately 3%. It was confirmed that PCR-detection limit for *R. salmoninarum* cells mixed with fish kidney tissues was significantly lower than that for the bacteria suspended in the medium. Moreover, there was no significant difference in the detection limit between immunofluorescence antibody technique (IFAT) and PCR. These results suggest that PCR detection should be followed by other methods such as IFAT.

Key words: *Renibacterium salmoninarum*, bacterial kidney disease, BKD, PCR, IFAT

細菌性腎臓病 (bacterial kidney disease: BKD) は、北米、ヨーロッパ、南米および日本で発生し、サケ・マス類に甚大な被害をもたらす疾病である (Fryer and Sanders, 1981; Wiens and Kaattari, 1999)。わが国では、1973年に北海道のマスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* で初めて BKD の発生が確認され、その後本州のギンザケ *O. kisutch* を中心に BKD が発生し (木村・栗倉, 1977)、現在では日本各地のサケ・マス養魚場で問題となっている。BKD 罹病魚には、体色黒化、腹部膨満、眼球突出および点状出血が見られ、主に腎臓、脾臓および

肝臓に白斑状の結節様病変が観察される (早川ら, 1989; Wiens and Kaattari, 1999)。BKD の原因菌である *Renibacterium salmoninarum* (R.s.) は、グラム陽性の短桿菌 ($0.3\sim0.5\ \mu\text{m} \times 0.8\sim1.0\ \mu\text{m}$) で、しばしば双桿状を呈する (Fryer and Sanders, 1981)。R.s. の分離培地として、システイン血液寒天培地 (KDM-1; Ordal and Earp, 1956) および KDM-2 培地 (Evelyn, 1977) が用いられる。また、KDM-2 培地に含まれる牛胎児血清の代わりに活性炭を用いた KDM-C 培地 (Daly and Stevenson, 1985) や KDM-2 培地に各種抗生物質を添加した S-KDM 培地 (Austin *et al.*, 1983; Gudmundsdóttir *et al.*, 1991) も報告されている。しかしながら、何れの培地においても R.s. がコロニーを形成するまで通常で 2 週間以上、不顕性感染魚からの分離では

¹ 北海道大学大学院水産科学研究学院

² 社団法人日本水産資源保護協会

* Corresponding author

E-mail: yosimizu@fish.hokudai.ac.jp

4ヶ月以上を要することもある (Benediktsdóttir *et al.*, 1991)。そのため、本菌の検出には、蛍光抗体法 (IFAT: Bullock and Stuckey, 1975) や Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA: Pascho and Mulcahy, 1987) などの免疫学的手法、さらに R.s. の菌表在蛋白質である p57 あるいは 16S rRNA を標的とした PCR および RT-PCR 等の分子生物学的手法も用いられる (Brown *et al.*, 1994; Magnússon *et al.*, 1994)。

ところで、近年、北海道内のサクラマス養魚場で飼育中の幼魚において BKD による減耗が認められ問題になっている。奥田ら (2006) は、サクラマス養魚場で実施した抗 R.s. 抗体検出調査により、健康幼魚の一部が抗 R.s. 抗体を有し、その陽性率が夏から秋にかけて上昇すること、また遡上親魚の抗 R.s. 抗体陽性率も催熟蓄養中に上昇することから、スモルト生産幼魚および遡上親魚間で R.s. の感染環が成立している可能性を指摘した。一方で、Chase and Pascho (1998) は、PCR で数細胞の R.s. が検出可能と報告しているが、これまで我々が実施した R.s. の疫学調査で、抗 R.s. 抗体陽性で明らかに R.s. 感染履歴を有すると考えられる健康幼魚群および親魚群から PCR により R.s. が検出された例は極めてまれであったため、抗体検出 ELISA と PCR 結果の整合性が得られず、R.s. 感染環の解明を困難にしていた。

そこで本研究では、感染初期あるいは不顕性感染魚など R.s. が微量しか存在しない状況での PCR による検出の限界について検証するため、対数増殖期の R.s. 細胞を用い、PCR による R.s. の検出感度を改めて検証した。

材料および方法

供試菌

本研究では、北海道内 BKD 罹病サクラマス幼魚由来の R.s. Tok46 株を用いた。R.s. は、KDM-2 液体培地 (1% peptone, 0.05% yeast extract, 0.1% cysteine-HCl, 10% FBS; Evelyn, 1977) を用い 15°C で振盪培養 (100 rpm) した。

R.s. の増殖曲線と総菌数

R.s. の増殖曲線は、KDM-2 液体培地に接種した細菌の濁度を経時的に測定し作成した。即ち、対数増殖期にある R.s. (OD_{620} : 0.5) を KDM-2 液体培地に 1/100 量接種後 15°C で 15 日間振盪培養 (100 rpm) し、経時的に培養液の濁度 (OD_{620}) を測定した。また、 OD_{620} : 0.5 付近まで培養した R.s. を採取し、ズダンブラック染色フィルターに集菌した。なお、ズダンブラック染色フィルターは、メンブレンフィルター (0.2 μ m, Whatman) をズダンブラック B 溶液 (50% エタノールで 0.1% に溶解したズダンブラック B (和光); 0.2 μ m メンブレンフィルターで濾過) で染色 (遮光、一晚) した後、滅菌濾過 DW

で洗浄したものをを用いた。フィルターに PBS で 50 倍に希釈した抗 R.s. 家兎血清を 50 μ L 滴下した後 37°C で 30 分間反応させ、PBS で 50 倍に希釈した FITC 標識抗ウサギ Ig ブタ血清 (Dako) を 50 μ L 滴下し 37°C で 30 分間反応させ、R.s. を蛍光染色した。未反応血清を PBS で洗浄した後、グリセリン緩衝液 (0.5 M 炭酸-重炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) で作製した 90% グリセリン) で封入後、蛍光顕微鏡 (BX51, オリンパス) で観察し、1,000 倍下で 50 視野観察したときの R.s. 細胞数を測定し、1 視野当たりの平均細胞数からフィルター全面の R.s. 細胞数を推定し、培養液 1 mL 中の総菌数を算出した。

R.s. の溶菌処理

KDM-2 液体培地で OD_{620} : 0.5 となるよう培養した R.s. を用い、TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) で 10 倍希釈列を作製後、リゾチーム (終濃度 1 mg/mL および 10 mg/mL)、アクロモペプチダーゼ (終濃度 0.5 mg/mL) およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS, 1%) を加え、以下の手順で溶菌処理した。リゾチーム添加では 37°C で 1 時間、アクロモペプチダーゼ添加では 55°C で 1 時間処理した。リゾチーム、アクロモペプチダーゼおよび SDS 処理の場合は、リゾチームおよびアクロモペプチダーゼ添加後 55°C で 30 分間処理し、次いで SDS を添加した後 70°C で 30 分間処理し、各々を後述の PCR に供した。

核酸抽出および PCR

R.s. 懸濁液では、TE-飽和フェノール抽出を 2 回、クロロホルム・イソアミルアルコール混液 (24:1) 抽出を 1 回行った後、遠心分離 (12,000 $\times g$, 5 分) により得た水層 1 μ L を PCR に供した。なお、SDS を添加した試料では、エタノール沈殿により SDS を除去した後、得られた核酸を所定量の TE に溶解し PCR に供した。一方、腎臓組織を添加した R.s. 懸濁液からの核酸抽出は、野中ら (1998) の RNase-PEG 沈法に従った。SPF サクラマスから摘出した腎臓組織 (20~50 mg) および所定量の R.s. を 1 mg/mL リゾチーム含 TE 300 μ L で磨砕後 37°C で 1 時間処理し、プロテナーゼ K および SDS を各々 1 mg/mL および 1% (w/v) となるよう加え 37°C で 30 分間処理した。フェノール抽出 (2 回) およびクロロホルム・イソアミルアルコール混液 (24:1) 抽出 (1 回) の後、水層を回収した。エタノール沈殿により得た核酸を 20 μ g/ μ L RNase A 含 TE に溶解し 37°C で 30 分間処理した後、1/2 量の 20% (w/v) ポリエチレングリコール (PEG-6000)-2.5 M NaCl 溶液を加え攪拌後、氷冷で 1 時間処理し、遠心分離 (12,000 $\times g$, 5 分, 4°C) により得られた沈殿核酸を 70% エタノールで洗浄・乾燥させた後、TE に溶解した。なお、核酸濃度は何れも UV 吸光

度法により求めた。

PCR による *R.s.* 遺伝子の検出には, Brown *et al.* (1994) の報告に従い, *R.s.* の菌表在蛋白質である p57 遺伝子領域 (501 bp) を標的とした PCR プライマー, Rs1 (5'-CAA GGT GAA GGG AAT TCT TCC ACT-3') および Rs2 (5'-GAC GGC AAT GTC CGT TCC CGG TTT-3') を用いた。抽出核酸液 1 μ L を含む 25 μ L の PCR 反応液 (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% TritonX-100, 0.2 mM dNTPs, 0.625 U Taq DNA polymerase (Promega), 0.4 μ M primers) 中で標的遺伝子の増幅を行った。増幅反応は, まず 72°C で 10 分間および 95°C で 5 分間反応させた後, 95°C で 40 秒間, 48°C で 40 秒間および 72°C で 40 秒間の反応を 1 サイクルとして 35 サイクル行い, さらに 72°C で 5 分間反応させた。PCR 産物は, 1.5% アガロース-TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) ゲル電気泳動の後, エチジウムブロマイドで染色し, UV 照射下で観察した。なお, 遺伝子増幅は, 35 サイクルを基本とし適宜変更した。

蛍光抗体法 (immunofluorescence antibody technique: IFAT)

KDM-2 液体培地で OD₆₂₀: 0.5 となるよう培養した *R.s.* を用い, PBS で 10 倍希釈液を作製後, 各々 10 μ L をスライドガラスに滴下し, 自然乾燥した後火炎固定した。上述と同様に, PBS で 50 倍に希釈した抗 *R.s.* 家兎血清および FITC 標識抗ウサギ Ig グタ血清で処理し, グリセリン緩衝液で封入後, 蛍光顕微鏡で観察した。なお, 判定は 1,000 倍下で 50 視野検鏡し, FITC 陽性菌体が確認された場合を *R.s.* 陽性とした。

結果および考察

対数増殖期にある *R.s.* (OD₆₂₀: 0.5) を KDM2 液体培地で 100 倍に希釈し 15°C で振盪培養した時の濁度の推移を Fig. 1. に示した。培養 2 ~ 3 日目から濁度が上昇し始め 7 日目には OD₆₂₀: 1.7 まで達したが, その後濁度の上

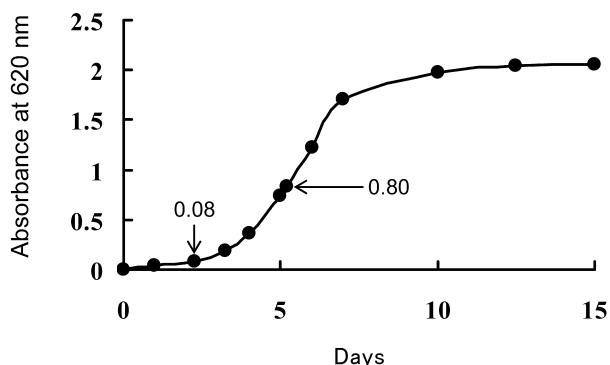


Fig. 1. Growth curve of *R. salmoninarum* in KDM-2 broth medium at 15°C at 100 rpm.

昇は認められなかった。なお, 培養約 5 日間で *R.s.* は OD₆₂₀ が 0.005 から 0.5 まで増殖したことから, KDM-2 液体培地を用い 15°C で振盪培養した *R.s.* は 120 時間を要して 100 倍 (2^{6.6} 倍) に増殖したことになり, *R.s.* の世代時間は約 18 時間と算出された。培養液を集菌し IFAT により *R.s.* 菌数を計数したところ, OD₆₂₀: 0.5 における *R.s.* 総菌数は約 10⁹ cells/mL であった。また, *R.s.* は少なくとも OD₆₂₀ が 0.08 ~ 0.80 では対数増殖期にあり, この範囲において *R.s.* の総菌数は生菌数と等しいと考えられた。

対数増殖期の *R.s.* 細胞を用いての PCR では, 検出限界は 25 および 30 サイクルの増幅で各々 10⁶ cells/mL および 10⁵ cells/mL であったが, 35 サイクル以上増幅しても *R.s.* が 10⁵ cells/mL 以上存在しないと検出されないことが示された (Table 1)。したがって, 本 PCR の検出感度は, 患部に多数の *R.s.* が存在する病魚等からの検出では支障ないが, 感染初期あるいは不顕性感染魚のように *R.s.* が微量しか存在しない場合では明らかに不十分であると考えられた。ところで, 本 PCR の標的とする p57 遺伝子は, 細胞当たり 3 コピー存在する (Rhodes *et al.*, 2004)。本実験結果では, 1 反応当たり 1 μ L の抽出核酸液を供した PCR での *R.s.* の検出限界が 10⁵ cells/mL であったことから, PCR の検出限界は 1 反応あたり 3 × 10² (300) コピーと算出される。結果には示さなかったが, クローニングした同標的遺伝子を対象にした場合, 本 PCR で約 10 コピーの標的遺伝子が安定的に検出可能であることを確認している。また, 本実験に供した *R.s.* 懸濁液は TE で十分に希釈されていたことから, PCR 反応阻害物質による検出感度への影響も無いと考えられた。にもかかわらず, *R.s.* 生菌を用いた本 PCR の検出限界が 300 コピー程度と算出されたことは, *R.s.* の核酸抽出効率が 3% 程度であることを示唆する結果であると考えられた。*R.s.* はグラム陽性菌であり, 一般的にグラム陽性菌はグラム陰性菌に比べ核酸抽出効率が極めて低いことが知られている。そこで, リゾチームの濃度を上げて溶菌処理を施したが, *R.s.* の検出限界は 10⁵ cells/mL であり, さらに, アクロモペプチターゼおよび SDS を用いた溶菌処理によっても, 大幅な検出感度の改善は認められなかった (Table 2)。

Table 1. Detection limits of *R. salmoninarum* by PCR with different amplification cycles

Number of amplified cycles	Total count (cells/mL)			
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
25	+	+ _w * ¹	—	—
30	NT* ²	+	+ _w	—
35	NT	+	+ _w	—
40	NT	+	+ _w	—

*¹: weakly positive, *²: not tested.

Table 2. Effect of bacteriolysis enzymes and agents on extraction of nucleic acids from *R. salmoninarum* cells

Enzyme and reagent	Total count (cells/mL)			
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
Lysozyme (1 mg/mL)	+	+	+ _w *	—
Lysozyme (10 mg/mL)	+	+	+ _w	—
Achromopeptidase (0.5 mg/mL)	+	+	+ _w	—
Lysozyme (1 mg/mL) + Achro- mopeptidase (0.5 mg/mL) + SDS (1%)	+	+	+	—

*: weakly positive.

次いで、腎臓組織からの R.s. 検出を想定し、SPF サクラマスから摘出した直後の腎臓組織（20～50 mg）に対数増殖期にある R.s. を所定量添加し、フェノール・クロロホルム法により核酸抽出した後 PCR に供した。その結果、詳しいデータは示さないが、R.s. は全く検出されなくなり、腎臓組織からの R.s. 検出感度は大幅に低下することが明らかになった。PCR では、抽出核酸液に組織由来 RNA や不純物が多量に混在することで標的遺伝子の増幅反応が阻害されるが、この問題は RNase-PEG 沈法による核酸抽出を行うことで大幅に改善される（野中ら、1998）。本研究においても RNase-PEG 沈法を用いることにより、35 サイクル増幅で 10⁵ cells/mL 以上の R.s. が検出可能となった（Table 3）。なお、RNase-PEG 沈法の各操作段階における腎臓組織からの抽出核酸量を比較した結果、RNase 処理前では 10～12 μg/μL であったのに対し、RNase 処理および PEG 沈殿後には、0.1～1.0 μg/μL となった。したがって、腎臓組織からの PCR による R.s. 検出では、多量の夾雑 RNA により検出感度が低下する可能性があり、標的核酸を効率良く抽出することが重要であることが改めて確認された。

Brown *et al.* (1994) および Chase and Pascho (1998) は、PCR で 1～数細胞の R.s. が検出可能と報告している。しかしながら、微量 R.s. の培養は極めて困難

Table 3. PCR-detection limit for *R. salmoninarum* from kidney tissue by RNase-PEG extraction

Total count (cells/50 mg tissue)			
10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
+	+	+	—

Table 4. Detection limit of *R. salmoninarum* by IFAT

Experiment	Total count (cells/mL)		
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
1	+	+	+
2	+	+	—

であるため、現在のところ供試検体中の R.s. 生細胞数を正確に把握することは困難である。さらに、CFU 法により標的細胞数を求めた場合、死菌から抽出された標的遺伝子数を正確に把握し、その影響を排除することは困難であると考えられる。そこで、本研究では対数増殖期にある R.s. を用いることで、濁度と総菌数の関係から生菌数を推定し、R.s. からの核酸抽出効率が数%程度であることを明らかにした。さらに、グラム陽性菌である R.s. においては、各種溶菌酵素あるいは溶菌剤を用いても、核酸抽出効率の改善が期待できないことを示した。Chase and Pascho (1998) や Magnésson *et al.* (1994) は、RT-PCR や nested-PCR を用いることで、その検出感度が改善されることを報告している。確かに、これらの方法により検出限界の改良が期待できるが、PCR でも十数コピー程度の標的遺伝子が検出可能であることから、nested-PCR を用いたとしても検出感度は10倍程度しか改善されないと考えられる。また、RT-PCR により mRNA を標的とした場合においても、腎臓組織由来の mRNA が多量に抽出されること、核酸抽出効率が改善されていないことを考慮すると、検出感度の大幅な改善は期待出来ないと考えられる。

最後に、IFAT による R.s. 検出感度について検証したところ、約 10⁴ cells/mL であった（Table 4）。近年、分子生物学的手法の普及により、手軽に PCR が行えるようになったが、少なくとも R.s. の検出においては、PCR による検出感度は決して高感度ではなく、蛍光抗体法と同程度であることが改めて確認された。すなわち、BKD 発症魚からの R.s. 検出あるいは分離培養された R.s. の迅速同定においては、PCR は極めて有用な方法であるが、IFAT でも代用可能であり、感染初期あるいは不顕性感染魚など R.s. が微量にしか存在しない場合には、PCR を過信することなく、IFAT を併用すべきであると考ええる。さらに、奥田ら（2006）は、北海道内のサクラマス養魚場における抗 R.s. 抗体検出調査により、健康幼魚群および遡上親魚群から抗 R.s. 抗体を検出しているが、R.s. 感染履歴を有すると考えられるこれらの健康魚から PCR により R.s. が検出された例は極めて希であったため、抗体検出 ELISA と PCR 結果の整合性が得られなかったが、その原因の一つに R.s. 検出用 PCR の感度が予想以上に低かったことがあると考えられた。

文 献

- Austin, B., T. M. Embley and M. Goodfellow (1983): Selective isolation of *Renibacterium salmoninarum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **17**, 111–114.
- Benediktsdóttir, E., S. Helgason and S. Gudmundsdóttir (1991): Incubation time for the cultivation of *Renibacterium salmoninarum* from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodfish. *J. Fish Dis.*, **14**, 97–102.

- Brown, L. L., G. K. Iwama, T. P. T. Evelyn, W. S. Nelson and R. P. Levine (1994): Use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect DNA from *Renibacterium salmoninarum* within individual salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.*, **18**, 165–171.
- Bullock, G. L. and H. M. Stuckey (1975): Fluorescent antibody identification and detection of the *Corynebacterium* causing kidney disease of salmonids. *J. Fish. Res. Board Can.*, **32**, 2224–2227.
- Chase D. M. and R. J. Pascho (1998): Development of a nested polymerase chain reaction for amplification of a sequence of the p57 gene of *Renibacterium salmoninarum* that provides a highly sensitive method for detection of the bacterium in salmonid kidney. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 223–229.
- Daly, J. G. and R. M. W. Stevenson (1985): Charcoal agar, a new growth medium for the fish disease bacterium *Renibacterium salmoninarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 868–871.
- Evelyn, T. P. T. (1977): An improved growth medium for the kidney disease bacterium and some notes on using the medium. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, **87**, 511–513.
- Fryer J. L. and J. E. Sanders (1981): Bacterial kidney disease of salmonid fish. *Annu. Rev. Microbiol.*, **35**, 273–298.
- Gudmundsdóttir, S., S. Helgason and E. Benediktsdóttir (1991): Comparison of the effectiveness of three different growth media for primary isolation of *Renibacterium salmoninarum* from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodfish. *J. Fish Dis.*, **14**, 89–96.
- 早川 穰・原田隆彦・畑井喜司雄・窪田三朗・文谷俊雄・星谷 愿一 (1989): 海面養殖ギンザケにみられた細菌性腎臓病 (BKD) の病理組織学的研究. 魚病研究, **24**, 17–21.
- 木村喬久・栗倉輝彦 (1977): わが国で初めて見出された養殖サケ科魚類の細菌性腎臓病 (Bacterial Kidney Disease) について. 日水誌, **43**, 143–150.
- Magnússon, H. B., O. H. Fridjónsson, Ó. S. Andrússon, E. Benediktsdóttir, S. Gudmundsdóttir and V. Andrúsdóttir (1994): *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fish, detected by nested reverse transcription-PCR of 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4580–4583.
- 野中里佐・C. A., Venegas・西澤豊彦・室賀清邦 (1998): PRVD 検出用 PCR のための核酸抽出法. 魚病研究, **33**, 115–121.
- 奥田律子・西澤豊彦・吉水 守 (2006): 特異抗体を指標にしたサクラマス増養殖における感染環の推定. 魚病研究, **41**, 175–178.
- Ordal, E. J. and B. J. Earp (1956): Cultivation and transmission of the etiological agent of bacterial kidney disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **92**, 85–88.
- Pascho, R. J. and D. Mulcahy (1987): Enzyme-linked immunosorbent assay for a soluble antigen of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of salmonid bacterial kidney disease. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **44**, 183–191.
- Rhodes, L. D., A. M. Coady and R. K. Deinhard (2004): Identification of a third *msa* gene in *Renibacterium salmoninarum* and the associated virulence phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6488–6494.
- Wiens, G. D. and S. L. Kaattari (1999): Bacterial kidney disease (*Renibacterium salmoninarum*). In “Fish diseases and disorders: viral, bacterial and fungal infections, vol. 3.” (ed. Bby Woo, P.T.K. and D.W. Bruno). CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom, pp. 269–301.