

VNTR法を用いた結核分子疫学解析の有用性及び ミジット液体培地からの迅速検査法の検討について

平田 佐知 北野 隆一 木上 照子 鷺見 舞* 竹口 真帆** 堀 忍**
勝山 久美子*** 船越 瑞貴**** 中村 清康**** 伊東 寛人***** 佐藤 昭司

Molecular Epidemiological Availability of *Mycobacterium tuberculosis* by Using VNTR Analysis and Examination for Rapid Test Method with MIGIT Liquid Culture Medium

Sachi HIRATA Ryuichi KITANO Teruko KIGAMI Mai SUMI* Maho TAKEGUUCHI** Shinobu HORI**
Kumiko KATSUYAMA*** Mizuki FUNAKOSHI**** Kiyoyasu NAKAMURA***** Hiroto ITO***** Shoji SATO

2013年9月～2015年7月に新規登録された結核患者由来44菌株(山城北保健所管内35菌株、山城南保健所管内1菌株、丹後保健所管内8菌株)について、JATA(12)-VNTR (Japan Anti-Tuberculosis Association(12)-Variable Numbers Tandem Repeats)型別を実施し、過去5年間の127菌株と併せて、患者間の関連性を調査した。しかしながら、新たな患者間の関連性が認められた疫学的有効事例は確認されなかった。次に、保健所から搬入される結核菌株の大半はミジット液体培地で培養、保存されたものであり、ここから結核菌DNAを抽出する迅速検査法の有効性を検討した。この迅速検査法により、JATA(12)-VNTR型別を実施した結果、ミジット液体培地における培養及び保存期間が123日より短い場合に結核菌の小川培地培養後のJATA(12)-VNTR型別結果と同等な検査結果が得られた。

キーワード：結核菌、JATA(12)-VNTR型別、分子疫学、実地疫学調査

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*,

Japan Anti-Tuberculosis Association(12)-VNTR Typing, Molecular epidemiology, Field epidemiological survey.

はじめに

結核は、患者の咳やくしゃみによって飛沫感染し、主に肺疾患を引き起こす病気である。平成27年度国内の新規登録患者数は18,280人、死亡数は1,955人であり、1日あたり50人の患者が登録され、5人が命を落としている。

他の感染症と比較して、結核は感染してから発症するまでの潜伏期間が長く(6ヵ月から数十年)、早期発見が困難である。そのため、結核を減らすためには早期発見、適切な治療及び感染拡大の防止が重要である。

JATA(12)-VNTR型別は、結核菌株の遺伝子型を調べることによって、菌株間の関連性から患者間の関連性に科学的な根拠を付与することができる。また、遺伝子型別の照合により、地域の隠れた集団感染の発見、散发事例の確認、薬剤感受性の推定、そして患者が複数発生した事例における感染源、感染経路の解明といった結核感染防止対策への活用が期待されている。平成23年5月に一部改正された「結核に関する特定感染症予防指針の一部改正について」(平成23年5月

16日付け厚生労働省健康局結核感染症課長通知(健感発0516第1号))には、国、地方公共団体、医療関係者、民間団体等が連携して取り組むべき課題として、患者発生動向調査の一層の充実、薬剤感受性検査及び分子疫学的サーベイランス体制の構築や研究推進の必要性があると明記されている¹⁾。

そこで、当所では、平成23年よりJATA(12)-VNTR型別による患者間の関連性調査を開始した。平成27年度までに127菌株のJATA(12)-VNTR型別を行い、その結果と実地疫学調査結果とを比較した9事例、17菌株について表1に示す。

本研究では、平成25年9月～平成27年7月に新規登録された結核患者由来44菌株(山城北保健所管内35菌株、山城南保健所管内1菌株、丹後保健所管内8菌株)についてJATA(12)-VNTR型別を実施し、得られた結果と過去5年間の127菌株の結果を併せて比較し、JATA(12)-VNTR型が完全に一致するグループ(以下「クラスター」という)を同一クラスターとして分類(クラスター型：1～18)し、各々のクラスターに属する菌株について実地疫学調査を実施した。さらに、和田らの報告した阪神地域において出現頻度の高いJATA(12)-VNTR型(以下「和田らの分類」という)²⁾について、本報で報告したクラスター型と比較した。

保健所経由で搬入される結核菌株の大半は、医療機関で喀痰等を接種、培養し、臨床診断に用いられた後のミジット液体培地でそのまま保存されたもの³⁾であり、現在はここから小川培地に再接種、培養したものを材料として結核菌DNAを抽出し、JATA(12)-VNTR型別を実施している。しかしながら、小川培地における培養は、通常6週間程度を要し、

(平成28年9月30日受理)

*京都府乙訓保健所

**京都府山城北保健所

***京都府山城南保健所

****京都府丹後保健所

*****京都府健康福祉部 高齢者支援課

表1. 疫学調査*結果の比較

事例番号	菌株番号 (No.)	発生地域	実地疫学調査内容	クラスター型 [†]	和田らの分類 ^{**}
1	1	中丹	2人は同一人物であり、再燃と判断した。	-	該当なし
	7	中丹			
2	4	丹後	2人は同じ職場に勤務していたことがあったが、11領域以上の一致ではなかったため、職場内感染が否定された。	-	該当なし
	27	丹後			
3	21	南丹	3人は同じ病院に勤務(21と41は同じ病棟、28は受付業)していたが、いずれも11領域以上の一致ではなかったため、院内感染を否定した。	-	該当なし
	28	丹後			
	41	丹後			
4	34	山城	2人は夫婦でその息子及び母親に感染が確認された。また同じ職場に勤務していたが、職場での感染者は見られなかった。	5	該当なし
	35	山城			
5	40	丹後	2人は同級生で、卒業イベントで数時間の接触が確認された。	6	該当なし
	56	丹後			
6	43	山城	43が結核と診断されたため、職場で接触者検診を実施したところ4名中1名の感染が確認され、2人のVNTR型別は一致した。43の家族内感染は確認されなかった。	-	該当なし
7	44	山城	入院していた病院で職員2名が結核を発症した。この2名のVNTR型別は一致したが、44とは一致しなかった。病院関係者の接触者検診においても感染が見られなかったため、院内感染を否定した。	-	J ₁₂ -0001
8	48	丹後	2人は夫婦だが、妻が施設に入り、ほとんど接触していなかったため、それぞれの再燃と認識していた。VNTR型別が一致したため、接触者検診を実施したところ家族2名、施設職員2名の感染が疑われた。	12	該当なし
	78	丹後			
9	73	丹後	2人は2日間のみ、病院の同室に入院していた。VNTR型別が一致したため、同室患者6名、看護師26名、医師5名について接触者検診を実施したところ、感染者3名、感染疑い8名となり、院内感染が強く疑われた。	11	該当なし
	84	丹後			

* 疫学調査には実地疫学調査、分子疫学調査があり、分子疫学調査結果としてクラスター型別を示した。

** 和田らの分類²⁾した阪神地域における出現頻度の高いJATA(12)-VNTR型

JATA(12)-VNTR型別を実施するまでに時間がかかる。そこで、今回、搬入されたミジット液体培地から直接抽出した結核菌DNAを材料としたJATA(12)-VNTR型別についても試みた(以下「ミジット液体培地からの迅速検査法」という)。ミジット液体培地で長期間保存された結核菌はDNAが切断され、JATA 1～12領域すべてを増幅できないという知見があるため、解析結果をミジット液体培地における保存期間との関連性で考察し、ミジット液体培地からの迅速検査法の有効性を検討した。

材料と方法

1. 小川培地からのJATA(12)-VNTR型別

1-1. 供試菌株

平成25年9月～平成27年7月に新規登録された結核患者由来44菌株(山城北管内34菌株、山城南管内1菌株、丹後管内9菌株)について、ミジット液体培地から小川培地に接種、培養したものを実験に用いた。

1-2. Template DNAの調製

10μL滅菌デイスポーザブルエーゼを用いて小川培地に生えたコロニーをかきとり、遺伝子用蒸留水200μLに懸濁させ、ヒートブロック(DTU-2B:TAITEC製)を用いて95℃、15分間加熱し、氷冷却した。4℃、13,000rpm、10分間遠心

し、その上清をTemplate DNAとした。

1-3. PCR及びアガロースゲル電気泳動

ABI Gene Amp PCR System 9700を用いて、16μLスケール(DDW 5μL、TakaRa 2×GC buffer 8μL、TaKaRa dNTP Mixture 1.3μL、前報^{4)~7)}と同じプライマー各0.3μL、TaKaRa ExTaq HS version 0.1μL、Template DNA 1μL)として実験した。バイオラッド製Sub-Cell®RGT電気泳動槽を用いて50V、360分泳動後、エチジウムブロマイド染色した。その後UV照射下でJATA 1～JATA12領域のバンドを確認し、写真撮影した。

2. ミジット液体培地からの迅速検査法

2-1. 供試菌株

1-1で使用した44菌株のうち6菌株(山城北管内5菌株、丹後管内1菌株)について、ミジット液体培地から直接結核菌DNAを抽出した。

医療機関におけるミジット液体培地への喀痰等の接種から保健所を経由し、当所への搬入までの保存期間は、医療機関における1～2週間の培養期間を含め、64～132日であった。

2-2. Template DNAの調製

搬入されたミジット液体培地を3,000rpm、5分間遠心分離した。滅菌スポイトを用いて結核菌を含む沈渣を滅菌蒸留

水10 mLに移して混和し、3,000rpm、10分間遠心分離した。これを3回繰り返して沈渣を遺伝子用蒸留水100 μ Lに懸濁した後、ヒートブロック(DTU-2B:TAITEC製)を用いて95°C、15分間加熱し、氷冷却した。4°C、13,000rpm、10分間遠心し、その上清をTemplate DNAとした。

2-3. PCR及びアガロースゲル電気泳動

Template DNAを2 μ L(PCRは17 μ Lスケール)とする以外は1-3.と同様に実験した。

3. 結核分子疫学解析

JATA 1～JATA12領域のバンドを確認できる写真から各分子量を算出し、前田らの示した表⁸⁾を用いてVNTR型別を判定した。さらに、過去5年間の127菌株、今回の供試菌株を含めた合計171菌株について、クラスター型別を実施した。前報^{4)～7)}ではJATA 1～JATA12のうち11領域以上で反復数(結核菌ゲノム上に多数存在する、数10bpの塩基配列を1単位とした反復配列領域(VNTR領域)をいう)が一致した菌株を同一クラスター型と分類していた。

しかし、菌株数が増えるにつれて複数のクラスター型に属する菌株が増加し、クラスターを構成する菌株間の関連性が不明瞭になってきた。そのため、全領域で反復数が完全一致した菌株のみを同じクラスター型として分類した。また、和田らの分類²⁾と比較し、一致するものを調べた。

4. 実地疫学調査

各保健所で実施された結核患者への聞き取り調査結果を活用し、同一クラスター型に含まれる患者間に関連性がないかを調べた。

結果

1. 小川培地からのJATA(12)-VNTR型別と事例解析

供試菌株44菌株について、JATA(12)-VNTR型とクラスター型分類を表2に示す。菌株番号は前報⁷⁾で報告した菌株番号に続きNo.128～No.171とした。発生地域は菌株の患者所在地を管轄する保健所名で示し、JATA(12)-VNTR型別はJATA 1～JATA12の各領域の反復数を「」で区切って列挙した。

前報^{4)～7)}で報告した127菌株及び今回の44菌株を含めた計171菌株について、JATA(12)-VNTR型から分類したクラスター型ごとの分類結果を疫学調査結果と併せて表3に示す。6菌株で構成されるクラスター型が1、5菌株で構成されるクラスター型が1、4菌株で構成されるクラスター型が3、3菌株で構成されるクラスター型が2、2菌株で構成されるクラスター型が11、及びクラスター型を構成しない菌株に分類された。また、表3には和田らの分類²⁾及び年報60号までの分類型別についても示した。

今回のJATA(12)-VNTR型別により判明した新たなクラスター型は、10、14、15、16、17で、いずれにおいても、患者間の関連性は確認されず、感染経路は解明できなかった。

クラスター型3、4、7、9、10、14、15及び18はそれぞれ和田らの分類²⁾のJ₁₂-0001、J₁₂-0006、J₁₂-0003、J₁₂-0007、J₁₂-0024、J₁₂-0009、J₁₂-0022、J₁₂-0004に一致した。このうち9及び14は山城北管内の菌株でのみ構成され、これらを除くクラスター型は山城北、中丹または丹後の2つ以上の管内の菌株により構成されていた。

2. ミジット液体培地からの迅速検査法との比較

今回の供試菌株6菌株について、小川培地由来抽出DNA及びミジット液体培地由来抽出DNAのJATA(12)-VNTR型別を行い、その結果を表4に示す。

6菌株のうち4菌株(No.151、153、155、156)は、小川培地及びミジット液体培地由来DNAのJATA(12)-VNTR型が一致したが、2菌株(No.152及び154)についてはミジット液体培地由来DNAの一部に増幅されない領域が存在した。保存期間が不明なものを含めてミジット液体培地における保存期間が123日より短い場合に、JATA(12)-VNTR型別におけるすべての領域を検出できる傾向が見られた。

考察

1. 小川培地からのJATA(12)-VNTR型別

表3について、和田らの分類に一致したクラスター型3(J₁₂-0001)は広域拡大性クラスターの1つであり、クラスター型4(J₁₂-0006)は全国的に分離されているM株と同一のJATA(12)-VNTR型である。さらに、JATA(12)-VNTR型別の分解能ではならず、実地疫学調査結果と併せても、これらのクラスター型を構成する菌株それぞれが同一感染源由来と判断することは難しい可能性なども考えられるため、患者間の関連性を見出すことが困難となる場合がある²⁾。

このような場合には、国内標準法として提唱されるJATA(12)12領域の他に、JATA(15)3領域(QUB-11a、ETR-A、QUB-18)、高識別能である超可変3領域(QUB-3232、v3820、v4120)、及び国際比較6領域(MIRU04、MIRU16、MIRU40、ETR-C、Mtub30、Mtub39)を含む24領域においてVNTR型別を実施することによって、各クラスターを構成する菌株を正確に分析することができる⁹⁾。

2. ミジット液体培地からの迅速検査法

供試菌株の中には、各医療機関における培養及び保存期間が長期にわたるものがあり、搬入直後に結核菌DNAを抽出したとしても結核菌DNAがすでに切断されている可能性が示唆され、ミジット液体培地からの迅速検査法ではJATA12領域の一部で増幅できないものがあった。この場合は、ミジット液体培地から小川培地に接種、培養してJATA(12)-VNTR型別を実施することになる。しかしながら、小川培地を使用すると、4～8週間の培養期間が必要になり、迅速に結果を得られない。

そこで今後は、ミジット液体培地における保存期間と結核菌DNA切断の関連性を継続調査するとともに結核菌DNAが切断されている可能性がある場合は、小川培地に代えてミ

表2. JATA(12)-VNTR型別とクラスター型分類

菌株番号(No.)	発生地域	JATA(12)-VNTR型別*	クラスター型**
128	山城北	3,3,4,3,8,3,7,2,6,13,9,4	
129	山城北	4,3,4,3,6,3,7,4,5,8,8,3	14
130	山城北	4,1,3,2,6,4,7,4,5,4,8,5	
131	山城北	2,3,1,3,4,2,4,4,3,8,5,3	
132	山城北	4,3,3,3,6,3,7,4,5,7,8,3	
133	山城北	3,3,3,4,5,3,7,5,4,7,2,5	
134	山城北	3,2,2,2,3,2,5,4,2,7,7,3	
135	山城北	2,3,1,3,3,2,5,4,3,12,5,3	
136	山城北	4,1,3,2,6,4,9,4,5,7,8,5	10
137	山城北	3,5,2,1,2,3,1,2,3,13,3,4	
138	山城北	3,3,3,3,5,3,11,2,5,10,8,4	
139	山城北	3,3,4,4,7,3,7,5,5,7,2,5	
140	山城北	4,3,4,3,3,3,6,3,5,7,6,4	
141	山城北	4,1,3,2,7,7,3,5,7,8,5	
142	山城北	3,3,3,4,9,3,7,5,5,7,2,5	
143	山城北	4,3,3,3,9,3,7,4,4,7,10,3	
144	山城北	2,3,4,3,6,3,7,2,5,7,8,3	
145	山城北	3,3,3,3,3,3,7,4,5,7,3,4	
146	山城北	3,3,3,4,7,3,7,5,5,7,2,5	3
147	山城北	2,3,2,3,3,2,5,4,3,12,5,3	
148	山城北	3,3,3,3,5,3,7,2,5,10,6,4	15
149	山城北	4,3,4,3,6,3,7,4,5,5,6,3	
150	山城北	2,3,1,3,4,2,5,4,3,11,5,3	16
151	山城北	4,3,4,3,6,3,7,4,5,8,8,3	14
152	山城北	4,3,4,3,5,5,8,4,5,7,8,3	
153	山城北	2,2,2,4,3,2,5,4,3,3,7,3	
154	山城北	2,4,3,3,-,3,10,4,6,7,3,4	
155	山城北	2,3,1,3,3,2,5,4,3,13,5,3	
156	丹後	4,1,3,2,6,5,9,4,5,7,8,5	17
157	丹後	3,3,3,4,7,3,5,5,5,-,2,6	
158	丹後	2,3,1,3,3,2,5,2,3,10,5,3	
159	丹後	4,3,3,3,3,4,7,4,5,7,7,4	
160	丹後	4,1,3,2,6,4,7,4,5,4,6,5	
161	丹後	4,3,4,3,6,3,7,4,5,7,8,3	
162	丹後	1,4,9,3,9,1,2,4,3,7,7,2	
163	丹後	4,3,4,3,5,3,3,6,4,5,11,8,3	
164	山城北	2,2,2,3,-,2,4,4,3,12,4,3	
165	山城北	4,3,4,3,8,3,7,4,5,7,8,3	4
166	山城南	4,3,3,3,3,3,7,4,3,7,7,4	
167	山城北	1,4,9,3,6,1,2,4,4,7,7,2	
168	山城北	4,1,3,2,7,4,7,3,5,7,8,5	
169	山城北	4,3,4,3,5,3,6,4,5,10,8,3	
170	山城北	4,3,3,3,7,3,7,4,5,7,8,5	18
171	山城北	3,3,4,3,5,3,7,2,4,14,9,4	

* 電気泳動の結果、バンドが検出されなかった領域については「-」と記載した。

** JATA(12)-VNTR型が完全に一致した株を同じ数字で分類し、同一のクラスター型とした。クラスター型は前報⁴⁾⁻⁷⁾で報告した127菌株と併せて検討した。

表3. JATA(12)-VNTR型別から分類したクラスター型ごとの疫学調査結果

クラスター型	菌株番号(No.)	発地域	患者間の関連性	和田らの分類*	年報60号までの分類
1	2	中丹	接触確認できず。	該当なし	b
	8	丹後			
	22	丹後			
	28	丹後			
	30	山北			
2	4	丹後	接触確認できず。	該当なし	c
	23	丹後			
	57	丹後			
	74	丹後			
3	11	中丹	接触確認できず。	J ₁₂ -0001	d
	13	丹後			
	44	山北			
	106	山北			
	120	山北			
4	27	丹後	接触確認できず。	J ₁₂ -0006	e
	52	山北			
	82	山北			
	165	山北			
5	34	山北	2人は夫婦で息子及び母親に感染が確認された。また同一職場に勤務していたが、職場内感染は確認されなかった。	該当なし	f
	35	山北			
6	40	丹後	父親が平成16年に結核を発症したため、No.40は予防投薬されていたが発症した。No.56は同級生で接触が確認された。	該当なし	g
	56	丹後			
7	42	丹後	接触確認できず。	J ₁₂ -0003	h
	60	山北			
	88	山北			
	126	丹後			
8	53	丹後	接触確認できず。	該当なし	i
	54	丹後			
9	5	山北	接触確認できず。	J ₁₂ -0007	k
	69	山北			
	80	山北			
10	83	丹後	接触確認できず。	J ₁₂ -0024	-
	136	山北			
11	73	丹後	入院時、2人は3日間のみ同室（抗癌剤治療）で接触が確認された。	該当なし	l
	84	丹後			
12	48	丹後	2人は夫婦でほとんど接触がなかったものの、一致したため、夫婦間の感染と判断した。	該当なし	m
	78	丹後			
13	47	山北	接触確認できず。	該当なし	r
	115	山北			
14	129	山北	接触確認できず。	J ₁₂ -0009	-
	151	山北			
15	102	丹後	接触確認できず。	J ₁₂ -0022	-
	148	山北			
16	98	山北	接触確認できず。	該当なし	-
	150	山北			
17	124	山北	No.124は、平成15年まで丹後に住んでいた（結核既往歴あり）が、接触確認できず。	該当なし	-
	156	丹後			
18	39	丹後	接触確認できず。	J ₁₂ -0004	n
	89	山北			
	170	山北			

* 和田らの分類²⁾した阪神地域における出現頻度の高いJATA(12)-VNTR型別

表4. 菌株培地とJATA(12)-VNTR型別

菌株番号(No.)	JATA(12)-VNTR型別*		ミジット液体培地での保存期間(日)
	小川培地由来抽出DNA	ミジット液体培地由来抽出DNA	
151	4,3,4,3,6,3,7,4,5,8,8,3	4,3,4,3,6,3,7,4,5,8,8,3	64
152	4,3,4,3,5,5,8,4,5,7,8,3	4,3,4,-,5,-,8,4,5,-,8,3	132
153	2,2,2,4,3,2,5,4,3,3,7,3	2,2,2,4,3,2,5,4,3,3,7,3	123
154	2,4,3,3,-,3,10,4,6,7,3,4	2,4,3,3,-,3,10,4,6,-,3,4	123
155	2,3,1,3,3,2,5,4,3,13,5,3	2,3,1,3,3,2,5,4,3,13,5,3	115
156	4,1,3,2,6,5,9,4,5,7,8,5	4,1,3,2,6,5,9,4,5,7,8,5	不明

* 電気泳動の結果、バンドが検出されなかった領域については「-」と記載した。

ジット液体培地に継代、培養し、小川培地より短期間の培養でJATA1～JATA12領域すべてを増幅することができるかどうかを調査し、経済的、時間的にメリットがあるミジット液体培地からの迅速検査法によるJATA(12)-VNTR型別をルーテイン化していきたいと考えている。

謝辞

本研究を行うあたり、結核菌株をご提供いただきました各医療機関の諸先生方、並びに実地疫学調査にご協力いただいた保健所関係者の皆様に深謝します。

引用文献

- 1) 平成23年5月16日付け厚生労働省健康局結核感染症課長通知(健感発0516第1号)。結核に関する特定感染症予防指針の一部改正について
- 2) 和田崇之, 田丸亜貴, 岩本朋忠, 有川健太郎, 中西典子, 小向潤, 松本健二, 長谷篤. 2013. 複数自治体をまたぐ広域的結核分子疫学の基礎構築. 結核, 88, 4, 393-398.
- 3) 斎藤肇, 柏原嘉子, 佐藤紘二, 片山透, 権赫, 富岡治. Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) による抗酸菌の迅速検出法. 結核, 71, 6, 399-405.
- 4) 浅井紀夫, 杉浦伸明, 真田正稔, 和田崇之, 長谷篤. 2012. 結核菌の分子疫学解析における Variable Numbers of Tandem Repeats(VNTR)法の検討. 京都府保健環境研究所年報, 57, 18-21.
- 5) 浅井紀夫, 杉浦伸明, 真田正稔, 堀忍, 中村清康, 和田崇之, 長谷篤. 2013. 京都府分離結核菌株のJATA(12)-VNTR型別解析. 京都府保健環境研究所年報, 58, 6-11.
- 6) 浅井紀夫, 平田佐知, 真田正稔, 鷺見舞, 堀忍, 中村清康, 和田崇之, 長谷篤. 2014. 京JATA(12)-VNTR結核菌型別解析法の検討と京都府分離菌株の解析結果. 京都府保健環境研究所年報, 59, 8-12.
- 7) 浅井紀夫, 平田佐知, 真田正稔, 鷺見舞, 堀忍, 中村清康, 和田崇之, 長谷篤. 2015. 京JATA(12)-VNTR結核菌型別法による2014年京都府分離菌株の解析. 京都府保健環境研究所年報, 60, 12-15.
- 8) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 菅原勇, 加藤誠也. 2008. 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型(VNTR)分析システム—JATA(12)-VNTR分析法の実際—. 結核, 83, 10, 673-678.
- 9) 瀬戸順次, 阿彦忠之, 和田崇之, 長谷篤, 山田敬子. 2013. 結核低蔓延地域における網羅的な結核菌反復配列多型(VNTR)分析の有用性. 結核, 88, 6, 535-542.