

[原著]

兵庫県内の患者から分離された結核菌のRFLP分析に基づいた分子疫学

辻 英 高* 西 海 弘 城
押 部 智 宏 山 岡 政 興Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from the Patients in Hyogo Prefecture Based on IS 6110 RFLP Analysis

Hidetaka TSUJI*, Hiroki NISHIUMI, Tomohiro OSHIBE and Masaoki YAMAOKA

Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

Genetic relationships among 273 *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Hyogo Prefecture between April 1998 and March 2005 were investigated using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. The RFLP patterns of the isolates were classified into 197, and 27 of these patterns each contained two or more strains. Clear cases of infection between patients where strains showed an identical PFGE patterns accounted for 14 cases, which occurred such as in the same workplace, facility and household. Cluster analysis demonstrated high similarity among the strains in two groups (A and B), and the frequency of appearance was 32.2% among the strains for which genetic homology was analyzed based on the criterion of $\geq 80\%$ banding pattern similarity. The frequency of resistance to the primary anti-tuberculosis drugs isoniazid, rifampicin, streptomycin and ethambutol among the 140 investigated strains was 8.6%, 15.0%, 5.7% and 11.4%, respectively. Group A, which contained strains showing a high similarity of the RFLP pattern, tended to have a high frequency of resistance to the anti-tuberculosis drugs examined.

I はじめに

わが国における結核の新規登録患者数は毎年3万人¹⁾にのぼっている。最近特に多剤耐性結核菌や、感染伝播力の強い結核菌が国内はもとより国際的に脅威となっている²⁾。兵庫県では結核の罹患率は毎年減少傾向ではあるが、2005年に新規に登録された患者数は1002人であり、その罹患率24.6は、全国平均22.2に比べて高い値を示し

ている¹⁾。結核の罹患率を低減化するためには、患者の早期発見が大切であり、接触者健診の強化などの対策が重要である³⁾。また、接触者健診や集団感染事例では接触者の把握や患者と感染者への対応が必要となるが、患者から分離された菌株の関連性を調べ、それが同じ結核菌による感染か否かを判定することは、予防対策上重要な情報となる。近年、結核の分子疫学調査の重要な手段として、結核菌の挿入因子IS6110を指標としたRestriction fragment length polymorphism(RFLP)分析法が確立され^{4, 5)}、国内分離株の亜分類に用いられるようになった⁶⁾。IS6110は結核菌特有の挿入配列であり、染色体DNA上に複数個存在し、菌株ごとにその数、位置が異なる^{7, 8)}。また、この形質はある程度安定して遺伝してい

感染症部

* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所
感染症部 辻 英 高

く⁹⁾。その結果、菌株によって、RFLPパターンが異なり、由来ごとのグループ分けが可能となる。

我々は1998年4月から2005年3月の期間、結核対策特別促進事業の一環として、県内で結核罹患率が高い淡路地区¹⁰⁾を中心に、接触者検診によって分離された菌株について、県内の健康福祉事務所と共同でRFLP分析による型別を行い、併せて型別と薬剤感受性との関連性を調べたので、それらの結果について報告する。

II 材料と方法

1. 供試菌株

RFLP分析に使用した菌株は1998年4月から2005年3月に淡路地区で分離され、患者の同意の許に研究センターに搬入された194菌株とその他の地区で分離された79菌株の合計273菌株の県内分離株である(Table 1)。

Table 1 The number of samples by year class from Awaji district and others used for IS6110 DNA fingerprints (RFLP) analysis between the 1998 and the 2005 investigation

Region	Year class								Total
	'98	'99	'00	'01	'02	'03	'04	'05	
Awaji district	18	44	23	12	36	27	14	20	194
Other districts	5	11	26	4	17	5	1	10	79
Combined	23	55	49	16	53	32	15	30	273

2. RFLP分析

小川培地等で搬入された菌株は、1%小川培地で再培養後、アイソプラント(日本ジーン)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAは制限酵素Pvu IIで消化断片化し、1%アガロースゲル電気泳動で展開した。アガロースゲル上に展開されたDNA断片はメンブレンに転写・固定し、IS6110プローブとのハイブリダイゼーションを行った^{5, 10)}。メンブレン上のDNA断片は、ジゴキシンゲン(DIG)検出試薬(ロシュ・ダイアグノスティックス)でIS6110断片を発色・可視化させ、菌株のRFLPパターンを調べた。なお、IS6110プローブはロシュ・ダイアグノスティックス社の方法に従ってランダムプライム法によりDIGを標識して作成した。

3. クラスタ解析

各菌株間のRFLPパターンはFingerprinting II (日本バイラッド)を用いてクラスタ解析を行った。菌株間の類似度の算出はDiceの方法を用い、その類似度を基に非加重結合法(UPGMA)で系統樹を作成した。

4. 菌株の薬剤感受性

分離菌株の薬剤感受性は健康福祉事務所が調査したものをを使用した。RFLP分析を行った273菌株のうち140菌株について薬剤感受性試験結果の回答が得られた。感受性試験に使用されている薬剤は患者により異なるものの、140菌株のすべてが一次抗結核薬であるイソニアジド(INH)、リファンピシン(RFP)、ストレプトマイシン(SM)、エタンブトール(EB)の4薬剤について試験が実施されていた。患者に共通に使用されているこれらの薬剤について耐性株の発現頻度、およびRFLPパターンとの関連を調べた。

III 結果

1. 患者の年齢構成

RFLP型別に使用した273菌株のうち258菌株について、患者の年齢分布は、Table 2のとおりで、2005年に新規登録された県内患者の分布¹⁾と大きな違いはなかった。

Table 2 Comparison of the number of the patients by the age class between the newly registered patients in Hyogo prefecture and the patients who carried out the study for IS6110 DNA fingerprints (RFLP) analysis

Classification	Age group										Total
	0~19	20~29	30~39	40~49	50~59	60~69	70~79	80~89	>90		
Hyogo prefecture ^{*1} ; n (%)	9 (0.9)	77 (7.7)	83 (8.3)	69 (6.9)	140 (14.0)	147 (14.7)	239 (23.9)	207 (20.7)	31 (3.1)	1002	
Samples ^{*2} ; n (%)	2 (0.8)	15 (5.8)	16 (6.2)	17 (6.6)	32 (12.4)	47 (18.2)	67 (26.0)	53 (20.5)	9 (3.5)	258	
RFLP group A ^{*3} ; n (%)	0 (0)	5 (10.4)	7 (14.6)	3 (6.3)	8 (16.7)	5 (10.4)	13 (27.1)	5 (10.4)	2 (4.2)	48	
RFLP group B ^{*3} ; n (%)	0 (0)	2 (5.6)	3 (8.3)	5 (13.9)	6 (16.7)	6 (16.7)	8 (22.2)	5 (13.9)	1 (2.8)	36	

*1; Newly registered patients in 2005.

*2; The patient by whom age was investigated among 274 patients who carried out RFLP analysis.

*3; The patient by whom age was investigated among the patients belonging to the group shown in Fig. 3 and Fig. 4.

2. 分離株のIS6110コピー数の分布

県内の患者から分離された結核菌273菌株はすべての株がIS6110を保有しており、ISのコピー数は、12個を中心として1個から20個であった(Fig. 1)。

3. 分離株のRFLPパターンおよび患者の疫学的な関連性

分離株のRFLPパターンは197に分類され、複数の菌株を有するパターンは27種類であった(Table 3, Fig. 2)。

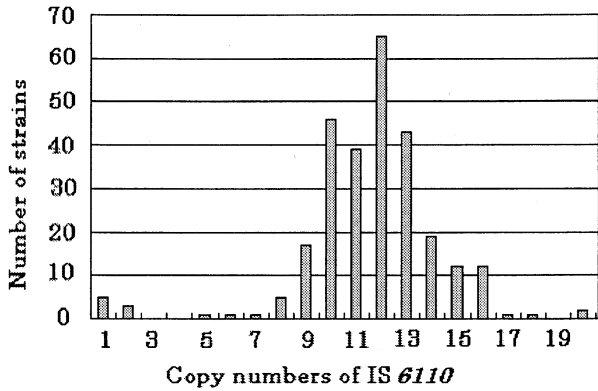


Fig. 1 Distribution of the copy numbers of IS6110 among the *Mycobacterium tuberculosis* strains tested

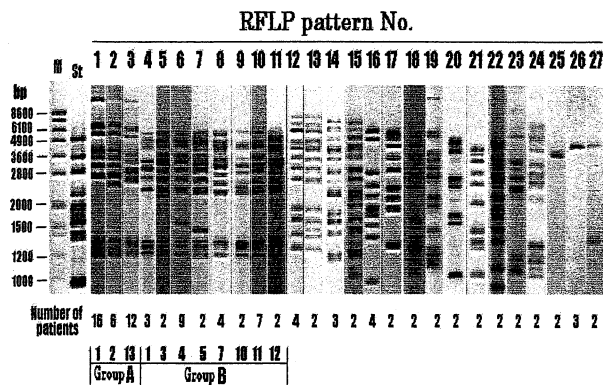


Fig. 2 IS6110-RFLP patterns in which two or more strains showed the same pattern: RFLP pattern No. is the same as the number indicated to Table 3, and the number of Groups A and B is the same as the number of RFLP pattern in each group shown in Fig. 4. M; DNA molecular weight marker VII (Roche Diagnostics GmbH), St.; *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv.

同一のRFLPパターンを示した菌株のうち、疫学的に患者間の関係が明らかであるのは夫婦間の3例、6菌株 (Table 3, Fig. 2; パターン番号1, 12および22), 親子間の4例, 8菌株 (パターン番号3, 15, 21および23), 同一職場内の1例, 5菌株 (パターン番号6), 同一施設内の2例, 4菌株 (パターン番号18と24), および接触者間4例, 8菌株 (パターン番号1, 6, 7および20) の計14例で31菌株であった。また、それぞれのRFLPパターンが一致した他の72菌株については患者間の疫学的な関連性は不明であった。

4. 分離菌株の型別

分離株についてクラスター解析を行い菌株間の相同性を比較すると、RFLPパターンが一致する類似度100%のクラスターは27種類103菌株であり、クラスター形成

Table 3 IS6110 DNA fingerprints (RFLP) patterns with which two or more patients were seen and the epidemiological relations between the patients who showed the same pattern

RFLP pattern No. (group)*	Number of patients	Epidemiological relations (Number of patients)	RFLP pattern No.	Number of patients	Epidemiological relations (Number of patients)
1 (A)	16	Husband and wife(2) Contact person(2) Unknown(12)	14	3	Unknown
			15	2	Parent and child
			16	4	Unknown
2 (A)	6	Unknown	17	2	Unknown
3 (A)	12	Parent and child(2) Unknown(10)	18	2	Same facility
			19	2	Unknown
4 (B)	3	Unknown	20	2	Contact person
5 (B)	2	Unknown	21	2	Parent and child
6 (B)	9	Contact person(2) Same place of work(6) Unknown(2)	22	2	Husband and wife
			23	2	Parent and child
			24	2	Same facility
7 (B)	2	Contact person	25	2	Unknown
8 (B)	4	Unknown	26	3	Unknown
9 (B)	2	Unknown	27	2	Unknown
10 (B)	7	Unknown	Subtotal	103	Husband and wife(6) Parent and child(6) Same place of work(6) Same facility(4) Contact person(8) Unknown(72)
11 (B)	2	Unknown	27		
12	4	Husband and wife(2) Unknown(2)	Other patterns		170
			170		
13	2	Unknown	Total	273	
			197		

* The group is the same as show in Fig. 3 and Fig. 4

率は37.7%であった。これら27クラスターの1クラスターあたりの菌株数 (クラスターサイズ) は、2から16であり、クラスターサイズ2が16種類、3が3種類、4が3種類、6が1種類、7が1種類、9が1種類、12が1種類、および16が1種類であった。また、全体をRFLPパターンの類似度80%の基準でグループ分けすると、4菌株以上で構成されるグループが6種類みられ、そのなかで構成菌株数が多い、2種類の主要なグループA、Bが存在した。これら2グループ内には類似度100%の27クラスター103菌株のうち、グループAに3クラスター34菌株(33%)、およびグループBに8クラスター31菌株(30%)が含まれていた (Fig. 3)。これら2グループ内の菌株は、いずれもIS6110のバンド数やサイズが1から3本異なるRFLPパターンを示し、グループAは50菌株が19のパターンから、またグループBは38菌株が15のパターンから構成されていた (Fig. 4)。これら2グループ内の患者はいずれも若年層から高齢層まで広く分布し、両者に差はみられなかった (Table 2)。県内の分離株で淡路地区と、それ以外の地区において両グループに相当する分離菌株数を調べたところ、グループAに属する50菌株は淡路地区194菌株中40菌株(20.6%)で、他の地区79菌株中10菌株(12.7%)であり、淡路地区でAの割合が多かった。また、グループBに属する38菌株は淡路地区で23菌株(11.9%)、他の地区で15菌株(19.0%)が分離されており、Aとは異なる傾向にあったが、淡路地区と他の地区における両グループの菌株の出現頻度は、有意水準5%で有意差はみられなかった。

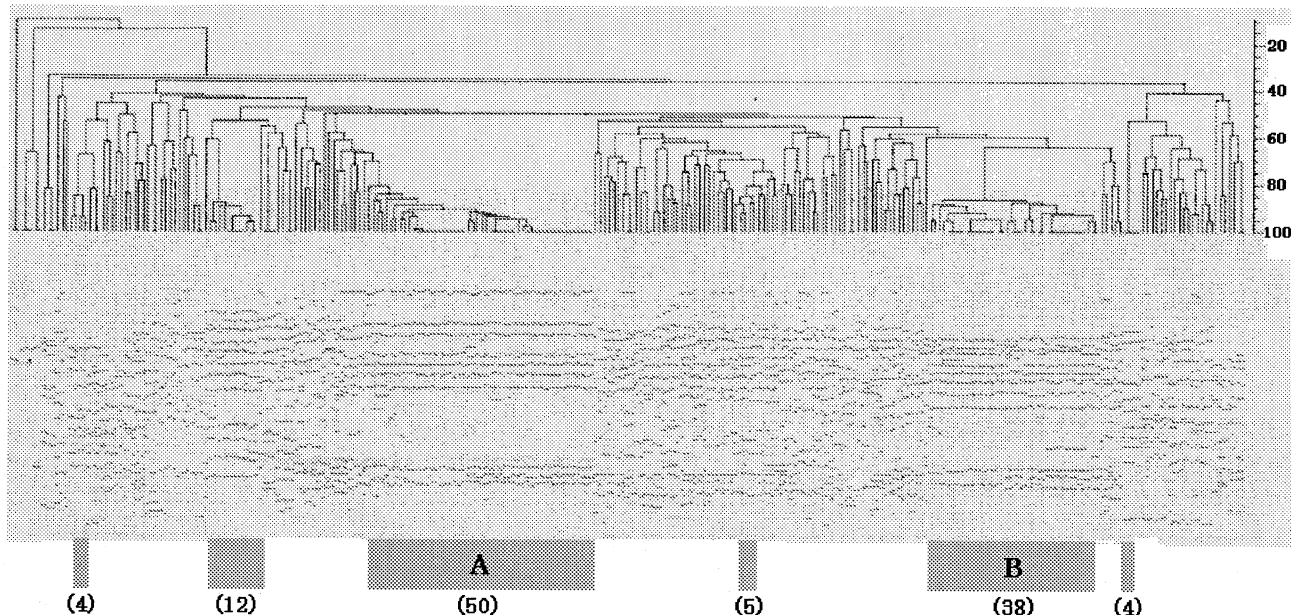


Fig. 3 Dendrogram of IS6110-RFLP of 294 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* based on Dice coefficients and UPGMA clustering : Six kinds of cluster groups defined similarity as 80% similar level were shown under the figure and the inside of parenthesis showed the composition number of strains ($n \geq 4$) in the cluster groups. The alphabetic characters (A and B) indicated two large cluster groups shown in Fig. 4.

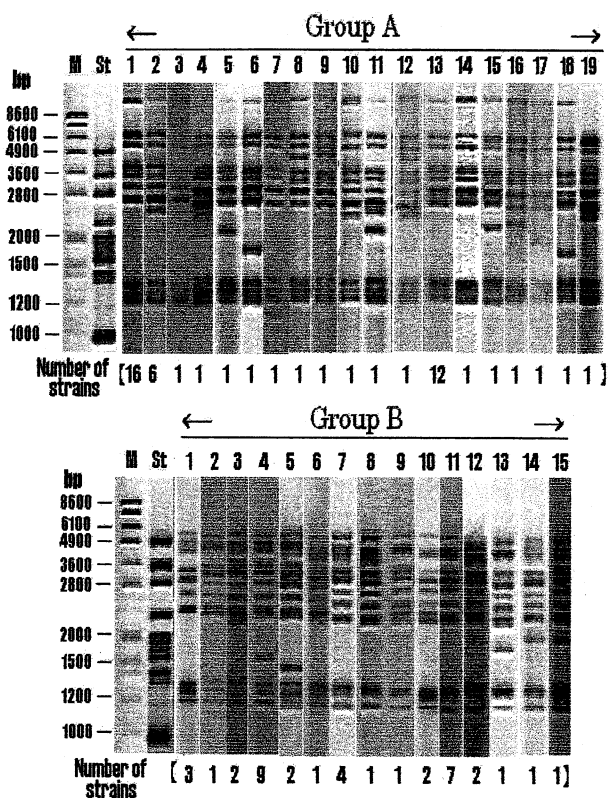


Fig. 4 Strains of the two cluster groups (A, B) to which the genetic homology between strains showed 80% similarity as the result of cluster analysis. M; DNA molecular weight marker VII (Roche Diagnostics GmbH), St.; *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv.

5. 菌株の薬剤感受性とRFLPとの関連性

調査した140菌株の4薬剤INH, RFP, SMおよびEBに対する耐性株の発現頻度は、それぞれ8.6%, 15.0%, 5.7%および11.4%であった。また、これら4薬剤のいずれかに耐性の1剤耐性株は22.9%, 2剤以上の耐性株は5.7%であった。上記A, B両グループ内の菌株については、Aグループ23菌株の4薬剤INH, RFP, SMおよびEBに対する耐性株の発現頻度は、それぞれ17.4%, 21.7%, 8.7%および13.0%であった。Bグループ25菌株の同じ4薬剤に対する耐性株の発現頻度は、それぞれ4.0%, 4.0%, 4.0%および12.0%であった。また、1

Table 4 Proportion of the drug resistant strains about four primary anti-tuberculosis drugs

Resistance to	Sample ^{*1}	RFLP	RFLP
	(n=140)	GroupA ^{*2}	GroupB ^{*2}
	n(%)	n(%)	n(%)
Isoniazid	12(8.6)	4(17.4)	1(4.0)
Rifampin	21(15.0)	5(21.7)	1(4.0)
Streptomycin	8(5.7)	2(8.7)	1(4.0)
Ethambutol	16(11.4)	3(13.0)	3(12.0)
One Drug	32(22.9)	6(26.1)	3(12.0)
Two or more	8(5.7)	3(13.0)	1(4.0)

*1 ; The strain by which drug susceptibility was investigated among 274 strains.

*2 ; The strain by which drug susceptibility was investigated between the strains belonging to the group shown in Fig. 3 and Fig. 4.

剤耐性株はAグループで26.1%, Bグループで12.0%であり, 2剤以上の耐性株はAグループで13.0%, Bグループで4.0%であり, グループAを構成する菌株に薬剤耐性株の発現頻度が高い傾向にあった(Table 4).

IV 考 察

県内の患者から分離された273菌株のRFLP分析の結果, 患者は197の多様なRFLPパターンに分類される菌株によって感染を受けていたことが分かった(Table 3). 一方, 菌株のクラスター解析の結果, 県内の分離株は類似度が高いA, B, 2グループの存在が明らかになった. これら2グループに属する菌株はA, 18.3%, B, 13.9%で全体の32.2%を占めており, 県内に分布する主要な株であると思われた. また, RFLPパターンが一致した27パターンの患者についての疫学調査の結果, 患者間の感染が明らかな事例は, 夫婦間3例6名, 親子間4例8名, 同一職場内1例5名, 同一施設内2例4名, および接触者間4例8名の計14例31名であり, これらの患者はいずれも濃厚接触で感染したものと考えられた. RFLPパターンが一致した患者103名のうち30.1%の患者について疫学的な関連性が証明されたが, 分離株の中で類似度が高い上記2グループ内の患者については, Aグループで18%, Bグループで29%であり, Aグループ内の患者で, 疫学的な関連性が証明されない割合が高かった. 国内の調査においてRFLPパターンが一致した事例から疫学的な調査によって伝播が証明されるのは10%程度であり^{15, 16)}, 海外においても伝播が証明されない事例¹⁷⁾や二次的な調査によって疫学的な関連性が明らかになった事例が報告¹⁸⁾されている. また, 結核の高蔓延地区では分離株のRFLPパターンは同一, あるいは類似したグループを構成し, 結核の罹患が少ない国では分離株のRFLPパターンは類似性のない多様性を示すことが報告されている^{14, 19)}. 国内の分離株にも類似した菌株のグループがみられることが報告されており^{15, 16, 20)}, その理由として過去の結核のまん延時代に感染を受けた世代の高齢化による再燃がRFLPパターンの類似性に表れると考えられている^{15, 16, 20)}. RFLPパターンは過去の流行株による垂直伝播や, 現在の患者間の偶発的な伝播などによって一致する可能性も考えられることから, 類似したグループ内の一致事例については伝播の証明が困難な事例があると推測される¹⁵⁾. しかしながら, 県内の類似度が高い2グループにおいて, いずれも患者の年齢は, 若年から高齢者まで幅広い分布を示しており(Table 2), これらの菌株は現在も県内における感染の有力株である可能性が高いと推測される. また, 類似株によるグループ化の要因

として, 抗結核薬に対する耐性株の増加によって患者が治癒しにくく, 結核が長期化している可能性も考えられることから, 分離株の薬剤耐性について調査したが, 一次抗結核薬の4薬剤について耐性株の発現頻度を県内分離株と全国分離株の成績²⁰⁾を比較すると, 県内分離株はRFPおよびEBの2薬剤に対する耐性株, および4薬剤のいずれかに耐性がある株の発現頻度が有意に(有意水準5%)高かった. また, 県内分離株とグループA, Bに属する分離株の薬剤感受性成績については, いずれも統計的な有意差はみられなかった(有意水準5%)が, グループAに属する患者株の一次抗結核薬に対する耐性株の発現頻度は, すべての薬剤で他の県内分離株の成績よりも高い傾向にあり, このグループ内の菌株に薬剤耐性遺伝子の変異が進行している可能性も考えられた. 一方, グループBに属する患者については, EBを除く3薬剤に対する薬剤耐性株の発現頻度は, 県内分離株のそれよりも低く, 全国の初回治療の患者で分離された耐性株の発現頻度²⁰⁾に近似していることから, 結核の未治療患者を中心としてグループが構成され, 菌株が伝播されている可能性が考えられた.

県内で分離される類似度が高いグループを形成する菌株と薬剤耐性との関連性については, 詳細に調査していく必要があると思われる. そのことによって遺伝子型別に固有の薬剤情報を結びつけることにつながり, 治療に大きく貢献できると考えられる.

V 要 旨

1998年4月から2005年3月の期間において兵庫県内の結核患者から分離された273菌株について, RFLP分析を行った. 分離株のRFLPパターンは197に分かれ, そのうち27パターンに複数の菌株がみられた. パターンが一致した患者間において, 感染が証明された事例は, 同一職場内や同一施設内, および家族内における感染など14例であった. クラスター解析の結果, 分離株には類似性の高い2グループ(A, B)が存在し, これらの菌株は類似度80%の基準で, 解析した分離株全体の32.2%を占めていた. 調査した140菌株の一次抗結核薬(イソニアジド, リファンピシン, ストレプトマイシン, エタンブトール)に対する耐性株の発現頻度は, それぞれ8.6%, 15.0%, 5.7%および11.4%であった. RFLPパターンの類似性が高いグループAは薬剤耐性株の出現頻度が高い傾向にあった.

謝 辞

本稿を終えるにあたり、調査にご協力いただいた兵庫県健康生活部健康局疾病対策課、洲本健康福祉事務所、及び健康福祉事務所の関係者の皆様方、ならびに菌株を提供いただいた医療機関の関係者の皆様方に深謝いたします。

文 献

- 1) 財団法人結核予防会：結核の統計2006，東京(2006)
- 2) CDC：Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs -- Worldwide, 2000--2004. *MMWR.*, **40**, 585(1991)
- 3) 森 亨：新たな結核対策の技術と展望. *結核.*, **79**, 587-604(2004)
- 4) van Soolingen, D., Hermans, P. W., de Haas, P. E., Soll, D. R. and van Embden, J. D. : Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains : evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2578-2586 (1991)
- 5) van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R. and Shinnick, T. M. : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 406-409 (1993)
- 6) Takahashi, M., Kazumi, Y., Fukusawa, Y., Hirano, K., Mori, T., Dale, J. W. and Abe, C. : Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol. Immunol.*, **37**, 289-294 (1993)
- 7) Thierry, D., Cave, M. D., Eisenach, K. D., Crawford, J. T., Bates, J. H., Gicquel, B. and Guesdon, J. L. : IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 188 (1990)
- 8) McHugh, T. D. and Gillespie, S. H. : Nonrandom Association of IS6110 and *Mycobacterium tuberculosis* : Implications for Molecular Epidemiological Studies. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1410-1413 (1998)
- 9) Niemann, S., Rusch-Gerdes, S., Richter, E., Thielen, H., Heykes-Uden, H. and Diel, R. : Stability of IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Actual Chains of Transmission. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2563-2567 (2000)
- 10) 兵庫県健康生活部：兵庫の結核統計(平成15年版)，(2005)
- 11) van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P. E., Douglas, J. T., Traore, H., Portaels, F., Qing, H. Z., Enkhsaikan, D., Nymadawa, P. and van Embden, J. D. : Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 3234-3238 (1995)
- 12) 高橋光良, 阿部千代治：ISタイピング法：IS6110をプローブとしたRFLP分析による結核菌の亜分類. *日本細菌学雑誌*, **49**, 853-857 (1994)
- 13) Mokrousov, I., Jiao, W. W., Valcheva, V., Vyazovaya, A., Otten, T., Ly, H. M., Lan, N. N., Limeschenko, E., Markova, N., Vyshnevskiy, B., Shen, A. D. and Narvskaya, O. : Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 2851-2856 (2006)
- 14) Kurepina, N. E., Srevatsan, S., Plikaytis, B. B., Bifani, P. J., Connell, N. D., Donnelly, R. J., van Soolingen, D., Musser, J. M., and Kreiswirth, B. N. : Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS6110 elements in *Mycobacterium tuberculosis* : non-random integration in the *dnaA-dnaN* region. *Tuber. Lung Dis.*, **79**, 31-42 (1998)
- 15) 高橋光良：結核菌DNAのRFLP分析を用いた結核分子疫学の研究と実践. *結核*, **78**, 641-651(2003)
- 16) 大島律子, 多田敦彦：岡山県内で分離された結核菌DNAのIS6110-RFLPパターン分析. *結核*, **77**, 629-637 (2002)
- 17) Braden, C. R., Templeton, G. L., Cave, M. D., Valway, S., Onorato, I. M., Castro, K. G., Moers, D., Yang, Z., Stead, W. W. and Bates,

- J. H. : Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J. Infect. Dis.*, **175**, 1446-1452 (1997)
- 18) van Deutekom, H., Hoijing, S. P., Petra, S. P., de Haas, E. W., Langendam, M.W., Horsman, A., van Soolingen, D. and Coutinho, R. A. : Clustered Tuberculosis Cases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **169**, 806-810 (2004)
- 19) Hermans, P. W., Messadi, F., Guebresabher H., van Soolingen, D., de Haas, P. E., Heersma, H., de Neeling, H., Ayoub, A., Portaels, F. and Frommel, D. : Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands : usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J. Infect. Dis.*, **171**, 1593-1594 (1995)
- 20) 阿野裕美, 森山和郎, 松本智成, 谷川信 : RFLP分析に基づく, 結核感染状況の疫学的検討-当院医療圏である大阪中南部地域の場合-. *結核*, **77**, 783-788 (2002)
- 21) Abe, C., Hirano, K., Wada, M. and Yagi, T. : Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **5**, 546-556 (2001)