

# IS6110 RFLP解析に基づく、結核の分子疫学的検討

—2001年～2003年—

<sup>1</sup>阿野 裕美   <sup>1</sup>松本 智成   <sup>1</sup>吉多 仁子   <sup>1</sup>永井 崇之  
<sup>1</sup>田村 嘉孝   <sup>2</sup>西森 敬   <sup>1</sup>河原 邦光   <sup>1</sup>高嶋 哲也  
<sup>1</sup>露口 泉夫

**要旨：**〔目的〕結核流行状況の分子疫学的検討。〔対象と方法〕2001年1月～2003年12月の3年間に当院を受診した全結核患者から得られた1200菌株を対象として、IS6110 RFLPを実施した。クラスターは“IS6110 RFLPパターンの類似度が90%以上で、薬剤感受性パターンが一致した菌株”と定義した。IS6110が5コピー以下の菌株については、“IS6110 RFLPパターンと、ETRとMIRUの16領域を対象とするVNTRのアリルプロファイルが一致した菌株”と定義した。〔結果〕累積クラスター形成率は2001年の1年間で27.8%、2001～2002年の2年間で29.7%、2001～2003年の3年間で32.6%であった。薬剤耐性菌のクラスター形成率は25.0%で、感受性菌よりも有意に低かった。性・年齢階級別のクラスター形成率は、女性では19歳以下の若年者が23.8%と最も高く、男性では40歳代が32.4%と最も高かった。〔考察〕クラスター形成率の経時的変化を解析した結果、2年目以降、累積クラスター形成率の急激な増大は認められなかった。われわれは、これは結核罹患率の減少に伴って結核感染の拡大もある程度抑制された結果であり、当該地域における結核行政対策の成果であると考えている。

**キーワード：**結核菌，分子疫学，DNA fingerprinting，IS6110 RFLP，16 VNTR，クラスター形成率

## はじめに

近年 DNA fingerprinting が結核対策に応用されるようになり、感染源調査や感染ルートの解明はもとより、内因性再燃と外来性再感染の検討、クロスコンタミネーションの証明、特定地域の流行菌株や感染状況の分析などに広く用いられている<sup>1)～3)</sup>。結核菌の DNA fingerprinting は、IS6110 restriction fragment length polymorphism (RFLP) が国際標準法であったが<sup>4)～8)</sup>、最近ではスポリゴタイピング、variable numbers of tandem repeats (VNTR) などが施行されている。すでに欧米ではこれらの方法を用いて広域ネットワークによる結核菌遺伝子データベースが作成されている<sup>9)～11)</sup>。さらにアメリカ合衆国では、スポリゴタイピングと mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) の12領域を対象とする MIRU-VNTR を組み合わせた方法で全米の培養陽性結核菌株を対象とした遺伝

子解析を実施し、さらに特定の結核菌株については IS6110 RFLP を実施するという遺伝子解析プロジェクトが、2004年から Centers for Disease Control and Prevention (CDC) を中心に開始されている<sup>12)</sup>。しかし本邦では、現時点では結核菌遺伝子の広域データベースは構築されていない。

当院では院内感染対策の一環として2001年から IS6110 RFLP を導入し、すべての培養陽性結核菌株を対象とする遺伝子解析を実施してきた。さらに2003年からは exact tandem repeats (ETR) と MIRU の合計16領域を対象とした16VNTRを導入した。当院医療圏は大阪府中部から東部の広域をカバーしており、3年間に及ぶ全培養陽性結核患者の遺伝子解析結果は、地域の結核感染状況を把握するうえで貴重な情報をもたらすものと思われる。今回は、3年間のクラスター形成率の推移とクラスター形成に影響を及ぼす要因について報告する。

<sup>1</sup>大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター，<sup>2</sup>動物衛生研究所

連絡先：阿野裕美，大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター，〒583-8588 大阪府羽曳野市はびきの3-7-1

(E-mail: ano@zeus.conet.ne.jp)

(Received 28 Sep. 2005 / Accepted 21 Nov. 2005)

## 対 象

当院では結核菌検査を受ける全患者を対象として、喀痰等から抗酸菌が検出された時のために前もって菌株の保存と疫学的調査等への使用について文書で説明し、同意を得ている。今回は、同意が得られた患者のうち IS6110 RFLP解析を実施するに十分な菌量が得られた全患者、すなわち2001年1月～12月に422名、2002年1月～12月に409名、2003年1月～12月に369名の合計1200名を対象とした。

## 方 法

### (1) 結核菌培養と DNA 抽出

小川培地で4～6週間培養した結核菌を2白金耳採取し、0.1 mmのガラスビーズを用いて菌体を破碎した後、フェノールクロロホルム法を用いてDNAを抽出した。得られたDNAはTE buffer (pH8)に溶解し、1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度に調整した後に4℃にて保存した。

### (2) IS6110 RFLP解析

IS6110 RFLP解析は、WHOの提唱する国際標準法に準拠した<sup>13)</sup>。詳細は、著者らが2002年に雑誌「結核」に報告している<sup>14)</sup>。

### (3) 16 VNTR

16 VNTRは、結核菌ゲノムのETR 6領域 (A, B, C, D, E, F) およびMIRU 12領域 (2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40)の合計16領域を対象とした (ETR-D=MIRU-4, ETR-E=MIRU-31)。各領域のプライマー配列はSupplyおよび西森等の参考文献によった<sup>15) 16)</sup>。PCR増幅産物を1.5%アガロースゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動 (コスモアイ SV1210: 日立化成工業) し、その鎖長から縦列反復配列数を決定し

た。16領域の縦列反復配列数を基にユークリッド距離を算出し、最短距離法でクラスター解析を実施した。

### (4) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、新結核菌検査指針<sup>17)</sup>に従って小川比率法にて実施した。判定基準濃度は Isoniazid (INH): 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Rifampin (RFP): 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Streptomycin (SM): 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Ethambutol (EB): 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。Pyrazinamide (PZA)の感受性試験は、結核菌感受性PZA液体培地 (極東製薬)を用い、400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を判定基準とした。

### (5) クラスターの定義とクラスター形成率

今回対象とした全1200菌株の、IS6110コピー数は1本から23本に分布しており、14本にピークを示した (Fig. 1)。IS6110が6本以上の菌株は、1150株 (95.8%)であった。これらの菌株の場合には、IS6110 RFLP解析によるバンドパターン間の類似度が90%以上の菌株を抽出し、さらに薬剤感受性試験結果を参照し、INH, RFP, SM, EB, PZAの5剤について薬剤感受性パターンが完全に一致した菌株をクラスターと定義した。

van Soolingen等の報告では、IS6110が5本以下の菌株 (Low-copy 菌株) の場合には、IS6110 RFLP単独では菌株分離能が低いとされている<sup>11) 18)</sup>。今回対象となった1200株のうちLow-copy 菌株は50株 (4.2%)であった (Fig. 1)。そこでこれらの菌株を対象に、Hunter Gaston Index<sup>19)</sup> (HGI)を用いてIS6110 RFLPと16 VNTRの菌株分離能を算出した。その結果、IS6110 RFLPのHGIは0.804、16 VNTRのHGIは0.865となり、IS6110 RFLPと16 VNTRを組み合わせたHGIは0.979となった。この結果からIS6110 RFLPと16 VNTRを併用した場合には、クラスター解析を実施するに十分な菌株分離能があると判断した。そこでLow-copy 菌株におけるクラスターの定義を、“IS6110 RFLP法で90%以上の菌株類似度を示

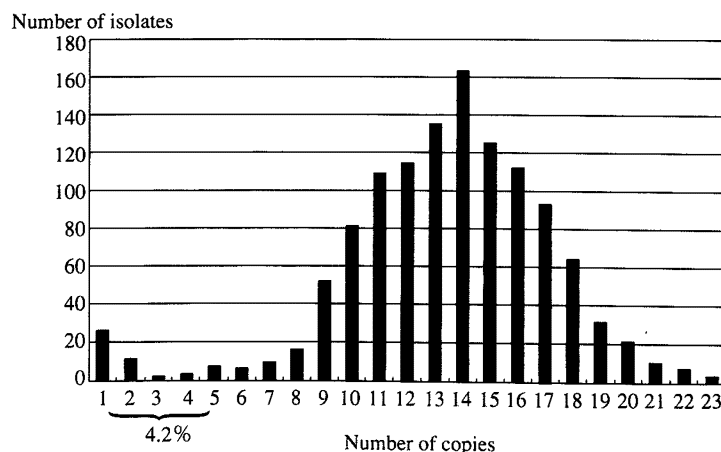


Fig. 1 Distribution of all tuberculosis cases with isolates by number of IS6110 copies. Percentage of the isolates containing fewer than six copies of IS6110 was 4.2% (50 isolates).

し、かつ16VNTRのアリルプロファイルが完全に一致し、さらに薬剤感受性パターンが一致した菌株”とした。クラスター形成率は次の数式を用いて計算した。

$$\text{クラスター形成率} = (\text{クラスター形成者数} / \text{全対象者数}) \times 100$$

#### (6) 統計解析

統計解析ソフトは Statcel 2 for Excel Windows を用いた。有意差検定は Chi-square for independence test と Student's t-test, 回帰分析は Simple regression analysis を用い、危険率5%で検定した。

## 結 果

### (1) 患者背景

今回検討対象となった1200名の性別は、男性855名(71.3%), 女性345名(28.8%)で、平均年齢は男性58.5歳(1歳~96歳), 女性54.5歳(0歳~99歳)であった。治療歴は、初回治療954名(79.5%), 再治療230名(19.2%)治療歴不明16名(1.3%)であった。薬剤耐性は、INH, RFP, SM, EB, PZAの5剤に感受性1044名(87.0%), INH単剤耐性28名(2.3%), SM単剤耐性64名(5.3%), RFP単剤耐性7名(0.6%), INH+RFP+( $\alpha$ )耐性43名(3.6%), INH+SM+(RFP以外の $\alpha$ )耐性11名(0.9%), その他の耐性3名(0.3%)であった。居住地は、大阪市416名(34.7%), 大阪市以外の大阪府下710名(59.2%), 他府県74名(6.2%)であった。

### (2) 地域別患者把握状況

クラスター解析を実施するにあたって、最初に当院の患者把握状況を推定した。当院で培養陽性となった結核患者全員を対象に遺伝子解析を実施しているため、本報における解析率は患者把握状況に匹敵する。仮に新規登録患者の約5割が培養陽性であると仮定すると、解析率は以下の式で表される。

$$\text{地域別解析率}(\%) = (\text{当院の地域別培養陽性患者数} / \text{地域別新規登録結核患者数} \times 0.5) \times 100$$

上記の式に基づき、大阪府の地域保健福祉室感染症・難病対策課から出されている保健所・市町村別結核罹患率を参照して、市町村別に解析率を算出した。その結果、東大阪市51%, 中南河内地区の八尾市84%, 松原市63%, 藤井寺市100%, 柏原市87%, 羽曳野市100%, 富田林市64%, 大阪狭山市48%, 南河内郡76%, 河内長野市72%といずれも高い解析率を示した。一方、大阪市は14%, 箕面市から大東市にかけての大阪北部地域は1%~7%, 堺市から岬町にかけての大阪南部地域は4%~33%といずれも低値を示した。

### (3) クラスター形成率の年次推移と累積推移

単年度のクラスター数およびクラスター形成率は、2001年は44組27.8%, 2002年は31組19.1%, 2003年は

32組19.5%であった。

累積クラスター数およびクラスター形成率は、1年間で44組27.8%, 2年間で82組29.7%, 3年間で126組32.6%であった(Table 1)。1年を四半期に分けて3カ月ごとの累積クラスター形成者数と非形成者数およびクラスター形成率を図示したものがFig. 2である。このグラフから明らかなように、調査期間の延長に伴ってクラスター形成者数も非形成者数も増加傾向が認められた(クラスター形成者: $R^2=0.9972$ ,  $P<0.001$ , クラスター非形成者: $R^2=0.9975$ ,  $P<0.001$ )。一方、累積クラスター形成率は、最初の1年間は12.8%から27.8%まで増加したが、2002年度の第1期から2003年度の第4期までは急激な増加は示さず、29.7%から32.6%とほぼ横ばい状態を保っていた。最大クラスターサイズは、1年間で7名、2年間で11名、3年間で12名となり、3年間にまたがる菌株が存在するクラスターは35組であった。

### (4) クラスター形成に影響を及ぼす要因

次にクラスター形成に影響を及ぼす要因について分析した(Table 2)。

治療歴別クラスター形成率は初回治療32.4%, 再治療33.9%で、有意差はなかった( $P=0.658$ )。

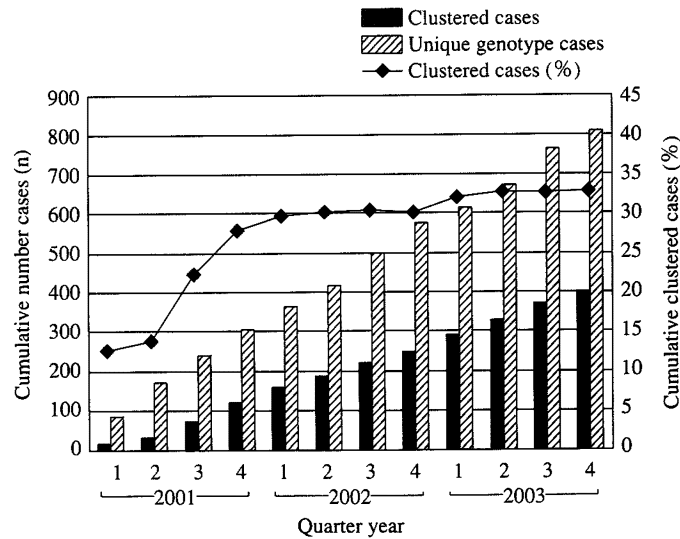
薬剤耐性別クラスター形成率は、抗結核薬(INH, RFP, SM, EB, PZA)のいずれか1剤以上に耐性の菌25.0%, 感受性菌33.7%で、薬剤耐性菌のクラスター形成率が有意に低かった( $P=0.030$ )。クラスター形成群の中には、SM耐性菌5組、INH+SM耐性菌1組、RFP耐性菌1組以外に、多剤耐性菌(INH+RFP+ $\alpha$ )のクラスターが4組(13株)存在した。

性別クラスター形成率は男性34.3%, 女性28.4%で、男性のクラスター形成率が有意に高かった( $P=0.050$ )。

年齢別クラスター形成率は60歳未満35.7%, 60歳以上

**Table 1** Cluster size and cluster formation rate of product arithmetic changes for 3 years

Cluster size	1 year	2 year	3 year
2	28	49	67
3	10	15	31
4	3	7	12
5	1	5	6
6	0	2	1
7	2	1	3
8	0	1	2
9	0	1	0
10	0	0	2
11	0	1	1
12	0	0	1
Total	44	82	126
% clustered	27.8	29.7	32.6

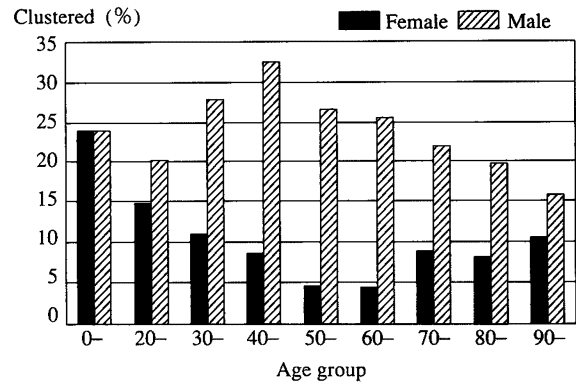


**Fig. 2** Percentage of clustered cases, cumulative proportion of cases with isolates in genetic clusters by quarter that verified cases was counted, 2001–2003 (bulleted line). Number of cases with isolates that had unique genotype (slash line bars) and those with isolates that were in clusters (dark bars) are shown separately.

**Table 2** Risk factors for clustering of tuberculosis cases of Osaka, Japan, 2001–2003

Parameter	No. clustered	No. Unique	% clustered	P value
<b>Treatment record</b>				
Primary	309	645	32.4	0.658
Acquired	78	152	33.9	
Unidentified	4	12	25.0	
<b>Any drug resistance</b>				
Yes	39	117	25.0	0.030
No	352	692	33.7	
<b>Sex</b>				
Male	293	562	34.3	0.050
Female	98	247	28.4	
<b>Age group</b>				
59 ≥	214	386	35.7	0.023
60 ≤	177	423	29.5	

\* P value is calculated in comparison with clustered cases and unique cases by chi-square for independence test.



**Fig. 3** Percentage of clustered cases with isolates by gender and age group. Percentage was calculated by using the following formula. Percentage of clustered cases (%) = (Number of clustered cases by gender and age group/Number of all cases by age group) × 100.

上29.5%で、60歳未満のクラスター形成率が有意に高かった (P=0.023)。へ男女別の平均年齢をみると、男性の場合クラスター形成群の平均年齢55.9歳、非クラスター群59.9歳で、有意にクラスター形成群の平均年齢が低かった (P=0.002)。一方、女性の場合には、クラスター形成群51.9歳、非クラスター群55.3歳で有意差は無かった (P=0.238)。

そこで、性別・10歳ごとの年齢階級別クラスター形成率に着目し、同年代群の中でのクラスター形成率を算出した (Fig. 3)。その結果、女性では、19歳以下の若年齢層が23.8%と最も高く、年齢の上昇とともに減少する

右下がりの曲線を描き、70歳代から再び上昇した。女性とは対照的に男性の場合には、19歳以下の若年齢層や70歳以上の高年齢層よりも40歳代の32.4%を中心とした中年層のクラスター形成率が高くなった。参考までに、性・年齢群別の解析対象者数 (Fig. 4) を付記したが、女性の場合20歳代～80歳代までは、クラスター形成率と解析対象者数の増減は同一傾向を示した。しかし、男性の場合には両者は異なり、特に男性の20歳代～40歳代では、解析対象者数が少ないにもかかわらず高いクラスター形成率を示した。

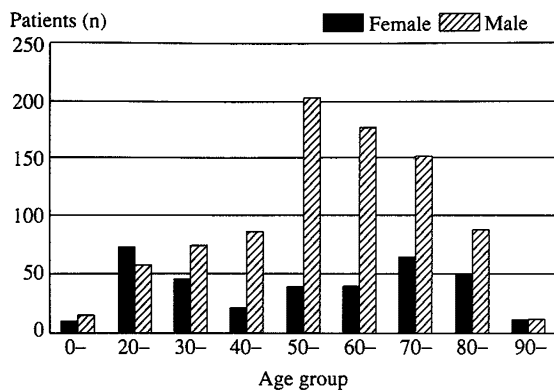


Fig. 4 Number of all culture positive tuberculosis cases with isolates those were obtained by the end of this survey period, 2001-2003, by gender and age group.

## 考 察

いまだ日本の結核罹患率は欧米先進諸国に比較して高く、中でも大阪府の結核罹患率は2001年51.9, 2002年47.1, 2003年33.5と群を抜いて高率である。当院はこの大阪府中東部に位置しており、患者把握状況は大阪中東部地域における培養陽性結核患者の6割以上を占めている。すでにわれわれは、IS6110 RFLP解析に基づく1年間の結核感染状況<sup>14)</sup>を報告したが、今回の3年間におよぶ当院の全培養陽性結核患者の分子疫学解析結果は、当該地域の結核感染状況を把握するうえで有用である。

特に今回の調査では、DNA fingerprinting patternの一致のみならず薬剤感受性パターン的一致も加え、クラスターの定義を諸外国の報告よりもさらに厳しく設定している。このためにクラスター形成率は従来の報告<sup>4)~8) 20) 21)</sup>よりも低く算出される。しかし、クラスターは結核の最近の感染を表す指標であると考えられ、不適切な化学療法による薬剤耐性化症例を除けば、数年以内に薬剤耐性患者と感受性患者が同一感染源から感染したとは考え難い。われわれは、遺伝子解析を用いた結核感染状況の推定には、対象者全員の薬剤感受性データを加味することが、より現状に即したクラスター形成の推定を可能にすると考えている。

最初に、単年度のクラスター形成率を海外の報告と比較検討した。Geng等<sup>5)</sup>は、結核感染状況の動向を把握するうえで結核罹患率の変化と同時に、分子疫学解析によるクラスター形成率の経年変化が結核対策を評価する指標と報告している。また、Ellis等<sup>20)</sup>は、アメリカ合衆国の7地点における調査で、結核罹患率と単年度のクラスター形成率がSpearman順位相関に従って減少している。日本では1999年に「結核緊急事態宣言」が出された後、2000年から結核罹患率は5年連続で低下して

いるが、その低下率は次第に鈍化しており、今後の動向は予断を許さない状況である。今回の検討期間では、大阪府の結核罹患率は2001年51.9, 2002年47.1, 2003年33.5と減少していた。一方、当院のクラスター形成率は2001年から2002年にかけては27.8%から19.1%まで急激に減少したが、2002年から2003年にかけては、19.1%から19.5%と横ばい傾向を示した。そこで、単年度のクラスター形成率が結核罹患率と相関しない原因がどの時期にあるのかを探るために、1年を四半期に分けてクラスター形成者の増加率を検討した。その結果、原因は不明であるが、2002年の10月から12月にかけてクラスター非形成者に対するクラスター形成者の増加率が低い時期があった。この増加率の乖離を、対象地域が限られているための一時的な現象とみなして、2002年末のクラスター形成率がもう少し高いと仮定すると、大阪中東部地域の場合にも諸外国の報告と同様に、結核罹患率の減少に伴い、単年度のクラスター形成率も2001年~2003年に減少傾向を示したと考えられる。

次に累積クラスター形成率を海外の報告と比較検討した。van Soolingen等によるオランダの経年調査<sup>6)</sup>では、1993年~1997年の5年間にわたる累積クラスター形成率のデータが示されており、そのうち最初の2年間は22%から40%と急激に、後の3年間は緩慢ながらも最終的には46%まで増加していた。前述のEllis等のアメリカ合衆国における報告<sup>20)</sup>でも、最初の2年間で累積クラスター形成率は28%から45%まで急激に増加し、その後3年間は緩慢に増加していた。またvan Soolingenも総説<sup>1)</sup>で、クラスター形成が最近の感染をどの程度反映するかは分析期間に強く依存し、さらにクラスター化の割合は標本抽出の完全さに強く依存すると報告している。われわれは、大阪中東部地域の培養陽性結核患者の6割以上を把握しているの、上記地域の解析には十分なクラスター数を有していると考えている。そのうえでオランダや合衆国のデータから考えると、解析対象者数の増加に伴ったクラスター形成率の増加が予測される。しかし当該地域の場合、解析対象者数は直線的に増加していたが、累積クラスター形成率は欧米のように急激な増加はみられず、2年目以降ほぼ横ばい状態を保っていた(Fig. 2)。これは結核罹患率の減少に伴って結核感染の拡大もある程度抑制された結果であり、当該地域における結核行政対策の成果と判断している。

次にクラスター形成に影響を及ぼす要因について分析した。薬剤耐性の有無について比較すると、上述のオランダの場合<sup>6)</sup>には、INH耐性菌のクラスター形成率は37.1%、SM耐性菌のクラスター形成率は49.4%であり、アメリカ合衆国の場合<sup>20)</sup>にはINH、RFP、EB or SM耐性菌のクラスター形成率は45.1%であった。またBurgos

等のサンフランシスコ市における報告<sup>21)</sup>では、INH, RFP, EB, SM耐性菌のクラスター形成率は34.3%で、多剤耐性菌の二次感染はみられなかった。一方われわれの調査では、クラスターの定義に薬剤耐性パターンの一一致を加えているので、薬剤耐性菌のクラスター形成率は25.0%と低く算出された。遺伝子型の一致のみでクラスターを定義すると、薬剤耐性菌のクラスター形成率は46.1%と感受性菌よりも有意に高くなったが、この結果が直ちに薬剤耐性菌の流行を示唆するものとは思われない。むしろ前者の結果から、感受性菌に比べて薬剤耐性菌の感染拡大はないと考えるべきであり、当該地域の結核行政の成果の一端がうかがわれた。しかし今回の調査で、多剤耐性菌のクラスターがみられた事実は重要な課題であり、これら多剤耐性菌の感染拡大を防ぐためにも、薬剤耐性結核菌に関する早急な遺伝子データベースの構築が望まれる。

最後に性・年齢階級別クラスター形成率について検討した。築島等が行った札幌市での調査<sup>22)</sup>によると、男性のクラスター形成群の平均年齢は57.3歳で非クラスター群の64.2歳よりも有意に低いが、女性の場合には有意差はなかった。Fujikane等の北海道北部での調査<sup>23)</sup>では、70%の菌株類似度をもつ5グループに属する患者の平均年齢は68.4歳で非グループ患者の平均年齢(69.4歳)との間に有意差はなかった。また、大角の沖縄県での調査<sup>24)</sup>では、年齢別でも性別でもクラスター形成率に統計学的有意差はなかった。大阪中東部地域の場合は札幌市と同じ傾向を示したが、男性のクラスター形成群の平均年齢は55.9歳とさらに低年齢であった。

そこで性別・10歳ごとの年齢階級別クラスター形成率に着目し、解析対象者数と比較検討した(Fig. 3, 4)。仮に男女共に同じ確率で結核に感染し発病すると仮定すると、低年齢者ほど近年結核に感染したためクラスター形成率は高くなると思われる。一方、高年齢者群では感染からの期間が長く内因性再燃も多くなると考えられるので、クラスター形成率は低くなる。その結果、年齢階級別クラスター形成率のグラフは右下がりの曲線になるはずである。今回、0歳～19歳までの若年齢群と90歳以上の高年齢群については解析対象者が少ないために除外すると、女性の場合にはこの仮説どおり右下がりの曲線を描いた。一方、男性のクラスター形成率は、40歳代の中年年齢層が最も高い単峰形曲線を描いた。特に20歳代～40歳代男性では、50歳以上の高年齢層に比べて、結核罹患率が低く培養陽性者数が少ないにもかかわらず高いクラスター形成率を示した。このことから、20歳代～40歳代の男性において、現在も活発な結核感染が生じている可能性が認められた。それと同時に、50歳代～70歳代の男性では、培養陽性者数が多くクラス

ター形成率も女性に比べて高い。実際にクラスターを形成している患者数もこの年齢層に多いことから、社会的な影響を考えると50歳代～70歳代の男性における結核感染の拡大にも注意を要する。今回の検討期間では単年度のクラスター形成率は減少傾向を示し、全体として結核感染が拡大する傾向はみられなかった。しかし若年男女および壮年男性では、現在も活発な結核感染が生じていることが分子疫学解析から明らかになった。

## ま と め

クラスター形成率の3年間の経時変化を解析した結果、単年度のクラスター形成率は減少し、累積クラスター形成率の急激な増大は抑制されていた。われわれは、これらは結核罹患率の減少に伴って結核感染の拡大もある程度抑制された結果であり、当該地域における結核行政対策の成果を示すものと考えている。しかし、性・年齢階級別にみると若年男女および壮年男性での結核流行が確認された。われわれは引き続き分子疫学的解析を実施して、当該地域における結核流行状況の動向を注意深く見守っていきたい。

## 謝 辞

今回の結果をまとめるにあたりお世話になった大阪市保健所、東大阪市保健所、藤井寺保健所、富田林保健所の皆様に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) van Soolingen D: Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med.* 2001; 249: 1-26.
- 2) Barnes PF, Cave MD: Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med.* 2003; 349: 1149-1156.
- 3) McNabb SJN, Braden CR, Navin TR: DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: Lessons learned and implications for the future. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1314-1320.
- 4) Smail PM, Hopewell PC, Singh SP, et al.: The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1703-1709.
- 5) Geng E, Kreiswirth B, Driver C, et al.: Changes in the transmission of tuberculosis in New York City from 1990 to 1999. *N Engl J Med.* 2002; 346: 1453-1459.
- 6) van Soolingen D, Borgdoff MW, de Hass PE, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: A nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis.* 1999; 180: 726-736.
- 7) Hermans PW, Messadi F, Cubrexabher H, et al.: 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.* 1995 ; 171 : 1504-1513.
- 8) Cowan LS, Crawford JT: Genotype analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a sentinel surveillance population. *Emerg Infect Dis.* 2002 ; 8 : 1294-1302.
  - 9) Sola C, Filliol I, Gutierrez MC, et al.. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*; biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg Infect Dis.* 2001 ; 7 : 390-396.
  - 10) Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, et al.: Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis.* 2002 ; 8 : 1347-1349.
  - 11) Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, et al.: High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 ; 98 : 1901-1906.
  - 12) National Tuberculosis Controllers Association/Centers for Disease Control and Prevention advisory group on tuberculosis genotyping: Guide to the application to tuberculosis prevention and control. 2004; CDC tuberculosis genotyping program's. Available at <http://web-tb.forum.cdc.gov>.
  - 13) van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al.. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993 ; 31 : 406-409.
  - 14) 阿野裕美, 森山和郎, 松本智成, 他: RFLP分析に基づく, 結核感染状況の疫学的検討. *結核.* 2002 ; 77 : 783-788.
  - 15) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000 ; 36 : 762-771.
  - 16) 西森 敬, 内田郁夫, 田中 聖, 他: VNTR (Variable number of tandem repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル. 動物衛生研究所報告. 2003 ; 109 : 25-32.
  - 17) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 「新結核菌検査指針」. 結核予防会, 東京, 2000.
  - 18) van Soolingen D, de Hass PE, Haagsma J, et al.: Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1994 ; 32 : 2425-2433.
  - 19) Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discrimination ability of typing systems: an application of Simpson's Index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1998 ; 26 : 2465-2466.
  - 20) Ellis BA, Crawford JT, Kammerer S, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in a sentinel surveillance population. *Emerg Infect Dis.* 2002 ; 8 : 1197-1209.
  - 21) Burgos M, DeRiemer K, Small PM, et al.: Effect of drug resistance on the generation of secondary cases of tuberculosis. *J Infect Dis.* 2003 ; 188 : 1878-1884.
  - 22) 築島恵理, 三觜 雄, 高瀬愛子, 他: 結核菌遺伝子解析による結核流行状況の分析. *結核.* 2005 ; 80 : 257.
  - 23) Fujikane T, Fujiuchi S, Yamazaki Y, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in the north Hokkaido district of Japan. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004 ; 8 : 39-44.
  - 24) 大角晃弘: 「沖縄県結核菌 DNA を用いた地域結核管理改善事業」第一回地域分子疫学研究会資料, 結核予防会結核研究所, 東京, 2004.

## Original Article

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS BY THE USE OF  
IS6110 RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM:  
A STUDY FROM 2001 TO 2003

<sup>1</sup>Hiromi ANO, <sup>1</sup>Tomoshige MATSUMOTO, <sup>1</sup>Hiroko YOSHIDA, <sup>1</sup>Muneyuki NAGAI,  
<sup>1</sup>Yoshitaka TAMURA, <sup>2</sup>Kei NISHIMORI, <sup>1</sup>Kunimitsu KAWAHARA, <sup>1</sup>Tetsuya TAKASHIMA,  
and <sup>1</sup>Izuo TSUYUGUCHI

**Abstract** [Objective] To analyze the situation of tuberculosis infection by DNA fingerprinting in the middle and eastern part of Osaka, Japan.

[Design] We performed IS6110 restriction fragment length polymorphism (RFLP) on 1200 isolates from tuberculosis patients who visited our hospital from January 2001 to December 2003. A cluster was defined as a series of isolates with more than 90% similarity by IS6110 RFLP and those with the same drug-susceptibility pattern. The isolates with fewer than six copies of IS6110 were considered to be clustered if the IS6110 RFLP patterns and the variable numbers of tandem repeats with 16 regions of ETR and MIRU "allele profile" were identical.

[Results] The number of samples in incremental study periods was 422 in 2001, 817 between 2001 and 2002 and 1200 between 2001 and 2003. The percentage of clustered cases was 27.8% in 2001, 19.1% in 2002 and 19.5% in 2003. The cumulative percentage of clustered cases was 27.8% in the first year, 29.7% over two years and 32.6% over three years. The percentage of clustered cases of isolates with a drug resistance was significantly lower (25.0%) than that of drug susceptible isolates (33.7%). Next, we investigated the clustered cases by gender and age. The percentage of clustered cases with isolates from young males and females (0–19 years

old) was 23.8%. In contrast, the percentage of clustered cases with isolates from 20–59 year-old females gradually decreased from 14.7% to 4.4%. Conversely, the percentage of clustered cases from young and middle aged male (20–59 years old) was higher (20.2%–32.4%) than that of females.

[Conclusion] The sharp increase in the cumulative cluster formation rate was curbed by the decline in the tuberculosis incidence rate in Osaka, Japan, after the first year of examination. We thought that this phenomenon suggests the success of the anti-tuberculosis measure in Japan.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, Molecular epidemiology, DNA fingerprinting, IS6110 RFLP, 16 VNTR, Cluster formation rate

<sup>1</sup>Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, <sup>2</sup>Department of Epidemiology, National Institute of Animal Health

Correspondence to: Hiromi Ano, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, 3–7–1, Habikino, Habikino-shi, Osaka 583–8588 Japan.  
(E-mail: ano@zeus.eonet.ne.jp)