

結核菌の分子疫学的解析

— 多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較 —

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ¹岡田 全司
²坂谷 光則

要旨：〔目的〕多剤耐性結核菌株と全剤感受性結核菌株の分子疫学的解析。〔対象〕国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて分離，同定された多剤耐性結核菌109株（MDR-TB群）と，全剤感受性結核菌226株（S-TB群）。〔方法〕IS6110を用いたRFLP法およびSpoligotyping法。〔結果〕RFLP法の結果，クラスター形成率はMDR-TB群，S-TB群ともに約43%を占め有意差は認められなかった（ χ^2 検定 $p=0.51>0.05$ ）。Spoligotyping法の結果，Beijing familyはMDR-TB群で77.1%（84株），S-TB群で84.5%（191株）認め，有意な差はなかった（ χ^2 検定 $p=0.09>0.05$ ）。〔結論〕MDR-TB群とS-TB群では，RFLPクラスター形成率，Spoligotyping法におけるBeijing familyの占める割合はほぼ同程度に認められ，両群の感染伝播力に大きな差がない可能性が支持された。

キーワード：結核菌，RFLP法，Spoligotyping法，多剤耐性，全剤感受性

はじめに

近年結核の感染状況を把握するために，様々な方法による分子疫学的解析が行われてきた。現在，菌株の識別能が高く多型性に富んだ方法として，結核菌染色体上の比較的安定した挿入配列IS6110をプローブとしたRestriction fragment length polymorphism (RFLP)法が世界的に標準化されている¹⁾²⁾。しかし，IS6110コピー数が1～5本以下の菌株では識別能が低いことと，煩雑な手技と大量のDNAが必要となる欠点から，より簡便かつ短時間で解析可能な別の遺伝子マーカーによる二次的型別が必要になってくる。Spacer oligonucleotide typing (Spoligotyping)法はRFLP法の二次的解析のひとつとして³⁾，アジアを中心として広汎に分布し強い感染伝播力を有したBeijing familyの鑑別が可能であり，広範囲の感染状況の解明に有益である。これらRFLP法とSpoligotyping法を用いて結核菌を分子疫学的に解明した報告は多いが^{4)～8)}，結核菌を多剤耐性結核菌（MDR-TB）群と全剤感受性結核菌（S-TB）群とに分類した比較検討は報告されておらず，単独薬剤耐性菌〔isoniazid (INH)，

streptomycin (SM)〕についての検討がなされているのみである⁹⁾。また従来感染伝播力が低いといわれてきたMDR-TBによる集団感染事例が近年報告されている¹⁰⁾。したがって今回，RFLP法，Spoligotyping法を用いて，当センターにおいて分離，同定された結核菌を対象に，薬剤感受性の違いによるクラスター形成率とBeijing familyの割合の比較を試みた。

方 法

〔対象〕

2001年1月1日から2005年12月31日の期間，独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて分離，同定された結核菌2827株中，下記の方法で示した2種類の薬剤感受性試験で少なくともINHとrifampicin (RFP)に対して耐性を示した多剤耐性結核菌109株をMDR-TB群とした（3.9%）。そのうちINH，RFPのみに耐性を示した株は4株（すべてのMDR-TBに占める割合は3.7%）であった。またethambutol (EB)を加えた3薬剤に耐性を示した株は61株（56%），pyrazinamide (PZA)を加えた4薬剤に耐性を示した株は1株（0.9%），SM

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹臨床研究センター，²内科

連絡先：吉田志緒美，独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター，〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
(Received 16 Nov. 2006/Accepted 28 Feb. 2007)

を加えた5薬剤に耐性を示した株は2株(1.8%)であり、残りの41株(37.6%)は上記5薬剤に加えて二次抗結核薬のいずれかに対しても耐性を示していた。また世界保健機関(WHO)は2006年11月に招集した Extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB) 専門委員会において INHとRFPだけでなく特定の Second-line drugs (少なくとも fluoroquinolone 中の1種と、注射薬の capreomycin, kanamycin, amikacin 中の1種)にも耐性をもつ結核菌を XDR-TBと定義しているが¹⁾、今回35株(MDR-TBの32.1%)に認められた。

MDR-TB群と比較するために必要な相当数の全剤感受性結核菌として2003年1月1日から8月31日の一定期間、当センターにて分離、同定された226株をS-TB群とした。

性別はMDR-TB群では男性81名(74.3%)、女性28名(25.7%)であり、S-TB群では男性163名(72.1%)、女性63名(27.9%)であった。平均年齢は、MDR-TB群では55.5±15.6歳、S-TB群では57.2±19.2歳であった。

治療歴は、MDR-TB群では初回治療37名(33.9%)、再治療72名(66.1%)であり、またXDR-TB患者のうち7名(XDR-TBの20%)は初回治療例であった。S-TB群では初回治療190名(84.1%)、再治療36名(15.9%)であった。

当センターは大阪府堺市に属しており、今回対象とした335菌株由来の患者の居住地は当センター周辺の堺市を中心とした大阪湾沿岸の泉州地域から和歌山県北部までの比較的広範囲にまたがる地域であった。また結核罹患率の高い大阪市西成区および浪速区からの患者はMDR-TB群で1名(0.9%)、S-TB群で22名(9.7%)であった。外国籍をもつ患者はMDR-TBで4名(3.7%)認められ、すべて中国籍であったが、S-TB群に外国籍をもつ患者は認められなかった。すべての患者の疫学調査は初診時の聞き取り調査用紙に基づいて行った。発症状況から明らかに家族内感染と思われる事例はMDR-TB群では認められず、S-TB群で4事例(構成員各2名)認められた。集団感染と思われる事例はMDR-TB群で3事例(構成員5名, 3名, 2名)認められたが、S-TB群での事例はなかった。すべての患者間での地域内感染と見られる事例は認められなかった。

〔方法〕

同定

菌株の同定は結核菌群同定用アキュプローブ結核菌群同定キット(極東製薬)と結核菌群同定試薬キャピリアTB(日本ベクトン・ディッキンソン)で行った。

薬剤感受性試験

薬剤感受性試験にはバクテックMGIT 960結核菌薬剤感受性試験用ミジットシリーズ(MGIT-AST法:日本ベ

クトン・ディッキンソン)と結核菌感受性ピットスペクトル-SR法(極東製薬)を用いた。PZAの薬剤感受性試験は結核菌感受性試験PZA液体培地法(極東製薬)を用いた。耐性の判定基準濃度はMGIT-AST法でINH 0.1 µg/ml, RFP 1.0 µg/ml, EB 5.0 µg/ml, SM 1.0 µg/mlとし、ピットスペクトル-SR法でINH 0.2 µg/ml, RFP 40 µg/ml, EB 2.5 µg/ml, SM 10 µg/mlとした。PZAは400 µg/mlとした。

RFLP法

van Embdenらの方法²⁾に準拠して行った。結核菌からのDNA抽出には0.1 mmのガラスビーズを用いて、Beads-beaterによるフェノールクロロホルム・イソプロパノール処理を行った。得られたゲノムを制限酵素Pvu II (TAKARA BIO)で消化、電気泳動後サザンブロッティングを行い、IS6110をプローブとして、ハイブリダイゼーションさせ、ジギキシゲニン発色でIS6110のバンドを検出した。バンドの解析にはMolecular Analyst Software (Bio-Rad)のDouble gel analysis法を用い、各々のレーンごとの補正として、λ/Hind IIIとφX174/Hae IIIの2種類のマーカーを使用した。メンブレン間の補正はH37Rvを標準株として用いた。

Spoligotyping法

結核菌DNAのSpacer配列を、directly repeated sequence (DR)のもとにデザインされた2種類のプライマー(ピオチン標識)を用いてpolymerase chain reaction (PCR)にて増幅し、43の合成オリゴヌクレオチドを固相化したメンブレン(Isogen Bioscience BV)に、Immunitics社のMiniblotter 45を用いてハイブリダイズさせた³⁾。パターンを検出にはECL発色システムを用いて個々のSpacer配列の有無を解析した。

結 果

RFLP法

IS6110コピー数は全対象結核菌335株において1~25本の分布を示し、11本にピークを認めた。そのうちMDR-TB群では9~25本のコピー数が認められ、10本にピークを認めた。一方S-TB群では1~20本の間に分布し、ピークは13本に認められ、両群ともに多型性が認められた。またコピー数5本以下の菌株はS-TB群にのみ3株(コピー数1, 3, 4本)認められた(Fig. 1, 2)。同一のバンドパターンを示すクラスターはMDR-TB群では12種類(47株)、S-TB群は20種類(99株)が認められた。クラスターの大きさ(構成員数)はMDR-TB群で2~11を示し、構成員11名のクラスターaグループと、構成員7名のクラスターeグループには両グループ内での患者の間に疫学的関連はなかった。一方S-TB群では2~16を示し、構成員6名が2つ、8名が2つ、

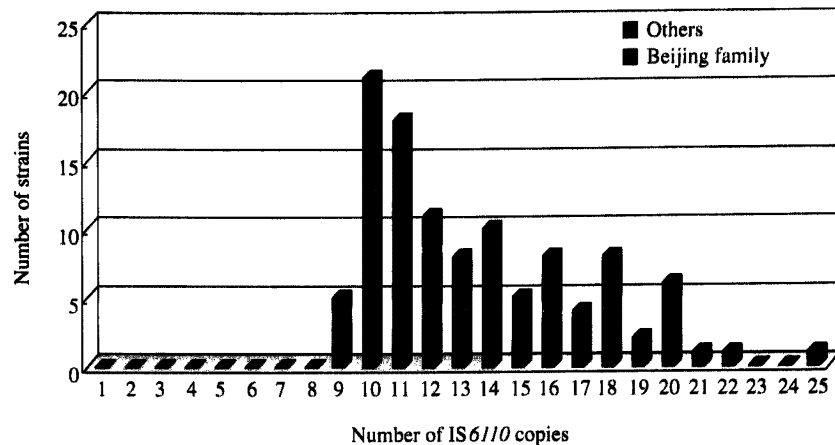


Fig. 1 Distribution by number of IS6110 copies: multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains

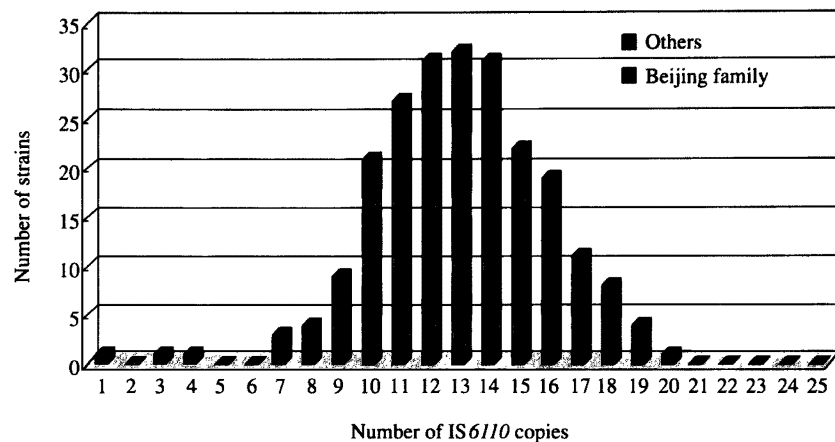


Fig. 2 Distribution by number of IS6110 copies: susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains

9名が1つ、14名、16名が各1つであった。家族内感染は構成員3名のtグループで2名、6名のaグループで2名、14名のcグループで2名、16名のfグループで2名に認められた (Table 2)。

クラスター形成率はMDR-TB群で43.1%、S-TB群は43.8%、全体で43.6%を示した (Table 1)。そのうち、MDR-TB群クラスターのパターンaはS-TB群クラスターのパターンaと同じパターンを示し、MDR-TB群クラスターのパターンiはS-TB群クラスターのパターンiと同じパターンを示した (Table 2)。

西成区および浪速区に居住地をもつ患者由来の22株 (S-TB群) のうち6株が5種類のクラスターに属し、残り16株はクラスターを形成しなかった。

外国籍をもつ患者由来のMDR-TB群に属する4株はクラスターを形成しなかった。

Spoligotyping法

今回われわれは、Spacer配列1~34の発色を認めない Beijing familyの占める割合を求めるにあたって、35~

43配列を有する典型的な Beijing型に加え、Mokrousovら¹²⁾の定義による Beijing型のパターンに類似した Beijing-likeも Beijing familyとして全株を分類した。その結果、Beijing familyはMDR-TB群で84株 (77.1%)、S-TB群では191株 (84.5%)、全体で275株 (82.1%)を占めた。一方 Beijing family以外の遺伝子型をもつ株で International Spoligotyping database SpolDB3分類¹³⁾に示される familyに分類された株はMDR-TB群の25株中13株と、S-TB群35株中の24株と判定された。それ以外の24株 (MDR-TB群12株、S-TB群12株)はSpolDB3の family definitionに分類されない Unique株と判定された (Table 1)。また Uniqueパターンを示した株の中にIS6110コピー数5本以下を示したS-TB群の3株が含まれていた (Table 3)。

RFLP法でクラスター形成を認めた Beijing familyはMDR-TB群で35株 (32.1%)、S-TB群で86株 (38.1%)であった。一方 Beijing family以外のクラスター形成グループとしてMDR-TB群ではLAM1 (Latin American and Mediterranean) familyのbグループ (7株)、T2 family

Table 1 Comparison of MDR-TB and S-TB by RFLP and Spoligotyping

		Cluster	Others	Total	Cluster %
RFLP	MDR-TB	47	62	109	43.1
	S-TB	99	127	226	43.8
	Total	146	189	335	43.6
		Beijing family*	Others	Total	Beijing %
Spoligotyping	MDR-TB	84	25	109	77.1
	S-TB	191	35	226	84.5
	Total	275	60	335	82.1
		Class**	Unique	Total	
Non-Beijing family	MDR-TB	13	12	25	
	S-TB	24	12	35	
	Total	37	24	60	

* ancient Beijing strains and Beijing-like spoligoprofiles

** major classes of *M. tuberculosis* in SpoIDB3**Table 2** DNA fingerprinting results for MDR-TB and S-TB isolates by RFLP and Spoligotyping

MDR-TB				S-TB							
Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster
1010016	a*	2011505	f*	3070599	a*	3080908	e ^{T1}	3080070	g*	3080951	m
1011097	a*	1100583	f*	3030861	a*	3070182	e ^{T1}	3081137	g*	3070657	m
1051148	a*	3040439	f*	3110253	a*	3070919	e ^{T1}	3030853	g*	3070044	n*
1020193	a*	2050419	g*	3020215	a*	3080723	e ^{T1}	3020287	g*	3070658	n*
2070344	a*	3060933	g*	3010525	a*	3010626	e ^{T1}	3070708	g*	3020048	o*
2010894	a*	1012035	g*	3010925	a*	3010007	e ^{T1}	3011132	g*	3020024	o*
3070308	a*	1040969	h*	3071163	b*	3030100	e ^{T1}	3010820	g*	3020124	p*
2100456	a*	2020438	h*	3080532	b*	3030834	e ^{T1}	3020779	g*	3010501	p*
1010518	a*	1070653	i*	3070045	c*	3020017	e ^{T1}	2100603	h*	3080765	p*
1060866	a*	3060032	i*	3070400	c*	2120831	f*	2100985	h*	3031049	p*
2071004	a*	2100509	j ^{T2}	3070543	c*	2060904	f*	3070421	h*	3080540	q
2101128	b**	3071249	j ^{T2}	3080792	c*	3071093	f*	3070878	h*	3030993	q
3020418	b**	2011515	j ^{T2}	3022013	c*	3090992	f*	3080597	h*	3010419	r*
2060497	b**	1011111	k ^{T1}	3022069	c*	3070512	f*	3080475	h*	3010785	r*
3030886	b**	2020473	k ^{T1}	3030607	c*	3070215	f*	3030726	h*	3010395	r*
3020454	b**	2011505	l*	3071172	c*	3080936	f*	3030794	h*	4010937	s*
3010929	b**	2060287	l*	3070737	c*	3030206	f*	2110964	i*	3110253	s*
2011514	b**			3031018	c*	3040093	f*	3070025	i*	3030039	s*
3050944	c*			3030796	c*	3040033	f*	3071118	i*	2061106	t*
3020288	c*			3020810	c*	3030165	f*	3070116	j*	3100905	t*
2091054	c*			3031022	c*	3020391	f*	3010231	j*	3080817	t*
1070018	d*			3030837	c*	3010178	f*	3030083	k*		
1080214	d*			3030316	d*	3020757	f*	3030553	k*		
2060548	e*			3070021	d*	3010746	f*	3090365	l*		
2060510	e*					4011101	f*	3030634	l*		
2060423	e*							3070977	l*		
3060080	e*							3081099	l*		
3060868	e*							3030156	l*		
3060247	e*							3020920	l*		
1030685	e*										

* Beijing family

** LAM1 family

^{T1} T1 family^{T2} T2 familySuperscript letters: classes of *Mycobacterium tuberculosis* excerpted from SpoIDB3

The a pattern in MDR-TB was similar of the a pattern in S-TB by RFLP.

The i pattern in MDR-TB was also similar of the i pattern in S-TB by RFLP.

していた沖縄県での報告¹⁶⁾や、大島らの1～17本の分布で10と12本にピークが見られた岡山県の報告¹⁷⁾と同様の分布状況であった。したがって当センター周辺地域と他の地域での結核菌感染伝播に大きな違いは見られないと考えられた。

クラスター形成率は最近の感染からの発病を反映しているという定義が分子疫学を応用した感染対策の原則である。オランダ(1995年)、デンマーク(1998年)でのクラスター形成率は46.0%(結核罹患率:人口10万対10.4)、50.0%(10万対9.6)と報告されており¹⁸⁾、結核の低蔓延地域(10万対10未満)では比較的高いクラスター形成率を形成するものと考えられている。一方ニューヨークにおける1989年の結核罹患率は10万対36(全米平均は10万対9.2)となっているにもかかわらず、Allandら¹⁹⁾の1989～1991年での報告によるとクラスター形成率は37.5%であった。わが国では、阿野ら²⁰⁾の2001年の報告で大阪中南部地域のクラスター形成率は32.0%で中蔓延地域であるとしている。財団法人結核予防会から出版されている「結核の統計2002」²¹⁾によると2001年の大阪府における結核罹患率51.9は、全国平均の27.9より高値であった。したがって、大都市では地方に比べると結核罹患率が高いという地域間格差が見られ、また高いクラスター形成率が都市部における最近の感染状況を示唆していると考えられている。

今回の検討によるクラスター形成率は43.6%であった。そこで当センター周辺地域の結核罹患率を推定するために、まず西成区および浪速区に居住する患者由来菌株22株の対象菌株に占める割合は低い値を示していたこと(9.7%)から、大阪府の罹患率を今回の当センター周辺地域の罹患率と仮定した。結核罹患率は年度ごとに変動があるため、長期にわたって集められたMDR-TB群のサンプリング期間の中央値であり、S-TB群のサンプリング期間である2003年のデータを用いた。「結核の統計2004」²²⁾によると大阪府の2003年の結核罹患率は人口10万対44.0であり、全国平均(10万対24.8)よりも高かった。したがって当センター周辺地域は世界の高蔓延地域に比べると低い中蔓延地域ではあるが、ニューヨーク¹⁹⁾や大阪中南部²⁰⁾で示されたのと同様に、都市における比較的最近の感染発病を反映していると考えられた。

高島毛ら²³⁾は1996年から2000年までに結核高蔓延地域(西成区および浪速区)を含む大阪市内在住患者によるRFLP法を実施した結果、高蔓延地域と他の地域とでクラスター形成率は差が見られなかったとしている。そこで彼らはクラスター形成率と地域の罹患率水準の間には相関がなく、高結核罹患率は最近の感染伝播によるものではなく古い感染の内因性再燃発病による可能性が高

いと述べている。今回の検討から比較的高いクラスター形成率と高蔓延地域とはいいがたい結核罹患率が示され、クラスター形成率と結核罹患率との間に関連性が見られないという高島毛らの考えが支持できた。

しかし、結核においては「クラスター形成率=最近の感染の反映」とは必ずしもいえないという報告がBradenら²⁴⁾による米国アーカンソー州での地域結核分子疫学的研究で示されている。それによると33%の患者がクラスターを形成していたが、疫学的関連が確認されたのはそのうちの42%にすぎなかったとしている。高橋ら¹⁶⁾も沖縄県における地域流行株の存在を示唆している。今回、疫学的関連性が認められた事例は家族内感染の4事例(S-TB群)と集団感染と思われる事例の3事例(MDR-TB群)のみであり、疫学的につながりがないと思われる感染がほとんどであった。同様にクラスターの大きさ(構成員数)はMDR-TB群とS-TB群とで同程度に認められ、両群ともに構成員の大きいクラスターグループが存在していたが、多くの患者間での相互接触関係が証明されなかった。構成員数が大きいグループの中で疫学的関連が低い場合には幾世代か前の流行を反映する地域特有な株と推定されることから¹⁶⁾、過去に起きた流行株による内因性再燃発病によるものと考えられている。しかし最近に起こった患者間の偶発的な伝播による感染発病もありうることから、このような場合、患者に対して綿密な接触調査を実施することが必要となってくる。当センターのような広範囲な地域から結核症患者を受け入れる医療機関においては、患者情報を管轄する保健所が多岐にわたってしまい、個人のプライバシーの保護のうえからも患者情報の詳細な把握は非常に困難である。したがって現時点での解析結果からは、感染伝播力の強い結核菌による最近の感染発病と、地域的に流行している菌による内因性再燃発病の両方が混在して、クラスターを形成している可能性が考えられた。

MDR-TB群とS-TB群との間のクラスター形成率に有意差は認められなかった。従来薬剤耐性結核菌の感染伝播力は弱いとされてきたが⁹⁾²⁵⁾、近年、阿野ら²⁰⁾は大阪中南部地域を対象としたRFLP法の結果、薬剤感受性患者群とINH、RFP、EB、SMいずれかの薬剤に耐性の患者群とのクラスター形成率に有意差はなかったと報告している。われわれもMDR-TBの感染伝播力が必ずしも弱いとはいえないことを示すMDR-TBによる集団感染事例¹⁰⁾を報告している。したがって結核菌の感染伝播力は薬剤感受性に関係しないとの考えを今回支持できたことは意義があると考えられた。

MDR-TB群とS-TB群で共通のパターンを示すクラスターが2組認められた。すなわち感染伝播力の強い感受性菌が感染伝播力を保ちながら多剤耐性化し流行した可

能性と、全剤感受性の流行株が不適切な治療で多剤耐性化（獲得耐性）してクラスターを形成した可能性が、両群における共通パターンの存在から示唆された。

Spoligotyping 法

今回の検討では MDR-TB 群、S-TB 群ともに Beijing family が約 75% 以上を占め、両群に有意差は認められなかった。また RFLP 法でクラスターを形成したグループは大部分が Beijing family に属していた (Table 2)。Beijing family は感染伝播力が強く、薬剤耐性を獲得しやすいとされており^{61,26)}、今回両群が同じ割合で Beijing family に属していたことは、薬剤感受性の違いによる結核菌の感染伝播力に差はない可能性をさらに支持する結果と考えられる。

RFLP 法と Spoligotyping 法のクラスターから推定した最近の結核感染発病率は、今回全対象結核菌 336 株において、大角ら¹⁹⁾が報告している 30.0% とほぼ同程度の 34.0% を示し、MDR-TB 群においては 32.1%、S-TB 群においては 35.0% であった。したがって最近における感染発病率も薬剤感受性に左右されない可能性が支持された。

ま と め

薬剤感受性の違いによる結核菌の感染伝播力の違いについて、遺伝子学的手法を用いた分子疫学的解析を行った結果、RFLP 法では MDR-TB と S-TB 群の間のクラスター形成率に有意差はなく (χ^2 検定 $p=0.51 > 0.05$)、Spoligotyping 法でも両群間の Beijing family の占める割合に有意差がないことを証明できた (χ^2 検定 $p=0.09 > 0.05$)。今回のデータは当センター周辺地域における結核対策の活動に役立つ基礎的データとして有用であると考えられた。

文 献

- van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, et al.: 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.* 1991; 29: 2578-2586.
- van Embden JDA, 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.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al.: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 907-914.
- Cowan LS, Crawford JT.: Genotype analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a sentinel surveillance population. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1294-1302.
- Toungousova OS, Mariandyshev A, Bjune G, et al.: Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the archangel prison in Russia: predominance of the W-Beijing clone family. *Clin Infect Dis.* 2003; 37: 665-672.
- Diaz R, Kremer K, de Haas PEW, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of Spoligotyping versus IS 6110 restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2: 743-750.
- Kubica T, Rüscher-Gerdes S, Niemann S.: The Beijing genotype is emerging among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Germany. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8: 1107-1113.
- Krüüner A, Hoffner SE, Sillastu H, et al.: Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3339-3345.
- van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PEW, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis.* 1999; 180: 726-736.
- 露口一成: 外来性再感染も含む多剤耐性結核菌による院内集団感染事例について. 複十字. 2003; 293: 8-11.
- WHO: Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendation for prevention and control. *Wkly Epidemiol Rec.* 2006; 45: 430-432.
- Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, et al.: Analysis of the allelic diversity of the Mycobacterial interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2438-2444.
- Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, et al.: Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1347-1349.
- Goguet de la Salmonière YO, Li HM, Torrea G, et al.: Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2210-2214.
- 大角晃弘, 高橋光良, 内村和広, 他: 結核菌 DNA 指紋法を用いた結核対策改善事業成績 (1996年4月~2004年5月の概略). 資料と展望. 2004; 51: 77-83.
- 高橋光良: 結核分子疫学の成果と展望. 結核. 2002; 77: 741-752.
- 大島律子, 多田敦彦: 岡山県内で分離された結核菌 DNA の IS 6110-RFLP パターン分析. 結核. 2002; 77: 629-637.
- Bauer J, Yang Z, Poulsen S, et al.: Results from 5 years of nationwide DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in a country with a low incidence of *M. tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 305-308.
- Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al.: Transmission of tuberculosis in New York City—An analysis by DNA

- fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1710-1716.
- 20) 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—当院医療圏である大阪中南部地域の場合—. *結核.* 2002; 77: 783-788.
- 21) 厚生労働省健康局結核感染症課監修: 「結核の統計2002」. 結核予防会, 東京, 2002, 4.
- 22) 厚生労働省健康局結核感染症課監修: 「結核の統計2004」. 結核予防会, 東京, 2004, 4.
- 23) 高島毛敏雄: 社会経済弱者における結核対策の強化に関する研究. 厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「再興感染症としての結核対策確立のための研究」平成14年度分担研究報告. 2003; 49-213.
- 24) Braden CR, Templeton GL, Cave MD, et al.: Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis.* 1997; 175: 1446-1452.
- 25) Middlebrook G: Diagnosis and biological problems of isoniazid-resistant tubercle bacilli. *Bull IUATLD.* 1956; 26: 179-205.
- 26) Niemann S, Rünsch-Gerdes S, Richter E: IS 6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 3015-3020.

————— Original Article —————

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
— Comparison between Multidrug-Resistant Strains and Susceptible Strains —

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiro SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ¹Masaji OKADA,
and ²Mitsunori SAKATANI

Abstract [Purpose] Comparing multidrug-resistant *M. tuberculosis* strains with susceptible strains by molecular epidemiological methods.

[Methods] We examined 109 multidrug-resistant strains (MDR-TB) and 226 susceptible strains (S-TB) derived from National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center by restriction fragment length polymorphism (RFLP) with IS6110, and Spacer oligonucleotide typing (Spoligotyping).

[Results] In the case of MDR-TB, 47 strains (43.1%) belonged to 12 descriptions of clusters and the number of IS6110 copies per isolate ranged from 9 to 25. Similarly, 99 strains (43.8%) belonged to 20 descriptions of clusters in S-TB and the distribution of IS6110 copies were from 1 to 20. On the other hand, 84 strains of MDR-TB (77.1%) and 191 strains of S-TB (84.5%) belonged to Beijing family by Spoligotyping.

[Conclusion] MDR and susceptible *M. tuberculosis* strains were characterized similarities in ratio of clusters by RFLP patterns and high proportion of Beijing family by Spoligotyping. These finding supported the possibility that infectiousness of MDR-TB might be similar to that of S-TB.

Key words: *M. tuberculosis*, IS6110-RFLP, Spoligotyping, Multidrug-resistant, Susceptible

¹Clinical Research Center, ²Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

Correspondence to: Shiomi Yoshida, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)