

# 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—

前田 伸司 村瀬 良朗 御手洗 聡 菅原 勇  
加藤 誠也

**要旨:**〔目的〕 VNTR法を用いた日本国内の結核菌型別法開発のために各ローカスの識別能を評価した。〔方法〕 全国から集めた325株および院内感染・集団発生疑い例の24事例, 74株を対象にし, IS6110 RFLP, スポリゴタイピングおよびVNTR分析 (35 loci) を行った。〔結果・考察〕 4カ所 (VNTR 2163a, 3232, 3820および4120) を除き, *h*値の上位12カ所 (VNTR 0424, 0960, 1955, 2074, 2163b, 2372, 2996, 3155, 3192, 3336, 4052および4156) を分析すると, 識別能はIS6110 RFLP分析より優れていた。このVNTRシステムをJATA(12)-VNTR分析法と名付け, 次にヨーロッパ諸国で採用されているSupply(15)-VNTR分析法と識別能を比較した。JATA(12)-VNTR分析法は12カ所の分析にもかかわらず, 15カ所分析するSupplyらのVNTRシステムより優れた識別能をもっていた。よって, 本JATA(12)-VNTR分析法は, 日本だけでなく北京型結核菌の割合が高い地域でVNTR分析の標準法として利用できると思われる。

**キーワード:** 結核, 分子疫学, RFLP, VNTR, 北京型結核菌

## はじめに

現在の結核菌型別標準法は, Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 分析法である。しかし, この分析法は高分子のDNA (1  $\mu$ g以上) が必要なので, 菌を長期培養 (2~3週間) する必要がある, またバンドの差異 (アナログデータ) の判定は肉眼によるため, 電気泳動の状態や条件による結果の変動が大きく, 多施設間でのデータ比較および共有は難しい等の欠点がある<sup>1)</sup>。このようなRFLP法の欠点を補う新規の型別法として, Variable numbers of tandem repeats (VNTR) 分析法が報告された。このVNTR法は, パスツール研究所で進められた結核菌のゲノムプロジェクトで明らかになったMycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) などの繰り返し配列のコピー数を調べ, 結核菌の型別を行う方法である<sup>2)</sup>。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を利用して核酸を増幅するため, 少量の未精製のDNAを検体とし

て使うことができる。そのため, 死菌体からでも分析可能であり, 三種病原体と分類され移動が困難になった多剤耐性結核菌でもオートクレーブした小川培地を分析施設に送付すれば型別は可能である。

大都市における結核対策には, 人の移動を考慮して広域での結核疫学調査が必要となる。広域調査には, 結果がデジタルで表されるVNTR法が有望な型別法である。しかしながら, 米国で採用されている12カ所のMIRU分析で日本国内の株を型別すると約23%の株が同一プロファイルとなる<sup>3)</sup>ことや, Supplyらの15-loci VNTR分析<sup>4)</sup>でも大きなクラスターが残ることが報告<sup>5)</sup>されていることから, これらの既に報告されている方法を直接日本で採用することはできない。

本研究では, ほぼ全国から集めた結核菌を分析し, 日本国内での結核菌型別の新しいVNTRシステム, すなわちJapan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR分析法を確立したので報告する<sup>6)7)</sup>。

Table 1 PCR primer sequences used in this study

No. of JATA (12)	Alias	PCR primer pairs (5' to 3')		Reference
2	MIRU-2	TGGA <sup>CT</sup> TGCAGCAATGGACCAACT	TACTCGGACGCCGGCTCAA <sup>AA</sup> T	Supply et al., <i>J Clin Microbiol.</i> 2001 ; 39 : 3563-3571.
	MIRU-4	GCGCGAGAGCCCCGA <sup>ACT</sup> G	GCGCAGCAGAAACGTCAGC	
	MIRU-10	GTTCTT <sup>G</sup> ACCAACTGCAGTCGTCC	GCCACCTTGGT <sup>G</sup> ATCAGCTACCT	
	MIRU-16	TCGGT <sup>G</sup> ATCGGGTCCAGTCCAAGTA	CCCCTCGTGCAGCCCTGGTAC	
	MIRU-20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG	GGAGACCGCGACCAGGTA <sup>CT</sup> TGTA	
	MIRU-23	CTGT <sup>C</sup> GATGGCCGCAACAAAACG	AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTT <sup>T</sup> GTC	
	MIRU-24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT	GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA	
	MIRU-26	TAGGTCTACCGT <sup>C</sup> GAAATCTGTGAC	CATAGGCGACCAGGGCA <sup>AT</sup> AG	
	MIRU-27	TCGAAAGCCTCTGCGTGCAGTAA	GCGATGTGAGCGTGC <sup>CA</sup> CTCAA	
	MIRU-31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	GTGCCGACGTGGTCTT <sup>G</sup> AT	
MIRU-39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC	CGGAAACGTCTACGCC <sup>CA</sup> CACAT		
MIRU-40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT	GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA		
ETR-A	ETR-A	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT	Frothingham & Meeker-O'Connell, <i>Microbiology.</i> 1998 ; 144 : 1189-1196.
	ETR-B	GCGAACACCAGGACAGCATCATG	GGCATGCCGGTGATCGAGTGG	
	ETR-C	GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCAG	GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG	
	ETR-F	CTCGGTGATGGTCCGGCCGGTCA	GGAAGTGCTCGACAACGCCATGCC	
5	VNTR 2163a	CGTGATGTTGATCGGGATGT	ACCCTGGAGTCTGGC <sup>AT</sup> C	Iwamoto et al., <i>FEMS Microbiol Lett.</i> 2007 ; 270 : 67-74.
	VNTR 2163b	CCGATGTAGCCCGTGAAGA	AGGGTCTGATTGGCTACTCA	
	VNTR 3232	CCCAGCCTTACGACTGA	GTCGGGCTTGGTGAAGG	
3	VNTR 1955	AGACGTCAGATCCCAGTT	ACCCGACAACAAGCCCA	Smittipat et al., <i>J Clin Microbiol.</i> 2005 ; 43 : 5034-5043.
	VNTR 3820	TGCGCGGTGAATGAGACG	ACCTTCATCCTTGGCGAC	
	VNTR 4120	GTTACCCGGAGCCAACC	GAGGTGGTTTCGTGGTCCG	
12	VNTR 4156	ACC <sup>G</sup> CAAGGCTGATGATCC	GTGCATCTCGT <sup>C</sup> GACTTCC	
1	VNTR 0424	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT	GGCAGCAGAGCCCCGGGATTCTTC	Supply et al., <i>J Clin Microbiol.</i> 2006 ; 44 : 4498-4510.
	VNTR 2347	GCCAGCCGCGTGCATAAACCT	AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC	
	VNTR 3171	GGTGCACCTGTCCAGATAA	GGCTCTCATGTGAGGGTGTGAC	
	VNTR 3690	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC	TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG	
10	VNTR 1895	GGTGACCGCCTCGGCTCC	AAGCCCCGCCCAATCAA	Roring et al., <i>J Clin Microbiol.</i> 2002 ; 40 : 2126-2133.
	VNTR 3336	ATCCCCGCGGTACCCATC	GCCAGCGGTGTCGACTATCC	
4	VNTR 1612	GGTATCACCGGAGCCGGAACG	CATGGCTGGTGTCCGTTTCGT	This study
	VNTR 2074	TGTGTACCTGACGATTTC <sup>A</sup> AGG	TGGCCGGCAAATAATGGATGC	
6	VNTR 2372	ACCTCCGTTCCGATAATCCG	CAGCTTTCAGCCTCCACAAT	
	VNTR 2401	CGTCGTCGCCGAGCTGGATT	CACCGGGGCTGGCAGCTAAG	
8	VNTR 3155	GCCAGCCGTAACCCGACCAG	GGGCCGGAAATTCG <sup>C</sup> AGTGG	
	VNTR 4052	GTGCCGGCCAGTCCCTTC	CACCGCGTGTTCGACCCGAAC	

The number of JATA (12) was sequentially named by locus number.

## 方 法

〔結核菌分離株と型別法〕結核療法研究協議会が2002年に収集した菌株の中から都道府県ごとに、ランダムに3~10株選択した。これら合計325株について、IS6110 RFLP, スポリゴタイピングおよびVNTR分析を行った。VNTR分析は、ゲノム上の35カ所について分析を行った (Table 1)。また、集団感染・院内感染疑い例の24事例、74株についてJATA (12)-VNTR法で分析を行い、IS6110 RFLP分析結果との比較を行った。

〔ゲノムDNAの調製〕結核菌のゲノムDNAの精製は、ISOPLANT (ニッポンジーン社)により行った。VNTR分析のみを目的とした場合は、小川培地をオートクレーブ後、凝固水と菌塊を回収し遠心上清を粗抽出DNA画分としてPCR用の検体とした。

### Mixture for PCR:

Template DNA	(~ 10 ng)
20 μM Primers	0.5 μl each
2.5 mM dNTPs	2 μl
2×GC buffer I (Takara)	10 μl
Distilled water	
Ex Taq (5U/μl) (Takara)	0.1 μl
	20 μl

### PCR program:

94°C	5 min	} 35 cycles
94°C	30 sec	
63°C	30 sec	
72°C	3 min	
72°C	7 min	
4°C	∞	

Fig. 1 Protocol for VNTR analysis

**Table 2** Conversion table for JATA (12) -VNTR analysis

JATA No.	Alias	Locus	Unit (bp)	Copy no. of H37Rv	Copy number of tandem repeat unit (s)															
					0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	Mtub 04	0424	51	2	535	586	<b>637</b>	688	739	790	841	892	943	994	1045	1096	1147	1198	1249	1300
2	MIRU 10	0960	53	3		536	589	<b>642</b>	695	748			907				1116			
3	Mtub 21	1955	57	1	208	<b>265</b>	322	379	436	493	550	607	664	721	778	835	892	949	1006	1063
4	Mtub 24	2074	56	4		70	126	182	<b>238</b>	294	350	406	462	518	574	630	686	742	798	854
5	QUB 11b	2163b	69	5	200	269	338	407	476	<b>545</b>	614	683	752	821	890	959	1028	1097	1166	1235
6	VNTR 2372	2372	57	2	176	233	<b>290</b>	347	404	461	518	575	632	689	746	803	860	917	974	1031
7	MIRU 26	2996	51	3		336	387	<b>438</b>	489	540	591	642	693	744	795					
8	QUB 15	3155	54	4	71	125	179	233	<b>287</b>	341	395	449	503	557	611	665	719	773	827	881
9	MIRU 31	3192	53	3			597	<b>650</b>	703	756	809	862								
10	QUB 3336	3336	59	8	98	157	216	275	334	393	452	511	<b>570</b>	629	688	747	806	865	924	983
11	QUB 26	4052	111	5	168	279	390	501	612	<b>723</b>	834	945	1056	1167	1278	1389	1500	1611	1722	1833
12	QUB 4156	4156	59	3	510	569	628	<b>687</b>	746	805	864	923	982	1041	1100	1159	1218	1277	1336	1395

The bold number in each locus is the molecular size of PCR products when genomic DNA of H37Rv is analyzed.

**Table 3** Conversion table for VNTR analysis

Alias	Locus	Unit (bp)	Copy no. of H37Rv	Copy number of tandem repeat unit (s)																
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						
MIRU 2	0154	53	2			454	<b>507</b>	560												
MIRU 4*	0580	77	3'(352bp)	184	261	338	415													
MIRU 16	1644	53	2		617	<b>670</b>	723	776	829											
MIRU 20	2059	77	2		513	<b>590</b>														
MIRU 23	2531	53	6		200		306	359	412	<b>465</b>	518	571								677
MIRU 24	2687	54	1		<b>447</b>	501														
MIRU 27	3007	53	3		551	604	<b>657</b>	710												
MIRU 39	4348	53	2		592	<b>645</b>	698	751												
MIRU 40	0802	54	1		<b>407</b>	461	515	569												
ETR A	2165	75	3			334	<b>410</b>	482	554											
ETR B	2461	57	3		166	220	<b>278</b>	334												
ETR C	0577	58	4			149	208	<b>263</b>	321											
ETR F	3239	79	3	308	362	412	<b>462</b>	517												
QUB 23	1612	21	6	52	73	94	115	136	157	<b>178</b>	199	220	241	262						
VNTR 1895	1895	57	4	81	138	195	252	<b>309</b>	366	423	480	537	594	651						
Mtub 30	2401	58	2	75	133	<b>191</b>	249	307	365	423	481	539	597	655						
Mtub 29	2347	57	4	327	384	441	498	<b>555</b>	612	669	726	783	840	897						
Mtub 34	3171	54	3	318	372	426	<b>480</b>	534	588	642	696	750	804	858						
Mtub 39	3690	58	5**	260	318	376	434	492	<b>550</b>	608	666	724	782	840						
QUB 11a	2163a	69	2	170	239	<b>308</b>	377	446	515	584	653	722	791	860						
QUB 3232	3232	56	4	181	237	293	349	<b>405</b>	461	517	573	629	685	741						
VNTR 3820	3820	57	3	266	323	380	<b>437</b>	494	551	608	665	722	779	836						
VNTR 4120	4120	57	2	326	383	<b>440</b>	497	554	611	668	725	782	839	896						

\* H37Rv has Type I (77bp) unit (s) in the locus of MIRU 4. However, most clinical isolates have an additional Type II unit (53bp) in MIRU 4.

\*\* Based on actual measurement, the copy number of tandem repeat units was defined.

〔PCR法によるVNTRローカスの増幅〕結核菌DNA (1~10 ng), 0.5 μMのプライマー混合液, GC buffer I (タカラバイオ社), 0.2 μM dNTP, Takara Ex Taq (0.5 U)を混合し, H<sub>2</sub>Oで全量20 μlとして反応液を調製した (Fig. 1)。PCRの条件は, 94℃で5分加熱した後, 94℃30秒, 63℃30秒, 72℃3分のサイクルを35回繰り返し, 72℃で7分加熱し, その後4℃とした。

〔アガロースゲル電気泳動〕PCR増幅液は, TBE緩衝液

を用いた1.5~2.5%アガロースゲルで電気泳動を行い, PCR産物の分子量を算出した。そして, Table 2およびTable 3を用いてコピー数へ換算した。

〔識別能の比較〕h値を用いて各ローカスの識別能を比較した<sup>3)</sup>。

## 結 果

日本国内株分析のためのVNTR標準法

**Table 4** The VNTR loci selected for the different VNTR analyses

No.	locus	Alias	<i>h</i> *	This study		
				12 VNTR	24 VNTR	15 VNTR
1	2163b	QUB 11b	0.855	○	○	○
2	4052	QUB 26	0.812	○	○	○
3	3336		0.768	○		
4	1955	Mtub 21	0.731	○	○	○
5	4156		0.693	○	○	○
6	2372		0.675	○		
7	0424	Mtub 04	0.635	○	○	○
8	2074	Mtub 24	0.614	○		
9	2996	MIRU 26	0.591	○	○	○
10	3155	QUB 15	0.575	○		
11	0960	MIRU 10	0.546	○	○	○
12	3192	MIRU 31	0.545	○	○	○
13	2401	Mtub 30	0.498		○	○
14	2165	ETR A	0.496		○	○
15	0802	MIRU 40	0.473		○	○
16	4348	MIRU 39	0.472		○	
17	3690	Mtub 39	0.406		○	○
18	1895		0.367			
19	3239	ETR F	0.358			
20	1644	MIRU 16	0.345		○	○
21	2531	MIRU 23	0.336		○	
22	0580	MIRU 4	0.189		○	○
23	2461	ETR B	0.151		○	
24	0577	ETR C	0.134		○	○
25	2347	Mtub 29	0.129		○	
26	2059	MIRU 20	0.083		○	
27	3007	MIRU 27	0.072		○	
28	2687	MIRU 24	0.054		○	
29	3171	Mtub 34	0.036		○	
30	1612	QUB 23	0.024			
31	0154	MIRU 2	0.018		○	
32	3232		0.929			
33	4120		0.924			
34	3820		0.911			
35	2163a	QUB 11a	0.836			

\* *h* represented the allelic diversity of each locus.

検体が精製したゲノム DNA, 粗抽出 DNA 画分のどちらの場合でも, 種々の検討から VNTR 分析では, Takara Ex Taq と GC buffer I を使った PCR キット (タカラバイオ社: RR06BG) を使うと最も効率よく PCR 産物が得られた。

既に報告されている MIRU 分析に Exact tandem repeat (ETR) の 4 カ所を加えた VNTR 分析で日本国内の株を分析すると, IS6110 RFLP 法に比べて識別能は低かった。この原因として国内では北京型結核菌の割合が 73.8% と高いことが考えられる。北京型結核菌を効率よく型別可能なローカス<sup>8)</sup>を選び分析を行った。

得られる PCR 産物が高分子となると反復配列数のコピー数の相違を判定することが難しい。このような株が

**Table 5** Discriminatory power of IS6110 RFLP and VNTR analyses

Typing method	Total no. of type patterns	No. of clusters	No. of clustered isolates (%)	Maximum no. of isolates in a cluster
IS6110 RFLP	283	18	60 (18.5)	8
8-locus VNTR (VNTRs 2163b, 4052, 3336, 1955, 4156, 2372, 0424, and 2074)	290	25	60 (18.5)	5
10-locus VNTR (8-locus VNTR + VNTRs 2996, and 3155)	297	21	49 (15.1)	4
JATA (12)-VNTR	302	18	41 (12.6)	4
Supply (15)-VNTR	291	22	56 (17.2)	6

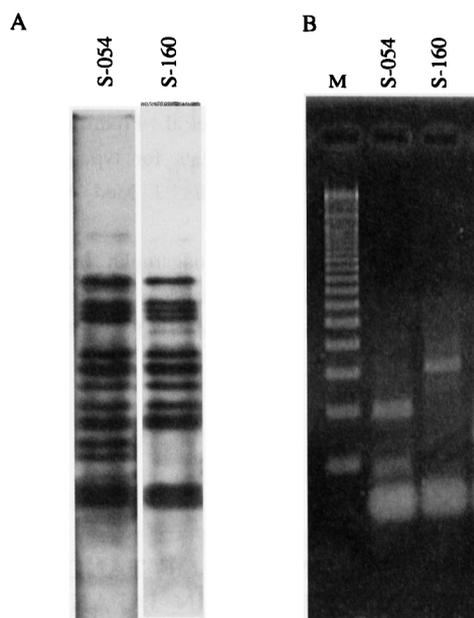
多く含まれる VNTR 2163a, 3232, 3820 および 4120 の 4 カ所は, 分析ローカスから除外した。残りの 31 カ所について, *h* 値が高いものから順番に並べて分析ローカスの上位 8, 10, 12 カ所の組み合わせを作り (Table 4), IS6110 RFLP 分析結果と識別能を比較した (Table 5)。上位 12 カ所 (VNTR 0424, 0960, 1955, 2074, 2163b, 2372, 2996, 3155, 3192, 3336, 4052 および 4156) の組み合わせで VNTR 分析を行うと, 調べたすべての指標で IS6110 RFLP 分析結果より優れた識別能だった。そこで, このローカスの組み合わせを JATA (12)-VNTR 分析法と命名した。

#### ヨーロッパで提唱されている 15-locus および 24-locus の VNTR 分析との比較

クラスター形成率で比較すると, 本分析法は, 12 カ所の VNTR 分析にもかかわらず, Supply らによって提唱されたヨーロッパ諸国での VNTR 分析標準法<sup>4)</sup>の 24-locus 分析には及ばないものの, 15-locus 分析よりも優れていた (Table 5)。

#### 集団感染疑い事例における JATA (12)-VNTR 法と IS6110 RFLP 法の型別結果の比較

接触者調査から同一株による感染が疑われた事例 (24 例, 74 株) について RFLP 分析を行うと, 17 例 (54 株) ではそれぞれの事例内で RFLP パターンは一致した。また, これらのすべての例で JATA (12)-VNTR 分析でも事例内で同じプロファイルとなり, RFLP と VNTR の両分析法で型別結果が一致することが確認された。一方, 7 例 (20 株) は, RFLP 分析で各事例内においても別パターンとなったことから, これらの事例は集団感染例ではなく, 同時発生病例であることが判明した。そのため, JATA (12)-VNTR 分析法によるプロファイルも異なることが



**Fig. 2** IS6110 RFLP and VNTR analyses of isolates  
These isolates were initially suspected as an outbreak case. However, the RFLP pattern was different each other. So, it turned out that this case was not epidemic outbreak. A : IS6110 RFLP analysis ; B : analysis of the VNTR 2074 locus, the M lane is a 100 bp ladder marker.

予想された。実際に、ほとんどの例で少なくとも4カ所以上でコピー数が異なっていた。しかし、1事例では、当初集団発生が疑われた2株でVNTR2074の1 locusのみコピー数が異なることがわかった。これら2株は、IS6110 RFLP分析において両株ともほぼ同じパターンを示し、S-054は、S-160にバンドが2本付加したパターンであった (Fig. 2)。

## 考 察

結核菌の型別結果は、①集団・院内感染疑い例における確認、②地域内全数調査において菌株の遺伝子型から集団感染例の発見 (地域分子疫学研究)、などに利用されている。特に①のケースの場合、迅速性が求められることからVNTR分析の特長を生かすことができる。集団感染疑い例の分析でJATA (12)-VNTRを利用した場合、われわれが分析した範囲内ではIS6110 RFLP分析結果と相関する結果が得られている。

RFLP分析では、2本バンド以上異なる場合は別株と判定される。VNTR分析において何カ所コピー数が異なれば別株と判定すべきかの明確な基準は明らかにされていない。先の集団感染疑いの1事例のように、RFLP分析で別パターンという結果が得られていることから1カ所でもコピー数が異なれば別株と考えてよい例もあるが、ローカスごとにコピー数変化の頻度が異なること、

またいつ変化するかわからないことから、少なくとも2～3カ所以上コピー数が異なる場合、別株と判定すべきだと考えられる。1～2カ所のみコピー数が異なる場合は、MIRUやETRなどの他のローカスの分析結果を参考にして総合的に判定すべきである。

JATA (12)-VNTR分析法は、分析が比較的容易で、地域間でのデータ比較などの際に利用できる最低限必要なローカスの組み合わせと考えられる。つまり、多施設間でデータを比較する際に、まずJATA (12)-VNTR分析法で比較を行い、必要な場合にはh値の高いローカスを加えるなど識別能を高めた比較も可能である。

JATA (12)-VNTR分析法において、実際に使用するTaqポリメラーゼやサーマルサイクラーなどは各施設で異なる場合もある。そのため、PCR産物が得られなかった場合はプライマー濃度の増量や増幅反応の各段階での時間延長など、若干の条件検討が必要である。また、結核研究所では結核菌型別結果のデータベース化を目指しており、JATA (12)-VNTR分析システムを全国に広めたいと考えている。そのために、VNTR分析システム精度管理用の標準結核菌DNAを準備しており、必要な施設に対して提供を行っている。

## ま と め

本研究で樹立した国内株分析に最適化したJATA (12)-VNTR分析法は、ヨーロッパで提唱されているSupply (15)-VNTR分析法よりも少ない箇所の分析にもかかわらず、識別能が高く優れていた。また、JATA (12)-VNTR分析法は、日本だけでなく北京型結核菌の割合が高い地域でVNTR標準法として利用できると考えられる。

## 謝 辞

本研究では、結核療法研究協議会が全国から集めた結核菌の一部を分析に利用させて頂きました。利用に関して承諾を頂いた諸先生方に心より感謝致します。また、本研究は、厚生労働省新興・再興感染症研究事業 (主任研究者 加藤誠也: 結核菌に関する研究) の一部として補助を受けた。

## 文 献

- 1) Moström P, Gordon M, Sola C, et al.: Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8: 694-704.
- 2) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000; 36: 762-771.
- 3) Wada T, Maeda S, Hase A, et al.: Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Med*

- Microbiol. 2007 ; 56 : 1052-1057.
- 4) Supply P, Allix C, Lesjean S, et al.: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006 ; 44 : 4498-4510.
  - 5) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, et al.: Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett. 2007 ; 270 : 67-74.
  - 6) 前田伸司, 村瀬良朗: 反復配列多型を利用した結核菌の迅速遺伝子型別法の標準化. 第82回総会シンポジウム「抗酸菌研究の最前線」. 結核. 2007 ; 82 : 784-786.
  - 7) Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, et al.: Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 2008 ; 57 : 873-880.
  - 8) Smittipat N, Billamas P, Palittapongpim M, et al.: Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2005 ; 43 : 5034-5043.

————— Original Article —————

RAPID, SIMPLE GENOTYPING METHOD BY THE VARIABLE NUMBERS OF TANDEM REPEATS (VNTR) FOR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLATES IN JAPAN

— Analytical Procedure of JATA (12)-VNTR —

Shinji MAEDA, Yoshiro MURASE, Satoshi MITARAI, Isamu SUGAWARA,  
and Seiya KATO

**Abstract** [Purpose] The discriminatory power of each locus in variable numbers of tandem repeats (VNTR) analyses was evaluated for development of the genotyping method of *Mycobacterium tuberculosis* (TB) in Japan.

[Method] By using 325 TB strains collected from whole Japan and 24 mass infection cases (74 isolates), IS6110 restriction fragment length polymorphism (RFLP), spoligo-typing and VNTR (35 loci) were analyzed.

[Results and discussion] We excluded 4 loci (VNTRs 2163a, 3232, 3820, and 4120) and selected in top 12 loci (VNTRs 0424, 0960, 1955, 2074, 2163b, 2372, 2996, 3155, 3192, 3336, 4052, and 4156). The cluster rate of IS6110 RFLP was higher than that of 12-locus [Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)] VNTR. And in comparison of the discriminatory power of 12-locus JATA VNTR and that of

Supply (15)-VNTR, the JATA (12)-VNTR was superior, even though less loci analyses. Therefore, this JATA (12)-VNTR could be used for TB genotyping in areas where Beijing strains are prevalent.

**Key words:** Tuberculosis, Molecular epidemiology, RFLP, VNTR, Beijing genotype

Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to : Shinji Maeda, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan.  
(E-mail: maeda@jata.or.jp)