

結核菌の縦列反復配列多型 (VNTR) 解析に基づく分子疫学とその展望

—大阪市の例—

和田 崇之 長谷 篤

要旨：わが国における結核菌の遺伝型別解析とそれに基づく分子疫学研究は、縦列反復配列多型 (VNTR) 解析の手法が確立したことにより新しい局面を迎えつつある。同手法は菌株の異同を正確かつ簡便に判定しうると同時に、自治体間でのデータ比較をも可能とする。このような VNTR 型別の特性は集団感染事例での菌株解析を容易にするだけでなく、結核菌の広域的な伝播経路を推定するうえでこれまで得られなかった知見を提供しうるものである。わが国では、現在 JATA (12) -VNTR が標準法として確立しつつあり、その普及が期待されている。大阪市では、集団事例における原因株解析と不特定多数の菌株を対象とした結核サーベイランスを進めている。JATA (12) -VNTR に基づいたデータ蓄積を行うと同時に、必要に応じてさらに12領域について追加解析することにより、様々な行政・研究のニーズに対応している。結核菌の VNTR 型別解析は、型別データが蓄積されるにつれてより広範な菌株拡散を見出す足がかりとして機能しうる。今後、その用途・需要は飛躍的に拡大することが見込まれる。

キーワード：*Mycobacterium tuberculosis*, VNTR, 分子疫学, 公衆衛生

1. はじめに

分子疫学における主要な目的は、臨床分離株の遺伝子レベルでの個性 (遺伝型別) を分析し、その異同・近似性を判別することによって病原体の伝播経路やそれ自身の病原性、拡散性を究明することである。実地疫学から見出された感染症の集団発生や濃厚接触事例では、原因株の異同判定によってその伝播・拡散を裏付ける科学的根拠を与えうる。遺伝型別解析は分子疫学的应用を通じて強力なツールとして活用され、公衆衛生的局面での需要が日々増加している。結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) では、結核集団感染事例での伝播ルートや特定菌株の拡散規模を把握するうえで特に重要な手法として、全国的な実用化と技術的普及が期待されている。

結核菌の縦列反復配列多型 (Variable number of tandem repeat, VNTR) は数 10 bp を単位とする塩基配列が繰り返すゲノム構造である¹⁾。その反復数は一般的に高い多型

性を示し、当該領域の PCR 増幅ならびに DNA 電気泳動によって容易に判定可能であることから、分子疫学的应用を目的とした結核菌株の遺伝型別にきわめて有用である²⁾。Fig. 1 に VNTR 型別解析の原理を示す。VNTR 型別はデジタル情報として管理されるため、施設間でのデータ比較や長期間に及ぶ継続的なデータ蓄積が容易であるという利点をもつ。このような特性は、画像データとしての精度や手技的な実験誤差による影響が著しい制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) に基づいた従来の型別解析とは異なり、結核患者の移動に伴う広範的な伝播 (空間的乖離) や、結核菌の不顕性感染・休眠に起因する再燃現象 (時間的乖離) をも追跡できる高度なトレーサビリティを実現する。VNTR 型別は、集団感染事例における菌株の異同判定といった既存の目的のみならず、それにとどまらない新しい結核研究を推進する駆動力としても魅力的な可能性を秘めていると言える。

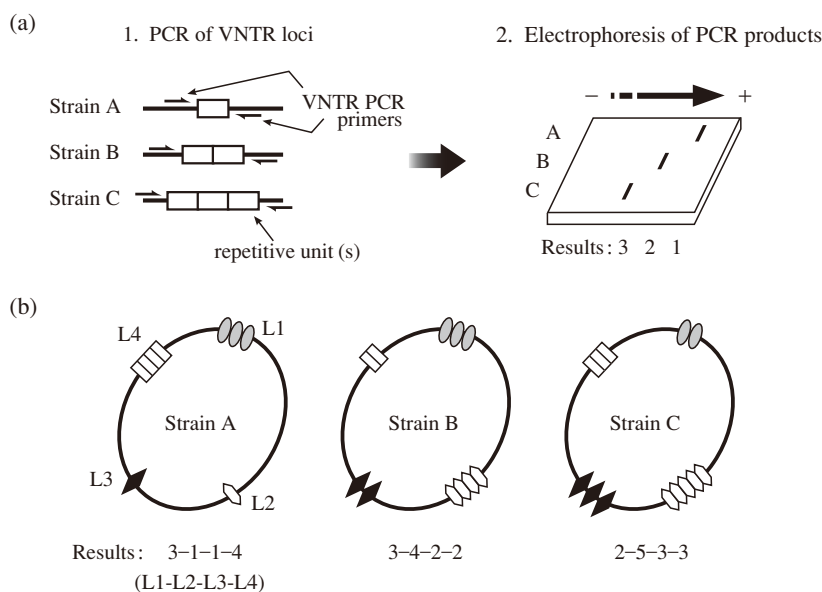


Fig. 1 The principle of genotyping by variable number of tandem repeat(s) (VNTR). (a) A simplified procedure of genotyping of a VNTR locus by PCR. Numbers of repetitive unit(s) of a VNTR locus can be determined by agarose gel electrophoresis of amplified DNA fragments. (b) A genome of *Mycobacterium tuberculosis* possesses various VNTR loci. VNTR genotyping can provide sufficient resolution (discrimination) of strains for the purpose of molecular epidemiological study by combination of VNTR alleles (numbers of repetitive units).

本総説では、VNTR型別解析の導入において最も重要なプロセスであるVNTRセットの構築について、これまでの経緯を説明する。次に、わが国における活用例として大阪市における同型別法の利用を紹介し、さらに近年におけるVNTRデータ蓄積によって見出されつつある結核の多発性大規模感染について概説を行う。

2. VNTR解析法の経緯—国際標準化と国内最適化

VNTR領域は結核菌ゲノム内に数多く点在しており、VNTR解析ではそれらを複数組み合わせで型別を判定することによって信頼度の高い遺伝型別情報を提供する。したがって、VNTR解析の大きな利点である多施設間のデータ比較を実現するためには、VNTRセットの共有、すなわち「どの領域を解析対象として組み合わせるか」をあらかじめ決定しておくことが必須である。現在、国際標準法として最も有望視されているものは、Supplyらによって提案された15ないし24領域の組み合わせによるSupply's 15 (24)-mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRU)-VNTRである³⁾。全世界規模で集められた菌株を用いて構築されたため汎用性が高く、国際標準として用いられつつあった既存の12領域 (classical MIRU-VNTR)⁴⁾よりも分解能が飛躍的に向上している。同セットに準じたVNTRデータの蓄積は国際的な型別比較を可能とし⁵⁾⁶⁾、グローバルな結核菌の伝播推定や全世界的な結核菌遺伝型データベースの構築に寄与するものと期待される。

国際標準法としての用途を指向したVNTRセットでは、世界規模で集められた菌株を基に解析領域の取捨選択が行われる。そのため、各地域内で分離される近縁株を型別分類することが重要な地域分子疫学での需要を必ずしも満たすものではない。事実、日本国内でSupply's MIRU-VNTRを地域的分子疫学解析に適用した場合、その型別分解能には限界があることがわかってきた⁷⁾⁸⁾。日本は東アジアに位置し、「北京型ファミリー」と呼ばれる結核菌系統群が分離菌株全体の約80%を占めるという地理生物学的特徴がある^{7)~10)}。このような特徴がVNTR型別の分解能に少なからず影響を与えており、結果的には国際標準法をそのまま国内法として導入できないという難しさにつながっている。そこでわが国では、国際標準セットとは異なるVNTR領域を積極的に活用することによって、より有用な遺伝型別法として確立する試みが進められてきた。現在はJapan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTRが国内標準法として提唱されており¹¹⁾¹²⁾、同組み合わせに基づいた精度管理、ならびに各自治体の地方衛生研究所への技術展開が進められている段階である。各セットにおいて解析対象となっているVNTR領域をTable 1にまとめたので参照されたい。

このように、VNTR型別法の国際標準化と地域最適化には異なる指向性があり、両者を同時に満たすVNTRセットを限られた領域数で構築することは基本的に困難である¹³⁾。VNTRの遺伝的安定性や多型性、すなわち型

Table 1 Variable number of tandem repeat loci of *Mycobacterium tuberculosis* and their combination repertoires for molecular epidemiology of TB in Japan

Alias (traditional name)	Synonym	Locus	Classical MIRU (12)	Supply's MIRU (15)	Supply's MIRU (24)	JATA (12)	JATA (15)	Hypervariable	Osaka City additional loci
MIRU02		154	x		x				
Mtub04	JATA01	424		x	x	x	x		
ETR C		577		x	x				x
MIRU04	ETR D	580	x	x	x				x
MIRU40		802	x	x	x				x
MIRU10	JATA02	960	x	x	x	x	x		
MIRU16		1644	x	x	x				x
Mtub21	JATA03	1955		x	x	x	x		
QUB-18		1982					x		x
MIRU20		2059	x		x				
Mtub24	JATA04	2074				x	x		
QUB-11b	JATA05	2163		x	x	x	x		
QUB-11a		2163					x		x
ETR A		2165		x	x		x		x
Mtub29		2347			x				
V2372	JATA06	2372				x	x		
Mtub30		2401		x	x				x
ETR B		2461			x				
MIRU23		2531	x		x				
MIRU24		2687	x		x				
MIRU26	JATA07	2996	x	x	x	x	x		
MIRU27	QUB-5	3007	x		x				
QUB-15	JATA08	3155				x	x		
Mtub34		3171			x				
MIRU31	JATA09; ETR E	3192	x	x	x	x	x		
QUB-3232		3232						x	x
QUB-3336	JATA10	3336				x	x		
Mtub39		3690		x	x				x
V3820		3820						x	x
QUB-26	JATA11	4052		x	x	x	x		
V4120		4120						x	x
QUB-4156	JATA12	4156		x	x	x	x		
MIRU39		4348	x		x				

別分解能への寄与は各領域によって大きく異なっている。さらに、そのような多型個性は地域ごとに偏在している種内系統群（菌株群）によっても違いが見られる¹⁴⁾。つまり、ある地域に蔓延している菌株群において高い多型性を示すVNTR領域が他の菌株群では変異に乏しく、型別分解能に寄与しないこともあり、各領域の利用価値は地域別に相対的に変動する。その結果、型別解析に効果的なVNTR領域の組み合わせは目的・地域・対象株によって千差万別であり、同手法に基づいたデータ解析や直感的理解を妨げ、複数の検査機関で利害が一致するVNTRセットの構築を困難にする一因となっている。

3. 日本国内におけるVNTR型別の考え方

JATA (12)-VNTRは各都道府県から集められた結核菌株の遺伝的多様性に基づいて構築された国産VNTRセットである¹¹⁾¹²⁾。12領域から構成され、国際標準法であるSupply's 15-MIRU-VNTRとは8領域を共有している (Table 1)。国内分離株の傾向に基づいて高分解能を示すVNTR領域が選ばれているため、日本国内での分子疫学的用途に適しており、特に集団事例における菌株の異同判定において信頼度の高い結果を得ることができる。

VNTR型別ではいったん誤判定が生じるとその後補正される機会が少ないため、解析の各段階で起こりやすい

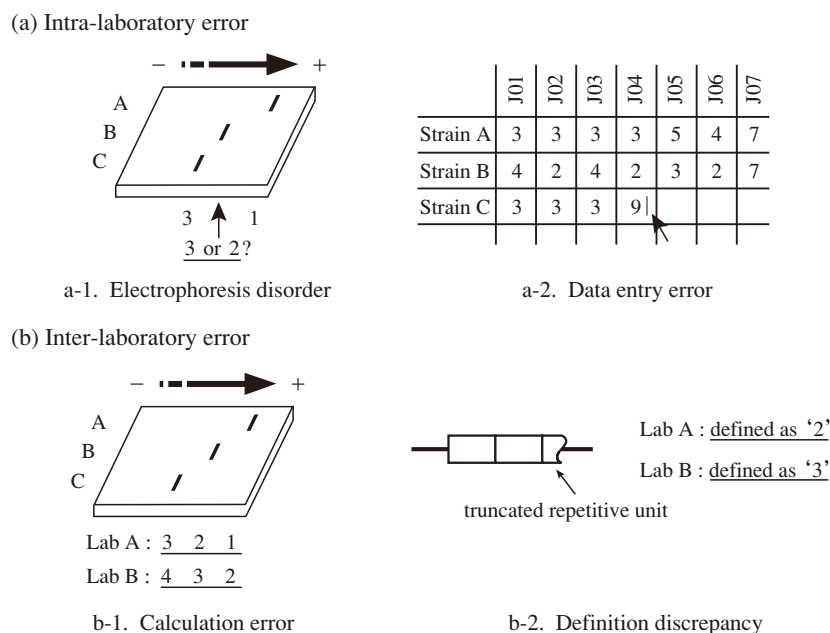


Fig. 2 Examples of errors often found in genotyping of variable number of tandem repeat(s) (VNTR). (a) Intra-laboratory error. It often results from technical problems or careless procedures during such as electrophoresis or data entry as shown. Generally, these errors are hard to be recognized after data accumulation and cause incorrect identification/differentiation of isolates in a laboratory. (b) Inter-laboratory error. Even if calculation of repetitive unit(s) can be achieved in respective laboratories, the comparison of VNTR types among different laboratories fails to reach proper results without sharing common definitions of each VNTR locus.

誤りについて十分配慮する必要がある (Fig. 2 (a))。また、多施設間の型別比較では、各VNTR領域の反復数換算における精度管理も重要な検討課題となる (Fig. 2 (b))。精度管理では、対照となる結核菌株 (H37Rvや代表的な臨床分離株) と各領域の反復数換算ルールを相互に一致させればよく、換算のずれに起因する型別判定の誤りをあらかじめ抑えることが可能である。日本国内におけるJATA (12)-VNTRでは、技術的シェアと同時に、このような精度管理を含めた普及が進められている。一定のルールに基づいた型別情報の蓄積により、複数の自治体にわたる集団感染調査のみならず、全国的結核分子疫学への拡張をスムーズに行えるよう配慮されている。

全国的普及が見込まれるJATA (12)-VNTRであるが、疫学的関連性の低い菌株群が対象となるサーベイランス (集団) 解析への適用には議論を残すところである。結核菌の分子疫学サーベイランスでは、遺伝型別のみを論拠として互いに関連性が薄い臨床分離株の伝播経路や集団発生を推定することになる。このような場合において、JATA (12)-VNTRによって担保される型別分解能は、なお十分でない可能性がある。そこで着目されるのが、より厳密な異同判定を目的とした解析領域の追加である。VNTR領域にはきわめて変異速度が速く、多型性に富んだ「超多変 (hypervariable, HV) 領域」と呼ばれる領域

があり、高い分解能を必要とする型別解析の際に用いられることがある^{7) 8) 15)} (Table 1)。被検株の比較においてHV領域が一致する場合、それらの菌株は同一であることを強く示唆する。一方で、HV領域はクローン性 (一致性) がきわめて高い菌株間でさえ変異していることがあるため、その解釈には細心の注意を必要とする。すなわち、HV領域は単独で用いると誤判定の原因になりやすいが、他の標準的なVNTRセットによる型別比較を前提とすることによって詳細な異同判定を可能とする。それ以外にも、HV領域に頼らずに高い分解能を実現する追加領域が模索されている。中でも、比較的解析しやすい3領域を追加したJATA (15)-VNTR¹⁶⁾が有力である (Table 1)。普及展開中のJATA (12)-VNTRを基本としたVNTRセットであり、今後詳細な型別判断が必要な局面において汎用的に利用される可能性が高い。

4. 大阪市における結核分子疫学に即したVNTR領域の選択

現在、大阪市内立環境科学研究所 (環科研) では、同市内で起こった集団事例における分離菌株と、連携体制にある医療機関で分離培養された市民患者由来株についてVNTR型別解析を実施している。前者は疫学的状況に基づく集団感染の科学的裏付けを、後者は同市内における

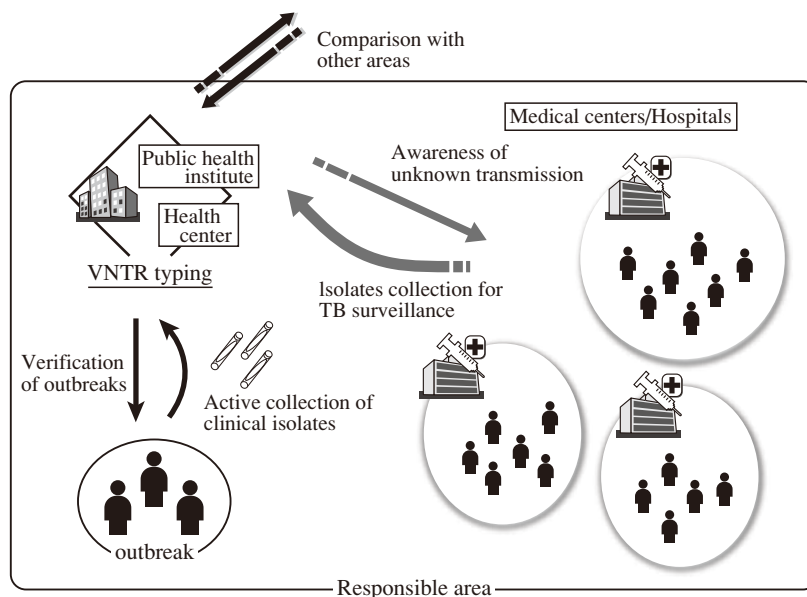


Fig. 3 A molecular epidemiological strategy for tuberculosis in a local government in Japan. Clinical isolates from putative outbreaks in the responsible area are collected by a health center to certify their identification using JATA-VNTR genotyping. For surveillance study, isolates obtained from hospitals or medical centers are collected systematically to analyze their genotypes. These data are utilized to suspect unknown transmissions and to monitor emergence of putative expanding cluster types (pECTs). Accumulation of genotypes of clinical isolates is also useful for comparison with those of different areas through the quality control of VNTR genotyping.

結核菌伝播・拡散の監視を目的として、継続的なデータ蓄積を図っている (Fig. 3)。双方ともに基本的にはJATA (12)-VNTRによる型別解析を実施しており、必要に応じて追加領域を解析している (後述)。

集団事例では、VNTR型別に基づいた菌株の異同判定を、実地疫学情報 (患者間の接触度など) から検討することが重要である。通常、VNTR型別では解析に用いた領域のうち1カ所でも反復数が異なれば菌株不一致とみなすのが原則である。しかし、そのような変異は同一株でも偶発的に起こるため、濃厚接触が疑われる事例では追加領域の解析を行って再検討することが望ましい。環科研では、疫学的背景からVNTR型別に偶発的な変異が生じた可能性が懸念される事例 (具体的には、濃厚接触にもかかわらず1カ所のみ反復数が異なるJATA (12)-VNTRタイプを認めた場合) について、さらに追加12領域を解析して精度の高い型別判定を行っている (Table 1)。これらの追加領域は国際的な標準となるSupply's 15-MIRU-VNTR、国内追加領域として将来性が高いJATA (15)-VNTRのための3領域、および国内でとりわけ高い多型性を示すHV3領域をすべて含んでおり、現在日本国内外でVNTR型別情報として要求されるほぼすべての領域をカバーしている。国際標準領域からなる低多型性領域の変異は菌株の相違を裏付ける一方、HV領域の一致は同一菌株であることを強く示唆する。このような型

別情報に基づいて菌株の異同を再検証することによって精度の高い異同判定を実現し、より正確な科学的根拠を結核疫学調査に提供することが可能である。

5. 分子疫学から浮かび上がる多発性大規模感染の存在

近年、複数の研究施設・医療機関において結核菌VNTRデータが蓄積されつつあり、いくつかのVNTRタイプが分離地域や分離年度にかかわらず散見されることが明らかとなってきた。このようなタイプの菌株が実際に同一株か否かは現時点でははっきりしない。しかし、結核菌は休眠と再燃を繰り返しながら広範に拡散すると考えられ、これまで把握しきれなかった伝播背景をもつ結核菌株がVNTR型別解析を通して浮かび上がってきた可能性が高い。また、通常の菌株よりも伝播力が高い菌株の存在を捉えている可能性もあり、公衆衛生的にも継続的な監視が必要である。このような伝播様式はこれまでの結核疫学では十分議論されてこなかったことから、新たに「多発性大規模感染」として定義することが提案されている^{17)~19)}。

環科研ではこれまでに蓄積されてきたVNTRデータを参照し、そこから多発性大規模感染株の候補型 (putative expanding cluster types: pECTs) を規定して監視体制を構築している^{17) 20)} (Table 2)。現在は近畿地区の既報デー

Table 2 Profiles of variable number of tandem repeat (VNTR) recognized as putative expanding cluster types (pECTs) in Osaka City

Type ID	JATA (12)												JATA (15)			Hypervariable				for international comparison*						Note
	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	Q11a	EA	Q18	Q3232	Q3820	Q4120	M04	M16	M40	EC	t30	t39		
pECT01	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	9	4	8	4	10	13	9	8	2	2	2	4	4	3	pECT04–06 can be discriminated only by hypervariable loci. identical to M strain**	
pECT02	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	7	4	10	16	14	12	2	3	3	4	4	3		
pECT03	4	1	3	2	6	4	7	4	3	8	8	5	9	4	9	16	14	9	2	3	3	4	4	3		
pECT04	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	8	4	10	9	12	11	2	4	3	4	4	3		
pECT05	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	8	4	10	10	12	11	2	4	3	4	4	3		
pECT06	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	8	4	10	10	9	7	2	4	3	4	4	3		
pECT07	4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3	8	4	8	14	14	9	2	3	3	4	4	3		
pECT08	4	3	4	3	6	3	7	4	5	8	8	3	8	4	8	14	17	11	2	3	3	4	4	3		
pECT09	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	5	4	8	14	14	10	2	3	3	4	4	3		
H37Rv	2	3	1	4	5	2	3	4	3	8	5	3	2	3	5	4	3	2	3'	2	1	4	2	5		

* These six loci compose the international Supply's 15-MIRU-VNTR by combination with JATA (12)-VNTR.
 ** Ohkado et al. (2009).²¹⁾

タ^{10) 15)}に基づいて9タイプを抽出している。JATA (12)-VNTRによって当該タイプを呈した株を対象として上述の追加12領域について解析を加え、厳密な異同判定を行うことによってその出現頻度の把握や実地疫学的情報の蓄積を図っている段階である。

今後、結核分子疫学の全国的展開や各地域での継続的なデータ蓄積が進展するに伴って、pECTsとして定義されるVNTRタイプは増減・変化するものと思われる。また、諸地域に局限して頻出するタイプなども存在することが想定され、地域的な結核菌株の分離傾向が具体的に明らかになると期待される。このような分子疫学的情報は結核菌の市中伝播・広域拡散を裏付けると同時に、pECTsの再定義をはじめとしたVNTR型別の実践的解釈へとフィードバックされることによって、より実効性の高い技術として確立していくだろう。

6. おわりに

VNTR型別は、地域的需要に即した最適化と包括的な精度管理を行うことにより、強力な結核分子疫学ツールとして活用できる。今後、同型別法の技術シェアが進み、普及率が向上することによって、より綿密な伝播経路の把握、集団事例における厳密な規模推定が可能となる。わが国における結核分子疫学は、既存の実地疫学や急速な発展が見込まれるゲノム解析、国際的な菌株比較研究と合わせ、まったく新しい研究展開と結核対策の礎となることが期待される。

文 献

- 1) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000 ; 36 : 762-771.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Supply P, Lesjean S, Savine E, et al.: Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.* 2001 ; 39 : 3563-3571.
- 5) Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, et al.: Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2008 ; 46 : 2692-2699.

- 6) Weniger T, Krawczyk J, Supply P, et al.: MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res.* 2010 ; 38 Suppl : W326–331.
- 7) 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.
- 8) Yokoyama E, Kishida K, Uchimura M, et al.: Improved differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains, including many Beijing genotype strains, using a new combination of variable number of tandem repeats loci. *Infect Genet Evol.* 2007 ; 7 : 499–508.
- 9) van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, et al.: Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol.* 1995 ; 33 : 3234–3238.
- 10) Wada T, Iwamoto T, Maeda S: Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 2009 ; 291 : 35–43.
- 11) 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.
- 12) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他: 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 分析法の実例—. *結核.* 2008 ; 83 : 673–678.
- 13) 和田崇之: 結核菌の反復配列多型 (VNTR) 解析におけるローカライジングと国際標準化. 第83回総会シンポジウム「分子疫学研究の進歩と対策への応用」. *結核.* 2009 ; 84 : 59–61.
- 14) Comas I, Homolka S, Niemann S, et al.: Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One.* 2009 ; 4 : e7815.
- 15) 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.
- 16) 前田伸司, 和田崇之, 岩本朋忠: 国内結核菌を効率よく型別するための標準反復配列多型 (VNTR) 分析法. *日本細菌学雑誌.* 2010 ; 65 : 201.
- 17) 和田崇之, 三宅由起, 加藤仁一, 他: 多発性大規模感染に関連する結核菌株による集団事例の疫学情報. *結核.* 2010 ; 85 : 404.
- 18) 岩本朋忠, 藤山理世, 白井千香, 他: 分子疫学情報の蓄積から示唆される多発性大規模感染事例の存在とその検証. *結核.* 2010 ; 85 : 411.
- 19) 田丸重貴, 和田崇之, 長谷 篤, 他: 大阪府における多発性広域感染株について. *結核.* 2010 ; 85 : 411.
- 20) 和田崇之, 前田伸司, 岩本朋忠, 他: 地域的に限局されないVNTR型別結核菌の同定と広範的分子疫学へのアプローチ. *結核.* 2009 ; 84 : 386.
- 21) 大角晃弘, 村瀬良朗, 森 正明, 他: 首都圏におけるストレプトマイシン耐性結核菌M株の伝播状況. *結核.* 2009 ; 84 : 388.

Review Article

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
AND ITS PROSPECT BASED ON VARIABLE NUMBER OF
TANDEM REPEAT (VNTR) GENOTYPING

— A Strategy in Osaka City, Japan —

Takayuki WADA and Atsushi HASE

Abstract The methodological establishment of variable number of tandem repeat(s) (VNTR) genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* has opened a new era of molecular epidemiology against tuberculosis (TB). The method can provide simple, rapid and accurate identification of clinical isolates from TB patients that makes it possible to compare the isolates among different laboratories. Such advantages of VNTR not only help us certify the identification of isolates in putative outbreaks easily but also promote the reasonable estimation of unidentified transmissions in surveillance studies. Recently, the Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR has become a standard genotyping method of *M. tuberculosis*, and its spread has been expected in Japan. In Osaka City, located in the western part of the country, JATA (12)-VNTR has been applied to molecular epidemiological study of TB. Moreover, the additional 12 VNTR loci have been analyzed for various purposes, such as to enhance the discriminatory power (public health needs) or to further analyze the population genetic structure (research needs). As the nationwide

findings of VNTR genotyping of *M. tuberculosis* are accumulated, this technology will be increasingly useful for detecting transmission of any specific strain in large geographic areas that could not be recognized by conventional epidemiological methods. The needs for the VNTR genotyping of *M. tuberculosis* and its practical uses are expected to expand drastically in the future.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, VNTR, Molecular epidemiology, Public health

Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

Correspondence to: Takayuki Wada, Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34, Tojo-cho, Tennoji-ku Osaka-shi, Osaka 543-0026 Japan.
(E-mail: taka-wada@city.osaka.lg.jp)