

# 複数自治体をまたぐ広域的結核分子疫学の基盤構築

— JATA (12)-VNTR 型別に基づくクラスター形成とその傾向 —

<sup>1</sup>和田 崇之    <sup>2</sup>田丸 亜貴    <sup>3</sup>岩本 朋忠    <sup>3</sup>有川健太郎  
<sup>3</sup>中西 典子    <sup>4</sup>小向 潤    <sup>4</sup>松本 健二    <sup>5</sup>長谷 篤

**要旨：**〔目的〕 JATA (12)-VNTR 法は結核菌における遺伝型別法の国内標準法として用いられつつある。本研究では、結核分子疫学サーベイランスを牽引するための基盤構築として、同手法によって定義される各遺伝型の出現頻度を把握することを目的とした。〔方法〕 2007年から2008年に大阪市、大阪府、および神戸市において新規登録された結核患者から分離培養された結核菌1,778株について、各地方衛生研究所にてJATA (12)-VNTR型別解析を実施し、その結果を集約してクラスター分析を行った。〔結果および考察〕 同型別によって見出されたクラスター形成株は1,086株（61.1%）となり、3地域すべてから分離された菌株によって構成されたクラスターは38組であった。これらのクラスター株は実際に広域的に伝搬したか、JATA (12)-VNTR型別の低分解能に起因する偽クラスターであったと考えられる。クラスターを形成したJATA (12)-VNTR型についてID化を図ることにより、同型別におけるデータ解釈における注意点が明確になると同時に、特定株の分離検出や未知のアウトブレイクの発見を容易に行えるサーベイランス体制が構築できるだろう。

**キーワード：** *Mycobacterium tuberculosis*, VNTR, 広域分子疫学, 公衆衛生, サーベイランス, 遺伝型別, 伝搬追跡

## I. はじめに

結核分子疫学解析は、結核菌の遺伝型別多型から患者由来菌株の異同性もしくは相同性を調べることによって、これまで患者間の接触度や聞き取り調査といった実地疫学情報のみに拠っていた伝搬経路の推定に対し、客観的かつ科学的な根拠を与える。近年、結核菌の遺伝型別について多くの知見が見いだされ、わが国においてもその積極的な活用が期待されている。2011年5月に一部改正された「結核に関する特定感染症予防指針」(厚生労働省)には、遺伝子型別を活用した分子疫学的サーベイランスの構築や研究推進の必要性が明記され、各自治体、地方衛生研究所(地衛研)を中心に普及展開の機運が高まっている。

結核分子疫学の用途は、感染源が疫学的に示唆されている場合(集団事例、同一患者の再発例など)の科学的

裏付けと、不特定多数の菌株について網羅的に遺伝型別を集約するサーベイランス分析の2種類に大別される。いずれの用途に関しても、結核患者由来株の遺伝子多型を手掛かりとして菌株の異同を判定し、それに基づいて伝搬経路を推定することが基本となる。前者は実地疫学情報を前提とするため型別の解釈が容易である反面、後者は異同判定に寄与する情報が遺伝型別のみによ拠することから、より慎重な検討が不可欠である。

現在、結核菌の遺伝型別解析では、反復配列数多型(Variable Numbers of Tandem Repeats, VNTR)が利用されることが多い<sup>1)</sup>。結核菌ゲノム上には数10 bpの塩基配列を1単位とした反復配列領域(VNTR領域)が多数存在しており、一般的にその反復数は高い多型性を示すことが知られている<sup>2)</sup>。わが国では、12カ所のVNTR領域の組み合わせからなるJapan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR法<sup>3)4)</sup>が国内標準法として提唱され

<sup>1</sup>長崎大学熱帯医学研究所国際保健学, <sup>2</sup>大阪府立公衆衛生研究所感染症部微生物課, <sup>3</sup>神戸市環境保健研究所微生物部, <sup>4</sup>大阪市保健所, <sup>5</sup>大阪市立環境科学研究所微生物部

連絡先: 和田崇之, 長崎大学熱帯医学研究所国際保健学, 〒852-8523 長崎県長崎市坂本1-12-4

(E-mail: twada@nagasaki-u.ac.jp)

(Received 18 May 2012/Accepted 31 Oct. 2012)

ており、本法に基づいた精度管理ならびに各自治体・地衛研への技術共有が進められている。

JATA (12)-VNTR法は国際的標準法として用いられている Supply's standard 15 loci-VNTR<sup>5)</sup>とは異なり、東アジア全域で優先する「北京型ファミリー」<sup>6,7)</sup>において分解能が高いことから、わが国における型別分析に適している。また、簡便性、コスト、精度管理など、様々な面で高機能であることから、結核分子疫学解析を未だ実施していない地域においても導入しやすいという利点をもつ。したがって、型別分析の普及という意味において同手法が果たす役割は大きく、わが国における結核分子疫学の実用化に寄与するものである。一方、本法の分解能ではサーベイランス分析に問題を残す可能性も指摘されており<sup>8,9)</sup>、解析領域の追加によって精度を高める試みも検討されている。

JATA (12)-VNTR法をサーベイランス分析に利用するためには、クラスター形成率やアレル（反復数）分布のようなメタ情報にとどまらない型別情報の蓄積と、データベースの共有・公開が重要である。そこで本研究では、各JATA (12)-VNTR型の検出状況とその傾向をより詳しく把握するために、関西3自治体（大阪市、大阪府、神戸市）においてそれぞれ独立的に収集、型別分析された結核菌株のVNTRデータを集約・統合し、広域的なクラスター分析を実施した。さらに、高頻度で分離されたVNTR型別についてリスト化、ID化を行うことによって同地域に主要なJATA (12)-VNTR型を定義し、同手法の型別分析によって付帯される菌株情報として提起することを目的とした。

## II. 対象と方法

**供試菌株**：2007年から2008年に大阪市、大阪府、および神戸市において新規登録された結核患者から分離培養された結核菌株のうち、大阪市立環境科学研究所、大阪府立公衆衛生研究所、および神戸市環境保健研究所に集められた1,778株を対象とした（Table 1）。性別と一部の年齢群において地域間で有意なばらつきが認められたが、大阪市ホームレス患者群の特異性や地域罹患率の差に起因すると考えられ、阪神地区全体を俯瞰する本研究の目的上影響を与えるものではない。

**DNA抽出**：結核菌培養試験用培地（小川培地、Middlebrook7H9, その他）において増殖が確認された結核菌株を用いて、以下のいずれかの方法によりPCR鋳型を作成した。①簡易法。菌体を純水に懸濁し、95℃、10分間加熱後遠心分離により上清を得た。②ISOPLANT（ニッポンジーン）を用いてゲノムDNAを抽出精製した。③ビーズビーターにより菌体を破碎し、フェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿法によりゲノムDNAを抽出精製した。

**VNTR型別**：JATA (12)-VNTR型別は、以前の報告<sup>3)10)</sup>に準じて行った。各PCR産物はコスモアイSV1210（Hitachi Electronics Engineering）によるキャピラリー電気泳動もしくはDNAシークエンサーABI310 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）で分析した。キャピラリー電気泳動では非標識のプライマーを、DNAシークエンサーによる分析では蛍光色素（FAM, HEX, およびNED）によって標識したプライマーを用いて増幅産物の

**Table 1** Summary of *M. tuberculosis* isolates collected to three local public health laboratories in this study during 2007 and 2008

	Total	Origin			
		Osaka City		Osaka pref.	Kobe City
		Normal	Homeless		
No. of isolates	1,778	704	136	595	343
Sex*					
Male	1,304	513	136	426	229
Female	474	191	0	169	114
Age					
<9	3	0	0	2	1
10-19	16	8	0	5	3
20-29	93	49	1	29	14
30-39	151	62	2	55	32
40-49	185	77	20	63	25
50-59†	295	101	60	89	45
60-69*	342	160	36	90	56
70-79	347	138	14	117	78
>80*	305	108	3	107	87
Unknown*	41	1	0	38	2

\*P<0.01 from the  $\chi^2$  tests among three origins.

†P<0.05 from the  $\chi^2$  tests among three origins.

**Table 2** Comparison of cluster formation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates

	Kansai, 2007–2008	Nationwide, 2002	Kobe, 2002–2007	Osaka City, homeless, 2002–2004	Kobe, 2001	Osaka City, 2001
No. of isolates	1,778	325	909	274	235	243
Genotyping method	JATA (12)- VNTR <sup>a</sup>	JATA (12)- VNTR	Supply (15) <sup>b</sup> + HV (4) <sup>c</sup> VNTR	Supply (15) + HV (4)	Supply (15) + HV (3) <sup>d</sup>	RFLP <sup>e</sup>
No. of isolates in a cluster (%)	1,086 (61.1)	41 (12.6)	289 (31.8)	114 (41.6)	60 (25.5)	75 (30.9)
No. of clusters	207	18	82	35	24	27
Reference	This study	3) 4)	11)	12)	10)	15)

<sup>a</sup>Japan anti-tuberculosis association (JATA) (12) - variable number of tandem repeats (VNTR)<sup>3)4)</sup>.

<sup>b</sup>Supply's standard 15 loci VNTR<sup>5)</sup>.

<sup>c</sup>4 hypervariable VNTR loci: QUB-11a, QUB-3232, VNTR3820, and VNTR4120.

<sup>d</sup>3 hypervariable VNTR loci: QUB-3232, VNTR3820, and VNTR4120.

<sup>e</sup>Restriction fragment length polymorphism.

サイズを測定した。反復配列の換算は、前田らの報告<sup>3)</sup>に従った。2株以上の菌株において全12領域の反復配列が一致した場合、その菌株群をクラスターとして定義した。クラスター型の系統分類（非北京株、祖先型北京株、および新興型北京株）は、系統情報を含んだ既報<sup>11)~14)</sup>のVNTR型との一致に基づいて推定された。

### Ⅲ. 結果

#### JATA (12)-VNTR型別に基づくクラスター分析

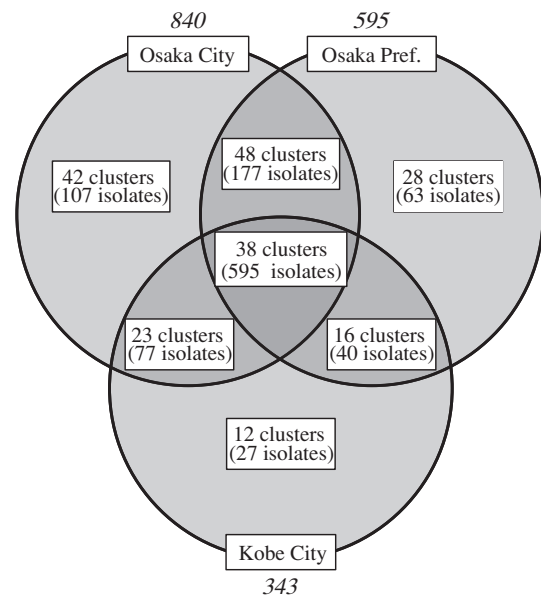
3自治体において分離、集積された結核菌株（1,778株）のJATA (12)-VNTR型別に基づいたクラスター分析を実施した。クラスター形成率は61.1%（1,086株）であり、既存のIS6110制限酵素断片長多型（Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP）型別や超多変（hyper variable, HV）領域を含んだVNTR型別に基づいた同地域からの報告<sup>10)~12)15)</sup>と比較して明らかに高い数値を示した（Table 2）。また、日本全国から集められた菌株を同一の手法で分析した場合のクラスター率と比較しても高かった<sup>3)4)</sup>。菌株の分離地域を確認すると、3地域すべてから分離された菌株によって構成されるクラスターが38組見出された（Fig.）。

#### JATA (12)-VNTR型別のクラスター定義

本研究において見出されたクラスター型をサイズ順に並べ、7株以上からなる33組のクラスターを対象としてID番号（J<sub>12</sub>-0001～J<sub>12</sub>-0033）を付加した（Table 3, 全クラスター型情報は要望に応じ提供可能）。このうち3地域すべてから分離された菌株によって構成されていたクラスターは25組（75.8%）であった。VNTR型からの系統推定では、非北京株が3組（9.1%）、祖先型北京株が21組（63.6%）、新興型北京株が9組（27.3%）となり、祖先型北京株が多いわが国の傾向<sup>14)</sup>と合致していた。

### Ⅳ. 考察

結核菌の伝播に境界はなく、とりわけ人間の流動が集



**Fig.** Venn diagram of clustered isolates analyzed by JATA (12)-VNTR in this study. Respective circles represent clustered isolates obtained in each area. Italicized numbers indicate the total number of analyzed isolates originating from each area in this study.

中する大都市圏においては自治体枠にとられない分子疫学体制の確立が不可欠である。結核菌遺伝型別情報の蓄積と公開は、各地域における結核菌伝播の様相を俯瞰するのみならず、周辺地域での比較検討をも可能にすることから、未実施の地域に対して同分析の導入を促しうるものである。そうした積み重ねが進展することによって結核分子疫学に基づく地域保健が充実し、新しい結核対策へと展開すると期待される。

今回分析対象とした阪神地域（2007～2008）では、全3地域をまたいで出現する巨大なクラスターの存在が確認された（Table 3）。要因としては、特定の菌株が大阪・神戸地域で広域的に伝播（もしくは再発）している可能性だけでなく、JATA (12)-VNTRによって分離できな

**Table 3** Types of JATA (12)-VNTR composing clusters whose size as more than seven in this study

Type ID	JATA (12)-VNTR												Origin			Lineage	Notes*		
	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	Cluster size						
													Osaka City, Normal	Osaka City, Homeless	Osaka Pref.			Kobe City	
J <sub>12</sub> -0001	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	97	57	11	16	13	Beijing, ancient	including pECT04, pECT05, and pECT06 including pECT09
J <sub>12</sub> -0002	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	50	12	8	18	12	Beijing, modern	
J <sub>12</sub> -0003	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	39	12	0	12	15	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0004	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	37	8	3	19	7	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0005	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	33	13	1	14	5	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0006	4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3	26	11	4	4	7	Beijing, modern	
J <sub>12</sub> -0007	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	24	10	2	7	5	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0008	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	22	8	0	7	7	Beijing, modern	
J <sub>12</sub> -0009	4	3	4	3	6	3	7	4	5	8	8	3	22	12	2	5	3	Beijing, modern	
J <sub>12</sub> -0010	2	2	1	3	4	2	5	4	3	10	4	3	19	4	10	4	1	Non Beijing	including pECT07 (M strain) including pECT02
J <sub>12</sub> -0011	4	2	4	3	6	1	7	4	5	7	8	3	17	7	1	8	1	Beijing, modern	
J <sub>12</sub> -0012	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	17	8	2	7	0	Beijing, modern	
J <sub>12</sub> -0013	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	7	4	16	1	0	8	7	Beijing, modern	
J <sub>12</sub> -0014	4	3	3	3	6	3	7	4	5	8	8	5	16	10	0	3	3	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0015	4	3	4	3	5	5	6	4	5	7	8	3	15	10	1	4	0	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0016	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	15	8	0	5	2	Beijing, modern	
J <sub>12</sub> -0017	4	3	5	2	7	3	7	4	5	7	10	5	13	10	1	2	0	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0018	1	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	11	7	1	2	1	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0019	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	7	5	10	3	3	0	4	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0020	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5	10	3	1	4	2	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0021	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	3	9	7	1	1	0	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0022	3	3	3	3	5	3	7	2	5	10	6	4	9	3	1	4	1	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0023	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	8	1	1	1	5	Non Beijing	
J <sub>12</sub> -0024	4	1	3	2	6	4	9	4	5	7	8	5	8	4	0	2	2	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0025	4	1	3	2	7	3	7	4	5	7	8	5	8	4	0	2	2	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0026	4	1	3	2	7	4	7	4	4	7	8	5	8	2	0	4	2	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0027	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	8	4	1	0	3	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0028	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	4	3	8	3	0	3	2	Non Beijing	including pECT03
J <sub>12</sub> -0029	4	1	3	2	6	4	7	4	3	8	8	5	7	4	0	3	0	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0030	4	3	0	3	3	3	7	4	4	1	8	4	7	2	1	3	1	Beijing, ancient	
J <sub>12</sub> -0031	4	3	4	3	4	3	7	4	5	7	8	3	7	5	1	1	0	Beijing, modern	
J <sub>12</sub> -0032	5	3	3	3	7	3	6	4	5	7	7	5	7	2	5	0	0	Beijing, ancient	08-09 Osaka homeless outbreak (putative) including pECT01
J <sub>12</sub> -0033	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	9	4	7	4	1	0	2	Beijing, ancient	

\*pECTs were defined as putative expanding cluster types of 24-loci VNTR (including JATA (12)-VNTR and additional 12 loci VNTR) by Wada et al.<sup>8)</sup>

い型があり、異なる菌株が同一型として見出されている可能性などが考えられるため、これらを同一感染源由来であると単純に考えることは難しい。他地域についても同様の分析を実施し、全国的に型別の分布状況が把握されることが望まれる。

JATA (12)-VNTR 型別の分解能を補う追加領域解析の利用は、今回見出されたクラスターを正確に分析するうえで一つの打開策となりうる。追加領域解析による型別分解能はきわめて高く、異同判定に実地疫学情報を加味できないサーベイランス分析では大きな威力を発揮する手法である。しかし、精度管理の難しさやコストの問題など様々な課題が残されており、一元的な導入が難しいという問題点が避けられない。全国的なサーベイランス事業を目指した体制の確立に様々な課題が残されている状況の下、現段階においてはJATA (12)-VNTR 型別の出現傾向を把握してその導入的役割を高めることが重要であると言えるだろう。

本研究では、阪神地域において出現頻度の高いJATA (12)-VNTR 型を列挙している (Table 3)。これにより、同地域では同型別で頻出するパターンが明瞭に認識され、データ解釈 (菌株の異同判定、誤判定の可能性) における注意点がより具体的になったと言える。例えば、本稿で定義したJ<sub>12</sub>-0001は本分析で最大のクラスターであり、各地域から分離された計97株 (5.46%) によって構成されている。和田らによってまとめられた広域拡大性クラスター型<sup>9)</sup>のうち3タイプと同一のJATA (12)-VNTR 型を呈していることから、同手法のみでは細分類できないが、追加領域解析によって詳細な菌株群に分解する必要があると考えられる。J<sub>12</sub>-0006は全国的に分離されているM株<sup>8)16)</sup>と同一のJATA (12)-VNTR 型であることから、今後詳細な分析や注意喚起が求められる可能性がある。J<sub>12</sub>-0010は大阪市あいりん地域において2006年以降に集中的に分離され続けている型であり、同地域での集団事例の可能性が示唆されている。一方で、これらの頻出型とは異なる型が今後の分析で多数分離された場合には、それらを伝搬経路不明の集団事例と仮定し、新たな実地疫学調査の糸口として機能させることも可能である。こうしたアプローチは他の地域においても実施可能であり、JATA (12)-VNTR の活用展開として重要な切り口となると思われる。より統合的には、全国規模での同法の普及と型別情報の蓄積を進めることによって、統一的な結核菌遺伝型別、分子疫学的検討のワークフロー構築、ひいては本邦における結核分子疫学体制の確立につながるが見込めるだろう。

## V. 結 語

わが国の結核分子疫学体制をいち早く確立するうえ

で、JATA (12)-VNTR 型別の活用が望まれる。同型別において高頻度で見出される型をID管理・定義し、情報共有を促すことにより、サーベイランス分析においてもより効率的な運用が期待できる。

## VI. 謝 辞

本研究は、各自治体において積極的疫学調査を目的として収集され、遺伝型別が実施された菌株を用いて行われました。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、本データのVNTR 型別分析において、大山み乃り氏 (沖縄県立食肉衛生検査所)、増野功章氏 (名古屋市立衛生研究所)、平山照雄氏 (大阪市立環境科学研究所) にご尽力頂きましたことに、厚く御礼申し上げます。

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 石川信克: 地域における効果的な結核対策の強化に関する研究) の一部として補助を受けた。

## 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) 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 分析法の実際. *結核.* 2008; 83: 673-678.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 岩本朋忠: 結核菌北京型ファミリーの集団遺伝学的解析から推察される日本国内定着型遺伝系統群の存在と遺伝系統別薬剤耐性化傾向の違い. *結核.* 2009; 84: 755-759.
- 8) 和田崇之, 長谷 篤: 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. *結核.* 2010; 85: 845-852.
- 9) 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.

- 10) 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.
- 11) Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, et al.: Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan. J Clin Microbiol. 2009 ; 47 : 3340–3343.
- 12) Wada T, Fujihara S, Shimouchi A, et al.: High transmissibility of the modern Beijing *Mycobacterium tuberculosis* in homeless patients of Japan. Tuberculosis (Edinb). 2009 ; 89 : 252–255.
- 13) Wada T, Iwamoto T: Allelic diversity of variable number of tandem repeats provides phylogenetic clues regarding the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family. Infect Genet Evol. 2009 ; 9 : 921–926.
- 14) 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.
- 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) Ohkado A, Murase Y, Mori M, et al.: Transmission of specific genotype streptomycin resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in the Tokyo Metropolitan Area in Japan. BMC Infect Dis. 2009 ; 9 : 138.

————— Original Article —————

## CLUSTERING ANALYSIS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY USING THE JATA(12)-VNTR SYSTEM FOR MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE OF BROAD AREAS OF JAPAN

<sup>1</sup>Takayuki WADA, <sup>2</sup>Aki TAMARU, <sup>3</sup>Tomotada IWAMOTO, <sup>3</sup>Kentaro ARIKAWA, <sup>3</sup>Noriko NAKANISHI, <sup>4</sup>Jun KOMUKAI, <sup>4</sup>Kenji MATSUMOTO, and <sup>5</sup>Atsushi HASE

**Abstract** [Objectives] Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-variable numbers of tandem repeats (VNTR) is a standard method for genotyping of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. As a model study for nationwide surveillance, this study aimed to describe the tendency and frequency of genotypes of *M. tuberculosis* in a large number of clinical samples.

[Methods] Clinical isolates of *M. tuberculosis* (n=1,778) were obtained from patients with tuberculosis in 3 areas, i.e., Osaka City, Osaka Prefecture, and Kobe City, during 2007 and 2008. The samples were analyzed using JATA (12)-VNTR. All genotypes were subjected to clustering analysis.

[Results and Discussion] In total, 1,086 (61.1%) isolates showed clustering. The most common clusters were composed of 3 members. Such clusters were considered to reflect either actual transmission or low discriminatory power of JATA (12)-VNTR. Several prevalent JATA(12)-VNTR genotypes formed large clusters and were discussed in relation with epidemiological findings of other studies. The findings of this study will aid in the construction of an effective genotyping-

based surveillance system of *M. tuberculosis*, through improvement of interpretation of VNTR types, observation of certain particular strains in an area, and efficient detection of unidentified outbreaks.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, VNTR, Molecular epidemiology, Public health, Surveillance, Genotyping, Traceability of transmission

<sup>1</sup>Department of International Health, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, <sup>2</sup>Department of Microbiology, Osaka Prefectural Institute of Public Health, <sup>3</sup>Department of Microbiology, Kobe Institute of Health, <sup>4</sup>Health Center of Osaka City, <sup>5</sup>Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

Correspondence to: Takayuki Wada, Department of International Health, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, 1-12-4, Sakamoto, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8523 Japan. (E-mail: twada@nagasaki-u.ac.jp)