

# IS1245を用いた肺 *Mycobacterium avium* 症の臨床病型と多クローン性感染の関連についての分子疫学的検討

<sup>1</sup>桑原 克弘 <sup>2</sup>渡辺 靖 <sup>1</sup>和田 光一 <sup>1</sup>土屋 俊晶

**要旨：**〔目的〕*Mycobacterium avium* 症の一部の症例は多クローン性感染であることが報告されている。高度な多型性を有する IS1245 をマーカーとした RFLP 分析を行い、肺感染症の臨床像と多クローン性感染の関係について検討した。〔方法〕*Mycobacterium avium* 肺感染症を肺結核類似型、結核後遺症に伴う気管支拡張症型、中葉舌区型の 3 群に分類し IS1245 を用いた RFLP 分析を行った。〔結果〕肺結核類似型と結核後遺症に伴う気管支拡張症型では単クローン性感染が多く長期観察でもクローンの変化を認めない例も存在した。一方、中葉舌区型は多クローン性感染の頻度が高く、3 種以上の遺伝子型を有する例も認められた。経時変化を見ると同時多クローン性感染に加えてクローンの交代も認められ、薬剤感受性の変化からも全く関連のない菌株と考えられた。〔考察〕病型とクローン構成には関連があり、治療や感受性検査を行う上で多クローン性感染の可能性を考慮する必要があると考えられた。

**キーワード：**肺アビウム菌感染症、分子疫学、挿入断片 1245、多クローン性感染

## はじめに

非結核性抗酸菌症のなかでも特に MAC (*Mycobacterium avium-intracellulare* complex) 症は増加傾向にあり、難治であることから臨床的に問題になってきている。結核菌と異なりヒトからヒトへの感染はないとされるがその感染経路や病態は未だ明確ではない。結核症では主として IS6110 を用いた分子疫学的分析で菌株の異同の判別が可能となり、感染経路の推定に用いられている。MAC 症では従来菌株の異同を判断する方法は血清型などに限られていたが<sup>1</sup>、*Mycobacterium avium* (*M. avium*) において IS1245 を用いた分子疫学的検討の標準法が提唱され、結核における IS6110 と同様な手法で菌株の比較が従来よりも多型性が高く、簡便になった。MAC 症では複数の報告で多クローン性感染が示され、近年その感染形態の一部が明らかにされてきている。

一方 MAC 症には結核後遺症に伴うものや肺結核と類似の病態、中葉舌区を中心とした気管支拡張症などいくつかの臨床病型があり、予後や伸展形式、性差などの疫

学的な違いも指摘されている。このような臨床病型の違いが菌側の毒力などの要因によるものか宿主側の要因による違いかは不明である。

そこで病型によって感染している MAC の菌株のクローン構成に違いがありそれが病態の違いに関与していると予測し、IS1245 を用いた分子疫学的分析法で *M. avium* 症の臨床病型と感染している *M. avium* のクローン構成の関連について検討した。

## 対象と方法

過去に当院に通院歴のある ATS の非結核性抗酸菌症の診断基準を満たす *M. avium* 症例 11 例を対象に画像上、結核類似型、肺結核後遺症に伴う気管支拡張症型 (以下、結核後遺症型)、中葉舌区中心の気管支拡張症型 (以下、中葉舌区型) に分類した。

結核類似型は上肺野を中心に空洞を伴う結節影が主たる所見の症例、結核後遺症型では上肺野中心の陳旧性結核病変に気管支拡張症を伴っている症例、中葉舌区型は中葉舌区を中心に小粒状影と気管支拡張所見を伴う症例

<sup>1</sup>国立療養所西新潟中央病院呼吸器科、<sup>2</sup>検査科

連絡先：桑原克弘、国立療養所西新潟中央病院呼吸器科、〒950-2085 新潟県新潟市真砂 1-14-1  
(E-mail: kuwabara@masa.go.jp)

(Received 27 Oct. 2003 / Accepted 10 Dec. 2003)

と定義し病変部位, 空洞や粒状影, 気管支拡張所見といった画像所見, 結核既往歴の有無などで総合的に判断した。

各症例より得られた *M. avium* と同定された小川培地上の培養菌株から部位の異なる単一コロニーを最低3個以上継代培養し, サブクローン化して遺伝子分析に用いた。*M. avium* の培養コロニーは平板上に発育することもありこのような場合はなるべく離れた部位から継代した。一部の症例は時期を変えて複数回検体を採取し, それぞれをサブクローン化して分析, 比較した。

DNA多型分析は Soolingen らの提唱する標準法に従って行った<sup>1)</sup>。サブクローン化した菌株から DNA を抽出し制限酵素 *PvuII* で切断後, アガロースゲル電気泳動を行った。PCR法で作製した IS1245 をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い ECL labeling and detection kit (Amersham) を用いて化学発光で検出した。得られた電気泳動パターンを比較して菌株の異同を判定した。予備検討として当院で得られた無関係の症例より得られた10検体からサブクローン化した菌株の検討を行ったところ0~40本程度までのバンドを有し, 高度な多型性があり, さらにさらなるサブクローン化でバンドパターンは保たれ本邦の菌株でも多型性の判定に用いることが妥当であると判定した。一方で結核菌に用いられる IS6110 に比して, 継代で変異をおこす頻度が速いとされており, 1本までのバンドの変異は同一菌株と判定した。

症例提示で行った薬剤感受性検査は米国検査法標準化委員会 (NCCLS) がクラリスロマイシン (CAM) の定めたブレイクポイント MIC の測定のために設定した PH 7.4 での検討が可能なプロスミック NTM (極東) を用いた。NCCLS では MIC が  $4\mu\text{g}/\text{ml}$  以下が感性,  $32\mu\text{g}/\text{ml}$  以上を耐性と定義しておりこれに従い判定した。

## 結 果

### (1) 病型とクローン構成

検討症例11例の性別, 年齢, 結核既往歴, 病型, 病変部位, 罹病期間を Table に示した。症例1~3の3例が結核類似型, 症例4~7の4例が結核後遺症型, 症例8~11の4例が中葉舌区型に分類された。全体に女性が多く, 特に中葉舌区型は全例女性であった。5例においては1年以上おいた複数の時点で得られた培養菌株を用いて経時的なクローン構成の変化も同時に検討している。肺結核類似型の3例は罹病期間が比較的短い傾向があり, 2例に基礎疾患 (肺癌, 神経性食思不振症による高度低栄養) を認めた。それぞれ3~4個のサブクローンを検討したところ, 1例が4株中2パターンで多クローン性感染であったが, 他の2例は同一パターンで単クローン性感染が推定された。

結核後遺症型では3例が10年以上と長期の罹病期間がありながら多クローン性感染を認めたのは症例6のみで1年間の経過でクローンが交代していた。症例4, 5は異なる2点, 3点でみても同一パターンであり単クローン性の長期持続感染と考えられた。

中葉舌区型の4例では罹病期間が短い例から長い例まで認められた。症例11を除き, 3例が多クローン性感染であり, 2/3, 3/6, 4/6 と同時, 経時的変化とともに多数のクローンが混在することが証明された。

### (2) 臨床経過とクローン構成の経時的変化

5症例において1年以上の間隔で複数の検体を得ており, 病型とその経時的変化について検討した。結果について Table に示したように経時的にも多クローン性感染を示しクローンの交代を示す例も見られている。一部の症例について, 治療経過と同時に検討した薬剤感受性の変化も含め呈示する。

Table Clinical features of 11 cases and RFLP patterns of subclones

Case	Sex	Age	Preexisting tuberculosis	CT pattern	Location of major lesion*	Duration from diagnosis (ys)	RFLP pattern (No. of types/subcultured colonies)
1	F	84	—	Cavities	LUL	3	2/4
2	F	18	—	Cavities	RUL	0.5	1/3
3	F	23	—	Cavities	RUL	1	1/3
4	F	76	+	BE	RUL, LUL	22	1/8 (3 points)**
5	M	71	+	BE	RUL, LUL, LLL	10	1/6 (2 points)**
6	F	70	+	BE	LUL, RUL	19	2/6 (1/3 → 1/3)**
7	F	77	+	BE	RUL, LUL	4	1/3
8	F	73	—	BE, nodules	RUL, RML	15	2/3
9	F	57	—	BE, nodules	RML, RLL, Ling	3	3/6 (1/3 → 2/3)**
10	F	79	—	BE, nodules	RML, Ling	11	4/6 (3/3 → 1/3)**
11	F	54	—	BE, nodules	RML, Ling	2	1/3

\*RUL=right upper lobe; LUL=left upper lobe; RML=right middle lobe; Ling=lingula; RLL=right lower lobe; LLL=left lower lobe

\*\*Isolates were collected at different points in clinical course over one year period.



3クローンをサブクローン化してIS1245のパターンを検討するとすべてバンドが1本の同一パターンで単一クローンによる持続感染と考えられた。

2001年のクローンAと2002年のクローンBの薬剤感受性を見るとCAM単剤内服を反映してMICが0.25  $\mu\text{g/ml}$  から32  $\mu\text{g/ml}$  以上と上昇していた。CAM以外の薬剤感受性検査は類似しており同じクローンが1年の経過でCAMのみに耐性化したことが示唆された。

同じくCAM長期投与中の症例5の結核後遺症患者で同じくクローンが変化せずCAM耐性化が認められた。

②症例9 57歳，女性。中葉舌区型。

現病歴 (Fig. 3)：1999年に咳嗽，喀痰で初診し，中葉舌区，右下葉の気管支拡張症を伴う *M. avium* 症と診断された。慢性排菌状態で喀痰が多く3年で画像上，気管支拡張症の増悪が明らかである。

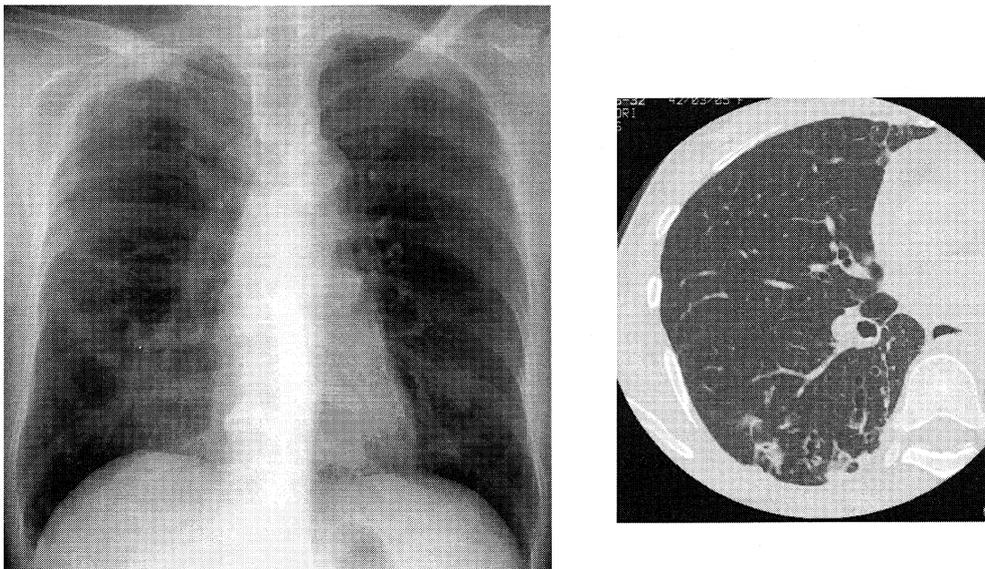
治療経過と菌株のクローン構成 (Fig. 4)：1999年から2000年まではRFP 450 mg，EB 750 mg，CAM 400 mgで治療したが消化器症状を訴え2001年からはCAM単剤で200 mgのみ内服している。

2000年12月の検体由来の3クローンはバンドが1本変化している株があるがほぼ同一のクローンと判定した。しかし2002年7月の検体由来の3クローンは2種のパターンがありそれぞれ2000年の株と異なり同一検体中の多クローン感染に加え経時的にも異なるクローンによる菌交代が起きていることが証明された。薬剤感受性をそれぞれの菌株で行うとCAM単剤の長期投与にも

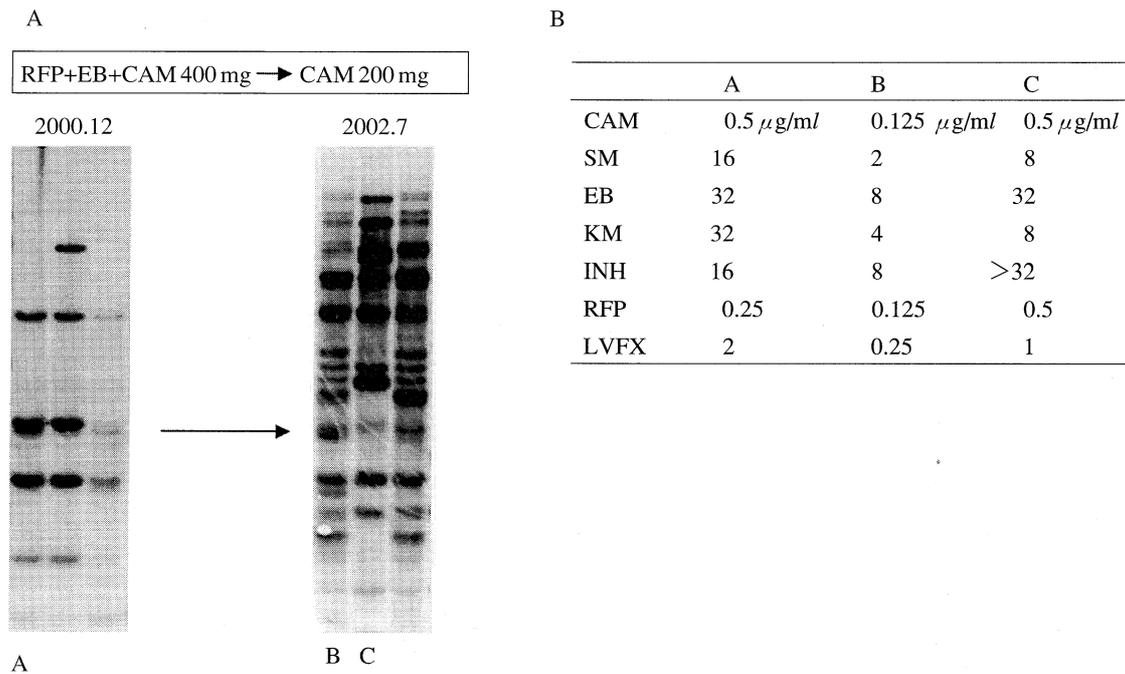
かわらずMICが0.5  $\mu\text{g/ml}$ ，0.125  $\mu\text{g/ml}$ ，0.5  $\mu\text{g/ml}$ と感性であり他の薬剤の感受性パターンも大きく異なり，感受性検査からも全く無関係の異なるクローンであることが示唆された。

## 考 察

本邦においてMAC症は増加傾向にあり，多彩な臨床像と化学療法に対して難治であるという点で問題となってきた。またAIDSでは高度に免疫が低下すると全身播種型のMAC症が見られ致命的になることもあり，HIV感染率の増加とともに難治性感染症として問題となっていくと予測される。その感染様式も明確ではないものの，ヒトからヒトへの感染はないとされ，水回りなどの住環境や土壌，動物，食物などが菌のリザーバーになっていると推測されている。患者や環境から得られた菌株の疫学的比較については従来，血清型が用いられることが多かったが種類が限られ特定の血清型が多い傾向にあり分離能力が低い。しかし近年の抗酸菌の遺伝学的研究の進歩によりDNA多型を用いて菌株の異同の判定が可能となってきた。結核症においてはIS6110と呼ばれる結核菌のゲノム上にランダムに存在するDNA挿入配列をプローブとした制限酵素切断断片長分析法 (RFLP法) が標準化され，集団感染の証明や感染経路の推定などの疫学的解析に広く用いられている。MAC症においても高分子量のDNAを泳動比較するパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) や挿入配列を用いた



**Fig. 3** Chest radiograph and CT on diagnosis of case 9, 57 years old female. She was diagnosed pulmonary *Mycobacterium avium* infection at 1999. Chest CT revealed bronchiectasis and multiple nodular lesion of right middle and lower lobe and left lingula. Clinical symptoms and radiological findings were worsening despite of chemotherapy.



**Fig. 4** A: Clinical course and RFLP analysis of case 9. She was treated in multi-drug chemotherapy from 1999. All subclones of isolates at 2000 had RFLP pattern A, but subclones of isolates at 2002 showed two different patterns, B and C. Strain conversion and simultaneously polyclonal infection were considered. B: Susceptibility test of each three strain. All strains were susceptible for clarithromycin despite of long-term chemotherapy. MIC patterns of the other drugs were also apparently different. These strains were considered to be different strains.

RFLP分析などでDNA多型分析が試みられている。特にIS 1245は1995年にGuerreroらによって報告された1313bpの挿入配列で*M. avium*のみがゲノム上に持ちヒト由来の菌株ではコピー数が多く、存在部位を含めて多型性が高くPFGEと同等以上の分解能をもつマーカーとして注目されている<sup>2)</sup>。その後、結核症におけるIS 6110のように世界的な研究室間での比較を可能にするためにSoolingenらによってRFLP分析の標準法が提唱され<sup>1)</sup>、今回の検討ではこの標準法に従い検討した。本邦の*M. avium*株でも高度な多型性を有することを確認したが、IS 1245を有しない菌株と1コピーしか有しない菌株があり、このようにコピー数の少ない株は2コピーしか持たないトリ由来の菌株に特有なパターン以外に報告がなく日本特有の菌株である可能性もある。またコピー数が多く多型性が高い一方、継代で変異がやや起こりやすい欠点もありクローンの同一性の判定には注意を要する。

結核症は通常、単クローン性感染であり、外来性再感染をしないかぎり同じ患者由来の菌株は同一のRFLPパターンを示す。一方、分子疫学的手法や血清型、薬剤感受性などで同様に*M. avium*症を検討すると一部の症例で異なる菌株による多クローン性感染を認めたという報告

がなされている。特にAIDSに伴う播種型*M. avium*症の検討がいくつか行われ90%以上の症例が単クローン性感染であるといった報告<sup>3)4)</sup>や、一方で5例中4例に多クローン性感染を認めたといった報告<sup>5)</sup>があり、単クローン性感染が多いとする報告が多いもののAIDSの一部の症例では多クローン性感染が証明されている。

一方でHIV陰性の呼吸器感染症での検討はわずかしかなく<sup>6)7)</sup>、特に臨床像と感染菌株のクローン構成の関連の検討はほとんどない。1998年にWallaceらはMAC症で17例の中葉舌区型症例と9例の空洞病変を持つ結核類似型症例に対し経時的に喀痰培養しPFGE法と血清型を用いて菌株のクローンの変化を詳細に報告している<sup>6)</sup>。中葉舌区型では88%が2種以上、53%が3種以上の遺伝子型を示したのに対し、結核類似型では1例(11%)のみが複数の遺伝子型を示し、中葉舌区型は反復性多クローン性感染が多く、結核類似型は単クローン性感染が多いと結論づけている。

今回の研究ではWallaceの検討した2群に加え本邦で頻度の高い肺結核後遺症に伴う*M. avium*症を加えて3群でPFGE法より分離能に優れるIS 1245を用いて検討した。また同一の検体から得られた培養検体から複数のコロニーを継代培養することで同時期に複数クローンが存

在するかどうかについても検討した。

方法で述べたように画像を中心とした臨床所見から、①結核類似型、②結核後遺症型、③中葉舌区を中心以小結節影と気管支拡張所見を主体とした nodular bronchiectasis と表現される中葉舌区型に大きく分類した。結核類似型は結核との鑑別が必要で、薄壁空洞が多いという特徴があり、アルコール多飲歴や重喫煙、呼吸器基礎疾患を持つ男性例が多いとされ、今回の検討では2例が基礎疾患を有していた。結核後遺症型は本来二次性として分類を分けるべきであろうが、他の二次性の病態と比較して、全身の免疫状態が比較的保たれている例が多く慢性排菌ながら進行がきわめて緩徐な例も多く病態が異なる。本邦では過去の結核の罹患率を反映して頻度が高く欧米での検討がほとんどないため今回の検討の対象とした。一方、中葉舌区型は疫学的には圧倒的に老年期以降の基礎疾患を有さない女性に多く世界的にも増加傾向で、臨床像が明らかに他の病型と異なることが知られている<sup>9)</sup>。緩徐に進行し10年以上の経過で増悪し、呼吸不全や咯血で死亡する例も存在し臨床的に大きな問題になっている。

結核類似型3例中1例と結核後遺症型の4例中1例と両病型では一部の症例のみが多クローン性感染であったのに対し、中葉舌区型では4例中3例が多クローン性感染であり同一時期の喀痰内に複数クローンが存在する例が多く、クローン構成も3種以上の多数の症例が2例あったことを示した。

経時的にも結核後遺症型の症例が長期観察でほとんどクローンの変化がない例が多いのに対し、中葉舌区型では経時変化も認め同時多クローン感染、反復性多クローン性感染がしばしば認められることを証明した。これらの所見は同一時期の多クローン感染と経時的な多クローン性反復性再感染を系統立てて証明できた臨床的きわめて重要な知見と考えられる。この検討では一検体からわずか3～4コロニーの継代であり、継代するコロニー数を増やして検討すれば多クローン性感染の頻度がさらに上昇する可能性が高く、結核症とは感染様式が全く異なることを示している。

また以上の所見を補足するために、MACに対して唯一 *in vitro* の感受性と臨床効果に相関のあるとされるCAMの薬剤感受性の推移も検討した。結核後遺症型症例の症例呈示で示したようにCAM単剤の治療を行うとクローンが変化しない例では耐性化が見られることを示した。一方、クローンが変化したと考えられる中葉舌区型の症例ではCAM単剤投与でもすべての株が感性で他の薬剤パターンから見ても全く関連のない菌株である可能性が高く、同時多クローン性感染、反復性感染を支持する所見といえる。

これらの知見からは、多クローン性反復性感染を起している例では単一時期でしかもサブクローン化していない検体の薬剤感受性を検討しても、多クローン性感染を反映できず意味が乏しいことを意味する。また一時的に化学療法で除菌したとしても環境のリザーバーから再感染、再定着を受けるため再発する可能性が高いとも考えられる。これは中葉舌区型の症例が治療で一時的に除菌されても再燃、再排菌をくり返し増悪していく臨床経過とよく一致する。中葉舌区型が再燃をくり返していくのは菌が治療に抵抗性であるためのみではなく、再感染をくり返しているために難治化している可能性がある。一方で10年以上に及ぶ長期観察中の結核後遺症型では単クローン感染が多くこれらの例では薬剤耐性も難治化に関与していると考えられる。液体培地を用いてMACの感受性を検討する際、中葉舌区型では多クローン性感染が多いため結果の解釈を慎重に行う必要がある。一方、他の2型では単クローン性感染が主であるため、結果が臨床的にも有効である可能性が高い。

反復性再感染が普通の現象であるとなれば中葉舌区型は菌株の感染力、毒性の違いによる発症と考えるよりは宿主側の何らかの全身的、局所的な抗酸菌に対する防御メカニズムの障害が大きな要因であると考えべきであろう。実際にヒトのNRAMP1(natural resistance-associated macrophage protein)遺伝子多型やビタミンDレセプター遺伝子多型などの抗酸菌免疫に関わる遺伝子変異が結核症発症の感受性に関与しているといった報告<sup>9)10)</sup>もでてきているが、MAC症と遺伝子変異の関係は未だ明確ではなく今後のさらなる検討が必要である。

病型により感染クローンの数や構成に差があるという今回の結果から、肺MAC症の薬剤感受性結果、治療法の選択や継続期間は、病型ごとに考慮する必要があると考えられた。今後の肺MAC症の治療戦略を考える上で、感染菌株のクローン構成という視点はきわめて重要なポイントであると思われる。

## ま と め

臨床病型別に3分類した *M. avium* 症に対しIS1245を用いた遺伝子多型解析を行った。中葉舌区型では同時多クローン感染、反復性多クローン性再感染が高頻度に起きており従来の薬剤感受性検査法や治療薬の選択の考え方では問題があると考えられた。一方、結核類似型や結核後遺症型では単クローンによる持続感染例が多く認められ、薬剤感受性の変化からもクローン交代が起きず薬剤耐性の問題が結核症と同様に存在することが示唆された。

中葉舌区型は他の病態と明らかに異なり、その病因論的な検討が必要と考えられる。

## 文 献

- 1) Soolingen D, Bauer J, Ritacco V, et al. : IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates : Proposal for standardization. J Clin Microbiol. 1998 ; 36 : 3051–3054.
- 2) Guerrero C, Bernasconi C, Burki D, et al. : A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. J Clin Microbiol. 1995 ; 33 : 304–307.
- 3) Picardeau M, Vanerot A, Lecompte T, et al. : Use of different molecular typing techniques for bacteriological follow-up in a clinical trial with AIDS patients with *Mycobacterium avium* bacteremia. J Clin Microbiol. 1997 ; 35 : 2503–2510.
- 4) Lari N, Cavallini M, Rindi L, et al. : Typing of human *Mycobacterium avium* isolates in Italy by IS1245-based restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 1998 ; 36 : 3694–3697.
- 5) Fordham C, Jacobs N, Albeit R, et al. : Polyclonal *Mycobacterium avium* infections in patients with AIDS ; Variations in antimicrobial susceptibilities of different strains of *M. avium* isolated from the same patient. J Clin Microbiol. 1995 ; 33 : 1008–1010.
- 6) Wallace RJ, Zhang Y, Brown B, et al. : Polyclonal *Mycobacterium avium* complex infections in patients with nodular bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med. 1998 ; 158 : 1235–1244.
- 7) Dvorska L, Bartos M, Ostadal O, et al. : IS1311 and IS1245 restriction fragment length polymorphism analysis, serotypes, and drug susceptibilities of *Mycobacterium avium* complex isolates obtained from a human immunodeficiency virus-negative patient. J Clin Microbiol. 2002 ; 40 : 3712–3719.
- 8) Prince S, Peterson D, Steiner M, et al. : Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. N Engl J Med. 321 : 863–868.
- 9) Bellamy R, Ruwenda T, Corrah K, et al. : Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. N Engl J Med. 1998 ; 338 : 640–644.
- 10) Wilkinson R, Llewelyn M, Petel P, et al. : Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among gujarari Asians in west London : a case-control study. Lancet. 2000 ; 355 : 618–621.

## Original Article

RELATIONS BETWEEN CLINICAL SUBTYPES OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* PULMONARY DISEASE AND POLYCLONAL INFECTIONS DETECTED BY IS1245 BASED RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS<sup>1</sup>Katsuhiko KUWABARA, <sup>2</sup>Yasushi WATANABE, <sup>1</sup>Koichi WADA, and <sup>1</sup>Toshiaki TSUCHIYA

**Abstract** [Introduction] The epidemiology of *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) infections has not been completely defined. Recently some reports presented polyclonal MAC infections. The purpose of this study was to reveal the clonal diversity of *Mycobacterium avium* isolates and the relation between clinical subtype of lung disease and polyclonal infection.

[Methods] We categorized pulmonary *Mycobacterium avium* infection to three clinical subtypes, tuberculosis like type, bronchiectasis with preexisting tuberculosis type and nodular bronchiectasis type. *Mycobacterium avium* isolates of 11 patients were studied for their heterogeneity using IS1245 based RFLP analysis. The insertion sequence IS1245 is repetitive element identified only in *Mycobacterium avium*. Standard method of IS1245 based RFLP analysis has been proposed as a suitable technique for typing of *Mycobacterium avium* isolates for epidemiological and taxonomic studies. At least three distinct colonies were subcultured to single clone. The subclones of the isolates were analyzed by IS1245 based RFLP technique and some subclones were also examined by antimicrobial susceptibility test.

[Results] Two of three patients of tuberculosis like type were considered to be monoclonal infection because only a single genotype was identified. And only one of four patients of bronchiectasis with preexisting tuberculosis type was considered to be polyclonal infection despite of long-term observation. Although isolates were collected in two or more occasions in clinical course over one year period, only a single genotype was observed in two patients. In contrast, three of four patients of nodular bronchiectasis type had multiple genotypes.

Isolates recovered from patients with monoclonal infection pattern following long-term treatment with clarithromycin monotherapy became resistant to clarithromycin. In contrast, three strains derived from one nodular bronchiectasis patient were susceptible to clarithromycin despite of long-term chemotherapy including clarithromycin. The susceptibility patterns

of the other drugs were also apparently different. Strain conversion due to repeated polyclonal infection was considered. These results of the antimicrobial susceptibility test supported clonal diversity of the *Mycobacterium avium* infection.

[Discussion] IS1245 based RFLP analysis possesses a discriminatory power between the isolates on clonal level. This study demonstrates that polyclonal infections are common in nodular bronchiectasis type and monoclonal infections are common in tuberculosis like type and bronchiectasis with preexisting tuberculosis type. And not only simultaneous polyclonal infection but also repeated polyclonal infection were observed in a nodular bronchiectasis type patient.

Drug susceptibility test showed long-term chemotherapy including clarithromycin could change the susceptibility of clarithromycin to resistant in patients with monoclonal infection. In contrast patients with repeated polyclonal infection pattern would avoid drug resistance because of strain conversion. This multiple susceptibility patterns identified in this study would not have been detected by the standard susceptibility test without subculture. And we also need the treatment strategy considering the polyclonal infection.

[Conclusions] Polyclonal infections are considered to be common in pulmonary *Mycobacterium avium* infection, especially nodular bronchiectasis type. Clonal diversity of *Mycobacterium avium* infection is an important factor to perform chemotherapy and drug susceptibility test.

**Key words:** *Mycobacterium avium*, RFLP analysis, IS1245, Polyclonal infection

<sup>1</sup>Department of Respiratory Diseases, <sup>2</sup>Clinical Laboratory Division, National Nishi-Niigata Central Hospital

Correspondence to: Katsuhiko Kuwabara, Department of Respiratory Diseases, National Nishi-Niigata Central Hospital, 1-14-1, Masago, Niigata-shi, Niigata 950-2085 Japan.  
(E-mail: kuwabara@masa.go.jp)