

日本における肺 *M. avium* 症の臨床像と菌遺伝子に関する多施設共同研究

^{1,2}中川 拓 ³高橋 弘泰 ⁴市川 和哉 ^{2,6}稲垣 孝行
⁷打矢 恵一 ⁷二改 俊章 ⁵八木 哲也 ^{1,2}小川 賢二

要旨：〔背景〕肺 *Mycobacterium avium* 症は多様な臨床経過を示すが、菌遺伝子との関係は知られていない。〔対象および方法〕われわれは全国の国立病院機構12病院から、治療抵抗性に悪化した症例（増悪群）43株と、治療歴のない症例（未治療群）46株の *M. avium* 臨床分離株と臨床データを集め、両群の臨床背景および菌側因子を比較検討した。さらに未治療群においては経過観察し、病状の悪化により治療を開始したものを未治療悪化群（17株）として検討を行った。菌側因子としては薬剤感受性試験、VNTR 型別解析、さらに最近報告された新規挿入配列である ISMav6 遺伝子保有の有無との関連を検討した。〔結果〕VNTR 型別解析の結果、地域や病勢（増悪群、未治療悪化群）において固有のクラスター形成はみられなかった。ポリクロール感染8症例中6症例、CAM高度耐性株12株中11株が増悪群であった。また、ISMav6がIFN- γ の産生を誘導するとされる *cfp29* 遺伝子の直上流に挿入されている株は未治療群の中で未治療悪化群に有意に多く存在していた（ $p=0.002$ ）。〔結論〕ポリクロール感染やCAM高度耐性が治療効果に悪影響を及ぼす可能性が考えられた。*cfp29*に挿入された ISMav6の保有の有無が肺MAC症の病状悪化の一つの要因である可能性が示唆された。

キーワード：非結核性抗酸菌症、ポリクロール感染、CAM耐性、VNTR 型別解析、ISMav6、*cfp29*

はじめに

Mycobacterium avium complex (MAC) は、肺非結核性抗酸菌感染症の原因菌の8割を占める¹⁾。肺MAC症は世界中で増加し続けているが、とくに日本においては罹患率が人口10万対0.82 (1971年)、2.43 (1990年)、3.52 (1997年)と大幅に増加しており²⁾、現在の罹患率は6.0~8.0と推定されている。これは諸外国（アメリカ2.0、ヨーロッパ0.2~1.0）³⁾と比べてきわめて高い。*M. avium*と*M. intracellulare*の比率をみると、*M. avium*が約70%を占めている¹⁾。とくに明らかな免疫不全や肺の基礎疾患をもたない中高年女性に急増しているが、その理由はわかっていない。

日米の非結核性抗酸菌症に関するガイドライン⁴⁾において、肺MAC症の治療はclarithromycin (CAM)を中心とした多剤併用療法が原則とされているが、肺結核症と

異なり、肺MAC症を治癒させるような強力な殺菌作用をもつ薬剤は存在しない。排菌陰性化や症状・画像所見の改善など一定の効果は見込める治療であるが、治療は長期にわたり完治させるようなものではない。肺 *M. avium* 症の感染源や感染経路、および発病や重症化の機序は不明である。臨床経過は症例によりばらつきが大きく、予測が難しい。無治療経過観察でも進行が緩徐で比較的安定している症例もあれば、適切な多剤併用療法を行っても急速に気管支拡張や空洞形成が進行し、肺の破壊が進行し死に至る症例もある。症例によって起因菌の病原性に差があるのではないかと、というのは臨床現場において実感されることである。今のところ治療反応性や予後について予測因子は確立していない。分離菌を遺伝学的に解析することによって病原性を判定することができれば、臨床的に大いに有用と考えられる。

*M. avium*の遺伝子タイピングとしては従来IS1245-

¹国立病院機構東名古屋病院呼吸器内科、²同臨床研究部、³愛知県厚生連海南病院薬剤科、⁴名古屋大学医学部附属病院薬剤部、⁵同中央感染制御部、⁶高山赤十字病院薬剤部、⁷名城大学薬学部微生物学研究室

連絡先：中川 拓，国立病院機構東名古屋病院呼吸器内科/臨床研究部，〒465-8620 愛知県名古屋市中東区梅森坂5-101 (E-mail: nkgwtk@toumei.hosp.go.jp)
 (Received 22 Mar. 2012/Accepted 13 Jun. 2012)

restriction fragment length polymorphism (IS1245-RFLP) 法⁵⁾が標準的な分子疫学解析法とされてきたが、迅速性と再現性に問題があった。これに対し筆者らは簡便で迅速性と再現性の高い *Mycobacterium avium* tandem repeats-variable number tandem repeat (MATR-VNTR) 型別解析法⁶⁾のほう⁷⁾がIS1245-RFLP法より菌株鑑別能力も優れていることを示した⁷⁾。

さらに、*M. avium* のゲノム上に存在する挿入配列 (Insertion Sequence: IS) の解析を行い、日本の臨床分離株の50~70%が新規挿入配列 ISMav6 を保有することを見出し、欧米で分離される *M. avium* にはみられない特徴であることを報告した⁸⁾。われわれは ISMav6 の保有の有無が日本での肺 MAC 症増加に関わっているのではないかと疑っている。

ISMav6 の挿入位置は7カ所特定されており、そのうちの1つは感染宿主において interferon (IFN)- γ の産生誘導に関与している遺伝子、*cfp29*⁹⁾ の Shine-Dalgarno (SD) 配列に挿入されている。IFN- γ は抗酸菌に対する宿主防御に重要な働きをしていることから、ISMav6 が *cfp29* の SD 領域に挿入されていることにより IFN- γ 産生を抑制しているのではないかと推測される。

本研究では、病原性の高い *M. avium* に遺伝子的特徴があるかどうかを検討するため、臨床的に病原性が高いと思われる症例由来の *M. avium* を日本全国から集めて、それらの遺伝子解析を行った。コントロール群として未治療症例由来の *M. avium* を用いて VNTR 型別解析における系統樹との関連性、および新規挿入配列 ISMav6 の保有率を比較検討した。また未治療症例においては経過観察し、進行例と安定例に分けて同様の遺伝学的検討を加えた。

方 法

(1) 対象

全国国立病院機構12病院(旭川医療センター8株、西新潟中央病院8株、茨城東病院16株、東京病院1株、千葉東病院13株、天竜病院9株、東名古屋病院1株、近畿中央胸部疾患センター6株、刀根山病院16株、西別府病院2株、福岡東医療センター3株、南九州病院6株)より分与を受けた肺MAC症(ATS/IDSAの診断基準をみたす)患者喀痰由来臨床分離 *M. avium* 計89株(増悪群43株、未治療群46株)を解析に使用した。

基準株として *M. avium* subsp. *avium* GTC00603 (ATCC 25291), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ATCC19698, *M. avium* subsp. *hominissuis* 104 (GenBank accession number NC008595) の3株を用いた。

(2) 臨床データの収集

増悪群と未治療群の定義は以下のようにした。

増悪群: CAMを含む多剤併用療法を12カ月以上行い、12カ月目の時点での検痰で塗抹陽性が継続かつ胸部エックス線画像検査で12カ月前に比べ悪化した症例

未治療群: 肺MAC症としての治療を受けたことのない症例

調査内容としては、性別、年齢、基礎疾患〔陳旧性肺結核、COPD、塵肺症、慢性間質性肺炎(特発性肺線維症、膠原病肺など)、糖尿病、HIV感染症、アスペルギルス感染症、その他〕の有無、確定診断時期、画像所見〔日本結核病学会による結核症の病型分類(陰影の性状・拡がり・病側)に準じる〕、病型〔nodular/bronchiectatic type, fibrocavitary type, solitary nodule, その他〕、(増悪群のみ)治療内容〔CAM単剤、CAMを含む多剤併用、その他〕について各施設よりアンケート調査を行った。

未治療群については12~18カ月後に追跡調査を行い、その間に病状の悪化がみられ治療開始された症例を未治療悪化群、病状の悪化がみられず未治療のまま安定している症例を未治療不変群と分類した。

(3) 薬剤感受性試験

測定にはプロスミックNTMを用い、方法はこの試薬のマニュアルに準拠し、streptomycin (SM), ethambutol (EB), kanamycin (KM), isoniazid (INH), rifampicin (RFP), levofloxacin (LVFX), clarithromycin (CAM), ethionamide (TH), amikacin (AMK) のMICを測定した。

(4) DNA抽出

菌の培養は抗酸菌培養用液体培地MGITを用いた。MGITからMyco Broth[®]に継代培養し、吸光度(530 nm)が0.2になるまで培養した。蒸留水1 mLを1.5 mLのエッペンドルフチューブに分注し、培養菌液100 μ Lを入れ、12,000 rpm, 1分間の遠心分離後、上清を捨て、200 μ LのINSTAGENE MATRIXを加え、均一の菌浮遊液を作製した。56℃の温浴にて20分間保温し、ヒーティングブロックで100℃, 8分間の加熱処理を行った。放冷後、ボルテックスにより10秒間攪拌を行い、12,000 rpm, 3分間の遠心分離で得られた上清をテンプレートDNAとした。

(5) MATR-VNTR型別解析および系統樹解析

プライマーは、西森らが報告したMATR-VNTR型別解析法に用いられている15種類を使用した。PCR反応は、AmpliTaq GOLD DNA Polymeraseを用いて行った。2 μ LのDNA溶液にAmpliTaq GOLD DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 2 mM dNTPmix 5 μ L, 10x PCR buffer 5 μ L, 25 μ Mの各プライマー1 μ Lを加え、全量50 μ Lになるように滅菌精製水で調整した。PCRは、GeneAmp[®] PCR System 9700を用いて、95℃10分間プレヒーティング後、98℃10秒, 68℃30秒, 72℃1分の増幅サイクルを38回実行し、最後に72℃7分間伸張反応を行った。PCR産物は、2%

アガロースゲル (E-gel) を TrackIt 50 bp DNA Ladder のサイズマーカーとともに電気泳動した。陽性コントロールは、各 VNTR 領域の反復回数がシーケンス解析にて判明している *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (ATCC19698) 由来の増幅産物を用いた。電気泳動後のゲルは Gel-Doc で撮影し、解析ソフト Quantity-One を用いて対象 VNTR 領域の塩基対数を推定した。各 VNTR 領域の反復回数を求め、これをアリルプロファイルとした。得られたアリルプロファイルを基に、マンハッタン距離を求め、系統樹を Fitch-Margoliash 法にて推定し、Fig tree v1.3.1, Splits Tree 4 により系統樹を作成した。

(6) ISMav6 および ISMav6 in *cfp*29 の保有率の解析

新規挿入配列 ISMav6 と ISMav6 in *cfp*29 の保有状況を PCR 法により解析を行った。ISMav6 の保有率については Ichikawa らの方法に従った。ISMav6 in *cfp*29 の保有状況については、2 μ L の DNA テンプレートに 10x buffer 5 μ L, 2 mM dNTP mix 5 μ L, AmpliTaq GOLD DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 25 μ M のプライマー (F: 5'-GCTCGCTCACGTCGACCA-3', R: 5'-ATTTCTCCACCGCGGTCAC-3') を各 1 μ L 加え、全量を 50 μ L になるように滅菌精製水で調節した。95°C 10 分間のプレヒーティング後、94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 1 分の増幅サイクルを 35 回実行し、最後に 72°C 7 分間の伸長反応を行った。得られた PCR 産物を 2% アガロースゲルで泳動し、DNA フラグメントの解析を行った。

(7) 統計解析

臨床データ (性別, 学会分類など) や挿入配列の保有率の解析は、カイ 2 乗検定法および Fisher の直接確率検定を用い統計解析を行った。年齢に関しては Student の t 検定を用いた。

結 果

(1) 患者背景

最初に、増悪群と未治療群の臨床的背景を比較した。診断時年齢が増悪群において有意に低く、空洞形成は有意差をもって増悪群に多くみられた (Table 1)。未治療群の診断確定後期間は 0~125 カ月 (中央値 11 カ月) であった。

(2) ポリクローナル感染

臨床分離 89 株に対し MATR-VNTR 型別解析を行ったところ、8 検体において VNTR 領域の反復数を算出する電気泳動で複数のバンドが検出され、ポリクローナル感染と考えられた。これらの 8 菌株をそれぞれ固形培地にて分離培養し、分離培養された菌株のうちそれぞれ 10 コロニーずつを MATR-VNTR 型別解析により確認した。6 検体は 2 種類の VNTR パターンの菌を単離できたが、残り 2 検体は 1 種類の VNTR パターンの菌しか分離できなかった。ポリクローナル感染 8 株のうち 6 株は増悪群であり、残り 2 株は未治療悪化群であった。

(3) 薬剤感受性試験

臨床分離株 95 検体 (ポリクローナル感染の検討で分離培養したものを含む) に対し薬剤感受性試験を行った。プロスミック NTM による CAM 感受性試験の結果 (Fig. 1), CAM 高度耐性 (MIC>32) 12 株中 11 株が増悪群であり、残り 1 株は未治療悪化群であった。他の薬剤感受性試験結果と病勢の間に関連はみられなかった (data not shown)。

(4) MATR-VNTR 解析

臨床分離株 95 検体 (ポリクローナル感染由来株を含む) に対し MATR-VNTR 型別解析を行い、系統樹解析を行った。

Table 1 Patient characteristics

	Untreated group (N=46)	Progressive group (N=43)	Total (N=89)	p-value
Age at positive culture—yr				
Mean $\pm$ SD	67.1 $\pm$ 12.5	61.3 $\pm$ 9.8	64.3 $\pm$ 11.6	0.016
Range	34–84	43–83	34–84	
Sex—no. (%)				0.37
Male	17 (37.0)	12 (27.9)	29 (32.6)	
Female	29 (63.0)	31 (72.1)	60 (67.4)	
Underlying disease—no. (%)	22 (47.8)	19 (44.2)	41 (46.1)	0.448
Subtype of MAC-PD*—no. (%)				0.377
Fibrocavitary disease	17 (37.0)	19 (44.2)	36 (40.4)	
Nodular bronchiectatic disease	26 (56.5)	24 (55.8)	50 (56.2)	
Solitary lung nodule	1 (2.2)	0	1 (1.1)	
Others	2 (4.3)	0	2 (2.2)	
Chest X-Ray finding according to the Japanese Society for Tuberculosis Classification				
Cavity (I/II)—no. (%)	17 (37.0)	26 (60.5)	43 (48.3)	0.022
Extensive shadow (3)—no. (%)	3 (6.5)	7 (16.3)	10 (11.2)	0.131

*MAC-PD: MAC-pulmonary disease

系統樹と地域性との明らかな関連はみられず、日本の中では地域による *M. avium* の遺伝学的な違いは認めなかった (Fig. 2)。

増悪群による固有のクラスター形成はみられなかった。未治療群を未治療不変群、未治療悪化群と分類しても系統樹との明らかな関連はみられなかった (Fig. 3)。標準株 *M. avium* 104からのマンハッタン距離も増悪群、未治療不変群、未治療悪化群の間に有意差は認めなかった (data not shown)。

(5) ISMav6およびISMav6 in *cfp*29

新規挿入配列 ISMav6を保有する株と ISMav6が IFN- γ の産生を誘導するとされる *cfp*29のSD領域に挿入されている (ISMav6 in *cfp*29) 株の比率を増悪群と未治療群の間で比較したが、有意な相関は認めなかった (Table 2-a)。

次に、未治療群の中で ISMav6および ISMav6 in *cfp*29の保有率を比較した。ISMav6の保有率は両群間に有意

差を認めなかったが、ISMav6 in *cfp*29の保有率は有意に未治療悪化群において高かった ($p=0.002$) (Table 2-b)。

考 察

今回の検討では、予後不良と考えられる増悪群の菌に遺伝学的特徴がないか、MATR-VNTR解析およびISMav6およびISMav6 in *cfp*29の保有率を検討したが、有意な関連を認めることができなかった。一方、未治療群の中で経過観察後、悪化して治療を要した症例にISMav6 in *cfp*29の保有率が有意に高いことがわかった。

肺MAC症の治療開始時期については、必ずしも診断時期と一致しないとされている⁴⁾。とくに小結節・気管支拡張型肺MAC症ではどのような症例に対して治療を行うべきかの結論はまだ出ていない。しかし、経過観察した結果急速に悪化してしまう症例があること、重症化した後の薬物治療は効果が出にくいこと、手術の機会を失う可能性があることなどを考慮すると、早期治療すべ

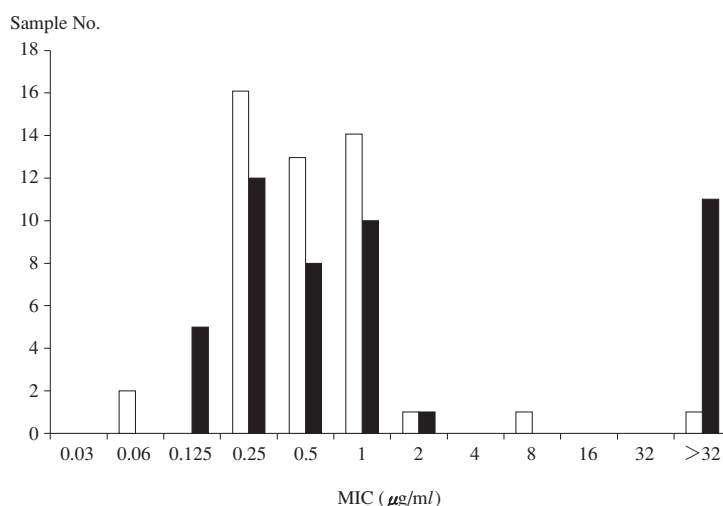


Fig. 1 MICs of clarithromycin for *M. avium* isolates. *M. avium* strains are isolated from patients with progressive diseases despite chemotherapy (progressive group, black bars) and with untreated diseases (untreated group, white bars).

Table 2-a Comparison of detection rates of ISMav6 and ISMav6 in *cfp*29 between untreated group and progressive group

	Untreated group (N=46)	Progressive group (N=43)	Total (N=89)	p-value
ISMav6 positive	19 (41.3%)	24 (55.8%)	43 (48.3%)	0.12
ISMav6 in <i>cfp</i> 29 positive	12 (26.1%)	15 (34.9%)	27 (30.3%)	0.25

Table 2-b Comparison of detection rates of ISMav6 and ISMav6 in *cfp*29 between stable patients and deteriorated patients in untreated group

	Stable patients in untreated group (N=29)	Deteriorated patients in untreated group (N=17)	Total (N=46)	p-value
ISMav6 positive	9 (31.0%)	10 (58.8%)	19 (41.3%)	0.062
ISMav6 in <i>cfp</i> 29 positive	3 (10.3%)	9 (52.9%)	12 (26.1%)	0.002

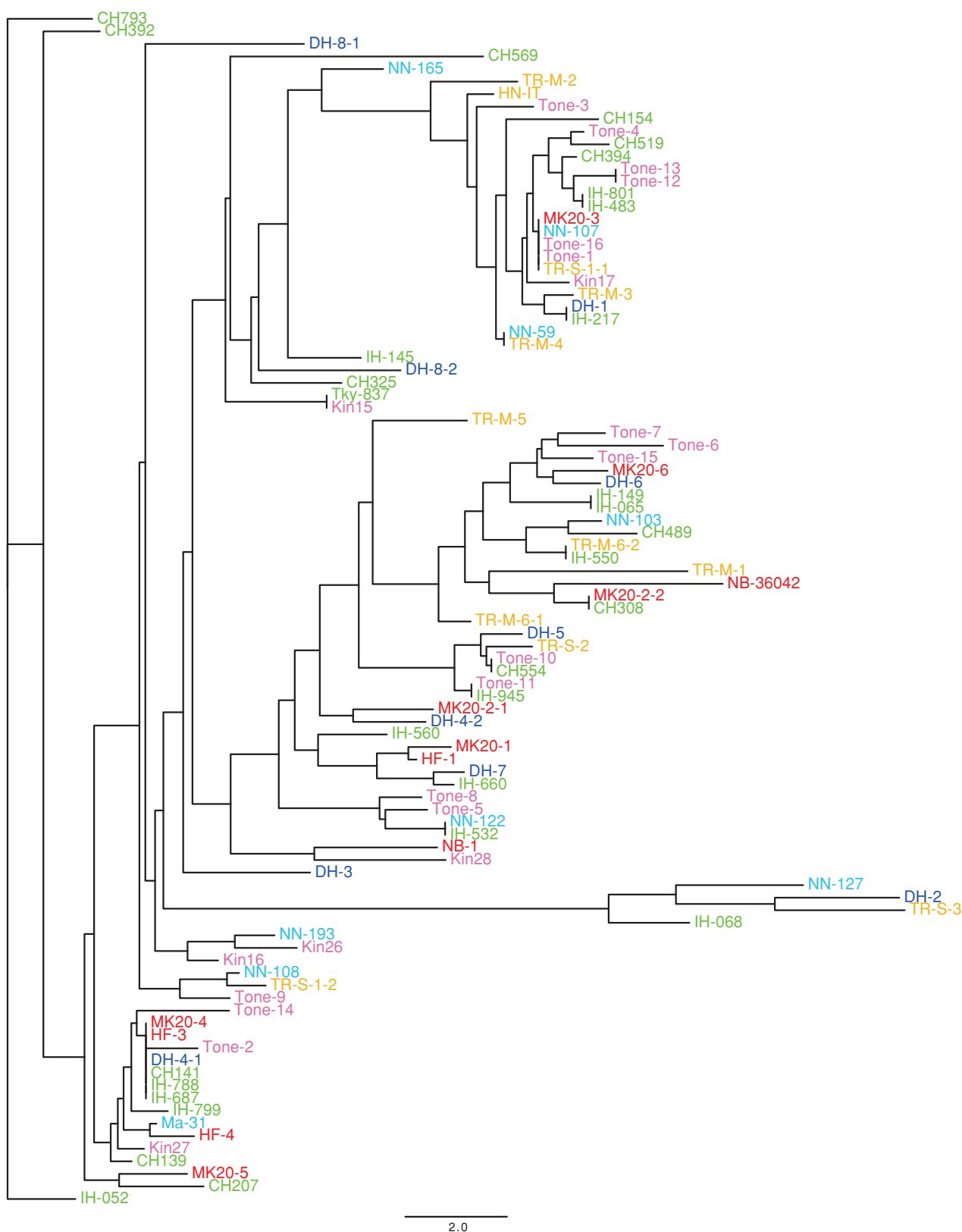


Fig. 2 Dendrogram constructed from MATR-VNTR typing results for *M. avium* isolates from patients in 6 geographical regions in Japan. The dendrogram was created from distance matrix files by Fitch-Margoliash analysis according to MATR-VNTR markers. The Manhattan distance is indicated at the bottom. the Hokkaido region, blue letters; the Tohoku region, light blue letters; the Kanto region, yellow-green letters; the Chubu region, yellow letters; the Kansai region, pink letters; the Kyusyu region, red letters.

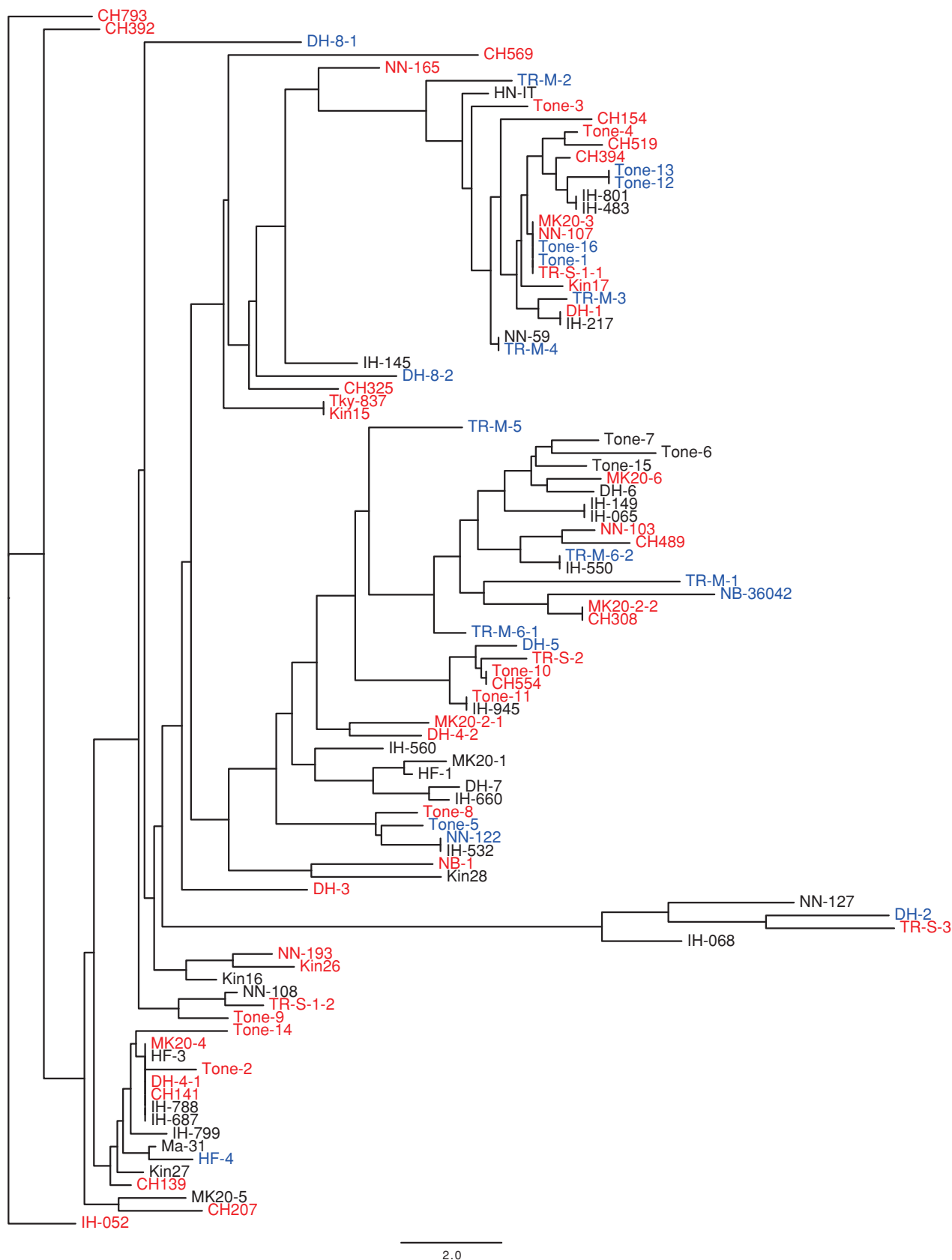


Fig. 3 Clinical course of *M. avium* pulmonary disease and MATR-VNTR typing analysis. *M. avium* strains from patients with progressive diseases despite chemotherapy (red), stable patients in untreated group (black), and deteriorated patients in untreated group (blue) were represented in the dendrogram constructed as shown in Fig. 2.

き症例を菌の遺伝子検査により予測することは意義深いと考えられる。今回はretrospectiveな検討であり、今後さらなる前向きな研究による検証が必要と考える。

ISMav6 in *cfp*29の保有は未治療群の中での悪化予測因子であったが、今回のprimary endpointであった増悪群での保有率は35%とそれほど高くなかった。薬物治療の反応性についてはまた別の原因があると考えれば矛盾するものではない。

Maekuraらは肺MAC症64例の血清型と予後の関連を検討し、血清型4をもつ菌が有意に生命予後不良であることを報告した¹⁰⁾。この研究は肺MAC症の予後に菌側因子が関与していることを明確に示している。おそらく生命予後不良の集団は今回の研究における増悪群に相当すると考えられる。血清型は古くから*M. avium*の疫学的分類に用いられてきたが、手間とコストがかかり安定性、再現性に問題があることから実際の臨床に応用するのは現実的でないと考えられる。より簡易な方法により菌の病原性を予測することが求められている。今回は増悪群に関連する菌側因子を明らかにすることはできなかったが、今後さらなる研究が必要である。

2009年Kikuchiらは、VNTR型別解析法を用いて*M. avium*感染症の病勢を予測する報告をしている¹¹⁾。呼吸器検体から*M. avium*が検出された37症例を検討した。11症例はコンタミネーションなどによる肺*M. avium*症以外の症例、26症例が肺*M. avium*症であり、経過が追えなかった1例とhot tub lungの1例をのぞく24症例のうち、12カ月以内に治療を開始した群をprogressive disease群(PD群:n=15)、12カ月以上治療開始しなかった群をstable disease群(SD群:n=9)と定義した。これら37症例の*M. avium*菌株を用いてMATR-VNTR解析を行い、得られたアリルプロファイルのマンハッタン距離から樹形図を描出したところ、PD群とSD群が別々に集積するようなクラスターが認められた。さらに多重ロジスティック回帰分析により、*M. avium*感染症の病勢を有意に予測するモデルを構築した。この報告は*M. avium*症に対して早期に治療開始すべき症例をVNTR解析により抽出できる可能性を示した。

今回の研究では、ほぼ同じprimer setを用いたMATR-VNTR解析であり、未治療不変群と未治療悪化群が別々のクラスターに分かれることが期待された。しかし残念ながらわれわれの解析では固有のクラスター形成はみられず、VNTR解析による病勢予測を再現することはできなかった。

今回の検討において、未治療患者の中で悪化群に多くISMav6 in *cfp*29がみられたのは、偶然のbystanderでありsurrogate markerの役割を果たしているだけかもしれない。しかし抗酸菌感染症においてIFN- γ は宿主防御に重

要な役割を担っており、難治性肺非結核性抗酸菌症患者において末梢血単核球のIFN- γ 産生能が低かったという報告もなされている¹²⁾。ISMav6が*cfp*29のSD配列に挿入されると、*cfp*29の転写抑制を介してIFN- γ 産生が抑制されることにより、肺MAC症患者の宿主防御反応が減弱化する可能性がある。そのメカニズムについて、今後のさらなる研究が必要である。

本研究の成果のひとつとして、CAM高度耐性は増悪群に多く、未治療安定群には一例もみられなかった点がある。肺MAC症に対するCAMの効果について、免疫調整機能によるものと考えるむきもあるが、この事実はCAMが抗菌薬として働いていることの証明でもある。実際KobashiらはCAMの用量が400 mg/day, 600 mg/day, 800 mg/dayと増えるにつれて菌陰性化率が有意に上がっていくことを示している¹³⁾。キードラッグであるCAMの薬剤感受性試験が肺*M. avium*症の予後予測において一つの有用な方法であると考えられた。

また非常に興味深いことには、ポリクロール感染症例が増悪群に多くみられる傾向にあり、未治療安定群にはみられなかった。このポリクロール感染が反復性再感染と関連しているかどうかは、環境由来菌のgenotypeとの比較検討が必要であると考えられるが、ポリクロール感染の検出自体が、予後不良因子として臨床応用できる可能性が考えられた。

本研究の結果、VNTR解析結果だけでは肺*M. avium*症の病勢予測は困難であるが、*cfp*29に挿入されたISMav6の保有の有無が無治療での進行に関係する可能性が示唆された。また原因か結果か不明ではあるが、ポリクロール感染およびCAM高度耐性が増悪群に多くみられることが明らかになった。

今回は*M. avium*感染症の研究であるが、*M. intracellulare*についてもわれわれが開発したVNTR解析により菌の遺伝子タイピングが容易になったため、同様のアプローチが可能と考えられる。

将来的にはMACの遺伝学研究により、予後予測や治療方針決定の臨床応用、また特定の病原因子の保有状況などを調べることにより、肺MAC症の感染、発病、重症化の機序の解明、さらに分子標的治療のターゲットなど新たな治療戦略につながる可能性がある。

また宿主側(ヒト)の遺伝的素因や、環境中からの菌の分析などの研究も同時に進める必要があり、菌の遺伝学研究の成果と協調しながら進めていくことが、この難治性感染症の克服につながると期待される。

謝 辞

本研究において臨床分離菌株と臨床情報を提供していただいた、藤内智、桑原克弘、佐々木結花、豊田恵美子、

前倉亮治, 露口一成, 白井正浩, 斉藤武文, 川畑政治, 田尾義昭, 瀧川修一, 坂谷光則各先生および菌遺伝子研究に協力していただいた新美政樹, 黒河和広, 田中映美, 福大哉, 森山誠各先生に感謝を申し上げます。

文 献

- 1) 坂谷光則: 非定型抗酸菌症. 結核. 2005 ; 80 : 25-30.
- 2) 坂谷光則: 非定型抗酸菌症の疫学と臨床. 結核. 1999 ; 74 : 377-384.
- 3) Bodle EE, Cunningham JA, Della-Latta P, et al.: Epidemiology of nontuberculous mycobacteria in patients without HIV infection, New York City. *Emerging Infect Dis.* 2008 ; 14 : 390-396.
- 4) Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al.: An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 ; 175 : 367-416.
- 5) van Soolingen D, Bauer J, Ritacco V, et al.: IS*1245* restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J Clin Microbiol.* 1998 ; 36 : 3051-3054.
- 6) 森山 誠, 小川賢二, 西森 敬, 他: 臨床由来*Mycobacterium avium*における Variable Numbers of Tandem Repeats 型別解析法の有用性の検討. 結核. 2006 ; 81 : 559-566.
- 7) Inagaki T, Nishimori K, Yagi T, et al.: Comparison of a variable-number tandem-repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS*1245* restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol.* 2009 ; 47 : 2156-2164.
- 8) Ichikawa K, Yagi T, Moriyama M, et al.: Characterization of *Mycobacterium avium* clinical isolates in Japan using subspecies-specific insertion sequences, and identification of a new insertion sequence, IS*Mav6*. *J Med Microbiol.* 2009 ; 58 : 945-950.
- 9) Rosenkrands I, Rasmussen PB, Carnio M, et al.: Identification and Characterization of a 29-Kilodalton Protein from *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate Recognized by Mouse Memory Effector Cells. *Infect Immun.* 1998 ; 66 : 2728.
- 10) Maekura R, Okuda Y, Hirotsu A, et al.: Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. *J Clin Microbiol.* 2005 ; 43 : 3150-3158.
- 11) Kikuchi T, Watanabe A, Gomi K, et al.: Association between mycobacterial genotypes and disease progression in *Mycobacterium avium* pulmonary infection. *Thorax.* 2009 ; 64 : 901-907.
- 12) Safdar A, White DA, Stover D, et al.: Profound interferon gamma deficiency in patients with chronic pulmonary nontuberculous mycobacteriosis. *Am J Med.* 2002 ; 113 : 756-759.
- 13) Kobashi Y, Abe M, Mouri K, et al.: Clinical usefulness of combination chemotherapy for pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *J Infect.* 2010 Nov 19 [Epub ahead of print].

Original Article

MULTICENTER STUDY ON CLINICAL FEATURES AND GENETIC CHARACTERISTICS OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* STRAINS FROM PATIENTS IN JAPAN WITH LUNG DISEASE CAUSED BY *M. AVIUM*

^{1,2}Taku NAKAGAWA, ³Hiroyasu TAKAHASHI, ⁴Kazuya ICHIKAWA, ^{2,6}Takayuki INAGAKI,
⁷Kei-ichi UCHIYA, ⁷Toshiaki NIKAI, ⁵Tetsuya YAGI, and ^{1,2}Kenji OGAWA

Abstract [Background] The pulmonary disease caused by *Mycobacterium avium* shows diverse clinical manifestations. Little is known about the potential association between the genetic characteristics of *M. avium* strains and disease progression.

[Subjects and Methods] We enrolled 89 patients with disease caused by *M. avium*, from 12 hospitals in Japan and collected the corresponding *M. avium* isolates and clinical data. We divided the 89 patients into 2 groups: one group comprising 43 patients with progressive disease despite chemotherapy ("progressive"), and the other group comprising 46 patients with untreated disease ("untreated"). We compared clinical and bacteriological characteristics between these groups. The bacteriological characteristics that we examined were drug susceptibility, variable-number tandem-repeat (VNTR) typing, and presence of the insertion sequence *ISMav6*. Seventeen patients in the "untreated" group were started on chemotherapy because their condition had clinically deteriorated during follow-up.

[Results] The result of VNTR typing showed that there was no specific clustering according to geographical region or clinical group in the "untreated" or "progressive" groups. Six out of eight cases those of polyclonal infection, and 11 of 12 isolates that were highly resistant to clarithromycin were isolated from patients with progressive disease. The frequency of isolates with *ISMav6* inserted into upstream region of the *cfp29* gene, which is involved in the induction of interferon- γ

production, was significantly higher in patients with deteriorating disease than in stable patients in the "untreated" group ($p=0.002$).

[Conclusion] Polyclonal infection and clarithromycin resistance may be involved in disease progression. *ISMav6* inserted into the *cfp29* gene is also suggested to be a factor related to the deterioration of pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease.

Key words : Nontuberculous mycobacteriosis, Polyclonal infection, Clarithromycin resistance, Variable-number of tandem-repeat (VNTR) typing, *ISMav6*, *cfp29*

Department of ¹Respiratory Medicine and ²Clinical Research, National Hospital Organization (NHO) Higashi Nagoya National Hospital, ³Department of Pharmacy, Aichi Prefectural Koseiren Kainan Hospital, ⁴Department of Pharmacy, and ⁵Department of Infectious Diseases, Center of National University Hospital for Infection Control, Nagoya University Hospital, ⁶Department of Pharmacy, Takayama Red Cross Hospital, ⁷Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Meijo University

Correspondence to: Taku Nakagawa, Department of Pulmonary Medicine, NHO Higashi Nagoya National Hospital, 5-101, Umemorizaka, Meito-ku, Nagoya-shi, Aichi 465-8620 Japan. (E-mail: nkgwtk@toumei.hosp.go.jp)