

Fig. 6. Intracellular protein expression of the wild type and intracellular growth-deficient strains within *A. polyphaga*. (A) Bacterial protein expression profiles of the wild type and intracellular growth-deficient strains within *A. polyphaga*. Lane 1, JR32 with in vitro heat shock at 42 °C for 1 h; lane 2, JR32 within *A. polyphaga*; lane 3, 25D within *A. polyphaga*; lane 4, LELA3118 within *A. polyphaga*. Open and solid arrowheads indicate the bands of DnaK and Hsp60, respectively. (B) The number of live intracellular bacteria at 14 h post-infection on a replicate experiment. Intracellular bacteria were recovered by cell lysis at 14 h post-infection, and the bacterial colonies were counted by inoculating the lysate onto a CYE plate. The experiments were performed in triplicate, and the data are shown as means \pm SD.

level within these strains. These results indicate that mutations of *icm/dot* genes probably do not affect the expression of whole cell proteins induced by heat shock. Regarding the presence of Hsp60 in the secreted protein fraction for the wild type strain, a previous immuno-electron microscopic study showed that heat-shocked *L. pneumophila* exhibited increased expression of the Hsp60 epitope on the cell surface and secreted Hsp60 molecules into the culture supernatant [39]. Our data were consistent with this finding, although the quantities of cell surface and secreted forms were considerably small.

DnaK chaperone participates in various cellular processes, including folding of nascent polypeptides, assembly and disassembly of multimeric protein structures, membrane translocation of secreted proteins and protein degradation. Especially in intracellular pathogens such as *Brucella suis* and *Listeria monocytogenes*, DnaK is involved in and plays some critical role in intracellular replication [40–42]. Although the *L. pneumophila* DnaK gene has been cloned [43], its actual function is not known yet. We attempted to produce a *dnaK* mutant of *L. pneumophila* to examine its phenotypes, but failed. It is plausible that DnaK of *L. pneumophila* is essential for its survival.

We next investigated the stress-induced protein expression by *L. pneumophila* within host cells. One of our interests was whether there are any differences in the expression of bacterial proteins within different hosts. Because amoebae function as a reservoir for *L. pneumophila* in the natural environment [4,5], they may be less detrimental to the bacteria and provide relatively mild conditions for bacteria. In contrast, macrophages are major target cells during mammalian infection by *L. pneumophila* and should be able to fight against invasive bacteria. Hence we predicted that there might be differences in

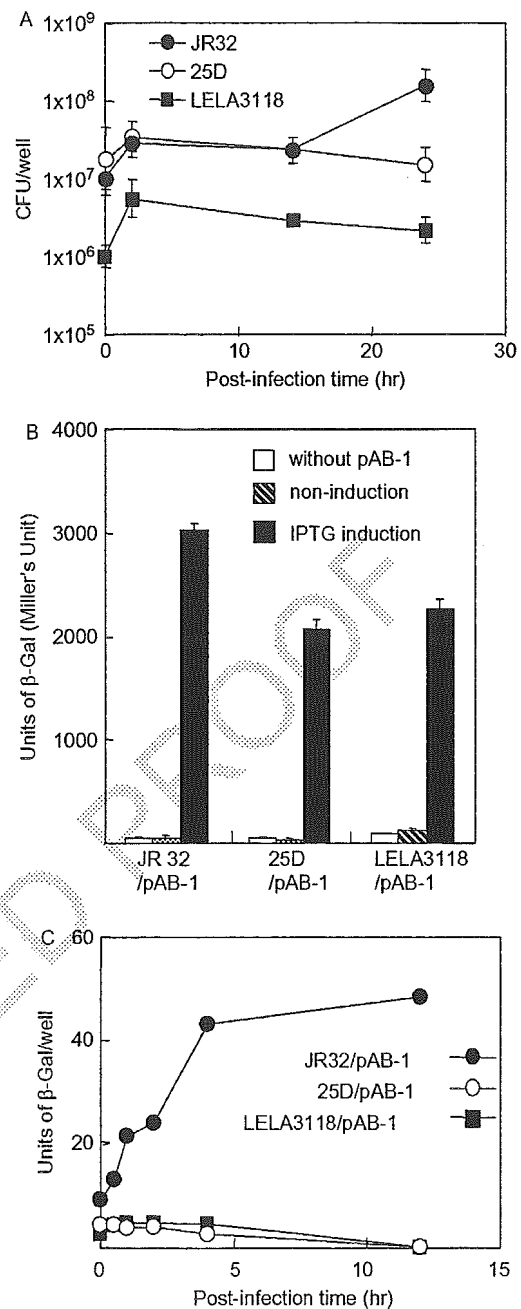


Fig. 7. Ability of bacterial protein synthesis determined with an inducible reporter construct. (A) Intracellular growth kinetics of *L. pneumophila* strains within U937 cells until 24 h post-infection. (B) Induction of β -galactosidase in *L. pneumophila* strains at the early logarithmic phase in culture by IPTG. The enzymatic activity from bacteria without pAB-1 (open column), one from bacteria with pAB-1 with no induction (hatched column), and one from bacteria with pAB-1 upon IPTG induction (filled column) are shown. The activity was normalized per the unit cell number, and the data are expressed as means \pm SD for triplicate determinations. (C) Induction of β -galactosidase in intracellular *L. pneumophila*. U937 cells were infected with *L. pneumophila* strains with pAB-1. At several time points during post-infection (abscissa), β -galactosidase activity in the cell lysate was determined. The activity is expressed as units per well of tissue culture plates.

bacterial responses within different intracellular environments. *L. pneumophila* was strongly induced to produce a variety of proteins including heat shock proteins DnaK and Hsp60 within macrophages, whereas the quantity and variety of proteins expressed within amoebae were limited. These are novel data showing a difference of protein expression of *L. pneumophila* within macrophages or amoebae. These data may indicate that many of *L. pneumophila* proteins induced within macrophages might play some role in the survival of bacteria in macrophages, whereas such intense protein expression might not be needed within amoebae whose intracellular environments may be safe enough for *L. pneumophila*. It is conceivable that *L. pneumophila* might have originally evolved to become parasitic for protozoa.

Another interest was whether there are any differences in protein expression between wild type and intracellular growth-deficient strains within host cells. We used two types of mutants as intracellular growth-deficient strains; LELA3118, *dotA* genetic mutant, and 25D, a spontaneous mutant that was established by passage on suboptimal artificial medium [24]. Incredibly, de novo synthesis of bacterial proteins as revealed by metabolic labeling was markedly suppressed in both of the mutants in macrophages. This is confirmed by experiments using bacteria carrying a reporter construct encoding β -galactosidase. The ability of synthesis of β -galactosidase proteins was stopped in the mutant strains after infection in macrophages. This is also the first evidence of a difference in the protein expression pattern in vivo between wild type and intracellular growth-deficient strains despite the lack of a difference in the in vitro response to heat shock between them. We also confirmed that the same pattern of protein expression was observed in response to another form of in vitro stress, osmotic or oxidative, as was seen for heat shock on SDS-PAGE, and that there was no difference between an intracellular growth-deficient strain (LELA3118 or 25D) and the wild type JR32 strain (unpublished observation). These data may indicate that none of the stress imposed in vitro could precisely mimic the intracellular stress for bacteria. It is possible that the initial protein synthesis by bacteria upon infection in macrophages is involved in the subsequent stress response and protein synthesis at a later stage. This initial response may be regulated by some virulence factors including the type IV secretion system.

Early studies on vacuoles harboring *L. pneumophila* showed that phagosomes containing JR32 aged 0.5–6 h do not fuse with lysosomes, but the phagosomes containing 25D or LELA3118 do [35]. It has also been shown that the activity of NADPH oxidase, which produces reactive oxygen intermediates, affects the intracellular growth of *L. pneumophila* within macrophages at early phase of infection [44]. It is commonly believed that intracellular growth-deficient *L. pneumophila* are damaged immediately through the bactericidal reaction of host cells in intracellular compartments. However, our data indicated that the numbers of intracellular viable cells of mutant strains, 25D and LELA3118, did not decrease until at least 14 h post-infection, because the recovery of viable bacteria remained constant

throughout this period (Fig. 7A). These data indicate that most cells of both mutant strains were not killed immediately after internalization by macrophages and were still viable until at least 14 h post-infection or probably for a longer period. This is supported by another report that *dotA* and *dotB* mutants reside in some non-lysosomal and LAMP-1 positive compartment within macrophages [45]. Taken together, these mutants likely remained alive with a suppressed-protein synthetic condition for at least 12 h.

In conclusion, we have shown a difference in the *L. pneumophila* intracellular stress response depending on the host cells. We have provided new evidence that intracellular growth-deficient *L. pneumophila* strains are not killed but forced to stop protein synthesis within macrophages immediately after internalization. They are viable without replication for some time in macrophages. Using bacteria carrying an inducible β -galactosidase construct, the immediate cessation of protein synthesis of intracellular growth-deficient strains upon internalization within macrophages, has been demonstrated. One could speculate that there might be a difference in the nature of phagosomes at the beginning between those containing wild type and intracellular growth-deficient strains. Only the former phagosomes may provide environments that allow bacteria to start protein synthesis. Recently it has been shown that RaIF protein, which is one of Icm/Dot substrates, is translocated into host cells before bacterial internalization [46]. This evidence may suggest a possibility that the quality of phagosomes is determined at the beginning of bacterial infection.

Acknowledgements

We wish to thank Dr Howard A. Shuman (Columbia University) for the kind gifts of the *L. pneumophila* strains and plasmid, and the stimulating discussion, and Dr Chieko Wada (Kyoto University) for the kind gift of the rabbit anti *E. coli* DnaK serum. We are also grateful to Mr Tsuyoshi Hayashi and Mr Takuro Watanabe for the technical assistance. This work was supported in part by a Grant for Research on Cancer Prevention and Health Services (H15-gan-yobou-095) from the Ministry of Health, Labor and Welfare, and Grant-in-aid (16790258) and a grant for the COE Program in the 21st Century from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

References

- [1] Horwitz MA, Silverstein SC. Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest* 1980;66:441–50.
- [2] Abu Kwaik Y. Fatal attraction of mammalian cells to *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 1998;30:689–95.
- [3] Swanson MS, Hammer BK. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:567–613.
- [4] Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 1980;33: 1179–83.

- [5] Barbaree JM, Fields BS, Freeley JC, Gorman GW, Martin WT. Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 1986;51:422–4.
- [6] Fields BS, Barbaree JM, Shotts Jr EB, Feeley JC, Morrill WE, Sanden GN, et al. Comparison of guinea pig and protozoan models for determining virulence of *Legionella* species. *Infect Immun* 1986;53:553–9.
- [7] Buchmeier NA, Heffron F. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* 1990;248:730–2.
- [8] Lee BY, Horwitz MA. Identification of macrophage and stress-induced proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 1995;96:245–9.
- [9] Daigle F, Graham JE, Curtiss RIII. Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Mol Microbiol* 2001;41:1211–22.
- [10] Abu Kwaik Y, Eisenstein BI, Engleberg NC. Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophage. *Infect Immun* 1993;61:1320–9.
- [11] Abu Kwaik Y, Engleberg NC. Cloning and molecular characterization of *Legionella pneumophila* gene induced by intracellular infection and by various in vitro stress conditions. *Mol Microbiol* 1994;13:243–51.
- [12] Abu Kwaik Y, Gao LY, Harb OS, Stone BJ. Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Mol Microbiol* 1997;24:629–42.
- [13] Pedersen LL, Radulic M, Doric M, Abu Kwaik Y. HtrA homologue of *Legionella pneumophila*: an indispensable element for intracellular infection of mammalian but not protozoan cells. *Infect Immun* 2001;69:2569–79.
- [14] Hoffman PS, Houston L, Butler CA. *Legionella pneumophila* *htpAB* heat shock operon: nucleotide sequence and expression of the 60-kilodalton antigen in *L. pneumophila*-infected HeLa cells. *Infect Immun* 1990;58:3380–7.
- [15] Fernandez RC, Logan SM, Lee SHS, Hoffman PS. Elevated levels of *Legionella pneumophila* stress protein Hsp60 early in infection of human monocytes and L929 cells correlate with virulence. *Infect Immun* 1996;64:1968–76.
- [16] Garduño RA, Garduño E, Hoffman PS. Surface-associated Hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun* 1998;66:4602–10.
- [17] Coers J, Monahan C, Roy CR. Modulation of phagosome biogenesis by *Legionella pneumophila* creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nat Cell Biol* 1999;1:451–3.
- [18] Nagai H, Roy CR. The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter. *EMBO J* 2001;20:5962–70.
- [19] Nagai H, Kagan JC, Zhu X, Kahn RA, Roy CR. A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* 2002;295:679–82.
- [20] Conover GM, Derré I, Vogel JP, Isberg RR. The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol Microbiol* 2003;48:305–21.
- [21] Chen J, Felipe KS, Clarke M, Lu H, Anderson OR, Segal G, et al. *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* 2004;303:1358–61.
- [22] Luo ZQ, Isberg RR. Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:841–6.
- [23] Sadosky AB, Wiater LA, Shuman HA. Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages. *Infect Immun* 1993;61:5361–73.
- [24] Horwitz MA. Characterization of avirulent mutant *Legionella pneumophila* that survive but do not multiply human monocytes. *J Exp Med* 1987;166:1310–28.
- [25] Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, et al. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 1979;10:437–41.
- [26] Horwitz MA, Silverstein SC. Intracellular multiplication of Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes is reversibly inhibited by erythromycin and rifampin. *J Clin Invest* 1983;71:15–26.
- [27] Gao L-Y, Harb OS, Abu Kwaik Y. Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect Immun* 1997;65:4738–46.
- [28] Hilbi H, Segal G, Shuman HA. Icm/Dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 2001;42:603–17.
- [29] Harb OS, Abu Kwaik Y. Characterization of a macrophage-specific infectivity locus (*milA*) of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 2000;68:368–76.
- [30] Sadosky AB, Wilson JW, Steinman HM, Shuman HA. The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability. *J Bacteriol* 1994;176:3790–9.
- [31] Miller JH. Experiments in molecular biology. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1972.
- [32] Segal G, Shuman HA. How is the intracellular fate of the *Legionella pneumophila* phagosome determined? *Trends Microbiol* 1998;6:253–5.
- [33] Nagai H, Roy CR. Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems. *Cell Microbiol* 2003;5:373–83.
- [34] Segal G, Shuman HA. *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect Immun* 1999;67:2117–24.
- [35] Wiater LA, Dunn K, Maxfield FR, Shuman HA. Early events in phagosome establishment are required for intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1998;66:4450–60.
- [36] Brand BC, Sadosky AB, Shuman HA. The *Legionella pneumophila* *icm* locus: a set of genes required for intracellular multiplication in human macrophages. *Mol Microbiol* 1994;14:797–808.
- [37] Abu Kwaik Y. Induced expression of the *Legionella pneumophila* gene encoding a 20-kilodalton protein during intracellular infection. *Infect Immun* 1998;66:203–12.
- [38] Roy CR, Berger KH, Isberg RR. *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Microbiol* 1998;28:663–74.
- [39] Garduño RA, Faulkner G, Trevors MA, Vats N, Hoffman PS. Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 1998;180:505–13.
- [40] Hanawa T, Fukuda M, Kawakami H, Hirano H, Kamiya S, Yamamoto T. The *Listeria monocytogenes* DnaK chaperone is required for stress tolerance and efficient phagocytosis with macrophages. *Cell Stress Chaperones* 1999;4:118–28.
- [41] Hanawa T, Yamanashi S, Maruyama S, Yamamoto T, Kamiya S. Participation of DnaK in expression of genes involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* 2002;214:69–75.
- [42] Köhler S, Ekaza E, Paquet JY, Walravens K, Teyssier J, Godfroid J, et al. Induction of *dnaK* through its native heat shock promoter is necessary for intramacrophagic replication of *Brucella suis*. *Infect Immun* 2002;70:1631–4.
- [43] Anemura-Mackawa J, Watanabe H. Cloning and sequencing of the *dnaK* and *grpE* genes of *Legionella pneumophila*. *Gene* 1997;197:165–8.
- [44] Saito M, Kajiwara H, Miyamoto H, Yoshida S. Fate of *Legionella pneumophila* in macrophages of C57BL/6 chronic granulomatous disease mice. *Microbiol Immunol* 2001;45:539–41.
- [45] Joshi AD, Sturgill-Koszycki S, Swanson MS. Evidence that Dot-dependent and -independent factors isolate the *Legionella pneumophila* phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. *Cell Microbiol* 2001;3:99–114.
- [46] Nagai H, Cambronne ED, Kagan JC, Amor JC, Kahn RA, Roy CR. A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:826–31.

IV. 研究成果の刊行物・別刷

3. 環境中のレジオネラとレジオネラ症の迅速かつ網羅的
遺伝子診断法に関する研究

Note

Comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and Conventional Culture for the Detection of *Legionella* Species in Hot Spring Water Samples in Japan

**KATSUNORI FURUHATA^{1*}, TOSHIMITSU ANNAKA², MASANARI IKEDO²,
MASAHUMI FUKUYAMA¹ AND SHIN-ICHI YOSHIDA³**

¹*School of Environmental Health, Azabu University, 1-17-71,
Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan*

²*Biochemical Research Laboratory, Eiken Chemical Co., Ltd., 143 Nogi,
Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0114, Japan*

³*Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1
maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan*

Received 1 February 2005/Accepted 19 April 2005

We detected *Legionella* species in 125 samples of hot spring bath water from various places in Japan using the culture and LAMP methods, and compared the results of the 2 methods. *Legionella* spp. was detected in 40 samples in the culture test, and 38 of these (95.0%) were also positive in the LAMP test, showing a high rate of consistency. Of the 85 negative samples in the culture test, 38 samples (44.7%) were positive in the LAMP test. The positive rate in the LAMP test was higher than that in the current culture test ; the test procedure was simple, and judgments could be made in a few hours, showing that the LAMP method is useful for the rapid detection of *Legionella* spp.

Key words : *Legionella* species/Hot spring water/Loop-mediated isothermal amplification (LAMP).

Mass infection through bath water as the source of infection has recently occurred in Japan (National Institute of Infectious Diseases, 2003), and improved hygienic management of bath water is needed. For monitoring the bacterial counts of *Legionella* spp. in bath water, a culture test is necessary. However, 7-10 days are needed to obtain the test results because bacterial growth on selective media is very slow, which is a limitation of the culture method. Such time-consuming procedures cause delays in applying effective countermeasures and increases the risk of infection. Furthermore, in the case of the public bath business, delays in inspection after bactericidal measures results in great economic losses due to the long-term suspension of business licenses. Therefore, the establishment of a rapid method to de-

tect *Legionella* spp. in bath water that replaces the culture method is urgently required.

Detection of pathogenic microorganisms by gene amplification takes only a few hours (Coleman et al., 1996). Particularly, a new gene amplification method, loop-mediated isothermal amplification (LAMP), is superior in sensitivity and the ease of implementation to the current polymerase chain reaction (PCR) method (Horisaka et al., 2004 ; Inoue et al., 2004b), and basic investigations of the detection of *Legionella* spp. have progressed (Annaka et al., 2004).

In this study, we detected *Legionella* spp. in hot spring bath water from various places in Japan using both the culture and LAMP methods, and compared the results of the 2 methods.

Between March and November 2004, 125 samples (500 ml) of hot spring water from 20 prefectures were subjected to testing. Samples from local regions were transported in a refrigerator. As a rule, the

* Corresponding author. Tel : +81-42-754-7111, Fax : +81-42-754-6215.

samples were bath water, but some samples were collected from water sources and hot-water taps.

Each sample was centrifuged at 6,000 rpm for 30 min, and re-suspended in 5 ml to prepare 100-times-concentrated samples.

Following the new version of the *Guidelines for the Control of Legionellosis* (Building Management Education Center, 1999), 1 ml of 0.2 M HCl-KCl solution (pH 2.2) was added to 1 ml of the 100-times-concentrated sample in a small sterilized test tube. After sufficient stirring, the mixture was kept at room temperature for 15 min. The samples, 0.1 ml each, were dropped on WYO α agar medium (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo) and GVPC α agar medium (Nikken Biomedical Laboratory Co., Kyoto), and smeared by using a Conradi stick (Toyo Kizai Co., Saitama). The plates were incubated at 37°C for 7 d, and colonies showing characteristics of *Legionella* spp. on the media were counted. A few colonies were selected and smeared on blood agar medium and BCYE α agar medium (Nikken Biomedical Laboratory Co., Kyoto). The plates were subjected to pure culture at 37°C, and a cysteine auxotrophy test was performed at the same time. After culturing for 3 d, strains that did not grow on the blood agar plate, but grew on the BCYE α agar plate, were assumed to be *Legionella* spp., and confirmed to have gram-negative rods. For identification of the bacterial species, the latex aggregation reaction (Kanto Chemical Co., Tokyo), immune serum aggregation reaction (Denka Seiken Co. Ltd., Tokyo) and DNA-DNA hybridization (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co. Ltd., Tokyo) were used. The detection limit of this culture method was 10 colony forming units (CFU)/100 ml.

For LAMP, 'Loopamp® *Legionella* Screening kit E' (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo) was used according to the package insert. A 100-times-concentrated sample of 2 ml was centrifuged at 13,000 \times g for 10 min at 4°C, and the supernatant was removed, leaving about 40 μ l. 50 μ l of 'Extraction Solution for *Legionella*' was then added to the precipitate. After being mixed by using a vortex mixer, the mixture was heated at 95°C for 15 min, rapidly cooled, and neutralized with 8 μ l of 1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0). The mixture was centrifuged again under the same conditions, and the supernatant was used as the nucleic acid extract. The nucleic acid extract, 5 μ l, was added to 20 μ l of LAMP reaction reagent 'Master Mix', and the amplification reaction was performed at 65°C for 60 min with a Loopamp® real-time turbidity measurement system. When a characteristic increase in turbidity with amplification was observed within 1 h, the sample was judged positive

TABLE 1. Distribution of *Legionella* spp. colony counts, and comparison of detection results using the LAMP method.

<i>Legionella</i> counts (CFU/100ml)	Culture	LAMP	
		Positive	Negative
Less than 10	85 (68.0)*	38 (50.0)	47 (95.9)
10-40	18 (14.4)	16 (21.1)	2 (4.1)
50-90	6 (4.8)	6 (7.9)	0 (0)
100-490	6 (4.8)	6 (7.9)	0 (0)
500-990	3 (2.4)	3 (3.9)	0 (0)
1,000-4,900	6 (4.8)	6 (7.9)	0 (0)
5,000-9,900	1 (0.8)	1 (1.3)	0 (0)
Subtotal	40 (32.0)	38 (50.0)	2 (4.1)
Total	125 (100.0)	76 (100.0)	49 (100.0)

* : Number of samples (%)

for *Legionella* spp. The enzyme was inactivated by heating at 80°C for 2 min. The lower limit of detection of this test was 10 cells/100 ml.

The results of detection of *Legionella* spp. in 125 samples using the culture and LAMP methods are shown in TABLE 1. *Legionella* spp. was detected in 38 samples (30.4%) with both methods, and not detected in 47 samples (37.6%) with either method. The results of the 2 methods were consistent in 85 samples (68.0%). Thirty-eight samples (30.4%) were negative in the culture test, but positive in the LAMP test. In contrast, 2 samples (1.6%) were positive in the culture test, but negative in the LAMP test. There was a significant difference in the results of detection between the 2 methods ($p < 0.01$). When *Legionella* spp. was detected with the LAMP method, the risk magnification, relative risk level and attributable risk level were 0.303, 0.526 and 0.288, respectively, and the detection rate was higher than that of the culture method.

The distribution of bacterial counts in 40 *Legionella*-positive samples in the culture test is shown in TABLE 1. The count was 10-40 CFU/100 ml in 18 samples (45.0%), and was the most frequent count level. The count was 50-90, 100-400 and 1,000-4,000 CFU/100 ml in 6 samples (15.0%). The count was less than 10 CFU/100 ml (undetectable) in 85 samples (68.0%), and 7 of these (8.2%) were judged negative because bacteria other than *Legionella* spp. and/or fungi grew faster on the selective media, and the growth of *Legionella* spp. could not be confirmed. Forty-nine isolates were subjected to identification, and 42 isolates (85.7%) were identified as *L. pneumophila*. *L. micdadei* and *L. gormanii* were also identified. On serotyping *L. pneumophila*, 17 isolates (34.7%) were typed group 1, which was

the most frequent type, and next most frequent type was group 6, in 8 isolates (16.3%). A relatively high number of isolates were typed group 3, group 4 and group 10. These identification results were similar to the isolation situation of the *Legionella* spp. in the soil of Japan, which the authors investigated previously (Furuhata et al., 2002).

The results of the detection of *Legionella* spp. in 125 samples of hot spring bath water using the LAMP method are shown with the distribution of bacterial counts measured with the culture method in TABLE 1. Of the 85 undetectable samples (less than 10 CFU/100 ml) in the culture test, 38 samples (44.7%) were positive in the LAMP test. Of the 18 samples in which 10-40 CFU/100 ml *Legionella* spp. was detected in the culture test, 16 samples (88.9%) were also positive in the LAMP test, but 2 samples (11.1%) were negative. The *Legionella* counts in these 2 LAMP test-negative samples were 10 and 30 CFU/100 ml, respectively, and *L. pneumophila* was isolated from both samples, but the serotypes were not clear. All of the 22 samples in which 50 CFU/100 ml or higher *Legionella* spp. was detected were positive in the LAMP test.

The biggest disadvantage of the generally used culture method for the detection of *Legionella* spp. is the length of time required for testing. Detection of nucleic acid has been widely used as a rapid test method (Savani et al., 2004). As for differences between the 2 methods, the culture method detects only viable bacteria capable of forming colonies on medium, while the gene test is capable of detecting not only viable bacteria but also dead bacteria and viable but non-culturable bacteria (VNC). The gene test is also capable of detecting bacteria using nucleic acid alone. Thus, it is difficult to obtain a complete consistency between the results of the culture test and the gene test.

Legionella spp. in 125 samples of hot spring bath water was detected using the current culture method and the recently developed LAMP method, and the results were compared. Of the 40 samples in which *Legionella* spp. was detected in the culture test, 38 samples (95.0%) were positive in the LAMP test, showing a high rate of consistency. Two samples that were positive in the culture test but negative in the LAMP test contained abundant insoluble materials, suggesting that amplification-inhibiting substances present in the hot spring bath water affected the test. Of the 85 undetectable samples in the culture test, 38 samples (44.7%) were positive in the LAMP test. Ng et al. (1997) reported that the presence of dead bacteria and VNC bacteria were the factors causing the PCR test positivity of the culture test-negative

samples in a *Legionella* spp. test of cooling tower water. There may be similar factors involved in the testing of hot spring bath water, and positive readings may be obtained with the gene test even when disinfection with chlorine is performed properly. A positive result in the gene test may indicate the existence of *Legionella* spp. contamination in the past, and it indicates that there is the potential for actual contamination in the future. Accordingly, positivity in the gene test does not directly mean infectivity, unlike the culture test, and gene test-positive hot spring bath water does not necessarily become a source of infection. Sufficient consideration is necessary at this point when the gene test is employed for rapid testing of *Legionella* spp.

When oxidizing bactericidal agents such as chlorine are added, the nucleic acid of dead bacteria is degraded, and become undetectable, depending on the concentration of the bactericidal agent and exposure time (Inoue et al., 2004a). NASBA and TRC methods developed as rapid RNA amplification techniques have recently been investigated in many fields (Templeton et al., 2003 ; Masuda et al., 2004). Introduction of these techniques may bring the results of the gene test and culture test into closer accordance.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by Health and Labour Sciences Research Grants (H16-Kenkou-055) from the Ministry of Health, Labour and Welfare.

REFERENCES

- Annaka, T., Kojima, T., Ikedo, M., and Furuhata, K. (2004) The detection of *Legionellae* from environmental water specimens by the LAMP method (in Japanese). *Bokin Bobai*, **32**, 195-201.
- Buiding Management Education Center (1999) Guidelines for the control of legionellosis (in Japanese).
- Coleman, S. S., Melanson, D. M., Biosca, E. G., and Oliver, J. D. (1996) Detection of *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 in eels and oysters by PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1378-1382.
- Furuhata, K., Okabe, Y., Dogasaki, C., Hara, M., and Fukuyama, M. (2002) Isolation of *Legionella* spp. from soils in Japan (in Japanese). *Bokin Bobai*, **30**, 555-561.
- Horisaka, T., Fujita, K., Iwata, T., Nakadai, A., Okatani, T., Horikita, T., Taniguchi, T., Honda, E., Yokomizo, Y., and Hayashidani, H. (2004) Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5349-5352.
- Inoue, H., Noda, A., and Agata, K. (2004a) Detection of *Legionella pneumophila* with the polymerase chain reaction after treatment with chlorine or hydrogen peroxide

- (in Japanese). *Bokin Bobai*, **32**, 383-386.
- Inoue, H., Noda, A., Agata, K., Annaka, T., Kojima, T., Watari, H., and Ikedo, M. (2004b) Examination of the rapid detection of *Legionella* from bathwater samples by the loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction methods (in Japanese). *Bokin Bobai*, **32**, 481-487.
- Masuda, N., Yasukawa, K., Isawa, Y., Horie, R., Saitoh, J., Ishiguro, T., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., and Hayashi, T. (2004) Rapid detection of *tdh* and *trh* mRNAs of *Vibrio parahaemolyticus* by the transcription-reverse transcription concerted (TRC) method. *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 236-243.
- Ng, D. L. K., Koh, B. B., Tay, L., and Heng, B. H. (1997) Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of *Legionellae* in cooling tower waters in Singapore. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**, 214-216.
- National Institute of Infectious Diseases, Infectious Diseases Surveillance Center (2003) Legionellosis, April 1999-December 2002, Japan. *Infectious Agents Surveillance Rep.*, **24**, 27-28.
- Savan, R., Igarashi, A., Matsuoka, S., and Sakai, M. (2004) Sensitive and rapid detection of Edwardsiellosis in fish by a loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 621-624.
- Templeton, K. E., Scheltinga, S. A., Graffelman, A. W., van Schie, J. M., Crielaard, J. W., Sillekens, P., van den Broek, P. J., Goossens, H., Beersma, M. F. C., and Claas, E. C. J. (2003) Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4366-4371.

ゲノム情報を使った 感染症の網羅的診断法



江崎 孝行
岐阜大学大学院医学研究科教授

これまでに、微生物のゲノム情報をどう解析するかという話が続きましたが、私は、現在までに分類学上正式に記載されている約5,500種の細菌の情報を、どのように感染症の診断に利用するかという話をします。

感染症の診断と病原細菌の同定

5,500種の細菌のなかでヒトに病気を起こす細菌性病原体は約900菌種で、そのうちもっとも危険度の高いレベル3の菌種としてチフス菌、炭疽菌、ペスト菌および結核菌などに代表される33菌種が、レベル2およびレベル1で、日和見病原体といって通常は病気を起こさず免疫力が落ちたときに感染を起こすものをいれて約900種に達します。そのなかで、菌類では50類ほど、病原性ウイルスとしては110種ほどを対象とした感染症診断法を開発することを目標に、私どもは研究を進めています。

医師が発熱した患者さんを前にして診察をするとき、これだけの病原体が対象となるため、原因菌を同定することは、かなりの経験を積んだ医師でも容易ではありません。そこで、従来は検体を採取して検査をしていました(図1)。下痢をしているのであれば、下痢便を採取して1日から数日かけて培養し、そ

れをもとに同定作業を行います。この同定作業も1日から数日かかります。結核菌だと培養に1か月ほど、同定作業にさらに数週間かかります。このように長い時間がかかると、患者さんの病気が治った後に結果がでたり、運が悪いと重篤化して初めてわかるため、感染症の診断・治療にはあまり役立ちません。

いち早く病原体を特定し、その病原体に特異的に効く抗生物質を最初から選択することができれば、治療が的確になり、無駄な抗生物質を使う高額な治療費の浪費を抑えることができます。

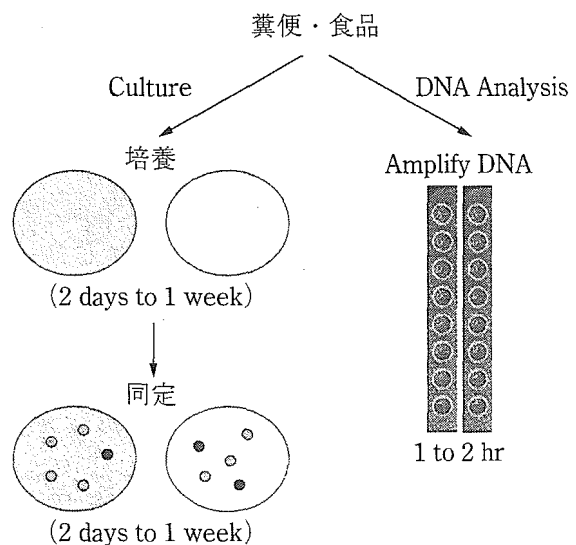


図1 培養検査と遺伝子検査の比較

このような視点に立って、私どもは主要なヒト感染症のうち、下痢症、気道感染、敗血症、髄膜炎、性感染症、眼科領域、皮膚感染などにわけ、これらの病気を起こす病原体を網羅的に迅速に解析する方法を作成しています。

感染症診断法の問題点

ところで、病原体のなかで通常の培地で培養できるものは、ごくかぎられています。たとえば、呼吸器感染症の場合、通常の培養で引っかかる病原体と、熟練した検査技師が特殊な培地を使って初めて同定できるもののがかなりありますが、それでも通常の培養では培養できない病原体が多くなっています。ウイルスになると、インフルエンザウイルスのよ

うな特殊なごく一部の抗原検査が外来などでできるようになってはいますが、通常は組織培養というやっかいな方法でなければ分離できないため、病院などではそのような検査をまったく行っていません。

皆さんが熱がでて病院にいったとき、検体をだすと、すべての感染症の病原体が調べられているものと考えがちですが、現実には、すべてを検査できないのが実情です。保険診療ではすべてを調べることはできません。医師が指定したときは特殊な検査を行います。それ以外は通常の数少ない培地を使って、頻度の高いものだけが検査対象となります。頻度の低い疾病、たとえば1年に1回しか見つからないような疾病や、外国にしかないような疾病、ウイルスは通常検査の対象外です。

階級に応じた細菌の同定

新しい感染症の診断法には遺伝子情報を使います。大腸菌の場合、ゲノムは460万塩基対ほど、ヒトはその1,000倍ほどあります。そこで、すべてのゲノムを対象に使うことは無理があるため、大腸菌のゲノムのなかの、どの情報を使うかが問題になります。大腸菌の菌株によってもゲノムサイズは違いますし、大腸菌以外の菌種によってもさまざまです。また、遺伝子の数も数百から数千とかなりのひらきがあります。

15年ほど前から、真核生物に共通な16SリボソームRNA(16S rRNA)の遺伝子配列を使って微生物を分類する方法がさかんになり、そのデータが蓄積されてきました。そのデータをもとにすると、地球上の生物は3つのドメインに大別することができます(図2)。細菌(Bacteria)と古細菌(Archaea)、真核生物(Eukaryotes)です。この真核生物のなかに、原虫、カビ、動物、植物が分類されます。この16S rRNA(真核生物は18SリボソームRNA)の配列情報をもとに作成した系統樹を使うと、細菌性の病原体をほぼ同定することができま

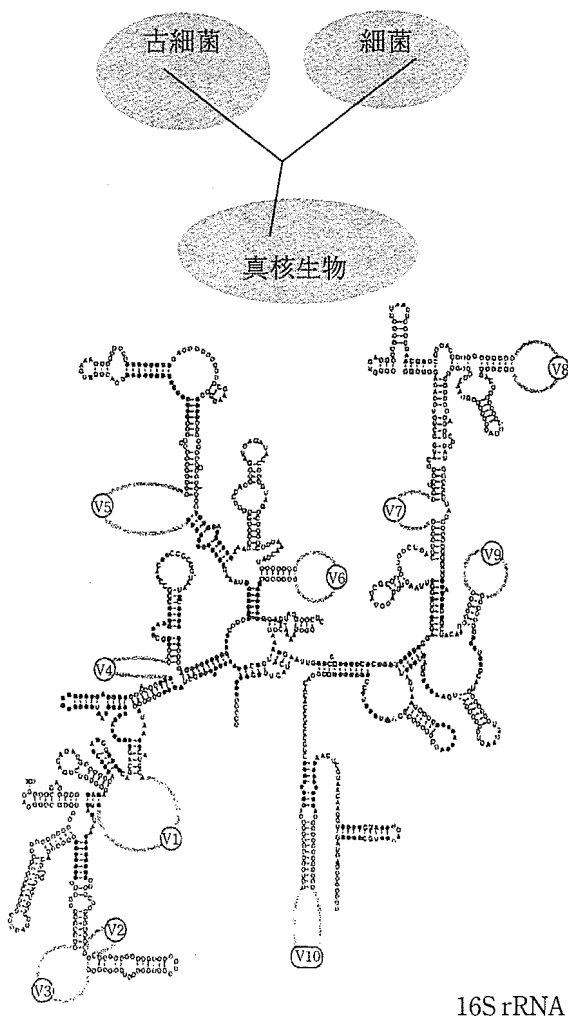


図2 生物のリボソームによる系統分類 図中のVは配列が菌種によって異なる

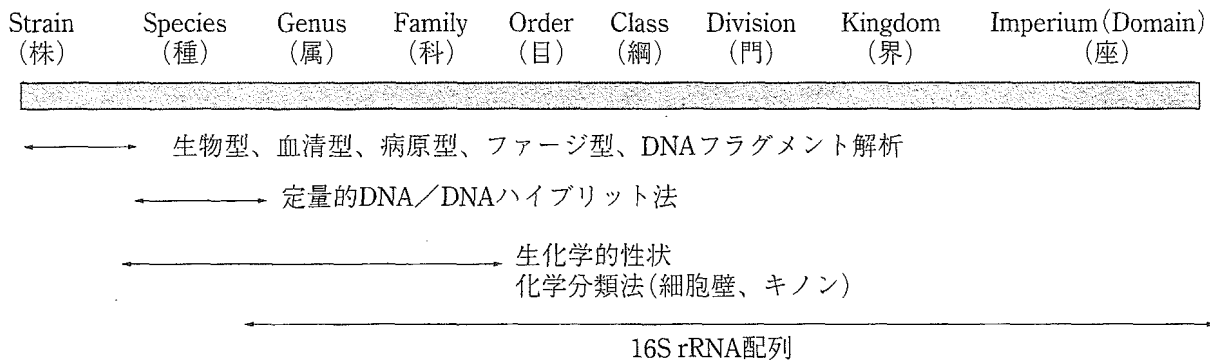


図3 分類階級と使用される指標

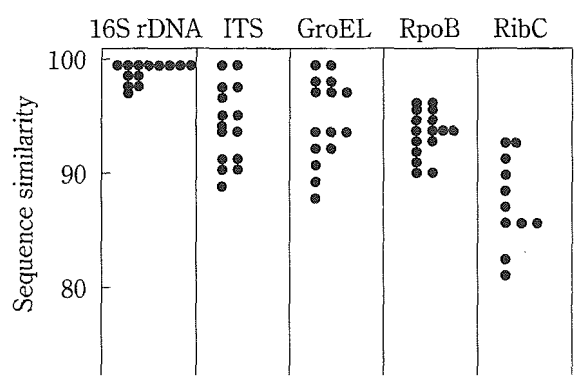


図4 Bartonella 属菌種の遺伝子の多形

表1 菌種の定義の変遷

<ul style="list-style-type: none"> ・ 少ない生化学的性状で病原菌を同定し分類した ・ 血清型による分類： 連鎖球菌、サルモネラ ・ 数値分類： 多数の性状を調べて分類同定 ・ 化学分類： 安定な細胞壁、Quinone、GC %、脂質 ・ リボソーム配列と DNA / DNA ハイブリッド法
--

す。
微生物の分類は、分類段階によって使う情報が異なりますが、現在、16S rRNA 配列で微生物の高次分類から菌種に近いところまで分類するシステムが確立しています(図3)。そして、この15年間の研究の過程で、この方法論の利点と欠点も明らかになっています。図4は、Bartonella 属の菌種の16S rRNA 配列を比較したのですが、ほとんどが同じ配列となります。つまり、16S rRNA 配列では、Bartonella 属の菌種を識別することはできません。この16S rRNA にかわるものとして、23S リボソーム RNA の配列と、タンパク質、RNA ポリメラーゼなどが候補にあがってきています。他の遺伝子配列をみると16S rRNA より配列に多様性があることから、識別能力があります。GroEL でも同じです。

病原細菌の同定法

これまでに、菌種の定義が変遷してきました(表1)。現在では、種の同定にリボソーム

配列と DNA / DNA ハイブリッド法を使っています。この定義に基づいて病原細菌を同定する場合、16S rRNA だけでは無理で、さらに細かい候補遺伝子、特に病原菌の場合は病原性因子、毒素をつくるかつからないか、組織に侵入するかしないかなどを検出のターゲットにして検出系を組むようにします。私たちが目標としているのは、患者さんが来院して検体を採取して、あるいは入院患者さんから朝の検査で検体を採取して、その結果を次の日、理想をいえば2~4時間でだせるようなシステムを開発することです(図5)。そのためは、遺伝子を抽出し、その遺伝子を特異的にふやす方法が必要になります。

図5に示す方法であれば、臨床材料から病原体の遺伝子を抽出して遺伝子を増幅するまでに約1時間です。抽出作業に約30分、もっとも早い遺伝子の増幅方法だと、1個の遺伝子を100万個までふやすのに10~15分ですみます。そして、病原体を決める際に、約1,000種の病原体すべてを対象とすることは物理的

に不可能であることから、病原性の強いものは遺伝子増幅方法でいっきに確定し、病原性の弱いものは属レベル、ファミリーレベルで捕まえるようにして、遺伝子を増幅する試薬の種類を極力減らす工夫をしています。

ここで遺伝子をグループで増幅する方法を使った場合、識別が必要となりますが、それにはDNAチップを使います。DNAチップには病原体のリボソームの配列と病原因子を固定します。それと1時間ほどグリッドをつくらせ、レーザースキャナーでみたり、蛍光顕微鏡、CCDカメラで捕まえる方法を使っています。

DNA増幅キットの開発

喀痰の病原体を調べるとき、普通は、細菌とカビを対象にしますが、ウイルスの場合はRNAウイルスとDNAウイルスが混在しているため、抽出方法、増幅方法がかわります。ここにいろいろな病原体があり、この数をみると20いくつかしははいっていませんが、ここに遺伝子を増幅するための試薬セットが16個ははいっています。ただし、病原体には900菌種もあるため、これではすべてを増幅できないのではないかと考えるかもしれませんが、ひとつの属の菌種をまとめて増幅するような試薬をいれています。たとえば、Chlamydiaのプライマーはクラミジア属の菌なら何でも増

幅することができます。さらに、ひとつのなかに何種類かの遺伝子増幅試薬をいれることで、ウエル数を減らします。このなかには3種類ほどの試薬がはいっていますが、これを増幅した後、電気泳動にかけると増幅したDNAフラグメントの違いがでて、その長さを測定することで、どの病原体の遺伝子が増幅したかがわかります。

ただし、このようなグループプライマーで増幅したものは、さらにマイクロアレイなどを使って細かな種の識別をするようにします。

下痢でも同じようなことがいえます。その場合、呼吸器疾患とは違って16S rRNAをほとんど使わず、病原因子を使って検出します(図6)。

病原体遺伝子の抽出法

ほとんどの細菌検査室では、検査費削減のために遺伝子の増幅機を使い、電気泳動で得たフラグメントで識別しています。費用に少し余裕がある施設では、フラグメントをさらに細かくDNAチップで読みとったり、さらに余裕のある施設ではリアルタイムで増幅をモニタリングして病原体数を測定しています。

このような方法でもっとも重要な点は、病原体の遺伝子の抽出法です。細菌の場合、グラム陽性菌とグラム陰性菌でDNAの壊れ方が違います。芽胞をもつ菌は壊れにくいので、

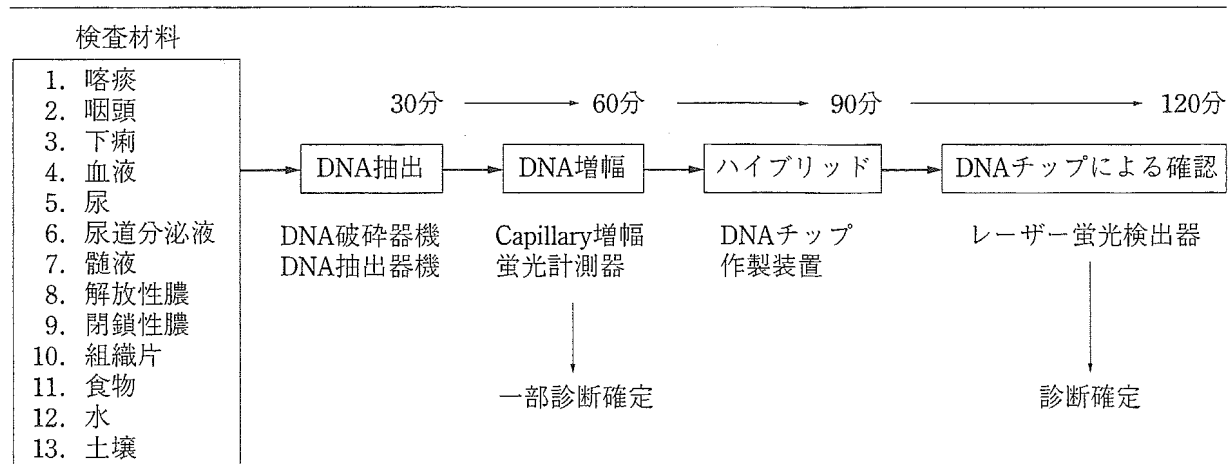


図5 迅速な遺伝子診断

下痢病原体

どの病原体も同じレベルで破碎しなければなりません。私たちはジリコニアビーズというガラスビーズより密度が2倍ほど高いビーズを使って、菌体を物理的に破碎しています(表2)。また、タングステンビーズはジリコニアビーズの約2倍の密度があるので、さらに強力な破碎ビーズになります。これを使うと、ほとんどの菌がほぼ100%に近い状態で壊れます。

ちなみに、タングステンビーズがもっとも破碎効率がよいのですが、純度の高いタングステンビーズの入手は容易ではありません。

純度のよいものは高価で、臨床の場ではなかなか使えません。現実的には、ジリコニアビーズを使って物理的に破碎してDNAを抽出しています。

尿道炎の病原菌の同定

しかし、検体によっては簡単な方法で病原体遺伝子の抽出が可能です。たとえば、尿道炎で性病科にきた患者さんの尿道分泌物を蒸留水に浸して3分間ほどポイルした液の一部を遺伝子増幅試薬に加えると、約15分後には、遺伝子が増幅したものをモニターすることができます(図7)。20~40サイクルで遺伝子が増幅するため、サンプリングしてから30分以内に答えがでます。そのため市中の医院でも使えると考えています。

実際の尿道炎では、病原体の種類は非常に

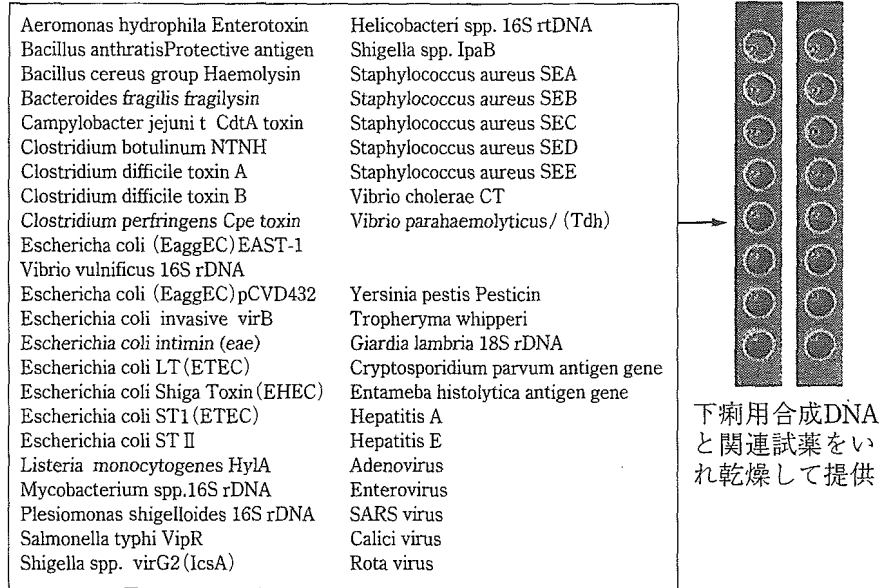


図6 多数の下痢病原体の遺伝子検査

表2 細菌を破壊する共通のプロトコール

	酵母菌 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	コメコウジカビ (<i>Aspergillus oryzae</i>)	枯草菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
ガラスビーズ	38 %	29 %	42 %
ジリコニアビーズ	88 %	66 %	81 %
タングステンビーズ	99 %	92 %	96 %

少ないため、15種類の病原体をふやす試薬セットをつくって、すべての性病の病原体をモニターする方法を開発しています(表3)。

すべての菌を増幅するようなプライマリーをつくって、まだ尿道炎を起こすことが学問的に確定されていない細菌の遺伝子を増幅し、それをさらにチップで解析することで、新たな尿道炎の病原体を同定する方法論を構築しています。

ただし、ひとつのウエルのなかに何種類もの試薬をいれているので、遺伝子が増幅したことがモニタリングでわかっても、電気泳動でそのサイズを調べる必要があります。たとえば、図8の場合、340塩基のDNAフラグメントがふえただけでは、どの細菌の遺伝子が増幅したのかはわかりません。これをマイクロアレイと反応させて細かく識別するように

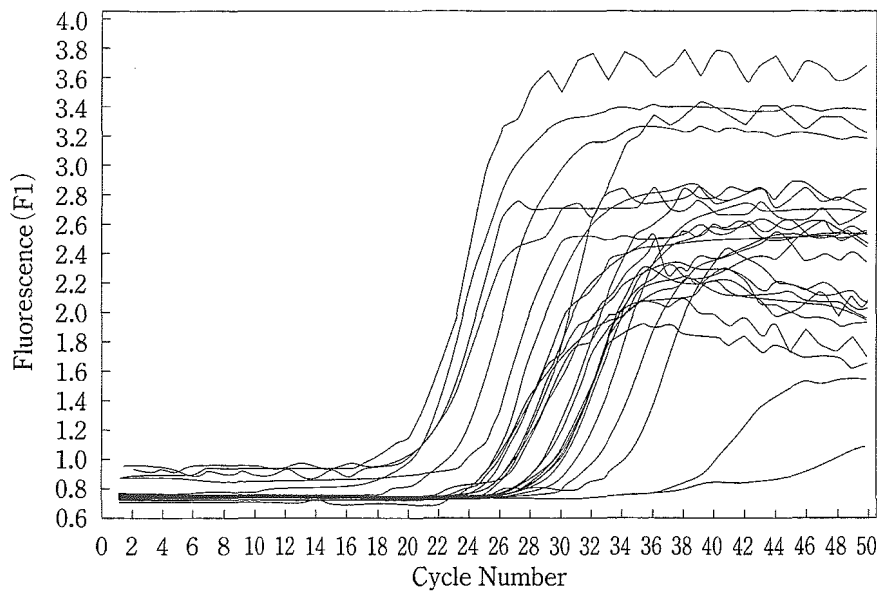


図7 尿道炎の Real Time PCR

表3 尿道炎を起こす病原体の遺伝子検査法の標的遺伝子

病原体	遺伝子
1. <i>Bacteroides ureolyticum</i>	16S rDNA
2. <i>Chlamydia trachomatis</i>	MOMP
3. <i>Haemophilus ducreyi</i>	16S rDNA
4. <i>Haemophilus influenzae</i>	16S rDNA
5. <i>Mycoplasma fermentans</i>	IS like element
6. <i>Mycoplasma genitalium</i>	Adhesin antigen
7. <i>Mycoplasma hominis</i>	16S rDNA
8. <i>Mycoplasma pneumoniae / genitalium</i>	16S rDNA
9. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	16S rDNA
10. <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	16S rDNA
11. <i>Treponema pallidum</i>	47KDa gene
12. <i>Treponema pallidum</i>	16S rDNA
13. <i>Trycomonas vaginalis</i>	B-TUBULIN
14. <i>Ureaplasma ureolyticum</i>	16S rDNA
15. Herpes simplex I-II	DNA polymerase

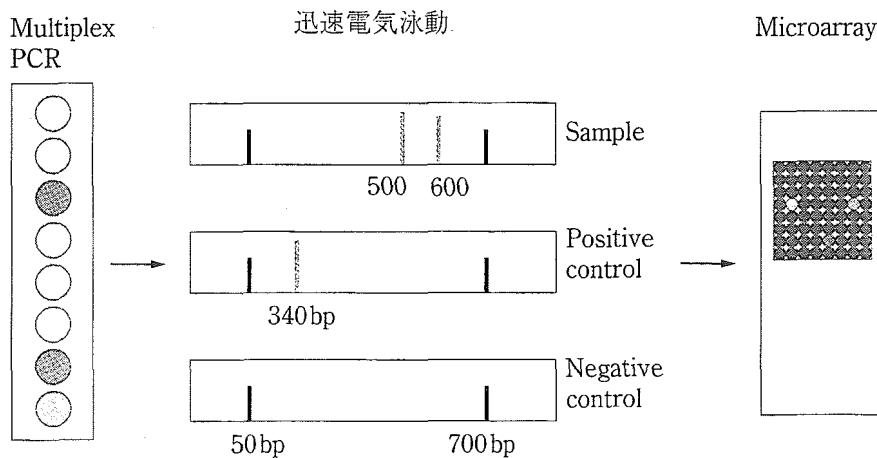


図8 遺伝子増幅と迅速電気泳動

します。

マイクロアレイは、ひとつの細菌の全ゲノムのマイクロアレイと違って、菌種に特異的な配列がはいっていて解析が楽です。図9の一番左は、*Mycobacterium* アレイの *M. bovis* で、同じスポットが3つ特異的に反応しています。ところが、右の *M. kansasii* や *M. goodii* は反応せず、16S rDNA の配列が非常に近いものはときどき識別が難しくなりますが、スポットの強さをみれば定量が簡単であることがわかんと思います。

さらに幅広く900種類ほどをマイクロアレイに固定したときのデータを図10に示します。性病を起こすクラミジアの場合、特異的に反応します。

図11は、白血球のなかの細菌の遺伝子を増幅してマイクロアレイと反応させたところ、*Ehrlichia sennetsu* のシグナルがでてきました。通常は培養できないため培養検査の対象にはなりません。ユニバーサルプライマーという、微生物を何でもふやす遺伝子増幅試薬を使うと、ときどき引

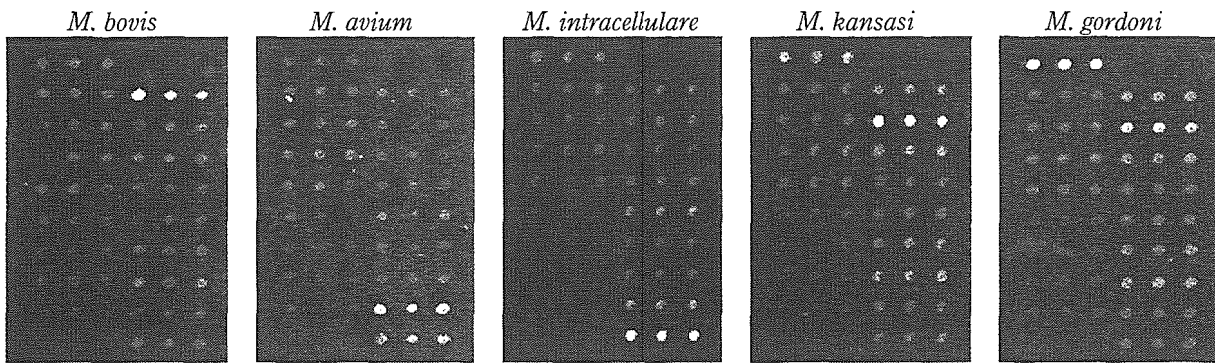


図9 Mycobacterium 属菌の DNA アレイ

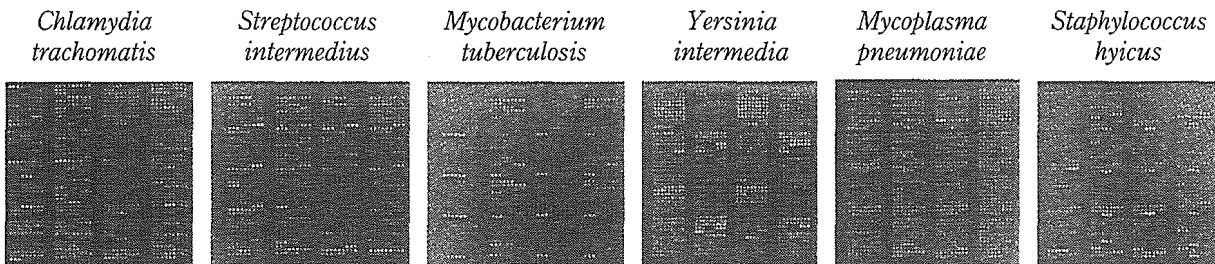


図10 リボソームを使ったマイクロアレイ (口絵カラー参照)

かかることがあります。

新しい システムの構築

もう一度振り返ってみます。菌体を破碎してDNAを抽出する操作、遺伝子をふやすための試薬セットを準備しリアルタイムで遺伝子が増幅するのをモニタリングする、増幅したものをマイクロアレイに反応させて、それをレーザースキャナーでスキャンする工程があります。おのおの工程で高価な機械を使います。たとえば、リアルタイムでモニタリングするような機械は高価ですし、レーザースキャナーも高価です。貧乏な細菌の検査室ではなかなか、このような装置を導入してもらえません。

そこで、私たちがもっとも力をいれているのは、もう少し安価で実用的なシステムを開発することです。私どもは、縦横8mm角のファイバに約100種類の遺伝子をのせるように

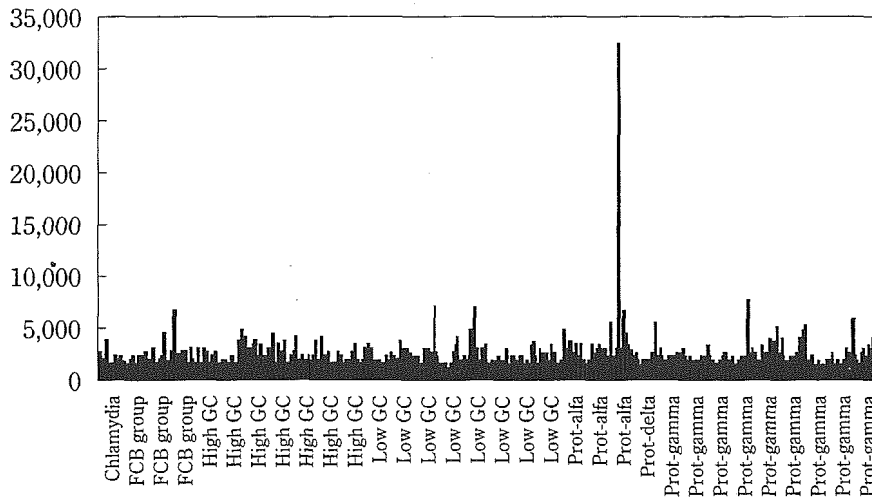


図11 白血球中の *Ehrlichia sennetsu*

しています(図12)。中空ファイバのなかにDNAを埋めこんで、それを100本なら100本のファイバを束ねた後、金太郎飴のように切断して、そのひとつをDNAチップとして使うようにします。シリコンアレイとしては3mm角のものを使っています。

図13は、実際にファイバアレイでだしたデータで、下痢の病原体です。これがそのときの実際の画像です。同じものを2つのせてあります。

この方法で、赤痢菌の virG やエロモナスと

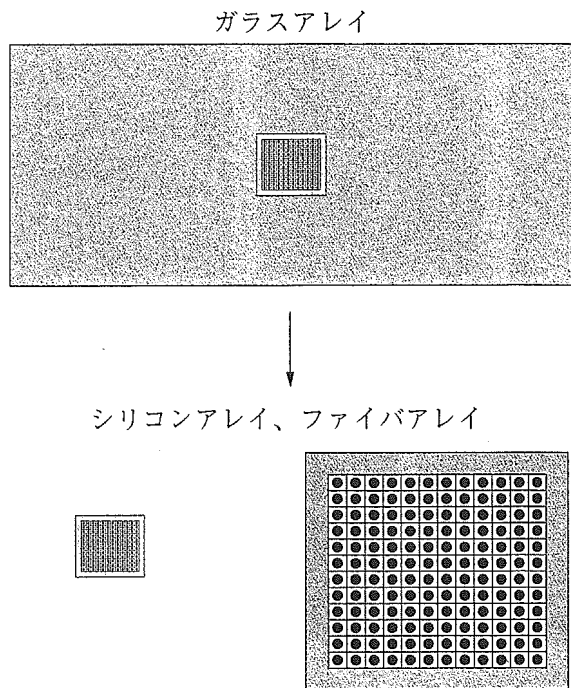


図12 迅速で安価なマイクロアレイ

いう下痢を起こす病原体も、簡単に識別することができます。リボソームRNAではときどき類似した配列をもっている菌のシグナルがでてきますが、それも簡単に識別することができます。

マイクロアレイというと、たくさんのシグナルを定量する技術がたいへんですが、この場合、簡単に定量することができます。

常在菌を固定したマイクロアレイの利用

これを進めて、環境中の微生物を網羅的に調べるマイクロアレイを開発しています。環境中の微生物として5,000種ほどが記載されていますが、実際には数百万菌種はいると推定されています。それらを解析するには、網羅的に既知の微生物の遺伝子を固定したマイクロアレイを作製してスクリーニングするシステムが不可欠です。私たちはこれを土壌や健康者の糞便内の菌のモニタリングに使っており、現在データを蓄積しています。健康なときと病気になったとき、菌相の変化をマイクロアレイで網羅的に調べることが、これからの目標になっています。

Plesiomonas shigelloides (primer : for *Plesiomonas shigelloides* 16S rDNA)

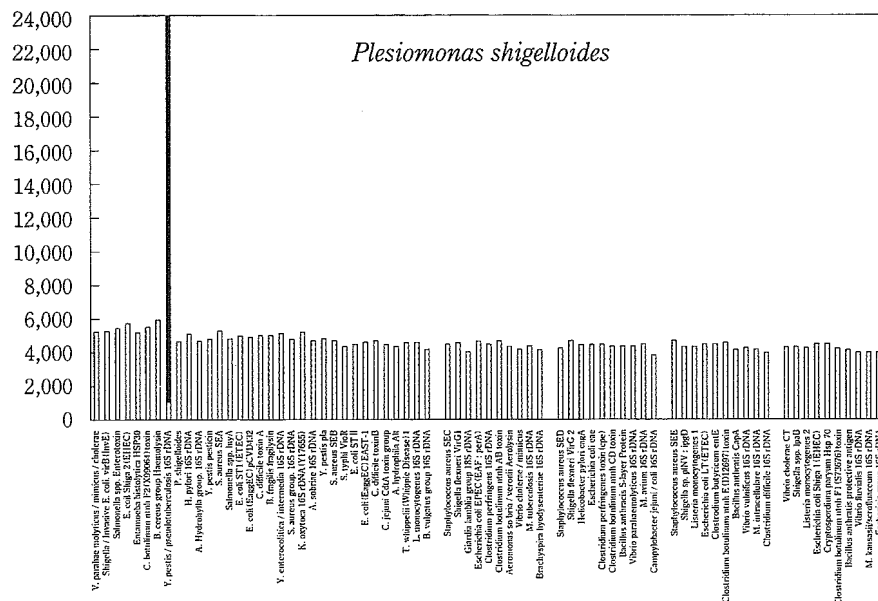
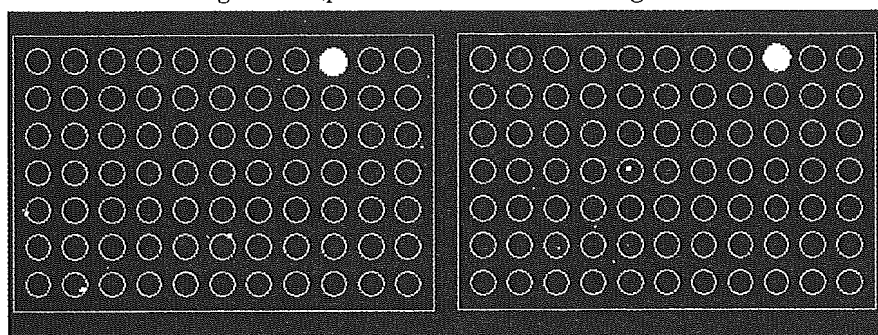


図13 ファイバアレイで識別した下痢の病原体

参考文献

- 1) 江崎孝行：Realtime PCRと系統アレイを用いた微生物相の網羅的解析方法、バイオインフォマティクスがわかる、105-111 (羊土社、2003)
- 2) 中原一彦、江崎孝行、奈良部雄：遺伝子・染色体検査ガイドブック (日本臨床衛生検査技師会、2003)

- 3) 江崎孝行：病原細菌の遺伝子解析、ウイルス・細菌と感染症がわかる、28-35 (羊土社、2003)
4) 江崎孝行：遺伝子診断とDNAチップ、新医療5、

- 143-144、2003
5) 江崎孝行：ゲノム情報を利用した感染症診断、ゲノム医学 Vol.3、111-118 (メヂカルレビュー社)

Q & A

■ Q ■

薬剤感受性にゲノムを使った診断について、薬剤感受性のデータが得られませんがどうしていますか。

● A ●

感受性の情報をすべてゲノムの情報だけで予測することはできないので、当分の間、培養検査は生き残ると思います。診断で使っているDNAチップは、病原菌の場合はほとんどがオリゴを使っています。すべてオリゴにしたいのですが、環境中にはフローラの解析が未知の菌がたくさんいるため、それを捕まえるためにcDNAも使っています。

■ Q ■

高額な医療費を抑えることが可能となれば、患者にしてみれば喜ばしいものの、それで利益が下がれば新しい研究ができなくなります。そのバランスはどうしていますか。

● A ●

今後、定額医療が定着すると、いかに薬を少なく使って、早く患者さんを治療するかが、医療上、重要になります。その意味では貢献できると考えています。

■ Q ■

ユニバーサルプライマーを使うと、メジャーなものだけしか捕まらないのではないのでしょうか。

● A ●

実際、糞便などでユニバーサルプライマーを使うと、うまくいって糞便全体の0.1%ほどまでのフローラしか捕まえられません。ユニバーサルスペシフィックグループプライマーを組合わせて、フローラの解析に使っています。

■ Q ■

シリコンアレイやファイバアレイの検出法はどうするのですか。

● A ●

ガラスアレイの場合、レーザーキャナーを使います。シリコンアレイとファイバアレイの場合、CCDカメラを使うか、一番安く使える蛍光顕微鏡での観察を考えています。

■ Q ■

DNAチップを、電気泳動する前に用いれば早くなると思いますが、できない理由は何ですか。

● A ●

リアルタイムでモニタリングできるところは、そのまま

DNAチップを使います。リアルタイムの機械をもっていない施設は、電気泳動をして、そのフラグメントをみてからチップにあてるようにしています。

■ Q ■

ゲノム解析によって、種をあらためてわけるとか、一緒にするようなことはないのでしょうか。

● A ●

現在、全染色体の遺伝子の30%以内の多様性であれば、その株の集団は、ひとつの種と定義されています。それにかわるような定義はまだできていません。現在、5~10個のハウスキーピング遺伝子を数個選んで、その多様性を比べることで種を決める動きがでてきています。5個でよいのか10個でよいのか、まだコンセンサスが得られていません。ただし、ゲノムの情報が蓄積されれば、種を決める新しい概念ができると思います。16S rRNA データが蓄積して種の系統の概念ができあがるのに15年ほどの年月がかかりました。これからさらに蓄積していけば、10年後、20年後には新しい種の概念ができるかもしれません。

診 断

細菌の迅速診断システム

江崎 孝行 大楠 清文

Rapid diagnostic system of bacterial infection

Takayuki Ezaki, Kiyofumi Ohkusu

Department of Microbiology, Gifu University, Graduate School of Medicine

Abstract

Approach to develop genetic detection system for bacterial infection in blood is a demanding subject because number of bacteria in blood stream is very few and in most cases the number of bacteria is less than the detection limit of gene amplification methods. At the first stage of blood sampling, we only applied gene amplification method against fastidious organisms to culture and organisms causes severe infection. Organisms which are usually found very few in blood are subjected to blood culture. After monitoring system of blood culture gave positive signal of bacterial growth, DNA or RNA in culture media were extracted and amplified with universal primers for bacteria and fungi.

Amplicons were applied to a rapid sequencer. However, in case of mixed infection, the sequencing is not successful. In such cases, the amplicons are analyzed with DNA microarray, immobilized 16S rDNA and 28S rDNA of 1,000 human pathogenic bacteria and fungi.

Key words: bacterial infection, microarray, sepsis, bacteremia, molecular diagnosis, blood culture

はじめに

菌血症や敗血症を疑う診察指標が出揃っても、通常、病原体の抗体検査を行うためには、抗体が上昇するまでの日数が必要で、疾病を絞り込むための更なる診察情報が必要になる。手がかりのない感染初期の状況では、血液培養が唯一の感染症の病原体を特定する積極的な検査法になる。感染症を疑って培養を行っても現状では血液培養が陽性になる確率は2-3割で、臨床医の診断治療に役に立つ情報を提供できるケース

は少ない。このことは血液培養に期待する臨床医の意欲を低下させる原因にもなっている。この培養陰性の背景には発熱の原因が感染症以外にある場合も含まれているが、感染症であった場合も、ウイルス、培養困難な細菌、抗生物質治療後の検査などが隠されている。血液培養の培地は頻度の高い一般細菌の検査に照準を合わせて作成されており、培養困難な細菌で頻度が少ない病原体検査は特別な場合を除いて、忘れ去られてきた。

そこで遺伝子検査が現在の血液培養に全部か

わり得るのか、かわることができなければどの部分の欠点を補うことができるかといった視点で、検査の指針を記載する。

I. 発熱時の血液中の細菌数

ウイルスと異なり、細菌による菌血症や敗血症を起こし、発熱を起こした患者の血液には1ml当たり数個から数百個の病原体がいる。小児の場合は例外的に数千個まで菌が入り込んでも救命できることがあるが、成人の場合は1ml当たり数百個の病原体が血液に入り込むと敗血症性のショックを引き起こし、救命は難しいとされている。したがって多くの場合は、PCR法など遺伝子増幅方法の検出限界以下の菌数しかないため、遺伝子検査の利用には制限がある。

II. 血液培養法の限界

通常、特別な指示のない血液培養では、2種類の血液培養培地に血液を入れ、walk awayなどの自動検出装置の培養陽性シグナルまで37℃の培養を継続する。シグナルが出ると培養のために血液平板に接種し、更に1-2日培養が継続される。血液培養は以前は数週間の培養を試みていたが、最近では効率の問題から5日以内で培養をやめるのが一般的になっている。

このような血液培養の手順では、細菌やカビの検査でも、クラミジア、リケッチア、バルトネラなどの細胞内寄生性の病原体の検査はできない。日和見感染を起こす一般細菌でも30℃以下に最適な発育領域をもつ菌群は37℃の培養では発育が極めて遅く、培養ボトル、および平板の37℃培養の検査では検出できない。しかし、効率を求められる検査で培養日数の延長、多種類増菌培地の使用、培養温度を複数選択するといった対応は不可能である。

III. 血液の病原体遺伝子検査の限界

PCRなどの遺伝子検査では、血液中の細菌を検出できるのは通常は100個以上である。ところが、敗血症に至らなくても、血液に菌が入り、発熱がある時点での菌数の多くは数個から数十個であり、ほとんどのケースでは菌数は遺伝子

検出方法の限界以下である。

ウイルスによる感染症が顕正化した場合、血中のウイルス量は遺伝子増幅法で十分検出できる程度まで増加するが、細菌感染症の場合、通常は数十個/ml程度でPCR法の検出限界以下の菌数のことが多い。数百個/mlに達した場合は重症で敗血症性ショックに陥る場合が多いとされている。

血液培養では通常4-5mlを培養に使用するため、1mlに数個の菌数でも血液培養用に採血した4-5mlには10個以上の菌培養がいることになり、培養では陽性になる。ところが遺伝子検査でこのレベルの菌数を検出することはできない。血液1ml全量を検査に使用しても、検出感度に到達できないばかりか、1ml血液全部を遺伝子検査に利用しようとしても、白血球やリンパ球のDNAが多すぎて遺伝子増幅の障害になり、抽出したDNA全部を病原体検査に使用することができない。全血を利用した場合、このような理論上の限界に突き当たってしまう。

IV. 病原体の遺伝子検査が活躍できる検査領域

定額医療が推進され、感染症治療にかかるコストの削減が求められているが、現在の検査にかかっているコストを削減したり、細菌検査をやめてしまう対応をするのは、検査の未来に希望がもてない悲しい選択である。

新しい時代では、病原体を絞り込み、有効な抗生物質を短期間使用し、患者を早く退院させる治療が病院の収益につながるようになる。病原体が特定できず、治療を開始し、結果として耐性菌や菌交代症を引き起こしてしまうと、入院が長引き、病院にとっては大きな損失になる。そこで細菌、カビ、原虫、ウイルス病原体を同時に検査し、迅速化を図る試みが多く発表されるようになってきている¹⁻³⁾。

一方、菌数が少ない発熱では敗血症性ショックに至るまでは時間がかかると予測されるので、検出感度以下の遺伝子検査を実施しても検査の効率は悪い。この部分は従来の血液培養法に譲り、著者らは培養ボトルの増殖シグナルが出始

表 1 採血時の遺伝子検査の対象となる病原体(ウイルスを除く)

<i>Bacteroides fragilis</i> group	16S rRNA	培養困難・不可
<i>Bartonella</i> group	16S rRNA	培養困難・不可
<i>Borrelia</i> group	16S rRNA	培養困難・不可
<i>Brucella melitensis</i>	16S rRNA	培養困難・不可
<i>Campylobacter</i> spp.	16S rRNA	培養困難・不可
<i>Chlamydia/Chlamydophila</i> spp.	16S rRNA	培養困難・不可
<i>Coxiella burnetii</i>	16S rRNA	培養困難・不可
<i>Leishmania</i> spp.	18S rRNA	培養困難・不可
<i>Leptospira interrogans</i> group	16S rRNA	培養困難・不可
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> group	16S rRNA	培養困難・不可
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Virulent gene	培養困難・不可
<i>Plasmodium</i> spp.	18S rRNA	培養困難・不可
<i>Rickettsia/Ehrlichia</i> spp.	16S rRNA	培養困難・不可
<i>Treponema pallidum</i>	16S rRNA	培養困難・不可
<i>Trypanosoma</i> spp.	18S rRNA	培養困難・不可
<i>Haemophilus influenzae</i>	16S rRNA	迅速対応必要
<i>Listeria monocytogenes</i>	16S rRNA	迅速対応必要
<i>Neisseria meningitidis</i>	16S rRNA	迅速対応必要
<i>Salmonella typhi</i> <i>vi</i> p R	Virulent gene	迅速対応必要
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	MecA	迅速対応必要
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumolysin	迅速対応必要
<i>Vibrio vulnificus</i>	16S rRNA	迅速対応必要
<i>Enterobacteriaceae</i> major	16S rRNA	
<i>Enterococcus</i> spp.	16S rRNA	
<i>Mycobacterium</i> spp.	16S rRNA	
<i>Streptococcus</i> spp.	16S rRNA	
Fungal universal	18S rRNA	カビ一般*
Bacteria universal	16S rRNA	細菌一般*

* Microarray もしくは配列決定を行い菌種の詳細な同定が必要。

める8時間から翌日に迅速遺伝子診断法を実施することを目指している。シグナル陽性の血液培養液の遺伝子検査を実施すれば、平板培地で菌を増殖させ同定する方法に比べ1日から数日の間、検査期間が迅速化される。

したがって重篤なケース、および培養できない病原体に標的を絞り、遺伝子検査を採血時に行い、菌数が少ないが培養できる一般細菌のケースは血液培養ボトルの陽性シグナルが出た後に遺伝子の迅速検査を行う方法を選択している。

V. 採血時の遺伝子検査

ここで対象になるのはウイルス、細胞内寄生細菌、重篤な敗血症を起こす特定の細菌性病原体である。一般細菌やカビでも菌数が多ければ

検査に引っかかってくるので、細菌とカビの universal primer も併用する(表1)。

血液は細胞内寄生細菌、ウイルスも標的にするため全血を対象とする。著者らは血液2mlからDNAを回収する方法を作成し使用している。血清中のウイルスは200 μ lから抽出する方法を使用しているが、血清中の細菌のみを対象とする場合は、超遠心がいらず、卓上の微量遠心機で処理ができるので2-4mlの血清を出発点にした検査もできる。

著者らは16個のwellに1-2種類の primer を入れて28グループの細菌、カビ原虫を増幅する primer set を作成し、病原体を screening する系を作成している。この方法では primer をあらかじめ tube に入れて乾燥しておき、使用