

表2 16 well で従来型の増幅法を使用する場合の試薬量

10×Taq buffer	36 μ l
10×DXPT	36 μ l
DNA 液	50 μ l
Hot start Ex Taq	1 μ l (5 U/l)
DH2O で total 360 μ l に調整し、各 20 μ l を tube に分注する。	

表3 血液培養から検出する細菌および菌類の primer

細菌 16S rDNA 配列増幅用 primer (増幅産物 約 510 塩基)
forward: 5-AGAGTTTGATCRTCRTGGCTAAG-3
reverse: 5-GTATTACCGCGGCGYCTG-3
糸状菌 18S rDNA 用 primer (増幅産物 約 362 塩基)
forward: 5-GAAACTCACCAGGTCCAG-3
reverse: 5-ATTCCTCGTTGAAGAGCA-3
*この領域の菌種の識別能力は 28S rDNA より低い。
糸状菌 28S rDNA 用 primer (増幅産物 約 635 塩基)
forward: 5-AAGCATATCAATAAGCGGAGG-3
reverse: 5-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3

時に酵素と DNA を各 well に 20 μ l (表2) 入れ、Realtime PCR もしくは従来型の PCR を行う方法を採用している。RNA ウイルスの場合、最初に逆転写反応を行ってから、各 tube に試薬を分注し PCR で増幅する方法をとっている。

tube は 16 あるが液量を 20 μ l で行うので単独で行う場合の 4 本に相当する量に匹敵する。

VI. 血液培養ボトルの遺伝子検査

培養を開始し、walk away など血液培養監視システムを導入している場合、8-24 時間で多くの場合、菌の増殖シグナルが出る。この時点で従来は血液平板培地に培養液を塗り、更に数日培養をしてきた。菌の増殖シグナルのシグナルが出た時点で培養ボトルを 2 ml 取り、遺伝子検査を行う。この場合、増幅に使用する primer はカビと細菌の universal primer だけで対応できる。2 種類以上の細菌やカビの遺伝子が増幅した場合は困難であるが、単独の場合、増幅産物を迅速にシーケンスにもっていけば数時間で配列がわかるので、その結果をデータベースと比較すれば菌種が特定できるため現在ではこの方法が最も確実である。

同定レベルでは 16S rDNA 配列の 500 塩基程度の情報で十分であるので、著者らは表3に示す primer で増幅し、配列を決定している。カビの場合データベースが不十分であるが、ヒトに病気を起こすカビに限定してデータを比較すれば特定ができる。18S rDNA, 18S rDNA と 23S rDNA の spacer, あるいは 28S rDNA の D1/D2 領域が使われている。

著者らは ABI の Capillary Sequencer を使い、ショートカラムを使用することで機械にサンプルをシーケンサーにロード後、1 時間以内に配列が出るようにしている。この方法の 1 回当たりのシーケンス試薬は 200 円程度で済むため、安価であり、検査室でシーケンスを決定し菌種を自動同定できるようになる日も近いと期待している。細菌の場合は病原体のほとんどの配列の解析が終わっており、同定が容易である。ただし一部の病原菌群ではリボソーム配列が 100% 同じでも同定できない場合もある。

カビの場合データベースが不十分であるがヒトに病気を起こすカビに限定してデータを比較すれば特定ができる。18S rDNA, 18S rDNA と 23S rDNA の spacer, あるいは 28S rDNA の D1/D2 領域が使われている。

著者らは患者から分離された材料に限って、従来法で同定できない病原体をシーケンスで同定するサービスを行っているが、ここ 1-2 年で検査技師から依頼されたケースで未分類の新しい菌種が次々と見つかっている。

ところが白血病の治療中の患者、癌の末期の患者の血咳からは複数の菌種が分離されることがしばしばある。このような場合は直接シーケンス法は無力で、チップのような特異プローブを固定した同定方法が威力を発揮する。著者らは 1,000 種類の病原細菌のマイクロアレイを作成し、universal primer でしか増えなかったケースでシーケンスができない場合に利用している^{4,5)}。しかし検査の現場では遺伝子増幅器機すら設置されていないところが多く、高価な

アレイの解析装置を現段階で準備するのは困難であろう。

解析が自動化され機器を容易に使えるようにならないければ、一般に受け入れられる検査にはならない。著者らもマイクロアレイの実用化を目指した様々な取り組みを行っているが、臨床検査に導入するにはまだまだ多くの改善が必要だと考えている。

VII. 薬剤耐性情報の取得

薬剤耐性に関する遺伝子情報は数多く蓄積されてきているが、現在の段階では培養せずに感受性を予測するまでには至っていない。著者らは検出レベルでの耐性遺伝子情報はほとんど使用しておらず、MRSA 株の検出、*Enterococcus* 属の vancomycin 耐性程度である。primer の種類が多種類あり、耐性遺伝子を検出の段階で使

用するためには標的の病原体を絞り込まなければ実用的な方法にはならない。誘導型の耐性、調節遺伝子の耐性など耐性機構は多彩で、耐性遺伝子の有無だけで感受性を 100% 予測するのは困難である。感染した菌種を特定した時点で、耐性遺伝子を迅速に解析するのが現実的である。既に耐性遺伝子の検出やプローブも多く記載されているが、著者らは耐性遺伝子に関しては配列を迅速決定し、配列情報から耐性を推測する方向でデータベースを蓄積している。

ゲノム解析が進んでいることから、薬剤耐性をチップ上で推測する時代がいずれ来ると予測されるが、現在の段階はまだデータの蓄積を行う時代と考えている。

個々の遺伝子の検出と利用法については、既に多くの出版物があり、専門家の記載に委ねたい。

■ 文 献

- 1) Templeton KE, et al: Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza virus, 1, 2, 3, 4. *J Clin Microbiol* 42: 1564-1569, 2004.
- 2) Corless CE, et al: Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 39: 1553-1558, 2001.
- 3) Verweij JJ, et al: Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex Realtime-PCR. *J Clin Microbiol* 42: 1220-1223, 2004.
- 4) 江崎孝行: 感染症に対する検査法の進歩: 遺伝学的検査法. *日本臨牀* 61(増刊号 3), p373-380, 2003.
- 5) 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*, p105-111, 羊土社, 2003.

呼吸器感染症の網羅的診断に向けて

江崎孝行* Ying Li* 大楠清文* 河村好章*

はじめに

一呼吸器感染症検査の現状と問題点一

呼吸器感染症の病原体の検査を細菌・菌類感染症、ウイルス感染症の二つに分けて考えると、細菌感染症では一般的な培養検査が中心であるが、ルーチン検査では喀痰の一般細菌検出がおこなわれているところが多い。ところがこの検査では、常在菌が混入することと、培養できる菌が限られていることから、表①に示した一部の病原体の検査にしか有効性がない。一方、結核菌やマイコプラズマのような特殊な菌種の検査は、医師の指示があって初めて検査対象になり、検査培地が使用されるといった運用上の欠点がある。

したがって、血液培地、チョコレート培地を使用して検査できるのは *Streptococcus*, *Haemophilus* のような一部の菌が対象になるだけで、1,000 種を越す日和見病原体および特殊病原体はルーチン検査の対象にはならない。

喀痰検査の場合、もう一つ大きな課題を抱えている。喀出痰を肺炎の検査材料として提出している医師が多く、喀出痰には口腔内常在菌が多数混入しているため、下気道の菌層を反映した材料ではない。気管支採痰あるいは肺を直接穿刺した材料が提出されることは少なく、原因菌の決定が難しい。

ウイルス疾患に至っては、分離培養をおこなっている検査室は皆無に近いので、抗原検査キット、遺伝子検査がキットとして市販されている Influenza

virus, Adenovirus RS virus など一部にすぎない。

表① ルーチン検査の対象菌および非対象菌

代表的ルーチン検査対象 <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Branhamella catarrhalis</i>	人工培地培養不能/困難菌 <i>Chlamydomphila/Chlamydia</i> spp. <i>Orientia tsutsugamushi</i> <i>Neorickettsia</i> spp. <i>Rickettsia</i> spp. <i>Bartonella</i> spp. <i>Coxiella</i> spp. <i>Hisoplasma capsulatum</i> <i>Anaplasma</i> spp.
特殊検査対象菌 <i>Bordetella pertussis</i> <i>Prevotella</i> spp. <i>Bacillus anthracis</i> <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Anaerococcus</i> spp. <i>Peptinophilus</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Treponema</i> spp. <i>Burkholderia</i> spp. <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Yersinia pestis</i> <i>Legionella</i> spp. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Mucor</i> spp.	

(筆者作成)

*EZAKI Takayuki, Ying Li, OHKUSU Kiyofumi, KAWAMURA Yoshiaki/岐阜大学大学院医学研究科病原体制御分野

表② 網羅的増幅プライマーの対象菌

Tube 場所	Organism	Gene
Tube1	<i>Neisseria meningitidis</i>	16S rRNA
Tube1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	StreptolysinO
Tube2	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	16S rRNA
Tube2	<i>Rickettsia</i> spp.	16S rRNA.
Tube3	<i>Branhamella catarrhalis</i>	16S rRNA
Tube3	<i>Chlamydomydia/Chlamydia</i> spp.	16S rRNA
Tube4	<i>Legionella</i> group	16S rRNA
Tube4	<i>Pneumocystis carini</i>	Specific Antigen
Tube5	<i>Coxiella burnetii</i>	Specific Antigen
Tube5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> group	16SrRNA
Tube6	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diphtheria Toxin
Tube6	<i>Mycobacterium</i> spp.	16S rRNA
Tube7	<i>Legionella pneumophila</i>	DnaJ
Tube7	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumopysin
Tube8	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	DnaJ
Tube8	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	16S rRNA
Tube9	<i>Bordetella pertussis toxin</i>	Pertussis toxin
Tube9	<i>Staphylococcus aureus</i>	MecA
Tube10	<i>Burkholderia cepacia</i>	16S rRNA
Tube10	<i>Staphylococcus aureus</i>	TSST-1
Tube11	<i>Enterobacteriaceae</i>	16S rRNA
Tube11	<i>Haemophilus influenzae</i>	16S rRNA
Tube12	<i>Aspergillus</i> group.	16S rRNA
Tube12	<i>Bartonella</i> group.	16S rRNA
Tube13	<i>Bacillus anthracis</i>	Protective Antigen
Tube13	<i>Yersinia pestis</i>	Virulence factor
Tube14	<i>Klebsiella pneumoniae</i> group	16S rRNA
Tube14	<i>Prevotella</i> group	16S rRNA
Tube15	Fungus universal	18S rRNA
Tube16	Bacterial universal	18S rRNA

(筆者作成)

1. 網羅的な検査法の提案

表①に示した気道感染を起こすすべての病原体検査を培養方法で実施するの不可能であるため、われわれは表①のすべての病原体の遺伝子を使った検査で網羅的に実施使用とすることを提案している。

表①のすべてに特異的なプライマーをデザインし

表③ Pathogen array に固定した病原体の系統と数

Actinobacteria	90
Mycobacteria	62
Streptococci	90
Stapylococci-clostridia	60
Anaerobic GNR	88
anaerobic ccoci/clostridia	92
Flavobacreia	90
Enterobacteriaceae	92
Legionella spp.	93
Pseudomonas Acinetobacter	78
Haemophilus-actinobacteria	60
Campylobacter-Spiral bacteria	72
Fungi	60
Total	1027

(筆者作成)

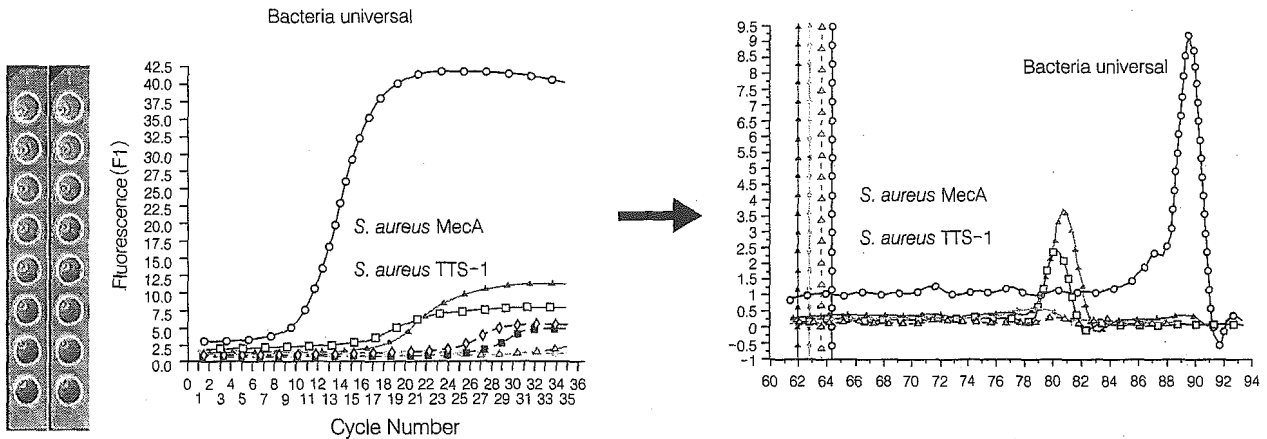
表④ 網羅的検査の対象とするウイルスのリスト

HHV1/2 simplex virus
HHV3 : Varicella-zoster virus
HHV6 : Human herpes virus 6 type A
HHV7 : Human herpes virus 7
HHV8 : Human herpes virus 8 (Caposi Sarcoma related)
Human Adenovirus all
Human Influenza A virus
Human Influenza B virus
Human parainfluenza virus
Human respiratory syncytical virus (RS virus)
Human Rhino virus
Human Cytomegalovirus
Foot-and-mouth disease virus
Measles virus
Mumps virus
Rubella virus
SARS virus
Vesicular stomatitis virus

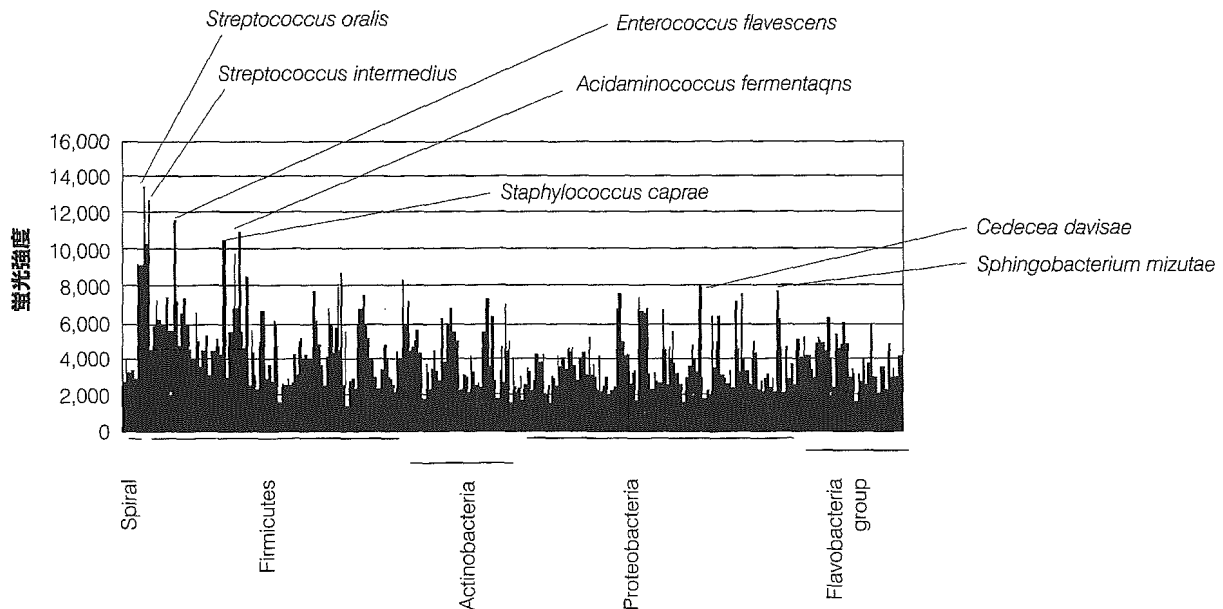
(筆者作成)

て検査をおこなうことは、研究室レベルでは可能であるが、実地現場では不可能に近いので、われわれは、病原体の遺伝子をいくつかのグループに分け、グループに属する菌種を共通のプライマーで増幅し、必要に応じてつぎのステップでマイクロアレイを使い、詳細な検査をおこなう方法の提案をおこなっている。

表②に示したように、16 well が連結した tube にプライマーを 1~2 種類入れ、頻度の高い重要な病原体はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法だけで検査が



図① 16 well を使った Realtime PCR と *Staphylococcus aureus* の増幅 signal (筆者作成)



図② 病原体アレイを使った咽頭の細菌叢 (筆者作成)

完結するようにし、日和見病原体や、リストにない菌種は universal プライマーの増幅産物を表③に示した病原体アレイで識別する方法を作成している。

ウイルスはまだ十分なデータを取得していないが、表④のリストにあるウイルスを対象に別途 16 well 単位で検査法を作成し、検査している。

咽頭炎の診断例 (図①)

咽頭炎の患者の咽頭材料を、16 well のプライマー set で増幅した。咽頭炎の患者の咽頭を綿棒で擦過

し、表②のプライマー set で増幅した。Realtime PCR を実施し、図①の結果を得た。Universal プライマーの増副産物と *Staphylococcus aureus* の TTS-1 と MecA 遺伝子が増幅され、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 株による咽頭炎と診断した。

健康者の咽頭菌叢のシグナルの計測例 (図②)

健康者の咽頭擦過材料を bacterial universal プライマーで増幅し、蛍光標識後、表③のリストに掲

載された病原体アレイで解析した。その結果、日和見病原体、口腔内常在菌の signal のなかに日和見病原体の signal が検出された。

健康者の咽頭擦過材料に *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* を混合し、 10^5 /smear まで両病原体の signal が検出できることが確認できた。

おわりに

16 Well で代表的な病原体をスクリーニングし、日和見病原体は Bacterial universal プライマーを使用し、病原体マクロアレイで解析する方法を紹介

した。

Universal プライマーで一般細菌に隠れている病原体は、現状では $10^4 \sim 10^5$ cfu/smear レベルの検出で、一般細菌の陰にひそんでいる病原体を universal プライマーで検出するには、まだ高感度な方法が要求されるかもしれない。

一方、この方法は日和見病原体による肺炎、咽頭炎をスクリーニングできる可能性をもっている。そのためには健常者のデータベースの蓄積が必要であり、データの蓄積がおこなわれれば、健常から異常に flora が変動すれば感知できるため、治療中の病態の把握に重要な情報を提供できると考えている。

第9章 DNAマイクロアレイを用いた 環境サンプル中の微生物群集の解析

江崎孝行*¹, 大楠清文*², 河村好章*³

環境中のサンプルの微生物を解析する際、細菌だけを取り上げても数百万種といわれる未知の生物をどのように捕捉して解析するかは難しい課題である。そのうち特定の微生物に限定した解析は現在では遺伝子を検出する手法を使えば比較的容易にできる。しかし採取した環境にどのような微生物が生息するかを予測できない場合、網羅的に解析する必要が出てくる。すべての系統の微生物を培養方法で解析することは実質的に不可能なので我々は、16S rDNA で系統分類が整理されてきた細菌を網羅的に検出するための方法の開発を行っている。まだ十分な環境の解析データが蓄積していないが汚染土壌の修復課程で修復前後の菌数の変動をモニターした例を使ってこの方法の利用方法を紹介する。

1 系統マイクロアレイの作成

細菌は分類学的には約6,000種が正式に記載されており、約30のphylaに分布している。しかし環境中には数百万の未分類の細菌が生息しているといわれており、その多くは通常の培養では培養困難なため、配列の記載だけに留まっている。しかし数万件登録におよぶ未分類の菌種の16S rDNA のデータを見ても、未分類の菌株の多くは既存の分類群のどこかに所属し、新しいphylumを形成する菌株はきわめて少ない。

そこで我々は既存の6,000種が所属する約950属の主な構成菌種の16Sr DNA配列を比較し、その属の菌種に比較的保存されている領域から40~50塩基長の配列を選択したoligoDNAを合成し

* Takayuki Ezaki 岐阜大学大学院 医学研究科 再生分子統御学講座 病原体制御学分野
教授

* Kiyofumi Ohkusu 岐阜大学大学院 医学研究科 再生分子統御学講座 病原体制御学分野
助手

* Yoshiaki Kawamura 岐阜大学大学院 医学研究科 再生分子統御学講座 病原体制御学分野
助教授

表1 アレイに固定した配列の系統と属の数

系統	Oligo DNAを作成した属の数	
1	<i>Archaea</i>	66
2	<i>Actinobacteria</i>	134
3	<i>Firmicutes</i>	190
4	<i>Chlamydia</i>	8
5	<i>Cyanobacteria</i>	39
6	<i>CFB group</i>	42
7	<i>Alfa Proteobacteria</i>	121
8	<i>Beta Proteobacteria</i>	57
9	<i>Gamma Proteobacteria</i>	119
10	<i>Delta proteobacteria</i>	49
11	<i>Epsilon proteobacteria</i>	12
12	<i>Spiral bacteria</i>	19
13	<i>Fusobacteria</i>	12
14	<i>Deferribacteria</i>	5
15	<i>Acidobacteria</i>	3
16	<i>Fibrobacter</i>	1
17	<i>Nitrospira</i>	2
18	<i>Nitrosomonad</i>	1
19	<i>Planctomyceta</i>	4
20	<i>Thermodesulfobacteria</i>	1
21	<i>Thermomicrobia</i>	1
22	<i>Verrucomicrobia</i>	2
23	<i>Aquifica</i>	5
24	<i>Thermotoga</i>	5
25	<i>Chlorobia</i>	4
26	<i>Deinococci</i>	3
27	<i>Chrysiogena</i>	1
28	<i>Chloroflexa</i>	5
29	<i>Dictyogloma</i>	1
Total		912

マイクロアレイに固定した (表1)¹⁾。

2 土壌のDNAの抽出

菌相の解析には様々な微生物のDNAを均等な条件で抽出する方法が必要になる。我々はこの目的のためにグラム陽性菌、菌類の細胞壁を破碎するために従来汎用されてきたガラスビーズを密度がガラスの2倍高い giriconia beads を使用して効率に破碎する方法を採用した¹⁾。土壌4gを36mlの50mM EDTA pH8.0に懸濁し、攪拌後、上澄み2mlをとり、微量の卓上遠心器12000gで5分間遠心した。上澄みを捨てた後1%SDS, 4Mのguanidiumが入った溶菌液200μlを加え、さらに1gの giriconia beads を加え Multibeads Shocker (安井機器, 大阪) で破碎した。

表2 土壌汚染が予測されるレベル3の病原体と検出遺伝子

菌名	遺伝子	増幅塩基 (bp)
<i>Bacillus anthracis</i> group	16S rDNA	329
<i>Bacillus anthracis</i>	Capsular gene:CapA	408
<i>Bacillus anthracis</i>	Protective antigen ;pag	390
<i>Bacillus anthracis</i>	S-layer	555
<i>Brucella melitensis</i>	16S rDNA	319
<i>Burkholderia mallei-pseudomallei</i>	16S rDNA	307
<i>Chlamydia /Chlamydia spp.</i>	16S rDNA	272
<i>Chlamydia psittaci</i>	16S rDNA	413
<i>Coxiella burnetii</i>	Surface antigen	552
<i>Coxiella burnetii</i>	16S rDNA	351
<i>Francisella tularensis</i>	17kD major OMP	350
<i>Francisella tularensis</i> group	16S rDNA	307
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	DnaJ	302
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> group	16S rDNA	323
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	16S rDNA	285
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	OMP	331
<i>Rickettsia spp.</i>	16S rDNA	416
<i>Salmonella spp.</i>	invA	422
<i>Salmonella typhi</i>	vipR	409
<i>Yersinia pestis</i>	virulence:pesticin	363
<i>Yersinia pestis</i>	Pla:plasminogen activator	346
<i>Yersinia pseudotuberculosis/pestis</i>	16S rDNA	308

300 μ lの溶菌液を追加し、90Cで10分間加熱処理したのち、Phenol-chloroform-isoamylalcohol (25 : 24 : 1) の混合液を 500 μ l加え、一分間 vortexした。その後12,000gで 3分間遠心し、上澄みを新しいチューブに移しphenol混合液の抽出をもう一度繰り返した。上澄みは 99%ethanol, 70%ethanolで沈殿、洗浄後 200 μ lの TE buffer にとかし、遺伝子増幅反応に使用した。

3 遺伝子増幅

土壌から抽出したDNAは次の3つの primersで増幅した。一つは土壌中の優位な菌群の解析のために真正細菌に共通な universal primer, 菌類に共通な 18S rDNA の universal primer および古細菌に共通な universal primer を使用した。この増幅産物をCy3で標識後、系統アレイおよび病原性アレイと反応させ、優位な菌相の系統分布を計測した。

一方、特定の病原細菌を検出するための primer set として、表2に示したレベル3の病原体の primer set, 及びレベル2以下の人・動物の細菌性病原体の primer set (表3) を使用し、realtime PCR法で増幅をモニターした。

第9章 DNAマイクロアレイを用いた環境サンプル中の微生物群集の解析

表3 検出のためにPrimerを作成した土壌生息病原体

菌種	レベル	系統	標準的遺伝子	汚染土	黒土	修復後土
<i>Acholeplasma</i> spp.	1	alfa-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	2	Beta-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Acidovorax avenae</i> group	1	Beta-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> group	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Actinomadura madurae</i> group	2	Actinobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Actinomyces bovis</i> group	2	Actinobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Aeromonas</i> spp.	1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Afipia felis</i> group	1	alfa-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Alcaligenes</i> group	2	Beta-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Anaplasma marginalis</i> group	2	alfa-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	2	Actinobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Arthrobacter</i> group	1	Actinobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Bacillus cereus-thuringensis</i> group	1	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Bacteroides vulgatus</i> group	1	CFB group	16S rDNA	-	-	-
<i>Bartonella</i> spp.	2,1	alfa-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Bilophila-Lawsonia</i> group	2	Delta-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i>	2	Beta-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Borrelia</i> group	2,1	Spiral	16S rDNA	-	-	-
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	2	Spiral	16S rDNA	-	-	-
<i>Branhamella catarrhalis</i>	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Brenneria alni</i> group	1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i> group	2,1	Beta-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Burkholderia</i> group	1	Beta-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>C.perfringens-tetani-botulinum</i> group	2	Firmicutes	16S rDNA	-	+	-
<i>Campylobacter</i> spp.	2,1	Epsilon-proteo	16S rDNA	-	-	-
<i>Cardiobacterium hominis</i> group	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Chromobacterium violaceum</i>	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Chryseobacterium-Flavobacterium</i> group	2	CFB group	16S rDNA	-	-	-
<i>Citrobacter</i> group	1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Clavibacter michiganensis</i>	1	Actinobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Clostridium coccoides</i> group	2	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Clostridium bifermentans</i> group	2	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i> group	2,1	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	2	Firmicutes	16S rDNA	-	+	-
<i>Clostridium tetani</i>	2	Firmicutes	Tetanospasmin	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> group	1	Actinobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Cowdria ruminantium</i>	1	alfa-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Edwardsiella</i> group	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Ehrlichia-Anaplasma</i> spp.	2,1	alfa-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Enterobacter</i> group	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Enterobacteriaceae(major)</i>	2,1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	2,1	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Eperythrozoon</i> group	1	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Erwinia</i> group	1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Erysipelothrix</i> group	2,1	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Escherichia</i> group	2,1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Haemobartonella canis</i> group	2,1	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Haemophilus-Pasteurella-Actinobacillus</i> group	2,1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i> group	2,1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Helicobacter pylori</i>	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Kingella denitrificans</i>	1	Beta-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> group	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Kluyvera ascorbata</i>	1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Legionella</i> group	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Leptospira interrogans</i> group	2	Spiral	16S rDNA	-	-	-
<i>Listeria</i> group	2	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Melissococcus pultoni</i> group	1	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Morganella</i> group	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Mycobacterium</i> spp.	3,2,1	Actinobacteria	16S rDNA	+	+	+
<i>Mycoplasma mycoides-pneumoniae</i> group	2,1	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> group	2	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	2	Beta-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Neorickettsia-E.sennetsu</i>	2,1	alfa-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Nocardia</i> group	2,1	Actinobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Paenibacillus larvae</i> group	1	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Pectobacterium</i> group	1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Photobacterium phosphor</i>	2,1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Proteus-providencia</i> group	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> group	2,1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> group	2,1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	+	-	-
<i>Rathayibacter rathayi</i> group	1	Actinobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Rhizobium</i> group	1	alfa-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Rhodococcus</i> group	1	Actinobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Rochalimea quintana</i>	2,1	alfa-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Rothia dentocariosa</i>	2	Actinobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> spp.	2,1	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	2	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	2,1	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Streptomyces</i> group	2,1	Actinobacteria	16S rDNA	+	+	+
<i>Suttonella indologenes</i>	1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Taylorella equigenitalis</i>	1	Beta-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Ureaplasma</i> group	2,1	Firmicutes	16S rDNA	-	-	-
<i>Vibrio cholerae/mimicus</i>	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Vibrio fluvialis</i>	2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Vibrio</i> group	2,1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Xanthomonas</i> group	1	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuber/pestis</i>	3,2	Gamma-proteobacteria	16S rDNA	-	-	-

4 マイクロアレイとの反応

Universal primerで増幅しCy3で標識したDNAを、マイクロアレイと55~60℃で4時間反応させた。反応後、Laser Scannerで蛍光シグナルを定量した。

4.1 結果の解析方法

4.1.1 病原体および特定の機能を持った菌群の Screening

土壌および環境水に含まれる病原体にはヒト、動物、植物、魚貝類があるがヒトと動物ではレベル2以上の細菌とカビに限定すると表4に示したように200~220種程度であり、マイクロアレイを使用しなくともPCR法で対応できる。我々は市販の96 wellに病原体を増幅する primer setを作成してscreeningを行っている。この際のprimer setは細菌では16S rDNA、標的とした primer setを作成してscreeningを行っている。16S rDNAで特異的と思われる配列を使用しても

表4 モニターが必要と考えられる病原体菌種数

	細菌	菌類	原虫
ヒト病原体	215	136	49
動物病原体	220	8	105
植物病原体	72	1700	/
魚貝類病原体	60	13	26

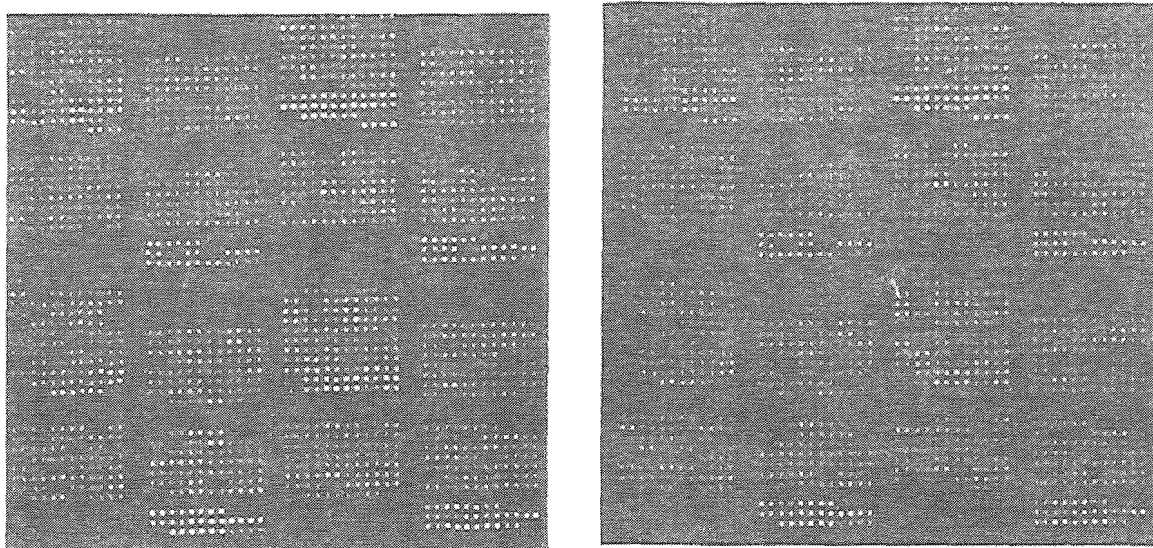


図1 石油汚染土壌の解析例

石油に汚染された土壌からDNAを抽出し、Universal primerを使った増幅したDNAを系統マイクロアレイと反応させた(左)、浄化に利用する非汚染黒土壌のPCR産物をマイクロアレイで解析(右)して比較した。

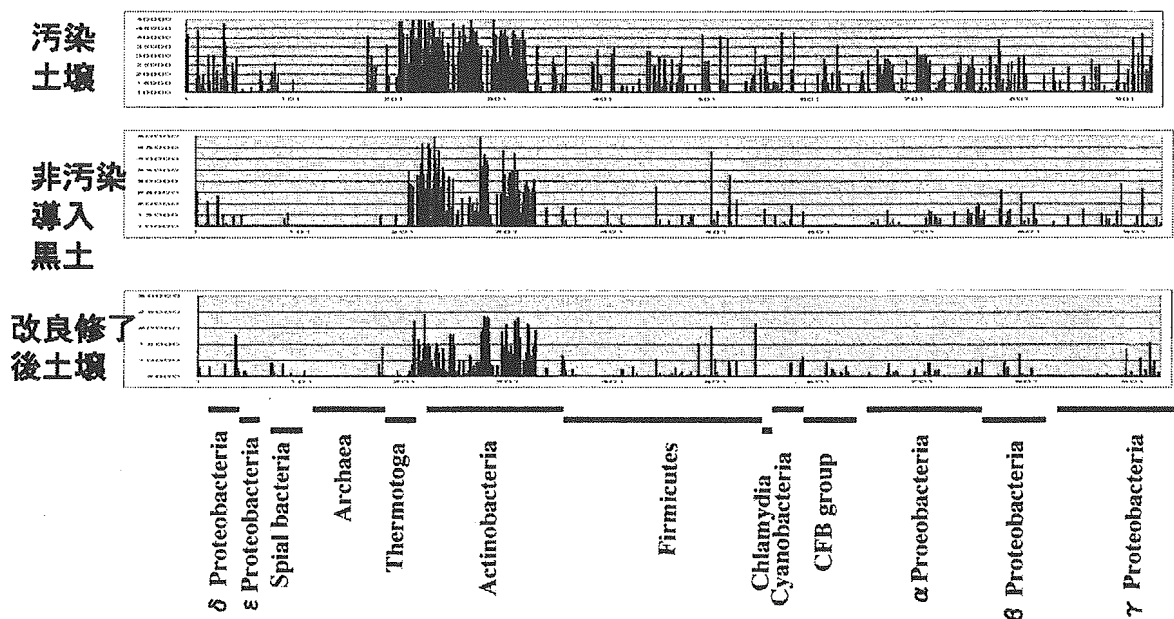


図2 汚染土壌（上）、非汚染土壌（中）、改良後（下）の比較

環境の材料に利用すると、まだ分類学的に記載されていない類縁の菌種が反応してくる場合があるのであくまでもscreening方法と理解している。

レベル2で病原性の強い菌種、およびLevel 3の病原体はscreeningで陽性になった場合、社会的に大きな影響をおよぼすので、病原因子を増幅する primer set を組み合わせて確認することでよりの確な検出をおこなう方法をとっている。

表3には土壌に生息する病原体の16S rDNAが汚染土壌、非汚染土壌、および土壌改良後の土壌から増幅されている。

4.1.2 優位な菌の系統解析

試料に含まれる環境中の菌数は系統ごとに異なる。土壌1g中に数百個しか存在しない菌から数億個と大きな開きがある。病原体のクリーニングのように特異的なprimerを用いれば菌数が低くても解析が可能であるが、universal primerを使用すれば優位な菌しか解析できないといった限界がある。優位な菌の系統解析に使用するマイクロアレイは属レベルで解析するので系統の分布を大まかに推測するには便利である。

解析に利用した土壌は石油汚染土壌で浄化を行う前、浄化のために外部から導入した土壌、および汚染作業を終了した時点の土壌の3つを使って比較した。

図1にはマイクロアレイの解析の画像、図2には画像処理後のデータをしめした。汚染土壌ではActinobacteriaのsignalとProteobacteriaのsignalに特徴がみられる。修復後の土壌のパターンではProteobacteriaのsignalが減少し、非汚染土壌のパターンに類似したシグナルが検出されている。

4.1.3 菌種レベルの解析

菌種レベルの解析を行う場合には種に特異的な配列を固定して網羅的に優位菌を解析する方法が必要になる。この方法には384wellを使って菌種ごとの定量 PCRを行うか universal primer を使用して種レベルの識別を行う microarray を使う必要がある。我々はヒトの flora 解析にこの方法を利用している²⁾。ヒトの flora のように生息する菌種がよく解析され、大きく系統が異なった菌種がない場合は有効であるが、環境の場合は未知菌種が圧倒的に多いのでシグナルはほとんど得られない。病原性菌種1012種類を搭載したマイクロアレイを土壌と反応させても得られるシグナルは clostridia, bacilli, actinomyces と pseudomonads, sphingomonads など一部の菌群に限られるが、我々の経験では菌数も少なくシグナルは弱い。下水のようなヒトの生活排水が含まれるような水には Enterobacteriaceae, Aeromonas, Vibrioaceae をはじめとした下痢をおこす病原体が多く含まれるため、病原体アレイを使った解析が有効になる。

5 おわりに

系統マイクロアレイ、および病原体マイクロアレイと遺伝子増幅方法を組み合わせて環境中の微生物相を網羅的に解析する試みを行った。病原体の有無の測定には遺伝子増幅法、優位菌の解析には universal Primer で増幅した産物を系統マイクロアレイで網羅的に解析する方法が未知の菌が多い土壌微生物の解析には適していた。今後は動物病原体、植物、魚介類など screening のための遺伝子増幅の系を増やす必要がある。また土壌中には植物病原体のカビが多く生息するため、カビの系統解析も重要な課題として残されているが、植物病原性菌類の遺伝子データはまだ十分には蓄積されておらず網羅的な菌類のマイクロアレイの作成には情報が不足している。

文 献

- 1) 大楠清文他2003 細菌ゲノムの効率的な抽出方法の開発：糞便および喀痰からの効率的 DNA/RNA 精製方法の確立にむけて、日本感染症学会、東京
- 2) 江崎孝行2003 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)

Editor-Communicated Paper

Quantitative Microarray-Based DNA-DNA Hybridization Assay for Measuring Genetic Distances among Bacterial Species and Its Application to the Identification of Family *Enterobacteriaceae*

Makoto Amano^{1,3}, Kiyofumi Ohkusu³, Koji Kusaba², Hironori Ikeda², Zenzo Nagasawa², Yosuke Aoki², Yoshiaki Kawamura³, Shinzo Kobatake¹, Takumi Tanaka¹, Shuuji Matsuura¹, and Takayuki Ezaki^{*,3}

¹Osaka Research Laboratories, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Amagasaki, Hyogo 661–0963, Japan, ²Department of Laboratory Medicine, Saga University Hospital, Saga, Saga 849–8501, Japan, and ³Department of Microbiology, Gifu University School of Medicine, Gifu, Gifu 500–8705, Japan

Communicated by Dr. Shin-ichi Yoshida: Received December 16, 2004. Accepted December 24, 2004

Abstract: Quantitative DNA-DNA hybridization to measure the genetic distances among bacterial species is indispensable for taxonomical determination. In the current studies, we developed a method to determine bacterial DNA relatedness on a glass microarray. Reference DNAs representing a total 93 species of *Enterobacteriaceae* were arrayed on a glass microplate, and signal intensities were measured after 2 hr of hybridization with Cy3-labeled bacterial DNAs. All immobilized DNAs from members of the family *Enterobacteriaceae* were identified by this method except for DNAs from *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. pestis*. These results suggest that quantitative microarray hybridization could be an alternative to conventional DNA-DNA hybridization for measuring chromosome relatedness among bacterial species.

Key words: Microarray, Species identification, *Enterobacteriaceae*

The sequences of nearly 6,000 taxonomically described species and bacteria have been reclassified according to their 16S ribosomal DNA (rDNA) sequences. As a result, ribosomal RNA sequencing has become a powerful method for determining the phylogenetic position of unidentified strains. All together, the sequences of more than 60,000 16S rDNAs covering more than 97% of the sequences of officially described species has been accumulated. This data has revealed that many established species have nearly identical rRNA sequences. Thus, given sequencing errors and variations among the five to eight copies of the 16S rDNA operon on a chromosome from a single species, it is practically impossible to identify an isolated strain by sequencing if the strain less than 2% different than a closely related established species. The Ad Hoc Committee of the International Systematic Bacteriology rec-

ommended that, if the 16S rDNA sequence variation between a new strain and an established species was less than 3%, chromosomal DNA-DNA hybridization data is needed to describe the new species (18). Since the last century, members of the family *Enterobacteriaceae* have been classified according to their biochemical traits (3). For this reason, genetically identical organisms, such as four species of genus *Shigella* and *Escherichia coli*, had been misclassified as different species (26, 27). Also, early in the 20th century, more than 2,000 *Salmonella* serovars had been classified as independent species, but they are now known to be a single species (33).

Chromosomal DNA-DNA hybridization can solve the problems of phenotypic identification and 16S rDNA sequencing. A bacterial species is genetically defined as a group of strains that shares more than 70%

*Address correspondence to Dr. Takayuki Ezaki, Department of Microbiology, Gifu University School of Medicine, Gifu, Gifu 500–8705, Japan. Fax: +81–58–230–6489. E-mail: tezaki@cc.gifu-u.ac.jp

Abbreviations: GTC, Gifu Type Culture Collection; PCR, polymerase chain reaction; rDNA, ribosomal RNA gene; SSC, saline-trisodium-citrate buffer.

Table 1. List of 93 type strains immobilized on a microarray and three strongly cross-hybridized strains to reference DNAs

Array position	Type strain	Labeled strains strongly cross-hybridized to reference DNAs	
		GTC 109	GTC 118
1 A-1	<i>Arsenophonus nasoniae</i> GTC 1349	—	—
2 A-2	<i>Budvicia aquatica</i> GTC 1689	—	—
3 A-3	<i>Buttiauxella agrestis</i> GTC 1505	—	—
4 A-4	<i>Cedecea davisae</i> GTC 345	—	—
5 A-5	<i>Cedecea lapagei</i> GTC 346	—	—
6 A-6	<i>Cedecea neteri</i> GTC 1717	—	—
7 A-7	<i>Citrobacter freundii</i> GTC 108	—	—
8 A-8	<i>Citrobacter amalonaticus</i> GTC 1718	—	—
9 A-9	<i>Citrobacter braakii</i> GTC 1320	—	—
10 A-10	<i>Citrobacter farmeri</i> GTC 1319	—	—
11 A-11	<i>Citrobacter koseri</i> GTC 113	—	—
12 A-12	<i>Citrobacter rodentium</i> GTC 1323	—	—
13 B-1	<i>Citrobacter sedlakii</i> GTC 1322	—	—
14 B-2	<i>Citrobacter werkmanii</i> GTC 1321	—	—
15 B-3	<i>Edwardsiella tarda</i> GTC 112	—	—
16 B-4	<i>Edwardsiella hoshinae</i> GTC 337	—	—
17 B-5	<i>Edwardsiella ictaluri</i> GTC 1340	—	—
18 B-6	<i>Enterobacter cloacae</i> GTC 109	100	—
19 B-7	<i>Enterobacter aerogenes</i> GTC 121	—	—
20 B-8	<i>Enterobacter amnigenus</i> GTC 340	—	—
21 B-9	<i>Enterobacter asburiae</i> GTC 1719	—	—
22 B-10	<i>Enterobacter cancerogenus</i> GTC 1704	—	—
23 B-11	<i>Enterobacter dissolvens</i> GTC 1514	53 (16) ^{b)}	—
24 B-12	<i>Enterobacter gergoviae</i> GTC 350	—	—
25 C-1	<i>Enterobacter hormaechei</i> GTC 1318	—	—
26 C-2	<i>Enterobacter intermedius</i> GTC 1678	—	—
27 C-3	<i>Enterobacter kobei</i> GTC 1531	—	—
28 C-4	<i>Enterobacter nimipressuralis</i> GTC 1513	—	—
29 C-5	<i>Enterobacter pyrinus</i> GTC 1516	—	—
30 C-6	<i>Enterobacter sakazakii</i> GTC 336	—	—
31 C-7	<i>Erwinia aphidicola</i> GTC 1688	—	—
32 C-8	<i>Escherichia coli</i> GTC 503	—	—
33 C-9	<i>Escherichia blattae</i> GTC 1342	—	—
34 C-10	<i>Escherichia fergusonii</i> GTC 1720	—	—
35 C-11	<i>Escherichia hermannii</i> GTC 347	—	—
36 C-12	<i>Hafnia alvei</i> GTC 104	—	—
37 D-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> GTC 107	—	—
38 D-2	<i>Raoultella ornithinolytica</i> GTC 490	—	—
39 D-3	<i>Klebsiella oxytoca</i> GTC 132	—	—
40 D-4	<i>Raoultella planticola</i> GTC 1343	—	—
41 D-5	<i>Raoultella terrigena</i> GTC 489	—	—
42 D-6	<i>Kluyvera ascorbata</i> GTC 338	—	—
43 D-7	<i>Kluyvera cryocrescens</i> GTC 339	—	—
44 D-8	<i>Kluyvera georgiana</i> GTC 1508	—	—
45 D-9	<i>Kluyvera cochleae</i> GTC 1506	—	—
46 D-10	<i>Leclercia adecarboxylata</i> GTC 1267	—	—
47 D-11	<i>Leminorella grimontii</i> GTC 1369	—	—
48 D-12	<i>Moellerella wisconsensis</i> GTC 1370	—	—
49 E-1	<i>Morganella morganii</i> GTC 1500	—	—
50 E-2	<i>Obesumbacterium proteus</i> GTC 1507	—	—
51 E-3	<i>Pantoea agglomerans</i> GTC 1261	—	—
52 E-4	<i>Pantoea ananatis</i> GTC 1705	—	—
53 E-5	<i>Pantoea citrea</i> GTC 1680	—	—

(Table 1. Continued)

Array position	Type strain	Labeled strains strongly cross-hybridized to reference DNAs		
		GTC 109	GTC 118	
54	E-6	<i>Pantoea dispersa</i> GTC 1472	—	—
55	E-7	<i>Pantoea punctata</i> GTC 1511	—	—
56	E-8	<i>Pantoea stewartii</i> GTC 1666	—	—
57	E-9	<i>Pantoea terrea</i> GTC 1512	—	—
58	E-10	<i>Pragia fontium</i> GTC 1557	—	—
59	E-11	<i>Photobacterium luminescens</i> GTC 1341	—	—
60	E-12	<i>Proteus vulgaris</i> GTC 134	—	—
61	F-1	<i>Proteus inconstans</i> GTC 1502	—	—
62	F-2	<i>Proteus mirabilis</i> GTC 137	—	—
63	F-3	<i>Proteus penneri</i> GTC 349	—	—
64	F-4	<i>Providencia alcalifaciens</i> GTC 111	—	—
65	F-5	<i>Providencia heimbachae</i> GTC 1501	—	—
66	F-6	<i>Providencia rettgeri</i> GTC 1263	—	—
67	F-7	<i>Providencia rustigianii</i> GTC 1504	—	—
68	F-8	<i>Providencia stuartii</i> GTC 1722	—	—
69	F-9	<i>Rahnella aquatilis</i> GTC 1499	—	—
70	F-10	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i> GTC 103 ^{a)}	—	—
71	F-11	<i>Serratia marcescens</i> GTC 135	—	—
72	F-12	<i>Serratia entomophila</i> GTC 1316	—	—
73	G-1	<i>Serratia ficaria</i> GTC 343	—	—
74	G-2	<i>Serratia grimesii</i> GTC 1268	—	—
75	G-3	<i>Serratia odorifera</i> GTC 1344	—	—
76	G-4	<i>Serratia plymuthica</i> GTC 351	—	—
77	G-5	<i>Serratia proteamaculans</i> GTC 1278	—	—
78	G-6	<i>Serratia rubidaea</i> GTC 136	—	—
79	G-7	<i>Serratia liquefaciens</i> GTC 323	—	—
80	G-8	<i>Tatumella ptyseos</i> GTC 344	—	—
81	G-9	<i>Trabulsiella guamensis</i> GTC 1379	—	—
82	G-10	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> GTC 1515	—	—
83	G-11	<i>Yersinia bercovieri</i> GTC 1317	—	—
84	G-12	<i>Yersinia enterocolitica</i> GTC 127	—	—
85	H-1	<i>Yersinia frederiksenii</i> GTC 1264	—	—
86	H-2	<i>Yersinia intermedia</i> GTC 1723	—	—
87	H-3	<i>Yersinia kristensenii</i> GTC 1724	—	—
88	H-4	<i>Yersinia mollaretii</i> GTC 1690	—	—
89	H-5	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> GTC 118	—	100
90	H-6	<i>Yersinia rohdei</i> GTC 1315	—	—
91	H-7	<i>Yersinia ruckeri</i> GTC 1266	—	—
92	H-8	<i>Yokenella regensburgei</i> GTC 1377	—	—
93	H-9	<i>Yersinia pestis</i> GTC 3P417	—	87 (15) ^{b)}
94	H-12	<i>Herring sperm</i> DNA	—	—

^{a)} Other *Salmonella* serovars and *Shigella* species were not spotted on a microarray.

^{b)} Values in parenthesis are range of variation.

No. 1 to 17, 31 to 46, 48 to 83, 85 to 88, and 91 to 93 did not cross-hybridize to reference DNAs.

similarity in chromosomal DNA under optimal experimental conditions (15, 31). Many chromosomal DNA-DNA hybridization methods to measure genetic relatedness among bacterial strains have been published and have been indispensable for describing new species. To measure chromosomal DNA similarity among bacterial strains, two methods have been used: free solution

hybridization membrane filter hybridization and a hydroxyl apatite method (5, 13). However, these methods require a large amount of purified chromosomal DNA.

In previous studies, we introduced a 96-well microplate-based protocol to reduce the amount of chromosomal DNA needed for DNA-DNA hybridiza-

tion (7, 8, 17). In this technique, DNA is fixed to the surface of the microtiter wells by physical adsorption. The method does not require radioisotopes and requires only microgram level of DNA. However, the DNA must be highly purified because of the limited DNA binding capacity of the microplate. Also, binding of DNA to the microtiter well can be competed by contaminating polysaccharides. Therefore microgram quantities of highly purified DNA have been needed for the method (1, 2, 22).

DNA microarray techniques using synthesized DNA (11, 14, 24), PCR amplicons, or covalently attached presynthesized oligoDNAs or complimentary DNA (25, 26, 30) have become popular. These microarray technologies require only nanogram levels of DNA (23), an advantage that has been applied to species identification (4, 21, 32).

In the present study, we developed a new method to determine genetic relatedness among bacterial species that utilizes a chromosomal DNA microarray with several thousand immobilized chromosomal DNA fragments. We measured the similarity in chromosomal DNA between the members of the *Enterobacteriaceae* family. With this method, we correctly identified 93 species covering almost all of the genera in the members of this family.

Materials and Methods

Bacterial strains. Bacterial strains were obtained from Gifu Type Culture Collection (GTC). The reference strains from which DNA was extracted and immobilized on glass slides are listed in Table 1. A total of 92 strains were used for these studies.

Preparation of reference DNAs. Strains were cultured on heart infusion agar for 2 days. Sedimented cells (1 g wet cells) were resuspended in 10 ml saline-EDTA buffer (0.15 M NaCl/0.1 M EDTA · 2Na, pH 8.0), and then lysed with lysozyme (1 mg/ml) followed by sodium dodecyl sulfate (2%) for 10 min at 60 C. The lysate was treated with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and ethanol according as described previously (6). Ethanol precipitated DNA was resuspended in saline-EDTA buffer and treated with RNase A (50 µg/ml) at 37 C for 30 min and followed by proteinase K (50 µg/ml) treatment for 60 min at 55 C. The DNA was then purified using a standard phenol-chloroform-isoamyl alcohol method (8) followed by ethanol precipitation.

Immobilization of DNA. Four different DNA concentrations (100, 50, 25, and 12.5 ng/µl) were prepared for spotting on the glass slides. These solutions were heat-denatured with 3× Standard Saline-Citrate buffer,

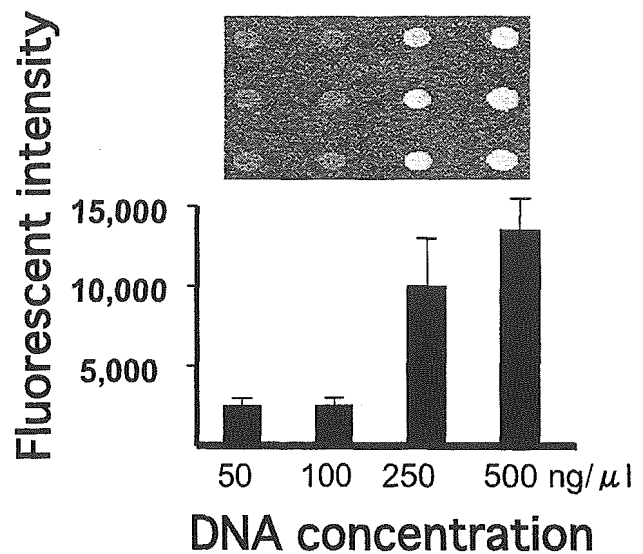


Fig. 1. Selection of an optimal DNA concentration for the microarray using a 2-hr hybridization. DNA from *E. coli* GTC 503 (500, 250, 100, and 50 ng/µl) was hybridized to spots of its own DNA for 2 hr at 45 C.

pH 7.2 and were spotted on poly-L-lysine-coated glass slides (Matsunami Glass Industries, Ltd.) using a GTMASS stamping system (Nippon Laser and Electronics Laboratories), and the glass slide was stored in a dry chamber at room temperature. Next, 20 µl of pre-hybridization solution (2× SSC, 5× Denhardt's solution (8), 0.1 mg/ml of denatured salmon sperm DNA, and 50% formamide) was added and the slide was covered with a cover slip. Slides were kept in a humid chamber and incubated for 30 min at 37 C. After the prehybridization, the slide was placed in 1× SSC, washed for 2 min, and then dried.

Fluorescence labeling of extracted DNA. Extracted genomic DNA (1 µg) was labeled and denatured using a Label IT Cy3 labeling kit (Mirrus) according to the manufacturer's recommendations.

DNA-DNA hybridization. Labeled DNA (10 µg/µl) solution was mixed with 20 µl of hybridization solution (2× SSC, 5× Denhardt's solution, 50% formamide, and 2.5% dextran sulfate). Twenty microliters of the solution was applied to DNA-immobilized glass and covered with a cover slip. Slides were kept in a humid chamber and hybridized for 30, 120, or 240 min at 35, 40, 45, 50, or 55 C. After hybridization, the slides were washed twice with 1× SSC buffer for 2 min and then centrifuged to remove excess buffer.

Data analysis. Hybridization slides were scanned with a ScanArray 4000 confocal laser scanner (GSI Lumonics). The average signal intensity of hybridized spots and local background signals were analyzed by QuantArray software (GSI Lumonics).

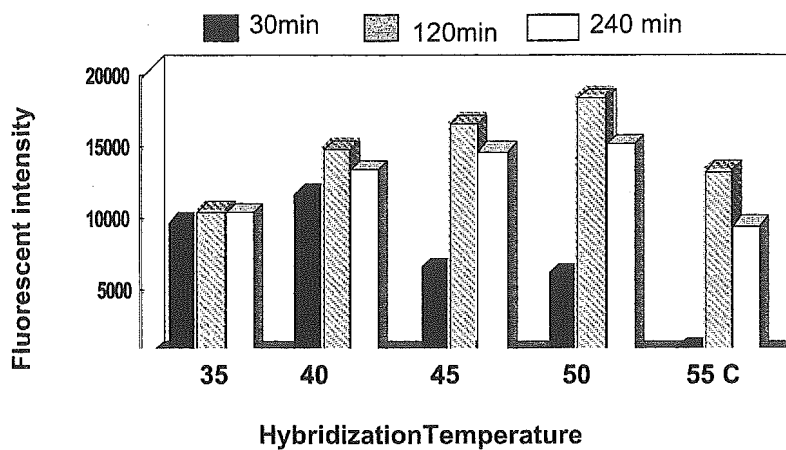


Fig. 2. Optimal hybridization temperature and time for the microarray. Labeled DNA from *E. coli* GTC 503 was hybridized to spots of its own DNA at different temperatures (35, 40, 45, 50, and 55 C) and hybridized for 30, 120, or 240 min.

Results

Selection of the Optimal DNA Concentration for the Microarray

To find optimal DNA concentration for spotting, three different DNA concentrations were prepared. These spotted DNAs were hybridized with heat-denatured Cy3-labeled DNA from *E. coli* GTC 503 (Fig. 1). Two concentrations, 250 and 500 ng/ μ l at 50 C gave strong signal after 2 hr of hybridization. We selected 500 ng/ μ l as an optimal concentration for rapid identification.

Determination of the Optimal Time and Temperature for Hybridization

Five different hybridization temperatures (35, 40, 45, 50, and 55 C) were examined (Fig. 2). When 500 ng/ μ l of DNA was used for spotting, the hybridization signal at 30 min was too weak at 45, 50, and 60 C, but strong signals were detected after 120 min at approximately 45–50 C. Based on these results, we selected 2 hr hybridization at 50 C for the identification of *Enterobacteriaceae* on the microarray.

Fluorescent Signal Intensities of Hybridized Spots on a Glass Slide

DNA from the 92 species in the *Enterobacteriaceae* family were arrayed and hybridized with Cy3-labeled reference DNAs (Fig. 3). Although all species were labeled and hybridized to the reference DNA spots on the glass array, only two species cross-hybridized with other type species (Table 1). Specifically, DNA from *Enterobacter cloacae* GTC 109 cross-hybridized with DNA from *E. dissolvens* GTC 1514. The variance in

their 16S rDNA sequences was 2.4%. Also, DNA from *Yersinia pseudotuberculosis* GTC118 cross-hybridized with DNA from *Y. pestis* GTC 3P 417. This is not surprising because, based on a DNA-DNA similarity higher than 80% and identical 16S rDNA sequences, the two species are considered genetically identical (3).

Genetic Relatedness among Species of the Genus Escherichia and Shigella

We next determined the interspecies similarity of members of the genus *Escherichia* and the genus *Shigella* (Table 2). Among members of the genus *Escherichia*, 16S rRNA similarity between *E. coli* and *E. fergusonii* was the most similar. The relatedness was also reflected in the similarities of their chromosomes as determined by microarray analysis. All four *Shigella* species were genetically identical to *E. coli* GTC 503 because their similarities with *E. coli* GTC 503 were higher than 70%.

DNAs of serovars of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and clinical strains of *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* were spotted on a glass slide, and their similarities with each species in the genus are shown in Fig. 4. Twelve strains of *Salmonella enterica* serovars made an independent cluster from 4 subspecies of *Salmonella enterica*. *Escherichia coli* and the 8 serovars and 4 species of genus *Shigella* made a single cluster and apparently different from 3 independent species of the genus *Escherichia*. *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii*, and *S. sonnei* were confirmed to belong to *E. coli* even in this method. Four species of the genus *Escherichia* had different level of 16S rDNA sequence similarity to the type species. Especially *E. blattae* had only 96% 16S rDNA similarity to the type species, *E. coli* GTC 503 (as in Table 2 and Fig. 4).

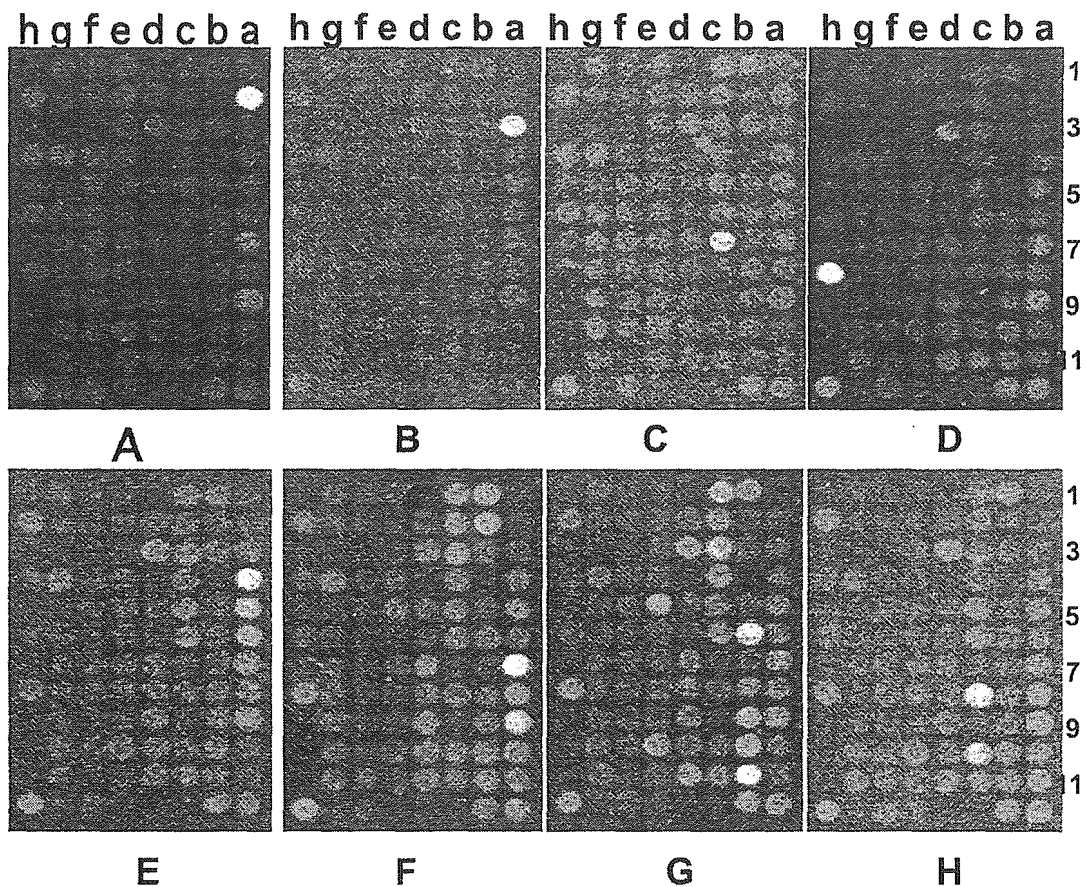


Fig. 3. Hybridization results for selected strains. The DNA spots on the microarray are described in Table 1. Labeled strain A, *Budvicia aquatica* GTC 1689 (position A2); labeled strain B, *Buttiauxella agrestis* GTC 1689 (position A3); labeled strain C, *Erwinia aphidicola* GTC 1688 (position C7); labeled strain D, *Yokenella regensburgi* GTC 1377 (position H8); labeled strain E, *Cedecea davisae* GTC 345 (position A4); labeled strain F, *Citrobacter freundii* GTC 108 (position A7); labeled strain G, *Enterobacter cloacae* TC 109 (position B6); labeled strain H, *Escherichia coli* GTC 503 (position C8).

Table 2. Similarities among species of genus *Escherichia* and *Shigella*

Type strain	16S rDNA homology to <i>E. coli</i> GTC 503	Relative similarity values against labeled strain (calculated from spots on microarray)			
		GTC 503	GTC 1342	GTC 1720	GTC 347
<i>E. coli</i> GTC 503	100–98.6 ^{a)}	100	–	55.2	–
<i>E. blattae</i> GTC 1342	96.2	– ^{b)}	100	–	–
<i>E. fergusonii</i> GTC 1720	99.6	37.0	–	100	–
<i>E. hermannii</i> GTC 347	97.4	–	31.6	–	100
<i>S. dysenteriae</i> GTC 786	99.8	95.0	–	45.3	–
<i>S. flexneri</i> GTC 780	99.3	98.0	–	46.2	–
<i>S. boydii</i> GTC 779	98.8	95.0	–	38.7	–
<i>S. sonnei</i> GTC 781	98.8	92.6	–	40.1	–

^{a)} Variation among 7 copies of rDNA operon of *E. coli* GTC 503 was 1.4% (18 base difference).

^{b)} –, signal lower than 30%.

Six clinical strains of *Serratia marcescens* made a close cluster to the type strains and their similarity values to the type species was higher than 80% as in Fig. 4. Established 8 species of the genus *Serratia* had DNA-DNA similarities to the type strain less than 45% with 96–98% 16S rDNA sequence similarities. Seven clinical

strains of *Klebsiella pneumoniae* made identical cluster with the type strain with more than 99% 16S rDNA similarities. While 2 species of the genus *Klebsiella* and 3 species of the genus *Raoultella* were proved to be independent species with less than 45% DNA-DNA similarities by this microarray method but

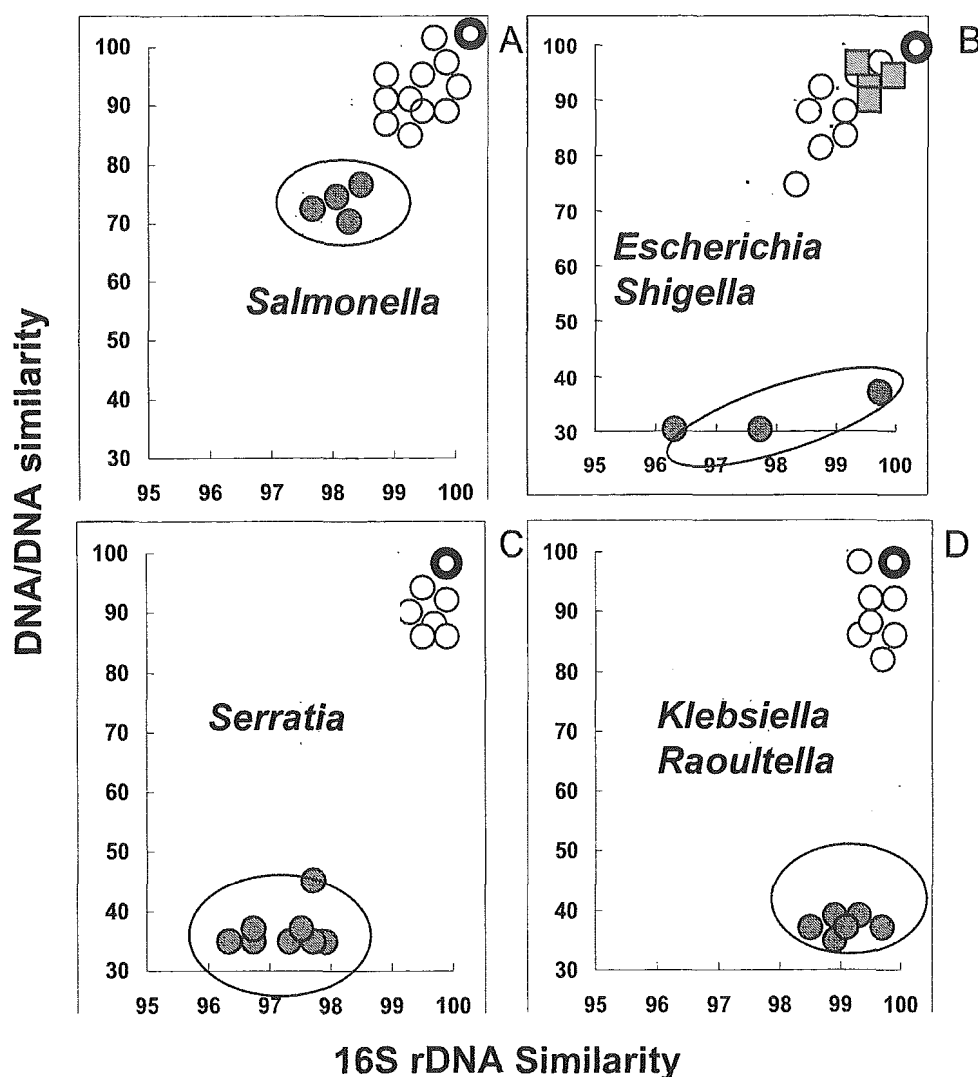


Fig. 4. DNA-DNA similarity of members of the genus *Shigella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, and *Serratia* and species from each genera as determined by the microarray method and 16S rDNA sequence homology. Open bold circles, *S. enterica* subspecies *enterica* ATCC 13311 (A), *E. coli* GTC 503 (B), *S. marcescens* GTC135 (C), and *K. pneumoniae* GTC 107 (D). (A) Closed circle, four subspecies of *Salmonella enterica* (*S. enterica* subsp. *arizonae* NCTC 8297, *S. enterica* subsp. *indica* DSM 14848, *S. enterica* subsp. *bongori* CIP 8233); open circle, 11 members of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (including serovars Typhi, Choleraesuis, Patatyphi A, and Dublin). (B) Closed circle, three species of genus *Escherichia* (see Table 2); open circle, eight serovars of *Escherichia coli* (including O157 and O121); closed square, four species of the genus *Shigella* (see Table 2). (C) Closed circle, eight species of genus *Serratia* (see Table 1); open circle, six clinical strains of *S. marcescens*. (D) Closed circle, two species of the genus *Klebsiella* and three species and one clinical strain of the genus *Raoultella* (see Table 1); open circle, seven clinical strains of *K. pneumoniae*.

their 16S rDNA sequence were close to the type species because their 16S rDNA sequence similarities were higher than 98% as in Fig. 4.

Discussion

The taxonomy of the *Enterobacteriaceae* family was thought to have been well established by conventional biochemical methods, but genetic information has since shown that many species that were previously thought to be distinct are, in fact, genetically identical. For exam-

ple, *Escherichia coli* and four species of the genus *Shigella* are taxonomically identical species (26), and four DNAs of the genus *Shigella* strongly hybridize to the reference DNA of *E. coli* even by this microarray method. Also, many earlier attempts at bacterial taxonomy classified many *Salmonella* serovars as independent species (10, 11), but they have now been proposed to be part of a single species (33). The potent human pathogen *Salmonella typhi* and the animal pathogen *Salmonella enteritidis* have been shown to be genetically identical and it has been proposed that they be classi-