

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>vip R</i>	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

検査に引がかかってくるので、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

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)	
foward:	5-AGAGTTTGATCRTCRTGGCTAAG-3
reverse:	5-GTATTACCGCGGCGYCTG-3
糸状菌 18S rDNA 用 primer(増幅産物 約 362 塩基)	
foward:	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)	
foward:	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2ml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を用い、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スにロード後、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た。

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、医師の指示があつ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ので、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>Chlamydomphila/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 cocci/clostridia	92
Flavobacreaia	90
Enterobacteriaceae	92
Legionella spp.	93
Pseudomonas Acinetobacter	78
Haemophilus-actinobacteria	60
Campylobacter-Spiral bacteria	72
Fungi	60
Total	1027

(筆者作成)

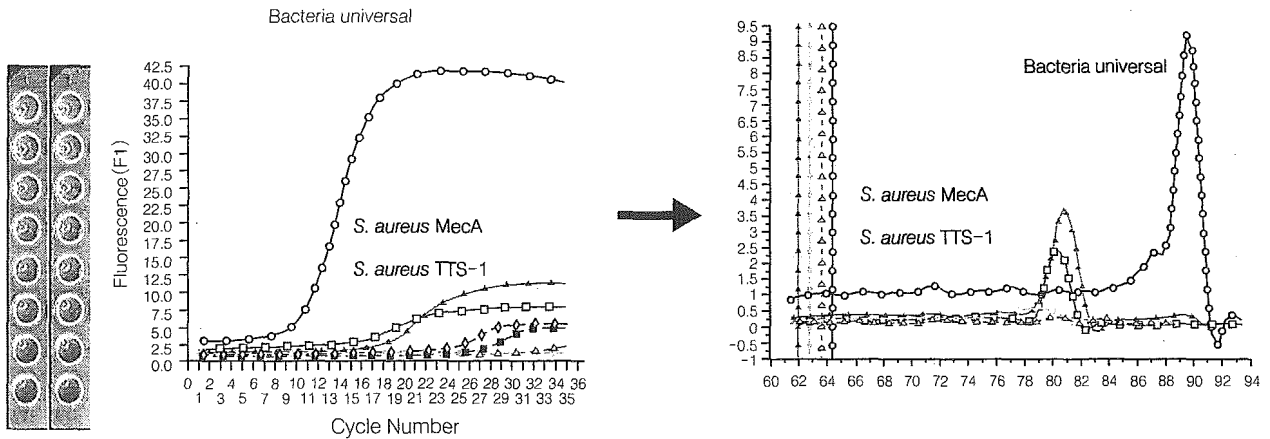
表④ 網羅的検査の対象とするウイルスのリスト

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

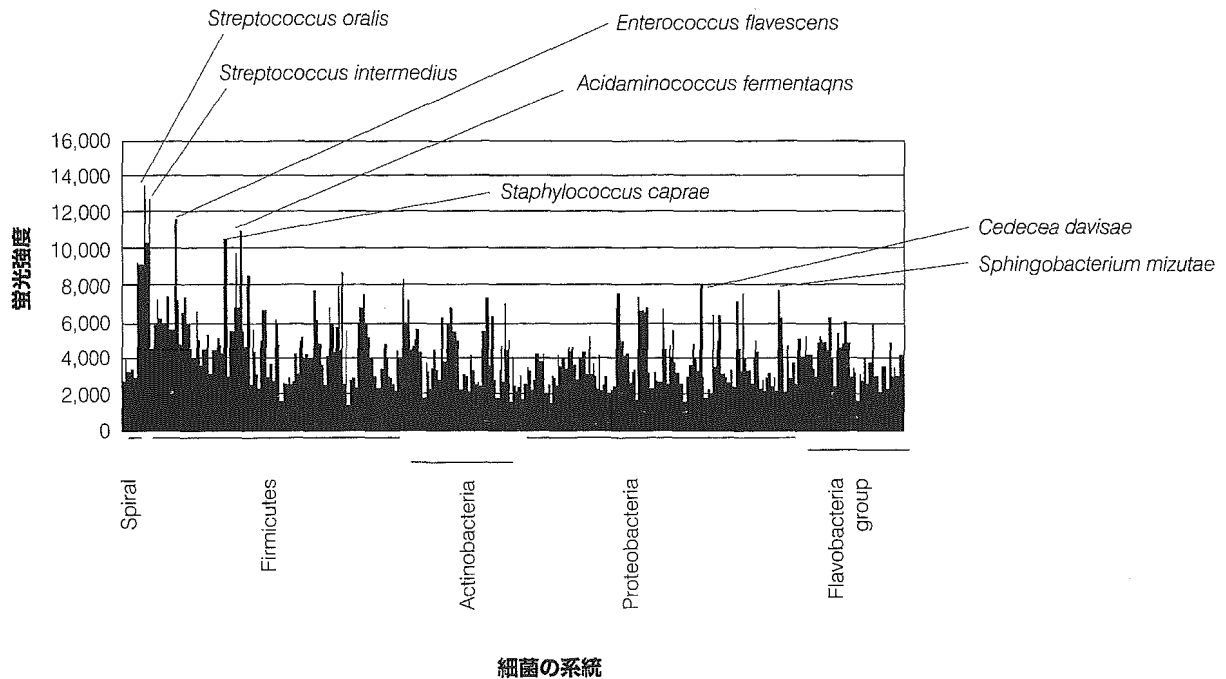
(筆者作成)

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 Proeobacteria</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>	Proteocitive 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>Chlamydomphila /Chlamydia</i> spp.	16S rDNA	272
<i>Chlamydomphila 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</i> spp.	16S rDNA	416
<i>Salmonella</i> spp.	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 albi</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 coccooides</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 pultonis</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>Faenibacillus 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

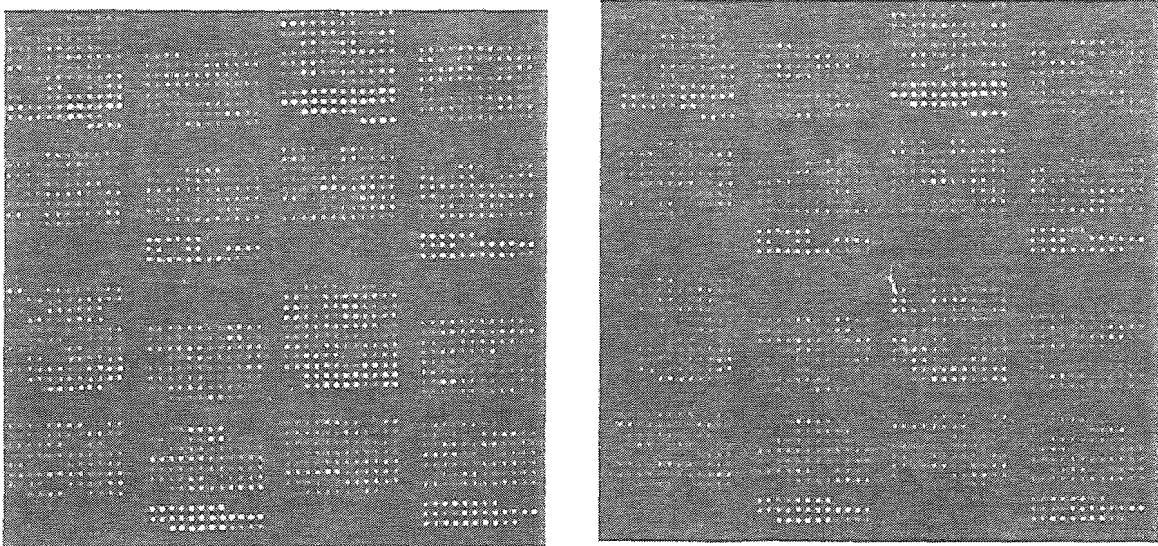


図1 石油汚染土壌の解析例

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。

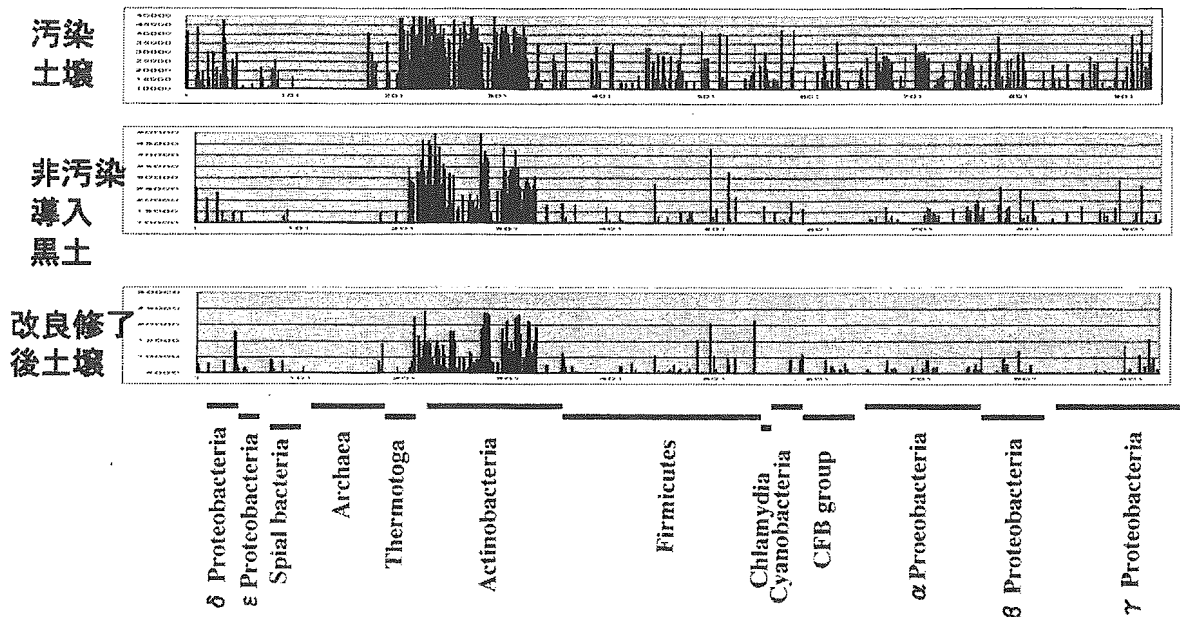


図2 汚染土壌（上）、非汚染土壌（中）、改良後（下）の比較

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)

Use of the *dnaJ* Gene for the Detection and Identification of All *Legionella pneumophila* Serogroups and Description of the Primers Used to Detect 16S rDNA Gene Sequences of Major Members of the Genus *Legionella*

Hongsheng Liu, Ying Li, Xinxiang Huang, Yoshiaki Kawamura, and Takayuki Ezaki*

Microbiology-Bioinformatics, Regeneration and Advanced Medical Science, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu, Gifu 500–8705, Japan

Received July 22, 2003. Accepted August 22, 2003

Abstract: We sequenced about 930 bp of the *dnaJ* gene from 15 *Legionella pneumophila* serogroups and some other members of the genus *Legionella*. As *L. pneumophila* 16S rDNA sequences could not discriminate between all subspecies and serogroups, we assessed the use of *dnaJ* gene sequences to differentiate between *Legionella* subspecies as well as between *L. pneumophila* serogroups. A phylogenetic analysis revealed that *dnaJ* gene sequences were more variable between the *L. pneumophila* serogroups than *mip* gene and 16S rDNA sequences. By studying 61 strains from 41 species of the genus *Legionella*, as well as other genera, we established a PCR method that could amplify 285 bp of *dnaJ* gene from all *L. pneumophila* serogroups. This primer set was more sensitive than *mip* gene primers and was able to detect 0.25 ng of purified DNA. We also describe the 16S rDNA primers that were used to detect most *Legionella* genus members.

Key words: *Legionella pneumophila*, *dnaJ*, Identification, PCR

Legionella pneumophila, the causative agent of Legionnaires' Disease and the type species of the genus *Legionella*, was first recognized in 1976 following an epidemic of acute pneumonia among veterans of the American Legion in Philadelphia, Pennsylvania, and led to the discovery of a new species and genus (7, 24). Since then, this genus has become very large with 47 species currently recognized (11, 20, 26). Nonetheless, the majority of Legionnaires' Disease cases are still attributed to *L. pneumophila* (6, 23, 28).

Routine biochemical identification methods based on phenotypic properties (biochemical tests, serotyping) are not applicable to the identification of legionellae due to their poor biochemical activities. New methods based on molecular techniques have been developed that allow a more reliable characterization of *Legionella* strains. Genotyping methods such as ribotyping (9, 15), 16S-23S intergenic spacer region PCR (29), 16S or 5S rRNA gene sequencing (1, 4, 12, 17, 25), macrophage

infectivity potentiator (*mip*) gene sequencing (27), and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) (21) have been shown to be useful in classifying isolated strains to the species level.

DnaJ, one of the members of the Hsp70 (heat-shock protein) family, co-regulates the activity of heat-shock sigma factor σ^{32} (5, 8, 13, 14). The *dnaJ* gene has been used for species identification in the genus *Mycobacterium* (3, 32), and may be a potentially useful gene for the detection and identification of other pathogenic bacteria.

Materials and Methods

Strains and cultivation. As shown in Table 1, 61 strains of *L. pneumophila* serogroups 1–15, 40 *Legionel-*

Abbreviations: ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; α -BCYE, buffered charcoal yeast extract agar plates supplemented with α -ketoglutarate and L-cysteine; CFU, colony forming unit; dNTP, deoxynucleoside triphosphate; GTC, Gifu Type Culture; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; Hsp, heat-shock protein; PCR, polymerase chain reaction; RAPD, randomly amplified polymorphic DNA; Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethane; UV, ultraviolet.

*Address correspondence to Prof. Takayuki Ezaki, Microbiology-Bioinformatics, Regeneration and Advanced Medical Science, Gifu University Graduate School of Medicine, 40 Tsukasa, Gifu, Gifu 500–8705, Japan. Fax: +81–58–267–0156. E-mail: tezaki@cc.gifu-u.ac.jp

Table 1. Amplification of *Legionella* species with *mip*, *dnaJ*, and 16S rDNA primers

Species	Other name	W 3 (<i>mip</i>)	W 8 (16S rDNA)	W 19 (<i>dnaJ</i>)
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Serogroup 1 GTC745	ATCC 33153	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Serogroup 2 GTC746	ATCC 33154	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Serogroup 3 GTC747	ATCC 33155	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> Serogroup 4 GIFU9246	ATCC 33156	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> Serogroup 5 GTC297	ATCC 33216	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Serogroup 6 GTC748	ATCC 33215	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Serogroup 7 GTC750	ATCC 33823	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Serogroup 8 GTC751	ATCC 35096	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Serogroup 9 GTC754	ATCC 35289	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Serogroup 10 GTC757	ATCC 43283	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Serogroup 11 GTC756	ATCC 43130	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Serogroup 12 GTC804	ATCC 43290	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Serogroup 13 GTC805	ATCC 43736	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Serogroup 14 GTC806	ATCC 43703	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> Serogroup 15 GTC807	ATCC 35251	+	+	+
<i>Legionella adelaidensis</i> GTC697 ^T	ATCC 35292	-	+	-
<i>Legionella anisa</i> GTC464 ^T	ATCC 35292	-	+	-
<i>Legionella birminghamsensis</i> GIFU11749 ^T	ATCC 43702	-	+	-
<i>Legionella bozemanii</i> GIFU9141 ^T	ATCC 33217	-	+	-
<i>Legionella brunensis</i> GTC515 ^T	ATCC 43677	-	+ ^{d)}	-
<i>Legionella cherrii</i> GTC374 ^T	ATCC 35252	-	+ ^{b)}	-
<i>Legionella cincinmatiensis</i> GTC477 ^T	ATCC 43753	-	+	-
<i>Legionella dumoffii</i> GIFU9244	ATCC 33343	-	+	-
<i>Legionella erythra</i> GIFU11748 ^T	ATCC 35303	-	+	-
<i>Legionella fairfieldensis</i> GTC698 ^T	ATCC 49588	-	+	-
<i>Legionella feeleei</i> GTC322 ^T	ATCC 35072	-	+	-
<i>Legionella geestiana</i> GTC703 ^T	ATCC 49504	-	+	-
<i>Legionella gormanii</i> GTC300 ^T	ATCC 33297	-	+	-
<i>Legionella gratiana</i> GTC699 ^T	ATCC 49413	-	+	-
<i>Legionella hackeliae</i> GIFU10740 ^T	ATCC 35250	-	+	-
<i>Legionella israelensis</i> GIFU11367 ^T	ATCC 43119	-	+ ^{c)}	-
<i>Legionella jamestowniensis</i> GIFU10741 ^T	ATCC 35298	-	+ ^{d)}	-
<i>Legionella jordanis</i> GIFU3193 ^T	ATCC 33623	-	+	-
<i>Legionella londiniensis</i> GTC741 ^T	ATCC 49505	-	+ ^{c)}	-
<i>Legionella longbeachae</i> GIFU9245 ^T	ATCC 33462	-	+ ^{b)}	-
<i>Legionella micdadei</i> GTC299 ^T	ATCC 33218	-	+	-
<i>Legionella moravica</i> GTC513 ^T	ATCC 49180	-	+	-
<i>Legionella nautarum</i> GTC742 ^T	ATCC 49506	-	+	-
<i>Legionella oakridgensis</i> GIFU10061 ^T	ATCC 33761	-	+ ^{d)}	-
<i>Legionella parisiensis</i> GTC444 ^T	ATCC 35299	-	+	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> GTC302 ^T	ATCC 33156	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> GTC296 ^T	ATCC 33152	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i> GTC702 ^T	ATCC 33737	+	+	+
<i>Legionella quateirensis</i> GTC743 ^T	ATCC 49507	-	+	-
<i>Legionella quinlivanii</i> GTC512 ^T	ATCC 43830	-	+	-
<i>Legionella rubrilucens</i> GIFU10743 ^T	ATCC 35304	-	+	-
<i>Legionella sainthelensi</i> GIFU10392 ^T	ATCC 35248	-	+	-
<i>Legionella santicrucis</i> GIFU11746 ^T	ATCC 35301	-	+	-
<i>Legionella shakespearei</i> GTC701 ^T	ATCC 49655	-	+	-
<i>Legionella spiritensis</i> GIFU11199 ^T	ATCC 35249	-	+	-
<i>Legionella steigerwaltii</i> GIFU11747 ^T	ATCC 35302	-	+	-
<i>Legionella tucsonensis</i> GTC516 ^T	ATCC 43878	-	+	-
<i>Legionella wadsworthii</i> GIFU10062 ^T	ATCC 33877	-	+	-
<i>Legionella waltersii</i> GTC1737 ^T	DSM 10501	-	+ ^{b)}	-
<i>Legionella worsleiensis</i> GTC744 ^T	ATCC 49508	-	+	-

Table 1. (continued)

<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> GIFU11962 ^T	ATCC 23055	–	–	–
<i>Burkholderia cepacia</i> GTC13 ^T	ATCC 25416	–	–	–
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> GTC8 ^T	ATCC 13253	–	–	–
<i>Escherichia coli</i> GTC503 ^T	ATCC 11775	–	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GTC2 ^T	ATCC 10145	–	–	–
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> GTC120 ^T	ATCC 33861	–	–	–

+: PCR positive.

–: PCR negative.

^a *L. brunensis* was amplified using W 8 forward 6 and W 8 reverse primers.

^b *L. cherrii* was amplified using W 8 forward 5 and W 8 reverse primers.

^c *L. israelensis* was amplified using W 8 forward 4 and W 8 reverse primers.

^d *L. jamestowniensis* was amplified using W 8 forward 6 and W 8 reverse primers.

^e *L. londiniensis* was amplified using W 8 forward 7 and W 8 reverse primers.

^f *L. longbeachae* was amplified using W 8 forward 2 and W 8 reverse primers.

^g *L. oakridgensis* was amplified using W 8 forward 1 and W 8 reverse 1 primers.

^h *L. waltersii* was amplified using W 8 forward and W 8 reverse 2 primers.

la species and 6 other genera were used in this study. *Legionella* strains were incubated on buffered charcoal yeast extract agar plates supplemented with α -ketoglutarate and L-cysteine (α -BCYE) at 37 C in 5% CO₂ for 3–5 d. Bacteria from other genera were incubated on nutrient agar at 28 to 37 C depending on the species for 1–3 d.

dnaJ sequencing and phylogenetic analysis. As only one *dnaJ* sequence from *L. pneumophila* was available when this study was initiated, we compared the *L. pneumophila dnaJ* sequence with sequences from other closely related proteobacteria. Based on this analysis, we designed *dnaJ*-specific primers to identify *Legionella* species. After trying several primers, we finally selected the following primer set: DN 13 F (forward) primer: 5'-AGCGGGATTATATGAAC-3', and New LG-R (reverse) primer: 5'-GACCGGTGTTTCTACAAC-3'. The amplicon is about 930 bp.

Amplicon sequences were determined using a DNA sequencing kit (BigDye™ terminator V3.0 cycle sequencing Ready Reaction) (Lot No. 0208111, Applied Biosystems, Tokyo) with forward and reverse primers and a 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Hitachi, Japan). For sequencing reactions, 50 ng purified PCR product, 32 pmol primer, and 4 μ l BigDye terminator premix were mixed and adjusted to a final volume of 20 μ l with distilled water. Reactions were run for 25 cycles of 10 sec at 95 C, 5 sec at 50 C, and 4 min at 60 C. As a double check, both strands were sequenced. *dnaJ* gene sequences from the 15 *L. pneumophila* serogroups and some *Legionella* species were compared by multiple alignment using CLUSTAL W (31). Phylogenetic distances were calculated by the neighbor-joining method (31), with and without gaps, and their similarities were calculated (Tables 2 and 3).

For comparative purposes, we obtained *mip* gene sequences from the *L. pneumophila* serogroups (27) and 16S rDNA sequences from some *Legionella* species as deposited in the GenBank by Ratcliff (27), Fry (12), Hookey (17) and Park (26). After sequence alignment using CLUSTAL W (version 1.7) (31), phylogenetic distances and similarities were analyzed (Tables 2 and 3).

Designing PCR detection primer for Legionella spp. and L. pneumophila. With compared sequences of *Legionella*, we designed the detective primer set of W 19 forward (*dnaJ*) primer, 5'-AGGTGGTTTTGGCG-GATTTGG-3' and W 19 reverse (*dnaJ*) primer, 5'-TGAATTCTGACTTGCCCCATG-3' for *Legionella pneumophila*, which gave an amplicon of 285 bp. We also designed primers to amplify the *mip* gene and 16S rDNA sequences for comparison: W 3 forward (*mip*) primer, 5'-GATAAGTTGTCTTATAGCAT-3'; W 3 reverse (*mip*) primer, 5'-TTTCACTGAAATTAAGT-GAA-3'; W 8 forward (16S rDNA) primer, 5'-AGCATKGTCTAGCTTGCTAG-3'; W 8 reverse (16S rDNA) primer, 5'-TCCTCCCCACTGAAAGTG-3'.

To assess primer sensitivity, purified DNA from *L. pneumophila* GTC296^T (ATCC 33152) was used as the template DNA. For sensitivity for living bacteria, fresh *L. pneumophila* GTC296^T cells were cultured on α -BCYE agar plates for 3 d, suspended in distilled water, and diluted using a 10-fold gradient. Live cells were counted by inoculation on α -BCYE agar plates. Dilutions were then used immediately as template DNA for PCR after boiling for 5 min.

Bacterial samples were boiled for 5 min and the crude DNA preparations were then used as template DNA for PCR. PCR mixtures contained 0.1 μ M each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.2 μ M each primer, 1 U Taq™ polymerase (Takara Shuzo Co., Ltd., Otsu, Japan)

Table 2. Similarity between *dnaJ* sequences (lower left) and *mip* sequences (upper right) of *Legionella pneumophila* subspecies

Subspecies	% Nucleotide similarity														
	GTC296 ¹	GTC746	GTC747	GTC302	GTC702	GTC748	GTC750	GTC751	GTC754	GTC757	GTC803	GTC804	GTC805	GTC806	GTC807
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> serogroup 1 GTC296 ¹	98.2	98.3	98.5	95.1	98.5	99.0	98.7	98.7	98.7	99.7	98.7	99.7	99.7	99.7	98.7
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> serogroup 2 GTC746	96.3	98.5	99.0	95.9	99.0	98.4	98.5	99.2	99.2	98.2	99.2	98.2	98.2	98.2	99.5
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> serogroup 3 GTC747	96.5	96.3	99.5	95.3	99.0	98.2	98.3	99.0	99.2	98.0	99.2	98.0	98.0	98.0	98.0
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> serogroup 4 GTC302	91.6	93.1	93.1	95.6	99.0	98.4	98.5	99.2	99.2	98.2	99.2	98.2	98.2	98.2	98.5
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascallei</i> serogroup 5 GTC702	90.5	92.0	91.2	94.3	96.2	95.6	95.7	96.2	96.1	95.1	96.1	95.1	95.1	95.1	95.4
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> serogroup 6 GTC748	97.0	96.7	97.0	91.9	90.5	98.7	98.9	99.5	99.8	98.5	99.8	98.5	98.5	98.5	98.5
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> serogroup 7 GTC750	97.5	97.9	98.5	93.2	91.9	97.3	99.2	98.9	98.9	99.5	98.9	99.5	99.5	99.5	98.9
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> serogroup 8 GTC751	96.6	97.0	97.2	92.5	91.2	97.2	97.9	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	98.4
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> serogroup 9 GTC754	96.3	97.6	95.6	92.5	91.3	95.8	96.9	96.0	99.7	98.7	99.7	98.7	98.7	98.7	98.7
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> serogroup 10 GTC757	96.8	96.9	96.9	92.6	91.3	96.9	98.5	97.3	96.5	98.7	100.0	98.7	98.7	98.7	98.7
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> serogroup 11 GTC803	96.4	97.8	96.4	93.0	91.8	96.3	97.2	96.0	97.3	96.4	98.7	100.0	100.0	100.0	98.7
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> serogroup 12 GTC804	98.3	98.6	98.4	93.3	92.3	99.2	98.9	99.0	97.5	98.8	97.8	98.7	98.7	98.7	98.7
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> serogroup 13 GTC805	96.3	98.0	95.8	93.2	92.1	96.0	97.4	96.2	98.4	97.2	98.2	97.9	100.0	100.0	98.7
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> serogroup 14 GTC806	96.3	97.1	97.0	92.3	91.3	96.4	98.3	96.9	96.0	98.1	96.1	98.8	96.5	96.5	98.7
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> serogroup 15 GTC807	88.9	91.1	91.1	97.5	92.3	90.9	91.3	91.0	90.8	90.0	91.1	92.7	90.1	89.5	

Sequenced length of the *dnaJ* gene is about 930 bp and that of *mip* is about 700 bp.

Table 3. Similarity between *dnaJ* sequences (lower left) and 16S rDNA sequences (upper right) of *Legionella* species

No.	Species	% Nucleotide similarity																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	<i>L. adelaiddensis</i> GTC697	95.6	94.9	94.9	94.9	94.8	95.0	92.5	95.4	95.4	93.9	94.8	95.0	95.2	95.2	93.6	94.9	93.8	93.4	94.9	95.0	94.9	
2	<i>L. brunensis</i> GTC515	76.9	95.4	95.2	95.1	96.4	92.8	95.3	97.0	93.8	96.0	96.0	96.6	96.6	96.7	94.7	96.1	93.5	93.8	96.0	95.5	95.8	
3	<i>L. cherrii</i> GTC374	76.2	76.3	96.4	93.6	95.6	92.2	96.9	95.2	93.0	97.0	97.0	97.1	96.9	94.8	97.5	94.7	95.1	97.1	98.8	96.0		
4	<i>L. cincinnatiensis</i> GTC477	77.8	75.1	79.5	95.0	94.7	91.8	97.0	94.2	94.0	98.1	96.4	96.3	96.2	94.7	98.4	98.2	94.8	96.8	96.5	96.2		
5	<i>L. fairfieldensis</i> GTC698	92.6	75.9	75.6	78.5	95.4	93.2	94.6	94.4	94.1	94.5	94.7	94.4	94.6	93.5	94.3	93.6	93.6	94.5	93.8	94.4		
6	<i>L. feeleii</i> GTC322	73.1	72.0	71.2	71.9	71.9	93.6	95.3	95.5	93.1	95.0	95.4	95.4	95.1	93.9	95.4	93.0	93.8	95.6	95.7	94.5		
7	<i>L. geestiana</i> GTC703	92.5	77.3	76.9	77.6	96.9	72.2	92.4	93.3	91.4	92.4	93.3	93.3	92.7	91.5	92.2	90.6	91.6	92.0	92.5	92.1		
8	<i>L. gratiana</i> GTC699	77.2	75.8	80.7	88.6	77.8	72.6	77.7	94.4	92.8	97.4	96.8	96.7	96.7	95.3	97.3	95.6	94.8	97.1	96.7	96.2		
9	<i>L. hackeliae</i> GIFU10740	73.7	70.7	72.4	71.3	72.9	75.4	72.1	71.8	93.3	95.6	95.7	95.5	95.0	93.1	94.6	92.8	93.5	94.9	94.4	94.6		
10	<i>L. israelensis</i> GIFU11367	69.7	66.3	68.7	70.7	69.1	67.9	68.6	69.7	69.1	92.9	93.7	94.1	94.0	91.5	93.3	92.1	92.0	93.3	93.2	92.9		
11	<i>L. longbeachae</i> GIFU9245	77.6	76.3	81.8	90.8	76.9	72.9	76.5	89.4	72.2	69.1	97.3	97.0	96.3	95.2	98.9	96.5	94.7	96.6	96.7	96.9		
12	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> GTC296	90.7	75.2	74.4	76.8	88.7	71.5	88.8	76.2	71.6	68.8	75.7	99.3	99.1	95.5	97.0	94.9	94.8	96.9	97.0	96.7		
13	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> GTC302	98.3	77.5	76.9	77.3	92.6	73.2	93.1	76.9	73.1	69.1	76.8	90.4	99.6	95.6	96.8	94.8	94.8	96.6	97.4	96.9		
14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascuallei</i> GTC702	94.1	76.7	76.6	78.7	98.2	72.5	97.7	78.7	72.5	69.3	77.9	90.1	93.6	95.7	96.7	94.8	94.8	96.7	97.1	97.0		
15	<i>L. quateirensis</i> GTC743	77.6	84.8	76.4	76.6	78.0	71.9	77.0	76.7	72.3	70.6	76.4	76.0	77.1	77.4	95.6	93.6	96.0	94.8	95.3	97.5		
16	<i>L. sainthelensi</i> GIFU10392	78.9	77.4	81.2	88.8	77.7	72.4	78.2	88.2	72.5	68.8	90.9	77.2	79.1	78.7	76.8	96.6	94.6	97.0	97.6	97.2		
17	<i>L. santicrucis</i> GIFU11746	78.6	75.6	80.3	92.2	78.6	72.7	78.1	90.8	72.0	69.5	90.9	76.9	77.8	79.6	76.3	89.5	93.9	95.4	94.7	95.4		
18	<i>L. shakespearei</i> GTC701	75.5	76.6	76.1	75.0	75.9	69.7	74.6	76.3	72.1	69.4	76.2	74.1	75.1	75.9	77.3	76.3	76.5	94.4	94.9	96.0		
19	<i>L. tucsonensis</i> GTC516	75.1	72.2	70.7	73.1	72.7	77.5	73.8	73.9	79.0	69.3	73.1	72.8	74.7	73.8	74.2	73.8	74.7	71.9	96.8	95.7		
20	<i>L. wadsworthii</i> GIFU10062	79.2	76.8	82.0	81.9	78.0	72.6	77.9	80.2	71.1	70.2	81.3	77.9	78.8	78.8	76.2	80.9	80.9	75.1	73.5	96.4		
21	<i>L. worsteiensis</i> GTC744	77.5	80.0	75.5	75.1	77.2	72.0	76.7	76.2	73.1	70.5	76.2	75.7	76.7	77.5	83.9	76.6	75.5	76.2	73.8	76.3		

Sequenced length of the *dnaJ* gene is about 930 bp and that of 16S rDNA is about 1,300 bp.