

Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 の

分子疫学的研究

2009 年

横山栄二

目 次

目次	1
緒言	2
本論	7
第1章 イエネズミから分離された DT104 の分子疫学的研究	8
第1節 イエネズミにおける DT104 保菌の分子疫学的研究	
1. 序論	9
2. 結果	11
3. 考察	17
第2節 DT104 の DNA fingerprinting 法の研究	
1. 序論	20
2. 結果	22
3. 考察	26
第3節 実験の部	
1. 材料	28
2. 方法	30
第2章 イエネズミおよびヒト由来 DT104 の分子疫学的比較研究	35
第1節 ヒトから分離された DT104 の分子疫学的研究	
1. 序論	36
2. 結果	38
3. 考察	42
第2節 イエネズミおよびヒト由来 DT104 の系統学的研究	
1. 序論	44
2. 結果	46
3. 考察	50
第3節 実験の部	
1. 材料	52
2. 方法	52
総括	53
謝辞	55
参考文献	56
主論文目録	65
審査委員名	66

緒 言

Salmonella はヒトおよび動物にチフス性疾患を引き起こすほか、ヒトの食中毒の原因となる¹⁾。分類学的に、Genus *Salmonella* には *S. enterica* と *S. bongori* の2つの species が存在し²⁾、さらに *S. enterica* には6つの subspecies が存在することが知られている³⁾ (表1)。Genus *Salmonella* のうち、ヒトおよび動物の疾患の原因となるのは、日和見感染を除くと原則的には *S. enterica* subsp. *enterica* および *S. enterica* subsp. *arizonae* である¹⁾。

表1 Genus *Salmonella*の種および亜種

種	亜種	主な宿主域
<i>S. enterica</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	ヒト、温血動物
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	冷血動物
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	ヒト、冷血動物
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	冷血動物
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	冷血動物
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	冷血動物
<i>S. bongori</i>		冷血動物

近年、我が国におけるヒトのチフス性疾患の患者数は年間数名程度であり、公衆衛生上の問題とはなっていない⁴⁾。一方、*S. enterica* による食中毒の患者数は年間1,500名程度で⁵⁾、細菌性食中毒の発生原因としては1位を占めており、依然として公衆衛生上の重要な問題となっている。このような傾向は我が国だけでなく、アメリカ合衆国では、細菌性食中毒の1/4を *S. enterica* による食中毒が占めている⁶⁾。

Genus *Salmonella* では、菌体成分の抗原性の違いに基づく血清型別が古くから研究されており、疫学マーカーとして現在でも使用されている^{1,6)}。我が国で食中毒の原因となった *S. enterica* の血清型の推移を見てみると、1980年代後半までは *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) が1位であったが、1990年代以降は *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) が1位を占めるようになった⁵⁾ (図1)。

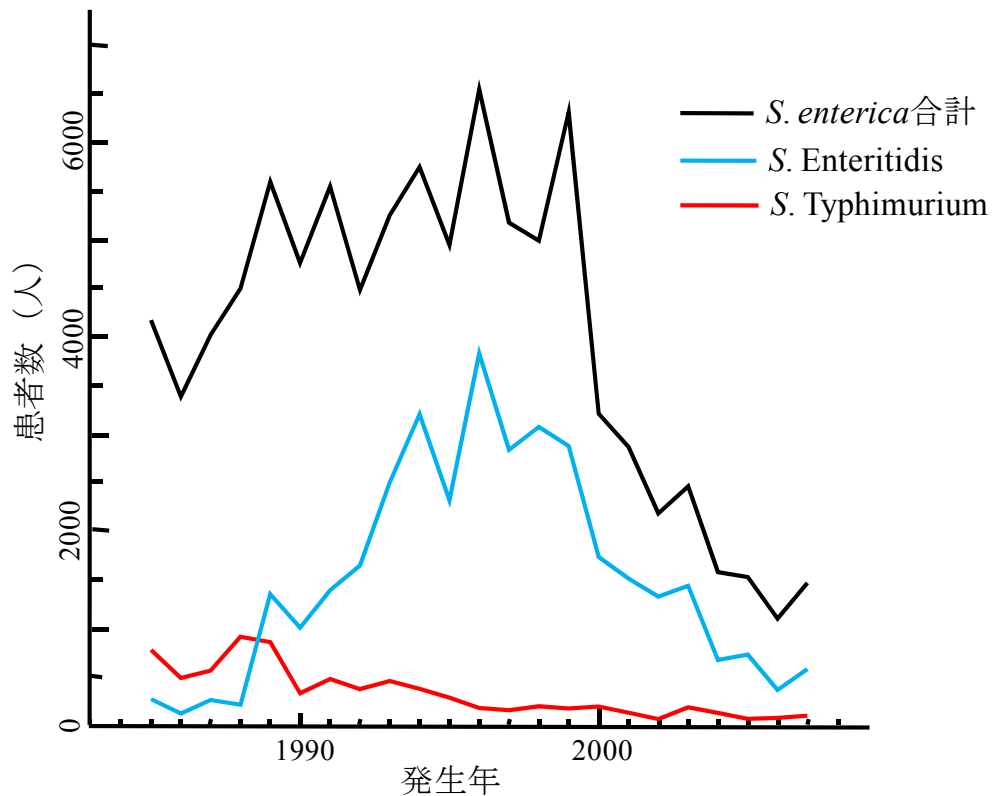


図1 *S. enterica*による食中毒患者数と血清型の推移

ところが、ヨーロッパおよびアメリカ合衆国において1980年代後半に突如として多剤耐性 *S. Typhimurium* による食中毒の発生が報告されるようになった⁷⁾。その原因となった *S. Typhimurium* は、バクテリオファージの感受性による definitive phage typing (DT ファージ型別) によって DT104 に型別され、多剤耐性遺伝子を integron と言われる水平伝播が可能な遺伝子構造に保有している特徴があった。1 剤以上の薬剤に耐性を有する *S. Typhimurium* に感染した場合、感受性の *S. Typhimurium* に感染した場合と比べて重症化しやすいということが報告⁸⁻¹⁰⁾され、多剤耐性の *S. Typhimurium* DT104 (DT104) が公衆衛生上の重大な問題となった。

その後、国際的な共同研究により世界各地に多剤耐性 DT104 が存在することが明らかとなった⁷⁾。我が国においては、1999年に松下ら¹¹⁾が散発下痢症患者由来の *S. Typhimurium* 菌株を retrospective に調査したところ、1987年の国内事例由来株が多剤耐性 DT104 であることを明らかにした。また、2005年には多剤耐性 DT104 による集団食中毒の発生が確認された¹²⁾。

世界各地で分離された多剤耐性 DT104 を分子疫学的に解析してみると、保有する integron および薬剤耐性遺伝子が同一であり^{13,14)}、DNA fingerprinting パターンが非常に類似する¹⁵⁾ことが判明し、unique clone 由来の pandemic であることが指摘されている¹⁶⁾。一般的に薬剤耐性菌が pandemic する機序としては、食用動物の生産現場で抗生物質の使用量が増加したために薬剤耐性菌

が選択的に増加する、という「薬剤選択圧説」¹⁷⁻²¹⁾と、祖先型 (ancestor) の病原細菌になんらかの変異が起こって生存する能力が高まったために流行を引き起こす、という「clonal dissemination 説」^{13,16,22)}がある。

世界各地で分離される多剤耐性 DT104 が unique clone 由来である^{13,16)}ことから、「clonal dissemination 説」が有力であるが、未だにそれを裏付ける決定的な evidence はない。その理由としては、多剤耐性 DT104 の疫学調査が食用動物を対象にしている場合が多く²³⁾、食用動物の餌に抗生物質が含まれているために薬剤選択圧の影響を完全に除去することが出来ないためである。

「clonal dissemination 説」を裏付けるためには、抗生物質の使用に無関係な野生動物の DT104 保菌調査が必要となるが、野生動物の DT104 保菌状況についての情報はほとんどない。野鳥^{14,15)}や貝類¹⁶⁾からの検出が報告されているが、その検出率が低いことから偶発的な汚染である疑いが残る。

さらに、DT104 の分布調査等の疫学的研究を実施するにあたって、2つの問題点がある。一つは、DT104 を同定するための DT フェージ型別を実施可能な機関が少ないことである。我が国においては DT フェージ型を実施可能な機関は現時点では2機関のみである。そのため、DT104 の動向を把握する目的で日常的に食中毒患者や食品等から分離される *S. Typhimurium* 菌株の全てを DT フェージ型別することは困難である。

近年、PCR を用いた DT104 の同定法が報告された。Pritchett ら²⁷⁾は、多剤耐性 DT104 の 16S-23S rRNA 領域の塩基配列が他のフェージ型の *S. Typhimurium* とは異なることを見出し、PCR を用いて DT104 の同定が可能であると報告した。しかしこの方法では、DT104 に近縁なフェージ型である U302 も陽性反応を示すことが指摘されている^{27,28)}。一方、Hermans ら²⁹⁾は DT104 のゲノム中に存在するプロフェージに着目し、多剤耐性 DT104 に安定的に存在する領域を見出し、それを PCR で検出する方法を報告した。しかし、プロフェージは脱落することがある³⁰⁾ため、Hermans らが報告した PCR²⁹⁾だけで全ての DT104 を同定可能であるかどうかは疑問が残る。

DT104 の疫学的研究における第二の問題点として、有効な DNA fingerprinting 法がないことがあげられる。病原細菌の DNA fingerprinting 法としてはパルスフィールド・ゲル電気泳動法 (PFGE) が gold standard として用いられることが多いが、DT104 ではほとんどの菌株が非常に類似した PFGE パターンを示すことが報告されており¹³⁾、DT104 菌株間の類似性を知ることが出来ない。

近年、ゲノム中に存在する繰り返し配列における繰り返し数の変異に基づく variable-number tandem repeat (VNTR) 型別が様々な病原細菌の DNA fingerprinting に用いられるようになった³¹⁾。DT104 に関しても、Lindstedt ら³²⁾によって VNTR 型別法が開発され、同一 PFGE パターンの DT104 菌株を細

分化可能であると報告されたが、安定性の面で問題があることが指摘されており³³⁾、より詳細な検討が必要である。

そこで本研究では、DT104 の世界的 pandemic の機序を明らかにするために、抗生物質の使用と無関係なイエネズミ由来の *S. Typhimurium* 菌株を用いて、イエネズミにおける DT104 保菌の有無を調査し、DT104 菌株について分子疫学的解析を行った。併せて、DT104 の疫学調査の問題点である DT104 の同定法および DNA fingerprinting 法について検討した。次に、ヒト由来 *S. Typhimurium* 菌株中の DT104 を調査し、イエネズミ由来 DT104 菌株を用いた DNA fingerprinting の問題点の改善結果を確認した。最後に、イエネズミおよびヒト由来 DT104 を系統的に比較検討した。

本 論

第 1 章

イエネズミから分離された DT104 の分子疫学的研究

第1節 イエネズミにおける DT104 保菌の分子疫学的研究

1. 序論

齧歯類は様々な動物由来感染症の病原体を保有している³⁴⁾が、齧歯類との接触によって *S. enterica* に感染した事例も報告されている^{35,36)}。さらに齧歯類は、環境中における *S. enterica* 循環の一役を担っていると考えられている³⁷⁾。

食用動物の飼養環境においては、野生の齧歯類が食用動物の餌を食べるために飼養環境に進入することがしばしば起こる。その際に野生齧歯類が糞便を排泄し、その糞便を食用動物が餌と一緒に摂取することで野生齧歯類から食用動物へ *S. enterica* が伝播することが指摘されている^{38,39)}。ヒトの *S. enterica* 食中毒の原因は汚染された食物の喫食による¹⁾が、野生齧歯類はその生産現場に *S. enterica* を伝播する役割を果たしている。したがって、食用動物生産現場への野生齧歯類の侵入は、ヒトの *S. enterica* 食中毒の制御にあたっての重大な問題点である。

その一方で、ヒトの生活域近くに生息する野生齧歯類の *S. enterica* 保菌に関する情報は少ない。Healing ら⁴⁰⁾は、調査したネズミ類のうち 10%から *S. enterica* を検出したが、そのほとんどが脾臓または肝臓からの分離であり糞便からの検出率が低かったことから、公衆衛生上の危害は少ないと考察した。その一方で Hilton ら⁴¹⁾は、調査したイエネズミの 8%の糞便から *S. enterica* を検出し、*S. enterica* が検出された糞便を室温で放置したところ 86 日後まで検出可能であり、齧歯類の糞便による環境汚染が懸念されることを指摘している。

著者らは、1997～1998 年に横浜市 of 2 つの雑居ビル(YS ビルおよび J ビル)に生息するイエネズミを捕獲し、*S. enterica* の保菌状況を調査した⁴²⁾。クマネズミ (*Rattus rattus*) 256 匹およびドブネズミ (*R. norvegicus*) 83 匹の計 339 匹のうち 60 匹 (17.7%) の腸内容物から *S. enterica* が分離された。血清型別の結果、58 匹が *S. Typhimurium* を、2 匹が *S. Enteritidis* を保菌していたことが明らかとなった (表 2)。調査時におけるヒトの主要な食中毒原因血清型は *S. Enteritidis* であり⁵⁾、イエネズミにおける血清型の分布傾向はそれとは明らかに異なっていた。そのため、イエネズミにおける *S. enterica* 保菌の公衆衛生上の重要性を評価するためには、分離された *S. Typhimurium* 菌株についてより詳細な研究が必要であると思われた。

表2 イエネズミの捕獲場所別*S. enterica* 保菌状況

捕獲場所	イエネズミの種類	陽性数／調査数 (%)
YSビル	<i>R. rattus</i>	21/146 (14.4)
	<i>R. norvegicus</i>	7/ 32 (21.9)
Jビル	<i>R. rattus</i>	21/110 (19.1)
	<i>R. norvegicus</i>	11/ 51 (21.6)
計		60/339 (17.7)

これらの *S. Typhimurium* 菌株は、イエネズミが抗生物質の使用と無関係であることから、薬剤選択圧の影響は受けていない。したがって、その *S. Typhimurium* 菌株中に偶発的汚染では考えられない程度に DT104 が存在すれば、DT104 が clonal dissemination を起こしたことの evidence となる可能性がある。

そこで、イエネズミから分離された *S. Typhimurium* 菌株について、DT フェージ型別および PCR による DT104 の同定を行った。DT104 と同定された菌株については、unique clone 由来であることを確認するために、Kirby-Bauer 法 (KB 法)による薬剤感受性試験を行い、さらに分子疫学的解析として PCR による integron および薬剤耐性遺伝子の保有状況、PFGE による DNA fingerprinting を行った。

2. 結果

(1) DT フェージ型別

イエネズミから分離された *S. Typhimurium* 58 株のうち、52 株が DT フェージ型別により DT104 と同定された。52 株の内訳は、YS ビルで捕獲されたイエネズミ由来 26 株および J ビルで捕獲されたイエネズミ由来 26 株であった。また、DT104 と同定された 52 株の全てが、Pritchett ら²⁷⁾および Hermans ら²⁹⁾の PCR によっても DT104 と同定された。一方、DT フェージ型別によって non DT104 と判定された 6 株のうち、J ビル由来の 1 株 (SH201 株) において PCR で DT104 と同じサイズの増幅バンドが確認された (図 2、3)

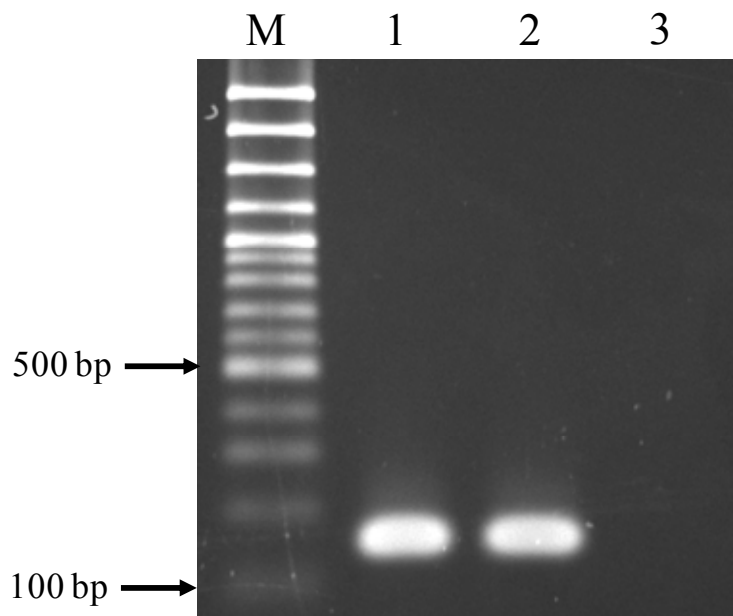


図2 PritchettらのPCRによるDT104の同定

Lane M: 分子量マーカー
Lane 1: SH001 (DT104)
Lane 2: SH201 (non DT104)
Lane 3: LT2

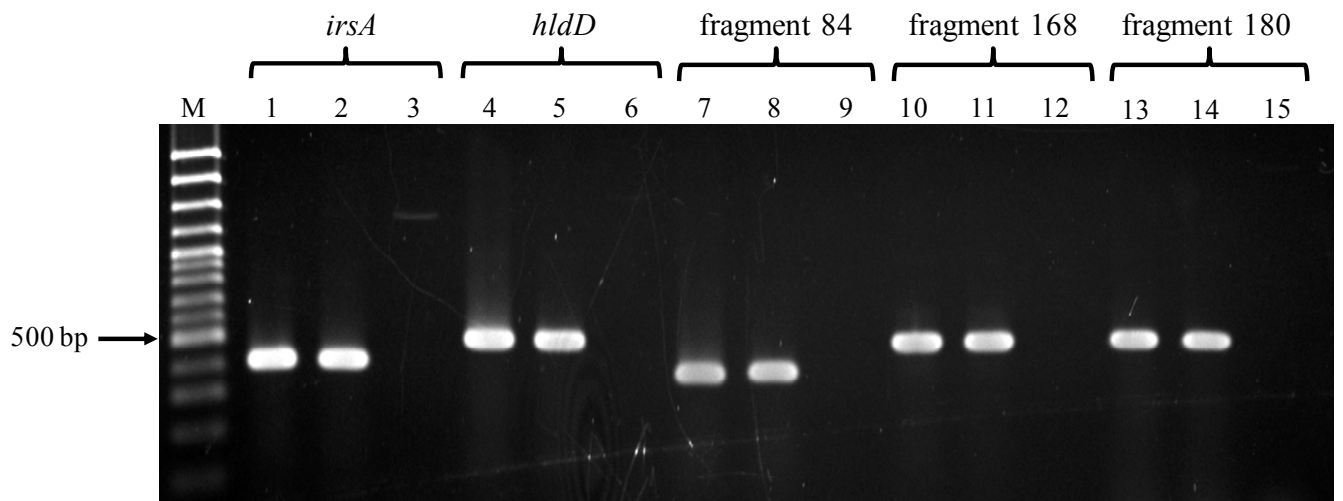


図3 HermansらのPCRによるDT104の同定

Lane M: 分子量マーカー

Lane 1, 4, 7, 10, 13: SH001 (DT104)

Lane 2, 5, 8, 11, 14: SH201 (non DT104)

Lane 3, 6, 9, 12, 15: LT2

(2) 薬剤感受性試験および薬剤耐性遺伝子検索

KB 法による薬剤感受性試験の結果、26 株の YS ビル由来 DT104 菌株全てがアンピシリンおよびスルフィソキサゾール (ASu) に耐性を示した。一方、26 株の J ビル由来 DT104 菌株のうち 24 株がアンピシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、スルフィソキサゾール、およびテトラサイクリン (ACSSuT) に耐性を示した。残り 2 株の J ビル由来 DT104 菌株は、ストレプトマイシンおよびスルフィソキサゾール (SSu) に耐性を示した (表 3)。

DT フェージ型別および PCR で non DT104 と判定された 5 株は、供試した 13 薬剤の全てに感受性であった。DT フェージ型と PCR の結果が一致しなかった SH201 株は、SSu 耐性パターンであった (データ示さず)。

表3 イエネズミ由来DT104の薬剤耐性パターン

捕獲日	捕獲場所	イエネズミの種類	DT104 陽性数	薬剤耐性パターン		
				ACSSuT	ASu	SSu
1997.10.17	Jビル	<i>R. rattus</i>	9	9		
1997.10.24	YSビル	<i>R. rattus</i>	1		1	
1997.11.20	Jビル	<i>R. norvegicus</i>	2	2		
1997.11.26	YSビル	<i>R. norvegicus</i>	1		1	
1997.12.18	Jビル	<i>R. rattus</i>	3	2		1
		<i>R. norvegicus</i>	2	1		1
1998.1.23	YSビル	<i>R. rattus</i>	2		2	
		<i>R. norvegicus</i>	3		3	
1998.2.20	YSビル	<i>R. rattus</i>	1		1	
		<i>R. norvegicus</i>	1		1	
1998.5.26	Jビル	<i>R. rattus</i>	3	3		
		<i>R. norvegicus</i>	2	2		
1998.4.23	Jビル	<i>R. rattus</i>	2	2		
		<i>R. norvegicus</i>	3	3		
1998.5.21	YSビル	<i>R. rattus</i>	1		1	
1998.6.19	YSビル	<i>R. rattus</i>	1		1	
		<i>R. norvegicus</i>	1		1	
1998.6.24	YSビル	<i>R. rattus</i>	3		3	
		<i>R. norvegicus</i>	1		1	
1998.8.25	YSビル	<i>R. rattus</i>	7		7	
1998.9.18	YSビル	<i>R. rattus</i>	3		3	
計	Jビル	<i>R. rattus</i>	17	16		1
		<i>R. norvegicus</i>	9	8		1
	YSビル	<i>R. rattus</i>	19		19	
		<i>R. norvegicus</i>	7		7	

PCR を用いて薬剤耐性遺伝子および *integron* の検索を行ったところ、ASu 耐性パターンを示した 26 株の YS ビル由来 DT104 菌株全てから、1.2kbp の *integron*、*pse1*、および *sull* の増幅バンドが確認された (図 4)。一方、ACSSuT 耐性パターンを示した 24 株の J ビル由来 DT104 菌株全てから、1.2kbp および 1.0kbp の *integron* と *pse1*、*floR*、*aadA2*、*sull* および *tet(G)* の増幅バンドが確認された (図 5)。また、SSu 耐性パターンを示した 2 株の J ビル由来 DT104 菌株からは、1.0kbp の *integron* と *aadA2* および *sull* の増幅バンドが確認された (図 6)。

DT フェージ型別および PCR で non DT104 と判定された 5 株は、*integron* および今回調査した薬剤耐性遺伝子の増幅バンドが確認されなかった。DT フェージ型別と PCR で DT104 同定結果が一致しなかった SH201 株は、SSu 耐性パターンを示した 2 株の J ビル由来 DT104 菌株と同一の *integron* および薬剤耐性遺伝子を保有していた (データ示さず)。

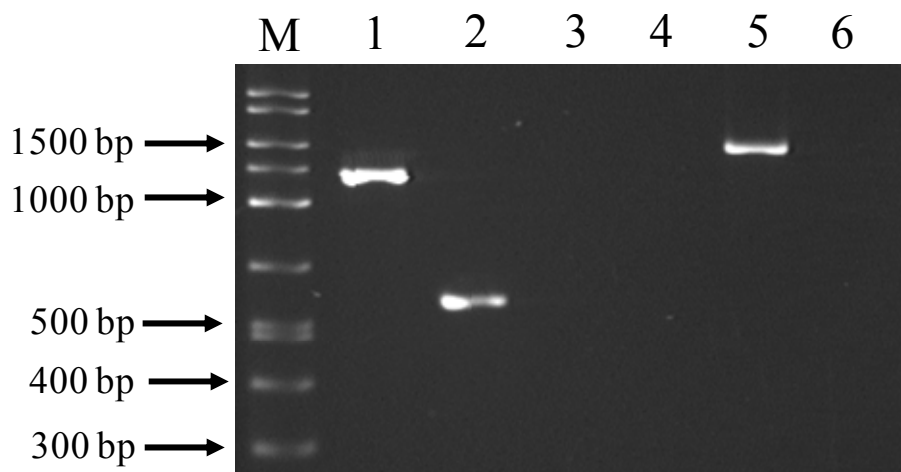


図4 ASu耐性パターンを示すDT104の薬剤耐性遺伝子および*integron*保有状況

Lane M: 分子量マーカー、Lane 1: *integron*
Lane 2: *pse1*、Lane 3: *floR*、Lane 4: *aadA2*
Lane 5: *sull*、Lane 6: *tet(G)*

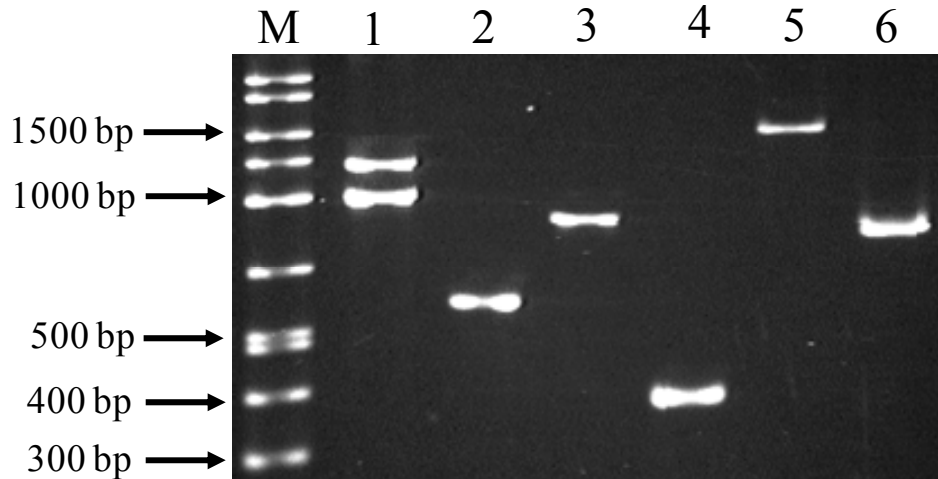


図5 ACSSuT耐性パターンを示すDT104の薬剤耐性遺伝子およびintegron保有状況

Lane M: 分子量マーカー、Lane 1: integron
 Lane 2: *pse1*、Lane 3: *floR*、Lane 4: *aadA2*
 Lane 5: *sulI*、Lane 6: *tet(G)*

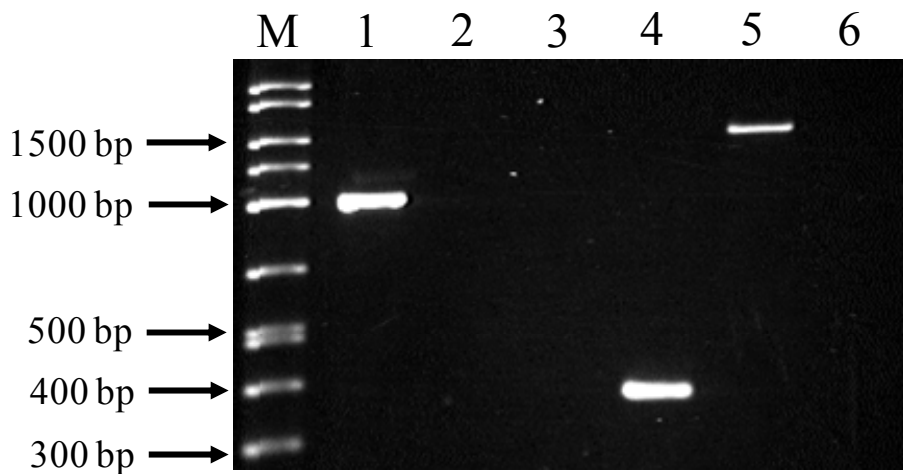


図6 SSu耐性パターンを示すDT104の薬剤耐性遺伝子およびintegron保有状況

Lane M: 分子量マーカー、Lane 1: integron
 Lane 2: *pse1*、Lane 3: *floR*、Lane 4: *aadA2*
 Lane 5: *sulI*、Lane 6: *tet(G)*

(3) PFGEによるDNA fingerprinting

制限酵素 XbaI を用いた PFGE の泳動パターンを、BioNumerics Ver. 4 を用いて泳動像の歪みを補正して目視で比較したところ、52 株の DT104 菌株は 11 の泳動パターンに分けられた (図 7)。Lane 7 の SH001 株の泳動パターン(X1) が最も多く、J ビル由来の 26 株中 22 株と YS ビル由来 26 株中 19 株がこのパターンを示した。J ビル由来の残り 4 株と YS ビル由来の残りの 7 株のうち、Lane 1 の SH164 株を除く 7 株は、X1 とバンド 2 本が異なる泳動パターン(Lane 2~6、8~11) であった。また、SH164 株はバンド 7 本が異なっていた。

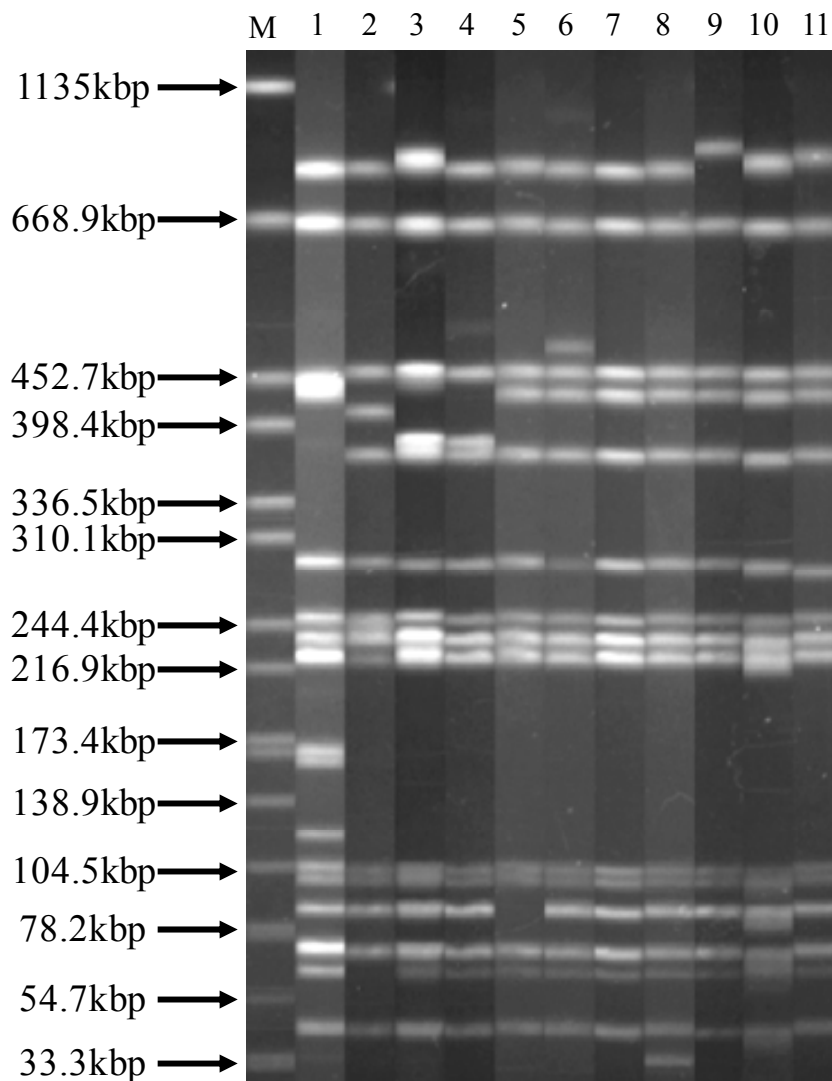


図7 イエネズミ由来DT104菌株のPFGEパターン

Lane M: *S. Braenderup*、Lane 1: SH164、Lane 2: SH266

Lane 3: SH608、Lane 4: SH255、Lane 5: SH505

Lane 6: SH445、Lane 7: SH001、Lane 8: SH459

Lane 9: SH376、lane 10: SH369、Lane 11: SH061

3. 考察

今回、雑居ビルに生息するイエネズミから分離された *S. Typhimurium* 菌株について DT104 の同定を行ったところ、供試菌株のほとんどが DT104 であった。捕獲頭数に対する DT104 の保菌率は 339 匹中 52 匹 (15.3%) と高い値であり、偶発的汚染でないことは明らかである。またイエネズミ由来 DT104 菌株は、分子疫学的解析によって保有する *integron* および薬剤耐性遺伝子が世界的に pandemic した unique clone と同一であった^{13,14)}ことが判明した。さらに、PFGE による DNA fingerprinting で最も多かった X1 パターンは、Baggesen らの XbaI type I に相当する¹⁵⁾が、この PFGE パターンは欧米で分離される DT104 の PFGE パターンと同一である¹⁵⁾。

抗生物質の使用とは無関係なイエネズミが高率に unique clone 由来の DT104 を保菌していたことから、DT104 の世界的 pandemic が薬剤選択圧ではなく、clonal dissemination によって起こったことが証明された。これまで DT104 の clonal dissemination を直接的に裏付けた調査はなく、本研究の成果は DT104 の疫学的研究の重要なデータとなるであろう。

イエネズミ由来の DT104 菌株は、2 つの雑居ビルに生息するイエネズミがそれぞれ別の種類の *integron* によって薬剤耐性を獲得していることが判明した。したがって、同一の雑居ビル内では同一遺伝子型の DT104 が長期間に渡ってイエネズミの間で維持されていることが示唆される。ネズミ類の *S. enterica* 保菌調査は、ペストコントロールによって駆除されたネズミ類を対象に調査することが多い。そのため、同一地点において継続的保菌調査を行うことが困難であり、様々な地点から集まったネズミ類を対象に調査とする¹⁸⁾ために今回のような長期間に渡る保菌を把握することが出来ない。

これまでに、食用動物以外で長期間に渡って DT104 を保菌している動物の報告はない。食用動物では、DT104 に汚染した環境を通じての持続感染^{43,44)}が指摘されている。ネズミ類の糞便中に存在する DT104 は環境中で長期間に渡って生残することが可能である⁴¹⁾ことから、今回認められたイエネズミにおける持続感染は、イエネズミの糞便により生息環境が汚染され、汚染した環境から新たなイエネズミに DT104 が感染することでイエネズミのコロニーで DT104 が維持されていたと考えられる。

イエネズミへの DT104 の伝播ルートとしては、汚染した食物から伝播したことが疑われる。加藤ら⁴⁵⁾は、東京都内の雑居ビル内の飲食店で捕獲されたクマネズミから分離された *S. enterica* の血清型が同時期に市販食肉から分離された血清型と類似していることを報告し、クマネズミが飲食店において汚染食肉を介して *S. enterica* に感染したことを指摘している。本研究で使用した DT104 は、雑居ビルの飲食店街で捕獲されたイエネズミから分離されており

43)、飲食店において汚染食肉を介してイエネズミに *S. enterica* が伝播した可能性があると思われる。

S. enterica が環境を通じて動物やヒトや食物の間を循環し、ヒトは *S. enterica* に汚染された食物の喫食によって食中毒を起こすことはよく知られている¹⁾。DT104でも同様の循環サイクルによってヒトへ感染すると考えられている³⁷⁾。したがって、自然界における DT104 の分布状況を把握しておくことは、DT104 による食中毒の制御のために重要である。本研究で明らかとなったイエネズミにおける長期保菌の公衆衛生的意義について、今後検討する必要があると思われる。

DT104 の疫学的研究にあたっての問題点である DT104 の同定方法について、本研究では PCR による同定法を評価した。その結果、1 株を除いて DT フェージ型別と Pritchett ら²⁷⁾および Hermans ら²⁹⁾の PCR の結果は一致した。結果が一致しなかった 1 株(SH201 株)は、PFGE パターンが unique clone と同一¹⁵⁾の X1 であり、さらに、integron および薬剤耐性遺伝子の保有状況が unique clone 由来と同一^{13,14)}であった。これらのことから、SH201 株は DT104 から他の DT フェージ型に変異したものである。

近年、Kang ら⁴⁶⁾は、DT104 から U302 および DT120 に、Majtánová⁴⁷⁾らは DT104 から DT20a および DT120 に DT フェージ型が変異することを報告した。このような DT フェージ型の変異が発生したと思われる SH201 株において、unique clone の特徴に変異は認められなかったことから、変異したフェージ型であっても公衆衛生上の意義は DT104 と変わらないものと思われる。したがって、PCR で同定を行い、分子疫学的解析で unique clone と同じ特徴を有していれば、DT104 と同定しても差し支えないものと思われた。しかしながら、PCR で同定した場合には DT104 以外のフェージ型を含んでいる可能性があるため、DT104 complex などの表記をするべきであろう。

PCR による DT104 の同定を行う際に留意しておかなければならない点は、ancestor DT104 を同定可能であるかどうか不明なことである。Matiasovicova ら³⁰⁾によれば、ancestor DT104 は Hermans ら²⁹⁾が調査対象としているプロフェージ領域を保有していない。したがって、Hermans らが報告した PCR²⁹⁾では ancestor DT104 は同定出来ないことが予想される。また、Pritchett ら²⁷⁾が調査対象としたのは多剤耐性 DT104 菌株であったことから、ancestor DT104 での有効性は検討されていない。したがって、現時点で報告されている PCR による DT104 同定法は、pandemic している unique clone 由来 DT104 にのみ有効性が証明されていると考えられる。

結論として、抗生物質の使用と無関係な雑居ビルに生息するイエネズミが長期間に渡って高率に DT104 を保菌していることが明らかとなった。そしてその DT104 は世界的に pandemic した unique clone 由来であったことが確認さ

れたことから、DT104 の pandemic が clonal dissemination の機序で起こったことの重要な evidence になると思われた。また PCR による DT104 の同定は、DT104 から派生した DT フェージ型を含む可能性があること、および ancestor DT104 の同定が行えない可能性があることに留意すれば十分に実用可能であることが判明した。

第2節 DT104 の DNA fingerprinting 法の研究

1. 序論

Levin ら⁴⁸⁾は、感染症の病原体の同定、病原因子および薬剤耐性遺伝子の検索、感染源および感染ルートの決定を行うことを分子疫学と定義している。感染源および感染ルートの決定は、DNA fingerprinting によって outbreak 関連株を特定することで行われる。しかし DT104 の場合は、制限酵素 XbaI による PFGE パターンが非常に類似している¹³⁾ため、XbaI による PFGE で分子疫学的解析の目的を果たすことは困難である。Baggesen ら¹⁵⁾は、PFGE で使用する制限酵素に BlnI を用いると、XbaI で同一パターンであった菌株を細分化出来るが、より感度の高い解析法が必要であると指摘している。近年、感度の高い DNA fingerprinting 法として VNTR 型別が有効であると報告された^{33,50,51)}が、それらの報告では BlnI を用いた PFGE との比較が行われていない。

PFGE による DNA fingerprinting のさらなる問題点としては、PFGE パターンの類似性から outbreak 関連株を特定するための菌株間の類似性を推察することが困難なことである。PFGE パターンの類似性から outbreak 関連株を特定するには、Tenover の criteria⁵¹⁾が使われることが多い。その criteria によれば、PFGE パターンのバンド数の相違が3本以内であれば1回の genetic event で起こりうるので、バンド数が3本以内の菌株は outbreak 関連株とされている(表4)。

表4 Tenoverのcriteria*によるPFGEパターンからの菌株の関連性推定

PFGEパターン		推定される genetic event	菌株の関連性
類似性	バンド数相違		
同一	0	0	outbreak関連株である
非常に類似	2~3	1	outbreak関連株の可能性が高い
類似	4~6	2	outbreak関連株の可能性はある
異なる	7≦	3≦	outbreak関連株ではない

*Tenover, F. C. et. al. J. Clin. Microbiol. 33, 2233-2239

しかしながらこの criteria は、PFGE パターンの変異が制限酵素の切断サイトにおける single-nucleotide polymorphism (SNP) によってのみ起こっていることを前提にしている。すでに、腸管出血性大腸菌血清型 O157 (O157) では、PFGE パターンの変異は制限酵素切断サイトの SNP ではなく、プロフェージ領域における相同組み換えによって起こっていることが報告されている^{52,53)}。DT104 に関してはまだこの様な報告はないが、Cooke ら⁵⁴⁾は DT104 の PFGE パターンの変異が保有しているプロフェージやプラスミドの違いによると報告しており、Tenover の criteria が適応出来るかどうか、疑問が残る。

著者らは O157 の分子疫学的解析において、コンピュータ・ソフトウェアを使用してクラスター解析を行うことで、Tenover の criteria を適用せずに菌株間の類似性を推察する方法を報告した⁵²⁾。DT104 に関してもクラスター解析が有効であると思われるが、これまでにそのような報告はない。

そこで、イエネズミ由来の DT104 菌株を使用し、制限酵素 XbaI および BlnI を用いた PFGE パターンのクラスター解析および VNTR 型別データのクラスター解析を行い、分子疫学的解析の目的である outbreak 関連株の特定による感染源および感染ルートの決定に対する有効性を検討した。

2. 結果

(1) PFGE パターンのクラスター解析

dendrogram のカットオフ値を変化させることでクラスターする菌株数がどのように変化するかを調べたところ、XbaI による PFGE パターンのクラスター解析 (XbaI クラスター解析) では、カットオフ値に関わらず J ビル由来および YS ビル由来の DT104 菌株が混在したクラスター (95-X1、90-X1、85-X1、80-X1、75-X1) を形成した (表 5)。

表5 XbaIクラスター解析によるカットオフ値とクラスター菌株数の変化

カット オフ値	菌株数		クラスター数	クラスター 名称	クラスター菌株数	
	非クラスター	クラスター			Jビル	YSビル
95	9	43	2	95-X1	21	20
				95-X2	2	0
90	3	49	3	90-X1	22	22
				90-X2	0	2
				90-X3	3	0
85	3	49	1	85-X1	25	24
80	1	51	1	80-X1	26	25
75	0	52	1	75-X1	26	26

BlnI による PFGE パターンのクラスター解析 (BlnI クラスター解析) では、カットオフ値が 95% の場合に J ビル由来と YS ビル由来の DT104 菌株はそれぞれ別のクラスター (95-B1、95-B2、95-B3) を形成し、混在したクラスターは形成されなかった (表 6)。

表6 BlnIクラスター解析によるカットオフ値とクラスター菌株数の変化

カット オフ値	菌株数		クラスター数	クラスター 名称	クラスター菌株数	
	非クラスター	クラスター			Jビル	YSビル
95	4	48	3	95-B1	22	0
				95-B2	0	24
				95-B3	2	0
90	1	51	1	90-B1	26	25
85	0	52	1	85-B1	26	26

(2) VNTR 型別データのクラスター解析

VNTR 型別データのクラスター解析 (VNTR クラスター解析) では、カットオフ値に関わらず、J ビル由来および YS ビル由来の DT104 菌株が混在したクラスター (95-V1、90-V1、85-V1、80-V1、75-V1) を形成した (表 7)。

表7 VNTRクラスター解析によるカットオフ値とクラスター菌株数の変化

カット オフ値	菌株数		クラスター数	クラスター 名称	クラスター菌株数	
	非クラスター	クラスター			Jビル	YSビル
95	3	49	3	95-V1	24	15
				95-V2	0	8
				95-V3	2	0
90	1	51	3	90-V1	26	15
				90-V2	0	8
				90-V3	0	2
85	1	51	2	85-V1	26	23
				85-V2	0	2
80	1	51	2	80-V1	26	23
				80-V2	0	2
75	0	52	1	75-V1	26	23
				75-V2	0	3

BlnI クラスター解析と XbaI クラスター解析の関連性を表す congruence value は、 $23.5 \pm 1.83\%$ と低い値であった。また、2つの解析の間に明確な相関関係は認められなかった (図 8)。また、BlnI クラスター解析と VNTR クラスター解析間の congruence value は、 $10.7 \pm 1.83\%$ とやはり低い値であった。2つの解析の間に明確な相関関係は認められなかった (図 9)。

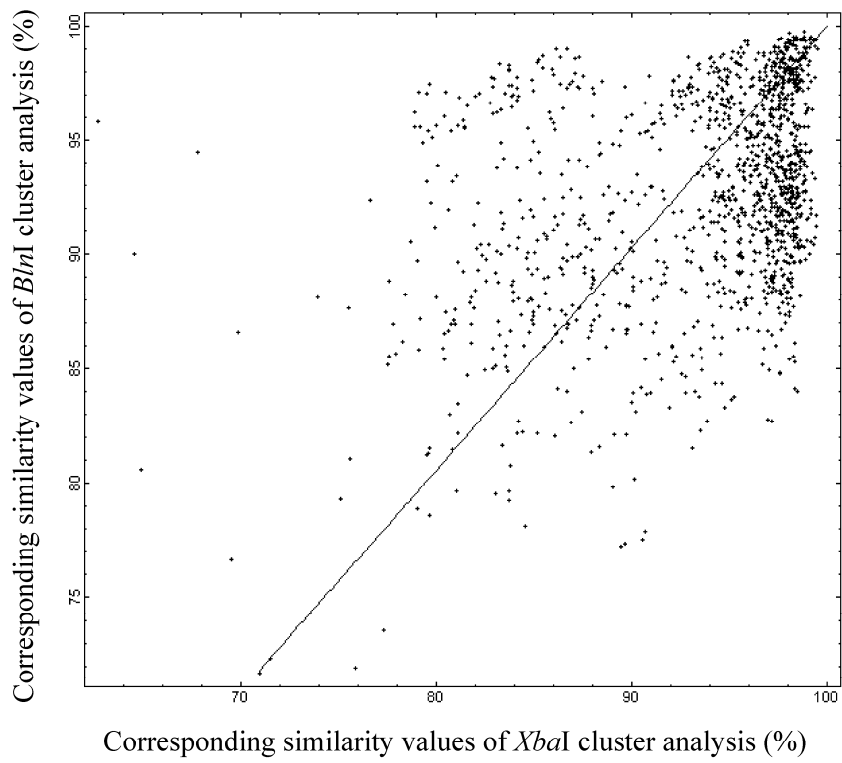


図8 XbaIおよびBlnIクラスター解析の関連性

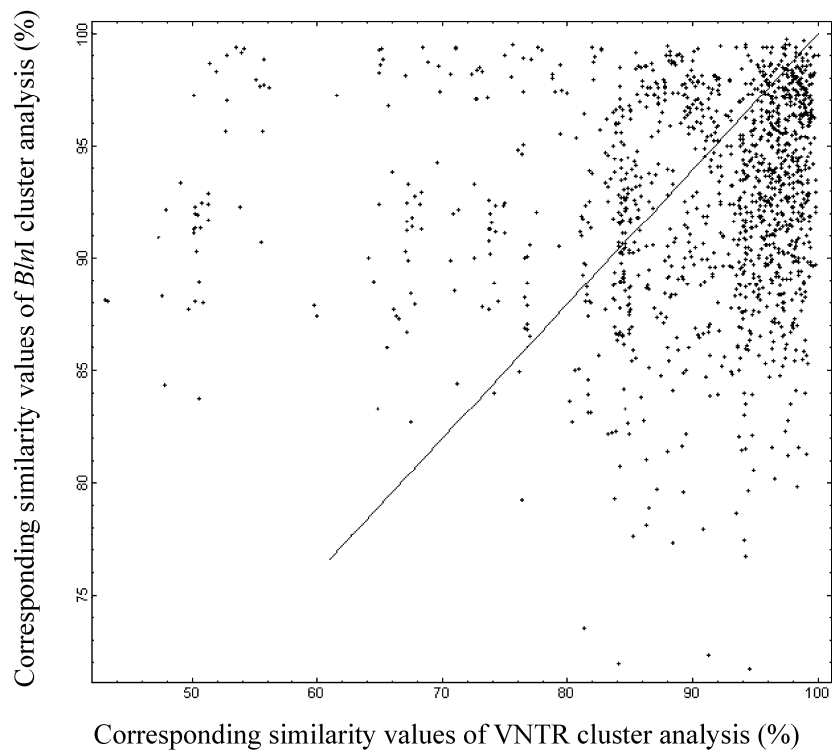


図9 BlnIおよびVNTRクラスター解析の関連性

(3) 2段階クラスター解析

YS ビル由来株と J ビル由来株が別のクラスターを形成した条件、すなわち 95%のカットオフ値による BlnI クラスター解析を第 1 段階解析とし、BlnI クラスター解析で形成されたクラスター (95-B1、95-B2、95-B3) に含まれる菌株を第 2 段階解析した場合に有効なクラスター解析法を検討した。第 2 段階解析として VNTR クラスター解析を用いた場合、J ビル由来株の 95-B1 はカットオフ値 95%で細分化された。また YS ビル由来株の 95-B2 は、カットオフ値 80~95%で細分化された (表 8)。一方、XbaI クラスター解析を第 2 段階解析に使用した場合にはクラスターが細分化されることはなかった (表 9)。

表8 BlnIクラスター解析により形成されたクラスターのVNTRクラスター解析によるカットオフ値とクラスター菌株数の変化

供試BlnI クラスター	カット オフ値	非クラスター 菌株数	クラスター数	クラスター 名称	クラスター 菌株数
95-B1	95	0	2	B1-95-V1	20
				B1-95-V2	2
	95	3	2	B2-95-V1	14
95-B2	90	1	2	B2-95-V2	7
				B2-90-V1	21
	B2-90-V2	2			
	85	1	2	B2-85-V1	21
				B2-85-V2	2
80	1	2	B2-80-V1	21	
B2-80-V2	2				
75	0	1	B2-75-V1	26	
95-B3	95	0	1	B3-95-V1	2

表9 BlnIクラスター解析により形成されたクラスターのXabIクラスター解析によるカットオフ値とクラスター菌株数の変化

供試BlnI クラスター	カット オフ値	非クラスター 菌株数	クラスター数	クラスター 名称	クラスター 菌株数
95-B1	95	0	1	B1-95-X1	22
	95	2	1	B2-95-X1	22
95-B2	90	1	1	B2-90-X1	23
	85	1	1	B2-85-X1	23
	80	0	1	B2-80-X1	24
95-B3	95	0	1	B3-95-X1	2

3. 考察

PFGE パターンをコンピュータ・ソフトウェアでクラスター解析する場合には、2つの大きな問題点がある。一つはバンド・マッチング、もう一つは類似度算出法で、その影響によりクラスター解析が客観的に行えないことがある^{55,56)}。著者らは、類似度算出に通常使用するバンド・マッチング係数である Dice coefficient を使用せずに densitometric curve そのものを比較する Pearson correlation coefficient を使用することで、それらの問題点を解決出来ることを報告した⁵⁵⁾。DT104 の PFGE パターンのクラスター解析に関する過去の報告では Dice coefficient を用いており^{46,57-62)}、解析結果の客観性に疑問が残る。したがって、本研究のクラスター解析結果は DT104 の DNA fingerprinting に関する貴重なデータとなるであろう。

今回供試した DT104 菌株は、横浜駅を挟んで反対側に位置している J ビルと YS ビルに生息するイエネズミから分離された⁴²⁾ものである。駅構内を通してイエネズミが移動しているとは考えにくく、さらに、J ビル由来と YS ビル由来の DT104 では保有している integron および薬剤耐性遺伝子が異なっていたことから、それぞれのビルで別の遺伝子型の DT104 が存在していることが示唆される。したがって、ある DNA fingerprinting 法で両ビル由来菌株が混在するクラスター形成が認められた場合、その解析法は型別能力が不足していることになる。

本研究で検討した解析法のうち両ビル由来菌株が混在しなかったのは、カットオフ値 95% の BlnI クラスター解析だけであった。BlnI による PFGE 解析が XbaI による PFGE 解析より細分化が可能であったことは、Baggesen ら¹⁵⁾の報告とも一致する。本研究で用いた DT104 菌株は、J ビルでは半年間、YS ビルでは 1 年間に渡って捕獲されたイエネズミから分離されたものである。このような長期間に渡って検出された DT104 菌株が BlnI クラスター解析で同一クラスターであったことから、BlnI クラスター解析では endemic している DT104 の遺伝子型を把握することが可能であると示唆される。しかし、outbreak 関連株の特定を DNA fingerprinting の目的とした場合、さらなる型別能力の向上が必要と思われる。

一方、PFGE 解析より型別能力が高いと報告されている^{32,49,50)} VNTR 型別であるが、VNTR クラスター解析によって両ビル由来株が混在したクラスター形成が認められ、単独での型別能力が不足していることが明らかとなった。VNTR 型別は解析対象とする tandem repeat 領域を増やすことで型別能力を高めることが可能である⁶³⁾。Witonski ら⁶⁴⁾は、本研究で著者らが使用した Lindstedt ら³²⁾の VNTR 型別とは異なる領域を使用した *S. Typhimurium* の型別を報告している。Witonski らの方法を DT104 に使用した場合の有効性については報告がないが、今後、Lindstedt らの使用している tandem repeat 領域と

Witonski らの使用している領域を組み合わせた VNTR 型別法を検討する必要があると思われる。

本研究では、3 種類のクラスター解析を試みたにも関わらず単独のクラスター解析では十分な型別能力が得られなかった。しかし、それぞれのクラスター解析の関連性を示す **congruence value** は低かったことから、**BlnI** クラスター解析を第 1 段階解析とした場合に有効な第 2 段階解析法を検討した。その結果、VNTR クラスター解析を第 2 段階解析に使用するとさらなる細分化が可能であることが判明した。これまでに PFGE と VNTR を組み合わせてクラスター解析した報告はなく、この解析法の有効性を今後さらに検討することで、DNA fingerprinting により outbreak 関連株の特定が可能になると思われる。

しかし、今回供試した DT104 菌株は雑居ビルに生息するイエネズミを捕獲して分離したため、イエネズミ相互の接触の有無に関する情報がない。したがって、イエネズミ由来 DT104 菌株だけでは 2 段階クラスター解析法の有効性を十分に評価することが出来ない。今後、ヒト由来菌株のような関連性が明らかな菌株を使用して評価する必要があると思われる。

結論として、**XbaI**、**BlnI** および VNTR クラスター解析のいずれでも単独で解析した場合には outbreak 関連株を特定することが出来なかった。そこで、**BlnI** クラスター解析を第 1 段階解析とし、VNTR クラスター解析で第 2 段階解析する 2 段階クラスター解析法を検討したところ、型別能力の向上が確認された。また、**BlnI** クラスター解析は単独で解析した場合、endemic している遺伝子型を把握することが可能であることが示唆された。

第3節 実験の部

1. 材料

(1) 供試菌株

1997年10月から1998年9月に、神奈川県横浜市の2つの雑居ビル(JおよびYSビル)内の地下飲食店街で捕獲したドブネズミ(*R. norvegicus*) 83匹およびクマネズミ(*R. rattus*) 256匹から分離された *S. Typhimurium* 菌株 58株を使用した(表2)。

(2) 使用した機器および試薬等

第1章では、表10に示した機器等および表11に示した試薬等を使用して実験を行った。

表10 第1章で使用した機器等

実験項目	機器名	メーカー
DNA抽出	Gene Quant Pro	Amasham
PCR	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
アガロース・ ゲル電気泳動	Mupid Gel Logic 200 Imaging System	アドバンス Kodak
PFGE	sample plug caster 0.7mm	Bio Rad
	CHEF DR III System	Bio Rad
	BioNumerics Ver. 4	Applied Maths
VNTR	Genetic Analyzer 310	Applied Biosystems
	GeneScan Ver. 3.12	Applied Biosystems

表11 第1章で使用した試薬等

実験項目	試薬名	メーカー
DNA抽出	InstaGene matrix	Bio Rad
PCR	FastStart <i>Taq</i> DNA polymerase (5U/μl)	Roche
	10mM PCR nucleotide mix	Roche
	PCR reaction buffer, x10 conc. with 20mM MgCl ₂	Roche
	各primer	グライナー
アガロース・ ゲル電気泳動	tris (hydroxymethyl) aminomethane	和光純薬
	ホウ酸	和光純薬
	EDTA・3Na	和光純薬
	アガロース	和光純薬
	Blue/Orange x6 Loading Dye	Promega
	Clone Size 1000bp DNA Ladder Marker	Norgen
	ethidium bromide	Merk
50-2500bp DNA Marker	BMA	
薬剤感受性	Sensi-Disc	Becton Dickinson
	Müller-Hinton II agar	Becton Dickinson
	Tryptic Soy Broth	Difco
PFGE	Seakem Gold Agarose	Cambrex
	Bacto-Trypton	Difco
	Yeast extract	Difco
	塩化ナトリウム	和光純薬
	Proteinase K	Merk
	0.5MEDTA (pH8.0)	ニッポンジーン
	Ultra Pure 1M Tris-HCl (pH8.0)	Invitrogen
	20% N-Lauroyl Sarcosine	Sigma
	Pefabloc SC	Roche
	XbaI	Roche
BlnI	Roche	
VNTR	310 POP4 polymer	Applied Biosystems
	Genetic Analyzer Buffer with EDTA	Applied Biosystems
	Hi-Di Formamide	Applied Biosystems
	310 Capillary	Applied Biosystems
	EXOSAP-it	USB
	Gene Mark 1000 Fluorescent DNA Ladder Rox	Northernbiotech

2. 方法

(1) DT フェージ型別

DT フェージ型別は、国立感染症研究所細菌第一部に依頼した。

(2) PCR による DT104 の同定

Pritchett ら²⁷⁾の報告した 16S-23S rRNA 領域の特異的な塩基配列および Hermans ら²⁹⁾が報告した *irsA*、*hldD*、fragment 84、fragment 168、fragment 180 を PCR で検出した。供試菌株の chromosome DNA を InstaGene matrix を用いて抽出し、Gene Quant Pro を用いて得られた DNA 濃度を測定し、DNA 濃度を 2ng/ μ l に調整した。その 1 μ l を PCR mixture (表 12) 24 μ l と混合して PCR 反応を行った。使用した primer は表 13 のとおりである。PCR 反応は GeneAmp PCR System 9700 を用いて行った。PCR サイクルは、94°C 5分を 1 サイクル、94°C 30 秒 : 60°C 1 分 : 72°C 45 秒を 30 サイクル、72°C 7分を 1 サイクル、で行った。

表12 PCR mixtureの組成

試薬名	容量
PCR reaction buffer, x10 conc. with 20mM MgCl ₂	10 μ l
10mM PCR nucleotide mix	2 μ l
20 μ M forward primer	2.5 μ l
20 μ M reverse primer	2.5 μ l
FastStart <i>Taq</i> DNA polymerase (5U/ μ l)	0.5 μ l
milliQ	78.5 μ l

表13 DT104の同定PCRに使用したprimer

検出ターゲット	primer名称	シーケンス (5'-3')	増幅産物サイズ
16S-23S rRNA	DT104-F	GTCAGCAGTGTATGGAGCGA	162bp
	DT104-R	AGTAGCGCCAGGACTCGTTA	
<i>irsA</i>	irsAF	ATTCAGGCTGCGCTCCGTCTTTAC	416bp
	irsAR	CTTAATGAGGCGGCGGAACAGTAC	
<i>hldD</i>	hldDF	ACAATGCTTTCGAACCTGATGGGC	510bp
	hldDR	CCATCGCTTCAATTGCAACCATGC	
fragment 84	frag-84F	ATGGCACAACCACTCAGTAATCCG	372bp
	frag-84R	AGATGGCATCGGCGTAGTTATGAG	
fragment 168	frag-168F	CATCCATTACCGGTTGTCCATCC	492bp
	frag-168R	CGCGTTTAACGGTACAGATGGTGG	
fragment 180	frag-180F	CCATAATAGGAAGCATTGCGTGAG	476bp
	frag-180R	ATGCCATCTAGCTATCTCTGCGAC	

次に、増幅産物をアガロース・ゲル電気泳動し、増幅バンドの確認を行った。アガロース・ゲル電気泳動は Mupid を用いて行い、アガロースのゲル濃度は 1.5%とし、TBE buffer[1]を用いた。泳動後、ゲルを 0.5 μ g/ml の ethidium bromide 溶液で染色し、Gel Logic 200 Imaging System で撮影した。

[1] TBE buffer (x5 conc. 使用時に5倍希釈して使用)

tris (hydroxymethyl) aminomethane	53.89g
ホウ酸	27.5g
EDTA・3Na	4.1g
蒸留水	up to 1000ml

(3) 薬剤感受性試験

KB 法により一濃度ディスクを用いて、13 薬剤（表 14）に対する薬剤感受性を調べた。供試菌株を Tryptic Soy Broth へ接種して 37°C で一夜培養後、培養液 20 μ l を 2ml の Tryptic Soy Broth へ接種し、37°C で菌液の濃度が MacFarland #0.5 になるまで震盪培養した。培養後、綿棒を用いて Müller-Hinton II agar へ培養液を接種し、Sensi-Disc を配置した後、37°C で一夜培養した。培養後、Sensi-Disc 周辺の阻止円の大きさを測定し、National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) の判定基準（表 14）に従い感受性を決定した。

表14 NCCLSによる薬剤耐性の判定基準

薬 剤	阻止円直径の判定区分 (mm)		
	耐性	中間	感受性
アンピシリン (10 μ g)	≤ 13	14-16	17 \leq
セファロチン (30 μ g)	≤ 14	15-17	18 \leq
セフトキシム (30 μ g)	≤ 14	15-22	23 \leq
カナマイシン (30 μ g)	≤ 13	14-17	18 \leq
ゲンタマイシン (10 μ g)	≤ 12	13-14	15 \leq
ストレプトマイシン (10 μ g)	≤ 11	12-14	15 \leq
テトラサイクリン (30 μ g)	≤ 14	15-18	19 \leq
クロラムフェニコール (30 μ g)	≤ 12	13-17	18 \leq
シプロフロキサシン (5 μ g)	≤ 15	16-20	21 \leq
スルフィソキサゾール (250 μ g)	≤ 12	13-16	17 \leq
ナリジキシン酸 (30 μ g)	≤ 13	14-18	19 \leq
フォスфоマイシン (50 μ g)	≤ 10	11-15	16 \leq
トリメトプリム (5 μ g)	≤ 10	11-15	16 \leq

(4) integron および薬剤耐性遺伝子の検索

Lai-King ら¹⁴⁾の報告にしたがって PCR で integron および薬剤耐性遺伝子を検索した。PCR については「(2) PCR による DT104 の同定」と同様に実施した。使用した primer は表 15 のとおりである。PCR サイクルは、94°C 5 分を 1 サイクル、94°C 30 秒 : 58°C 30 秒 : 72°C 2 分を 30 サイクル、72°C 7 分を 1 サイクル、で行った。

表15 integronおよび薬剤耐性遺伝子検索PCRに使用したprimer

検出ターゲット	primer名称	シーケンス (5'-3')	増幅産物サイズ
integron	5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	variable
	3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA	
<i>pse1</i>	<i>pse1</i> -L	AATGGCAATCAGCGCTTCCC	586bp
	<i>pse1</i> -R	GGGGCTTGATGCTCACTCCA	
<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i> -L	TGTTGGTTACTGTGGCCGTA	381bp
	<i>aadA2</i> -R	GCTGCGAGTTCCATAGCTTC	
<i>sull</i>	<i>qacEΔ1</i>	TAGTTGGCGAAGTAATCGCA	1581bp
	<i>orf5</i>	AGCTTGTGCAGATATGCGG	
<i>floR</i>	<i>floR</i> -L	CACGTTGAGCCTCTATATGG	868bp
	<i>floR</i> -R	ATGCAGAAGTAGAACGCGAC	
<i>tet(G)</i>	<i>tet(G)</i> -L	CAGCTTTCGGATTCTTACGG	844bp
	<i>tet(G)</i> -R	GATTGGTGAGGCTCGTTAGC	

(5) PFGE

被検菌株を LB broth (Lennox) [2]に接種し、37°Cで一夜震盪培養した。培養後、80 μl を採取して 12000rpm で 3 分間遠沈して上清を捨て、沈渣を 100 μl の milliQ で再浮遊させた。この菌液を、等量の 1% Seakem Gold Agarose と混合し、sample plug caster 0.7mm に注入して凝固させた。

sample plug caster 0.7mm からプラグを取り出し、1000 μl の proteinase K buffer [3]および 40 μl の 25mg/ml proteinesa K solution が入ったマイクロチューブに入れ、50°Cで 18 時間反応させた。反応後、反応液を捨てて TE buffer [4]で 25 倍希釈した 100mM Pefabloc SC solution を 1000 μl 加え、50°Cで 20 分間反応させた。この処理を 2 回行った後、1000 μl の TE buffer を用いて on ice で 20 分間プラグの洗浄を行った。洗浄を 2 回行った後、新しい TE buffer を 1000 μl 加え、4°Cでプラグを保存した。

保存していたプラグを適当な大きさに切断し、200 μl の x0.1 TE buffer で 30 分間平衡化した。平衡化したプラグを 30U の制限酵素 XbaI または BlnI を用いて 37°Cで 18 時間処理した。処理したプラグを、1% Seakem Gold Agarose で

作成したゲルに埋め込み、CHEF DR III System を用いて泳動した。泳動は、pulse time 2.2～54.2 秒で 19 時間行った。分子量マーカーとしては、*Salmonella* Braenderup H9812 株⁶⁵⁾を使用し、サンプル3レーンごとに分子量マーカーを配置した⁵⁵⁾。

泳動後、ゲルを 0.5 μ g/ml の ethidium bromide 溶液で染色し、Gel Logic 200 Imaging System で撮影した。

[2] LB broth (Lennox)

Bacto-Trypton	10g
Yeast Extract	5g
NaCl	5g
蒸留水	1000ml

[3] proteinase K buffer

0.5M EDTA (pH8.0)	250ml
20% N-Lauroyl Sarcosine	25ml
milliQ	225ml

[4] TE buffer

Ultra Pure 1M Tris-HCl (pH8.0)	10ml
0.5M EDTA (pH8.0)	2ml
milliQ	988ml

(6) VNTR

被検菌株の DNA を表 16 に示した primer を使用して PCR を行った。増幅産物を EXOSAP-it を用いて部分精製し、x0.1 TE buffer で 10 倍希釈した。希釈したサンプル 1 μ l を 12 μ l の Hi-Di Formamide に加え、Genetic Analyzer 310 を用いてキャピラリー・ゲル電気泳動を行った。泳動は 60℃で 40 分間行い、GeneScan Ver. 3.12 により増幅産物のサイズ測定を行った。サイズ測定の内部標準としては、Gene Mark 1000 Fluorescent DNA Ladder Rox を使用した。得られた増幅産物のサイズから tandem repeat 領域の繰り返し数を算出した³²⁾。

表16 VNTRに使用したprimer

primer名称	Dye-シーケンス (5'-3')
STTR3-F	6FAM -CCCCCTAAGCCCGATAATGG
STTR3-R	TGACGCCGTTGCTGAAGGTAATAA
STTR5-F	VIC -ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT
STTR5-R	GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT
STTR6-F	NED -TCGGGCATGCGTTGAAA
STTR6-R	CTGGTGGGGAGAATGACTGG
STTR9-F	6FAM -AGAGGCGCTGCGATTGACGATA
STTR9-R	CATTTTCCACAGCGGCAGTTTTTC
STTR10pl-F	VIC -CGGGCGCGGCTGGAGTATTTG
STTR10pl-R	GAAGGGGCCGGGCAGAGACAGC

(7) クラスタ解析

XbaI クラスタ解析および BlnI クラスタ解析は以下のとおり実施した。Gel Logic 200 Imaging System で撮影した PFGE パターンを Tiff ファイルとして保存し、BioNumerics Ver. 4 で読み込んだ。PFGE パターンの類似度は、0.5% optimization パラメータ条件下で Pearson correlation coefficient で算出した。dendrogram は、unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) で作成し、カットオフ値を 95% から 5% ごとに変化させて形成されるクラスタに含まれる菌株数の変化を検討した。

一方、VNTR クラスタ解析は以下のとおり実施した。算出した繰り返し数を BioNumerics Ver. 4 に numerical character として入力し、VNTR 型別データの類似度を square root オプションの条件下で Pearson correlation coefficient で算出した。dendrogram の作成およびカットオフ値の変化による形成されるクラスタに含まれる菌株数の変化については上記と同様に検討した。

2 種類のクラスタ解析の関連性について検討するため、BioNumerics Ver. 4 を用いて congruence value を算出した。また、0% minimum similarity、100% maximum similarity および without included self matches オプション条件下で、Kendall's tau correlation によって corresponding similarity を算出した。

第 2 章

イエネズミおよびヒト由来 DT104 の
分子疫学的比較研究

第1節 ヒトから分離された DT104 の分子疫学的研究

1. 序論

我が国では DT フェージ型別を実施可能な機関が 2 機関と少ないことから、下痢症患者や保菌者から分離される *S. Typhimurium* 菌株に DT104 が占める割合はほとんど調査されていない。松下ら¹¹⁾は、1987～1998 年間に東京都の散发下痢症患者から分離された *S. Typhimurium* のうち多剤耐性を示した 52 株について調査したところ、31 株 (59.6%) が DT104 であったと報告している (表 17)。

表17 東京都の下痢症患者からのDT104分離状況*

分離年	菌株数		
	<i>S. enterica</i>	<i>S. Typhimurium</i>	DT104
1987	481	26	3
1988	476	20	0
1989	655	36	0
1990	636	25	0
1991	554	22	0
1992	551	21	2
1993	470	20	4
1994	444	31	10
1995	434	19	3
1996	394	24	6
1997	358	14	0
1998	330	18	3

*松下ら 感染症誌 73, 1087-1093

我が国では、*S. enterica* による下痢症患者に占める *S. Typhimurium* の割合は減少傾向にある⁵⁾が、DT104 の世界的な pandemic¹⁶⁾によって *S. Typhimurium* に占める DT104 の割合が増加していることが懸念される。また、これまで報告されている DT104 による集団事例は現時点では 1 事例のみ¹²⁾であるが、O157 で問題となっているような通常の疫学調査では明らかとならない diffuse outbreak が発生⁶⁾していることも考えられる。そのような隠れた diffuse outbreak の把握には、下痢症患者由来の *S. Typhimurium* 菌株を用いて DT104

の同定を行い、DT104 と同定された菌株を分子疫学的に解析することが必要である。

そこで、ヒトにおける DT104 の分布状況および隠れた集団感染事例の有無を調査するため、千葉県内の下痢症患者および保菌者から分離された *S. Typhimurium* 菌株について、PCR による DT104 complex の同定を行った。DT104 complex と同定された菌株については、第 1 章で検討したイエネズミ由来と同様に世界的に pandemic している unique clone 由来であるかどうかを確認した。さらに、イエネズミ由来 DT104 菌株を用いた研究で有効性が認められた 2 段階クラスター解析が、DT104 の DNA fingerprinting としての有効であるか、ということについて確認を行った。

2. 結果

(1) PCR による DT104 complex の同定

千葉県でヒトから分離された *S. Typhimurium* 56 株中 23 株 (41.1%) が PCR により DT104 complex と同定された。23 株には、1999 年の A 集団事例由来 4 株、2000 年の B 集団事例由来 3 株、および 2003 年の C 集団事例由来 3 株が含まれていた (表 18)。

(2) 薬剤感受性試験および薬剤耐性遺伝子検索

KB 法による薬剤感受性試験の結果、23 株のヒト由来 DT104 complex のうち 16 株が ACSSuT 耐性パターンを示した。残りの 7 株中、2 株は ACSSuT 耐性パターンに加えてナリジキシン酸にも耐性を示し (ACSSuTNa)、2 株は SSu 耐性パターンであり、3 株は供試した全ての薬剤に感受性 (sensitive) であった (表 18)。

2000 年の B 事例由来株では、3 株中 2 株が ACSSuT 耐性パターンであったが、1 株は SSu 耐性パターンであった

表18 千葉県におけるヒトからのDT104分離状況および薬剤耐性パターン

分離年	菌株数		DT104 complexの薬剤耐性パターン			
	<i>S. Typhimurium</i>	DT104 complex	ACSSuT	ACSSuTNa	SSu	sensitive
1997	10	2	1		1	
1998	6	0				
1999	14	10	10 (4)*			
2000	11	3	2 (2)		1 (1)	
2001	7	4	2	2		
2002	2	0				
2003	8	4	1			3 (3)
2004	0	0				
2005	0	0				
2006	0	0				
計	56	23	16	2	2	3

* () は集団事例由来株の再掲

PCR を用いて薬剤耐性遺伝子および *integron* の検索を行ったところ、ACSSuT および ACSSuTNa 耐性パターンの菌株全てから 1.2kbp および 1.0kbp の *integron*、*pse1*、*floR*、*aadA2*、*sull* および *tet(G)* の増幅バンドが確認された。また、SSu 耐性パターンを示した 2 株は、1.0kbp の *integron*、*aadA2* および *sull* の増幅バンドが確認された (データ示さず)。

(3) PFGE 解析による DNA fingerprinting

制限酵素 XbaI を用いた PFGE の泳動パターンを、BioNumerics Ver. 4 を用いて泳動像の歪みを補正して目視で比較したところ、23 株の DT104 菌株は、7 つの泳動パターンに分けられた (図 10)。Lane 7 のイエネズミ由来 SH001 株の泳動パターンである X1 と同じパターン (Lane 6) が最も多く、11 株がこのパターンを示した。X1 とバンド 1 本が異なるパターン (lane 5) が 1 株、バンド 2 本が異なるパターン (Lane 4) が 1 株確認された。Lane 3 のように、X1 とバンド 3 本が異なるパターン (X2) を示した株が 8 株確認された。X2 とバンド 1 本が異なるパターン (Lane 2) が 1 株、バンド 3 本が異なるパターン (Lane 1) が 1 株確認された。

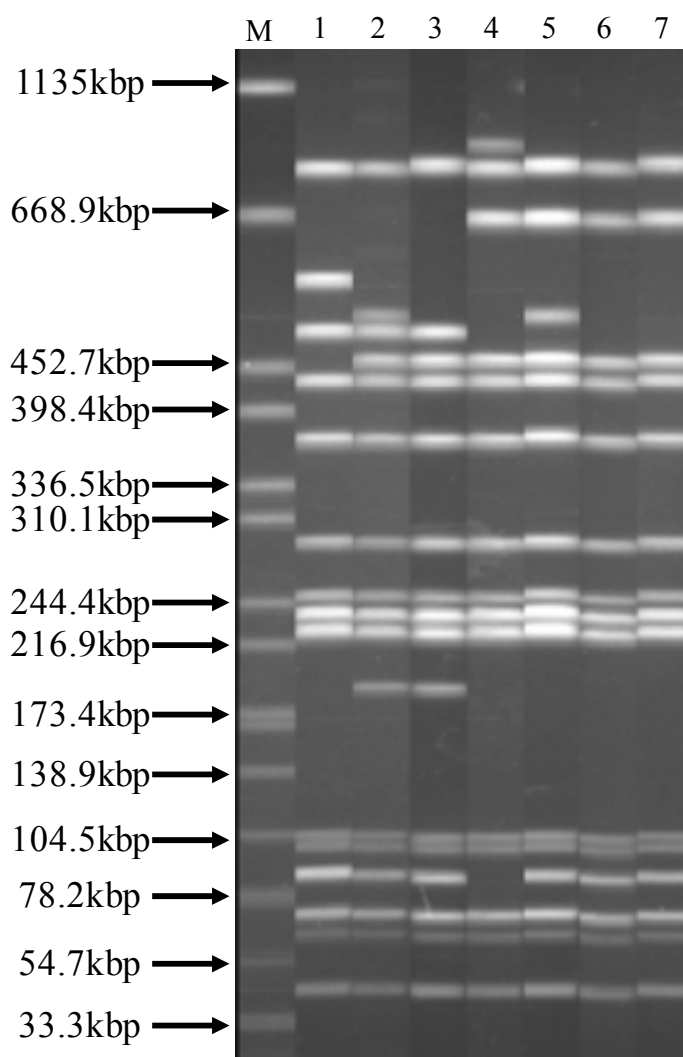


図10 ヒト由来DT104菌株のPFGEパターン

Lane M: *S. Braenderup*、Lane 1: CS99207、Lane 2: CS99257
Lane 3: CS01055、Lane 4: CS00025、Lane 5: CS03057
Lane 6: CS97025、Lane 7: SH001 (イエネズミ由来)

(3) 2段階クラスター解析

イエネズミ由来 DT104 の解析で有効であった 2 段階クラスター解析を用いてヒト由来 DT104 complex を解析した。BlnI クラスター解析による第 1 段階解析によってヒト由来 DT104 complex 23 株は 5 つのクラスター (cluster B1~B5) を形成した。集団事例由来株は、A および C 事例株は全ての株が cluster B1 に含まれた。一方、B 事例由来株は、耐性パターンが ACSSuT であった 2 株は cluster B2 に含まれたが、SSu 耐性パターンの 1 株は cluster B3 に含まれた (図 11)。

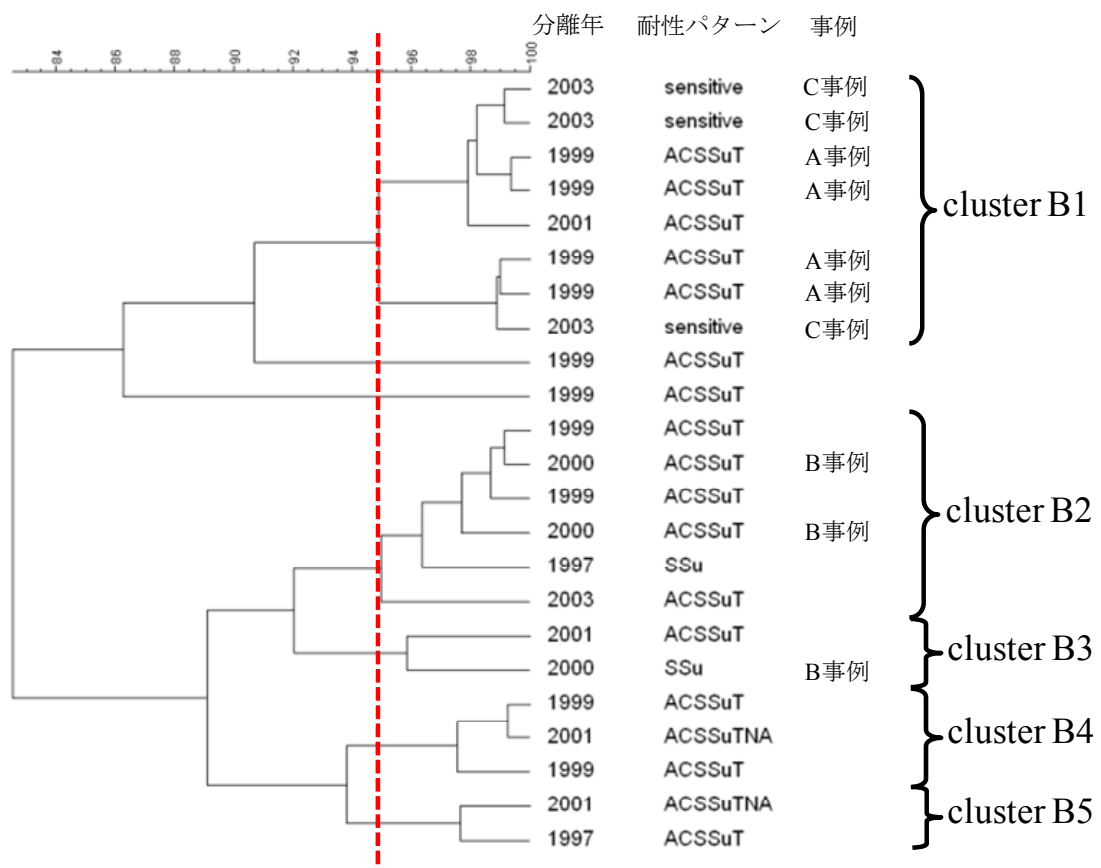


図11 ヒト由来DT104 complexのBlnIクラスター解析による第1段階解析

形成されたクラスターそれぞれについて VNTR クラスター解析による第 2 段階解析を行ったところ、cluster B1 は、A 事例由来 4 株と C 事例由来 3 株を含む 1 つのクラスター (cluster B1-V1) と非クラスター 1 株に細分化された (図 12 の A)。

一方 cluster B2 は、B 事例由来 2 株を含む 1 つのクラスター (cluster B2-V1) と非クラスター 4 株に細分化された (図 12 の B)。

残りの cluster B3~B5 は、VNTR クラスター解析でクラスターを形成せず、全ての菌株が非クラスター株となった (データ示さず)。

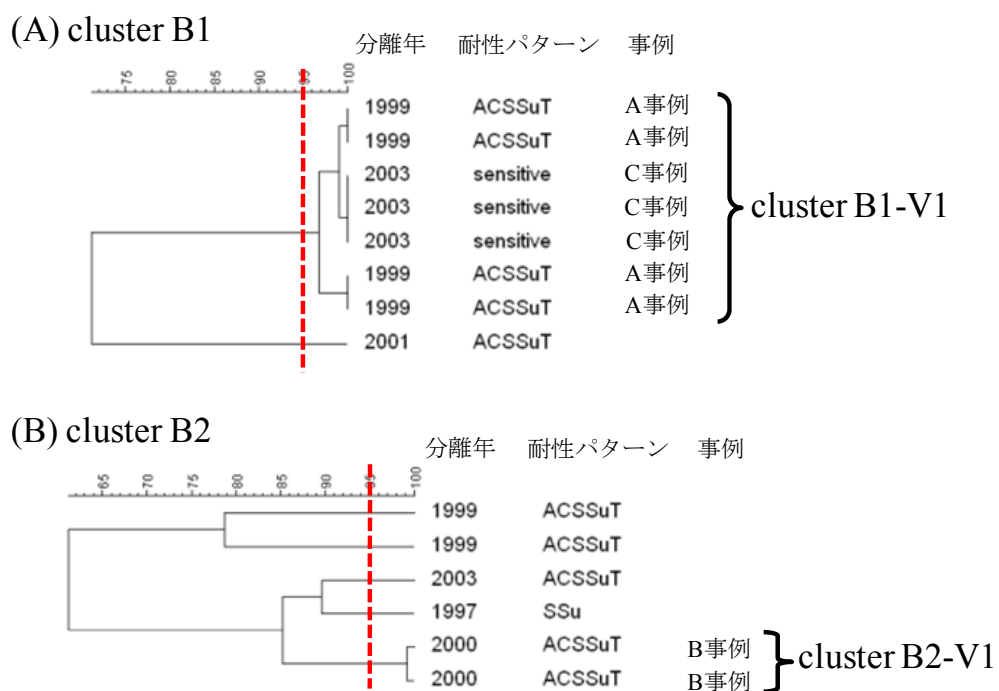


図12 ヒト由来DT104 complexのVNTRクラスター解析による第2段階解析

3. 考察

我が国で特定の地域におけるヒトからの DT104 分離状況を継続的に調査した報告はあまりない。松下ら¹¹⁾が東京都において 1987～1998 年における DT104 分離状況を報告しているが、その後の期間については報告されていない。今回、千葉県で散発下痢症患者および保菌者から分離された *S. Typhimurium* を用いて DT104 complex の有無を調査したところ、1999 年に DT104 complex による集団事例が発生していたことが確認された。これまで DT104 の集団事例としては 2005 年に国内で初確認されたと報告されていた¹²⁾が、今回の調査結果から DT フェージ型別が行えないために明らかとなっていないより多くの集団事例が存在する可能性が示唆された。

また今回の調査により、千葉県におけるヒトの DT104 感染事例は 2000 年代になってから減少傾向であることが確認された。このような減少傾向は海外でも確認されており、イギリスでは 1996 年をピークとして 1999 年にはヒトの感染事例数が 75%減少したと報告されている⁶⁷⁾。

我が国における DT104 の減少傾向の要因としては、食用動物における DT104 保菌率の低下があげられる。Kawagoe ら⁶⁸⁾は、牛および豚における DT104 保菌率が、1999～2001 年に比べて 2002～2005 年では有意に低下したことを報告している。食用動物における DT104 保菌の減少がヒトからの DT104 分離数の減少につながっているとすれば、千葉県以外の地域でも同様の傾向であると思われる。我が国における DT104 の動向把握のため、複数の地域で過去にヒトから分離された *S. Typhimurium* 菌株について DT104 検索を行う必要がある。

今回の調査でヒト由来 DT104 complex 菌株は、薬剤耐性パターン、保有している integron および薬剤耐性遺伝子、XbaI による PFGE パターンが世界的に pandemic した unique clone と同一であった^{13,14)}ことから、イエネズミ由来株と同様に世界的に pandemic している unique clone 由来の菌株であることが確認された。したがって、イエネズミ由来株と同様に、単独のクラスター解析では DNA fingerprinting による outbreak 株の特定が十分に行えないことが想定された。

そこで、イエネズミ由来株で有効であった 2 段階クラスター解析法の効果を確認するために、ヒト由来 DT104 complex を解析した。その結果、BlnI クラスター解析で形成されたクラスターは、VNTR クラスター解析による第 2 段階解析で細分化され、その細分化されたクラスターには疫学情報と一致する菌株が含まれていた。B 事例において 3 株中 1 株が同一クラスターに含まれなかったが、その 1 株は薬剤耐性パターンが他の 2 株と異なっており、B 事例は複数の遺伝子型の菌株によって発生した事例である可能性が高い。したがって、第 1 段階解析に BlnI クラスター解析、第 2 段階解析に VNTR クラス

ター解析を用いる 2 段階クラスター解析法は、DT104 の分子疫学的解析法として有効であることが確認された。

Hopkins らは³³⁾、DT104 の outbreak 由来株を VNTR 解析した場合、1 領域において 1 repeat 異なる菌株が認められることを報告している。同様の変異は他の病原細菌の VNTR 解析においても確認されている^{63,69)}。著者らは^{63,69)}、その対応策として VNTR クラスター解析のカットオフ値を 95%にした場合、そのような変異が生じて outbreak 関連株の特定に影響が出ないことを報告した。本研究においても、VNTR クラスター解析のカットオフ値を 95%にした場合に疫学情報と一致するクラスター解析結果が得られたことから、カットオフ値を 95%にする限り VNTR クラスター解析の安定性に問題はないと思われる。

これまでに我が国では DT104 による diffuse outbreak は確認されていないが、欧米では 2000 年代になって diffuse outbreak が発生している⁷⁰⁻⁷⁵⁾。今後の diffuse outbreak 発生に備えて、ヒトから *S. Typhimurium* が分離された場合にはその菌株を PCR により DT104 complex の同定を行い、DT104 complex であった場合には 2 段階クラスター解析法を用いた DNA fingerprinting を行って DT104 の動向を監視しておく必要がある。

結論として、ヒトから分離された *S. Typhimurium* 菌株中に DT104 complex が高率で含まれており、過去に隠れた集団事例が発生していたことが明らかとなった。イエネズミ由来 DT104 で有効であった 2 段階クラスター解析法の有効性をヒト由来 DT104 complex で確認したところ、疫学情報と一致した結果が得られ、その有効性が確認された。

第2節 イエネズミおよびヒト由来 DT104 の系統学的研究

1. 序論

近年、DNA fingerprinting 法である VNTR 型別のデータから minimum spanning tree (MST) を作成することで、病原細菌の分化状況を把握するといった系統学的解析が出来ることが明らかとなった^{32,76-79)}。MST 上で特異的に分化した菌株のグループが存在した場合、そのグループに特徴的な SNP や deletion などの genetic marker が確認されることがある⁷⁷⁻⁷⁹⁾。そのため、MST のグループに含まれる菌株が特異的な性状を有する⁸⁰⁾ことがあり、それが病原細菌の分布に影響することが想定される。

このような解析を行うためには、ある程度保存性が高い、すなわち型別能力が低い VNTR 領域を解析する必要がある⁸¹⁾。Lindstedt ら³²⁾が報告した DT104 の VNTR 型別法は、本研究で明らかとなったように単独のクラスター解析では outbreak 関連株を特定出来ない。したがって、VNTR 型別データに基づく MST によって系統学的解析が行える可能性があると思われる。しかしこれまでに、DT104 を VNTR 型別データに基づいて系統学的に解析した報告はない。

また、DT104 には複数の lineage が存在することが知られている (図 13)。DT104 は allantoin 代謝系に関する遺伝子群 (STM0517-STM0527) を deletion した後、*Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) と呼ばれる integron を含んだ遺伝子群を獲得し、世界的 pandemic を起こしたと考えられている^{16,30)}。さらに近年の DT104 の全ゲノム解析により、retron reverse transcriptase (*rrtT*) を含む領域 (STM3844-STM3849) が不安定で deletion を起こすことが報告されている⁸²⁾。他の病原細菌では、lineage によって薬剤耐性獲得傾向⁸⁰⁾や病原性⁸³⁾が異なることが報告されており、DT104 でも *rrtT* の deletion によって病原性が強まることが指摘されている⁸²⁾。しかし、これまでにヒト由来株を含めた野外分離株で lineage を解析した報告はない。

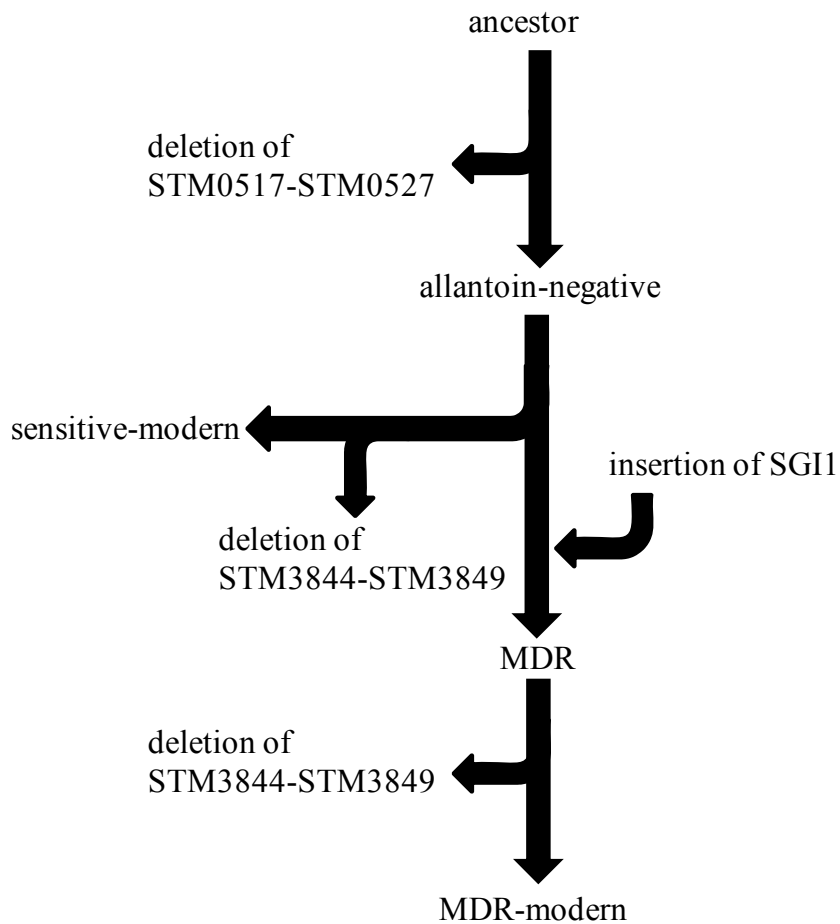


図13 DT104におけるlineageの分化

そこで、DT104 の分布に影響するような系統学的特質が現在分布しているDT104 菌株中にあるかどうかを調べるため、イエネズミ由来 DT104 およびヒト由来 DT104 complex 菌株を用いて lineage 解析を行った。また、VNTR 型別データに基づく MST 解析を行い、系統学的に分化したグループの有無を調査した。

2. 結果

(1) lineage 解析

イエネズミ由来 52 株は全てが MDR lineage であった。ヒト由来株は、薬剤感受性試験で耐性を示さなかった 3 株の sensitive を除いた 20 株が MDR lineage であった。薬剤耐性を示さなかった 3 株の sensitive は allantoin-negative lineage であった。

(2) VNTR 型別データに基づく MST 解析

イエネズミ由来株は、J ビルと YS ビル由来株から形成される complex と YS ビル由来株のみで形成される complex の 2 つに集約する傾向にあった。一方、ヒト由来株にも 2 つの complex が認められたが、イエネズミ由来株ほど集約する傾向がなかった。イエネズミ由来株とヒト由来株は系統学的に近い関係ではなく、両由来株が混在した complex を形成することはなかった (図 14)。

薬剤耐性が sensitive で allantoin-negative lineage であった 3 株は、MDR lineage の株と complex を形成した。

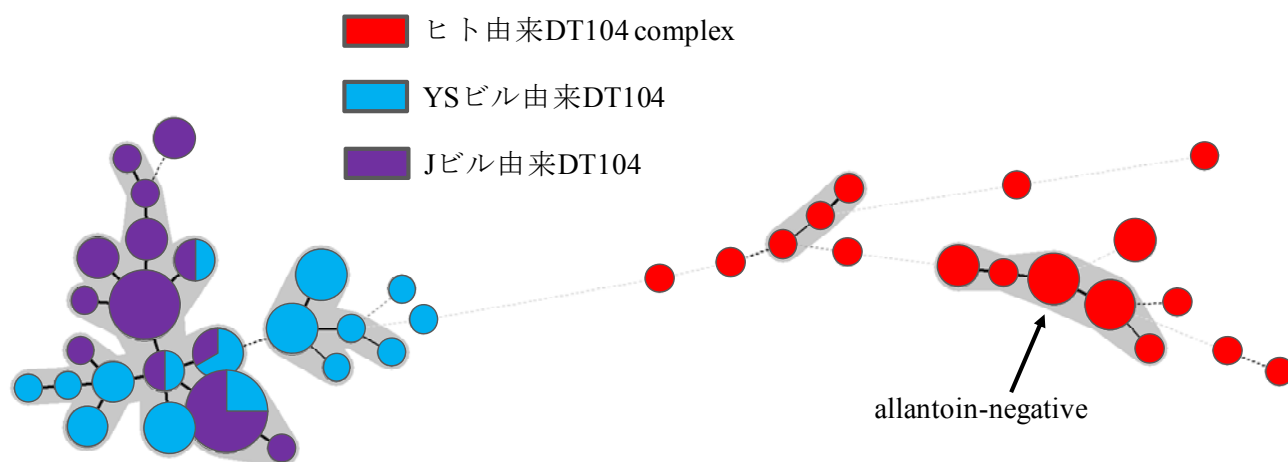


図14 イエネズミおよびヒト由来DT104のMST解析

各 STTR 領域における allele の分布状況を調査したところ、STTR6 (図 15) および STTR10pl (図 16) 領域において、イエネズミ由来株とヒト由来株で分布状況に差が認められた。

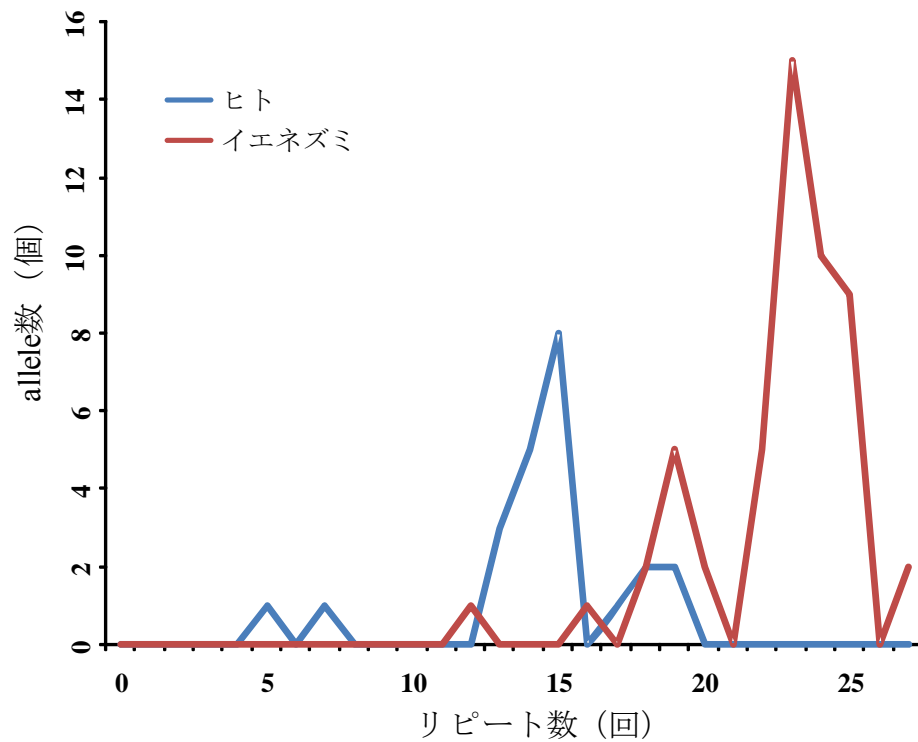


図15 STTR6におけるalleleの分布状況

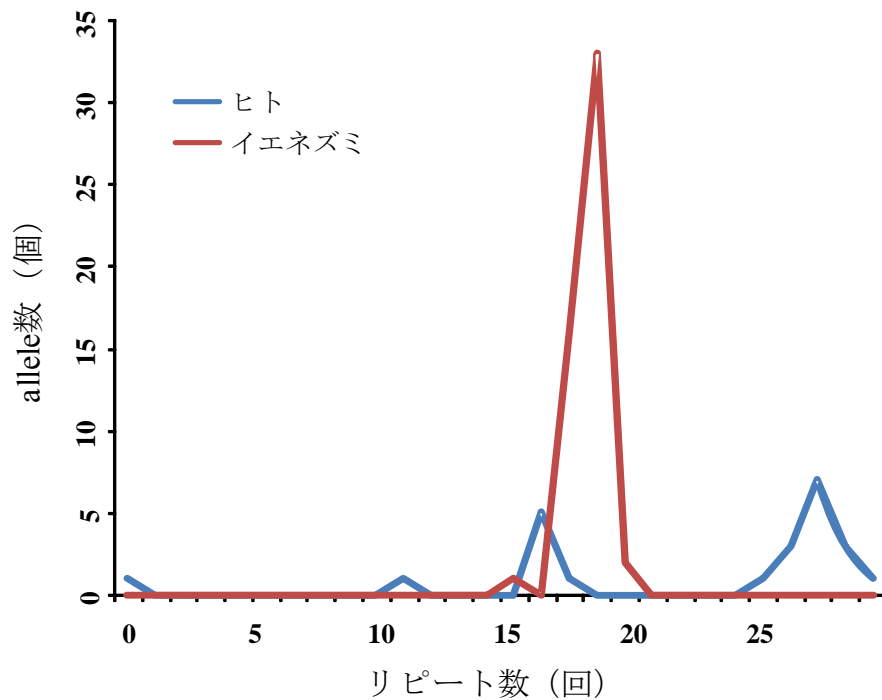


図16 STTR10plにおけるalleleの分布状況

一方、STTR3 (図 17)、STTR5 (図 18)、STTR9 (図 19) ではイエネズミ由来株とヒト由来株で分布状況に差はなかった。

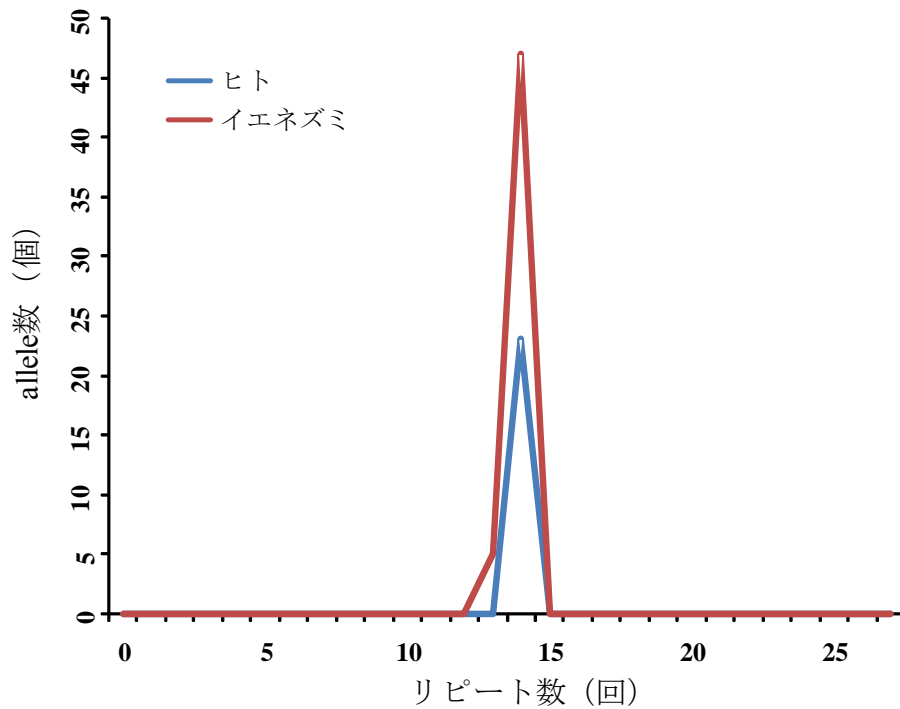


図17 STTR3におけるalleleの分布状況

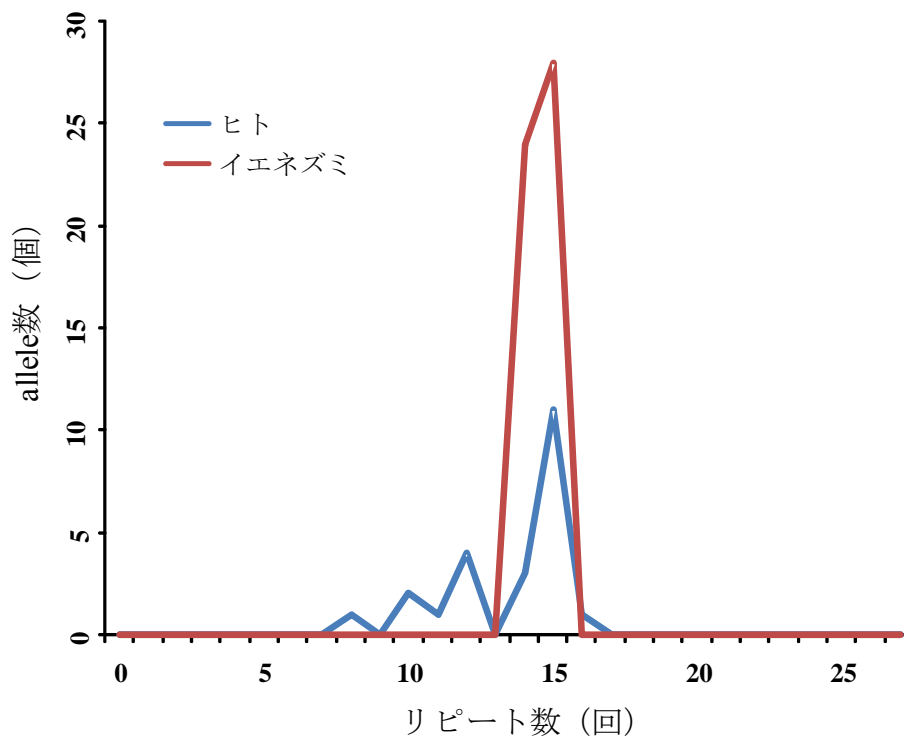


図18 STTR5におけるalleleの分布状況

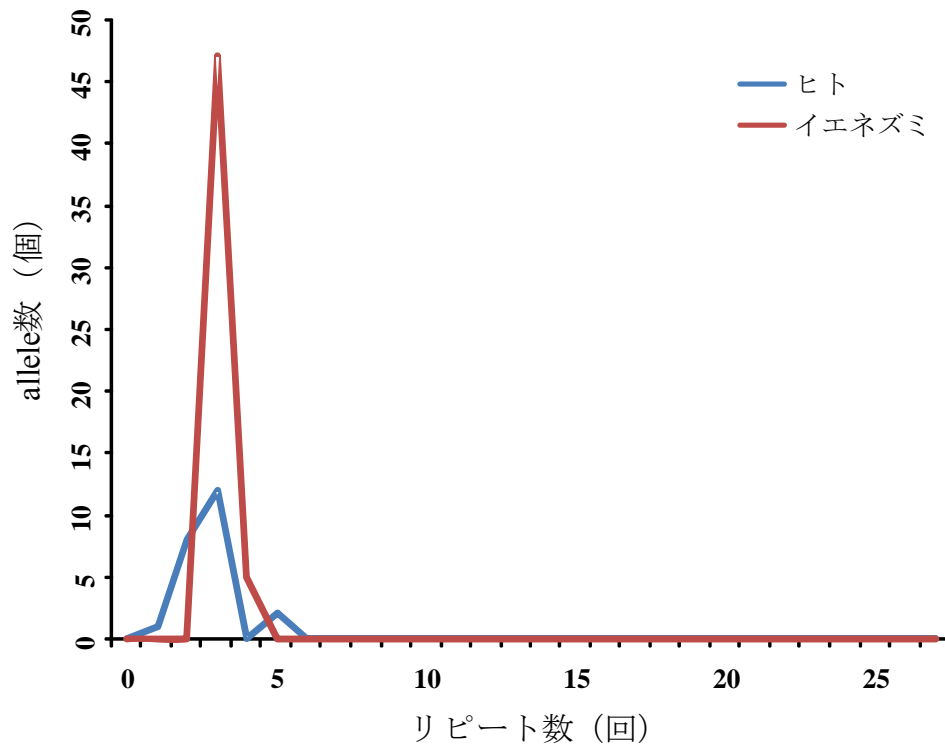


図19 STTR9におけるalleleの分布状況

3. 考察

VNTR 型別データに基づく MST による系統学的解析によって、イエネズミ由来 DT104 はヒト由来 DT104 complex とは異なって特異的に分化していることが明らかとなった。DT104 に関してはこれまでにこのような解析が行われていなかったため、イエネズミ由来株で認められた特異的な分化が DT104 の分布にどのような影響があるかということについては現時点では不明である。しかし、このような病原細菌の MST 解析で特異的に分化したグループが認められる場合には、そのグループになんらかの特徴的な genetic marker があることが多い⁷⁷⁻⁷⁹⁾。今後 DT104 の生態を明らかにするために、イエネズミ由来株に特徴的な genetic marker の有無を調査する必要がある。

VNTR 型別データに基づく MST による系統学的解析を行った場合、使用する VNTR 領域は、系統学的解析に有効に作用する phylogenetic locus と DT104 菌株の多型に有効に作用する polymorphic locus に大別される⁷⁸⁾。今回、イエネズミの特異的な分化の要因が STTR6 および STTR10pl であることは、allele の分布から明らかであり、DT104 に関してはこの 2 領域が phylogenetic loci であることが示唆される。

phylogenetic locus を特定しておくことは、VNTR 型別を行う際にも有用である。phylogenetic locus における repeat 数の相違は、polymorphic locus における相違より系統学的に大きな相違となる⁷⁸⁾。これまで VNTR 型別では全ての VNTR 領域を対等に取り扱ってきており^{32,49,50,69,76,77)}、本研究でもクラスター解析を行う際にはそのように扱ってきた。しかし、本研究によって DT104 の VNTR 解析における phylogenetic locus が特定出来たことから、今後は phylogenetic locus の相違を polymorphic locus の 2 倍に評価する、といった重み付けを行った解析が行える可能性がある。

DT104 の phylogenetic locus と特定された STTR6 および STTR10pl は、Lindstedt ら³²⁾によれば多様性が高い領域と報告されている。一般的には、系統学的解析を行うためには保存性の高い領域を使用する方が有利である⁸¹⁾ため、今回の結果は非常に興味ある知見である。その一方で、polymorphic locus である STTR3、STTR5、STTR9 は多様性に乏しかった。このことが、DT104 を VNTR クラスター解析した場合の型別能力不足の要因であると思われる。

今回明らかとなったイエネズミの特異的な分化は、lineage の違いに起因するものではなかった。ヒト由来株で allantoin-negative lineage が 3 株認められたが、その他は全て MDR lineage であり、イエネズミ由来株は全て MDR lineage であった。興味あることに、3 株の allantoin-negative lineage は MDR lineage と混在した complex を形成した。このことから、より多くの菌株を解析する必要はあるが、DT104 は SGI1 の獲得によって pandemic に有利な遺伝子を獲得したのではなかったことが推察される。

結論として、イエネズミ由来 DT104 はヒト由来 DT104 complex と比較して系統学的に特異な分化をしていることが明らかとなった。その分化は lineage の違いによるものではなかったことから、特徴的な genetic marker を有していることが推察された。また、DT104 の VNTR 領域のうち、STTR6 および STTR10pl が phylogenetic locus であることが特定され、DT104 の VNTR 型別の型別能力を改善出来る可能性が示唆された。

第3節 実験の部

1. 材料

(1) 供試菌株

1997～2006年に千葉県内で分離された *S. Typhimurium* 56株を供試した。56株には、1999年のA集団事例由来4株、2000年のB集団事例由来3株、および2003年のC集団事例由来3株が含まれている。残りの46株のうち、19株が保菌者から分離され、27株が散発下痢症患者から分離された。

(2) 使用した機器および試薬等

第2章で使用した機器および試薬等は、第1章で使用したものと同一である。

2. 方法

DTファージ型別、PCRによるDT104の同定、薬剤感受性試験、integronおよび薬剤耐性遺伝子の検索、PFGE、VNTR、クラスター解析については第1章と同様に実施した。

(1) DT104のlineage解析

lineage解析は、Matiasovicovaら³⁰⁾に準じて実施した。使用したprimerは表19のとおりである。PCRについては、第1章と同様に実施した。PCRサイクルは、94℃ 5分を1サイクル、94℃ 1分：55℃ 1分：72℃ 1分を30サイクル、72℃ 7分を1サイクル、で行った。

表19 DT104のlineage解析に使用したprimer

検出ターゲット	primer名称	シーケンス (5'-3')	増幅産物サイズ
STM0519(<i>glxR</i>)	STM519F	ACCATCGTCGATATGAGTTC	606bp
	STM519R	TATGATTGGCCATTAATTCC	
STM0527(<i>allC</i>)	STM527-F	CGATATCGATGCTGATATCC	933bp
	STM527-R	ATAGAAGAAACATTGCCCTG	
STM3846(<i>rrtT</i>)	STM3846-F	GAACTATTGCTCATCCTTCG	576bp
	STM3846-R	GTAACGTGACGGTTATGTCC	

(2) DT104の系統学的解析

VNTR型別データに基づくMSTはBioNumerics Ver. 4を用いて作成した。類似度はManhattan distanceにより算出した。

総 括

本研究によって、イエネズミが高率に DT104 を保菌しており、長期間に渡ってイエネズミのコロニーで維持されていることが明らかとなった。イエネズミは抗生物質の使用に無関係であり、保菌されている DT104 は世界的に pandemic した unique clone と同一であることが分子疫学的に確認されたことから、DT104 の clonal dissemination の重要な evidence になるものと思われる。

また、これまで解析されていなかった千葉県内でヒトから分離された *S. Typhimurium* 菌株を分子疫学的に解析したところ、供試菌株のうち 41.1% が DT104 complex であったことが確認された。ヒト由来 DT104 complex もイエネズミ由来 DT104 と同様に世界的に pandemic した unique clone と同一の特徴を有していた。供試菌株中に含まれた 3 集団感染事例由来株も DT104 complex であることが確認され、これまでに報告されていたよりも以前から DT104 による集団感染事例が発生していることが明らかとなった。我が国における DT104 の動向を把握するために、全国的にこれまで解析していなかった *S. Typhimurium* 菌株を retrospective に解析するとともに、今後分離される *S. Typhimurium* 全菌株について DT104 の同定を行う必要があると思われる。

イエネズミに保菌されていた DT104 のクラスター解析によって、これまで報告されている PFGE および VNTR の単独解析では DT104 の分子疫学的解析に必要な十分な型別能力がないことが明らかとなった。その解決策として、BlnI クラスター解析と VNTR クラスター解析による 2 段階クラスター解析法を試みたところ、ヒト由来株で疫学情報とリンクした結果が得られ、その有効性が確認された。今後、DT104 による diffuse outbreak の発生状況を監視する際に有用であると思われる。

DT104 の分子疫学的研究の一環として系統学的解析を行ったところ、イエネズミ由来株が特異的な分化をしていることが明らかとなった。その分化は lineage の違いといった大きな genetic event によるものではなかったことから、特徴的な genetic marker を有していることが推察された。また DT104 の VNTR 領域のうち、STTR6 および STTR10pl が phylogenetic locus であることが特定された。このことにより、DT104 の VNTR 型別法の型別能力を向上させられる可能性が示唆された。

本研究によって、これまで明らかとなっていなかった DT104 の生態の一環を解明し、DT104 の DNA fingerprinting に有効な新たな分子疫学的解析法を開発した。これらの成果は今後の DT104 の疫学研究に有用であるだけでなく、DT104 の自然界における生態の解明に役立つものと思われる。

謝 辞

本研究の遂行に際し、御指導御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究
院微生物薬品化学研究室の山本友子教授に深謝いたします。

本研究で使用したイエネズミ由来サルモネラ菌株は、日本大学生物資源科
学部獣医学科獣医公衆衛生学研究室の丸山総一教授をはじめとする同研究室
の卒業生の皆様によって分離・同定されました。当該菌株を分与していただ
きましたことに関して、深謝いたします。また、本研究で使用したヒト由来
サルモネラ菌株は、千葉県衛生研究所細菌研究室の依田清江室長によって同
定されました。当該菌株の使用を快く承諾いただきましたことに関して、深
謝いたします。

さらに、イエネズミ由来株のファージ型別を行っていただきました国立感
染症研究所細菌第一部細菌第二室の泉谷秀昌室長および渡辺治雄副所長に深
謝いたします。

最後に、千葉大学大学院への入学に関して御理解と御協力をいただきました
千葉県衛生研究所の皆様には深くお礼を申し上げます。

なお、本研究の一部は、文部科学省学術フロンティア事業「人獣共通感染
症のサーベイランスと制御」により行われました。

参考文献

1. 坂崎利一編：食中毒 近代出版 (1981)
2. Tindall, B. J.; Grimont, P. D. A; Garrity, G. M.; Euzéby, J. P.: Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 521–524 (2005)
3. Brenner, F. W.; Villar, R. G.; Angulo, F. J.; Tauxe, R.; Swaminathan, B.: *Salmonella* nomenclature. J. Clin. Microbiol. 38, 2465–2467 (2000)
4. Anonymous: サルモネラ症 2006 年 6 月現在 病原微生物検出情報 27, 191-192 (2006)
5. 国立感染症研究所感染症情報センター: <http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html> 2008 年 11 月 26 日アクセス
6. Foley, S. L.; Zhao, S; Walker, R. D.: Comparison of molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* foodborne pathogens. Foodborne Path. Dis. 4, 253-276 (2007)
7. Helms, M.; Ethelberg, S.; Mølbak, K.; the DT104 Study Group.: International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. Emerg. Infect. Dis. 11, 859-867 (2005)
8. Martin, L.J.; Doré, K.; Buxton, J. A.; Pollari, F.; Henry, B.; Middleton, D; Ahmed, R; Jamieson, F. Ciebin, B.; McEwen, S. A.; Wilson, J. B.; Multi-Provincial *Salmonella* Typhimurium Case-Control Study Steering Committee.: Increased burden illness associated with antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections. J. infect. Dis. 189, 377-384 (2004)
9. Helms, M.; Simonsen, J.; Mølbak, K.: Quinolone resistance is associated with increased risk of invasive illness and death in *Salmonella* Typhimurium infection. J. Infect. Dis. 190, 1652-1654 (2004)
10. Helms, M.; Vastrup, P.; Gerner-Smidt, P.; Mølbak, K.: Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* Typhimurium. Emerg. Infect. Dis. 8, 490-495 (2002)
11. 松下秀、小西典子、有松真保、甲斐明美、山田澄夫、諸角聖、泉谷秀昌、寺島淳、渡辺治雄：散発事例由来 *Salmonella* serovar Typhimurium の薬剤耐性と definitive phage type 104 の出現状況 感染症誌 73, 1087-1094 (1999)
12. Taguchi, M.; Seto, K.; Kanki, M.; Tsukamoto, T.; Izumiya, H.; Watanabe, H.: Outbreak of food poisoning caused by lunch boxes prepared by company contaminated with multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium DT104. Jpn. J. Infect. Dis. 58, 55-56 (2005)

13. Mulvery, M. R.; Boyd, D. A.; Olson, A. B.; Doublet, B.; Cloeckaert, A.: The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microb. Infect.* 8, 1915-1922 (2006)
14. Lai-King, N. G.; Mulvey, M. R.; Martin, I.; Peters, G. A.; Johnson, W.: Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolated of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 3018-3021 (1999)
15. Baggesen, D. L.; Sandvang, D.; Aarestrup, F. M.: Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1581-1586 (2000)
16. Ribot, E. M.; Wierzba, R. K.; Angulo, F. J.; Barrett, T. J.: *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 387-391 (2002)
17. van den Bogaard, A. E.; Stobberingh, E. E.: Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 327-335 (2000)
18. DeFrancesco, K. A.; Cobbold, R. N.; Rice, D. H.; Besser, T. E.; Hancock, D. D.: Antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* from dairy cattle associated with recent multi-resistant salmonellosis outbreak. *Vet. Microbiol.* 98, 55-61 (2004)
19. Olsen, J. E.: Antibiotic resistance: genetic mechanisms and mobility. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 92, 15-22 (1999)
20. Murphy, T. M.; McNamara, E.; Hill, M.; Rooney, N.; Sarry, J.; Egan, J.; O'Connell, A.; O'Loughlin, J.; McFaddyen, S.: Epidemiological studies of human and animal *Salmonella typhimurium* DT104 and DT104b isolates in Ireland. *Epidemiol. Infect.* 126, 3-9 (2001)
21. Bauer-Gariand, J.; Frye, J. G.; Gray, J. T.; Berrang, M. E.; Harrison, M. A.; Fedorka-Cray, P. J.: Transmission of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in poultry with and without antimicrobial selective pressure. *J. Appl. Microbiol.* 101, 1301-1308 (2006)
22. Davis, M. A.; Hancock, D. D.; Besser, T. E: Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: the importance of dissemination. *J. Lab. Clin. Med.* 140, 135-141 (2002)
23. Poppe, C.; Smart, N.; Khakhria, R.; Johnson, W.; Spika, J.; Prescott, J.: *Salmonella typhimurium* DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. *Can. Vet. J.* 39, 559-565 (1998)
24. Helm, J. D.; Hines, R. K.; Hill, J. E.; Caver, J. A.: Multiple drug-resistant

- Salmonella* Typhimurium DT104 and DT104b isolated in bobwhite quail (*Colinus virginianus*). Avian Dis. 43, 788-791 (1999)
25. Hudson, S. A.; Quist, C.; Lee, M. D.; Keyes, K.; Dodson, S. V.; Morales, C.; Sanchez, S.; White, D. G.; Maurer, J.: Genetic relatedness of *Salmonella* isolated from nondomestic birds in southern United States. J. Clin. Microbiol. 38, 1860-1865 (2000)
 26. Martinez-Urtaza, J; Liebana, E.; Garcia-Migura, L.; Perez-Piñeiro, P.; Saco, M.: Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from marine environments in costal waters of Galicia (Spain). Appl. Environ. Microbiol. 70, 4030-4034 (2004)
 27. Pritchett, L. C.; Konkell, M. E.; Gay, J. M.; Besser, T. E.: Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR. J. Clin. Microbiol. 38, 3484-3488 (2000)
 28. Leon-Velarde, C. G.; Cai, H. Y.; Larkin, C.; Bell-Rogers, P.; Stevens, R. W.; Odumeru, J. A.: Evaluation of methods for the identification of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 from poultry environmental samples. J. Microbiol. Methods 58, 79-86 (2004)
 29. Hermans, A. P. H. M.; Abee, T.; Zwietering, M. H.; Aarts, H. J. M.: Identification of novel *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-specific prophage and nonprophage chromosomal sequences among serovar Typhimurium isolates by genomic subtractive hybridization. J. Clin. Microbiol. 71, 4979-4985 (2005)
 30. Matiasovicova, J.; Adams, P.; Barrow, P. A.; Hradecka, H.; Malcova, M.; Karpiskova, R.; Budinska, E.; Pilousova, L.; Rychlik, L.: Identification of putative ancestors of the multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 clone harboring the *Salmonella* genomic island 1. Arch. Microbiol. 187, 415-424 (2007)
 31. Lindstedt, B.-A.: Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. Electrophoresis 26, 2567-2582 (2005)
 32. Lindstedt, B.-A.; Vardund, T.; Kapperud, G.: DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number tandem repeat loci. J. Microbiol. Methods 58, 213-222 (2004)
 33. Hopkins, K. L.; Maguire, C.; Best, E.; Liebana, E.; Threlfall, E. J. Stability of multiple-locus variable-number tandem repeats in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Clin. Microbiol. 45, 3058-3061 (2007)
 34. Webster, J. P.; MacDonald, D. W.: Parasites of wild brown rats (*Rattus*

- norvegicus*) on UK farms. *Parasitology* 111, 247-255 (1995)
35. Swanson, S. J.; Snider, S.; Braden, C. R.; Boxrud, D.; Wunschmann, A.; Rudroff, J. A.; Lockett, J.; Smith, K. E.: Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with pet rodents. *N. Engl. J. Med.* 356, 21-28 (2007)
 36. Fuller, C. C.; Jawahir, S. L.; Leano, F. T.; Signs, K.; Davis, C.; Hoimes, Y.; Morgan, J.; Teltow, G.; Jones, B.; Sextons, R. B.; Davis, G. L.; Braden, C. R.; Patel, N. J.; Deasy III, M. P.; Smith, K. E.: A multi-state *Salmonella* Typhimurium outbreak associated with frozen vacuum-packed rodents used to feed snakes. *Zoonoses Public Health* 55, 481-487 (2008)
 37. Humphrey, T.: *Salmonella* Typhimurium definitive phage type 104 a multi-resistant *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 173-186 (2001)
 38. Daniels, M. J.; Hutchings, M. R.; Greig, A.: The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiol. Infect.* 130, 561-568 (2003)
 39. Davies, R. H.; Wray, C.: Mice as carriers of *Salmonella enteritidis* on persistently infected poultry units. *Vet. Rec.* 137, 337-341 (1995)
 40. Healing, T. D.: *Salmonella* in rodents: a risk to man? *CDR(Lond Engl Rev)* 1, R114-116 (1991)
 41. Hilton, A. C.; Willis, R. J.; Hickie, S. J.: Isolation of *Salmonella* from urban wild brown rats (*Rattus norvegicus*) in the West Midlands, UK. *Int. J. Environ. Health Res.* 12, 163-168 (2002)
 42. 丸山総一、光眞明子、中川かほる、壁谷英則、横山栄二、勝部泰次：横浜市の雑居ビルで捕獲したイエネズミの*Salmonella*保菌状況 獣医疫学雑誌 4, 27-32 (2000)
 43. Erdman, M. M.; Harris, I. T.; Terremorell, M.; Wilt, V. M.; Harris D. L.: Occurrence of *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 on a commercial swine farm before, during, and after depopulation and repopulation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 460-466 (2005)
 44. Roesler, U.; von Altrock, A.; Heller, P.; Bremerich, S.; Arnold, T.; Lehmann, J.; Waldmann, K.-H.; Truyen, U.; Hensel, A.: Effects of fluorequinolone treatment acidified feed, and improved hygiene measures on the occurrence of *Salmonella* Typhimurium DT104 in an integrated pig breeding herd. *J. Vet. Med. B* 52, 69-74 (2005)
 45. 加藤行男、中井康博、松下真紀、高木敬彦、光崎研一、金内長司：ビル内飲食店と魚市場のネズミにおける *Salmonella* および *Campylobacter* 保菌状況 日獣会誌 52, 194-197 (1999)
 46. Kang, M.-S.; Besser, T. E.; Hancock, D. D.; Porwollik, S.; McClelland, M.; Call,

- D. R.: Identification of specific gene sequence conserved in contemporary epidemic strains of *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6938-6947 (2006)
47. Majtánová, L.; Majtán, V.: Molecular characterization of the multidrug-resistant phage types *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104, DT20A and DT120 strains in the Slovakia. *Microbiol. Res.* in press
48. Levin, B. R.; Lipsitch, M.; Bonhoeffer, S.: Population biology, evolution and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* 283, 806-809 (1999)
49. Torpdahl, M.; Sørensen, G.; Lindstedt, B.-A.; Nielsen, E. M.: Tandem repeat analysis for surveillance of human *Salmonella* Typhimurium infections. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 388-395 (2007)
50. Best, E. L.; Lindstedt, B.-A.; Cook, A.; Hadley, F. A. C.; Threlfall, E. J.; Liebana, E.: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium: comparison of isolates from pigs, poultry and cases of human gastroenteritis. *J. Appl. Microbiol.* 103, 565-572 (2007)
51. Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Mickelsen, P. A.; Murray, B. E.; Persing, D. H.; Swaminathan, B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239 (1995)
52. Iguchi, A.; Iyoda, S.; Terajima, J.; Watanabe, H.; Osawa, R.: Spontaneous recombination between homologous prophage regions causes large scale inversions within the *Escherichia coli* O157:H7 chromosome. *Gene* 372, 199-207 (2006)
53. Kudva, I. T.; Evans, P. S.; Perna, N. T.; Barret, T. J.; Ausubel, F. M.; Blattner, F. R.; Calderwood, S. B.: Strains of *Escherichia coli* O157:H7 differ primarily by insertion or deletions, not single-nucleotide polymorphism. *J. Bacteriol.* 184, 1873-1879 (2002)
54. Cooke, F. J.; Brown, D. J.; Fookes, M.; Pickard, D.; Ivens, A.; Wain, J.; Roberts, M.; Kingsley, R. A.; Thomson, N. R.; Dougan, G.: Characterization of the genomes of a diverse collection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *J. Bacteriol.* 190, 8155-8162 (2008)
55. Yokoyama, E.; Uchimura, M.: Optimal settings of fingerprint-type analysing computer software for the analysis of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pulsed-field gel electrophoresis patterns. *Epidemiol. Infect.* 134, 1004-1014 (2006)
56. 横山栄二、内村眞佐子: 牛たたきを原因食品とする腸管出血性大腸菌 O157

による diffuse outbreak における分子疫学的解析 防菌防黴誌 33,225-231 (2005)

57. Markogiannakis, A.; Tassios, P. T.; Lambiri, M.; Ward, L. R.; Kourea-Kremastinou, J.; Legakis, N. J.; the Greek Nontyphoidal *Salmonella* Study Group; Vatopoulos, A. C.: Multiple clones within multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1269-1271 (2000)
58. Liebana, E.; Garcia-Migura, L.; Clouting, C.; Clifton-Hardy, A.; Lindsay, E.; Threlfall, E. J.; McDowell, S. W. J.; Davies, R. H.: Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4450-4456 (2002)
59. Kim, S.; Chuu, S. G.; Lim, O. Y.; Park, M. S.; Kang, Y. H.; Park, Y. H.; Lee, B. K.: Genomic relationship of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolates from Korea and the United States. *J. Microbiol.* 42, 14-19 (2004)
60. Doran, G.; Morris, D.; O'Hara, C.; DeLappe, N.; Bradshaw, B.; Corbett-Feeney, G.; Cormican, M.: Cost-effective application of pulsed-field gel electrophoresis to typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8236-8240.
61. Weill, F.-X.; Guesnier, F.; Guibert, V.; Timinouni, M.; Demartin, M.; Polomack, L.; Grimont, P. A. D.: Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from human in France (1993 to 2003). *J. Clin. Microbiol.* 44, 700-708 (2006)
62. Valdezate, S.; Arroyo, M.; González-sanz, R.; Ramiro, R.; Herrera-León, S.; Usera, M. A.; De La Fuente, M.; Echeita, A.: Antimicrobial resistance and phage and molecular typing of *Salmonella* strains isolated from food for human consumption in Spain. *J. Food Prot.* 70, 2741-2748 (2007)
63. Yokoyama, E.; Kishida, K.; Uchimura, M.; Ichinohe, S.: Improved differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains, including many Beijing genotype strains, using a new combination of variable number of tandem repeat loci. *Infect. Genet. Evol.* 7, 499-508 (2007)
64. Witonski, D.; Stefanova, R.; Ranganathan, A.; Schutze, G. E.; Eisenach, K. D.; Cave, M. D.: Variable-number tandem repeats that are useful in genotyping isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Newport. 44, 3849-3854 (2006)
65. Hunter, S. B.; Vautering, P.; Lambert-Fair, M. A.; Van Duyne, M. S.; Kubota, K.; Graves, L.; Wrigley, D.; Barret, T.; Ribot, E.: Establishment of a universal size

- standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national database to the new size standard. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1045-1050 (2005)
66. 渡辺治雄、寺嶋淳、泉谷秀昌、伊豫田淳、田村和満 分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制；パルスネットの構築 *感染症誌* 76, 842-848 (2002)
 67. 国立感染症研究所 *Salmonella* Typhimurium DT104：多剤耐性動物流行株の推移 *病原微生物検出情報* 22, 226-227 (2001)
 68. Kawagoe, K.; Mine, H.; Asai, T.; Kojima, A.; Ishihara, K.; Harada, K.; Ozawa, M.; Izumiya, H.; Terajima, J.; Watanabe, H.; Honda, E.; Takahashi, T.; Samejima, T.: Changes of multi-drug resistance patterns in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium isolates from food-producing animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 69, 1211-1213 (2007)
 69. Yokoyama, E.; Uchimura, M.: Variable number of tandem repeats and pulsed-field gel electrophoresis cluster analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serovar O157 strains. *J. Food Prot.* 70, 2583-2588 (2007)
 70. Luzzi, I.; Galetta, P.; Massari, M.; Rizzo, C.; Dionisi, A. M.; Filetici, E.; Cawthome, A.; Tozzi, A.; Busani, L.; Gnesivo, C.; Pendenza, A.; Piccoli, A.; Napoli, P.; Loffredo, R.; Trinito, M. O.; Santarelli, E.; Ciofi degli Atti, M. L.; An Easter outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT104A associated with traditional pork salami in Italy. *Euro. Surveill.* 12, E11-12 (2007)
 71. Doorduyn, Y.; Hofhuis, A.; de Jager, C.; van der Zwalua, W.; Notermans, D.; van Pelt, W.: *Salmonella* Typhimurium outbreak in the Netherlands in 2008. *Euro. Surveill.* 13, pii:19026 (2008)
 72. Ethelberg, S.; Sørensen, G.; Kristensen, B.; Christensen, K.; Krusell, L.; Hemper-Jørgensen, A.; Perge, A.; Nielsen, E. M.: Outbreak with multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 linked to carpaccio, Denmark, 2005. *Epidemiol. Infect.* 135, 900-907 (2007)
 73. Kivi, M.; Hofhuis, A.; Notermans, D. W.; Wannet, W. J.; Heck, M. E.; van de Giessen, A. W.; van Duynhoven, Y. T.; Stenvers, O. F.; Bosman, A.; van Pelt, W.: A beef-associated outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT104 in the Netherlands with implications for national and international policy. *Epidemiol. Infect.* 135, 890-899 (2007)
 74. Isakbaeva, E.; Lindstedt, B. A.; Schimmer, B.; Vardund, T.; Stavnes, T. L.; Hauge, K.; Gondrosen, B.; Blystad, H.; Kløvstad, H.; Aavitsland, P.; Nygård, K.; Kapperud, G.: *Salmonella* Typhimurium DT104 outbreak linked to imported minced beef, Norway, October-november 2005. *Euro. Surveill.* 10, E051110.0

(2005)

75. Dechet, A. M.; Scallan, E.; Gensheimer, K.; Hoekstra, R.; Gunderman-King, J.; Lockett, J.; Wrigley, D.; Chege, W.; Sobel, J.; Multistate Working Group: Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium definitive type 104 infection linked to commercial ground beef, northern United States, 2003-2004. *Clin. Infect. Dis.* 42, 747-752 (2006)
76. Supply, P.; Allix, C.; Lesjean, S.; Caroso-Oelemann, M.; Rüsche-Gerdes, S.; Willery, E.; de Haas, P.; van Deutekom, H.; Roring, S.; Bifani, P.; Kurepina, M.; Kreiswirth, B.; Sola, C.; Rastogi, N.; Vatin, V.; Gutierrez, M. C.; Fauville, M.; Niemann, S.; Skuce, R.; Kremer, K.; Locht, C.; van Soolingen, D.: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4498-4510 (2006)
77. Schouls, L. M.; van der Heide, H. G.; Vauterin, L.; Vauterin, P.; Mooi, F. R.: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. *J. Bacteriol.* 186, 5496-5505 (2004)
78. 和田崇之 結核菌の反復配列多型 (VNTR) 解析におけるローカライジングと国際標準化 結核 83, 233 (2008)
79. 和田崇之、長谷篤、岩本朋忠、吉田志緒美 北京型結核菌のサブグループにおける遺伝的特徴：VNTR 多型を中心として 結核 83, 314 (2008)
80. Iwamoto, T.; Yoshida, S.; Suzuki, K.; Wada, T.: Population structure analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family indicates an association between certain sublineages and multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3805-3809 (2008)
81. Mokrousov, I.; Narvskaya, O.; Limeschenko, E.; Vyazovaya, A.; Otten, T.; Vyshnevskiv, B.: Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2438-2444 (2004)
82. Pilousova, L.; Matiasovicova, J.; Sisak, F.; Havlickova, H.; Rychlik, I.: Retron reverse transcriptase (*rrtT*) can be lost in multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 strains and influences virulence for mice. *Vet. Microbiol.* 111, 191-197 (2005)
83. Kong, Y.; Cave, M. D.; Zhang, L.; Foxman, B.; Marrs, C. F.; Bates, J. H.; Yang, Z. H.: Population-based study of deletion in five different genomic regions of *Mycobacterium tuberculosis* and possible clinical relevance of the deletions. *J.*

Clin. Microbiol. 44, 3940-3946 (2006)

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Yokoyama, E.; Maruyama, S.; Kabeya, H.; Hara, S.; Sata, S.; Kuroki, T.; Yamamoto, T.: Prevalence and genetic properties of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104 isolated from *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus* house rats in Yokohama City, Japan. Appl. Environ. Microbiol. 73, 2624-2630 (2007)

審査委員名

本学位論文の審査は、千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	小林	弘
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	医学博士	上田	志朗
副査	千葉大学教授（医学研究院）	医学博士	白澤	浩