

200401146A

食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究

(課題番号：H15-食品-012)

平成16年度総括・分担研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金食品の安全性高度化推進研究事業)

主任研究者 渡辺治雄

国立感染症研究所 細菌第一部

目 次

厚生労働科学研究費補助金食品の安全性高度化推進研究事業

1. 平成 16 年度総括研究報告書

食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究…………… 1

主任研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所 細菌第一部

2. 平成 16 年度分担研究報告書

(I) サルモネラをはじめとした食中毒菌の薬剤耐性に関する遺伝学的研究…………… 13

分担研究者 泉谷 秀昌 国立感染症研究所

協力研究者 寺嶋 淳 ”

(II) 食品・ヒト由来食中毒細菌の薬剤耐性の疫学的研究…………… 30

分担研究者 山口 正則 埼玉県衛生研究所

研究協力者 倉園 貴至 ”

大塚佳代子 ”

(III) 食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究…………… 42

分担研究者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター

研究協力者 横山 敬子 ”

小西 典子 ”

矢野 一好 ”

諸角 聖 ”

(IV) 食品由来の食中毒菌による耐性獲得リスクマネジメント手法に関する研究…………… 57

分担研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究者 山本 茂貴 ”

山崎 学 ”

(V) 家畜衛生分野における薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究…………… 70

分担研究者 高橋 敏雄 農林水産省動物医薬品検査所

協力研究者 浅井 鉄夫 ”

小島 明美 ”

石原加奈子 ”

原田 和記 ”

(VI) 家畜由来 *Salmonella* Typhimurium の多剤耐性化の誘因及び耐性化機構の解明…………… 83

分担研究者 中澤 宗生 農業・生物系特定産業技術研究機構
動物衛生研究所

協力研究者 鮫島 俊哉 ”

秋庭 正人 ”

平成16年度 厚生労働科学研究費補助金食品の安全性高度化推進研究事業
総括研究報告書

食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所細菌第一部長

研究要旨：

(1) ヒトから分離されるサルモネラの薬剤耐性率は約34%で、多剤耐性化の傾向にあることを明らかにしてきた。特にフルオロキノロン耐性サルモネラが2004年までに18例の患者から分離されており、すべて *S. Typhimurium* であり、疫学的解析で汚染原因が推定できたのはペットとの関係が推定された1例のみであった。

(2) 牛と豚から分離された *S. Typhimurium* (ST) の50%に多剤耐性を示すDT104が確認された。それらは2つの主要な遺伝子型(PFGEパターン)に分類され、一部はヒト症例株のそれと一致していた。多剤耐性 *S. Typhimurium* DT104による散発ヒト事例の発生が増加するとともに、大阪でわが国初の集団事例も見られた。

(3) 健康家畜糞便の14.2~49.5%からカンピロバクターが分離され、牛、採卵鶏およびブロイラーからは主に *C. jejuni* が、豚からは主に *C. coli* が分離された。*C. jejuni* 及び *C. coli* の耐性率を比較するといずれの薬剤についても *C. coli* の耐性率が高かった。マクロライド系薬剤については、*C. jejuni* の全株が感受性であったが、*C. coli* では39-48%と高い耐性率を示した。フルオロキノロン耐性株は *C. jejuni* の10.2~16.3%および *C. coli* の24.2~24.8%に認められた。

分担研究者：

中澤宗生 (独法農技研動物衛生研究所)
高橋敏雄 (農林水産省動物医薬品検査所)
五十君静信 (国立医薬品食品衛生研究所)
甲斐明美 (東京都健康安全研究センター)
山口正則 (埼玉県衛生研究所)
泉谷秀昌 (国立感染症研究所)

A. 研究目的

サルモネラ、カンピロバクターは食中毒の原因菌の主たるものである。それらの菌の多剤耐性化が世界的に拡大してきている。耐性菌による感染症を治療するに当たり、患者の治

療に困難を示す例が報告されてきている。「食用動物に対して抗菌薬を使用することがどの程度耐性菌を選択し、かつ食物連鎖を介してヒトに耐性菌がどれほど伝播しているのか。更に、ヒトへの細菌感染症の治療を困難にする潜在的危険性を孕んでいるのか。それをどの程度予測できるのか」が国際的大命題になっている。その大命題に対する科学的評価を行うための疫学的および遺伝学的データを得ることが本研究班の大きな目的である。家畜等、食肉、および食中毒に罹患した患者から分離される薬剤耐性菌の現状及び動向について全国レベルの調査を行う。また特定農場で

の薬剤の使用状況、家畜から分離される菌の耐性化状況について個別追跡調査を行う。更に家畜由来株と患者由来株に関して分子遺伝学的手法を用い詳細に解析し、その耐性遺伝子および耐性菌の関連性を解明する。動物由来耐性株がヒト医療に及ぼす影響に関するリスク評価を行うために必要なデータを蓄積する。その結果を行政的対策に生かすことにより、食中毒菌の耐性化の減少及び食中毒発生の健康被害の拡大を防ぐことに資するようになる。当研究班の特色は、農場から食卓およびヒトへの感染の過程における耐性菌の出現状況を、省庁の壁を越えて連携しデータを集めることにある。そのために、農林水産省関連研究組織から、農林水産省動物医薬品検査所、(独法)農技研動物衛生研究所、厚生労働省関係からは国立感染症研究所、国立医薬品食品衛生研究所および地方衛生研究所が参加している。

B. 研究方法

1) 家畜、食品及び患者由来のサルモネラ、カンピロバクターの分離菌株の血清型、生化学的性状、ファージ型、薬剤耐性型等を解析し、データベースを構築する。薬剤耐性については、ニューキノロン剤、 β -ラクタム剤特に第3、4世代のセフェム剤を中心的に調べる (Etest, センシデスク法等でスクリーニングを行い、詳細はMIC値を求める)。使用した薬剤はアンピシリン (A, or ABPC)、ストレプトマイシン系 (S, or SM, DSM)、テトラサイクリン系 (T, or TC, OTC)、シプロフロキサシン (Cip, or CIPX)、カナマイシン (K, or KM)、セフォタキシム (Ctx, or CTX)、クロラムフェニコール (C, or CM)、ST合剤 (Sx, or SXT)、トリメトプリム (Tp, or TMP)、ゲン

タマイシン (G, or GM)、ナリジクス酸 (N, or NA)、サルファ剤 (Su)、ホスホマイシン (F, or FOM) 等であった。分離菌の遺伝学型をPFGE, RAPD-PCR, ALFP等の分子疫学的方法により解析し上記データベースに加える。家畜由来株および患者由来株の耐性遺伝子について、遺伝学および分子生物学的手法を用い詳細に解析を加え、由来株による差異を検討する。必要なら耐性遺伝子を含む領域の全塩基配列を調べる。

2) パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) : Izumiya らの方法 (J. Clin. Microbiol. 35, 1675-1680, 1997) に準じて実施した。泳動条件は6V, 14°C, ランプ時間2.2-63.8秒で約19時間泳動した。

3) 薬剤耐性遺伝子のクローニング: 耐性株のゲノムDNAを調製し、これをEcoRI, PstI等の制限酵素で切断した。同酵素で切断したベクター (pUC, pSTVなど) を用いてライゲーションを行い、該当する薬剤を含むLBプレート上にて選択した。得られたプラスミドに対して、ベクター上の配列をもつプライマーを用いて塩基配列の決定を行い、相同性検索を行った。

C. 各分担者の研究結果概要

I. 人から分離される食中毒菌の耐性に関する研究

1) EHEC耐性株の分布

感染研に2004年に送付されたEHEC菌株から200株を抽出し薬剤感受性試験を行った。使用したすべての薬剤に対して感受性であった株は全体の72%であった。次いで耐性パターン (R-) STSu, R-A, R-ASTSu, が全体の3%

から8%を占めた。また、治療に際して使用されることの多い、ホスホマイシンに耐性の株が2株(R-F、R-TFが各1株)、またセフトキシム耐性が1株(R-ACtx)検出された。

2) *Salmonella* Enteritidis (SE) 耐性株の分布

感染研に送付されたSE菌株のうち2004年に発生した集団事例45件について、その関連株の感受性試験を行った。使用したすべての薬剤に対して感受性であった株は全体の76%であった。次いでR-Sが22%を占めた。

3) フルオロキノロン (FQ) 高度耐性 *Salmonella* Typhimurium(ST)

フルオロキノロン (FQ) 高度耐性株は2004年までに18例の患者から分離されており、ファージ型はすべてDT12もしくは193であった。

2004年に新たに検出されたFQ高度耐性株のキノロン耐性に関与する、DNAジャイレースおよびトポイソメラーゼの各サブユニットをコードする遺伝子の配列を解析したところ、これまでの株と同様に、*gyrA*に2箇所、*parC*に1箇所、点変異が見出された。

上記菌株の近縁性を調べるためPFGEを行った。また、PFGE泳動パターンを解析ソフトFinger Printing IIを用いてDT104株との比較を行った結果、FQ高度耐性株は、DT104株とは明らかに異なるクラスターを形成し、また、FQ高度耐性株同士は比較的近縁度が高いことが示された。

これらFQ高度耐性株がいずれも約2kbのクラス1インテグロンを保有していることを明らかにしたが、そのPCR産物の配列を決定した。その結果、上記PCRによる増幅産物には bla_{OXA-30}^+ *aadA1*の配列が含まれていることが

明らかとなった。これらはそれぞれアンピシリンおよびストレプトマイシン耐性を付与することが知られている。さらに他の耐性に関してFQ高度耐性株のゲノムDNAからのクローニングを試み、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、トリメトプリム耐性に関与する断片を得た。それら各々の配列の一部をシーケンスし、相同性検索を行った結果、クロラムフェニコールは*catA*、ゲンタマイシンは*aac3*、トリメトプリムは*dhfr12*(本遺伝子はさらに*aadA2*を含むインテグロンを構成)遺伝子によることが推測された。また、テトラサイクリンに関しても*tetRAC*遺伝子に関与が推測された。これらの配列からプライマーを設計しPCRによる遺伝子検索を行った。その結果、耐性パターンに従って該当する全ての遺伝子が検出された。一方、多剤耐性ST DT104はいずれの遺伝子も検出されなかった。

4) フルオロキノロン耐性STの感染事例

フルオロキノロン剤に耐性をしめずSTが分離された埼玉県4事例の解析が行われた。いずれも6薬剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。4例中3例は治療後も再排菌しており、フルオロキノロン耐性菌に対する治療の難しさが指摘できる。この4株は、ファージ型DT193で、制限酵素BlnI処理後のPFGE法によるDNA切断パターンの比較で同一あるいは非常に類似したパターンを示した。担当医師を通じて聞き取り調査を行った。その結果、共通する食品の存在は確認できなかったが、2例についてはペットが関与した可能性が示唆された。いずれの患者も発症する前にペットが下痢を発症していた。特に1事例では、患児は出生直後の乳児であり、産科から帰宅して4日後にこの乳児は不明熱で

再入院となり、入院時の検便からフルオロキノロン耐性 ST が分離された。この乳児が帰宅する 1 週間前から室内で飼育していた 2 頭のマルチーズのうち 1 頭が水様性の下痢をしていた。2 頭のマルチーズの検便検査は、当初その関与が不明であったため、50 日経ってから行われたが、当該菌を分離することはできなかった。しかし、この検便で 2 頭のいずれからもフルオロキノロン剤を含む多剤耐性大腸菌 O153:HUT および O78:H18 が分離され、その飼育環境に耐性化を進行させる何らかの要因があることが示唆された。

5) 非ヒト由来のフルオロキノロン高度耐性 ST

昨年、イヌ、ネコおよびウシから分離された FQ 高度耐性株 5 株について、耐性パターン、ファージ型、MIC 等がヒト由来株のそれとほぼ同様であったことを明らかにした。これらの株もヒト由来株と同様、多剤耐性であることから、上記薬剤耐性遺伝子に関する PCR を行った。その結果、ヒト由来株と同様、耐性パターンに応じて該遺伝子が検出された。また、さらに、FQ 低感受性株でなおかつ PFGE パターンが FQ 高度耐性株に類似しているウシ由来株が 1 株同定されていたが、本株についても同様の耐性遺伝子が検出された。このことは、これら非ヒト由来株もまた、ヒト由来株と近縁の株であることを示唆するものと考えられる。

6) セフトキシム耐性サルモネラ

近年、AmpC 型 β -ラクタマーゼを産生し、セフトキシムに耐性（もしくは中間）を示すサルモネラの報告が主として米国等で相次いでいる。また、大腸菌等でいわゆる ESBL と

呼ばれる β -ラクタマーゼを産生するサルモネラの報告も欧州等で見受けられる。わが国でも 2003 年 *S. Enteritidis* から ESBL 産生性株が、および *S. Typhimurium* と *S. Newport* から AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生性株が、それぞれ 1 株ずつ分離された。

7) ヒトから分離されたサルモネラ血清型 *S. Infantis*

散発下痢症患者から分離された血清型 *Infantis* の 33 株の薬剤感受性試験結果は、33 株中 25 株 (75.8%) は供試した 9 薬剤のいずれかに対して耐性であり、テトラサイクリン (TC) 耐性が最も多く 21 株 (63.6%)、次いでストレプトマイシン (SM) が 20 株 (60.6%)、カナマイシン (KM) が 12 株 (36.4%)、ST 合剤 (ST) が 8 株 (24.2%)、ナリジク酸 (NA) が 3 株 (9.1%) であった。フォスфоマイシン (FOM) およびノルフロキサシリン (NFLX) 耐性株は、認められなかった。また耐性菌の出現状況を年次別にみると、85.7% (2000 年)、57.1% (2001 年)、75.0% (2002 年)、81.8% (2003 年) で、高率であることに変わりない状況であった。

8) カンピロバクターの耐性

1997~2002 年に都内で散発下痢症患者から分離された *C. jejuni* 916 株について薬剤感受性試験を行なった。耐性菌は、445 株 (48.6%) に認められた。その中で、ニューキノロン系薬剤に対する耐性率の年次別推移は、31.1% (1997 年)、28.80% (1998 年)、28.7% (1999 年)、29.2% (2000 年)、39.4 (2001 年)、28.9% (2002 年) であった。NFLX・OFLX (オフロキサシン)・CPFX (シプロキサシン)・NA 耐性が 18.3% に認められた。一方、治療の第一選択剤である EM に対する耐性率は、毎年 1~

2%程度で推移しており、大きな変動はなかった。

II. 動物から分離される食中毒菌の耐性に関する研究

1) 食肉及び家畜由来 *Salmonella* *Infantis* の薬剤感受性及び耐性遺伝子の比較

食肉由来株と家畜由来株の耐性率は、全体的に類似していた。また、薬剤耐性パターンにおいても、DSM や OTC 耐性を中心に KM もしくは TMP 耐性を付加した耐性株が、農場由来と食肉由来で共通に認められた。薬剤耐性株の保有する薬剤耐性遺伝子は、両由来とも同じ遺伝子であった。一方、相違点としては、TMP 耐性は動物由来で高く、また、ABPC 及び CEZ 耐性は動物由来株で認められなかった。さらに、キノロン耐性株の *gyrA* の変異は、食品由来株の方が多様で、主要な変異型は異なっていた。

2) 人症例及び動物由来カンピロバクターの薬剤感受性、血清型及び遺伝学的特徴の比較

C. jejuni の ABPC (アンピシリン) 耐性率は、レイヤー (33.0%) およびブロイラー (20.3%) 由来株で高く、牛由来株では認められなかった。人由来株のアンピシリン耐性率は、5.6% と低率であった。一方、人由来 *C. coli* 株の耐性率は、豚由来株のものと類似していた。*C. jejuni* の血清型 B および D 群は、全ての由来 (人、牛、ブロイラー及びレイヤー) 株で共通に認められた。血清型 O 及び R 群は、人及び牛由来で認められた。人、牛及びブロイラー由来 *C. jejuni* 株は、*flaA*-type により大きく 5 つのクラスターに分類された。クラスター 1 は人及び牛由来株で、クラスター III~V は人、牛及びブロイラー由来株でそれ

ぞれ構成されていた。

3) 薬剤耐性菌が分離された農場における薬剤使用状況 (2001~2003 年)

薬剤耐性 *S. Infantis* 株が分離されたブロイラー農場における抗菌性物質の使用状況を調査したところ、23 農場中 3 農場で抗菌剤の治療が行われていた。残りの 20 農場で抗菌性飼料添加物が使用されていたのは、9 農場であった。抗菌剤を使用した 3 農場のうち、分離株の薬剤耐性パターンに含まれる薬剤で治療された農場は、1 農場のみであった。

一方、カンピロバクターでは、EM (エリスロマイシン) 耐性株が分離された 99 農場のうち、交差耐性と関連する薬剤 (タイロシン等の同系統薬剤) を使用していた農場は 11.1% で、分離株の耐性パターンに含まれる薬剤を使用していた農場は 25.3% であった。ERFX (エンロフロキサシン) 耐性株が分離された 140 農場のうち、交差耐性と関連する薬剤 (キノロン及びフルオロキノロン剤) を使用していた農場は 2.8% で、分離株の耐性パターンに含まれる薬剤を使用していた農場は 16.2% であった。

III. 鶏肉から分離されたサルモネラに関する研究

1) 鶏肉由来サルモネラ

2004 年に実施した市販鶏肉 (国産) の汚染実態調査では 106 検体中 39 検体 (36.8%) からサルモネラが分離された。血清型は全て *Infantis* であった。39 株全てが供試した 12 薬剤のいずれかに耐性を示した。多く認められた耐性パターンは SM・TC・SXT が 17 株 (43.6%)、SM・TC が 9 株 (23.1%)、SM・TC・KM・SXT が 8 株 (20.5%) などであった。

ヒト由来血清型 *Infantis* は2株分離されているが、1株が SM・TC・KM という鶏肉由来株に似た耐性パターンを示し、その関連性が示唆された。

外国産鶏肉では29検体中3検体(10.3%)からサルモネラが分離され、その血清型は *S. Infantis* が1株、*S. Saintpaul* が2株であった。薬剤感受性試験の結果、3株とも3剤以上の薬剤に耐性を示し、キノロン剤である NA に耐性を示した。一般的に NA 耐性菌はフルオロキノロン剤に対して高度耐性を獲得する可能性が高く、今回も1株がシプロフロキサシンに対して低感受性を示していたことから、今後ともその動向に注意する必要があると考えられた。

IV. 食品からのカンピロバクター分離手法の標準化

食品からのカンピロバクター分離手法の標準化：食品からのカンピロバクター分離の標準法を3種(PHLS法、BAM法、ISO法)の特徴とそれを基に検討したプロトコール原案をたたき台として、食品や臨床材料からのカンピロバクター分離実績のある衛生研究所の研究者の意見を合わせ、検査法の問題点及び検討が必要な重要項目を整理した。関連10研究機関のネットワークを作り、分担して検討し、市販鶏肉を用いてそれぞれの分担部分のプロトコールの妥当性につき検討を加えた。新しく示した検査方法(五十君分担報告書に記載)により、市販鶏肉30検体につき分離を試みたところ、17検体(57%)から合計20株のカンピロバクターが分離された。

D. 考察

サルモネラとカンピロバクターは、食中毒

の主要な原因菌で、家畜に広く分布している。両菌種のモニタリングで、動物用医薬品あるいは飼料添加物として広く使用されているテトラサイクリン、ストレプトマイシンに対する耐性が、高率に認められた。その結果は、テトラサイクリン系抗菌剤及びアミノグリコシド系薬剤が、家畜で最も使用量が多いことを反映しているのかもしれない。

牛と豚由来株では ST、ブロイラー由来株では SI が、主要な血清型であった。これら血清型の大部分の株は、何れかの薬剤に耐性で、STの70%あるいはSIの45%が4剤以上に耐性であった。SIはTMP及びKMに耐性率が高く、STはABPC及びCPに高い耐性率を示し、畜種ごとの薬剤耐性率が異なっていた。畜種ごとのサルモネラを軽減させるための衛生対策、および使用薬剤削減対策が必要であろう。

今回の健康家畜由来サルモネラ調査ではフルオロキノロン耐性株は見いだされなかったが、*S. Typhimurium* 感染患者からはフルオロキノロン高度耐性菌(シプロフロキサシンに対して24mg/l以上のMICを示す)が2004年までに18株分離された。それらは *gyrA* に2ヶ所、*parC* に1ヶ所の点変異が見られ、フェージ型はDT12もしくはDT193であった。また、フルオロキノロン高度耐性STがヒト以外(イヌ、ネコ、ウシ)から分離され、それら耐性型、フェージ型、PFGEパターンはヒト由来とほとんど同じであった。1997年にウシから分離された菌株が同じPFGEパターンを示しており、かつフルオロキノロンに低感受性(MIC 2mg/l前後)であった。この種の株がフルオロキノロン高度耐性菌のオリジンかもしれない。今後、広範囲のさらなる調査をすることにより、フルオロキノロン高度耐性STの実態を明らかにし、その制御に向けた方策を施す必要

がある。

カンピロバクター腸炎の第一次選択薬であるエリスロマイシンに対し、*C. coli*（主に豚から分離される）は 50%近くが耐性を示したが、*C. jejuni*（主にブロイラー、牛から分離される）は全株感受性であった。ブロイラーにおけるマクロライドの使用量は、豚に比べ極めて低く、マクロライド耐性が出現しにくいと考えられる。今後は、マクロライドに対する感受性をモニタリングするとともに、*C. jejuni* が分布する牛とブロイラーでの使用量にも注意を払っていく必要がある。

国内における食品からのカンピロバクター検査法は統一された方法がこれまでなかった。一方、実際の食品特に食中毒で問題となる鶏肉について、市販食品から分離を試みるとその手法により分離頻度は全く異なることが知られている。食品からの分離方法を標準化し、定量的な調査をおこなうことは、必須である。海外で標準法として用いられている英国の PHLS 法、米国 FDA の BAM 法、そして ISO 法について詳しく検討を行い、標準法原案を作成した。このプロトコールにつき、スパイク実験と市販鶏肉から分離を試みる実験を行い、検討した。それぞれの結果を持ち寄り比較してみると、プロトコールを少し変更するだけで、市販鶏肉からの分離頻度は変化し、本菌の分離方法の統一が大変重要であることを再確認した。カンピロバクターの分離を左右しているのは、どうやら大変微妙なちょっとした検体の取り扱いの差から生まれているようである。

フルオロキノロン高度耐性 ST については、耐性パターン、ファージ型、PFGE プロファイル、キノロン耐性にかかわる遺伝子変異の種類、インテグロンなどの点において互いの類

似性が示唆されていたが、本年の研究において、他の耐性にかかわる遺伝子においても類似性が観察された。これは非ヒト由来株についても同様であった。

国内ではこれまで報告のなかった ESBL 産生性および AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生性サルモネラが分離され、これらの動向に対しても注意を払う必要があると思われる。

初年度に実施したサルモネラ、カンピロバクターのモニタリングにおいて、動物用医薬品あるいは飼料添加物として広く使用されているテトラサイクリン、ストレプトマイシンに対する耐性が、高率に認められた。今年度は、人—食肉—家畜間での薬剤耐性菌・耐性遺伝子の伝播を検討することを目的に、サルモネラにおいては「市販食肉—家畜」、また、カンピロバクターにおいては「人—家畜」由来株を用いて、薬剤耐性に関連する疫学的・遺伝学的性状の解析を実施した。*S. Infantis* は、ブロイラー農場で分離されるサルモネラの主要な血清型であり、かつ、国内産の鶏肉において最も優勢に分離される血清型でもある。また、家畜から分離される *S. Infantis* の大部分は、OTC-DSM 耐性を保有する多剤耐性株で、家畜由来サルモネラの薬剤耐性率を引き上げている原因の一つとなっている。今回、両由来 *S. Infantis* の性状を比較すると、薬剤耐性率や薬剤耐性パターンは、非常に類似した傾向が認められ、ブロイラー由来の薬剤耐性 *S. Infantis* が、大部分の鶏肉の汚染に関与していることが示唆された。しかし、鶏肉由来 *S. Infantis* においてのみ、 β -lactam 剤 (ABPC、CEZ) に対する耐性株が認められ、また、キノロン耐性株の DNA ジャイレースの変異部位の比率が、両由来株で異なっていたことから、他の汚染源が存在する

可能性が示唆され、汚染源を特定していく上での調査範囲を拡大する必要性も考えられた。

人のカンピロバクター食中毒の事例では、*C. coli* によるものは極めて少なく、収集した人症例由来株においても *C. coli* は 134 株中 8 株 (6.0%) であったが、薬剤耐性率は、豚由来 *C. coli* と類似しており、両者の関連が示唆された。特に、両由来株で耐性を示した EM は、人のカンピロバクター腸炎の治療薬 (第一次選択薬) であり、医療上の極めて重要な薬剤の一つである。*C. coli* の EM 耐性機構や PFGE 型を検討することで、両者の関連性を解析していくことができると考えられる。

C. jejuni に関しては、薬剤耐性パターン比較の他に、血清型別と鞭毛遺伝子 (*flaA*) の型別を行った。調査薬剤に ABPC を加えたことにより、人由来 *C. jejuni* における ABPC 耐性の分布は、ブロイラーや採卵鶏由来株に比べ、牛由来株と同様に低率であることが判った。また、血清型と *flaA* 型の解析によって、一部の人症例由来株が、牛由来株と近縁であることが示唆された。このことは、カンピロバクター食中毒の原因として、鶏肉が重要視されてきたが、牛 (生レバー等) についても注意を要することが必要となることを示すものである。牛に分布する *C. jejuni* の性状解析は、*C. jejuni* による食中毒の疫学を解析する上で重要な情報となると考えられる。

一般に、食用動物における薬剤耐性菌の分布は、農場での抗菌剤使用と関連すると言われてきた。そこで、試行的に一部の薬剤を対象に使用状況と耐性出現との関連を検討した。サルモネラに関しては、ブロイラーにおける多剤耐性 *S. Infantis* の分布は、農場レベルでの薬剤使用との関連性は乏しく、薬剤耐性率を低減する上では、抗菌剤の使用をコント

ロールだけでは困難なことが示された。また、カンピロバクターにおいても、薬剤耐性と関連する抗菌剤を使用していた農場は、全体の 20~40% 程度であった。初年度に行った追跡調査においても、フルオロキノロン剤を使用していない農場でフルオロキノロン耐性株が 1 年以上にわたり継続的に分離された。供試例数が少なく、十分な解析は実施できなかったが、農場での抗菌性物質の使用制限のみでは耐性菌を完全にコントロールすることは難しい可能性が示唆された。農場で使用する抗菌薬以外の要因 (環境汚染、飼料等への汚染、農場内のネズミ等の小動物の汚染等) も考慮する必要があるのかもしれない。今後、関連となるデータを蓄積して畜種別などの要因解析を進めていく予定である。

前年度見出した多剤耐性へのインテグロンの関与と、これまでサルモネラの多剤耐性の主因と考えられていた R プラスミドとの相関を明らかにするために接合伝達試験を実施し、伝達された R プラスミド上にインテグロンが存在するか否かを検討した。その結果、ST, SE いずれにおいてもインテグロン構造を保有する R プラスミドの存在が明らかになったことから、インテグロン性の多剤耐性がプラスミドを介して他の菌株に伝達される可能性が示唆された。今年度の研究において、インテグロンの伝播機構の一端が明らかになったが、近年分離される DT104 の大半の菌株は病原プラスミド単独保有株であることから、その伝播機構についてさらに検討を進める必要があると考えられた。

E. 結論

カンピロバクターでは、治療に使われるエリスロマイシンに対し、*C. coli* は 50% 近く

が耐性を示したが、*C. jejuni* は全株感受性であった。フルオロキノロンに対してはかなり高い耐性率を示していた。キノロン未使用の農場であるにもかかわらず、単一のフルオロキノロン耐性株が継続的に分離される事例が存在した。その原因は不明であったが、土壌や齧歯類の汚染等を含め環境全般の汚染を調査対象に含めていく必要がある。サルモネラ感染症は人獣感染症の代表的なものであるが、ヒトおよびヒト以外の由来を持つ株から欧米で蔓延している多剤耐性 ST DT104 のみならず、フルオロキノロン高度耐性 ST 株についてもヒト由来株および非ヒト由来株を含め、互いの類似性が示唆されるなどの結果が得られ、ヒトへのサルモネラ感染の制御には、より広い宿主に対してサーベイランスを行うことが重要であることが示唆された。

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

G. 健康危害情報

本調査において、サルモネラ及びカンピロバクターにおいて、薬剤耐性菌がかなり存在していることが明らかになった。カンピロバクターでは、動物への薬剤の使用に関わらず、フルオロキノロン耐性株が出現する場合は認められた。環境汚染等のことも考慮する必要がある。人、家畜、および食由来のサルモネラとカンピロバクターの各種性状を詳細に比較解析することにより、断片的ではあるが、人—食肉—家畜との間の関連が明らかとなった。今後、food-chain における耐性株の低減に向けた取り組みへと繋げていく必要がある。

H. 研究発表

(英文発表)

- 1) Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, and Igimi S. 2004. Nationwide survey of *Listeria monocytogenes* infection in Japan. *Epidemiol Infect* 132:(4)769-772.
- 2) Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, Igimi S. 2004. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. *Int J Food Microbiol* 93:131-140.
- 3) Tanaka Yasuhito, Takizawa Makiko, Igimi Shizunobu, and Amano Fumio. 2004. Enhanced release of prostaglandin D2 during re-incubation of RAW 264.7 macrophage-like cells after treatment of both lipopolysaccharide and non-steroidal anti-inflammatory. *Drugs Biol Pharm Bull* 27(7): 985-991.
- 4) Yamasaki M, Igimi S, Katayama Y, Yamamoto S and Amano F. 2004. Identification and characterization of an oxidative stress-responsive protein from *Campylobacter jejuni*, Homologous to rubredoxin oxidoreductase/rubredoxin. *FEMS Microbial Letters* 235(1):57-63.
- 5) Cheun HI, Kawamoto K, Hiramatsu M, Tamaoki H, Shirahata T, Igimi S and Makino S-I. 2004. Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. *J Appl Microbiol* 96:1347-1353.
- 6) Asakura H, Panutdaporn N, Kawamoto K, Igimi S, Yamamoto S, and Makino S-I. 2004. Isolation of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg sensitive to NaCl-induced osmotic stress. *Microbiol Immunol.* 48:981-984.

- 7) T. Matsui, S. Suzuki, H. Takahashi, T. Ohyama, J. Kobayashi, H. Izumiya, H. Watanabe, F. Kasuga, H. Kijima, K. Shibata, and N. Okabe : 2004. *Salmonella* Enteritidis outbreak associated with a school-lunch dessert: cross-contamination and a long incubation period, Japan, 2001. *Epidemiol. Infect.* 132: 873-879.
- 8) M. Taguchi, K. Seto, M. Kanki, T. Tsukamoto, H. Izumiya and H. Watanabe: 2005. Outbreak of food poisoning caused by lunch boxes prepared by a company contaminated with multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium DT104. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58 (1):55-56.
- 9) Esaki H., Morioka A., Ishihara K., Kojima A., Shiroki S., Tamura Y., Takahashi T.: 2004. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53: 266-270.
- 10) Esaki, H., Noda, K., Otsuki, N., Kojima, A., Asai, T., Tamura, Y. & Takahashi, T. 2004. Rapid detection of quinolone-resistant *Salmonella* by real time SNP genotyping. *Journal of Microbiological Methods* 58: 131-134.
- 11) Esaki, H., Morioka, A., Kojima, A., Ishihara, K., Asai, T., Tamura, Y., Izumiya, H., Terajima, J. Watanabe, H. & Takahashi, T. 2004. Epidemiological characterization of *Salmonella* Typhimurium DT104 prevalent among food-producing animals in the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program (1999-2001). *Microbiology and Immunology* 48: 553-556.
- 12) Ishihara, K., Kira, T., Ogikubo, K., Morioka, A., Kojima, A., Kijima-Tanaka, M., Takahashi, T. & Tamura, Y. 2004. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* isolated from food-producing animals on farms (1999-2001): results from the Japanese Veterinary Antimicrobial resistance Monitoring Program. *International Journal of Antimicrobial Agents* 24: 261-267.
- 13) Esaki, H., Chiu, CH., Kojima, A., Ishihara, K., Asai, T., Tamura, Y., & Takahashi, T. 2004. Comparison of fluoroquinolone resistance genes of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates in Japan and Taiwan. *Japanese Journal of Infectious Disease.* 57: 287-288.
- (和文発表)
- 1) 五十君静信. 2004. 乳児用調製粉乳中の *Enterobacter sakazakii* など微生物に関する問題. *食品衛生研究* 48(12):981-984.
- 2) 五十君静信、山本茂貴、春日文子. 2004. 腸管出血性大腸菌の食品汚染と対策. *化学療法*の領域. 20(9):1350-1354.
- 3) 五十君静信. 2004. 海外における食品を介したリステリア症集団事例紹介. *食品衛生研究.* 54(9):7-14.
- 4) 五十君静信. 2004. どう防ぐ?食品を介したリステリア感染. *食の科学.* No. 320 : 44-51.
- 5) 板垣道代、白木豊、山田万希子、所光男、泉谷秀昌、渡辺治雄: 2004. 2000年4月から2003年3月に岐阜県において検出された

Salmonella Enteritidis 株の PFGE 型とフェージ型の組み合わせによる疫学解析。感染症学雑誌、第 78 巻、690-698.

6) 石畝史、布施田哲也、重屋志啓盛、京田芳人、望月典郎、泉谷秀昌、渡辺治雄：2004. 多剤耐性 *Salmonella* Newport の国内初報告例。感染症学雑誌、第 78 巻、989-990.

7) 近 真理奈、倉園貴至、大島まり子、山口正則、森田耕司、渡辺 登、金森政人、松下秀. 2005. 下痢症患者から分離された cefotaxime 耐性志賀毒素産生性 O26:H11 について。感染症誌 Vol. 79, No. 3, 161-168.

(学会発表)

1) H. Izumiya and H. Watanabe : Topics of *Salmonella* in Japan - characterization of drug resistant *Salmonella* isolates. 2004 annual Enter-net workshop, Berlin, Germany.

2) Noriko Konishi, Akemi Kai, Yukako Shimojima, Hiromi Obata, Mikiyoshi Shibata, Chie Monma, Hiroshi Fujikawa, Keiko Yokoyama, Maho Kawamura, Masaki Takahashi, Kazuyoshi Yano, Shigeru Matsushita, Satoshi Morozumi, Hidemasa Izumiya, Haruo Watanabe and Yasuo Kudoh : Antibiotic resistance of *Salmonella* recently isolated from human and foods in Tokyo, The 39th Joint Conference of US-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, 2004. Kyoto.

3) 山崎学、天野富美夫、山本茂貴、五十君静信. *Campylobacter jejuni* の 27kDa タンパク質の好気ストレスに対する応答性. 第 77 回日本細菌学会総会. 2004 年 4 月 2 日. 大阪

4) 朝倉宏、五十君静信、柳忠湖、鈴木荘介、春日文字子、山本茂貴、熊谷進. *Providencia alcalifaciens* における LPS の病原性への関与. 第 138 回日本獣医学会学術集会. 2004 年 9 月 10 日. 北大

5) 石井啓行、江川智哉、豊田有樹子、大田博昭、五十君静信、水本直恵、馬場栄一郎. SE の FliC フラグメント 9kDa (Sep9) に対する抗 Sep9 抗体の運動阻害作用と増殖抑制作用. 第 138 回日本獣医学会学術集会. 2004 年 9 月 10 日. 北大

6) 山崎学、長谷部保彦、北村和之、矢内原千鶴子、山本茂貴、五十君静信. *Campylobacter jejuni* 検出用抗体 : 31 kDa タンパク質に対するモノクローナル抗体の検討. 第 25 回日本食品微生物学会. 2004 年 9 月 29 日. 東京

7) 江川智哉、石井啓行、豊田有樹子、五十君静信、馬場栄一郎、水本直恵. SE 不活化ワクチン接種鶏由来の卵における抗 SE ベン毛抗体価の検討. 第 25 回日本食品微生物学会. 2004 年 9 月 28 日. 東京

8) 山崎学、天野富美夫、片山葉子、山本茂貴、五十君静信. 食中毒起因菌 *Campylobacter jejuni* の coccoid 化における酸素の影響. 日本微生物生態学会第 20 回大会. 2004 年 11 月 21 日. 仙台

9) 泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄 : 2002 年における *Salmonella* Enteritidis のフェージ型別および薬剤耐性の傾向. 第 77 回日本細菌学会総会. 2004

10) 小西典子、秋場哲哉、下島優香子、尾畑浩魅、柴田幹良、門間千枝、横山敬子、河村真保、高橋正樹、矢野一好、甲斐明美、諸角 聖、泉谷秀昌 : ナリジクス酸耐性 *Salmonella* Enteritidis の出現状況一ヒトおよび食品由来株の解析一, 日本食品微生物学会, 2004 年.

東京.

11) 横山敬子, 高橋正樹, 河村真保, 三井一子,
関根整治, 石崎直人, 金子誠二, 甲斐明美,
矢野一好, 諸角 聖, : 鶏肉におけるカンイロ

バクテリア検査法の検討ならびに汚染状況につ
いて, 日本食品微生物学会, 2004 年. 東京.

平成 16 年度 厚生労働省食品の安全性高度化推進研究事業

分担研究報告書

分担課題名:サルモネラをはじめとした食中毒菌の薬剤耐性に関する遺伝学的研究

分担研究者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部主任研究官

協力研究者 寺嶋淳 国立感染症研究所 細菌第一部第一室長

研究要旨:本研究班では、ヒトの健康への脅威となる動物由来感染症に関して、その発生動向を把握するための監視体制を整備することを目的とする。本分担研究においては、特に、動物の汚染を介した細菌感染症に着目して発生動向の解析を行う。とりわけサルモネラは代表的な食中毒起因菌であるが、同時に人獣共通感染症の起因菌としても重要な位置を占めている。また腸管出血性大腸菌感染症は 3 類感染症に指定されており、これは主としてウシがリザーバーとなっていると考えられている。そこで本研究ではこれらの菌種を扱い、殊に多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium を中心に、ヒトおよび非ヒト由来株を解析する。

A. 研究目的

2003 年厚生労働省食中毒統計における細菌性食中毒の患者総数は 16,551 名であった。このうち、39%にあたる 6,571 名はサルモネラによるものであり、本菌の公衆衛生上の重要性を示している。サルモネラには約 2,500 種の血清型が含まれるが、中でも *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*、以下 SE) による患者数は 1990 年代に急増し、現在もなお血清型別での検出頻度で第

一位を占めている。同じく *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*、以下 ST) は *S. Enteritidis* が台頭してくる以前は血清型別で最も多く検出されていた。現在でもなお、血清型別検出頻度の上位を占めている。

一方、腸管出血性大腸菌 (EHEC) は所謂感染症新法で 3 類感染症に挙げられており、2004 年の患者数は 3,635 名にのぼる (2005 年 1 月現在)。

これらの主要な食中毒細菌における菌

株の耐性化の傾向は異なっており、SE および EHEC における耐性株の報告は少ないものの、ST においては多剤耐性化が顕著であると言われている。本研究では、これらの耐性化の動向を調査するとともに、耐性因子等について遺伝学的解析を行うことで、耐性機構の解明および耐性化の広がり状況を明らかにすることを旨とする。

(倫理面への配慮)

食中毒事例に関し、ヒトの臨床情報等を扱う場合には、事前に研究倫理委員会の承認を得た上で、個人情報の取り扱いに注意し、研究を遂行する。分離した菌株に関しては、匿名化を図り、特定の個人に不利益が生じないように配慮する。

B. 研究方法

1. 供試菌株: 全国の地方衛生研究所等および動物衛生研究所等の協力により得られた EHEC、SE および多剤耐性 ST を使用した。

2. 薬剤感受性試験: BBL 社のセンシディスクを用いて、NCCLS に準拠した方法により試験し耐性を決定した。使用した薬剤はアンピシリン(A)、ストレプトマイシ

ン(S)、テトラサイクリン(T)、シプロフロキサシン(Cip)、カナマイシン(K)、セフトキシム(Ctx)、クロラムフェニコール(C)、ST 合剤(Sx)、トリメトプリム(Tp)、ゲンタマイシン(G)、ナリジクス酸(N)、サルファ剤(Su)、ホスホマイシン(F)の 13 剤であった。最小発育阻止濃度 MIC は Etest を用いて決定した。

3. ファージ型別: 英国 PHLS より分与された型別用ファージを使用して標準法に従って型別を行った。

4. パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE): Izumiya らの方法(J. Clin. Microbiol. 35, 1675-1680, 1997)に準じて実施した。泳動条件は 6V, 14°C, ランプ時間 2.2-63.8 秒で約 19 時間泳動した。

5. 薬剤耐性遺伝子のクローニング: 耐性株のゲノム DNA を調製し、これを EcoRI, PstI 等の制限酵素で切断した。同酵素で切断したベクター(pUC, pSTV など)を用いてライゲーションを行い、該当する薬剤を含む LB プレート上にて選択した。得られたプラスミドに対して、ベクター上の配列をもつプライマーを用いて塩基配列の決定を行い、相同性検索を行った。

C. 研究結果

1. EHEC 耐性株の分布

当部に 2004 年に送付された EHEC 菌株から 200 株を抽出し薬剤感受性試験を行った。その結果を図 1 に示す。使用したすべての薬剤に対して感受性であった株は全体の 72%であった。次いで耐性パターン(R-)STSu、R-A、R-ASTSu、が全体の 3%から 8%を占めた。また、治療に際して使用されることの多い、ホスホマイシンに耐性の株が 2 株(R-F、R-TF が各 1 株)、またセフトキシム耐性が 1 株(R-ACtx) 検出された。

2. SE 耐性株の分布

当部に送付された SE 菌株のうち 2004 年に発生した集団事例 45 件について、その関連株の感受性試験を行った。図 2 には過去のデータを併せてグラフにしたものを表す。使用したすべての薬剤に対して感受性であった株は全体の 76%であった。次いで R-S が 22%を占めた。

3. フルオロキノロン高度耐性 ST

2000 年にある国内散発事例より分離されたフルオロキノロン(FQ)高度耐性株はシプロフロキサシン(Cip)に 24mg/l 前後の MIC 値を示す。本菌株はフルオロキノロンおよびナリジクス酸に加え、

R-ACSSuT ならびに R-GTp を加えた耐性パターンを示す、多剤耐性株であった。その後、2004 年までに 18 例の患者から分離されており、R-GTp に対する耐性が無いものもあるが、ファージ型はすべて DT12 もしくは 193 であった(表 1)。

2004 年に新たに検出された FQ 高度耐性株は、2001 年分離株を 1 株含む 5 株であった。これらの菌株のフルオロキノロン各種に対する MIC 値は前年までに検出された株のそれとほぼ同様であったり(表 2)。これらの株についてキノロン耐性に関与する、DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼの各サブユニットをコードする遺伝子の配列を解析したところ、これまでの株と同様に、*gyrA* に 2 箇所、*parC* に 1 箇所、点変異が見出された(表 3)。

上記菌株の近縁性を調べるため PFGE を行った。その代表的な結果を図 3 に示す。また、PFGE 泳動パターンを解析ソフト Finger Printing II を用いて DT104 株との比較を行った結果、FQ 高度耐性株は、DT104 株とは明らかに異なるクラスターを形成し、また、FQ 高度耐性株同士は比較的近縁度が高いことが示された(図 4)。

昨年、これら FQ 高度耐性株がいずれ

も約 2kb のクラス 1 インテグロンを保有していることを明らかにしたが、その PCR 産物の配列を決定した。その結果、上記 PCR による増幅産物には *bla*_{OXA-30}+*aadA1* の配列が含まれていることが明らかとなった(図 5)。これらはそれぞれアンピシリンおよびストレプトマイシン耐性を付与することが知られている。さらに他の耐性に関して FQ 高度耐性株のゲノム DNA からのクローニングを試み、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、トリメプリム耐性に関与する断片を得た。それら各々の配列の一部をシーケンスし、相同性検索を行った結果、クロラムフェニコールは *catA*、ゲンタマイシンは *aac3*、トリメプリムは *dhfr12*(本遺伝子はさらに *aadA2* を含むインテグロンを構成) 遺伝子によることが推測された。また、テトラサイクリンに関しても *tetRAC* 遺伝子の関与が推測された。これらの配列からプライマーを設計し PCR による遺伝子検索を行った。その結果、耐性パターンに従って該当する全ての遺伝子が検出された(表4)。一方、多剤耐性 ST DT104 はいずれの遺伝子も検出されなかった。

5. 非ヒト由来のフルオロキノロン高度耐性 ST

昨年、イヌ、ネコおよびウシから分離された FQ 高度耐性株 5 株について、耐性パターン、ファージ型、MIC 等がヒト由来株のそれとほぼ同様であったことを明らかにした。これらの株もヒト由来株と同様、多剤耐性であることから、上記薬剤耐性遺伝子に関する PCR を行った。その結果、ヒト由来株と同様、耐性パターンに応じて該当遺伝子が検出された(表 4)。また、さらに、FQ 低感受性株でなおかつ PFGE パターンが FQ 高度耐性株に類似しているウシ由来株が 1 株同定されていたが、本株についても同様の耐性遺伝子が検出された(図 3 および表 4)。このことは、これら非ヒト由来株もまた、ヒト由来株と近縁の株であることを示唆するものと考えられる。

6. セフトキシム耐性サルモネラ

近年、AmpC 型β-ラクタマーゼを産生し、セフトキシムに耐性(もしくは中間)を示すサルモネラの報告が主として米国等で相次いでいる。また、大腸菌等いわゆる ESBL と呼ばれるβ-ラクタマーゼを産生するサルモネラの報告も欧州等で見受けられる。わが国でも 2003 年 *S. Enteritidis* で ESBL 産生性株が、*S. Typhimurium* および *S. Newport* で AmpC

型β-ラクタマーゼ産生性株が、それぞれ1株ずつ分離された(表5および6)。

D. 考察

本研究の結果から、EHECおよびSEでは感受性株がなお大勢を占める中で、耐性株が一部検出された。それには治療上問題となりうる耐性も含まれていた。

フルオロキノロン高度耐性 ST については、耐性パターン、ファージ型、PFGEプロファイル、キノロン耐性にかかわる遺伝子変異の種類、インテグロンなどの点において互いの類似性が示唆されていたが、本年の研究において、他の耐性にかかわる遺伝子においても類似性が観察された。これは非ヒト由来株についても同様であった。

また、国内ではこれまで報告のなかったESBL産生性およびAmpC型β-ラクタマーゼ産生性サルモネラが分離され、これらの動向に対しても注意を払う必要があると思われる。

E. 結論

細菌感染症において菌の耐性化は、非常に重要な問題である。サルモネラ感染症は人獣感染症の代表的なものであるが、ヒトおよびヒト以外の由来を持つ株

から欧米で蔓延している多剤耐性 ST DT104 のみならず、フルオロキノロン高度耐性 ST 株についてもヒト由来株および非ヒト由来株を含め、互いの類似性が示唆されるなどの結果が得られ、ヒトへのサルモネラ感染の制御には、より広い宿主に対してサーベイランスを行うことが重要であることが示唆された。

F. 健康危険情報

ST の多剤耐性化は年々進んでいることが明らかとなってきた。今後も、その動向に注意が必要である。

G. 研究発表等

(1) T. Matsui, S. Suzuki, H. Takahashi, T. Ohyama, J. Kobayashi, H. Izumiya, H. Watanabe, F. Kasuga, H. Kijima, K. Shibata, and N. Okabe : 2004. *Salmonella* Enteritidis outbreak associated with a school-lunch dessert: cross-contamination and a long incubation period, Japan, 2001. *Epidemiol. Infect.* 132, 873-879.

(2) M. Taguchi, K. Seto, M. Kanki, T. Tsukamoto, H. Izumiya and H. Watanabe: 2005. Outbreak of food

poisoning caused by lunch boxes prepared by a company contaminated with multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium DT104. Jpn. J. Infect. Dis. 58 (1), 55-56 .

(3) 板垣道代、白木豊、山田万希子、所光男、泉谷秀昌、渡辺治雄：2004. 2000年4月から2003年3月に岐阜県において検出された *Salmonella* Enteritidis 株の PFGE 型とフェージ型の組み合わせによる疫学解析。感染症学雑誌、第78巻、690-698.

(4) 石畝史、布施田哲也、重屋志啓盛、京田芳人、望月典郎、泉谷秀昌、渡辺治雄：2004. 多剤耐性 *Salmonella* Newport の国内初報告例。感染症学雑誌、第78巻、989-990.

(5) H. Izumiya and H. Watanabe : Topics of *Salmonella* in Japan - characterization of drug resistant *Salmonella* isolates. 2004 Annual Enter-net workshop, Berlin, Germany.

(6) 泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄：2002年における *Salmonella* Enteritidis のフェージ型別および薬剤耐性の傾向。第77回日本細菌学会総会。2004年。大阪。

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

※解析に使用した菌株を提供していただいた全国の地方衛生研究所、動物医薬品検査所、動物衛生研究所等の諸先生方、ならびに江東微研の東出先生に深謝いたします。