

【第41回 小島三郎記念文化賞】

腸内細菌ゲノムの多様性解明と分子疫学的解析への応用

Genomic diversity of enteric bacteria and its application to the molecular epidemiological analysis

わた なべ はる お
渡 辺 治 雄
Haruo WATANABE

はじめに

国立感染症研究所の役割として、感染症のメカニズムの基礎的研究およびその成果の応用があげられます。昨今はトランスレーショナル・リサーチなる言葉で、基礎的研究を実用的面に応用することの重要性が強く叫ばれております。今回の研究成果は、まさしく基礎的研究成果「ゲノムの多様性」を、分子疫学的に応用することにより、細菌性腸内感染症による集団事例を迅速に把握し、その被害を最小限にとどめることを目指したものです。このような成果が、小島三郎記念文化賞として認められましたことは、この研究を進めてきたものとして誠に喜びとするものです。今後とも、国内を初め、国際的ネットワークの構築を推進していくことに努力を傾けたいと思っております。今までの成果を此処にまとめ記録に残すとともに、今後とも多くの先生方に更なるご支援をお願いする次第です。

I. 感染症の集団発生と迅速検知

グローバル化の促進により、動物、人および物が大量かつ短時間の間に世界的に移動するようになってきている。感染力の強い病原体に罹患したヒトが広域に移動すれば、感染を拡大させる危険性が高い。また、経口感染症の原因病原体に汚染された食品や食材が広域に配送され、飲食されれば、その結果発生した食中毒により、広範なる地域において多数の罹患者が出ることになる。散在した地域で、あるいは時間的な差異をもって患者が発生する

ような場合には、各々が共通の原因によって起こっている集団事件、いわゆる“diffuse outbreak”（散在的集団発生）、であるということの検知までに多くの時間を要し、被害を拡大させてしまう可能性が高い。このような状況を未然に防ぎ被害を最小限に食い止めるためには、感染源の迅速なる把握およびそれに対する適切なる対策が要求される。そのためには原因となる病原体の分離・同定および個々で分離された病原体間の関連性等に関する科学的データを集約し、その結果に基づいて疫学的解析を行うことが不可欠である。

II. 病原体ゲノムの多様性の解析結果とその利用；パルスネット

各事例の原因である病原体間の関連性を明らかにするためには、病原体の染色体の構成成分であるDNA配列の多様性を利用した分子疫学的手法が有用であり、近年多くの病原体解析に用いられるようになってきている。種々の病原体のゲノムの全塩基配列が解読されその情報が集積されるにつれ、例えばある菌種の同じ血清型に属する菌株間においてすらゲノム上のDNA配列に差異を見いだせることが判明してきている。つまり“strain to strain difference（菌株間の差）”を検知できる技術を用いれば、菌株間のお互いの関連性をより詳細に解析できるわけである。理論的には菌株間の差を検出するにはゲノムの全塩基配列を決めればよいわけであるが、多数の菌を短時間に解析する必要がある場合には、経費的にもまた要する時間的にも現時点においては現実的

ではない。そこで、より簡便に DNA 間の差異を検出する技術が開発されてきている。主に使用されている方法としては、パルスフィールド電気泳動 [pulsed-field gel electrophoresis] (PFGE), random amplification of polymorphic DNA (RAPD), あるいは amplified fragment length polymorphism (AFLP) 法などがある。数ある方法の中で、現時点においては PFGE 法が菌株間の DNA 構成の差を検出するのに感度的にもまた再現性においても最も優れた方法であると認識されている。パルスフィールドゲル電気泳動法を用いての菌株解析ネットワーク (パルスネット; PulseNet) は、この PFGE 法を用いて、各地で分離される菌株の関連性をいち早く解析し、それを疫学分析に利用させるシステムである。

Ⅲ. 腸管出血性大腸菌 O157 : H7 および その他の腸内細菌の疫学調査における PFGE 解析の有用性

PFGE による遺伝型別が、病原菌の疫学マーカーの一つとしてさまざまな菌種において使われてきているが、特に EHEC (enterohemorrhagic *Escherichia coli*; 腸管出血性大腸菌) O157 に関しては疫学的解析における有効性が確立しているといえる。我々は、今までに臨床検体から分離された 10,000 株以上の EHEC O157 菌体について PFGE 解析を行い、7,000 種類以上の異なるパターンに分けることがで

きることを明らかにしてきている。つまり疫学的に関連性のないところから分離された株はほとんどが互いに異なるパターンを示していることになる (図 1)。EHEC の染色体ゲノムはその構成において不安定であり、菌が分裂し継代を重ねるに従いゲノム構成に変化が生じやすい。その大きな原因の一つとしては、EHEC O157 には多くの (少なくとも 10 以上) バクテリオファージ DNA および多数の pathogenicity Island (病原因子群島) という外来性の遺伝子群を保持していることが関与している。いくつかの EHEC O157 について全ゲノムの構成を比較してみると、PFGE パターンの差異に、バクテリオファージゲノム自身の構成の多様性、ファージ間の組み換えによる遺伝子変換、ファージの挿入部位の変化およびファージに依存した遺伝子欠失等が深く関与していることが明らかになった。このゲノム構造の不安定性が、かえって疫学的解析に利用できる利点になっている; 同じ PFGE パターンの菌が複数の食中毒患者から分離された場合には、原因菌が特定の食材を汚染してからあまり分裂を繰り返していないこと、つまり同時期に汚染された食材を複数の患者が喫食した可能性が高いことを示すことになる。一方、ゲノム構成が非常に安定な菌の場合には、どの事例から分離される菌も PFGE パターンが高い類似性を示すため、疫学的解析にはあまり意義を与えないことになる。

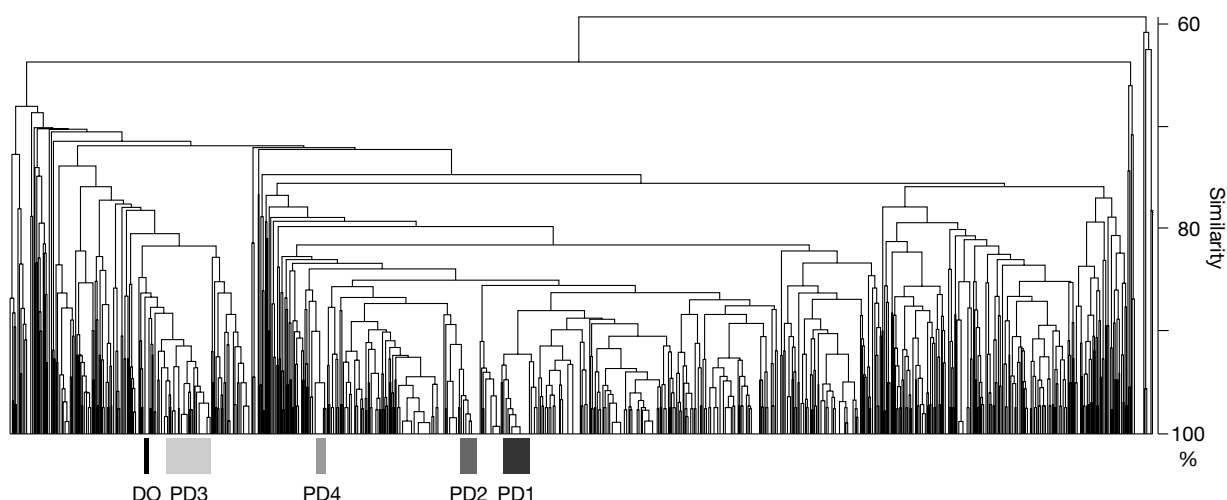


図 1 EHEC O157 の PFGE パターン解析によるデンドログラム

*Xba*I-切断後、ソフトウェア GelCompar II (Applied Maths) で解析。
DO: diffuse outbreak. PD: possible diffuse outbreaks を示す。

PFGE 解析結果が有用であったいくつかの EHEC O157 の集団事例を示す（表 1）。

(1) 1997 年 3 月に關東南部および東海地域において発生した EHEC O157 による事例では、患者宅の残食にあったカイワレ大根から分離された株の PFGE パターンがこれらの地域における患者から分離された株の PFGE パターンと一致し、カイワレ大根が感染源として特定された。

(2) 1998 年 5 月に富山県および首都圏を中心として 7 都府県で計 49 名の患者が発生した EHEC O157 の事例では、北海道産のイクラから分離された菌の PFGE パターンがイクラ喫食者の患者から分離された株のものと一致した。その結果を受けて、行政的処置が取られ製造元に残存していた約 200 トンのイクラが廃棄処分されたため、その後の患者の発生が阻止された。

(3) 2001 年 2～3 月にかけて、滋賀、富山、奈良の 3 県でチェーンレストランのサイコロステーキ [ビーフ角切りステーキ] を原因食とした EHEC O157 による事例が発生した。

(4) また、同年 3～4 月にかけては、首都圏を中心とした 1 都 6 県において、EHEC O157 で汚染された牛肉のタタキおよびローストビーフを喫食後、患者 204 名が発生した。

(3)、(4) の事例では、食品と原材料の冷凍輸入牛肉から EHEC O157 が分離され、それぞれの事例内の患者分離株の PFGE パターンと一致した。以上の 4 事例は、患者と食品から EHEC O157 が分離された珍しい事例であるが、患者の発生が複数の地域に及んでいることおよび発生に時期的な差があることから通常の検査のみではお互いの関連性の認知は困難である。それらは、一見散発的に発生していると思われるが実際は共通原因によって起こった集団発

生、いわゆる diffuse outbreak といえる。PFGE ネットワークの最大の利点は、このような diffuse outbreak の早期発見、およびそれにより被害の拡大防止を実現できることにある。

Ⅳ. パルスネットの構築

主に diffuse outbreak の迅速検知を目指し、国立感染症研究所、全国の地方衛生研究所（一部政令指定都市の保健所を含む）、および厚生労働省を対象としての PFGE ネットワーク（パルスネット）の構築を図った。PFGE に代表されるような遺伝型別法においては、現在のところ国際的な標準化は無論のこと、国内においても解析結果に対しての互換性が図られていない。そのため国立感染症研究所と地方衛生研究所との間で方法の精度管理を行ってきている。標準株との比較の上で対象株の PFGE 泳動パターンの系統樹を書くことによりお互いの菌株の関連性を明らかにできる。PFGE 解析のプロトコルの統一、解析機器、試薬等の規格化を行うことにより、異なる施設間のデータの再現性の確保、およびその解析結果の比較が可能であることが判明した。総合的に以下のようなパルスネットの構築を進めている。地方衛生研究所等における分離株の PFGE 解析結果をインターネット経由で国立感染症研究所細菌第一部に電送する。そこで系統樹等の作成による画像解析を通し各地で分離されている菌株間の遺伝学的関連性を明らかにする。その結果と疫学情報とを総合的に解析し、各事例間の関連性を解明する（この作業は国立感染症研究所感染症情報センター、厚生労働省、および各都道府県の疫学担当との連携になる）。さらに、これらの解析結果を WISH（厚生労働行政総合情報システム）上の www サーバー

表 1 パルスネットで解析された主な diffuse outbreaks の例

Pathogens	year	month	Source of contamination	No. of prefectures involved	patients	measures taken
EHEC O157 : H7	1998	May-June	a. Salmon roe	7	62	withdrawal of the products
	2001	Mar.-Apr.	b. Tataki (roast beef)	7	246	withdrawal of the products
		Mar.-Apr.	c. Saikoro steak	3	6	withdrawal of the products
S. Oranienburg	1999	Jan.-May	dried squid	47	821	(withdrawal of the products)
<i>Shigella sonnei</i>	2001	Nov.-Dec.	oyster	32	>180 ?	withdrawal of the products

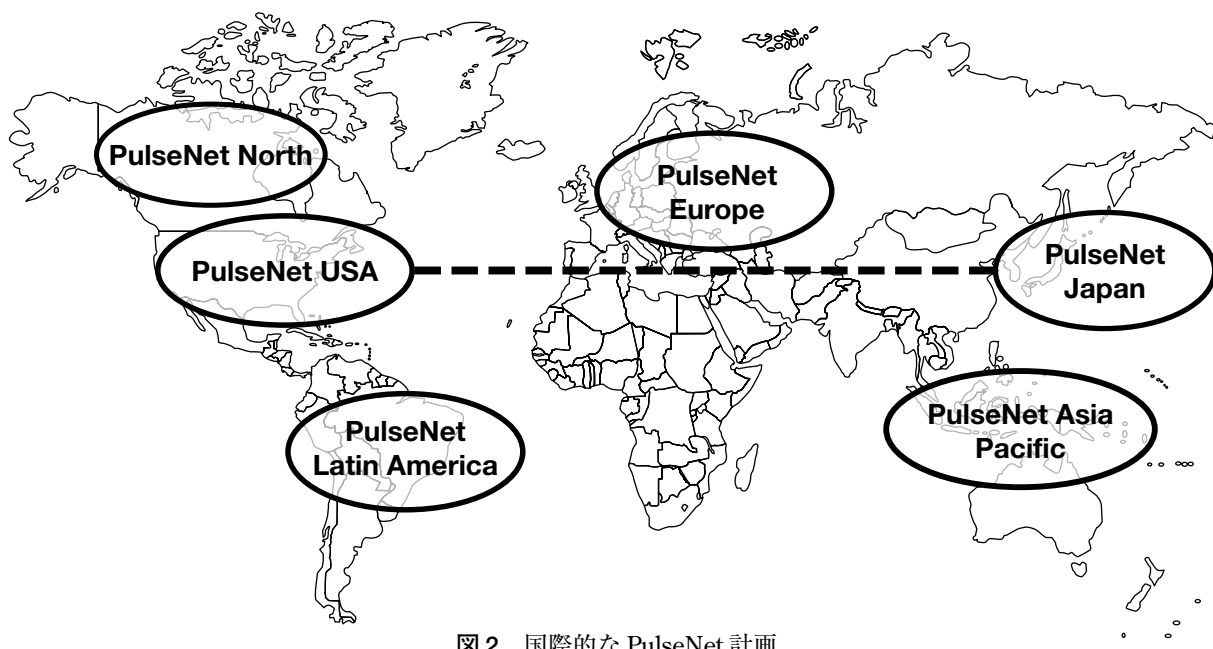


図2 国際的な PulseNet 計画

に転送し、情報の開示を行う。地方衛生研究所および保健所等は WISH を介してその情報を閲覧することができる。遺伝型が同一と考えられる菌株が複数の地域から分離されているような状況 (diffuse outbreak) が把握できれば、疫学的な調査結果と組み合わせることで迅速な感染源の解明、および感染の拡大防止に貢献できるだろう。また、将来的には農林水産省等との連携を計れるようになれば、汚染原因の元までたどれる可能性がある。国民の健康を守るために、省を越えての連携が重要になる。

V. 国際的な連携

米国では CDC (Centers for Disease Control and Prevention) を中心として、米国内のいくつかの州立公衆衛生研究所、FDA (Food and Drug Administration) および USDA (United States Department of Agriculture) の研究室間で、パルスネットの構築が行われてきている。年1回の連絡会議を開催し、試行錯誤の結果、diffuse outbreak の迅速なる発見においてかなりの成果を上げるところまでできている。かなりの額の予算が国から提供されており、そのことが当事業を成功させる鍵にもなっている。またカナダ、EU においてもパルスネット構築の準備が進められている。国際的協力が重要なことは、*S. sonnei* 汚染による韓国産生牡蠣を原因とする集団事例による韓国 NIH との共同研究、EHEC O157 汚染米国産

牛肉による沖縄の集団事件における米国 CDC との共同研究を通して明らかになっている。アジアを中心としたネットワーク化構築に向けて厚生科学研究費を獲得し、研究班を組織し、2005 年 11 月に国立感染症研究所にアジア汎太平洋地域 14 カ国が集まり会議を開催することになっている (図 2)。食材の国際的流通が益々盛んになる今後、国を越えての食を介する感染症の拡大が懸念される。それらに機能的に対処するためには、国際的なネットワークが功を奏することになる。国際的なネットワークの構築に向けての努力が今後さらに展開されていくであろう。その折にはわが国のアジア地区における貢献が期待されている。

謝 辞

栄えある小島三郎記念文化賞を受賞する機会を与えていただきましたことに感謝を申し上げます。特に、中谷林太郎先生をはじめとする選考委員の諸先生方および推薦の労をとっていただきました大阪大学微生物病研究所の本田武司教授には厚く御礼申し上げます。また、今回受賞の対象になりました「腸内細菌のゲノムの多様性の解明とその分子疫学解析への応用」の成果を得るに当たりましては、多くの共同研究者に支えられて初めて成し遂げることができました。特に、地方衛生研究所の諸先生方とのネットワーク無しには成し遂げることはできませんでした。また、ゲノムの多

様性に関する解析結果は、宮崎大学の林哲也教授を始めその教室のスタッフの方々、および神戸大学の大沢朗教授とそのスタッフの方々との共同研究の賜物であります。また、国際的なネットワーク「パルスネットアジア」の構築への施行に関しましては、中国、韓国、タイ、インド等アジア諸国14カ国に及ぶCDC様機能を持った研究機関との連携によるものであります。さらに、これら多くの大学および研究所との共同研究を支え、かつ個々の研究の遂行に努力してくれましたのは他ならぬ国立感染症研究所細菌第一部、感染症情報センター、厚生労働省の多くのスタッフおよび協力研究員の方々であります。此処に皆さまに厚く感謝を申し上げます。

文 献

(今回の受賞に係した論文のみを参考に記す)

- 1) Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Ito K, Tamura K : Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 infection by two different genotypes-strains in Japan, 1996. *Lancet* **348** : 831-832, 1996.
- 2) Izumiya, H., Terajima, J., Wada, A., Inagaki, Y., Itoh, K., Tamura, K., and Watanabe, H. Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analyses. *J. Clin. Microbiol.* **35** : 1675-1680, 1997.
- 3) Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pnrunangwong, S., Terajima, J., Watanabe, H., Kaneko, K., and Ogawa, M. Epidemiological analysis of *Salmonella Enteritidis* isolates from human and broiler chickens in Thailand by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **36** : 971-974, 1998.
- 4) Terajima, J., Nakamura, A. and Watanabe, H. Epidemiological analysis of *Salmonella Enteritidis* isolates by phage-typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol. Infection.* **120** : 223-231, 1998.
- 5) Izumiya, H., Kasuda, T., Ahmed, R., Khakhria, R., Wada, A., Itoh, K., Johnson, M.W., Konuma, H., Shinagawa, K., and Watanabe, H. Availability of combinatorial use of bacteriophage typing and pulsed-field electrophoresis in the epidemiological analysis of Japanese isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157. *Microbial Immunol.* **42** : 515-519, 1998.
- 6) Watanabe, H., J. Terajima., Izumiya, J., Wada A., Iyoda, S., and Tamura, K. Molecular epidemiological analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections in Japan. *J.J.Med.Sci.Biol.* **51** : S115-S123, 1998.
- 7) Murase, T. Yamai, S., and Watanabe, H. Changes in pulsed field gel electrophoresis patterns observed in clinical isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 associated with loss of shiga toxin genes. *Current Microbiol.* **38** : 48-50, 1999.
- 8) Terajima J., Izumiya, H., Wada, A., Tamura, K and Watanabe, H. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 : H7 in Japan. *Emerg. Inf. Diseases.* **5** : 301-302, 1999.
- 9) Watanabe, H., J. Terajima., Izumiya, J., Wada A., and Tamura, K. Molecular analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Japan and its application to epidemiological investigation. *Pediatrics International.* **41** : 202-208, 1999.
- 10) Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K., and Watanabe, H. Detection of a multi-prefectural *E. coli* O157 : H7 outbreak caused by contaminated Ikura-sushi ingestion. *Jap. J. Infect. Diseases.* **52** : 51-52, 1999.
- 11) Iyoda, S., Wada, A., Weller, J., Flood, J.A.S., and Watanabe, H. Investigation of the AFLP, high resolution DNA fingerprinting method, as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *Microbiol. Immunol.* **43** : 803-806, 1999.
- 12) Izumiya, H., Tamura, K., Terajima, J., and Watanabe, H. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104 and other multi-drug resistant strains in Japan. *J. J. Infect. Diseases.* **52** : 133, 1999.
- 13) Moriya, K. Fujibayashi, T. Yoshihara, T. Matsuda, A. Sumi, N. Umezaki, N. Kurahashi, H. Agui, N. Wada, A. and Watanabe, H. Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 : H7 carried by the housefly in Japan. *Medical Veterinary Entomology.* **13** : 214-216, 1999.
- 14) Osaka, K., Inouye, S., Taniguchi, K., Okabe, N., Izumiya, H., Watanabe, H., Matsumoto, Y., Yokota, T., Hashimoto, S., and Sagara, H. Electronic network for monitoring traveler's diarrhea and detection of an outbreak due to *Salmonella* Enteritidis among overseas tourists. *Epidemiol. Infect.* **123** : 431-436, 1999.
- 15) Arakawa, E., T. Murase, M. Matsushita, T. Shimada, S. Yamai, T. Ito, and H. Watanabe. Pulsed-field gel electrophoresis-based molecular comparison of *Vibrio cholerae* O1 Isolates between domestic and imported cases in Japan in 1997. *J. Clin. Microbiol.* **38** : 424-426, 2000.
- 16) Hamada, K., Tsuji, H., Izumiya, H., and Watanabe, H. Comparison by pulsed-field gel electrophoresis of *Salmonella* Enteritidis genotypes from various food poisoning outbreaks from 1997 to 1999 in Hyogo prefecture. *Jpn.J.Infect. Dis.* **53** : 25, 2000.
- 17) Osawa, R., Wada, A., Iyoda, S., Yamai, S., and Watanabe, H. Variation of shiga toxin-converting phages from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 isolates in Japan. *J. Medical Microbiol.* **49** : 565-574, 2000.
- 18) Sameshima, T., Akiba, M., Izumiya, H. Terajima, J., Tamura, K., Watanabe, H., and Nakazawa, M. *Salmonella* Typhimurium DT104 from livestock in Japan. *Jpn.J. Infect. Dis.* **53** : 15-16, 2000.
- 19) Terajima, J., Izumiya, H., Wada, A., Tamura, K. and

- Watanabe, H. Molecular epidemiological investigation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan. J. Appl. Microbiology. **88** : 99S-105S, 2000.
- 20) Kai, E., Ikebukuro, K., Hoshino, S., Watanabe, H., and Karube, I. Detection of PCR products of *Escherichia coli* O157 : H7 in human stool samples using surface plasmon resonance. FEMS Immunol. Medical Microbiol. **29** : 283-288, 2000.
 - 21) Iyoda, S., Tamura, K., Itoh, K., Izumiya, H., Terajima, J. and Watanabe, H. Inducible *stx2*-phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* O86 : HNM isolated from patients FEMS Microbiol. Lett. **191** : 7-10, 2000.
 - 22) Shindo, N., Osaka, K., tanuguchi, K., Inouye, S., Terajima, J., Izumiya, H., Tamura, K., and Watanabe, H. Geographic information system for food-borne diseases in Japan : development of Food-Info Net.. geography and medicine. Geomed' 99. A. Flahault, et. Al., eds. Elsevier SAS.p. 97-101, 2000.
 - 23) Watanabe, H., J. Terajima, H. Izumiya, S. Iyoda, R. Osawa and K. Tamura. Molecular epidemiological investigation and genotypic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Verocytotoxic *Escherichia coli*. Epidemiology (Concerted Action CT98-3935) . Vol.5. p.38-43, 2001.
 - 24) Izumiya, H., Terajima, J., Matsushita, S., Tamura, K., and Watanabe, H. Characterization of multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Japan. J. Clinic. Microbiol. **39** : 2700-2703, 2001.
 - 25) Matsune, W., Ishikawa, K., Hayashi, K., Tsuji, M., Izumiya, H., and Watanabe, H. Molecular analysis of *Salmonella* Enteritidis resistance to ampicillin and streptomycin from three outbreaks of food poisoning in Shiga prefecture. Jpn. J. Infect. Dis. **54** : 111-113, 2001.
 - 26) Terajima, J., Izumiya, H., Tamura, K., and Watanabe, H. High genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan and its applicability for the detection of diffuse outbreak. Jpn. J. Infect. Dis. **55** : 19-22, 2002.
 - 27) Iguchi, A., Osawa, R., Kawano, J., Shimizu, A., Terajima, J., and Watanabe, H. Effects of repeated subculturing and prolonged room temperature storage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 on pulsed field gel electrophoresis profile. J. Clin. Microbiol. **40** : 3079-3081, 2002.
 - 28) Watanabe, H., Terajima, J., Izumiya, H., and Iyoda, S. Molecular typing methods for STEC ; Methods in Molecular Medicine. Vol.73 : *E. coli* Shiga toxin methods and protocols. Edited by ; D. Philpott and F. Ebel. Humana Press Inc., Totowa, NJ. P.55-65, 2002.
 - 29) Ohnishi, M., Terajima, J., Kurokawa, K., Nakayama, K., Murata, T., Tamura, K., Ogura, Y., Watanabe, H., and Hayashi, H. Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **26** : 17043-17048, 2002.
 - 30) Nakaya, H., Yasuhara, A., Yoshimura, K., Oshihoi, Y., Izumiya, H., Watanabe, H. Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium with mutations in both *gyrA* and *parC*. Emerg. Infect. Dis. **9** : 255-257, 2003.
 - 31) Iguchi, A., Osawa, R., Kawano, J., Shimizu, A., Terajima, J., and H. Watanabe. Effects of lysogeny of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages on pulsed-field gel electrophoresis fragment pattern of *Escherichia coli* K-12. Current Microbiology. **46** : 224-227, 2003.
 - 32) Izumiya, H., Nojiri, N., Hashiwata, Y., Tamura, K., Terajima, J., and Watanabe, H. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, Japan. Emerg. Inf. Dis. **9** : 1650-1651, 2003.
 - 33) Terajima, J. Tamura, K., Hirose, K., Izumiya, H., Miyahara, M., Konuma, H., and Watanabe, H. A multi-prefectural outbreak of *Shigella sonnei* infections associated with eating oysters in Japan. Microbiol. Immunol. **48** : 49-52, 2004.
 - 34) Matsui, T., Suzuki, S., Takahashi, T., Kobayashi, J., Ohyama, T., Izumiya, H., Watanabe, H., Kasuga, F., Kijima, K., Shibata, K., and Okabe, N. *Salmonella Enteritidis* outbreak associated with a school lunch dessert-Japan : cross-contamination and a long incubation period, Japan, 2001. Epidemiol. Infection. **132** : 873-879, 2004.
 - 35) Esaki, H., Morioka, A., Kojima, A., Ishihara, K., Asai, Tetsuo., Tamura, Y., Izumiya, H., Terajima, J., Watanabe, H., and Takahashi, T. Epidemiological characterization of *Salmonella* Typhimurium DT104 prevalent among food-producing animals in the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program (1999-2001) . Microbiol. Immunol. **48** : 553-556, 2004.
 - 36) Talukder, K.A., Khajanchi, B.K., Islam. M.A., Dutta, D.K., Islam, Z., Safa, A., Khan, G.Y., Alam, K., Hossain, M.A., Malla, S., Niyogi, S.K., Rahman, H., Watanabe, H., Nair, G.B., Sack, D.A. Genetic relatedness of ciprofloxacin resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains isolated in south Asia. J. Antimicrob. Chemother. **54** : 730-734, 2004.
 - 37) Shima, K., Terajima, J., Sato, T., Nishimura, K., Tamura, K., Watanabe, H., Takeda, Y., and Yamasaki, S. Development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for the epidemiological analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. **42** : 5205-5213, 2004.
 - 38) Kudaka, J., Asato, R., Itokazu, K., Nakamura, M., Taira, K., Kobayashi, J., Terajima, J., Watanabe, H. Swaminathan, B., Braden, CR. *Escherichia coli* O157 : infections associated with ground beef from a U.S. military installation - Okinawa, Japan, February 2004. MMWR. **54** : 40-41, 2005.
 - 39) Taguchi, M., Seto K., Kanki M., Tsukamoto, T., Izumiya, H., and Watanabe, H. Outbreak of food poisoning caused by lunch boxes prepared by a company contaminated by multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium DT104. Jpn. J. Infect. Dis. **58** : 55-56, 2005.