

2021年度日本食品微生物学会学会賞受賞総説

食品由来感染症に係る腸内細菌の疫学とその病原性に関する研究

Study on Epidemiology of Intestinal Bacteria Related to Foodborne Infections and Their Pathogenicity

寺嶋 淳

(岩手大学大学院獣医学研究科)

Graduate School of Veterinary Sciences, Iwate University

はじめに

このたび第3回日本食品微生物学会賞を受賞することになり、大変光栄に思う。食品微生物学分野の本流からやや離れた研究内容であるにもかかわらず評価いただいたことは、身に余る栄誉との思いを禁じ得ないが、傍流の仕事内容にあっても貢献度を認知する本学会の包容力に感謝したい。受賞対象となった研究内容は、国立感染症研究所(旧国立予防衛生研究所、以下感染研)に入所以来、同僚を含め多くの研究者に支えられた結果であるが、以下にその内容を紹介する。感染研に入所する前に行った研究は、北海道大学で獣医学博士号を取得した研究としてボツリヌス毒素に関する研究であったが、ポストドクとして渡米後の3年間は大きく分野が異なる、T cell, B cellの免疫応答における信号伝達系に関する研究に携わっていた。1991年に帰国後、エイズ予防財団の非常勤職員を経てから、当時の感染研細菌部 ファージ型別室に研究員として採用された。2013年に国立医薬品食品衛生研究所(以下国衛研)衛生微生物部に移るまで約22年間を感染研において腸管感染症の起原菌に関する研究に携わっており、本総説ではこの期間における研究内容について紹介する。

(I) 広域における細菌性食品由来感染症の制御に向けた分子疫学的研究

さて、20年以上前の話になるので、食中毒統計による食中毒事件数の変遷を見ながら当時の状況を振り返ってみると、90年代後半にサルモネラと腸炎ビブリオによる事例が急増し、腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, 以下EHEC)が、全国的に発生し始めた時期となる。1999年には感染症法が制定され、コレラ、細菌性赤痢、腸チフスおよびパラチフスと

ともに、EHEC感染症は三類感染症となった。周知のようにサルモネラと腸炎ビブリオが減少した一方で、カンピロバクターとノロウイルスを原因とする食中毒が減少しないことが問題となっている。図1に食中毒統計に基づく病因物質別食中毒発生状況(事件数)を示す。EHECを含む病原大腸菌による食中毒件数はさほど多くないが、感染症法で動向が把握されているEHEC感染者は年間4,000名前後報告されており、感染源の探知が難しい疾患となっている。

1990年代初頭の感染研細菌部ファージ型別室では、中村明子先生がCentral Public Health Laboratory, Londonから導入したサルモネラのファージセットを用いて、サルモネラのファージ型別を行っており、筆者は当時卵を原因とする集団発生が多かった、*Salmonella* Enteritidis (SE)のファージ型別を担当していた。SEのファージ型別(PT)は、16種類のファージによる溶菌パターンを目視で判別し型別するが、型別の精度管理のため目視判定基準を厳密に維持する必要があった。したがって検査技術の普及という意味では難があったが、地方衛生研究所等で分離された貴重な株がファージ型別のため送付されていた。集団発生事例由来のSE株を調べてみると、かつて主流であったPT34からPT1あるいはPT4に主となるPTが変遷していた。PT1およびPT4のSE株も一様ではなく、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)では種々のパターンが観察され、多様なSE株による食中毒事例が発生していることが明らかになった¹⁾。また、当時研究室に留学していた、Dr. Sumalee Boonmarとの協同研究により、タイ国のヒト及び鶏由来のSEがPT4主体でかつ多様なPFGEパターンを示していることが明らかになった²⁾。

当時サルモネラの集団発生事例ではSEが圧倒的に多かったが、稀には他の血清型による事例もあり、1999年にはS. Oranienburgに汚染されたイカ菓子による全

* 連絡先

☎020-8550 岩手県盛岡市上田3-18-8

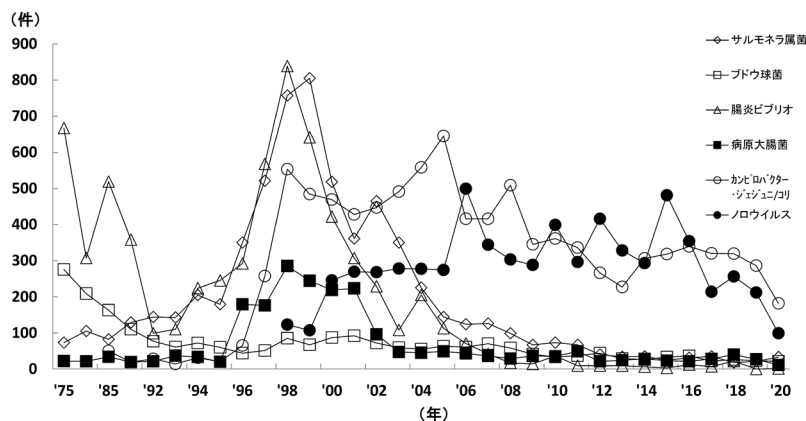


図1. 病因物質別食中毒発生状況（事件数）1975-2020年

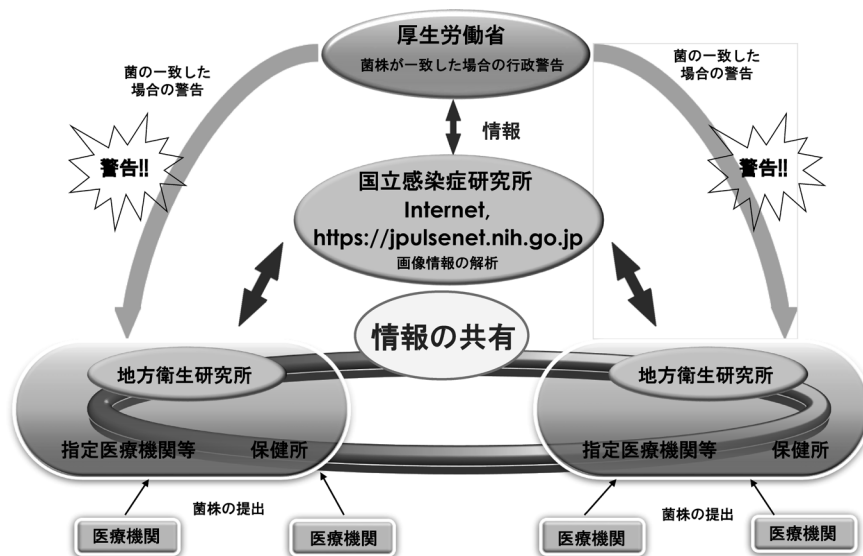


図2. 標準パルスフィールドゲル電気泳動法の情報ネット
(パルスネット; 菌の解析情報の共有)

国的な食中毒事例が発生した。同一原材料に由来する様々な製品がS. OranienburgとS. Chesterに汚染されており、1,634名にのぼる患者がほぼ全国の都道府県で発生した³⁾。本事例での患者由来株及び原因食品由来株では同一のPFGEパターンを示し、その原因菌が同一汚染源に由来することが強く示唆された(data not shown)。

EHEC O157:H7は、1982年にアメリカ合衆国のオレゴン州及びミシガン州で発生したハンバーガー食中毒における出血性大腸炎患者の便から分離されたのが最初である⁴⁾。わが国では、EHEC O157:H7は1984年大阪の食中毒事例の患者から分離されている⁵⁾が、1990年に浦和の幼稚園で汚染した井戸水を原因として死者2名が発生した事例⁶⁾を契機として、注目を集めた。さらに、1996年には堺市をはじめとして、小学校におけるEHEC O157:H7による集団発生が多発し1万7千名余の患者が発生した⁷⁾。なぜこの年はEHEC O157による事例が多発したかは不明であるが、さまざまな対策がとられ、翌年には小学校での集団事例は発生せず集団事例そのもの

の数も減少した。しかし散発事例を含めた報告数は減少しなかった。食中毒の原因解明においては、原因菌の解析と患者等に関する疫学情報の解析を関連付けながら実施することが重要であるが、当時原因菌の解析に汎用された技術がPFGEである。同一血清型のEHECの異同を識別する方法として、1990年代後半から菌株の主要な解析方法となった。1996年のEHEC O157による全国的な集団発生事例の解析においてもその有用性を発揮した⁸⁾。ゲノム配列に基づく菌株比較を実施するには、まだ時間と経費の点から導入するのが困難であった時代である。EHECを含めて食に由来する感染症（食中毒）の予防対策の一つとして厚生労働省は、当時米国で稼働しつつあった、菌株のPFGEによる解析情報共有ネットワーク、パルスネットを参考に、全国で分離された菌株とその疫学情報を解析するネットワーク、つまり日本版のパルスネットであるが、その構築と運営を、渡辺治雄先生を研究代表者として厚生労働科学研究費に基づいて進めてゆくこととした⁹⁾。すなわち、菌株の遺伝学的多

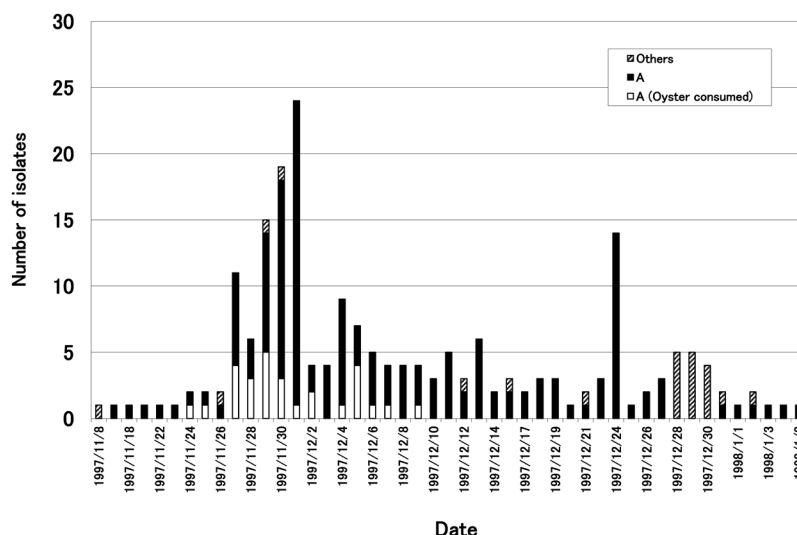


図3. The number of culture-confirmed cases of *S. sonnei* infection from November 9, 2001 to January 9, 2002. Date of specimen collection was indicated. A indicates the isolates showing PFGE type A and A (oyster consumed) indicates the isolates of PFGE type A from the patients who consumed raw oysters of the two dealers. Others indicate the isolates of non-PFGE type A

様性を利用して、菌株間の連関性を解析し、その結果を疫学的調査に利用することにより、汚染源の究明に貢献させるシステムの構築である。今では菌株のゲノム情報比較も容易に行われているが、20年以上前の話であるから、行政的な対応として多数の分離株を短時間に解析する必要がある場合も考慮されPFGEとなったわけである。パルスネットでは、図2に示すとおり、国内各地で発生する事例由来株そのもの或いはPFGEの解析データを感染研に集約し、作成された菌株解析データベースと照合することで事例相互の関連性の有無を判断し、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するシステムが目指された(図2)。米国パルスネットにおいても当初はPFGEの泳動像に基づくデータベースが構築され、bioMérieux社(当時のApplied Maths社)のBioNumericsという画像解析を主とするソフトウェアが使用されていた。BioNumericsでは、PFGE画像解析の結果を相互にやり取りすることが可能であり、解析技術の標準化を前提として感染研に設置されたデータベースに各機関での解析結果を蓄積することが可能となったが、実際には全国を6ブロックに分けた代表地方衛生研究所のみが本ソフトウェアを所持しているだけであったので、わが国のパルスネットは分離株の送付あるいはPFGE画像の送信という2本立てのシステムとなった。BioNumericsの高額な購入費用も導入の障壁であったが、煩雑なPFGE解析結果をサーベイランスとして常時稼働させるマンパワーが必要となることも現場では負担となるため、このシステムは現実的な対応だと考えられた。菌株の解析技術が進化するにつれパルスネットが使用する解析方法も変遷してきており、Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)やWhole Genome Sequence

(WGS)によるsingle nucleotide polymorphism (SNP)解析などが利用されるようになってきた。シーケンシング技術が進化し膨大な量のデータが生成され必要となる分析方法が多様化するなかで、PFGEの解析から始まったBioNumericsのサービスが2024年末に終了するということにも時代の流れを感じざるを得ない。

パルスネットのシステムが徐々に構築される間にも食中毒事例は発生しており、PFGE画像のデータベースを拡充しつつ発生事例由来株の解析を進めていった。2001年には、韓国産のカキを原因とする*S. sonnei*による赤痢が国内各地で発生した。当初は、国産カキに混入された韓国産カキの流通経路が明らかになった患者26名とされていたが、同時期に発生した患者由来株のPFGE解析結果から関連が疑われる293株が明らかとなり、一部には韓国産カキの混入が疑われていた¹⁰⁾(図3)。一方、EHECでは、1996年に多発したような大規模な集団発生は種々の対策が効を奏しほとんどなくなったが、その後もさまざまな施設や飲食店などを含め、小、中規模な集団発生が報告された。またパルスネットの稼働が継続し分離株の解析結果を含めたデータベースが拡充するにつれて、EHECの事例においては患者及び感染源となった食品等からの分離株のPFGEパターンが集団事例内ではほぼ一致しており、同一PFGEパターンの分離株においては相互の関連性が高いことが明らかになった。特にEHEC O157では染色体DNAの構造に多様性が存在する¹¹⁾ために、新たに分離される株のほとんどが過去の株とは異なるPFGEパターンを示していることが明らかになってきた。したがって、同一PFGEパターンの分離株が検知された場合は、これらの株間に何らかの関連性が存在することを示唆するものと考えられた。実際に、同一の汚染源により複数の都道府県にわたる広域同時多

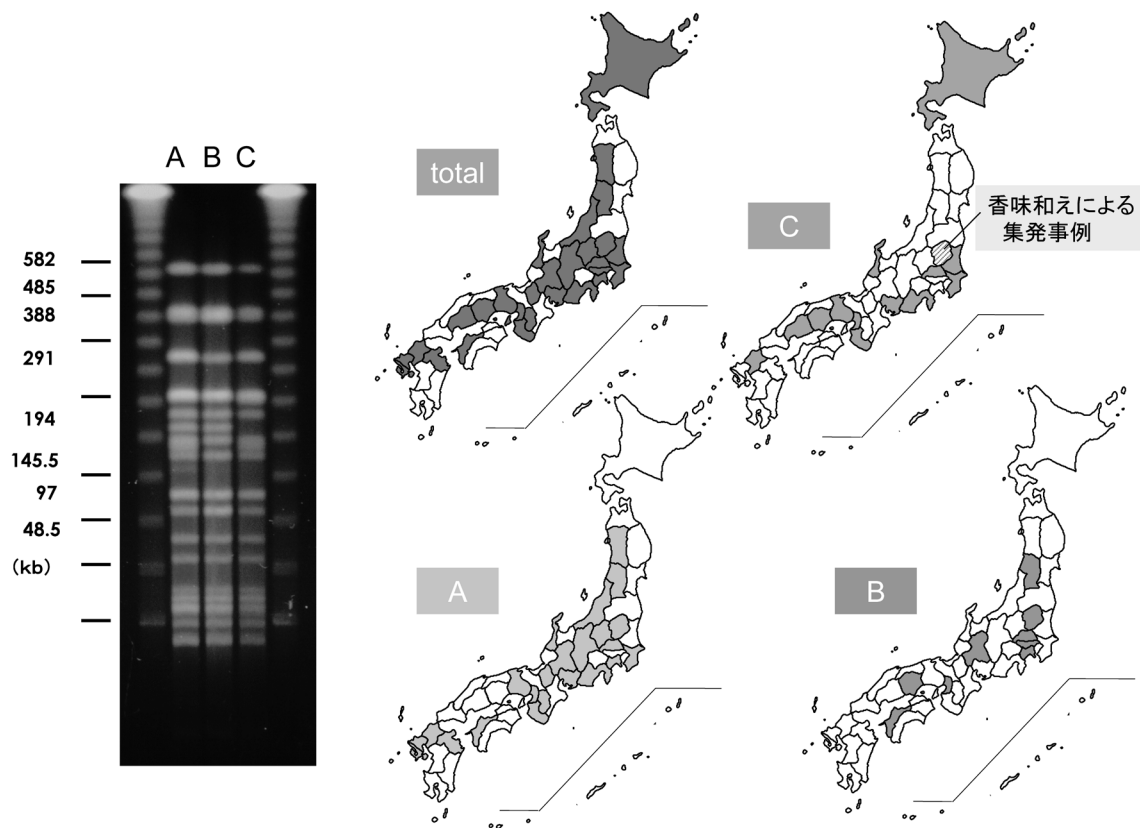


図4. 2002年におけるEHEC O157:H7のPFGE type A, B, C分離地

発型の散発事例、いわゆる diffuse outbreak (散在的集団発生) が探知されるようになった^{12, 13)}。原因食品が広域に流通することにより患者が複数の自治体で発生する事例は多数あるが、詳細は文献¹⁴⁻¹⁶⁾を参照していただくとして本文では省略させていただく。一方で、原因食品が不明ながら、複数の年次にわたって同一のPFGEパターンが広域から検出される場合もあった。2001年には、お互いにそれぞれバンド1本の違いである類似したPFGEパターン、type A, B, Cを示すEHEC O157がほぼ全国各地から分離され、type A, Bは、東京都と埼玉県において「和風キムチ」を原因とする集団発生を引き起こした。「和風キムチ」の流通は地域限定的であったが、type A, B, Cを示す株は北海道・東北地方を除いたほぼ全国から分離されており、2001年に解析を行った2438株の約21%がtype Aであった。さらに、2002年には栃木県において「香味あえ」を原因食としてtype Cを示す株による集団発生があり9名の死者が出たが、type A, Bも含めてこれらのPFGEパターンを示す株の分離地は全国各地に広がっており多くの散発事例から分離されていた¹⁷⁾(図4)。

広域での患者発生はEHEC O157に汚染された食品・食材が広域に流通していたことを推測させるが、2001年の広域から分離された同一PFGEパターンを示すEHEC O157株について「和風キムチ」以外に感染源が明らかになった事例はなく、EHEC感染症において感染

源を解明することの困難さを物語っている。複数年にわたり広域で分離される、同一PFGEパターンを示すEHEC O57株については、同一PFGEパターンを示す株が必ずしも同一クローンの株であるとは限らず、疫学的な関連性が不明な状況では同一性を検証するためにもPFGE以外にも菌学的な解析情報が必要である。識別能がいかに優れている解析方法でもサーベイランスとして利用する以上、現実的に採用が可能な方法は限られてくるが、このような状況からPFGE以外の解析方法、MLVA等の新規解析方法の利用や迅速性・簡便性に秀でた方法として大岡らの開発したIS-printing system¹⁸⁾の利用を進めた。MLVAについては、EHEC O157についてPFGEと同等以上の識別能がありデータ比較が容易であることが明らかとなった¹⁹⁾。また、EHEC O157以外にもゲノム情報が決定されたO26, O111等について泉谷らによりMLVAが使用可能となった²⁰⁾。

国内でのネットワーク構築が進む一方で、米国発のパルスネットは解析条件の標準化という難点があったもののその有用性から世界各地へと広がりPulseNet Internationalというネットワークが形成された²¹⁾。北米では、PulseNet USAとPulseNet Canadaが稼動しており、EHECのみならず、*Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*等、幅広い菌種に対してデータベースの構築が進められた。また、欧州では、Enter-Netを基盤としてPulseNet Europeが稼動し始め、EU内の各国の実情に応じたデー

データベースの構築が進められた。一方、アジア・オセアニア地域においては、PulseNet Asia Pacificとして13の国・地域からなるネットワークが構築された。それぞれの国での感染症の実情に差があることや、参加国間の経済的な格差など、克服すべき問題は多かったが、この地域内での人と物の移動が今後ますます盛んになることが予想されることから、将来的にはこのネットワークの果たす役割は大きなものになるものと期待された。特に東南アジアで問題であったコレラについては、米国CDCとの協力で *Vibrio Cholerae* に対する標準化プロトコルが作成された²²⁾。国をまたいだ人と物（食品・食材）の移動があるなかで、2004年には米国と日本の間ではハワイ発の米国本土便と日本便での航空機機内食を原因とする *Shigella sonnei* による赤痢事例が8月下旬（第35週および第36週）に発生し、日本への帰国者15名からの分離株の PFGE パターンと米国本土への旅客からの分離株のものが一致することが判明した²³⁾（図5、6）。ま

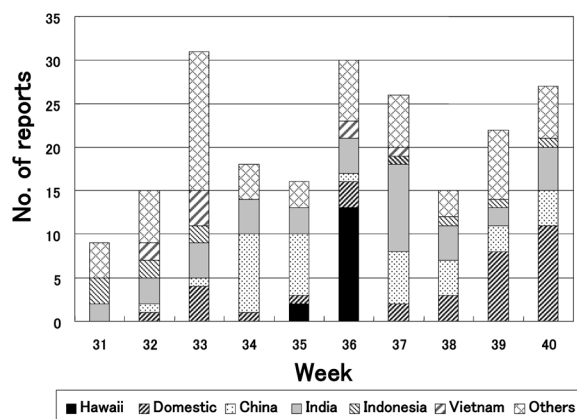


図5. Number of Shigellosis reports in Japan during the week of 31st to 40th in 2004 (National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases)

た、沖縄の米軍基地で購入したハンバーグパテによる EHEC O157 の事例では、日米関係機関の協力で、米国内において牛肉4万トンのリコールに結びついた例もあった²⁴⁾（図7）。速やかな事例の探知と情報の共有により、その後の事例拡大或いは発生阻止が二国間においても可能であることを示した例だといえる。PulseNet Asia Pacificにおいては、ネットワーク内での解析技術の標準化を目的とした研修会が香港の Public Health Laboratory Centre で毎年開催され、*Vibrio Cholerae* の標準化プロトコルに続いて *Vibrio parahaemolyticus*

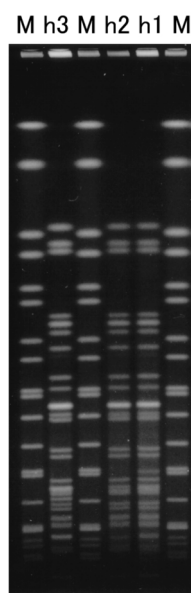


図6. Representative PFGE patterns of *Shigella sonnei* isolates from air-travel related cases. Lanes h1 to h3 are isolates from the patients. Lanes M are *Salmonella* Braenderup H9812 strain used as a molecular size marker

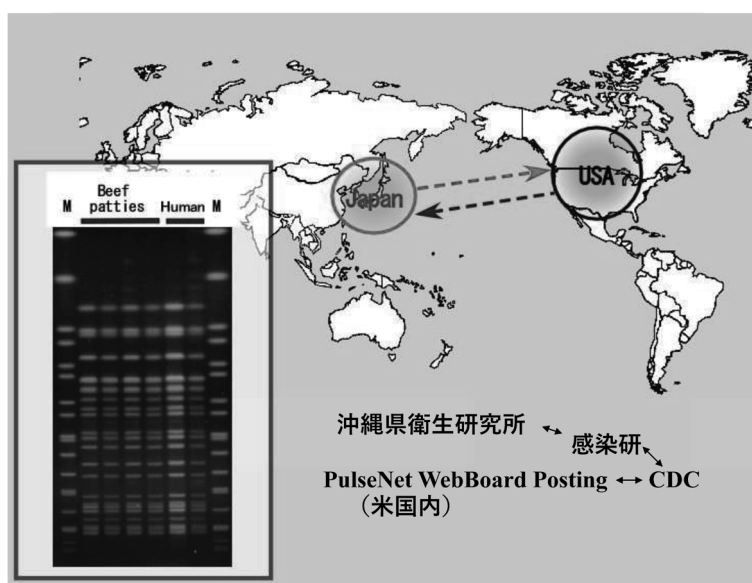


図7. 沖縄県で発生した EHEC O157:H7 事例に関わる PulseNet の連携

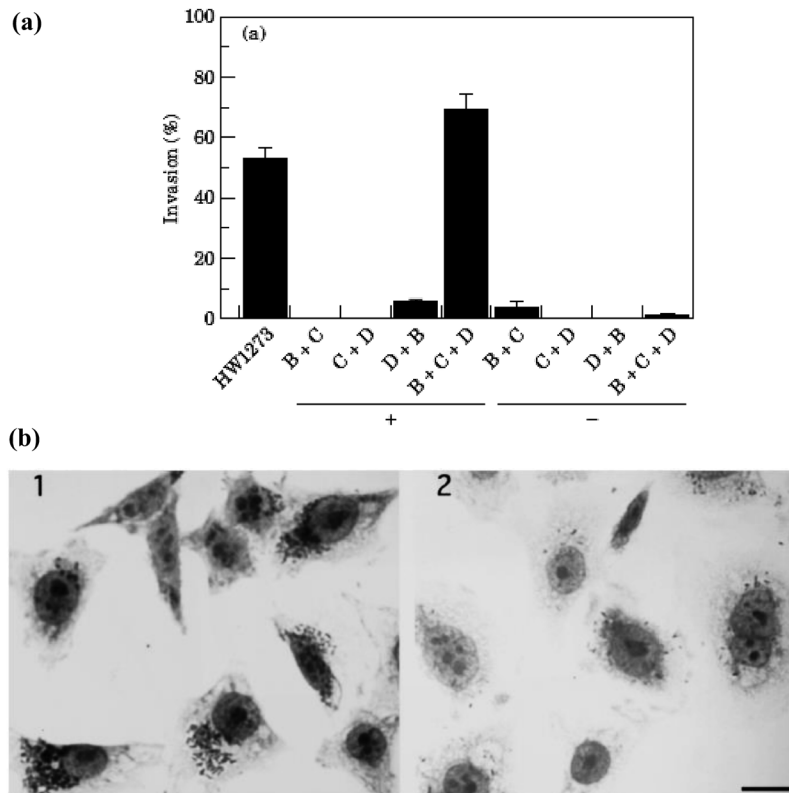


図8. Invasion of HeLa cell by non-invasive *E. coli* K-12 strain. HeLa cells were infected either with HW1273 or non-invasive *E. coli* K-12 strain CC118 at the multiplicity of infection of 1 to 2000 preincubated with various combinations of Ipa proteins. After 30 min of incubation at 37°C, cells were washed with excess amount of PBS and further incubated in the medium containing 200 μg/mg of gentamicin for another 2 h. Cells were then washed and fixed with methanol followed by Giemsa staining. (a) shows results of invasion assay using various combination of uncleaved (-) or cleaved (+) IpaB, D and IpaC-Tag proteins at the concentration of 30 nM for IpaB, D and 0.2 nM for IpaC-Tag, respectively. HW1273 was also used as a positive control. (b) shows Giemsa staining of the invasion assays. HeLa cells were infected with: (1) HW1273; and (2) *E. coli* K-12 strain CC118 with Factor Xa cleaved 30 nM of IpaB, D and 0.2 nM of IpaC-Tag, respectively. Bars = 10 μm

に対する標準化プロトコール²⁵⁾や *Salmonella* Typhimurium に対する MLVA 試験法²⁶⁾が作成された。

(II) 赤痢菌の病原性に関する研究

細菌性赤痢は開発途上国を中心として世界で年間8,000万人の患者が発生していると推定されている²⁷⁾が、わが国では1990年代には1,000名前後であった患者数が徐々に減少し2011年以降は100~300名の患者数となっている。また、かつては輸入事例の方が国内事例よりも多かったが近年は国内事例が半数以上となっている。筆者は感染研に入所以来、赤痢菌の病原性に関する研究に従事してきたので、以下ではその概要について述べる。

細胞内寄生細菌である赤痢菌は、腸管上皮細胞に侵入し、取り込まれたファゴソームから脱出した後、上皮細胞内で分裂・増殖し上皮細胞のF-アクチンの凝集束を利用して運動することにより隣接細胞へ拡散して感染を拡大することが知られている。その病原性を担うIII型分泌装置(Mix-Spa)をはじめとした種々の病原因子は主に220 kbの病原性プラスミドにコードされており、III型分泌装置から分泌される多数のeffectorのなかに、In-

vasion plasmid antigen (Ipa)がある。赤痢菌の細胞侵入能にはこれらのIpaタンパク質が必須であることから、Ipaタンパク質の役割について調べた。マルトース binding proteinあるいはStrep-tagとIpaタンパク質のfusionタンパク質を大腸菌で発現させ、HeLa細胞への侵入能を調べた。マルトース binding proteinから切り離して精製したIpaタンパク質とマルトース binding proteinとのfusionタンパク質そのものを用いて、大腸菌K-12株とともにこれらのタンパク質をインキュベートすると、Ipaタンパク質B, C, Dが共存する場合に、赤痢菌の病原性プラスミドを保持したK-12株(HW1273)と比べると効率は下がるものの、細胞侵入能を獲得することが示され、Ipaタンパク質単独で細胞侵入能を付与できることが示された²⁸⁾(図8-a, 図8-b, 図9)。

赤痢菌の病原性プラスミドを大腸菌K-12株に保持させた組み換え大腸菌HW1273はHeLa細胞に対する侵入能を持つ。一方、病原性プラスミド上の細胞侵入能に必須の領域、すなわち、Mix-Spa, Ipaやこれらのeffector発現のpositive regulatorである、invE, virFなどをクローニングした約30-kbの領域(entry region; B)を持つ

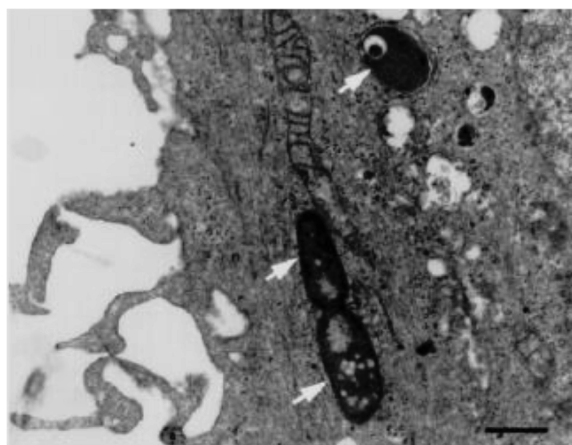


図9. Thin section electron micrograph of internalized bacteria within HeLa cells. HeLa cells were incubated with non-invasive *E. coli* K-12 strain CC118 at the multiplicity of infection of 1 to 2000 preincubated with various combinations of Ipa proteins at the concentration of approximately 60 nM of IpaB, D and 0.4 nM of IpaC-Tag. After 30 min of the infection period, cells were washed, treated with gentamicin and were observed under transmission electron microscopy after routine fixation and staining methods. Bars=0.5 μ m

組換え大腸菌 (B+virF) は、HeLa細胞への侵入能を持つものの、感染細胞の形態が大きく異なり、細胞質の退縮が観察される。感染細胞の形態の違いは赤痢菌の病原性発現において何らかの意味があると考え、病原性プラスミド上で違いを生じさせている遺伝子を探したところ、ospE2という遺伝子であることがわかった。OspE2タンパク質の役割について調べるため、赤痢菌の野生株からospE2遺伝子を脱落させ、HeLa細胞への細胞侵入能を調べてみると、ospE2遺伝子を欠損させた変異株ではB+virF株と同様の感染細胞像を示し、プラスミドでospE2遺伝子を相補すると野生株と同様の感染細胞像を示すことが明らかになった²⁹⁾。また、ospE2の positive regulatorである mxiE を欠損させた株でも ospE2 欠損株と同様の感染細胞像を示し細胞質の退縮 (rounding) が観察された。野生株及びそれぞれの変異株に感染した HeLa 細胞 300 個以上について、rounding 細胞の比率を計測すると、ospE2 及びその positive regulator mxiE の欠損により rounding した感染細胞、すなわち細胞質の退縮した感染細胞が増加していることが明らかとなった (図10)。赤痢菌は感染した腸管上皮細胞内で増殖し、隣接上皮細胞へ拡散して感染を拡大させる。ospE2 欠損株を用いて赤痢菌の感染細胞間拡散能力を調べるプラークアッセイを行ってみると、ospE2 欠損株は著しく細胞間拡散能力が低下しており、プラスミドで OspE2 を相補することで、野生株と同様の表現型に復帰した (図11)。したがって、OspE2 は赤痢菌の感染宿主細胞において感染宿主細胞の形態を維持する役割を担い、赤痢菌が感染宿主細胞から隣接する宿主細胞へ拡散するた

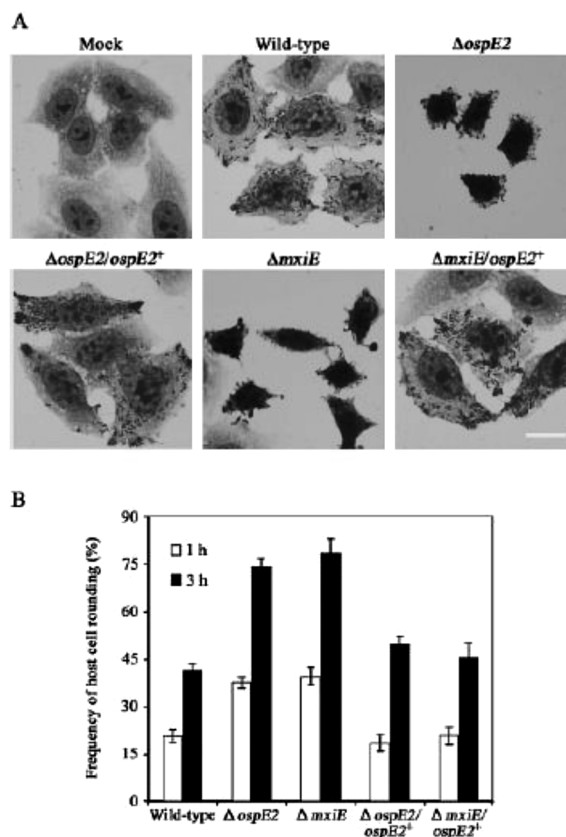


図10. Morphological changes in Hep2 cells after infection with *S. sonnei* ospE2 and mxiE mutants. (A) Hep2 cells were infected with *S. sonnei* HW506 (mock), MS390 (wild type), MS1303 (Δ ospE2), MS1303/pMM500 (Δ ospE2/ospE2⁺), MS1307 (Δ mxiE), or MS1307/pMM500 (Δ mxiE/ospE2⁺). After 3 h, cells were fixed with methanol and stained with Giemsa reagent. Scale bar, 10 μ m. (B) Frequency of host cell rounding (panel A) quantified. The frequency of rounding of mock-infected cells was less than 3% at both 1 and 3 h after infection. Error bars indicate standard deviations

めに必要な病原因子であることが推測された。

赤痢菌のOspE2タンパク質のアミノ酸配列をデータベース上で調べると、EHEC O157のEspO1-1タンパク質とEspO1-2タンパク質とのアミノ酸配列との類似性があることから、EHEC O157のEspO1-1及びEspO1-2は、赤痢菌のOspE2の機能的ホモログタンパク質であることが推測された。赤痢菌のOspE2タンパク質が関与する感染宿主細胞の形態維持のシステムは、III型分泌装置から様々なeffector分子を分泌して病原性を発揮する腸内細菌、EHEC O157、サルモネラ、シトロバクターにおいて広く保持されていることが示唆されており³⁰⁾、赤痢菌がOspE2タンパク質を介して感染宿主細胞内で惹起する分子機構の詳細も東大医科研の笹川らのグループによって明らかにされた³¹⁾。赤痢菌のOspE2のホモログであるEspO1-1とEspO1-2がEHEC O157感染時に同様な機能を果たすことが推定されたので、その分子論的なメカニズムの詳細について石原らが中心と

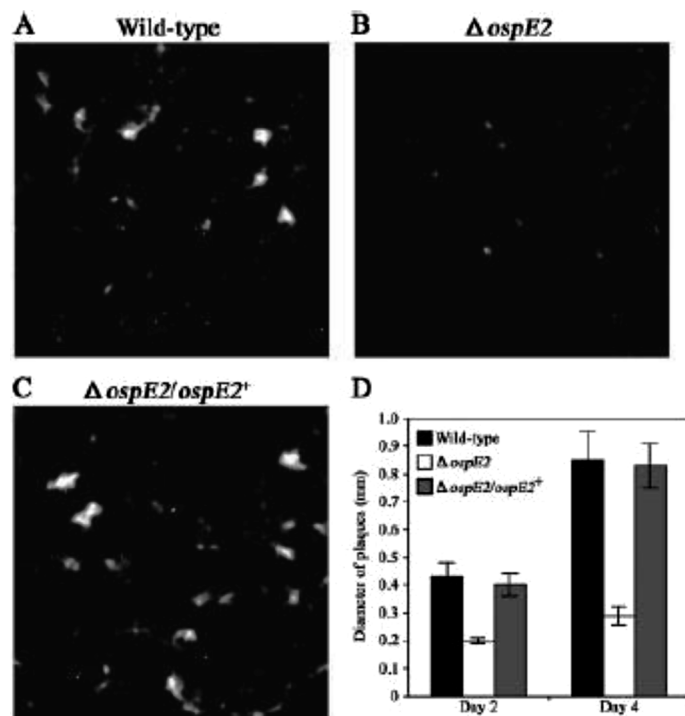


図11. Formation of small plaques in confluent monolayers of HEp2 cells after infection with the *S. sonnei* ΔospE2 mutant. Confluent monolayers of HEp2 cells were infected with *S. sonnei* MS390 (wild type) (A), MS1303 (ΔospE2) (B), or MM1303/pMM500 (ΔospE2/ospE2⁺) (C) and incubated for 2 h. After a wash, medium containing gentamicin was added and culturing was continued at 37°C. At 4 days after infection, monolayers were stained with Giemsa to observe plaque formation by bacterial spreading. (D) Values in the bar graph represent mean ± standard deviation diameter for a total of 150 plaques from three independent wells

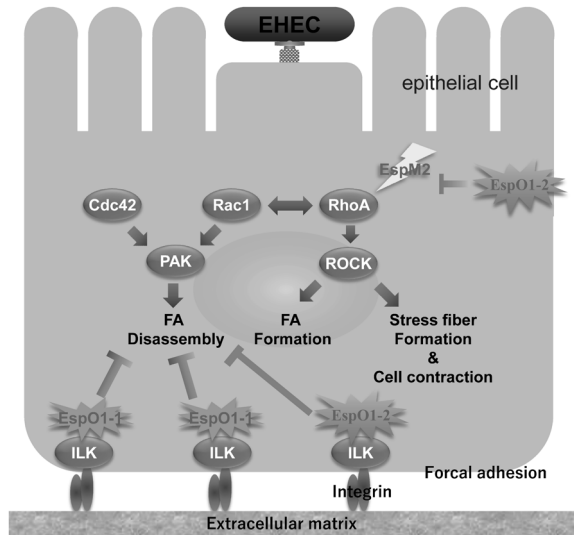


図12. EHEC感染細胞におけるEspO1-2の機能モデル
EspO1-2 interacts with EspM2 in EHEC-infected cells to suppress EspM2-enhanced host RhoA activity

なり調べた結果が図12のモデルとなる。

EHEC O157の持つEspO1-1は、赤痢菌のOspE2と同様に、感染細胞がIntegrin-linked kinase(ILK)を介して細胞外マトリックスと形成するFocal adhesionの安定化に貢献しており、EspO1-2は感染細胞質内に局在し、

EspM2というGuanin nucleotide exchange factorを介してRhoファミリーの低分子量GTP結合タンパク質である、RhoAを調節し、やはりFocal adhesionの安定化に貢献していることが示唆された³²⁾。

おわりに

厚生労働省の試験研究機関である感染研の在職中に行った研究成果を授賞対象の研究としていただいた。筆者が感染研に入所した当時は、世の中ではややもすると感染症、特に細菌感染症への関心が薄まる気配が漂っていたが、EHEC O157の集団発生等のいわゆる新興再興感染症の認識が広がるにつれて、細菌性食品由来感染症に対しても関心が高まりこの分野の研究活動も盛んとなった。筆者の研究分野においても同様で、食品由来感染症の発生原因究明には宿主、病原体及び感染経路の解明が必要になるが、探知される感染症の種類と数が増えるにつれ、一連の研究業務に携わる多数の研究者との共同作業が必要となった。受賞対象となった研究成果はこれらの多数の研究者との共同成果である。筆者が受賞するのはおこがましい気がするが、感染症制御に向けて地道に取り組みされている方々の代理としていただくこととしたい。あらゆるものがデジタル化された情報としてつながるネットワーク全盛の時代において、人と人のつながりが最も重要な要因であることを痛感しつつパルスネットワーク構築に携わった。多くの研究者と貴重な時間を共

有できたことに感謝の気持ちを持つとともに、関係諸氏の研究の益々の発展を期待したい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、筆者を感染研に研究員として採用していただいた渡辺治雄元感染研所長をはじめ、既に退職されておられるが、細菌第一部の中村明子氏、島田俊雄氏、故田村和満氏、故伊藤健一郎氏には筆者が入所した当時からご指導いただき、感謝申し上げます。また、亡くなられたお二方のご冥福をお祈りいたします。感染研の大西真副所長、泉谷秀昌氏、伊豫田淳氏、荒川英二氏、森田昌知氏、石原朋子氏、三戸部治郎氏（現：杏林大学）、退職された広瀬健二氏には、サルモネラ、赤痢菌と大腸菌の病原性解析と検査業務にわたり幅広く支援していただいた。上述の全ての研究成果はこれらの先生方との共同成果である。当時ポスドクの三浦雅史氏、Nurmohammad Shaikh氏には赤痢菌の病原性に関する研究、Yingxin Pei氏には、EHEC O157の分子疫学に関する研究を進めていただいた。

本研究結果の大半は、感染研が担う業務のなかで遂行したもので、使用した分離株は地方衛生研究所から送付していただいた株が中心である。全国の地方衛生研究所で対応いただいた担当諸氏に厚く御礼を申し上げたい。国衛研では、当時の小沼博隆氏、宮原美知子氏にカキの赤痢菌事例でご協力いただいた。奇しくも筆者は感染研から国衛研に異動したが、国衛研在職中は現部長の工藤由起子氏をはじめ、関係諸氏にご協力いただき職務を遂行できたことを感謝申し上げます。既に退職されたが神戸大学の大澤朗氏、当時大澤研におられた井口純氏（現：宮崎大学）には、腸炎ビブリオ、EHECでの共同研究、九州大学の林哲也氏は当時宮崎大学におられ、大岡唯祐氏（現：鹿児島大学）、小椋義俊氏（現：久留米大学）とともに、EHECのゲノムに係る研究でIS-printing systemをはじめとした多くの共同研究を遂行させていただいた。また、パルスネットアジアパシフィックの構築では、米国CDCのパルスネットの父といわれる、退職されたBala Swaminathan氏、現チーフのPeter Gerner-Smidt氏、香港CDCのKai-Man Kam氏（現：香港中文大学）、中華人民共和国CDCのJianguo Xu氏、インド共和国NICEDのT. Ramamurthy氏、台湾CDCのChien-Shun Chiou氏に多大なご協力をいただいた。ご協力いただいた多くの関係諸氏に厚く御礼を申し上げます。

最後に、筆者の研究を評価していただき学会賞に推薦してくださった三宅眞実氏（大阪府立大学）に深く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Terajima, J., Nakamura, A. and Watanabe, H.: Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* Enteritidis iso-

- lates in Japan by phage-typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol. Infect.*, **120**, 223-229 (1998).
- 2) Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornrunangwong, S., Terajima, J., Watanabe, H., Kaneko, K. and Ogawa, M.: Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from humans and broiler chickens in Thailand by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 971-974 (1998).
- 3) 食品安全委員会：食品健康影響評価のためのリスクプロファイル—鶏肉におけるサルモネラ属菌— (2012).
- 4) Centers for Disease Control and Prevention: Isolation of *E. coli* O157:H7 from sporadic cases of hemorrhagic colitis—United States. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **31**, 585 (1982).
- 5) 小林一寛, 原田七寛, 中務光人, 神野逸郎, 石井経康, 下辻常介, 田村和満, 坂崎利一. *Escherichia coli* O157:H7による出血性大腸炎の“さかのぼり調査”. *感染症学雑誌*, **59**, 1056-1060 (1985).
- 6) 城 宏輔：埼玉県某幼稚園で流行した *Escherichia coli* O157: H7による出血性大腸炎. *臨床と微生物*, **23**, 869-878 (1996).
- 7) Michino, H., Araki, K., Minami, S., Nakayama, T., Ejima, Y., Hiroe, K., Tanaka, H., Fujita, N., Usami, S., Yonekawa, M., Sadamoto, K., Takaya, S. and Sakai, N.: Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. Kaper, J. and O'Brien A., (Eds.) *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. p. 73-81 Washington: ASM Press, (1998).
- 8) Izumiya, H., Terajima, J., Wada, A., Inagaki, Y., Itoh, K. I., Tamura, K. and Watanabe, H.: Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1675-1680 (1997).
- 9) 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. *感染症学雑誌*, **76**, 842-848 (2002).
- 10) 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).
- 11) Ohnishi, M., Terajima, J., Kurokawa, K., Nakayama, K., Murata, T., Tamura, K., Ogura, Y., Watanabe, H. and Hayashi, T.: Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **99**, 17043-17048 (2002).
- 12) Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K. and Watanabe, H.: High genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan and its applicability for the detection of diffuse outbreak. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **55**, 19-22 (2002).
- 13) Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Mitobe, J., Miura, M. and Watanabe, H.: Effectiveness of pulsed-field gel electrophoresis for the early detection of diffuse outbreaks due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.*, **3**, 68-73 (2006).

- 14) 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. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **52**, 52-53 (1999).
- 15) Terajima, J., Izumiya, H., Wada, A., Tamura, K. and Watanabe, H.: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, **5**, 301-302 (1999).
- 16) Terajima, J., Izumiya, H., Wada, A., Tamura, K. and Watanabe, H.: Molecular epidemiological investigation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*, 99S-105S (2000).
- 17) Terajima, J.: 堺以後の日本におけるO157の発生動向. *日食微誌*, **24**, 74-79 (2007).
- 18) Ooka, T., Terajima, J., Kusumoto, M., Iguchi, A., Kurokawa, K., Ogura, Y., Asadulghani, M., Nakayama, K., Murase, K., Ohnishi, M., Iyoda, S., Watanabe, H. and Hayashi, T.: Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 2888-2894 (2009).
- 19) Pei, Y., Terajima, J., Saito, Y., Suzuki, R., Takai, N., Izumiya, H., Morita-Ishihara, T., Ohnishi, M., Miura, M., Iyoda, S., Mitobe, J., Wang, B. and Watanabe, H.: Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **61**, 58-64 (2008).
- 20) Izumiya, H., Pei, Y., Terajima, J., Ohnishi, M., Hayashi, T., Iyoda, S. and Watanabe, H.: New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol. Immunol.*, **54**, 569-577 (2010).
- 21) Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P., Ng, L. K., Lukinmaa, S., Kam, K. M., Rolando, S., Gutierrez, E. P. and Binsztein, N.: Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathog. Dis.*, **3**, 36-50 (2006).
- 22) Cooper, K. L., Luey, C. K., Bird, M., Terajima, J., Nair, G. B., Kam, K. M., Arakawa, E., Safa, A., Cheung, D. T., Law, C. P., Watanabe, H., Kubota, K., Swaminathan, B. and Ribot, E. M.: Development and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae*. *Foodborne Pathog. Dis.*, **3**, 51-58 (2006).
- 23) Terajima, J., Tosaka, N., Ueno, K., Nakashima, K., Kitsutani, P., Gaynor, M. K., Park, S. Y. and Watanabe, H.: *Shigella sonnei* outbreak among Japanese travelers returning from Hawaii. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **59**, 282-283 (2006).
- 24) Centers for Disease Control and Prevention. *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Ground Beef from a U.S. Military Installation—Okinawa, Japan, February 2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **54**, 40-42 (2005).
- 25) Kam, K. M., Luey, C. K., Parsons, M. B., Cooper, K. L., Nair, G. B., Alam, M., Islam, M. A., Cheung, D. T., Chu, Y. W., Ramamurthy, T., Pazhani, G. P., Bhattacharya, S. K., Watanabe, H., Terajima, J., Arakawa, E., Ratchtrachenchai, O. A., Huttayananont, S., Ribot, E. M., Gerner-Smidt, P., Swaminathan, B. and Vibrio parahaemolyticus PulseNet PFGE Protocol Working Group: Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study. *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 2766-2773 (2008).
- 26) Chiou, C. S., Hung, C. S., Torpdahl, M., Watanabe, H., Tung, S. K., Terajima, J., Liang, S. Y. and Wang, Y. W.: Development and evaluation of multilocus variable number tandem repeat analysis for fine typing and phylogenetic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *International journal of food microbiology* **142**: 67-73 (2010).
- 27) Organization, World Health: Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* I. Geneva, Switzerland, the WHO Document Production Services (2005).
- 28) Terajima, J., Moriishi, E., Kurata, T. and Watanabe, H.: Preincubation of recombinant Ipa proteins of *Shigella sonnei* promotes entry of non-invasive *Escherichia coli* into HeLa cells. *Microb. Pathog.*, **27**, 223-230 (1999).
- 29) Miura, M., Terajima, J., Izumiya, H., Mitobe, J., Komano, T. and Watanabe, H.: OspE2 of *Shigella sonnei* is required for the maintenance of cell architecture of bacterium-infected cells. *Infect. Immun.*, **74**, 2587-2595 (2006).
- 30) Tobe, T., Beatson, S. A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C. M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O., Frankel, G., Hayashi, T. and Pallen, M. J.: An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **103**, 14941-14946 (2006).
- 31) Kim, M., Ogawa, M., Fujita, Y., Yoshikawa, Y., Nagai, T., Koyama, T., Nagai, S., Lange, A., Fassler, R. and Sasakawa, C.: Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. *Nature*, **459**, 578-582 (2009).
- 32) Morita-Ishihara, T., Miura, M., Iyoda, S., Izumiya, H., Watanabe, H., Ohnishi, M. and Terajima, J.: EspO1-2 regulates EspM2-mediated RhoA activity to stabilize formation of focal adhesions in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected host cells. *PLoS One*, **8**, e55960 (2013).