

調理施設における食中毒菌伝播動態の遺伝子多型解析

2004 年

学位論文：博士(農学) 甲346

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学

(岐阜大学)

岸 本 満

目次

序章	8
0-1 食の安全とリスク評価	8
0-2 微生物学的リスク評価	9
0-3 調理過程における二次汚染研究	10
0-4 食品汚染細菌の検出と遺伝子多型解析	13
0-5 <i>S. aureus</i> の汚染および伝播実態の解析	15
0-6 本研究の目的	17
第1章 調理過程における細菌の伝播	19
1-1 緒言	19
1-2 手指を介した大腸菌の食品への伝播 (手指による食品汚染モデル)	19
1-2-1 実験材料及び実験方法	19
1-2-1-1 被験者の手指菌数測定	
1-2-1-2 接種菌液の接種	
1-2-1-3 対象食品と接触操作	
1-2-1-4 菌数測定	
1-2-1-5 データ解析	
1-2-2 実験結果	22
1-2-2-1 菌数及び移行率	
1-2-2-2 データ解析	
1-2-3 考察	26

1-3 食材由来菌の手指への伝播（食品による手指汚染）	27
1-3-1 実験材料及び実験方法	27
1-3-1-1 食品による手指汚染	
1-3-1-2 グローブジュース法	
1-3-1-2-1 食品接触前手指	
1-3-1-2-2 食品接触後手指	
1-3-1-3 菌数測定	
1-3-1-4 細菌移行率計算	
1-3-2 実験結果	29
1-3-2-1 食品および手指の菌数	
1-3-3 考察	31

第2章 調理施設から採取された

黄色ブドウ球菌 (<i>S. aureus</i>) の遺伝子多型解析	34
2-1 緒言	34
2-2 一般調理施設（1）	35
2-2-1 実験材料及び実験方法	35
2-2-1-1 菌の採取	
2-2-1-2 <i>S. aureus</i> の同定	
2-2-1-3 リボタイピング	
2-2-1-3-1 全自動リボタイピング	
2-2-1-3-2 系統樹解析	
2-2-1-4 BSFGE 法	
2-2-1-5 PFGE 法	

2-2-1-6	RAPD 法	
2-2-1-6-1	ゲノム DNA の調製	
2-2-1-6-2	PCR 反応	
2-2-1-6-3	再現性試験	
2-2-2	実験結果	40
2-2-2-1	菌の採取・同定	
2-2-2-2	リボタイピング	
2-2-2-2-1	リボタイピング	
2-2-2-2-2	系統樹	
2-2-2-3	BSFGE 法	
2-2-2-4	PFGE 法	
2-2-2-5	RAPD 法	
2-2-3	考察	52
2-2-3-1	<i>S. aureus</i> の検出・同定	
2-2-3-2	リボタイピング	
2-2-3-3	BSFGE 法, PFGE 法および RAPD 法	
2-3-4	まとめ	60
2-3	一般調理施設 (2) および大量調理施設	63
2-3-1	実験材料及び実験方法	63
2-3-1-1	菌の採取	
2-3-1-1-1	一般調理施設 (2)	
2-3-1-1-2	大量調理施設	
2-3-1-2	<i>S. aureus</i> の同定	
2-3-1-3	RAPD 法	

2-3-1-4	BSFGE 法	
2-3-2	実験結果	64
2-3-2-1	一般調理施設 (2)	
2-3-2-1-1	菌の採取・同定	
2-3-2-1-2	RAPD 法	
2-3-2-1-3	BSFGE 法	
2-3-2-2	大量調理施設	
2-3-2-2-1	菌の採取・同定	
2-3-2-2-2	RAPD 法	
2-3-2-2-3	BSFGE 法	
2-3-3	考察	70
2-3-3-1	一般調理施設 (2)	
2-3-3-2	大量調理施設	
2-3-4	まとめ	74
終章		76
3-1	調理施設の微生物学的リスク評価	76
3-2	調理過程における細菌の伝播	78
3-2-1	手指を介した食品への伝播	78
3-2-2	食材由来菌の手指への伝播	79
3-3	<i>S. aureus</i> の伝播と汚染源	81
3-4	<i>S. aureus</i> の遺伝子多型解析	82
3-5	結論	85

謝辭 · · · · · 86

参考文献 · · · · · 87

略 語 表

ARDRA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

BSE : Bovine Spongiform Encephalopathy

BSFGE : Biased Sinusoidal Field Gel Electrophoresis

CCFH : Codex Committee on Food Hygiene

CHEF : Contour - clamped Homogeneous Electric Field gel electrophoresis

CNS : Coagulase Negative *Staphylococcus*

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point system

IS : Insertion Sequence

MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis

WHO : World Health Organization

MLST : Multilocus Sequence Typing

MRSA : Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

NJ : Neighbor-Joining

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Q-Q plot : Quantile-Quantile plot

RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RPLA : Reversed Passive Latex Agglutination

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SCD: Soybean Casein Digest

SRSV: Small Round Structured Virus

TSB : Trypticase Soy Broth

UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

序章

0-1 食の安全とリスク評価

近年、腸管出血性大腸菌 0157 (*Escherichia coli* 0157:H7) や黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*; 以下 *S. aureus*) 毒素による大型食中毒事故が相次いでいる。また、BSE (bovine spongiform encephalopathy; 牛海綿状脳症) の国内発生などから食の安全に対する国民の関心は、以前に増して高くなっている。食の安全には絶対はなく、リスクの存在を前提に科学的に検討、評価し、その結果に基づいて安全に対する規制や指導を行っていくことが重要であると考えられている⁵⁵⁾。

わが国では食品安全基本法が 2003 年 5 月 16 日に成立、5 月 23 日に交付、そして 7 月 1 日に施行された。この法律は、国民の健康の保護が最も重要であるという基本的認識の下に、食品供給行程の各段階において国際的動向および国民の意見に配慮しつつ、科学的知見にもとづいて食品の安全性を確保するために必要な措置を講じることを基本理念としている⁵⁵⁾。

法律の施行と同時に設置された内閣府食品安全委員会は食品に関するリスク評価（食品健康影響評価）を行う各種専門調査会を設置した。この場合のリスク評価（Risk Assessment）とは食品中に含まれるハザード（危害要因）を摂取することによって、どの位の確率で、どの程度の健康への悪影響が及ぼされるかを科学的に評価することである。

リスク評価は総合的な危害対応システムとしてのリスク分析（Risk Analysis）を構成する 1 つの要素である。リスク分析は「リスク評価」と、リスク評価に基づいて施策を実行する「リスク管理（Risk Management）」と、さらに消費者を含め関連するすべての人たちとの間で情報・意見の交換を行う「リ

リスクコミュニケーション (Risk Communication)」の3つの要素からなる。リスク分析ではまず、事故が起きる前に有害性や危険性の程度やその起きる可能性を予測、判断して対策をたてる。次に、不都合なことが起こる可能性とその性質、規模、確率を含めて科学的なデータを総合して論理的な仮説を立ててリスクを事前に予測する。さらに、その予測結果に基づき、予想される被害の大きさと重さに対応して、経済的、技術的な手段を検討し、討論を経て政策を決めて実行する⁶⁰⁾。

食品の安全性に関するリスク分析とは生産から食卓にいたるすべての段階において健康に有害な影響を及ぼす恐れのある要因（微生物学的リスク、物理的リスク、化学的リスクなど）を的確にチェックし、その軽減を図る一貫した予防のための対策である。すなわち、ある集団が特定の有害事象にさらされる可能性がある場合にその状況をコントロールするプロセス全般を指しているともいえる⁶⁰⁾。

0-2 微生物学的リスク評価

食品衛生分野の中でも物理的および化学的なリスク分析は、多くの経験やデータの積み重ねの結果、高いレベルにある。しかし、食品の微生物学的リスク分析は、そのリスク評価の段階で、まだ発展途上にある。食品中の微生物は環境条件により劇的にその数が増減するため、定量的把握が難しく、高い精度での量的な予測が非常に難しいことが要因である²⁶⁾。

1999年、FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations ; 国連食料農業機構) と WHO (World Health Organization ; 世界保健機構) の合同食品規格委員会であるコーデックス委員会 (The Codex alimentarius commission) の食品衛生部会 (Codex Committee on Food Hygiene ; CCFH) によ

って微生物学的リスク評価のための一般原則とガイドライン (Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment, CAC/GL-30 (1999)) が発表された⁷⁵⁾。

これを機に、国際的に微生物学的リスク評価の専門家委員会の活動がスタートした。ガイドラインによると微生物学的リスク評価の基本的枠組みとして、「危害原因の確認 (Hazard Identification)」、「暴露評価 (Exposure Assessment)」、「危害特性の評価 (Hazard Characterization)」そして「危害の特徴究明 (Risk Characterization)」の4作業段階が定義されている。このうち、「暴露評価」では当該食品の収穫から調理、消費者の口に入るまでの食品チェーン全過程の各段階での汚染菌数と汚染頻度を分析する。その結果として汚染された食品を介して口に入る微生物の個数を推定する²⁶⁾。

「暴露評価」の目的は人がどれだけ微生物に暴露されるかを明らかにすることである。調理過程は食品チェーンにおける最終段階であり、この段階における汚染菌数と汚染頻度のデータは微生物学的リスク評価に大きな影響を与える²⁴⁾。また、わが国で頻発する食中毒事故は調理過程で起こる二次汚染が原因であることが多い。食品由来細菌の二次汚染に関する研究は、食品の微生物的リスク評価に有用な情報を提供できる。特に手や容器・器具への細菌の移行実態、細菌移行量 (移行率)、移行の変動要素等に係わる情報がリスク評価のためのデータとして望まれている²⁴⁾。

0-3 調理過程における二次汚染研究

肉、魚、野菜等の生鮮食品は細菌とともに調理施設に搬入され、取り扱う人の手指、器具、容器、設備など接触するものすべてが細菌の伝達物 (キャリア) になる。特に人の手は施設に広範に、そして頻度も高く細菌を伝播させるので、

手洗いやグローブの着用などが奨励されている¹⁷⁾。また、細菌によって汚染された調理台、まな板・布巾等の器具・容器、設備・装置、調理環境等は十分な洗浄殺菌を行なうことで二次汚染を防止することができる。

二次汚染防止のための手洗いや洗浄殺菌のマニュアルを策定する際には、調理現場における食品由来細菌の挙動把握が不可欠である。そこで、外食業、中食（惣菜・弁当）業、フードサービス業においてはさまざまなリスクを消滅または低減させるために、一般的衛生管理をはじめ HACCP（Hazard Analysis Critical Control Point system）等の管理方式を導入している。特に病院、学校、乳幼児施設、老人施設における大量調理は細菌感染に対する抵抗性の低い喫食者が対象となるのでより綿密な衛生管理が要求される。

一方、調理は日常的な行為であり、安全性はもちろん、栄養性、嗜好性、経済性などの要素を満たしたものでなければならない。過度な衛生管理は調理者に負担を強いるばかりか、栄養面、嗜好面、経済面などで喫食者の満足が得られない可能性もある。衛生管理者には適正な微生物制御を行うための適正な情報が提供されるべきである。

しかし、調理過程における微生物の二次汚染に関する報告は少ない²³⁾。これまで、作業者の手指、まな板、蛇口カラン、食品表面、布（布巾）間で細菌が伝播することがモデル実験で明らかにされている^{8, 41, 42, 56, 77)}。Humphrey ら¹⁹⁾はサルモネラ菌（*Salmonella enteritidis* PT4）で汚染された鶏卵を用いた実験で、調理操作により菌が人の手指、調理器具そして調理環境に伝播したことを明らかにした。Zhao ら⁷⁷⁾は交叉汚染の存在と厨房での汚染除去法実施の効果を調べる実験モデル法を開発した。指標菌としたナリジクス酸耐性アエロゲネス菌（*Enterobacter aerogenes*）を汚染させた鶏肉を、殺菌したまな板上で小片に切り、鶏肉からまな板へ、及びその後のまな板から野菜への交叉汚染の程

度を調べた。そして、ふきとり法による検査の結果、まな板、手指及び野菜に相当量の菌数が交叉汚染することを確認した。次に、Chen ら³⁾は調理操作中の手指とそれ以外の表面との間における細菌移行率を調べた。交差汚染を調べる微生物としてアエロゲネス菌 (*E. aerogenes*) を用い、30 名以上の被験者による交差汚染率の統計的分布を調べたところ、手、食品及び厨房表面間の移行率は 0.0005%未満～100%以上と、非常に高い変動があった。さらに、食品から手指、まな板からレタス、蛇口カランから手指、手指からレタス、洗浄前の手指から洗浄後の手指及び手指から蛇口カランへの移行の正規分布の平均±標準偏差を求めた。また、Montville ら⁴²⁾は同様にアエロゲネス菌 (*E. aerogenes*) を用い、食品取扱い用手袋を使用した場合の細菌の移動を検討した。鶏肉から手へ、鶏肉から手袋を通して手へ、手からレタスへ、高濃度または低濃度で菌を接種した手から手袋を通してレタスへの細菌移動率を測定した。多くの種類の手袋は、細菌を通過させた。

これらの研究は調理の各種段階で発生する二次汚染について暴露評価したもので、厨房におけるリスク評価のための科学的基礎情報を提供したものと見える。

一方、調理過程での二次汚染が原因の食中毒を疫学的に明らかにした調査報告はわが国の「平成 10 年 食中毒の統計と情報⁴⁷⁾」等の事件報告書に多数みられるが、これは各調理施設における食品サンプルの検体保存が原因調査に大きく寄与している。わが国だけにあるこのシステムのおかげで、貴重なデータの蓄積がなされているといえる²⁵⁾。米国の事例としては、Roels ら⁴⁴⁾がカンピロバクター (*Campylobacter jejuni* 0:33) による食中毒事件について、原因食品がツナサラダであると特定し、汚染は食品を取り扱った人の手、または、何かの表面を介して別の食品から二次汚染があったと推測、報告している。

0-4 食品汚染細菌の検出と遺伝子多型解析

調理過程におけるリスク評価を的確に行うためにはまず、食品に付着または二次汚染して、増殖ないし毒素を産生する衛生細菌の存在を具体的に明らかにする必要がある。そして、さらにその汚染経路や原因（起源）を追跡するための有効な道具が必要である。とりわけ、食中毒発生時には患者の糞便や原因と推定された食品から病原体を分離、同定し、汚染源や汚染経路を究明して疾病の拡大および再発を阻止することが求められる。

これまで細菌同定は形態学的な試験、生理学的な試験を基礎に行なわれてきた。これらの試験ではしばしば正確な同定ができないこと、識別能が低いこと、そして時間がかかることなどが問題であった。そこで、従来の表現型による同定法に代わり簡易、迅速でかつ特異性と検出感度に優れた検出法の開発と普及が進められてきた⁶⁶⁾。

遺伝子多型解析法は表現型による同定法より優れた方法であるとされる。DNAの核酸の塩基配列は細胞の環境状況により影響を受けない。すなわち、成長（増殖）中でもこの塩基配列は変化がない⁴⁶⁾。そこで、疫学調査や汚染原因菌調査でも遺伝子多型解析法が用いられるようになった。例えば、院内感染原因菌として問題になるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA; Methicillin-resistant *S. aureus*）の疫学的研究に多くの報告がある^{4, 5, 27, 29, 52, 57, 67)}。

腸管出血性大腸菌 0157 (*E. coli* 0157:H7) による事例ではパルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-field Gel Electrophoresis; 以下 PFGE 法) または RAPD-PCR 法 (Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis-PCR; 以下 RAPD 法) などの遺伝子工学的手法が疫学調査に用いられ、従来の試験法では考えられないほどの詳細な情報が得られ、感染源の追求に大きな威力を発揮した⁷⁶⁾。このように、遺伝子多型解析法は、細菌の同定、特異的検出法として有効で属から株レベ

ルまでの判別ができ、汚染源や汚染経路の特定に役立つといえる。

細菌の遺伝子多型解析法には PFGE 法^{15, 52, 57, 61)}、リボタイピング法^{7, 15, 51)}、RAPD 法^{4, 10, 57)}、Multilocus Sequence Typing (MLST) 法^{11, 71)}、Insertion Sequence (IS) タイピング法^{9, 74)}、Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) 法¹²⁾などがある。

このうち、PFGE 法による食中毒菌の型別解析に関する報告が近年増えている。甲斐ら²²⁾は腸管出血性大腸菌 0157 (*E. coli* 0157:H7) 感染症の感染経路、あるいは汚染源を明らかにするために、集団下痢症や散発下痢症から分離された菌株を対象に、PFGE 法を利用して遺伝子解析する分子疫学的方法を確立した。また、矢野ら⁷⁶⁾は腸管出血性大腸菌 0-157 (*E. coli* 0157:H7) の疫学解析での利用を提案し、その手法の標準化と画像診断を基礎とした分散型システム (0157 のパルスネット) の有効性を示した。中谷ら⁴⁵⁾は、食鳥処理場由来サルモネラ菌 (*Salmonella infantis*) の菌株間の相互関係を薬剤感受性試験及び PFGE 法を用いて食中毒原因細菌の解析を試み、PFGE 型別と薬剤感受性試験の結果の差異を考察した。

PFGE 法は泳動原理別に 7 つに分類される³⁵⁾ がその中でも特に CHEF (Contour-clamped Homogeneous Electric Field) gel electrophoresis 法 (以下 CHEF 法) による研究報告やデータが多数蓄積されてきた。一方、PFGE 法の中でもバイアス正弦電場ゲル電気泳動法 (Biased Sinusoidal Field Gel Electrophoresis; 以下 BSFGE 法)³²⁾ は分画分子量対応範囲が広く (500bp~3Mb)、泳動条件の設定により通常の DNA 制限酵素断片 (数百 bp~数十 kb) の分離から細菌の制限酵素断片長多型 (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism) (数 kb~数百 kb)、酵母染色体 (~数 Mb) の泳動などに利用できることが特徴である。BSFGE 法は装置の普及や研究データの蓄積といった実

績の点では CHEF 法より劣るが汎用性や操作性、そして価格の点で優れている。

リボタイピング法³¹⁾は約 8 時間で自動的に型別できる装置の登場により、細菌の同定や汚染源の解明が容易になった^{6, 73)}。リボタイピング法は細菌の染色体上に数箇所あるリボソーム RNA をコードしている遺伝子を指標として RFLP 解析を行う方法である。リボタイピング法はリボソーム RNA 遺伝子をプローブとして用いてリボソーム RNA 遺伝子と隣接する染色体 DNA の多型性を検出する。リボソーム RNA 遺伝子は異なる菌種間ではその塩基配列は異なるが、同一の菌種内では非常に均一であるので、リボソーム RNA の制限酵素切断部位も菌種内で保存されている。しかし、リボソーム RNA 遺伝子と隣接する染色体 DNA 部位を含む DNA 断片は突然変異、DNA 断片の欠失や挿入などにより変化している可能性がある。したがって、DNA 断片は同一菌種間でも異なる大きさとなり多型性を示すことになる。

一方、RAPD 法は PFGE 法やリボタイピング法に対し、専用の装置や時間を必要とせず、食中毒原因性細菌の迅速検出あるいは疫学解析には有効な試験方法であると考えられ、多くの検査室で利用されるようになってきた³⁸⁾。Stranden ら⁶⁴⁾は迅速性において散発、流行の食中毒事件に対応できるのは PCR 法であり、PFGE 法は遅いと指摘し、6 つのプライマーを用いて MRSA 75 株を 41 に型別した。また、Pereira ら⁵³⁾はヒトおよびウシ由来の黄色ブドウ球菌を RAPD 法及びリボタイピング PCR 法を用いて型別し、ウシ及び病院起源の分離株を特性化した。しかし、RAPD 法は再現性に問題があるともいわれ、分析手法の標準化は未だなされていないので、この点の整備が急がれる⁵⁷⁾。

0-5 *S. aureus* の汚染および伝播実態の解析

わが国における *S. aureus* 食中毒発生件数は個人衛生管理や施設設備の改善

等がすすみ減少の傾向にある。しかし、加工乳を原因食品とするこの菌による大規模な事件（患者数 14780 人）が 2000 年に発生し²⁾、この菌が食品衛生上重要な食中毒菌であることが広く国民に再認識されることとなった。

食中毒事件の原因食品にはおにぎり等の穀類およびその加工品が多く、次いで惣菜など複合調理食品、菓子類、弁当などとなっている^{49, 70)}。機械化・自動化により、おにぎりによる本菌食中毒の発生件数が減少した²⁰⁾が、手作業工程の比較的多い調理済食品、菓子類の製造・加工・販売において、手指や器具・機械からの *S. aureus* 汚染を確実に遮断することが求められている。これらの食品の製造・加工は比較的小規模な調理施設で行われていることが多く、調理施設における汚染実態、伝播実態を把握しておくことは汚染防止対策上極めて重要である⁷²⁾。仕出し弁当従事者の手指からの *S. aureus* の検出率はともに 17% 前後で鼻前庭からの検出率は 17% ないし 30% であった²⁸⁾。Acco ら¹⁾は 47 人の食品作業者の前鼻孔から試料を採取したところ、約 30% から *S. aureus* が検出された。また、同定、単離した菌を型別したところ 14 人の保菌者の中の 11 人が複数種類の菌を保菌していた。これらの結果から、疫学および食品汚染源の探索では作業者ごとに原因菌種を同定すべきであると提案している。

これまで、*S. aureus* の汚染経路の解明にはコアグララーゼ型、エンテロトキシン型などが利用されてきた⁵⁰⁾。食品中の *S. aureus* 検査は分離、増菌培養後、生理生化学的な特性を利用した同定キットにより菌を同定し、逆受身ラテックス凝集反応 (RPLA : Reversed Passive Latex Agglutination) 法または酵素結合免疫測定 (ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 法によりエンテロトキシン型およびコアグララーゼ型を検出、型別する⁵⁰⁾。しかし、近年遺伝子多型解析法を用いた新しい食品微生物検査法が次々と開発され⁶⁵⁾、PCR 法や PFGE 法による同定、検出が多く利用されるようになった。食品中の MRSA を PFGE 法

により検出した報告もある⁴⁴⁾。また、最近、エンテロトキシン型はエンテロトキシン遺伝子を検出するプライマーセット（特殊細菌検出用 Primer Set、TaKaRa 製）を用いた PCR 法で型別が開発され、上田ら⁶⁸⁾はこのプライマーセットによる PCR 反応条件等の検討を行った。

0-6 本研究の目的

S. aureus は人の生活環境に普遍的に存在し、健康人の喉や鼻粘膜、皮膚、毛髪、腸管などに分布する。そのため、人がこの菌による食中毒の感染源となる場合がある。特に傷口や皮膚炎症状の場所には *S. aureus* が高率に存在するので、手作業の多い調理業務では手指に傷のある従事者の業務禁止や手袋の着用を義務付ける規則を設けている。調理施設で発生したこの菌による食中毒事故はこのような規則を守らない、従事者が十分な手洗いをしない、または手袋の着用を怠るなどが原因している。

S. aureus 等の有害細菌は調理過程で従事者の手指から食品に伝播する。有害細菌の伝播実態を明らかにすることは食中毒予防に重要な情報を提供する。すなわち、調理過程でどれくらいの割合で細菌が伝播し、どのような調理操作で細菌が伝播していくかが予測されれば的確で効率的な対策を講じることが可能となる。しかし、調理過程における手指を介した二次汚染の実態に関する研究は少なく²³⁾、微生物学的リスク評価のための科学的データは世界的に不足している。とりわけ暴露評価（汚染菌数や汚染頻度の分析）に関する報告は少ない²⁵⁾。そこで、本研究は手指を介した細菌の伝播率を明らかにすること、そして食中毒菌の伝播実態の解析技術を開発することを目標とした。本研究は食品調理段階での二次汚染リスクの定量と伝播解析技術法の開発により、家庭及び食品サービス厨房におけるリスク管理実施のための科学的基礎を提供するもの

である。

はじめに、調理過程における細菌伝播の数量的解析を行った。この実験は微生物学的リスク評価における「暴露評価」に該当し、調理操作による細菌の伝播率（汚染菌数）を明らかにすることが目的であった。

次に、調理施設等から採取した *S. aureus* の遺伝子多型解析を行い、この菌による伝播実態の推定をした。この取り組みは疫学調査や汚染実態調査に有用な解析技術を開発、提案することが目的である。衛生管理者は危機管理上、迅速な対応が求められる。RAPD 法は簡便に短時間で遺伝子多型解析が可能な方法であるが、その再現性や解析能が劣るとされてきた。そこで PFGE 法等と同等の精度で解析可能な RAPD 法を確立し、その解析能を実証することを目標とした。

第 1 章 調理過程における細菌の伝播

1-1 緒言

調理過程における細菌の二次汚染の実態理解に関する研究は、食品の微生物的リスク評価に有用な情報を提供する。二次汚染に関する定量的データは不足しており²⁴⁾、具体的には作業者の手指、器具、容器、設備等表面への細菌の伝播実態と移行率を伝播経路ごとに明らかにする必要がある。

細菌によって汚染された器具・容器、設備・装置等は十分な洗浄殺菌を行なうことで二次汚染を防止することができる。しかし、手指はつかむ、握る、押さえるなど動作により食品と接触して細菌を伝播させるため、手指による食品汚染は防止しにくい。したがって、二次汚染防止を目的としたリスク分析において、手指を介した細菌の移行実態、移行率の変動要素等のリスク評価データの取得が必要となる。しかし、作業者の手指を介した細菌の伝播実態と移行率に関するデータは非常に少ない。本研究では、調理過程の二次汚染のうち、手指を介した細菌の伝播実態を解析するためにモデル実験を行った。本実験の目的は、調理操作中の手指から食品に移行する細菌の伝播量（移行率）を明らかにすること、また食品由来細菌の手指への伝播量（移行率）を明らかにすることであった。

1-2 手指を介した大腸菌の食品への伝播（手指による食品汚染モデル）

1-2-1 実験材料及び実験方法

1-2-1-1 被験者の手指菌数測定

被験者 48 名（名古屋栄養専門学校学生男子 6 名および女子 42 名、19～25 歳）は実験開始時に両手指を水でぬらし、薬用手洗い剤（「薬用 C&C」；花王（株）製）を約 1ml（ポンプ式容器 1 回分使用量）手にとり 30 秒間もみ洗いし、30 秒間水道水流水で

すすぎ、ペーパータオルで水分をふき取った。次いで、アルコール（アルペット；サラヤ(株)製）を両手に各1回ずつ噴霧し、両手をよくこすって、乾燥させた後、グローブジューズ法³⁾で食品接触前の手指の大腸菌数を測定した。

手洗い後すみやかに被験者は滅菌済み天然ゴムラテックス製の手術用ゴム手袋（パウダーフリー；三興化学工業(株)）を右手に装着した。その手袋にサンプリング液（1.00%リン酸二ナトリウム（片山化学）、0.04%リン酸一カリウム（片山化学）、0.18%TritonX-100（片山化学））18ml および中和剤（5%レシチン（シグマアルドリッチジャパン）、16.7%ルブロールPX（ナカライテスク）、4.2%Tween80（シグマアルドリッチジャパン）、3.3%チオ硫酸ナトリウム（シグマアルドリッチジャパン））2ml を入れ、液を手袋全体になじませ、手袋の上から60秒間マッサージを行った。すなわち、各指を2秒、指の間を2秒、ただし親指と人差し指の間は4秒、手のひらを10秒、甲を10秒マッサージした後、再度各指、指の間を同様に行った。このとき、被験者は左手で手首部を握って手袋から液が出ないようにした。時間測定は電子メトロノームを使用した。マッサージ終了後、静かに手を抜き取り、手袋をよくもみ、手袋内のサンプリング液を均一にし、滅菌試験管に採取、これを菌数測定まで氷中で保存した。

1-2-1-2 接種菌液の接種

非病原性大腸菌（*E. coli* JCM1649 株 国立感染症研究所より供与）は 10^6 個程度が片手に接種されるように調製した。すなわち、TSB培地で一夜培養し100倍希釈した菌液（接種菌液）を0.4mlずつ左右各手に接種した。被験者は均一にかつ指先まで広げるためにまず、右手のひらに0.4ml1滴下させ左手の2本の指（人差し指と中指）で手のひらに広げさらに5本の指に広げた。その後、左手の手のひらに0.4ml1滴下させ同様に広げて、両手のひらをこすりあわせた。接種菌液は段階希釈

し菌数を計測した。

1-2-1-3 対象食品と接触操作

被験者のうち半数の24名は生食用マグロ、残りの24名はカットキャベツを通常の調理操作を想定した方法で取り扱い、大腸菌の食品への移行量を測定した。

生食用マグロについては名古屋市内魚介類専門卸業者から冷凍品を購入した。これを8~10cm長の棒状(約25g)に無菌的に切り分け、凍結保存し、試験当日、自然解凍した。被験者は刺身調製の際の取り扱いを想定して右手で2秒間マグロを握った。カットキャベツは市内業者より袋入り(1kg)を試験当日購入した。被験者はサラダを盛り付ける操作を想定し、15~20gのカットキャベツを手指で掴み取り、数回にかけて滅菌シャーレに移す操作を行った。マグロおよびカットキャベツは接触操作後菌数測定までの間、氷水中に保存した。なお、対照の両食品は接触サンプルと同様に取り扱って同時に菌数計測した。

1-2-1-4 菌数測定

被験者の実験前手指菌液、接種菌液、対象食品、接触した食品の大腸菌数の測定は各試料菌液を段階希釈しコンパクトドライ「ニッスイ」EC(日水製薬株)で培養、計測した。これに各段階希釈液を1ml添加し35±2℃、48時間培養後発育した集落(コロニー)を計測した。

1-2-1-5 データ解析

菌の移行率は次式にしたがって算出した。

$$\text{移行率 } r (\%) = L_F / L_H \times 100$$

L_F ; 食品の大腸菌 (CFU)

L_H; 接種大腸菌数/片手 (CFU)

統計解析は被験者 24 名が握ったマグロ、および 24 名がつかんだキャベツの大腸菌数の対数値を用いた。被験者の手指に接種した大腸菌（一定量）の食品への移行菌数の対数を統計量とした。統計解析ソフト SPSS Ver. 10.0J (SPSS Japan Inc.) を用い、記述統計量、正規 Q-Q プロット図を作成した。なお、移行菌数が自然現象であることを保障するために正規性の検定を行った。正規性の検定には、Montville ら³⁹⁾に準じ Kolmogorov-Smirnoff 検定および Shapiro-wilks 検定を用いた。また、2 群における移行菌数の母平均値の差を検定するために t 検定を行った。

1-2-2 実験結果

1-2-2-1 菌数及び移行率

大腸菌接種前の 48 名の被験者手指から大腸菌は検出されなかった。また、接種菌液の大腸菌数は $6.80 \log_{10} \text{CFU/片手}$ (平均値) であった。被験者が接触した食品から検出された大腸菌総数および菌の移行率を Table 1-1 に示している。

マグロの場合、食品の大腸菌数は $3.63 \sim 5.60 \log_{10} \text{CFU/食品}$ で、キャベツは $0 \sim 5.38 \log_{10} \text{CFU/食品}$ であった。移行率はマグロの場合、 $0.07\% \sim 6.21\%$ (中央値; 0.66%)、キャベツでは $0.00\% \sim 3.75\%$ (中央値; 0.40%) の間に分布した。

1-2-2-2 データ解析

Table 1-2 に手からマグロおよびキャベツに移行した菌数(対数変換値)に関する記述統計量を示している。正規性を検定したところ、マグロへの移行菌数には正規性が認められ (Kolmogorov-Smirnoff 検定: $p = 0.20 > 0.05$ 、Shapiro-wilks 検定: $p = 0.477 > 0.05$)、キャベツで正規性が棄却された (Kolmogorov-Smirnoff 検定: $p = 0.00 < 0.05$ 、Shapiro-wilks 検定: $p = 0.01 < 0.05$)。

Table1-1 *E. coli* (JCM1649) isolated from foods when volunteers touched with inoculated hand

Foods		Tuna		Cabbage			
Volunteers ID	CFU/food	Log10 (CFU) /food	Transfer rate (%)	Volunteers ID	CFU/food	Log10 (CFU) /food	Transfer rate (%)
H1	28,250	4.45	0.44	H25	1,610	3.21	0.03
H2	4,420	3.65	0.07	H26	15,120	4.18	0.24
H3	89,250	4.95	1.40	H27	0	0.00	0.00
H4	270,000	5.43	4.23	H28	18,480	4.27	0.29
H5	34,425	4.54	0.54	H29	42,370	4.63	0.66
H6	27,840	4.44	0.44	H30	239,200	5.38	3.75
H7	156,800	5.20	2.46	H31	116,250	5.07	1.82
H8	12,500	4.10	0.20	H32	159,000	5.20	2.49
H9	113,400	5.05	1.78	H33	63,900	4.81	1.00
H10	391,000	5.59	6.13	H34	17,810	4.25	0.28
H11	115,000	5.06	1.80	H35	0	0.00	0.00
H12	33,770	4.53	0.53	H36	109,650	5.04	1.72
H13	4,290	3.63	0.07	H37	219,600	5.34	3.44
H14	11,475	4.06	0.18	H38	40,740	4.61	0.64
H15	42,120	4.62	0.66	H39	0	0.00	0.00
H16	106,700	5.03	1.67	H40	33,300	4.52	0.52
H17	85,050	4.93	1.33	H41	31,535	4.50	0.49
H18	225,000	5.35	3.53	H42	68,750	4.84	1.08
H19	176,550	5.25	2.77	H43	720	2.86	0.01
H20	32,850	4.52	0.51	H44	75	1.88	0.00
H21	396,250	5.60	6.21	H45	475	2.68	0.01
H22	27,875	4.45	0.44	H46	0	0.00	0.00
H23	15,390	4.19	0.24	H47	133,000	5.12	2.08
H24	42,390	4.63	0.66	H48	19,275	4.28	0.30

Table 1-2 Descriptive statistics

	tuna	cabbage
Mean (cell)	4.718	3.611
95%CI	4.483 - 4.954	2.823 - 4.399
Median	4.625	4.390
min.	3.63	0.00
max	5.60	5.38
Skewness	-0.251	-1.188
Kurtosis	-0.562	0.004

95% CI = 95% confidence interval

Figure 1-1 および 1-2 にマグロおよびキャベツデータの正規 Q-Q プロット (Quantile-Quantile plot) を示している。Q-Q プロットは正規分布と実データの適合度を視覚的に表すグラフである。図中の直線は正規分布の理論値であり、点が実データである。

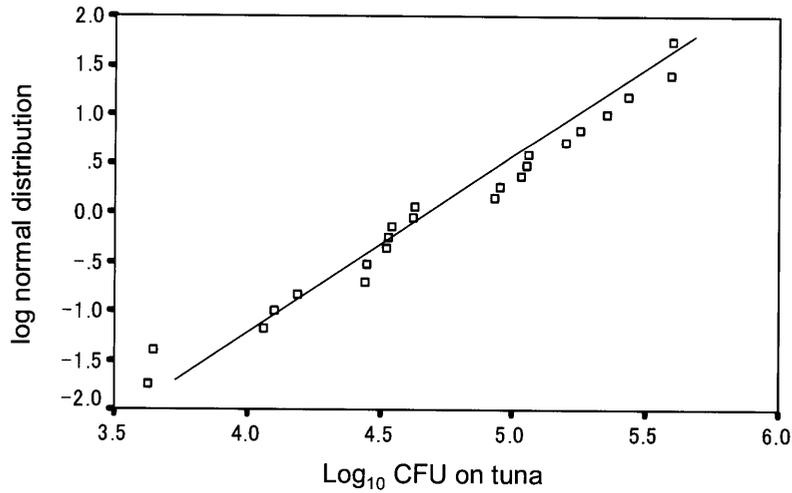


Figure 1-1 Q-Q Plot of the expected log Normal distribution and \log_{10} CFU on tuna for transfer of *E. coli* from hand to tuna.

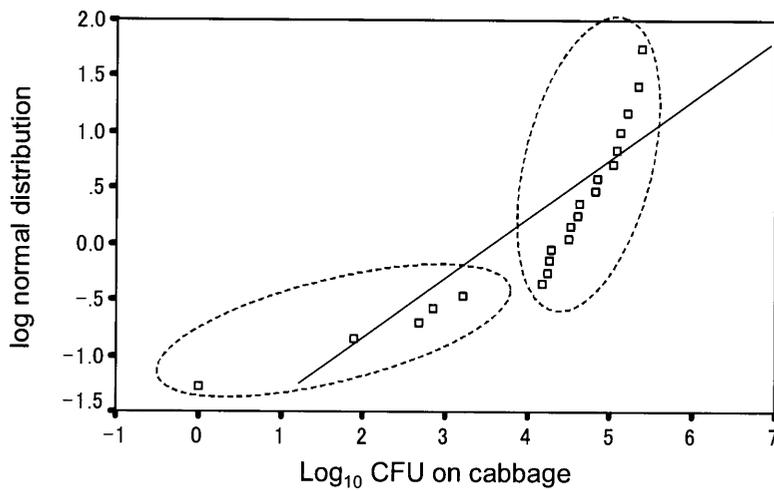


Figure 1-2 Q-Q Plot of the expected log Normal distribution and \log_{10} CFU on cabbage for transfer of *E. coli* from hand to cabbage.

マグロの正規 Q-Q プロットは点が直線の周囲に分布し、正規分布に適合することが確認できた。しかし、キャベツの正規 Q-Q プロット (Figure 1-2) は、2つのデータ群に分けられること、すなわち2つの異なる分布特性が存在することが予想された。そこで、キャベツへの移行菌数の対数値が3.5以上のグループ(データ数16)と、3.5以下(データ数8)の2群に分け、このうち3.5以上のデータについて記述統計量を求めた (Table 1-3) ところ、正規性が認められた (Kolmogorov-Smirnoff 検定: $p = 0.20 > 0.05$ 、Shapiro-wilks 検定: $p = 0.354 > 0.05$)。Figure 1-3 にこの正規 Q-Q プロットを示す。

Table 1-3 Descriptive statistics (16/24Cabbage data)

cabbage	
Mean (cell)	4.752
95%CI	4.536 - 4.968
Median	4.72
min.	4.18
max	5.38
Skewness	0.092
Kurtosis	-1.362
95% CI = 95% confidence interval	

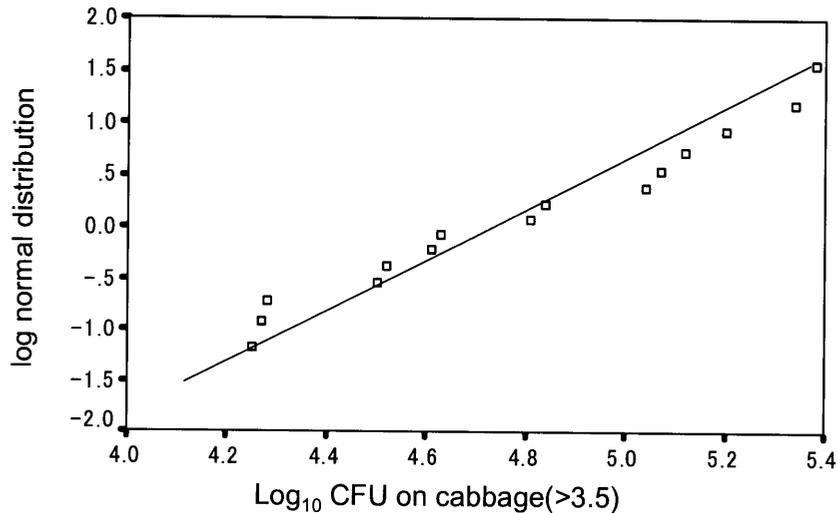


Figure 1-3 Q-Q Plot of the expected log Normal distribution and \log_{10} CFU on cabbage (>3.5) for transfer of *E. coli* from hand to cabbage.

1-2-3 考察

手指に大腸菌 (*E. coli* JCM1649 株) を $6.80 \log_{10}$ CFU 接種した 24 名の被験者がマグロをつかんだところ $4.71 \pm 0.56 \log_{10}$ CFU (平均±標準偏差) がマグロに移行した。移行割合は $1.60 \pm 1.80\%$ (平均±標準偏差) だった。また、マグロへの移行菌量は対数正規分布に従ったが、カットキャベツを取り扱ったグループのデータは対数正規分布に従わなかった。

考察の結果、カットキャベツのつかみ方は 2 通り、指先だけでつまむ方法と、手のひらの中に包むようにつかむ方法があった。この違いがカットキャベツへ移行した菌量に大きく関与していると考えた。

そこで、移行菌量が少なかったデータ (指先だけでつまむ方法)、すなわち $3.21 \log_{10}$ CFU 以下の 8 データを除外して再度統計処理したところ、 $4.75 \pm 0.40 \log_{10}$ CFU (平均±標準偏差)、移行割合 $1.30\% \pm 1.14\%$ (平均±標準偏差) となり、データの正規性が確認され、マグロの対数正規分布に近似する統計量が得られた。

両者の母平均の差を検定するため t-検定を行ったところ、母平均に有意差は認められなかった ($p = 0.836 > 0.05$)。

よって、手指から食品へ移行する菌量は対数正規分布に従ったことからモデル実験の手法は妥当であったといえる。Montville ら³⁹⁾ は 10 年間に渡る微生物検査の結果を集計し厨房内の器具、機器表面と各種食品の微生物検査データが対数正規分布したと報告している。

したがって、手のひらの中に包み込むように接触した場合はマグロでもキャベツでも同様に菌が移行することが予想された。マグロとカットキャベツはその形状、表面構造、手指との接触様式等に違いがあり、これらの差が移行菌量の違いに反映すると推測されたが、つかみ方が菌の移行現象に強く影響すると考えられた。

手指の表面は指紋、しわなどの微細な溝がありその中に多数の細菌が存在する。このモデル実験では添加大腸菌が手指の溝中に多数格納された状態だったと仮定すると、食品と接触するのは溝の中に入り込んだ菌ではなく表層の菌である可能性が高い。マグロ、キャベツいずれにおいても、表層に存在した菌の一定量が食品に移行したと考えられた。

1-3 食材由来菌の手指への伝播（食品による手指汚染）

1-3-1 実験材料及び実験方法

1-3-1-1 食品による手指汚染

被験者 12 名（各グループ 3 名、4 グループ）による調理実習を実施した。各グループに鶏挽肉のミートローフ風きのこソース、もやしときゅうりのさっぱりサラダ、アサリのチャウダーを各 4 人分調理させた。食材料はすべて市販品で名古屋市内の食料品店から納品されたものを使用した。あらかじめ鶏挽肉、もやし、あさりむきみの担当者を決めておき、生の材料に直接両手で接触するように操作させ、操作直

後の被験者手指の細菌汚染状況を測定した。食品との接触操作はいずれも料理レシピに指示された方法により、担当以外の食材に接触しないよう配慮した。

鶏挽肉の担当者は鶏挽肉 300 g を玉ねぎ、パン粉、鶏卵とともに調理器具（ボール）に入れ、両手で混合する操作を行った。もやしの担当者はもやし 200 g の種とひげを両手で取る操作を行った。あさりむきみの担当者は調理器具（ボール）に水道水をいれ、この中であさりむきみ 150 g を両手でほぐし、洗浄する操作を行った。

1-3-1-2 グローブジュース法³⁾

1-3-1-2-1 食品接触前手指

被験者は実習開始時に両手指を水でぬらし、薬用手洗い剤（「薬用 C&C」；花王（株）製）を約 1ml（ポンプ式容器 1 回分使用量）手にとって 30 秒間もみ洗いし、30 秒間水道水流水でゆすぎ、ペーパータオルで水分をふき取った。両手をよくこすり菌数を均一化した後、グローブジュース法³⁾によって食品接触前の手指の菌液を滅菌試験管に採取し、これを菌測定まで水中で保存した。

1-3-1-2-2 食品接触後手指

食品との接触操作後、手についた食品残渣をペーパータオルで十分にふき取って除去し、上記と同様にグローブジュース法で菌液を採取し、保存した。

1-3-1-3 菌数測定

被験者が接触した①鶏挽肉、②もやし、③あさりむきみは調理操作以前（材料分配時）に 10g 採取し滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈液を調製して、一般生菌数を測定した。測定にはコンパクトドライ「ニッスイ」TC（日水製薬（株））を用いた。手指菌液中の一般生菌の測定も同様にコンパクトドライ「ニッスイ」TC を用いた。

1-3-1-4 細菌移行率計算

調理操作中の細菌移行率は以下の式にしたがって計算した。

食品を両手で操作したので、移行菌数を2倍にし、これを食品の総菌数で除した。

$$\text{移行率 } r (\%) = 2 (L_A - L_B) / L_F \times 100$$

L_A ; 食品接触後手指の一般生菌数 (CFU)

L_B ; 食品接触前手指の一般生菌数 (CFU)

L_F ; 食品の一般生菌数 (CFU)

1-3-2 実験結果

1-3-2-1 食品および手指の菌数

Table 1-4 に食品および手指の一般生菌数、および移行率を示している。鶏挽肉を取り扱ったとき、菌の移行率は0.063~0.346%、もやしでは0.011~0.019%、あさりでは1.200~7.333%であった。

Table 1-4 Viable counts and corresponding transfer rates between food and volunteer hand.

Volunteer ID	Foods				Hand			Transfer rate ^d (%)
	CFU/g Log ₁₀ CFU	use (g)	Total CFU/food Log ₁₀ CFU	CFU/hand Log ₁₀ CFU				
				Before touching ^b	After touching ^b	Transfer ^c		
5A	Chicken ground meat ^a	4. 2E+06	300	1. 3E+09	2. 2E+06	2. 6E+06	4. 0E+05	0. 063%
					6. 62	9. 10	6. 34	
6A		1. 5E+06	300	4. 5E+08	2. 2E+05	1. 0E+06	7. 8E+05	0. 347%
					6. 18	8. 65	5. 34	
7A					6. 0E+04	6. 8E+05	6. 2E+05	0. 276%
					4. 78	5. 83	5. 79	
8A					7. 2E+04	2. 6E+05	1. 9E+05	0. 084%
					4. 86	5. 41	5. 27	
(Avarage)								0. 192%
5B	Bean sprout	2. 0E+08	200	4. 0E+10	4. 4E+03	2. 2E+06	2. 2E+06	0. 011%
					8. 30	10. 60	3. 64	
6B					3. 6E+03	2. 2E+06	2. 2E+06	0. 011%
					3. 56	6. 34	6. 34	
7B					3. 0E+05	4. 0E+06	3. 7E+06	0. 019%
					5. 48	6. 60	6. 57	
8B					1. 1E+06	4. 2E+06	3. 1E+06	0. 016%
					6. 04	6. 62	6. 49	
(Avarage)								0. 014%
5C	Clam	4. 0E+04	150	6. 0E+06	1. 1E+05	1. 5E+05	3. 6E+04	1. 200%
					4. 60	6. 78	5. 04	
6C					8. 8E+05	1. 1E+06	2. 2E+05	7. 333%
					5. 94	6. 04	5. 34	
7C					1. 9E+05	2. 8E+05	9. 0E+04	3. 000%
					5. 28	5. 45	4. 95	
8C					4. 2E+04	2. 2E+05	1. 8E+05	5. 933%
					4. 62	5. 34	5. 25	
(Avarage)								4. 367%

^a Using the onion, the bread crumbs and the egg as secondary raw materials: 5. 6E+05CFU (5. 75log₁₀CFU)/food.

^b Amount on one hand collected by glove juice method.

^c Estimated amount of transfer calculated by:
[CFU of Transfer]=[CFU on Hand of after touching]-[CFU on Hand of before touching].

^d Calculated by: Transfer rate (%) = 2 [CFU of Transfer] / [Total CFU of food] × 100.

1-3-3 考察

春日²⁴⁾は伝播経路を(1)手を介した伝播と(2)容器・器具・環境表面を介した伝播に分け、(1)の手を介した経路には①食品1→手→食品2、②食品1→手→器具→食品2、③食品1→手→器具→手→食品2の経路を、(2)の容器・器具・環境表面を介した経路には①食品1→器具(調理台、まな板等)→食品2、②食品1→器具1→布巾→器具2→食品2の経路を想定しモデル実験を行った(Figure 1-4)。このうち、手指を介した伝播モデル実験において、細菌移行率を数学的に解析したところ、食品ごとに一定量の細菌が移行した結果を得て、モデル実験の手法と数学的解析結果の利用がリスク評価に可能であることを示唆した。

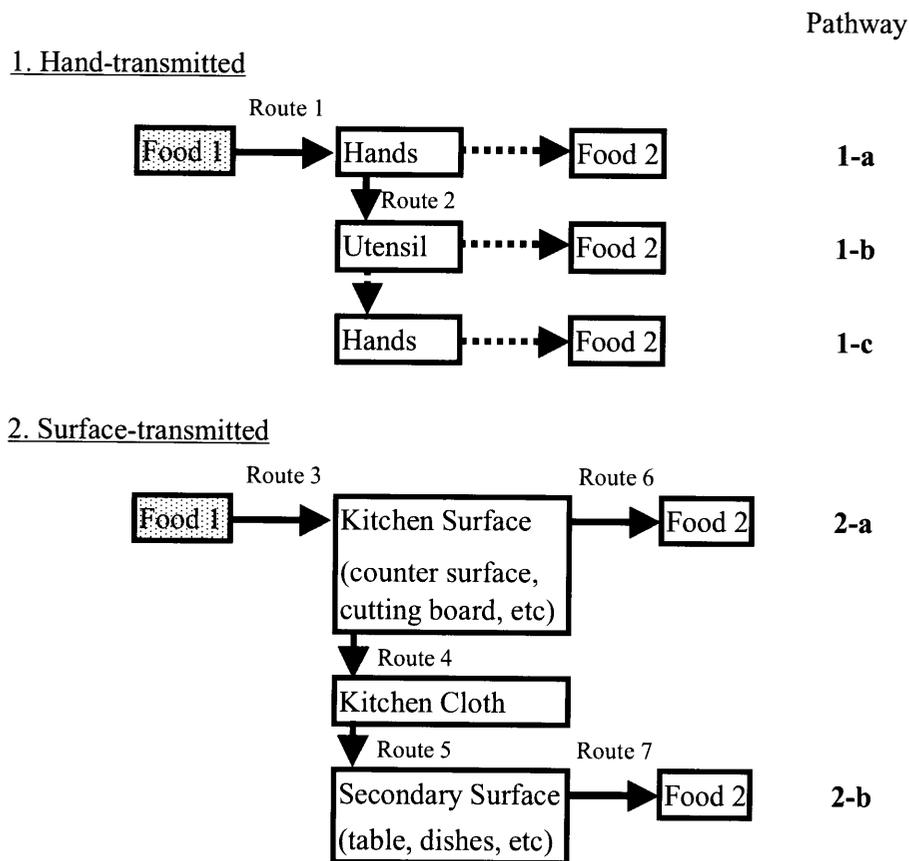


Figure 1-4 A model for cross contamination during cooking²⁴⁾

本実験は Figure 1-1 の Rout 1 に該当する経路の細菌移行率を明らかにした。そ

して、移行率には食品の取り扱い方法（接触の様式）が影響することを示唆した。最も移行率の高かった取り扱い方法はあさを水中でほぐす操作だった。水中に分散した細菌が手指に高効率に移行（平均値：4.367%）したことが推測された。次に挽肉を鶏卵等とともに攪拌した操作ではペースト状になった食材が手指全体に接触しながら移行（平均値：0.192%）、そして、もやしの作業では指先を中心に手指に多数回、もやしが接触した際に細菌が移行（平均値：0.014%）したと考えられた。

もやしは移行菌数量が $6 \log_{10}\text{CFU}$ を超え最も多くの細菌が手指に移行したが、移行率では最小であった。これは食品の総菌数が $10.60 \log_{10}\text{CFU}$ であさりの約 10000 倍であったのに対し、移行菌数はあさりの約 100 倍であったためであり、取り扱い方法が大きく影響したと考えられた。

しかし、食品取扱い用グローブを通した細菌の移行研究⁴²⁾では、低濃度で菌を接種した手から移行した菌の移行率は高く、接種が高濃度になるほど移行率は低くなった。グローブを通した移行率は、接種量の多寡により影響されている可能性を示唆した。さらに、鶏肉からまな板、まな板からレタスなどの 8 場面を想定し、*E. aerogenes* の接種量を変えて移行率を計測し、接種量の違いが移行率に影響するかどうかを調べたところ、接種量は移行率に有意な影響を与え、負の相関があることが判明した⁴⁰⁾。

本実験では菌を接種したのではなく、菌数の多い食品に手指を接触させたが、同様に負の相関傾向が見られた。移行率に影響を及ぼしたのは接種（接触）菌量である可能性も高いが、食品の取り扱い方法も影響していると考えるのが妥当である。すなわち、あさりのように菌数が少なくても、水中で菌と接触する場合（液相-固相接触）は高率に移行（平均 4.367%）し、もやしのように菌数は多くても、指先だけでつまむ（固相-固相接触）様式では低率で移行（平均 0.014%）すると考えられる。そして、鶏挽肉は鶏卵などの副原料を入れたペースト状態で接触しており、中

間の移行率（平均 0.192%）になると考えられる。今後、移行率を決定する各要素の検討と、影響の仕方、影響の強度などを検討する必要がある。

第2章 調理施設から採取された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の遺伝子多型解析

2-1 緒言

食品が有害微生物で汚染されることは調理施設にとって大きな問題である。加工食品と同様に、給食調理の生産スケールは大きくなり、セントラルキッチン等で大量に仕入れ、大量に調理する事業所が増加している。このことは安価生産には寄与するが、食品事故の観点から見ると非常に大きな問題を含んでいる。加えて、給食の喫食者は適時適温での提供も望んでおり、時間の制約と温度管理の必要性が微生物汚染対策の壁になっている。

微生物汚染は調理の過程で起こる。有害微生物は、従事者が不適切な方法で食品を取り扱う、または手洗いや洗浄殺菌などの衛生慣行を怠ることにより食品に伝播する。したがって、調理中に発生する汚染の汚染源と伝播経路、伝播経路になりやすい場所を明らかにすることが大切である。汚染や伝播を防止するには汚染の経路や原因（起源）を解明する方法が必要である。

これまでの微生物の同定には表現型による方法、すなわち形態学的試験、生理学的試験が用いられてきた。これらの試験はしばしば正確な同定ができないことがあり、識別能は低い。一方、DNAに基づく同定方法は、DNAの塩基配列が成長（増殖）中でも変化がない、細胞の環境状況により影響を受けない⁴⁶⁾ので、表現型による同定法よりも優れている。

本実験の目的は調理施設等から採取した *S. aureus* の遺伝子多型解析を行い、伝播実態を明らかにすることであった。そして、PFGE法と同等の伝播解析能を有するRAPD法による新しい手法を開発し、その解析能の検証実験を行い、汚染経路や汚染源調査に有用な手法であることを実証することであった。

2-2 一般調理施設（1）

2-2-1 実験材料及び実験方法

2-2-1-1 菌の採取

8グループ26名が調理した実習室（名古屋栄養専門学校内）の各所および調理者を被検対象とした。菌の採取先は調理前および調理中の被験者の手指、28種の食材料、調理済み食品、調理器具および設備である。被験者手指のサンプリングはグローブジュース法³⁾を用いた。26名の被験者はサンプリング前に両手菌数が均一になるように十分にこすり合わせ、片方の手を調理前と調理中の計2回採取した。なお、同じ手指にならないように両手指から1回ずつ採取した。

また、食材料および調理済み食品は約10gをサンプリングし、10倍量になるように滅菌生理食塩水を加えた後マスティケーターで攪拌し試料菌液とした。水道カラン、フライパンなどの実習設備および器具はふき取り法で試料菌液を得た。ただし、包丁と菜箸については実習中被験者が握ったものを滅菌バッグにいれ、グローブジュース法に準じたマッサージ法によって菌液を採取した。

得られた各菌液は段階希釈後市販卵黄加マンニット食塩培地（日水製薬（株））で35℃48時間培養し増殖した菌のうち、黄色で光沢があり周囲に白濁環を示すコロニーを分離した。

各同定試験には-80℃で保存した株をTSB培地一夜増菌後、SCD寒天培地で一夜培養したコロニーを使用した。

2-2-1-2 *S. aureus* の同定

分離株のグラム染色（B&M山中変法；メルクジャパン）、コアグララーゼ試験（ウサギプラズマ栄研；栄研化学）、コアグララーゼ型別試験（ブドウ球菌コアグララー

ゼ型別用免疫血清「生研」；デンカ生研）同定検査（APISTAPH；ピオメリュー）を行った。

2-2-1-3 リボタイピング

2-2-1-3-1 全自動リボタイピング⁶⁾

分離株は顕微鏡観察を行い、グラム染色陽性、球菌を確認後、The RiboPrinter[®] Microbial Characterization System (Qualicon, Wilmington, DE, USA) に供した。本リボタイピング法⁶⁾では、分離株 DNA を制限酵素 *EcoR I* で切断後、電気泳動を行って分離された DNA 断片の中から *rRNA* 遺伝子を含む DNA 断片を検出して、そのバンドパターンを解析する。分離菌株のバンドパターンは画像データとして保存され、これは RiboPrinter[®] Microbial Characterization System という分析ソフトで標準化され、RiboPrinter[®] System アルゴリズムによって各株のリボプリントパターンが作成される。なお、同一のパターンをもつ菌株に同じリボグループ名が与えられる。

2-2-1-3-2 系統樹解析

一般的に系統樹解析はバンド（泳動像）に基づいた各株間の類似度（あるいは非類似度）計算を行い、類似度（あるいは非類似度）行列を作成し、UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean；平均距離)法、NJ (Neighbor-Joining；近隣接合)法、Ward のクラスター形成演算法 (Ward's clustering algorithm)などのクラスタリング解析法を用いて系統樹を作成する³⁶⁾。なお、RiboPrinter[®] System のグルーピングアルゴリズムは明らかにされていない。そこで、系統樹をもとに各菌株のグルーピングを行い、リボプリントパターン解析によるグルーピング（リボグループ）と比較した。系統樹の

作成は系統解析ソフト MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) verion2.0³³⁾ を用いた。The RiboPrinter[®] Microbial Characterization System より得られる類似度行列をもとに UPGMA 法および NJ 法で系統樹を描き、類似度が 0.90 以上となる菌株グループを同一グループに分類した。

2-2-1-4 BSFGE 法

染色体 DNA の抽出は SCD 寒天培地 (日水製薬) で一夜培養したコロニー一白金耳分を 2 ml の TSB 培地 (栄研器材) で 5 時間培養し、その 250 μ l を分け取って遠心分離 (8000rpm, 10 分間) した。その菌体に 0.5M EDTA (和光純薬) 200 μ l を加えて懸濁後、1mg/ml リゾスタフィン (Lysostaphin; SIGMA) 10 μ l と 1.6% アガロース (InCert[®] Agarose; BMA) 200 μ l を加え、よく混和させ鋳型で固めた。この寒天ブロックを溶菌液 (リゾスタフィン 5 μ l と 0.5M EDTA 1 ml 混合液) 1 ml 中に入れ、37°C で穏やかに振とうしながら一夜溶菌させた。次に、この溶菌液をタンパク分解液 (プロテイナーゼ K (SIGMA), 1% N-ラウロリルサルコシナトリウム (SIGMA), 0.5M EDTA) 500 μ l に置換し、穏やかに振とうしながら 50°C で 8 時間インキュベートした後、タンパク分解液を TE バッファー (10mM Tris-HCl, 1mMEDTA; シグマアルドリッチジャパン) 1 ml に置換し、室温で振とうしてプロテイナーゼ K を不活化させた。TE バッファーは 3~4 時間ごとに入れ替え計 5 回、のべ 30 時間インキュベートした。

制限酵素による DNA の切断は、寒天ブロックを氷上で制限酵素用バッファー (*Sma* I buffer; TOYOBO) 200 μ l で 30 分間振とうした後、*Sma* I 処理 (10units/ μ l; TOYOBO) の入った反応液 (*Sma* I buffer 100 μ l に *Sma* I 3 μ l; 30units) に入れて 30°C で 16 時間反応させた。

次にこの寒天ブロックを1%電気泳動用アガロースゲル (SeaKem GTG ; BMA) でコームに固定しゲルメーカーにセットした。これに1%電気泳動用アガロースゲルを流し込み、TBE バッファー (4.45mM Tris borate, 1mM EDTA; シグマアルドリッチジャパン) 中で泳動 (Genofield; ATTO) した。泳動は DC=42V, AC=250V, start=0.01Hz, end=0.2 Hz, 24 時間、20℃の条件で行った。DNA 分子量マーカーとして λ -DNA (Lambda DNA Ladders ; CAMBREX) と λ -*Hind*III digest (TaKaRa) を用いた。泳動の終わったゲルはエチジウムブロマイド (0.5 μ g/ml) で30分間染色し精製水で1.5時間脱色後、UV (312nm) 照射しプリントグラフ[®] (AE-6914 ; ATTO) で撮影した。

2-2-1-5 PFGE 法

PFGE 法は、菌からの DNA 抽出および制限酵素処理を BSFGE 法と同様に行い、得られた寒天ブロックを1%電気泳動用アガロースゲル (Agarose ; Invitrogen) にセットし TBE バッファー中で泳動 (CHEF-DR[®] III ; Bio-Rad) を行った。マーカーとして、緑膿菌の *Sma* I 切断 DNA 断片を用いた。各断片のサイズは λ ラダーの泳動度と比較して算出した。泳動はパルスタイム 1 秒~50 秒、電圧 6.0V/cm、内角 120°、22 時間、14℃の条件で行った。泳動の終わったゲルはエチジウムブロマイド (2 μ g/ml) で30分間染色し、精製水で2時間脱色後撮影した。

2-2-1-6 RAPD 法

2-2-1-6-1 ゲノム DNA の調製

TSB 寒天培地 (日水製薬) で一夜培養したコロニー一白金耳分を「Gen とる君[™] (酵母用)」(TaKaRa) でゲノム DNA を分離した。ゲノム DNA の分離はゲノム

DNA 分離キット「Gen とる君™ (酵母用)」(TaKaRa) を使い、解説書にしたがって行った。分離したゲノム DNA は 50 μl の TE バッファーに溶解後、 -20°C で保存した。

2-2-1-6-2 PCR 反応

PCR 反応には AccuPower® PCR PreMix (TaqDNA polymerase : 1U, dNTP : 250 μM , Tris-HCl (pH9.0) : 10mM, KCl : 40mM, MgCl_2 : 1.5mM ; Bioneer) を用いた。これにゲノム DNA を 10 μl 添加し、40pM の 10-mer オリゴヌクレオチドプライマープライマー A-03 (5' -AGTCAGCCAC-3') および F-04 (5' -GGTGATCAGG-3') (RAPD10mer Kits; QIAGEN)、を 1 μl 、25mM MgCl_2 1.2 μl に蒸留水を加えて総量 20 μl とした。PCR 反応液中の Mg イオン濃度については 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 mM の各濃度で予備試験を行い、3.0mM および 4.0mM で良好な泳動像が得られることを確認した。今回は 3.0mM で行った。また、藤本ら¹⁰⁾ は Taq DNA ポリメラーゼ 5 種類のうち KlenTaq DNA polymerase (Sigma) が良好な結果を得たと報告しているが、AccuPower® PCR PreMix を用いた場合と比較したところ、ほぼ同等の泳動像を得たので AccuPower® PCR PreMix を使用した。PCR 反応には EZcycler (EZC-96, 旭テクノグラス) を使い、藤本らの方法¹⁰⁾ に準じた。すなわち、熱変性 94°C 、30 秒、アニーリング 37°C 、7 秒、伸長反応 72°C 、1 分を 2 サイクル行った後、引き続き熱変性 94°C 、0 秒、アニーリング 37°C 、7 秒、伸長反応 72°C 、1 分を 33 サイクル行い、最後に伸長反応 72°C 、4 分を行った。PCR 増幅物の確認には 2.0% アガロースゲル (Agarose H14 「TAKARA」 ; TaKaRa) で電気泳動し、分子量マーカーには PCR Markers (50-20000bp; Novagen) を用いた。泳動の終わったゲルはエチジウムブロマイド (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 20 分間染色し、精製水で 30 分間脱色後 UV (312nm) 照射、ポラロイドカメラまたはプリントグラ

フ® (AE-6914 ; ATTO) で撮影した。

2-2-1-6-3 再現性試験

再現性を確認するためにゲノム DNA の調製から撮影までの一連の操作を 2~4 回繰り返した。

2-2-2 実験結果

2-2-2-1 菌の採取・同定

実習前被験者の手指 26 検体、実習中被験者の手指 26 検体、食材料 28 検体、調理済み食品 26 検体、実習器具および設備 56 検体、計 162 検体中の 15 検体から 66 株の *S. aureus* を分離した (Table 2-1)。うち 2 検体 (水道カランとフライパン) 由来の 9 株は増菌培養後分離された。単離した 66 株はすべてグラム陽性、コアグラーゼ陽性で *S. aureus* であることを確認した。

2-2-2-2 リボタイピング

2-2-2-2-1 リボタイピング

リボプリントパターン解析の結果、66 株は 39 のリボグループに分類された。このうち 34 株が A~G の 7 グループに属した。他の 32 株は個別のリボグループ名が与えられた (Table 2-2)。

コアグラーゼ型とリボグループで比較すると、異なるリボグループに分類された株は同一のコアグラーゼ型に属することはなく、1 つまたは複数のリボグループが特定のコアグラーゼ型に対応した。Table 2-3 に A~G の各リボグループに分類された分離株の起源 (採取先)、コアグラーゼ型、リボプリントパターンを示す。

Table 2-1 Distribution of contamination by *S. aureus* during cooking.

Items	Sort of experimental sources*	Number of sources detected <i>S. aureus</i>	Number of strains obtained
Participants	Hands (Before preparation) ;26	4	25
	Hands (During preparation) ;26	3	15
Foods	Foodstuffs ;28	2	6
	Prepared food (salad) ;26	1	7
Facilities	Frying pans;2	1	4
Utencils	Faucets;2	1	5
	Knives;26	2	3
	Chopsticks for cooking;26	1	1
	Total;162	15	66

*The number shown after semi colon means the number of each source.

Samples were taken from hands of 26 participants before and during food preparation activities, 28 types of foodstuffs, 26 prepared foods, 4 facilities, and 52 utensils, respectively. Out of 162 specimens, 66 different strains of *S. aureus* were detected.

Table 2-2 Origins, coagulase types and ribogroups of the 66 isolated strains.

Isolate code	Origin	Coagulase type	Ribogroup	Group name**
K-03	Hand of study participant 2B*	Indeterminate	150-S-1	
K-04	(prior to food preparation activities)	Indeterminate	150-S-2	
K-05		Indeterminate	150-S-3	B
K-06		Indeterminate	150-S-4	
K-07	Hand of study participant 4C*	VII	132-S-7	
K-08	(prior to food preparation activities)	Indeterminate	150-S-6	
K-09		Indeterminate	150-S-7	
K-10	Hand of study participant 2A*	Indeterminate	150-S-8	
K-11	(prior to food preparation activities)	Indeterminate	151-S-1	
K-12		Indeterminate	151-S-2	
K-13		Indeterminate	151-S-3	
K-14		Indeterminate	151-S-4	
K-15		Indeterminate	151-S-5	
K-16		Indeterminate	151-S-6	
K-17		I	151-S-7	
K-18		Indeterminate	151-S-8	
K-19		Indeterminate	150-S-3	B
K-20		Indeterminate	152-S-2	
K-21		Indeterminate	152-S-3	
K-22	Hand of study participant 2A*	Indeterminate	150-S-3	B
K-23	(during food preparation activities)	Indeterminate	152-S-5	
K-24	Hand of study participant 7B*	II	152-S-6	
K-25	(during food preparation activities)	II	152-S-7	
K-26	Hand of study participant 7A* (prior to food preparation activities)	III	152-S-8	
K-27	Hand of study participant 7B* (during food preparation activities)	II	161-S-1	

Isolate code	Origin	Coagulase type	Ribogroup	Group name**	
K-29	Knife (used by 8B*)	V	157-S-6	F	
K-30		V	153-S-4	C	
K-31	Hand of study participant 8B* (prior to food preparation activities)	V	156-S-1	D	
K-32		V	153-S-2		
K-33		V	156-S-1	D	
K-34		V	156-S-1	D	
K-35		V	153-S-4	C	
K-36		V	132-S-2	A	
K-37		Hand of study participant 8B*	V	132-S-2	A
K-38		(during food preparation activities)	V	156-S-1	D
K-39		V	156-S-1	D	
K-40		V	157-S-7	G	
K-41		V	157-S-7	G	
K-42		V	157-S-6	F	
K-43		V	157-S-6	F	
K-44		V	153-S-4	C	
K-45		V	153-S-4	C	
K-46		V	155-S-3		
K-51	Chopsticks for cooking(used by 6C*)	VIII	155-S-7		
K-53		V	156-S-1	D	
K-54	Frying pan	V	156-S-1	D	
K-55		V	156-S-1	D	
K-56		V	156-S-1	D	
K-57	Water faucet	V	156-S-1	D	
K-58		III	153-S-6		
K-59		V	153-S-4	C	
K-60		V	132-S-2	C	
K-61		V	132-S-2	A	

Isolate code	Origin	Coagulase type	Ribogroup	Group name**
K-63	Foodstuff (chicken)	VIII	165-S-4	
K-65		VIII	157-S-2	
K-66		Indeterminate	157-S-3	E
K-68		Indeterminate	157-S-3	E
K-69		VIII	165-S-5	
K-71	Prepared food (Salad: prepared by	V	157-S-5	
K-72	8B*)		157-S-6	F
K-73			157-S-7	G
K-74			157-S-7	G
K-75			153-S-4	C
K-76			153-S-4	C
K-77			165-S-3	
K-80	Foodstuff (chicken)	V	165-S-8	

*Identifies study participant

**Group names were assigned when a ribogroup included two or more strains. Examples are as follows: 132-S-2 ; A, 150-S-3 ; B, 153-S-4 ; C, 156-S-1 ; D, 157-S-3 ; E, 157-S-6 ; F, 157-S-7 ; G.

Table 2-3 The seven ribogroups, origins, coagulase types and riboprint patterns.

Group name	Ribogroup	Isolate code	Origin 1	Origin 2	Food preparation activities	Coagulase type	Riboprint pattern					
							1kbp	5	10	15	50	
A	132-S-2	K-36	Human	Hand of "8B"	Prior	V	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	
		K-37			During	V						
B	150-S-3	K-61	Faucet	Touched by "8B"	Prior	V	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	
		K-05	Human	Hand of "2B"	Prior	Indeterminate						
		K-19		Hand of "2A"	Prior	Indeterminate						
C	153-S-4	K-22	Knife	Touched by "8B"	During	V	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	
		K-30		Human	Hand of "8B"	Prior						V
		K-35			Hand of "8B"	Prior						V
		K-44	Faucet	Touched by "8B"	During	V						
		K-45		Touched by "8B"	Prior	V						
		K-59		Touched by "8B"	Prior	V						
		K-60		Touched by "8B"	Prior	V						
		K-75	Salad	Cooked by "8B"	During	V						
		K-76				V						
		D	156-S-1	K-31	Human	Hand of "8B"						Prior
K-33	Prior			V								
K-34	Prior			V								
K-38	During			V								
K-39	Frying pan			Touched by "anyone"	During	V						
K-53				Touched by "anyone"	During	V						
K-54				Touched by "anyone"	During	V						
K-55				Touched by "anyone"	During	V						
K-56				V								
K-57	Faucet	Touched by "8B"	Prior	V								
E	157-S-3	K-66	Food	Ground meat of Chicken	Prior	Indeterminate	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	
		K-68	Food	Ground meat of Chicken	Prior	Indeterminate						
F	157-S-6	K-29	Knife	Touched by "8B**"	During	V	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	
		K-42	Human	Hand of "8B"	During	V						
		K-43		Hand of "8B"	During	V						
G	157-S-7	K-72	Salad	Cooked by "8B"	During	V	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	[Pattern]	
		K-40	Human	Hand of "8B"	During	V						
		K-41		Hand of "8B"	During	V						
		K-73	Salad	Cooked by "8B"	During	V						
K-74				V								

調理前の 8B 手指から分離された K-36 (A グループ) 株、K-35 (C グループ) 株、および K-31、K-33、K-34 (D グループ) 株は同一グループ中に水道カラン由来の K-61 (A グループ)、K-59、K-60 (C グループ)、K-57 (D グループ) 株があった。また、D グループにはフライパンハンドルから分離された K-53~56 株も含まれた。C グループには 8B 手指株と水道カラン株の他、包丁株、サラダ株が含まれ、F および G グループにも同様に 8B 手指株、サラダ株等が含まれた。なお、以上 5 グループに属す株はすべてコアグラゼ V 型だった。

B グループは同じ調理チームの被験者 2 名の手指由来株 (K-05, K-19, K-22) であり、E グループは同一検体から分離された 5 株のうちの 2 株 (K-66, K-68)

だった。これら2グループのコアグラマーゼ型はいずれの型の免疫血清にも凝固せず判別できなかった。

2-2-2-2-2 系統樹

UPGMA 法による系統樹を Figure 2-1 に示す。66 株中 46 株が類似度 0.90 以上のグループ (U-1~U-13) に分類された。リボグループ A~G の 34 株のうち K-72 を除く 33 株が、U-1~U-7 の各グループに対応した。

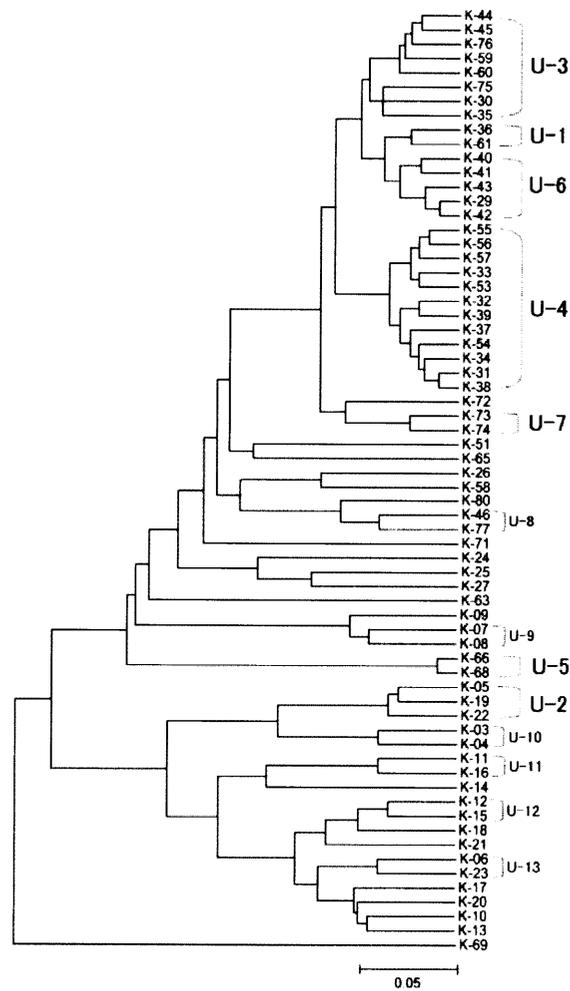


Figure 2-1 UPGMA dendrogram for 66 strains of *S. aureus* isolated from food preparation environments.

N-J 法による系統樹を Figure 2-2 に示す。66 株中 47 株が類似度 0.90 以上のグループ (NJ-1~NJ-13) に分類され、リボグループ A~G の 34 株に K-35 を加えた 35 株が NJ-1~NJ-7 の各グループに対応した。

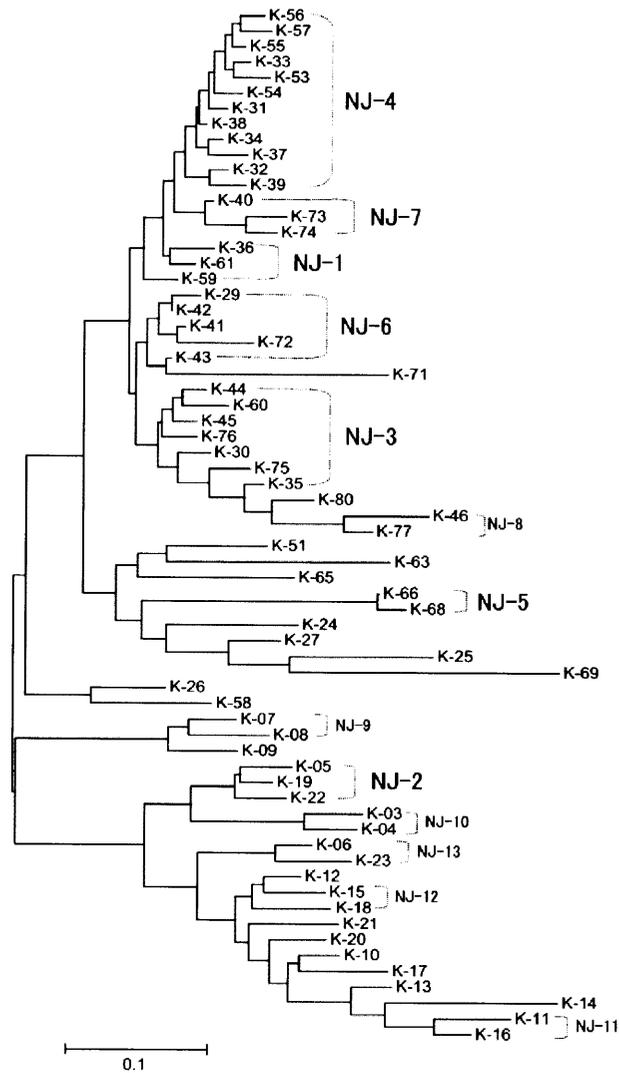


Figure 2-2 N-J dendrogram for 66 strains of *S. aureus* isolated from food preparation environments.

2-2-2-3 BSFGE 法

BSFGE 法による解析は K-32 と K-69 株を除いた 64 株を対象に行った。染色体 DNA は 10~12 本に切断され、これらはいずれも 50kb から 600kb 間にバンドを形成した。後述の PFGE 法と比較するため *S. aureus* 39 株の BSFGE パターンを Figure 2-3 に示した。これらのバンドパターンより *S. aureus* は b1~b12 の 12 型に別けられた (Table 2-6)。

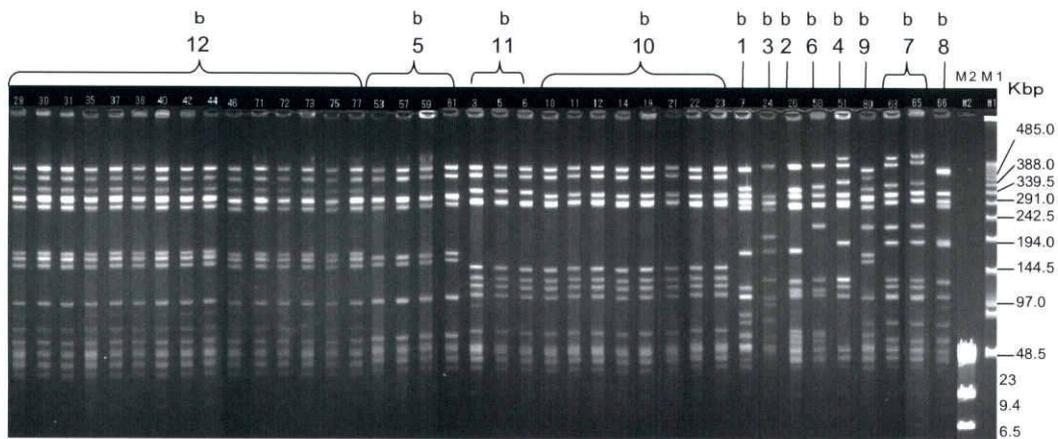


Figure 2-3 BSFGE patterns (b1~12) of selected 39/64 *S. aureus* strains.

Refer Table 2-6 for the origins of isolates of each classified pattern.

2-2-2-4 PFGE 法

無作為に抽出した *S. aureus* の 39 株について PFGE 解析を行った結果、染色体 DNA は 12~13 本に切断され、これらのバンドは 30 から 700kb 間にバンドを形成した (Figure 2-4)。これらの PFGE パターンは p1~p12 の 12 型に分けることができた。BSFGE 法で 100kb から 200kb 付近に明瞭に分離されたバンドは PFGE 法ではやや不明瞭であった。一方、250kb から 600kb 付近の 4~5 本のバンドは PFGE 法で明瞭に分離された。BSFGE 法で b1~b12 型に別けられた菌株は PFGE 法でも p1~p12 型に別けられ型別は完全に一致した (Table 2-6)。

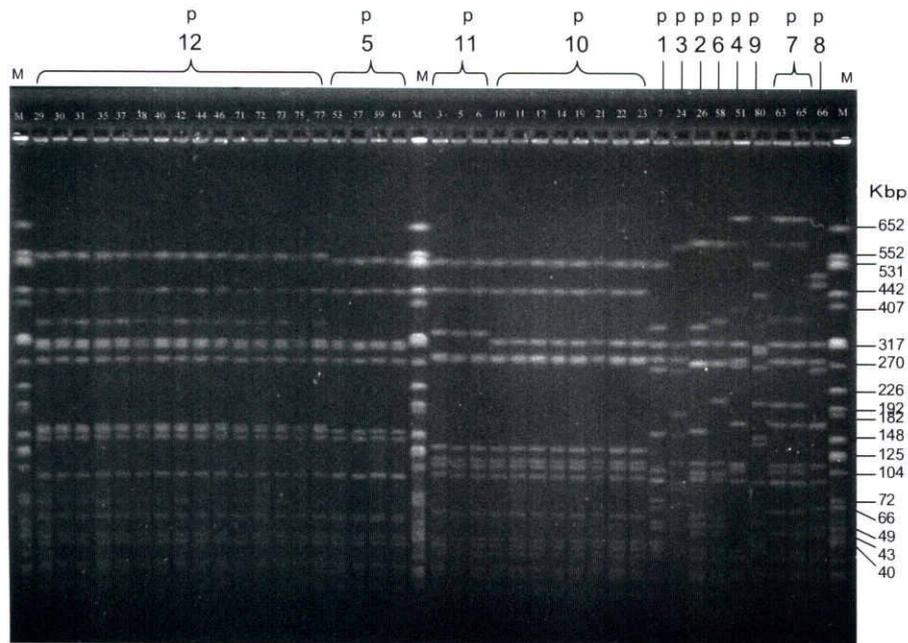


Figure 2-4 PFGE patterns (p1~12) of selected 39/64 *S. aureus* strains. Refer Table 2-6 for the origins of isolates of each classified pattern.

2-2-2-5 RAPD 法

プライマーA-03 およびプライマーF-04 により増幅されたバンドパターンとそのパターンを示した *S. aureus* の由来を Table 2-4 および Table 2-5 示した。プライマーA-03 により増幅されたバンドは 200bp から 2000bp 間に 10~12 本、プライマーF-04 では同様に 9~10 本現れた。RAPD パターンはプライマーA-03 では 7 型に、プライマーF-04 では 8 型に別けられた。両プライマーによる型別で共通して 1 つの型内に含まれた菌株は、1) 4C 手指由来の 3 株 (K7-9)、2) 7B 手指由来の 3 菌株 (K24, 25, 27)、3) 2B 手指と 2A 手指由来の 18 菌株 (K3-6) と K10-23) で計 24 菌株だった。しかし、サラダ由来の 7 菌株 (K71-77) はプライマーA-03 で a 5 型と a 7 型に型別され、鶏肉由来の 4 菌株 (K63, 65, 66, 68) はプライマーA-03 で a 5 型に、プライマーF-04 で f 4 と f 6 に型別された。*S. aureus* 64 株は、これら 2 種類のプライマーによる RAPD 型別から 11 型 (r1~

r11) に別れた (Table 2-6)。

Table 2-4 A-03 Primer RAPD patterns of 64 isolates of *S. aureus*.

PAPD-A Types ^a	Representative example of RAPD Patterns							strain code ^b	n ^c
	50	150	300	500	750	1000	1500		
a 1								K7, K8, K9	3
a 2								K26, K58	2
a 3								K24, 25, 27	3
a 4								K51	1
a 5								K29, K30, K31, K33, K34, K35, K36, K37, K38, K39, K40, K41, K42, K43, K44, K45, K46, K53, K54, K55, K56, K57, K59, K60, K61, K63, K65, K66, K68, K71, K72	31
a 6								K3, K4, K5, K6, K10, K11, K12, K13, K14, K15, K16, K17, K18, K19, K20, K21, K22, K23	18
a 7								K73, K74, K75, K 76, K, 77, K80	6

^a Classified using A-03 primer.

^b Refer Table 2-2

^c number of strains.

Table 2-5 F-04 Primer RAPD patterns of 64 isolates of *S. aureus*.

PAPD-F Types ^a	representative example of RAPD Pattern							strain code ^b	n ^c
	50	150	300	500	750	1000	1500		
f 1								K7, K8, K9	3
f 2								K26	1
f 3								K24, K, 25, K27	3
f 4								K51, K58, K63, K65	4
f 5								K53, K54, K55, K56, K57, K59, K60, K61	8
f 6								K66, 68	2
f 7								K29, K30, K31, K33, K34, K35, K36, K37, K38, K39, K40, K41, K42, K43, K44, K45, K46, K71, K72, K73, K74, K75, K76, K77, K80	25
f 8								K3, K4, K5, K6, K10, K11, K12, K13, K14, K15, K16, K17, K18, K19, K20, K21, K22, K23	18

^a Classified using F-04 primer.

^b Refer Table 2-2

^c number of strains.

Table 2-6 Origins and Genotypes of 64 isolates of *S. aureus*.

Origin of isolates	Strain code	n	RAPD-types			BSFGE-types	PFGE-types
			A-03 primer	F-04primer	A-03+F-04		
Hand of study participant 4C (Prior to food preparation activities)	K7-9	3	a 1	f 1	r 1	b 1	p 1
Hand of study participant 7A (Prior to food preparation activities)	K26	1	a 2	f 2	r 2	b 2	p 2
Hand of study participant 7B (During to food preparation activities)	K24, 25, 27	3	a 3	f 3	r 3	b 3	p 3
Chopsticks (Used by 6C)	K51	1	a 4	f 4	r 4	b 4	p 4
Frying pan	K53-56	4	a 5	f 5	r 5	b 5	p 5
Water faucet	K57, 59-61	4					
	K58	1	a 2	f 4	r 6	b 6	p 6
Foodstuff (Chicken1)	K63, 65	2	a 5		r 7	b 7	p 7
	K66, 68	2		f 6	r 8	b 8	p 8
Foodstuff (Chicken2)	K80	1	a 7	f 7	r 9	b 9	p 9
Hand of study participant 2A (Prior to food preparation activities)	K10-21	12				b 10	p 10
Hand of study participant 2A (During to food preparation activities)	K22, 23	2	a 6	f 8	r 10		
Hand of study participant 2B (Prior to food preparation activities)	K3-K6	4				b 11	p 11
Hand of study participant 8B (Prior to food preparation activities)	K31, 33-36	5					
Hand of study participant 8B (During to food preparation activities)	K37-46	10	a 5	f 7	r 11	b 12	p 12
Knife (Used by 8B)	K29, 30	2					
	K71, 72	2					
Prepared food (Salad: prepared by 8B)	K73, 76, 77	3					
	K74, 75	2	a 7		r 9		
Total		64	7 types	8 types	11 types	12 types	12 types

Strains analyzed by PFGE are 39 strains out of 64; K3, K5, K6, K7, K10-12, K14, K19, K21-24, K26, K29-31, K35, K37, K38, K40, K42, K44, K46, K51, K53, K57-K59, K61, K63, K65, K66, K71-73, K75, K77, and K80.

2-2-3 考察

2-2-3-1 *S. aureus* の検出・同定

Hatakka ら¹³⁾ は機内食調理作業者 153 名の手指のサンプルを採取し、そのうち 9% から *S. aureus* を検出した。入倉らは²¹⁾ 食品取扱者 1414 人の 17.1% の手指に *S. aureus* が検出されたと報告している。そして、関口ら⁵⁹⁾ は専門学校生 739 名の鼻前庭から 93 株を単離した。そして、その検出率は 12.6% だった。本研究においては 26 名の被験者のうち 5 人から *S. aureus* が検出され、先行報告とほぼ同等の検出率 (19.2%) であった。

2-2-3-2 リボタイピング

リボタイピングによる型別の結果、A~G の 7 リボグループにおいて、被験者 8B の手指由来株が 5 リボグループに関与していた。実習前の 8B 手指から分離された株が水道カランからも分離された (A、C、D グループ) ことから、8B の手指からカランに *S. aureus* が伝播したことが推測された (Figure 2-5)。8B の調理作業を行う調理台は調理室の最後列の窓側だったので、追跡調査をしたところ、8B は当該の水道カランで調理前に手をすすいだことが、ビデオ映像と本人および他の被験者の証言から明らかになった。また、D グループにフライパンハンドル由来の株が含まれていたことから、水道カランに触れた誰か (1X) がこれをフライパンハンドルに伝播させたことが推定された。C グループには水道カランの他、包丁、サラダ由来の株もあることから、8B の調理行為により手指由来の *S. aureus* が伝播したことが推定された。C グループの株は 8B が調理行為を行う前の手指から検出されており、サラダの食材から *S. aureus* が検出されていないこと、そして包丁は使用前に殺菌されていたこと、さらに 8B 手指と包丁から同時に菌液が採取されたことから、サラダと包丁への菌の伝播

は 8B の手指が原因であると考えられた。F グループおよび G グループについても同様に包丁、サラダに伝播したことを予想させる結果であった。

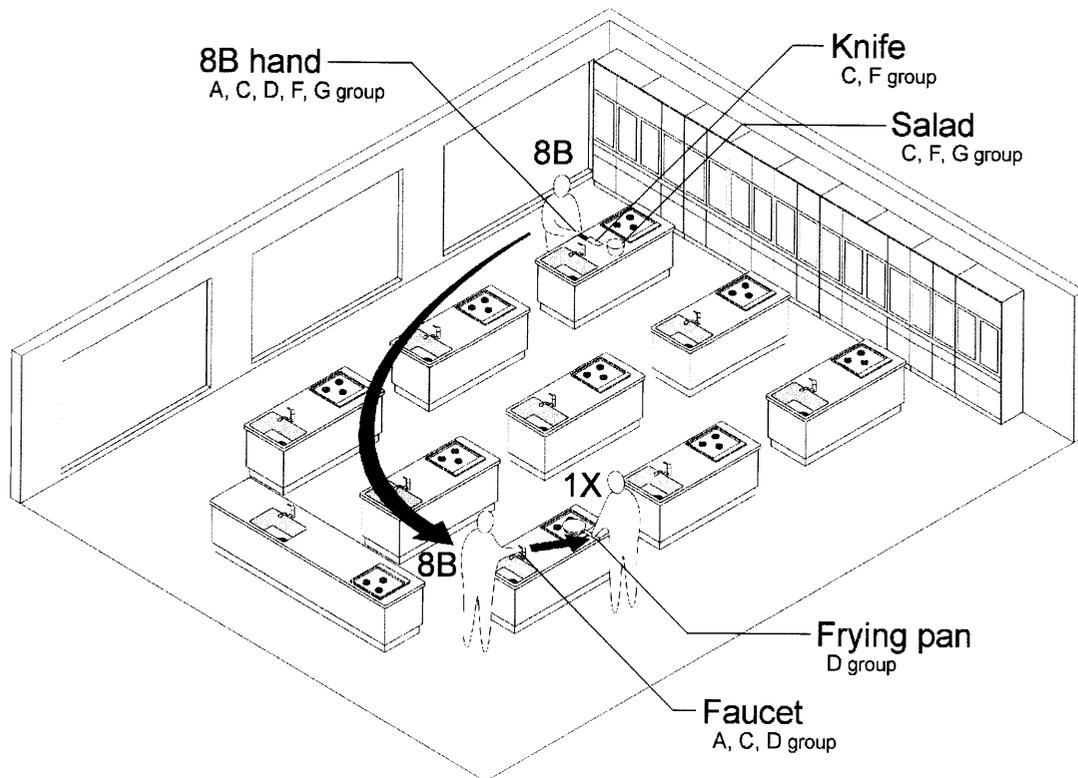


Figure 2-5 Transmission of *S. aureus* originating from the hands of 8B.

The 14 strains of *S. aureus* originating from the hands of study participant 8B were divided into five ribogroups. Strains belonging to the same groups were also isolated from a knife used by study participant 8B, a salad prepared by study participant 8B, a faucet used by study participant 8B, and a frying pan handle touched by an unknown person, 1X, who is thought to have also touched the faucet used by study participant 8B. The surmised diffusion of *S. aureus* from hands and utensils is illustrated above.

8B にインタビューしたところ、幼少期よりアトピー性皮膚炎症状をもち、現在も治療中で手荒れがあることがわかった。調理作業中の 8B 手指から 4.60

\log_{10} CFU/hand の *S. aureus* が、そして 8B が握った包丁から $2.0 \log_{10}$ CFU の *S. aureus* が検出された。包丁を握ったのち、もう一方の手から菌を採取しており、両手の菌数が同等という前提でおよそ 0.25% の菌が包丁に伝播したと考えられた。Chen ら⁸⁾ は手指と水道カラン間の菌の伝播率が 0.01% (-1SD), 0.16% (mean), 1.95% (1SD) であったと報告している。

被験者手指から分離された *S. aureus* のうち、器具や食品に本菌が伝播したのは 8B 由来の株のみであった。手荒れ症状を有する調理者は手指の洗浄殺菌に加えてグローブの着用により、*S. aureus* の伝播を防止しなければならない。Wei ら⁷⁴⁾ は食中毒事故の疫学調査で 27 株の *S. aureus* を単離して PFGE 法によるタイピングを行ったところ、患者と食品取扱者の手指傷口から採取した検体が同じ遺伝子タイプに分けられたので、食品取扱者由来の *S. aureus* が原因で食中毒事故が起きたと報告している。

系統樹によるクラスタリング解析はリボプリントパターン解析によるリボグループの妥当性を評価するために行われた。リボプリントパターン解析は数値化した画像情報を統計理論に基づき解析するもので、類似度が 0.93 以上のパターンを持つ菌株を同一のリボグループに分類する¹⁵⁾。しかし、このグルーピングのアルゴリズムは明らかにされていない。そこで、類似度行列を利用して、遺伝子系統樹作成で多用される UPGMA 法と NJ 法によるクラスタリングを行った。

リボタイピングに供された *S. aureus* 66 株は 3 通りの統計学的理論でグルーピングされ、各グルーピングで共通した菌株では A' ~ G' の 7 グループが編成された (Table 2-7)。リボプリントパターン解析に対して UPGMA 法は 29 株 (85%)、NJ 法は 30 株 (88%) が一致した。そして、各菌株の採取先をもとに *S. aureus* の伝播状況を示したのが Figure 2-6 である。A' および C' グループは 8B 手指

由来株がサラダや水道カランに伝播したこと、そして D´グループは水道カランから 1 X（不特定者）を経てフライパンに伝播したこと、F´グループは 8B 手指由来株が調理操作により包丁に伝播したことを表している。これら A´、C´、D´、F´グループの伝播状況は Figure 2-5 で示した A, C, D, F の各リボグループの伝播状況と一致し、リボプリントパターン解析の妥当性が確認できた。

Table 2-7 Comparison of riboprint pattern analysis and clustering analysis, and selection of common strains.

New group names	Common strains	Riboprint pattern analysis			Clustering analysis		
		Ribogroup	Strain No	N-J groups	Strain No	UPGMA groups	Strain No
A'	K-36	132-S-2	K-36	NJ-1	K-36	U-1	K-36
	K-61		K-37		K-59		K-61
			K-61		K-61		
B'	K-05	150-S-3	K-05	NJ-2	K-05	U-2	K-05
	K-19		K-19		K-19		K-19
	K-22		K-22		K-22		K-22
C'	K-30	153-S-4	K-30	NJ-3	K-30	U-3	K-30
	K-35		K-35		K-35		K-35
	K-44		K-44		K-44		K-44
	K-45		K-45		K-45		K-45
	K-60		K-59		K-60		K-59
	K-75		K-60		K-75		K-60
	K-76		K-75		K-76		K-75
			K-76				K-76
D'	K-31	156-S-1	K-31	NJ-4	K-31	U-4	K-31
	K-33		K-33		K-32		K-32
	K-34		K-34		K-33		K-33
	K-38		K-38		K-34		K-34
	K-39		K-39		K-37		K-37
	K-53		K-53		K-38		K-38
	K-54		K-54		K-39		K-39
	K-55		K-55		K-53		K-53
	K-56		K-56		K-54		K-54
	K-57		K-57		K-55		K-55
					K-56		K-56
			K-57				
E'	K-66	157-S-3	K-66	NJ-5	K-66	U-5	K-66
	K-68		K-68		K-68		K-68
F'	K-29	157-S-6	K-29	NJ-6	K-29	U-6	K-29
	K-42		K-42		K-41		K-40
	K-43		K-43		K-42		K-41
			K-72		K-43		K-42
				K-72		K-43	
G'	K-73	157-S-7	K-40	NJ-7	K-40	U-7	K-73
	K-74		K-41		K-73		K-74
			K-73		K-74		
			K-74				

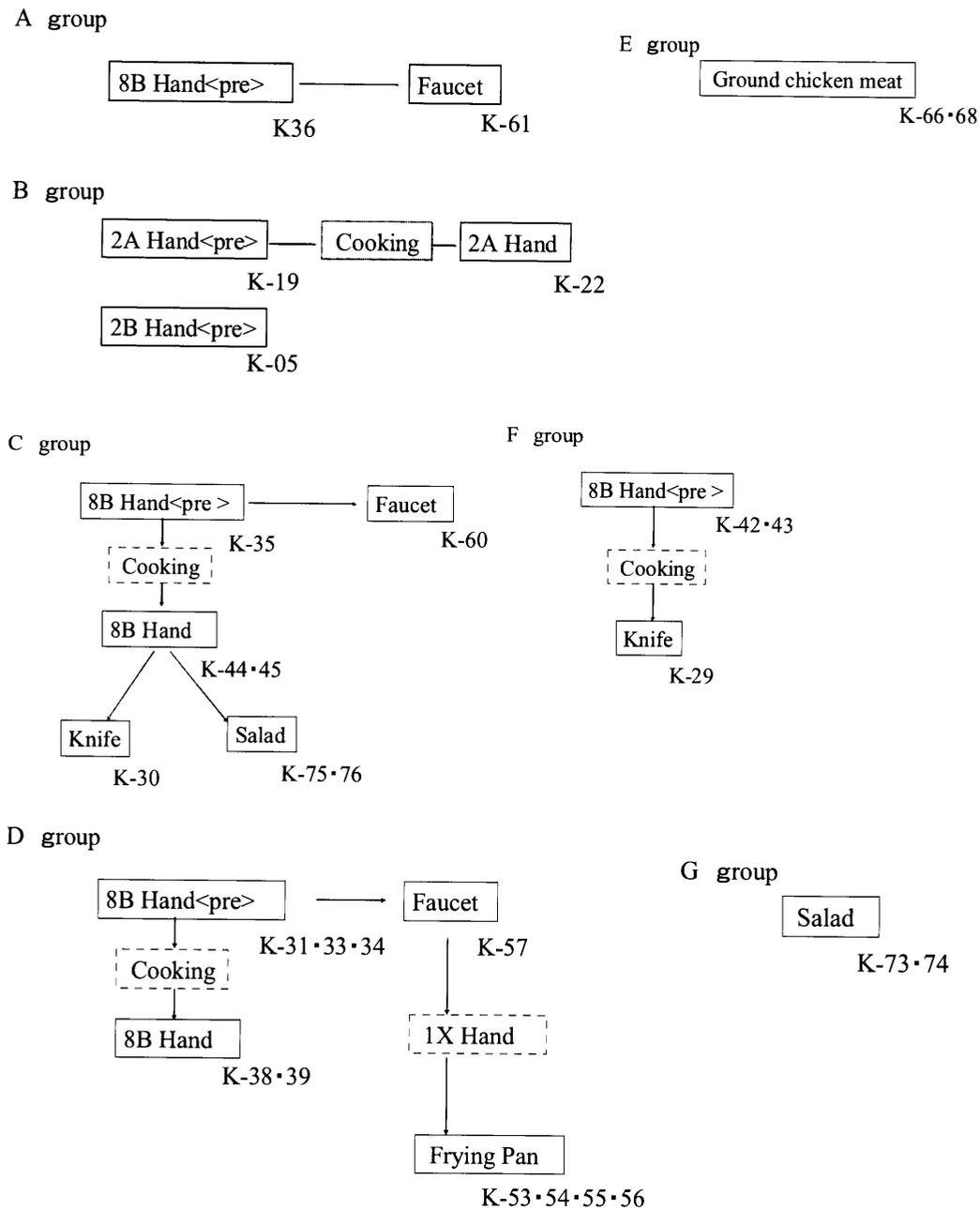


Figure 2-6 Diffusion of *S. aureus* in a food preparation environment.

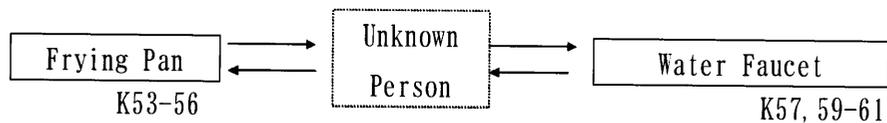
2-2-3-3 BSFGE 法, PFGE 法および RAPD 法

Bingen ら⁴⁾はコアグラマーゼ陰性のブドウ球菌 (CNS) を 8 人の小児患者から 12 株分離し、2 種のプライマーによる RAPD 法で感染源調査を行ったところ、病棟

の同区画内の4名の患者は相互に交差汚染があり、他区画の4名には交差感染がみられなかったとしている。また、笹岡ら⁵⁸⁾は未熟児新生児室内におけるMRSA伝播経路の菌型別解析を2種のプライマーを用いたRAPD法で行い、新生児から伝播したことを示唆した。本研究においてもBSFGE法、PFGE法およびRAPD法で同一型の菌株が分離されたことから、調理施設における*S. aureus*の伝播があったと考察した。

Figure 2-7 に示したように、フライパン由来4菌株(K53~56)とカラン由来の4菌株(K57、K59~61)が同一型だったことから、特定の被験者の手指から伝播、汚染したと考えられる。また、8Bの手指からの分離15菌株(K31、K33~46)は、包丁からの分離2菌株(K29、K30)およびサラダからの分離2菌株(K71~72)と、いずれの型別法でも同一型に分類されたので、8Bが使用した包丁と、調理したサラダは8B手指によって汚染したと考えられる。

Transmission 1 (r 5, b 5 and p 5 type group)



Transmission 2 (r 11, b 12 and p 12 type group)

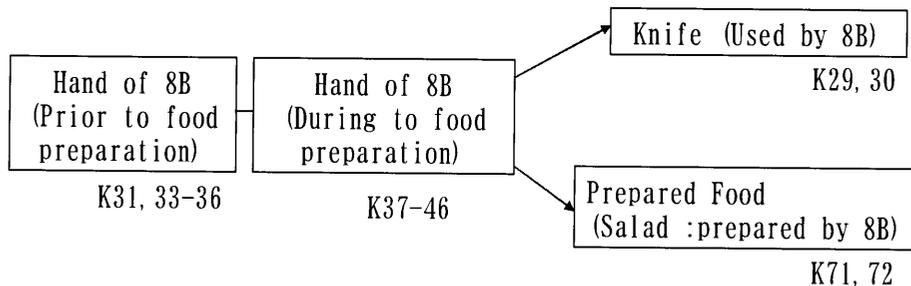


Figure 2-7 Transmission of *S. aureus* surmised based on saucers.

なお、アトピー性皮膚炎症状を有すものは *S. aureus* を多数保菌していること

が示されている^{14, 48, 69)}。8B は手指にアトピー性皮膚炎を患っており、このことが菌の伝播に大きく関与していたと考えられる。

ブドウ球菌食中毒ではコアグララーゼ型やエンテロトキシン型等に注目して、それらの型別結果を汚染源や感染ルートの解析に用いてきた。しかし、森田⁴³⁾によると食品環境から採取された *S. aureus* の毒素産生率は 37.5% と低いこと、環境由来菌の多くがエンテロトキシンで型別できないこと、また PFGE 法では同一コアグララーゼ型に含まれる株をさらに細かく型別できること⁶³⁾、コアグララーゼ型やエンテロトキシン型などの表現型が同じでも PFGE 法による型別では異なる型に判定される場合もある⁶²⁾ ことなどから、菌伝播の実態調査には PFGE 法と同等かそれ以上の識別力をもつ遺伝子多型解析法の適用が有用であると考えられる。

Sma I 処理による遺伝子多型性は泳動原理の異なる PFGE 法 と BSFGE 法で解析した。BSFGE 法は分画分子量対応範囲が広く (500bp~3Mb)、通常の DNA 制限酵素断片の分離から細菌の RFLP、酵母染色体の泳動などに利用可能で、汎用性もあり、安価でもある³⁵⁾。これまで BSFGE 法による *S. aureus* の型別の報告事例はないが、Figure 2-3 に示すように 100~200kb 間の分解能が高く、バンドも明瞭で PFGE 法と同等以上の泳動像が得られたので、BSFGE 法は今後 PFGE 法とデータを共有することが可能となると考えた。しかし 250kb~600kb 間の分解能が PFGE 法に対してやや劣る傾向がみられたので、今後泳動条件の検討が必要である。

RAPD 法は安定性と再現性に問題を残している^{11, 29)}。そこで、適正プライマーの検索を行うとともに複数のプライマーを使用して型別の精度を高めることが行われている⁵⁷⁾。本研究では PFGE 法と同等の型別が可能な RAPD 法を目指して MRSA の疫学解析で報告⁵⁾されている 12 のプライマーの中から比較的多数の

バンドが得られたプライマー (A-03 と F-04) を選択、利用した。さらに、安定性と再現性確認のため 2~4 回試験を行った。その結果、2A 手指由来 14 株と 2B 手指由来の 4 株は PFGE 法で 2 つに型別 (p 10 と p 11) されたが、RAPD 法では同一型 (r 10) に型別された。また、サラダ由来 5 株 (K73~77) と鶏肉由来 1 株 (K80) は RAPD 法では同一型 (r 9) に型別されたが PFGE 法で 2 つに型別 (p 9 と p 12) された。RAPD 法による菌株の型別では、PFGE 法による型別と 8 型 (r 1~r 8) は一致したが残りの型は一致しなかった。

PFGE 法は結果が出るまで数日を要す。RAPD 法による型別は識別能にやや劣るが、その迅速性と簡便性が特徴である。食品を取り扱う環境からは時に多数の株が分離されることがある。その際に多数株の絞り込みを RAPD 法で行い、その次の段階で PFGE 法による詳細な型別を行うなど、両者の特長を生かした遺伝子型別法が汚染源調査や疫学調査に有用である。

2-3-4 まとめ

リボタイピング法、PFGE 法、BSFGE 法そして RAPD 法による型別の結果を Table 2-8 にまとめた。PFGE 法、RAPD 法はおおむね菌の起源に対応した型別がなされたが、リボタイピング法では 68 菌株が 34 に型別され同一起源の菌株が 2~6 の型に分類された。

リボタイピング法は細菌の染色体上にあるリボゾーム RNA をコードしている遺伝子をプローブとして用いてリボゾーム RNA 遺伝子と隣接する染色体 DNA の多型性を検出する RFLP 解析法である。*S. aureus* の環状染色体上にはリボゾーム RNA オペロンが 6 箇所存在している。リボゾーム RNA 遺伝子と隣接する染色体 DNA 部位を含む DNA 断片は突然変異、DNA 断片の欠失や挿入などによって変化している可能性があり、同一菌種間でも異なる大きさとなって多型性を示す

Table 2-8 Origins, coagulase types, ribogroups, RAPD-types and PFGE -types of 66 isolated strains.

Isolate code	Origin	Coagulase type	Ribogroup	Group name ^a	RAPD type	BSFGE PFGE type
K-03	Hand of study participant 2B ^b (prior to food preparation activities)	Indeterminate	150-S-1		r10	b11
K-04		Indeterminate	150-S-2			
K-05		Indeterminate	150-S-3	B		
K-06		Indeterminate	150-S-4			
K-07	Hand of study participant 4C ^b (prior to food preparation activities)	VII	132-S-7		r1	b1
K-08		Indeterminate	150-S-6			
K-09		Indeterminate	150-S-7			
K-10	Hand of study participant 2A ^b (prior to food preparation activities)	Indeterminate	150-S-8		r10	b10
K-11		Indeterminate	151-S-1			
K-12		Indeterminate	151-S-2			
K-13		Indeterminate	151-S-3			
K-14		Indeterminate	151-S-4			
K-15		Indeterminate	151-S-5			
K-16		Indeterminate	151-S-6			
K-17		I	151-S-7			
K-18		Indeterminate	151-S-8			
K-19		Indeterminate	150-S-3	B		
K-20		Indeterminate	152-S-2			
K-21	Indeterminate	152-S-3				
K-22	Hand of study participant 2A ^b (during food preparation activities)	Indeterminate	150-S-3	B	r3	b3
K-23		Indeterminate	152-S-5			
K-24	Hand of study participant 7B ^b (during food preparation activities)	II	152-S-6		r2	b2
K-25		II	152-S-7			
K-26	Knife(used by participant 7A ^b)	III	152-S-8		r2	b2
K-27	Hand of study participant 7B ^b (during food preparation activities)	II	161-S-1		r3	b3
K-29	Knife (used by participant 8B ^b)	V	157-S-6	F	r11	b12
K-30		V	153-S-4	C		
K-31	Hand of study participant 8B ^b (prior to food preparation activities)	V	156-S-1	D	r11	b12
K-32		V	153-S-2			
K-33		V	156-S-1	D		
K-34		V	156-S-1	D		
K-35		V	153-S-4	C		
K-36		V	132-S-2	A		
K-37		V	132-S-2	A		
K-38	Hand of study participant 8B ^b (during food preparation activities)	V	156-S-1	D	r11	b12
K-39		V	156-S-1	D		
K-40		V	157-S-7	G		
K-41		V	157-S-7	G		
K-42		V	157-S-6	F		
K-43		V	157-S-6	F		
K-44		V	153-S-4	C		
K-45		V	153-S-4	C		
K-46		V	155-S-3			
K-51		Chopsticks(used by participant 6C ^b)	VIII	155-S-7		
K-53	Frying Pan	V	156-S-1	D	r5	b5
K-54		V	156-S-1	D		
K-55		V	156-S-1	D		
K-56		V	156-S-1	D		
K-57	Water faucet	V	156-S-1	D	r6	b6
K-58		III	156-S-6			
K-59		V	153-S-4	C		
K-60		V	153-S-4	C		
K-61	V	132-S-2	A	r5	b5	
K-63	Foodstuff (chicken)	VIII	165-S-4		r7	b7
K-65		VIII	157-S-2			
K-66		Indeterminate	157-S-3	E	r8	b8
K-68		Indeterminate	157-S-3	E		
K-69	VIII	165-S-5				
K-71	Prepared food(Salad: prepared by 8B ^b)	V	157-S-5		r11	b12
K-72		V	157-S-6	F		
K-73		V	157-S-7	G		
K-74		V	157-S-7	G		
K-75		V	153-S-4	C		
K-76		V	153-S-4	C		
K-77		V	165-S-3			
K-80	Foodstuff (chicken)	V	165-S-8		r9	b9

^a Group names were assigned when a ribogroup included two or more strains. Examples are as follows: 132-S-2;A, 150-S-3;B, 153-S-4;C, 156-S-1;D, 157-S-3;E, 157-S-6;F, 157-S-7;G.

^b Identifies study participant.

とされる。しかし、逆にリボタイピング法は限られた範囲内の多型解析をしており、疫学では十分な解析力が期待できないとされている。そこで、PFGE 法、IS タイピング法、リボタイピング法を組み合わせる解析することによってほぼすべての菌株を特異的にタイピングできるという報告もある³⁰⁾。

本研究ではリボプリントパターン解析までを全自動で行うリボタイピング装置を使用した。通常、PFGE 法、RAPD 法では電気泳動像のパターン認識は肉眼での観察が通例で、わずかなバンド位置の違いは経験的に受容できると判断し同一株とみなすことがある。しかし、全自動リボタイピングは一連の解析システムに依存しており、光学的バンドパターン解析により、わずかなプリントパターンの違いも識別するので、多くのリボタイプが与えられると考えられた。

PFGE 法や RAPD 法による型別から *S. aureus* の伝播実態を推定したが、これはリボタイピング法による伝播実態の推定結果に含まれ、PFGE 法と RAPD 法では伝播実態の一部を明らかにしたということになる。しかし、PFGE 法と RAPD 法の型別からも貴重な情報が得られており、疫学調査や汚染源調査においてもリボタイピングは詳細な結果を提供できるが、PFGE 法や RAPD 法を用いてもそれらの調査に十分な情報が得られる可能性があると考えられた。

2-3 一般調理施設（2）および大量調理施設

2-3-1 実験材料及び実験方法

2-3-1-1 菌の採取

2-3-1-1-1 一般調理施設（2）

6 グループ 34 名が調理した実習室（名古屋栄養専門学校内）の各所および食材料を被検対象とした。試料採取先は調理器具、設備、備品および食材料である。ふきとり法で 53 検体の試料菌液を得た。

2-3-1-1-2 大量調理施設

調理者 21 人と教員 2 人により 100 食分の給食業務が大量調理実習室（名古屋栄養専門学校内）で実施された。この実習室内各所と調理者手指を被検対象とした。実習室入室前にふき取り法で調理者の手指（片手、きき手）から、調理作業中に、器具・設備・食品から計 62 検体の試料菌液を採取した。調理者手指、器具、設備はふきとり法で、食品はその一部を採取し試料菌液を得た。

得られた各菌液 0.2 ml を卵黄加マンニット寒天培地 (Full-Steri) に塗布し、35℃、48 時間培養、黄色で光沢があり周囲に白濁環を示すコロニーを釣菌、分離した。なお、同時に試料菌液 1 ml を SCD プイヨン培地（日水製薬）に入れ、35℃、24 時間増菌培養し、これを 10 倍、100 倍、1000 倍に希釈した。各希釈菌液も上記と同様に卵黄加マンニット寒天培地で 35℃、48 時間培養し、黄色で光沢があり周囲に白濁環を示すコロニーを釣菌した。

各同定試験には - 80℃ で保存した株を TSB 培地で一夜増菌した後、SCD 寒天培地でさらに一夜培養したコロニーを使用した。

2-3-1-2 *S. aureus* の同定

分離した菌をラテックス凝集反応（ウサギプラズマ栄研；栄研化学），グラム染色（B&M 山中変法；MERCK JAPAN），およびアピスタフ（APISTAPH；Biomerieux）の各試験に供し、*S. aureus* の同定を行った。分離した菌株は遺伝子多型解析まで - 80℃にて保存した。

2-3-1-3 RAPD 法

2-2 一般調理施設（1）の方法に準じた。

2-3-1-4 BSFGE 法

2-2 一般調理施設（1）の方法に準じた。

2-3-2 実験結果

2-3-2-1 一般調理施設（2）；

2-3-2-1-1 菌の採取・同定

器具 12 検体、設備 27 検体、備品 8 検体および食材 6 検体、計 53 検体中、増菌培養後の 4 検体から 7 株の *S. aureus* を分離した。分離した株は、ラテックス凝集反応陽性、グラム染色陽性であり、アピスタフによる同定検査で *S. aureus* であることを確認した (Table 2-9)。

Table 2-9 Source and number of strains of 7 identified strains of *S. aureus*

Source		Contaminated sources /Sources tested	Number of strains
Utensils	Knives	0/6	0
	Cutting board	0/6	0
Facilities	Faucets	2/7	5
	Handle of refrigerator	0/2	0
	Handle of drawer	1/12	1
	Switch of kitchen range	0/6	0
Equipment	Bottle of seasoning	1/5	1
	Handle of pan	0/2	0
	Handle of Kettle	0/1	0
Food	Chicken meat	0/6	0
Total		4 / 53	7

2-3-2-1-2 RAPD 法

Table 2-10 にプライマーA-03 およびプライマーF-04 による RAPD パターンとその由来を示している。プライマーA-03 により増幅されたバンドは 200bp ~2000bp 間で 10~12 本、プライマーF-04 は 9~10 本現れた。プライマーA-03 およびプライマーF-04 で各々2種類のバンドパターンを得た。

よって、7 株の *S. aureus* は 2RAPD 型に型別され、蛇口レバー (No. 2) から分離された *S. aureus* 4 菌株は R01 型に、蛇口レバー (No. 6), 引き出し (No. 6)、調味料 (酢) の容器から分離された *S. aureus* 各 1 菌株は R02 型に別けられた。

Table 2-10 RAPD types (R01/R02) and patterns of 7 isolates of *S. aureus*.

RAPD Types	Representative exsample of RAPD patterns	Source: ^d	Strain codes	n ^e
	M ^a			
R 01	F ^b	Faucet No. 2	a, b, c, d	4
	A ^c			
R 02	F	Faucet No. 6	e	1
	A	Drawer No. 6	f	1
		Bottle of seasoning	g	1

^a PCR Markers (50-2000bp) , ^b F-04 primer RAPD pattern , ^c A-03 primer RAPD pattern , ^d Refer Table2-9, ^e Number of strain

2-3-2-1-3 BSFGE 法

Figure 2-8 に BSFGE 泳動パターンを示す。RAPD 法での結果と同様, 2 型 (B-01 および B-02) に別けられた。

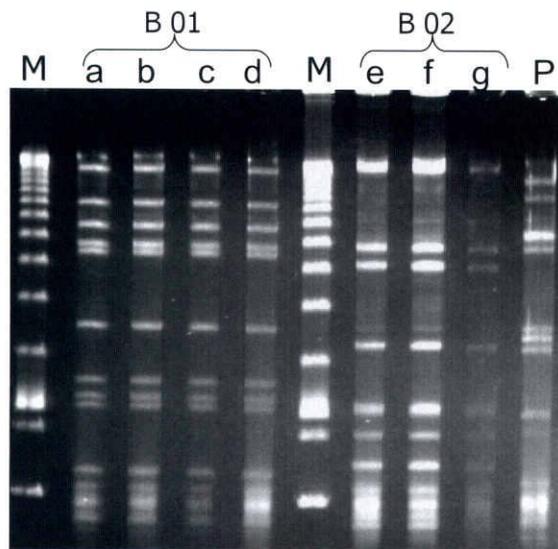


Figure 2-8 BSFGE of *Sma I*-digested genomic fragments of *S. aureus* isolated from kitchen.

Refer Table 2-10 for the source of each strain codes (a~g). M indicates the lambda DNA ladders used as molecular size markers (kb). P indicates positive control.

2-3-2-2 大量調理施設

2-3-2-2-1 菌の採取・同定

調理者の手指 23 検体、器具 6 検体、設備 28 検体および食材 5 検体、計 62 検体中 11 検体より *S. aureus* 53 株を分離した (Table 2-11)。うち、調理者 3 人 (A、B および C 氏) 由来の株が 36 株だった。分離した株は、すべてラテックス凝集反応陽性、グラム染色陽性であり、アピスタフによる同定結果で *S. aureus* であることが確認された。

Table 2-11 Source and number of strains of 53 identified strains of *S. aureus*

Sources		Contaminated sources /Sources tested	Number of strains
Study participants	Hands (before cooking)	3/23	36
Utensils	Knives	0/3	0
	Cutting board	1/3	3
Facilities	Faucets	3/5	6
	Handle of refrigerator	1/2	2
	Handle of dish storage	0/2	0
	Handle of drawer	0/3	0
	Switch of kitchen range	0/4	0
	Handle of rice cooker	0/1	0
	Handle of iron pot	0/2	0
	Handle of steam oven	0/1	0
	Handle of cutting board storage	0/1	0
	Cooking table	1/6	2
Floor	1/1	2	
Food	Carrot, chicken meat	1/5	2
Total		11 / 62	53

2-3-2-2-2 RAPD 法

Table 2-12 および Table 2-13 にプライマーA-03 およびプライマーF-04 による RAPD パターンとその由来を示した。プライマーA-03 により増幅されたバンドは 200bp~2000bp 間で 10~15 本、プライマーF-04 では 9~13 本現れた。*S. aureus* 53 株はプライマーA-03 により 4 型に、プライマーF-04 により 5 型に別けることができた。

Table 2-12 A-03 Primer RAPD patterns of 53 isolates of *S. aureus*.

RAPD-A Types	Representative example of RAPD patterns	Sources ^b	Strain codes	n ^c
a1		Hand of A ^d	1~25, 36, 37	38
		Faucet No. 1 ^e	42, 43	
		Handle of refrigerator	44, 45	
		Cooking table	46, 47	
		Cutting board	48, 49, 50	
a2		Hand of B ^d	26	3
		Faucet No. 2 ^e	38, 39	
a3		Hand of C ^d	27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34	10
		Faucet No. 3 ^e	40, 41	
a4		Floor	51, 52	2

^a PCR Markers (50-2000bp), ^b Refer Table 2-11, ^c Number of strain.

^d Identifies study participant, ^e Identifies faucet

プライマーA-03 による RAPD パターンを a1~a4 型と命名した。a1 型には調理者Aの手指から採取された 27 株のほか、蛇口 (No. 1) と冷蔵庫ドア取手、調理台、まな板、人参由来の株が含まれていた。a2 型には調理者Bの手指から採取された 1 株のほか、蛇口 (No. 2) 由来の 2 株が含まれていた。a3 型には調理者Cの手指から採取された 8 株のほか、蛇口 (No. 3) 由来の 2 株が含まれていた。a4 型は床由来の 2 株であった。

Table 2-13 F-O 4Primer RAPD patterns of 53 isolates of *S. aureus*.

RAPD-F Types	Representative example of RAPD patterns	Sources ^b	Strain codes	n ^c
				
f1		Hand of A ^d	1~25, 36, 37	38
		Faucet No. 1 ^e	42, 43	
		Handle of refrigerator	44, 45	
		Cooking table	46, 47	
		Cutting board	48, 49, 50	
		Food:carrot	53, 54	
f2		Hand of B ^d	26	3
		Faucet No. 2 ^e	38, 39	
f3		Hand of C ^d	27, 28, 31	3
f4		Hand of C ^d	29, 30, 32, 33, 34	7
		Faucet No. 3 ^e	40, 41	
f5		Floor	51, 52	2

^a PCR Markers(50-2000bp), ^b Refer Table2-11, ^c Number of strain,

^d Identifies study participant, ^e Identifies faucet

プライマーF-04によるRAPDパターンをf1~f5型と命名した。f1型、f2型およびf5型に型別された菌株はa1型、a2型およびa5型と一致した。f3型には調理者Cの手指から採取された3株が含まれていた。f4型は調理者C手指の5株と蛇口(No.3)由来株が含まれていた。調理者C手指より分離された*S. aureus*は8菌株のうち3菌株がf3型に、残りはf4型に別けられた。

2-3-2-2-3 BSFGE 法

RAPD法による型別をもとに、無作為に選んだ12株をBSFGE法で型別した。その結果、染色体DNAは11~13本に切断され、これらのバンドは50kb~600kb間に分布した(Figure 2-9)。

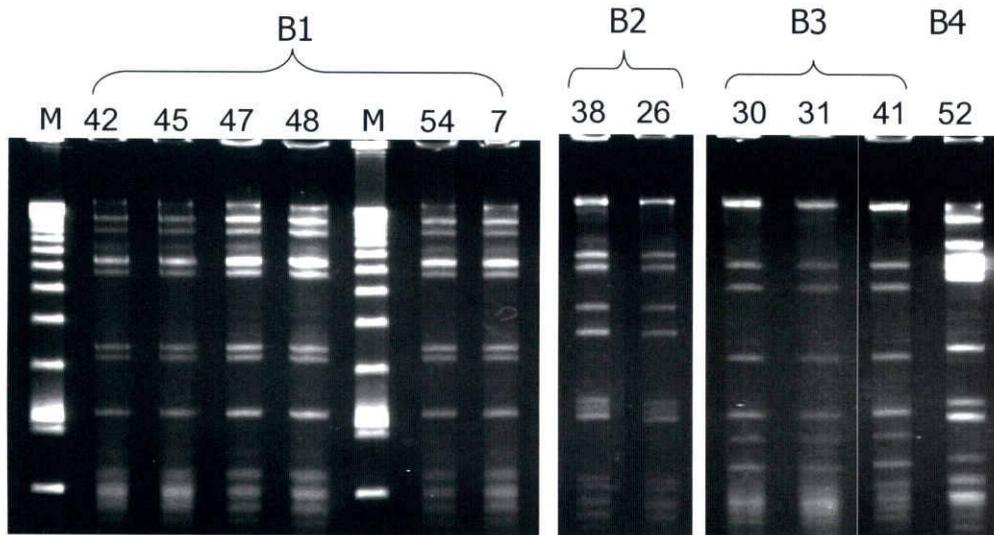


Figure 2-9 BSFGE of *Sma I*-digested genomic fragments of *S. aureus* isolated from foodservice training kitchen.

Refer Table 2-12 and 2-13 for the source of each strain codes (7, 26, 30, 31, 38, 41, 42, 45, 47, 48, 52, 54). M indicates the lambda DNA ladders used as molecular size markers (kb).

BSFGE 法による泳動パターンは 4 型に分けられた。これを B1～B4 型と命名した。B1 型には調理者 A の手指から採取された株 (strain code : 7) のほか、蛇口 (No. 1) (同 : 42) と冷蔵庫ドア取手 (同 : 45)、調理台 (同 : 47)、まな板 (同 : 48)、人参 (同 : 54) の各株が含まれていた。B2 型は調理者 B の手指から採取された株 (同 : 26) と蛇口 (No. 2) (同 : 38) 由来株が含まれていた。B3 型は調理者 C の手指 (同 : 30, 31) と蛇口 (No. 3) (同 : 41) 由来株が含まれていた。B4 型は床 (同 : 52) 由来株であった。

2-3-3 考察

2-3-3-1 一般調理施設 (2)

Table 2-14 に RAPD 法と BSFGE 法による型別結果をまとめた。*S. aureus* 7

株はいずれの型別においても同様に2型に分けられた。R02 および B02 型は採取先の異なる3株が同じ遺伝子型となった。特定の調理者が直接か間接に触れたため、伝播が起きたと考えられた (Figure 2-10)。特定の調理者は1名か複数かは不明だが、手指に付着した *S. aureus* が調理操作中に蛇口レバー (No. 6)、引き出し (No. 6)、調味料 (食酢) の容器を汚染したものと考えられる。

Table 2-14 Sources and genotypes of 7 isolates of *S. aureus*

Sources	Strain codes	n	RAPD types	BSFGE types	
Facilities	Faucet No. 2	a, b, c, d	4	R 01	B 01
	Faucet No. 6	e	1		
	Drawer No. 6	f	1	R 02	B 02
Equipment	Bottle of seasoning	g	1		

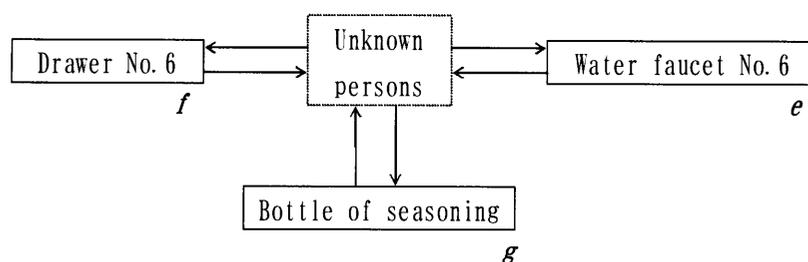


Figure 2-10 Transmission of *S. aureus* surmised based on sources.

The 3 strains of *S. aureus*, *e*, *f* and *g* were typed into RAPD-R02 and BSFGE-B02, were transmitted by an unknown persons.

2-3-3-2 大量調理施設

Table 2-15 に RAPD 法と BSFGE 法による型別結果をまとめている。RAPD 法による型別では、2 種類のプライマーによる型別を統合すると R1~R5 の 5 型に型別された。このうち R3 型と R4 型に型別された株は、BSFGE 法では B3 型にすべ

て含まれ、R1型とB1型、R2型とB2型、R5型とB4型はそれぞれ一致した。

R1およびB1型は、調理者A手指、蛇口(No.1)、調理台、検収台、冷蔵庫の取手、まな板から検出された。このことから調理者A手指由来の*S. aureus*が調理作業中に器具、設備の5箇所を汚染したことが考えられる。また、調理済みの人参から調理者A手指より分離された*S. aureus*と同じ型の*S. aureus*が検出されたことから、食品への汚染もあったことが確認された。調理施設における個人衛生管理において、盛り付け時などで調理済み食品を取り扱う際にはビニール手袋の着用を行うことになっているが、着用されなかったか、着用していても手袋の使用方法が適切でなかったと考えられた。

Table 2-15 Sources and genotypes of 53 isolates of *S. aureus*.

Sources	Strain codes	n	RAPD types			BSFGE types	
			A-03	F-04	A-03+F-04		
Participant	Hand of A	1-25, 36, 37	27				
Utensil	Cutting board	48, 49, 50	3				
Facilities	Faucet No. 1	42, 43	2				
	Handle of refrigerator	44, 45	2	a 1	f 1	R 1	B 1
	Cooking table	46, 47	2				
Food	Carrot	53, 54	2				
Participant	Hand of B	26	1				
Facility	Faucet No. 2	38, 39	2	a 2	f 2	R 2	B 2
Participant	Hand of C	27, 28, 31	3		f 3	R 3	
		29, 30, 32-34	5	a 3			B 3
Facility	Faucet No. 3	40, 41	2		f 4	R 4	
Facility	Floor	51, 52	2	a 4	f 5	R 5	B 4
Total			53	4 types	5 types	5 types	4 types

*S. aureus*が分離された3人の調理者の手指には、調理者A; $2.9 \log_{10} \text{CFU/片手}$ 、調理者B; $1.7 \log_{10} \text{CFU/片手}$ 、調理者C; $2.7 \log_{10} \text{CFU/片手}$ の*S. aureus*が存在した。調理者Aはアトピー性皮膚炎症状を有し、調理者B, Cは慢性的に手あれ症状を持っていた。アトピー性皮膚炎患者には*S. aureus*の検出率が有意に

高いことが知られている^{14, 48, 69)}。皮膚炎症状をもつ調理者は手洗いを行っても、接触した器具や食品に *S. aureus* を伝播させる可能性が高いものと考えられる。

なお、調理者 B にインタビューしたところ、蛇口カラン No. 2 には直接触れておらず、調理者 B の手指由来の *S. aureus* が別の調理者を介して伝播した可能性があった。

Figure 2-11 に示したように、直接的ないし間接的に *S. aureus* が伝播したと考えられたが、大量調理施設においては一人の調理者が広範囲に多くの異なる作業を行うため、多数の *S. aureus* を保有する調理者が含まれていた場合、施設内に次々と *S. aureus* が伝播する可能性がある。また、汚染源の調理者 A, B, C 以外の調理者が伝播に関与した可能性もあった。作業中の手洗い、器具の洗浄、グローブの適切な使用が *S. aureus* 汚染対策上重要である。

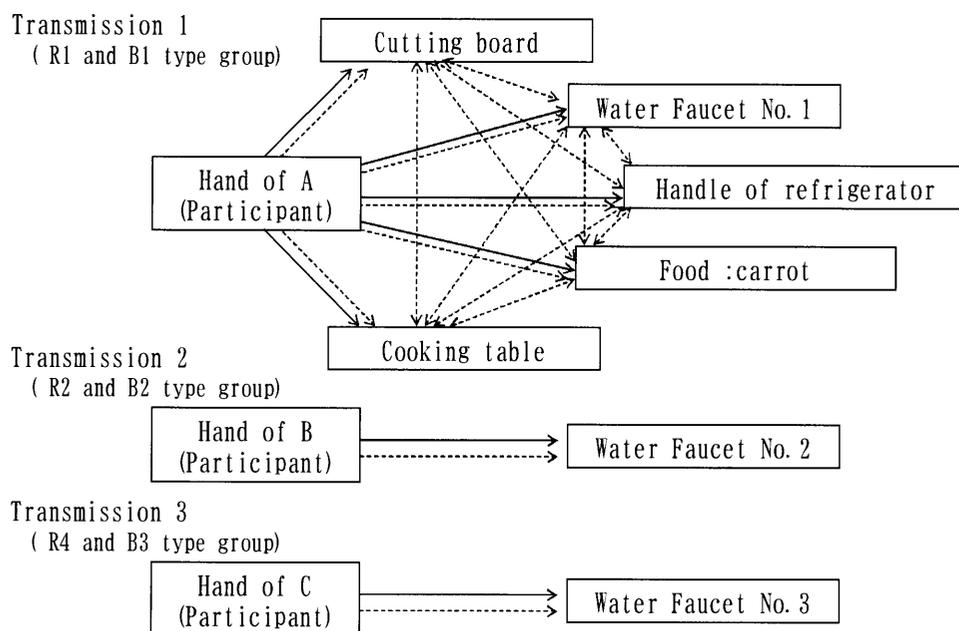


Figure 2-11 Transmissions of *S. aureus* surmised based on saucers.

The directly transmission indicates: ———> , The indirectly: - - - - ->

2-3-4 まとめ

一般調理施設(2)より分離された *S. aureus* 7 菌株は RAPD 法による型別で R01 と R02 型に、BSFGE 法による型別 B01 と B02 型に別けられた。これらの菌株が調理者由来であるかは不明であるが、R02 および B02 型に含まれた 3 菌株は異なる場所から検出されており、人の手指による汚染があったことはまちがいのないことである。また、R01 および B01 型は蛇口レバー (No. 2) より検出されており、人の手指の接触により伝播した可能性が高い。一方、大量調理施設より分離された *S. aureus* 53 菌株は RAPD 法による型別で 5 型に、BSFGE 法による型別 4 型に別けられ、これらのうちいずれの型別においても 3 型が 3 名の調理者手指より分離された。調理施設における *S. aureus* の伝播は調理者の手指を介して発生し、特にアトピー性皮膚炎等の *S. aureus* を常在化させた調理者が汚染源となりやすい。本実験では、ふき取りによる採取で $2\sim 3\log_{10}\text{CFU}/\text{片手}$ の *S. aureus* を有した 3 名の調理者が *S. aureus* の汚染源であった。このことは西田⁴⁸⁾による調査結果と一致した。

また、2つの伝播実態調査において RAPD 法は、BSFGE 法と同等の解析能を有した。一般調理施設(2)では分離した *S. aureus* 7 株の型別は RAPD 法と BSFGE 法で一致した。大量調理施設より分離した *S. aureus* 53 株の RAPD 型別は BSFGE 型別と 3 型は一致したが、残りは一致しなかった。

RAPD 法は解析にかかる時間が少なく、操作も簡便であることが特徴であり、その特長を生かして食品製造現場や厨房における伝播実態調査に活用できる。今後さらに PCR 条件や泳動条件の検討を行い、再現性や PCR 反応の安定性を上げるための研究が望まれる。

本研究では、採取された株すべてを RAPD 法で型別し、次に型別された株を任意に選択して BSFGE 法で RAPD 型の妥当性を検証することにより、効率のよい遺

伝子多型解析が可能であることを示した。また、迅速性が要求される汚染源調査や菌伝播実態調査に RAPD 法を一次スクリーニング法として活用できることを示唆した。

終章

3-1 調理施設の微生物学的リスク評価

我が国では腸管出血性大腸菌 0157 食中毒事故を契機に、学校給食施設などの大量調理施設に対する衛生指導、衛生管理教育がすすんだ。そのなかでも給食施設の衛生管理のバイブルともいえる「大量調理衛生管理マニュアル」は HACCP の概念を調理過程に根付かせたといえる。その結果、極端な例としては学校給食でキュウリを加熱して提供するなど、食品または調理者由来の食中毒菌にこれまで以上にさまざまな注意が払われるようになり、調理食品の多くから食品起因の疾病原因が減少した。

微生物による食品事故は社会全体にとって、特に業界や企業にとっては大きな問題である。食生活スタイルの変化に伴い「中食」に依存する人々が増加しているのに伴って、惣菜、弁当などの調理済み食品の生産スケールが近年増加している。このことは食品の安価生産には寄与しているが、食品事故の立場で言えば非常に大きな問題を内包している。加えて、最近の口の肥えた消費者は食品のよりマイルドな製造、腐敗防止、貯蔵条件を望んでいる（自然に近い状態や低塩など）ことも調理、製造における微生物増殖を促進させることを助長している。こういったスケール増加に伴う事故の大型化や保存性の脆弱化（冷蔵、チルドなど低温への依存）による食品に対する微生物学的リスクの増大が現に始まっており、今後も増えていくことが予想される。

食中毒の多くは、食中毒菌で汚染された食品の摂食、ないし食中毒菌の産生した毒素の摂取が原因で発生する。食品への微生物汚染は食品を衛生的に取り扱わないことにより起きる。菌の増殖は本来食品が持っている特性（たとえば水分活性、pH、酸化還元電位、栄養分、抗菌物質など）やその食品がおかれた

環境（温度、湿度、雰囲気空気など）に依存するが、増殖する前に洗浄や殺菌操作で微生物を残存させないことが重要である。食中毒予防では微生物を付けない、増殖させない、殺す、の3原則を重視している。

このような基礎的な知見に加えて、調理環境中で汚染、増殖する可能性のある微生物の動態を明らかにすることが期待されている⁷⁵⁾。管理対象の微生物の動態が明らかになれば、これら微生物による食中毒事故を未然に防ぐことができる。すなわち、調理過程における有害微生物の伝播量を明らかにするなど、微生物学的リスク評価を行うことで事故が予防可能となる。そのためには、有害微生物の汚染の経路や原因(起源)を明らかにするための有効な手法を確立、取得することが必要である。

微生物学的リスク評価で行われる「暴露評価」とは汚染経路、汚染源を明らかにし汚染菌数と汚染頻度を分析することである。「暴露評価」により調理過程における有害微生物の動態、伝播量が明らかになると、微生物汚染防止に有効な情報が提供されることになる。「暴露評価」では微生物の検出、計測、同定を行うが、これまでは形態学的な試験、生理学的な試験を基礎に行ってきた。しかし、これらの試験では特に正確な同定ができないことがしばしばあったので、識別能も低かった。一方、遺伝子の多型性に基づく食中毒菌の型別はこれまでの方法に比べて精度が高いので、汚染の経路や汚染源特定に有効な手法となるとされている⁶⁵⁾。

本研究は調理操作中の手指と食品間の細菌伝播量（移行率）を明らかにすることを目的に、手指を介した細菌伝播の実態を解析した。また、食中毒菌である黄色ブドウ球菌の汚染経路と汚染源を明らかにすることができる簡易な遺伝子多型解析法（RAPD法）開発した。そして、RAPD法による汚染経路と汚染源の追跡はPFGE法と同等の結果を得る事が可能で、本法が一次スクリーニング法と

して活用できることを明らかにした。

3-2 調理過程における細菌の伝播

3-2-1 手指を介した食品への伝播

調理施設における細菌の伝播は食品を取り扱い中、あるいは多様な調理操作中に発生する。Humphrey¹⁹⁾らはサルモネラ菌が厨房内の調理過程で手指、器具、設備機器表面に汚染したと報告した。また、食品を汚染していたカンピロバクター^{18, 54)}や SRSV (Small Round Structured Virus; 小型球形ウイルス)³⁴⁾が調理施設内で検出され、交差汚染を引き起こした報告もある。

本研究ははじめに調理過程における細菌伝播現象の数量的解析を行った。そして、調理操作中に細菌が手指から食品へ移行する割合（移行率）を明らかにした。移行率はマグロでは $1.60 \pm 1.80\%$ (平均±標準偏差)、キャベツで $1.30 \pm 1.14\%$ (平均±標準偏差)であった。また、両者の母平均に有意差はなかった。手のひらに包み込むように接触した場合は、2つの食品はそれぞれの特性に関係なく同様のメカニズムで菌は移行したと考えられた。

なお、実験ではキャベツのつかみ方を統一できず、指先だけでつまむ被験者と、手のひらに包むようにつかんだ被験者がおり、これが菌の移行率に大きな影響を与えた。指先だけでつまんだ被験者(8/24人)では移行率は0.03%以下であった。この場合の移行率は手指の接触面積に影響を受けることは容易に予想できたので、実験条件の不統一がデータのばらつきの原因になったと考察した。しかし、実際の調理操作においては調理者の操作習慣などが微妙に異なる。キャベツデータのばらつきはこのような被験者の実際の調理操作における微妙な差異を反映したものであると考えることができる。

手指から食品へ移行する菌量は対数正規分布に従った。対数正規分布は生物

現象、その他の現象に広く認められる統計分布であり、Montvilleら³⁹⁾は厨房内の器具、機器表面と各種食品の微生物検査データを集計したところ、全データが対数正規分布したと報告している。

Chenら⁸⁾は厨房での食品調理に関係する手とそれ以外の表面との間における細菌移行率を調べた。手、食品及び厨房表面間の移行率は0.0005%未満～100%以上の高い変動があり、正規分布を用いて移行率の対数値で変動を表わした。この報告は食品調理の各種段階での交差汚染リスクの定量によって、家庭及び食品サービス業者の厨房における微生物学的リスク管理実施のための科学的基礎を提供できた報告といえる。

微生物学的リスク評価を行ううえで、暴露評価に関するデータは極めて重要である。特に、調理過程は食品チェーンの最終段階であり、調理中の汚染菌数や汚染頻度についてのデータはリスク評価に大きな意義がある。しかし、調理過程は毎回取り扱う食品が異なり、調理者の手作業が多く、作業内容も複雑でシステム化されにくいという特徴がある。それゆえ、手指による二次汚染に関する知見の集積はまだ少ないと言わざるをえない。本研究結果は微生物学的リスク評価に利用できる科学的データを提供したものである。

なお、移行率ではなく手指への残存率の観点から考察すると、手指に接種した菌（通過菌）のほとんどが食品をつかんでも手指に残存した。このことは調理者が手洗いを怠れば、いろいろな接触のたびに汚染が発生する可能性をもっているということであり、作業が変わる毎に手洗いを励行する衛生慣行の重要性を裏付けることでもあった。

3-2-2 食材由来菌の手指への伝播

食品由来菌の手指への移行率は食品の菌数と取り扱い方法に影響されること

が明らかになった。3種の食品（もやし、鶏挽肉、あさり）は1gあたりの菌数がおおよそ $2 \log_{10}$ ずつ異なった。菌数の多い食品ほど、手指に移行した菌数は多かった。しかし、移行率ではその逆で、菌数の多い食品ほど移行率は低かった。

Montviller ら⁴²⁾ はナリジクス酸抵抗性のアエロゲネス菌 (*Enterobacter aerogenes*) を用い、食品取扱い用グローブを通した細菌の移行について検討した。このとき、低濃度で菌を接種した手から移行した菌の移行率は高く、接種が高濃度になるほど移行率は低くなったと説明した。このことはグローブを通した移行率は、接種量の多寡により影響されている可能性を示唆した。さらに、Montville ら⁴⁰⁾ は鶏肉からまな板、まな板からレタスなどの8場面を想定し、*E. aerogenes* の接種量を変えて移行率を計測し、接種量の違いが移行率に影響するか否かについて調べた。接種量を $1.90 \sim 9.37 \log_{10}$ CFU/対象物の範囲で検討したところ、接種量は移行率に有意な影響を与え、負の相関があることを示した。そして、細菌の相互汚染を検討する際には、接種量の影響を考慮する必要があると結論した。

本実験では菌を接種したのではなく、菌数の多い食品に手指を接触させたが、上記と同様の負の相関傾向が見られた。したがって、先行研究の結果に照らして考察すると、接種（接触）菌量が移行率に大きく影響したと推測されるが、本実験条件では食品の取り扱い方法も食品により異なっていたことから、これも移行率に影響を及ぼしたと考えた。これまで、取り扱い方法の影響について検討した先行研究はないが、今回の結果は以下のように考えることもできる。すなわち、あさりのように菌数が少なくても、水中で菌と接触する場合（液相-固相接触）は高率に移行（平均 4.367%）し、もやしのように菌数は多くても、指先だけでつまむ（固相-固相接触）様式では移行率は低い（平均 0.014%）。

一方、鶏挽肉は鶏卵などの副原料を入れたペースト状態で接触したので、中間の移行率（平均 0.192%）になったと考えられる。食品との接触の様式（いわゆる調理操作）に移行率が依存すると仮定すると、調理操作により手指の菌の汚染度合いが異なるので、リスクの軽減には移行率が高い水中での食品との接触を避けるなどの調理操作の工夫が必要である。もちろん、グローブを着用するなど直接食品と接触しない方法も基本的な対策として考えられる。

結局、食品の菌数と取り扱い方法が菌の手指への移行にどのように関与したかはわからなかったが、暴露評価のモデル実験における今後の課題が明らかになった。調理過程の二次汚染に関する研究には、調理操作を分類、体系化し、食品と手指との接触様式をモデル化した実験系を構築することがまず必要である。接触様式ごとに細菌移行の傾向が明らかになれば、各調理操作における、的確な汚染対策の構築が可能になる。食品から手指への二次汚染に関する研究は少ないが、本データは微生物学的リスク評価に利用しうる科学的データを提供できた。

3-3 *S. aureus* の伝播と汚染源

黄色ブドウ球菌食中毒の予防には各種食品の本菌での汚染実態を把握する⁷²⁾ことはもちろん、食品の調理過程に携わっている人々における本菌の保菌実態^{28, 44)}も把握しておくことが肝要である。入倉ら¹⁰⁾は食品取扱者の保菌状況を調査し、1414人の被験者のうち242名(17.1%)の手指から黄色ブドウ球菌を検出した。

本研究での保菌状況調査では一般調理施設(1)調理者26名中4名、大量調理施設の調理者23名中3名、計49名中7名から黄色ブドウ球菌を検出した(14.3%)。このうち汚染経路が明らかになり、汚染源と考えられた調理者は5

名であった。黄色ブドウ球菌の汚染では人の手指が汚染源である可能性が高い。手指が何らかの要因で黄色ブドウ球菌汚染の汚染源となりその手指から器具、設備、食品に伝播していったのではないかと推測した。

小沼²³⁾は細菌の汚染状況を調査するために病院給食施設のふき取り検査を実施した。検体から検出した黄色ブドウ球菌の汚染経路を調べる目的でリボタイプピングを行い、そのリボタイプから汚染源と汚染経路を推測した。黄色ブドウ球菌の汚染経路は調理者手指あるいは野菜洗い液から調理施設全体に広がったものと推測され、その汚染源は手指である可能性が高いと考えた。

本研究の実験では汚染源となった調理者 5 人のうち、2 名はアトピー性皮膚炎症状を自認、2 名は慢性の手あれ症状をもつ調理者であることを確認した。このことは調理者の健康管理は結核や消化器系の病気の排除に加え、従来から指摘されているような手指の衛生管理の徹底と汚染防止措置が必要であることを示した。

3-4 *S. aureus* の遺伝子多型解析

黄色ブドウ球菌の伝播、汚染経路、汚染源を正確に把握するにはこの菌を正確に型別する必要がある。これまで、黄色ブドウ球菌の汚染経路の解明にはコアグラマーゼ型やエンテロトキシン型が利用されてきたが、これらは型別能(識別能)で劣ることから、最近では PFGE 法など遺伝子多型解析による型別が多く用いられるようになった。

PFGE 法は院内感染原因菌の 1 つである MRSA の型別法として確立されている³⁷⁾。食中毒菌の PFGE 型別は本来、腸管出血性大腸菌 (*E. coli* 0157:H7)、サルモネラ菌 (*Salmonella Infantis*)、黄色ブドウ球菌などの疫学的解析に応用されていた。清水ら⁶¹⁾は食中毒の原因となった黄色ブドウ球菌のうちコアグラ

一ゼVII型の129株の型別を行い、A, B, Cの3タイプに分類し、さらにA型は33のサブタイプに、またCタイプは4のサブタイプに分類した。そして、PFGE法によりVII型菌を分類し、同じサブタイプの菌が数年間隔で同じ地域に食中毒を発生させていることを明らかにした。

ブドウ球菌食中毒の疫学的研究においても、Weiら⁷⁴⁾は27株の*S. aureus*を単離してPFGE法で型別を行い、食中毒患者から検出された株と同じPFGE型の株を調理者の手指から発見した。このことは調理者の手指由来の菌が食中毒を起こしたことを意味しており、手指の荒れや傷がある調理者は手洗いでなく、グローブの着用が必要であることを認識させる報告であった。

このように、PFGE法は感染菌や食中毒菌の遺伝子多型解析で標準的方法として多くの調査で実績をあげている。通常、PFGE法といえば、バイオラッド社のCHEF法によるものを指す。BSFGE法はPFGE法と電気泳動の電場の状態が異なるだけで、PFGE法と基本的には同じである。BSFGE法による黄色ブドウ球菌の型別の報告はこれまでのところみられない。BSFGE法はPFGE法による泳動像において100~200kb間のバンドの分離が優れていた反面、250~600kb間バンド間隔が狭いので、この領域での解像度を上げるべく泳動条件の設定が今後の課題である。

PFGE法およびBSFGE法は菌株識別能は優れているものの、手技が複雑かつ時間がかかるものであるため、今回はより簡便な方法として、*S. aureus*の汚染経路および汚染源調査に有用なRAPD法を開発した。

近年、RAPD法による遺伝子多型解析法は各種細菌の型別に広く用いられるようになった。一般的なPCR法が特異的なオリゴヌクレオチドのプライマーを用いて鋳型DNAを増幅するのに対し、RAPD法は任意のプライマーを用いるためにDNAのどの部分が増幅されるかは明らかではない。しかし、同一菌株において

はその DNA 生成物に再現性、特異性があり、株ごとの相違点は泳動パターンの違いとなって現れる。そこで、RAPD 法により正確に型別するには、いかに切断されていない DNA を抽出するかが重要な因子となる¹⁶⁾。フェノール・クロロホルム法による標準的な DNA 抽出法はゲノム DNA をできるだけ切断しないで取り出す方法として汎用されるが、時間がかかり、有毒な薬品を使用する点に問題がある。一方、抽出キットを用いる方法はミキサーを使用するとき DNA の安定性が損なわれるという問題があるものの、短時間で安全に DNA の抽出が可能である。今回、藤本ら¹⁰⁾の方法に従い TaKaRa の Gen とるくん(酵母用)を用いたところ、安定して DNA が抽出できたので手技時間を節約できた。しかし、さらに簡便な熱抽出法については今回は検討していないので、今後の課題としたい。

PCR 反応においては市販の PCR プレミックスに 3.0mM となるように Mg を添加しただけで、藤本ら¹⁰⁾が選択した KlenTaq DNA ポリメラーゼと同等の泳動像を得た。また、北条ら¹⁶⁾は RAPD 法において pH8.5 が至適であったと報告している。今回は pH の影響については検討しておらず、今後の課題としたい。

本研究において一般調理施設(1)より分離した黄色ブドウ球菌 66 株のコアグララーゼ型は I 型：1 株、II 型：3 株、III 型：2 株、V 型：34 株、VII 型：1 株、VIII 型：4 株、および不明 21 株であった。一方、リボタイピングでは 39 型(リボグループ)に、PFGE 法および BSFGE 法では 12 型に、RAPD 法では 11 型に型別された。清水ら⁶²⁾の報告の場合と同様に、コアグララーゼ型と PFGE 型には関連はみられなかった。

型別結果をもとに伝播経路と汚染源の解析を行ったところ、リボタイピングより 5 系統(A, B, C, F, F グループ)、PFGE 法, BSFGE 法および RAPD 法により 2 系統の汚染経路が推定できた。また、一般調理施設(2)および大量調理施設におけ

る黄色ブドウ球菌の分布と汚染経路の追跡を RAPD 法および BSFGE 法によって解析を試みたところ、計 4 系統の汚染経路があることが判明した。

リボタイピングによる型別結果からは *S. aureus* が器具を介してさらに別の人の手へ、さらにその人物が触れた器具へと、次々と伝播したことが推定された。このことは通常の調理環境において人や器具を介した伝播が広範囲に及ぶことを示唆するものである。そして、この伝播では調理者の手指との接触が主要な要因となる。

これらの成果は遺伝子多型解析法が黄色ブドウ球菌の汚染経路および汚染源調査に威力を発揮することを実証した。特に、RAPD 法は識別能が若干劣るが、短時間で安価に解析でき、調査に実用的であるといえる。

3-5 結論

調理過程における手指と食品間の細菌伝播の数量的解析を行い、細菌の伝播割合（移行率）を明らかにした。その解析は微生物学的リスク評価における「暴露評価」に相当し、手指を介した二次汚染に関するモデル実験の課題を提案した。この成果は、家庭及び食品サービス厨房における食中毒予防対策として実施されるリスク管理のための科学的データとして利用される。また、調理施設等から採取した黄色ブドウ球菌の遺伝子多型解析を行い、伝播実態を推定した。リボタイピング、PFGE 法、BSFGE 法および RAPD 法を用いて型別を行い、結果を比較検討した。これらのうち、RAPD 法は PFGE 法および BSFGE 法と同等の精度で菌株を識別でき、その簡便性や迅速性から一次スクリーニング法として疫学調査や汚染実態調査に利用できることを実証した。本 RAPD 法は DNA 抽出、プライマー、PCR 条件等の検討を行う余地を残しており、今後の研究により識別精度の向上、手法の簡便化、迅速化が期待される。

謝辞

終始懇篤なご指導を賜りました高見澤一裕教授に深甚なる謝意を表します。

論文審査およびご指導を賜りました 信州大学 柴井博四郎教授、 静岡大学 田原康孝教授、 岐阜大学 大橋英雄教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の機会を与えていただき、深いご理解と多大なる支援をいただきました名古屋栄養専門学校長 檜尾 一博士に心より感謝申し上げます。

本研究テーマの指針と機会、便宜を与えてくださった国立医薬品食品衛生研究所 春日文子博士、 東海大学教授 小沼博隆博士、花王株式会社 C&S 事業部 HACCP・学術部 日置祐一部長、同社化学品研究所 岡野哲也研究員、愛知県衛生研究所 鈴木匡弘博士に心から御礼申し上げます。

常に適切な助言と励ましをいただいた岐阜大学 中村征夫教授、篠田善彦教授、河合啓一教授、木曾 真教授、石田秀治教授に深く感謝申し上げます。

実験他様々な支援とご協力いただきました岐阜大学微生物工学研究室の野村泉さん、Tran Lien Ha さん、Randolph P. SCOTT Jr. さん、Afroze syeta humayra さん、金銀淑さん、井戸田 修さん、伊賀佳美さん、三嶋拓野さん、そして研究室の皆様感謝いたします。

実験を含め様々な支援をいただきました名古屋栄養専門学校の野杵治市教育主幹、大谷美都里教員、藤原裕美教員、岩西恩助手、後藤珠梨助手、山本彩助手、森田妃美子さん、光武亜莉さん、天野佑子さんに感謝申し上げます。

また、UDDIN M. Nasir 博士、A. K. M. Shofiqur Rahman 博士からは常に力強い激励と助言をいただきました。ご厚意に感謝いたします。

最後に、応援を続けてくれた、妻、典子、そして匠、立、成、そして両親に心から感謝いたします。成が誕生した年に研究科に入学しましたので妻の典子には大変苦勞をかけました。家族の協力と励ましが大きな支えでした。深謝。

参考文献

- 1) Acco M, Henriques JAP, Ferreira FS, and Tondo EC. (2003). Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiology*. 20, 489~493.
- 2) Anonymous. (2001). A massive outbreak of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A associates with milk product. *Food. Sanit. Res.* 51(2), 17~91.
- 3) Anonymous. (1978). Guidelines for effectiveness testing of surgical hand scrub (glove juice test). *Fed. Regist.* 43, 1242~1243.
- 4) Bingen E, Barc MC, Brahimi N, Vilmer E, and Beaufils F. (1995). Randomly amplified polymorphic DNA analysis provides rapid differentiation of methicillin-resistant coagulase-negative *staphylococcus* bacteremia isolates in pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1657~1659.
- 5) Blanc D, Francioli P, Le Coustumier A, Gazagne L, Lecaillon E, Gueudet P, Vandenesch F, and Etienne J. (2001). Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in France. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2287~2290.
- 6) Bruce J. (1996). Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. *Food Technology*. 50, 77~81.
- 7) Bruce J, Hubner RJ, Cole EM, McDowell CI, and Webster JA. (1995): Sets of EcoRI fragments containing ribosomal RNA sequences are conserved among different strains of *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 5229

～5233.

- 8) Chen Y, Jackson KM, Chea FP, and Schaffner DW. (2001). Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *J. Food Prot.* 64, 72～80.
- 9) Deplano A, Vaneechoutte M, Verschraegen G and Struelens M. (1997). Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of inter-IS256 spacer length polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2580～2587.
- 10) 藤本秀志, 小島夫美子. (2001) . Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 解析による黄色ブドウ球菌ゲノムタイピング. 九州大学医療技術短期大学部紀要. 28, 99～105.
- 11) Grundmann H, Hori S, Enright MC, Webster C, Tami A, Feil EJ, and Pitt T. (2002). Determining the genetic structure of the natural population of *Staphylococcus aureus*: a comparison of multilocus sequence typing with pulsed-field gel electrophoresis, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and phage typing. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4544～4546.
- 12) Gurtler V and Barrie H. (1995). Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. *Microbiology.* 141, 1255～1265.
- 13) Hatakka M, Bjoerkroth KJ, Korkeala HJ, Asplund K, and Maeki-Petaeys N. (2000). Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. *J. Food Prot.* 63, 1487～1491.
- 14) 平松啓一. (1998). アトピー性皮膚炎と黄色ブドウ球菌 黄色ブドウ球菌の疫学. 皮膚. 40. 1～5.
- 15) Hollis RJ, Bruce JL, Fritschel SJ, and Pfaller MA. (1999). Comparative

- evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 34, 263~268.
- 16) 北条聡子, 藤田次郎, 根ヶ山清, 大西隆行, 山地康文, 岡田宏基, 高原二郎, XU G. (1995). Arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) 法による Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) のタイピング. *感染症学雑誌*. 69, 506~510.
- 17) 細貝祐太郎. (2002). HACCP から見て、あなたの調理施設の衛生管理は何点ですか? (細貝祐太郎、太田和枝) *フードサービスの食中毒・衛生管理完全対策*, 第1版 pp. 72~96. 中経出版, 東京.
- 18) Humphrey TJ, Martin KW, Slader J, and Durham K. (2001). *Campylobacter spp.* in the kitchen: spread and persistence. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 90, 115S~120S.
- 19) Humphrey TJ, Martin KW, and Whitehead A. (1994). Contamination of hands and work surfaces with *Salmonella enteritidis* PT4 during the preparation of egg dishes. *Epidemiology and Infection*. 113, 403~409.
- 20) 五十嵐英夫. (1997). 過去15年間の東京都におけるブドウ球菌食中毒発生の動向. *東京都微生物検査情報*. 18 (9), 1~10.
- 21) 入倉善久, 池島伸至, 平田一郎, 新井輝義, 楠くみ子, 神真知子, 太田建爾. (1987). 各種食品取り扱い者からの黄色ブドウ球菌の検出状況および分離菌株のコアグララーゼ型とエンテロトキシン産生性. *東京都立衛生研究所研究年報*. NO. 38, 145~149
- 22) 甲斐明美, 畠山薫, 尾畑浩魅, 横山敬子, 小西典子, 有松真保, 松下秀,

- 門間千枝, 小久保弥太郎. (2000). 腸管系病原菌の分子生物学的手法を用いた疫学解析に関する研究. 各種感染症の遺伝子診断と分子疫学プロジェクト研究報告書 1. pp. 5~11.
- 23) 小沼博隆. (2000). 院内感染と医療環境要因に関する研究. 病院給食施設における院内感染の原因になりうる細菌等の汚染状況, 対策に関する調査研究 (科学技術庁研究開発局 S). 院内感染の防止に関する緊急研究成果報告書平成 11 年度. pp. 107~129.
- 24) 春日文字. (2002). 国際的リスクアセスメント手法を用いたモデリングに関する研究, 山本茂貴, 食品中の微生物のリスク評価に関する研究 (厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業総括研究報告書). pp. 33~68.
- 25) 春日文字. (2001). 食品汚染病原微生物のリスクアセスメント. モダンメディア別冊. 47 (5), 109~117.
- 26) 春日文字. (2001). 微生物学的リスクアセスメントと予測微生物学. 食品工業, 44 (14), 18~24.
- 27) Kluytmans JW, van Leeuwen, Goessens W, Hollis R, Messer S, Herwaldt L, Bruining H, Heck M, Rost J, van Leeuwen N, van Belkum A, and Verbrugh H. (1995). Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. J. Clin. Microbiol. 33, 1121~1128.
- 28) 近藤順子. (1993). 仕出し弁当従事者における鼻前提および手指の黄色ブドウ球菌検出状況調査. 食品衛生研究. 43, 59~64.
- 29) 近藤典子, 伊藤輝代, 平松啓一. (1997). MRSA の分子疫学の遺伝的基礎. 日細菌誌. 52, 417~434.
- 30) 近藤典子, 平松啓一. (1996). リボタイピング法 *Staphylococcus aureus*. 臨床と微生

- 物. 23, 670~673.
- 31) 近藤典子, 平松啓一. (1996). リボタイピング法 原理と方法. 臨床と微生物. 23, 667~669.
- 32) Kotaka T, Adachi S, and Shikata T. (1993). Biased sinusoidal field gel electrophoresis for the separation of large DNA. Electrophoresis. 14, 313~321.
- 33) Kumar S, Tamura K, and Nei M. (1993). Molecular Evolutionary Genetics Analysis. <http://www.megasoftware.net/>.
- 34) Lo SV, Connolly AM, Palmer SR, Wright D, Thomas PD, and Joynson D. (1994). The role of the pre-symptomatic food handler in a common source outbreak of food-borne SRSV gastroenteritis in a group of hospitals. Epidemiology and Infection. 113, 513~521.
- 35) 満田年宏. (2002). パルスフィールドゲル電気泳動法の原理と装置. 感染症対策のための分子疫学入門. pp.30~41, メディカ出版, 大阪.
- 36) 満田年宏. (2002). 分子疫学の初歩と病院感染対策, 画像処理と系統樹解析. Infection Control. 11(2), 232~243.
- 37) 満田年宏. (2001). 分子疫学の初歩と病院感染対策, 細菌の各種型別解析法について. Infection Control. 10(6), 612~623.
- 38) 宮本敬久. (2000). 食品衛生細菌の簡易迅速検査法. 日食科工誌. 47, 173~180.
- 39) Montville R, and Schaffner DW. (2004). Statistical distributions describing microbial quality of surfaces and foods in food service operations. J. Food Prot. 67(1). 162~167.
- 40) Montville R, and Schaffner DW. (2003). Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces. Appl Environ Microbiol.

- 69(12), 7188~7193.
- 41) Montville R, Chen Y, and Schaffner DW. (2002). Risk assessment of hand washing efficacy using literature and experimental data. *International Journal of Food Microbiology*. 73, 305~313.
- 42) Montville R, Chen Y, and Schaffner DW. (2001). Glove barriers to bacterial cross-contamination between hands to food. *J. Food Prot.* 64(6), 845~859.
- 43) 森田師郎. (1997). 食品取扱施設における黄色ブドウ球菌の分布とその性状薬剤耐性を中心にした4年間の調査結果から. *食品衛生研究*. 47, 59~67.
- 44) 村上和保, 石橋弥, 和田貴臣. (2002). 食品材料, 食品および調理施設からのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の検出. *日食微誌*. 19, 127~131.
- 45) 中谷紀久雄, 嶋田誠司, 上田誠巳, 堀本知昭, 中村寛海, 長谷篤. (2002). 食中毒原因食品解析における *Salmonella Infantis* の薬剤感受性およびパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による型別の応用. *食品衛生研究*. 52, 97~103.
- 46) Ness F, Lavallee F, Dubourdieu D, Aigle M, and Dulau L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62, 89~94.
- 47) 日本食品衛生協会. (2001). 主な食中毒事件例. 平成10年食中毒の統計と情報. pp. 35~70. 日本食品衛生協会, 東京.
- 48) 西田博. (2002). 先ずは個人衛生, 食品衛生の延長線上で, アトピーと個人衛生. *食品工業*. 45(7), 94~99.
- 49) 小田隆弘. (1998): ブドウ球菌食中毒の最近の動向. *食品衛生学雑誌*. 39, J179~J185.

- 50) 小田隆弘. (2001): 食品中の食中毒菌検査法黄色ブドウ球菌. 防菌防黴. 29, 595~600.
- 51) Oliveira A, and Ramos M. (2002). PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. Braz. J. Med. Biol. Res. 35, 175~180.
- 52) Prevost G, Jaulhac B, and Piemont Y. (1992). DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. 30, 967~973.
- 53) Pereira MSV, Leal NC, Leal TCA, Sobreira M, De Almeida AMP, Siqueira -Junior JP, and Campos-Takaki GM. (2002). Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. Letters in Applied Microbiology. 35, 32~36.
- 54) Roels TH, Wickus B, Bostrom HH, Kazmierczak JJ, Nicholson MA, Kurzynski TA, and Davis JP. (1998). A foodborne outbreak of *Campylobacter jejuni* (0:33) infection associated with tuna salad: a rare strain in an unusual vehicle. Epidemiology and Infection. 121, 281~287.
- 55) 坂本元子. (2003). 食品安全基本法と食品安全委員会の活動. 臨床栄養. 103, 772~774.
- 56) Sattar SA, Springthorpe S, Mani S, Gallant M, Nair RC, Scott E, and Kain J. (2001). Transfer of bacteria from fabrics to hands and other fabrics: development and application of a quantitative method using *Staphylococcus aureus* as a model. J Appl Microbiol. 90, 962~970.
- 57) Saulnier P, Bourneix C, Prevost G, and Andremont A. (1993). Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis

- for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 31, 982~985
- 58) 笹岡佳子, 森川良行. (1999). メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 伝搬経路の菌株型別分析 (randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) assay) による検討. 日本未熟児新生児学会雑誌. 11, 361.
- 59) 関口幸枝, 浅香清美, 川端彰, 斉藤勝, 加納せき雄, 加納堯子. (1997). 専門学校生からの黄色ブドウ球菌の検出率及び分離菌株のコアグララーゼ型とエンテロトキシン産生性並びに薬剤感受性. 食品衛生学雑誌. 38, 418~424.
- 60) 関澤純. (2003). リスクアナリシスの実際. 臨床栄養. 103, 788~792.
- 61) Shimizu A, Fujita M, Igarashi H, Takagi M, Nagase N, Sasaki A, and Kawano J. (2000). Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980-1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 38, 3746~3749.
- 62) 清水晃, 堀江理香. (1999). 1 スーパーマーケットで市販されていた鶏肉・豚肉の半年間にわたる黄色ブドウ球菌汚染調査と PFGE を用いた疫学解析. 日食微誌. 16, 157~261.
- 63) 清水晃, 山本千景, 河野潤一, 犬伏秀樹, 角谷修, 氷上雄三. (1997). パルスフィールドゲル電気泳動法による健康鶏の鼻腔および皮膚に分布する黄色ブドウ球菌の染色体 DNA タイピング. 鶏病研報. 33, 24~29.
- 64) Strandén A, Frei R, and Widmer AF. (2003). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis? J. Clin. Microbiol. 41, 3181~3186.
- 65) 武士甲一, 池田徹也, 砂川紘之. (1997). 遺伝子診断技術を用いた新しい食品微生物検査法. 日食微誌. 14, 75~81.
- 66) 寺嶋淳. (2000). パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) およびフェージ型

- 別を用いての各種食中毒原因菌の疫学的解析. 厚生省科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業総合研究報告. pp. 17~27.
- 67) 徳江豊. (1992). Polymerase Chain Reaction (PCR) を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の判定. 抗酸菌病研究所雑誌. 44, 237~242.
- 68) 上田成子, 桑原祥浩, 峰野純一, 徳丸雅一, 大塚佳代子, 品川邦汎. (1999). PCR 法による食品からの毒素産生性ブドウ球菌の検出. 防菌防黴. 27, 505~510.
- 69) 梅田昭子, 古江増隆, 安元慎一郎. (1999). アトピー性皮膚炎患者に定着する黄色ブドウ球菌株の動態. 臨床と微生物. 26, 216~217.
- 70) 梅迫誠一, 井上凡巳, 大林英之, 青木善也, 山中千恵子, 山本安純, 西井保司. (1990). 各種食品の黄色ブドウ球菌汚染について. 奈良県衛生研究所年報. 24, 64~67.
- 71) Van Leeuwen W, Sijmons M, Sluijs J, Verbrugh H, and Van Belkum A. (1996). On the nature and use of randomly amplified DNA from *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 34, 2770~2777.
- 72) 渡辺節子. (1994). おにぎりにおける黄色ブドウ球菌の挙動に関する基礎的研究. 群馬県衛生環境研究所年報. 26, 78~84.
- 73) Webster JA, Bannerman TL, Hubner RJ, Ballard DN, Cole EM, Bruce JL, Fiedler F, Schubert K, and Kloos WE. (1994). Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with *EcoRI* fragments containing rRNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov. Int. J. System. Bacteriol. 44, 454~460.
- 74) Wei H, and Chiou C. (2002). Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. Epidemiol. Infect. 128, 15~20.

- 75) 山本茂貴. (2004). 食の安全とリスクアナリシス. (熊谷進、山本茂貴) 食の安全とリスクアセスメント, 第1版. pp. 14~23. 中央法規出版, 東京.
- 76) 矢野昭起, 齋藤紀行. (2001). パルスフィールド電気泳動法 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) 標準化及び画像診断を基礎とした分散型システムの有効性に関する研究. パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) の標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究平成12年度総括・分担研究報告書. pp. 23~24.
- 77) Zhao P, Zhao T, Doyle MP, Rubino JR, and Meng J. (1998). Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. J. Food Prot. 61, 960~963.