

=原 著=

調理施設から採取された黄色ブドウ球菌の RAPD-PCR, BSFGE および PFGE による遺伝子多型解析

岸本 満^{*1,†}・鈴木匡弘^{*2}・森田妃美子^{*1}・後藤珠梨^{*1}
檜尾 一^{*1}・日置祐一^{*3}・岡野哲也^{*3}・小沼博隆^{*4}
高見澤一裕^{*5}・春日文子^{*6}

(^{*1}名古屋養専門学校, ^{*2}愛知県衛生研究所, ^{*3}花王(株), ^{*4}東海大学,
^{*5}岐阜大学, ^{*6}国立医薬品食品衛生研究所)

(受付 平成 15 年 12 月 12 日)

(受理 平成 16 年 6 月 28 日)

Genotyping of *Staphylococcus aureus* Collected from Food Preparation Facilities Using Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, Biased Sinusoidal Field Gel Electrophoresis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Michiru KISHIMOTO^{*1,†}, Masahiro SUZUKI^{*2}, Kimiko MORITA^{*1}, Juri Goto^{*1},
Hajime KASIO^{*1}, Yuichi HIOKI^{*3}, Tetsuya OKANO^{*3}, Hiroataka KONUMA^{*4},
Kazuhiro TAKAMIZAWA^{*5} and Fumiko KASUGA^{*6}

(^{*1}Nagoya College of Nutrition, Shinsakae, Naka-ku, Nagoya 460-0007; † Corresponding author)

(^{*2}Aichi Prefectural Institute of Public Health, Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya 462-8576)

(^{*3}Performance Chemicals Research Laboratories, Kao Corporation, Minato, Wakayama 640-8580)

(^{*4}Tokai University, Shimizu Orido, Shizuoka 424-8610)

(^{*5}Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193)

(^{*6}National Institute of Health Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501)

Sixty-four *Staphylococcus aureus* isolates from the hands of study participants, food-stuff, prepared food, cooking utensils, and cooking equipment at food preparation facilities were genotyped by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis, Biased Sinusoidal Field Gel Electrophoresis (BSFGE) and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).

The results of the genotyping revealed that diffusion of *S. aureus* had occurred. *S. aureus* originating from the hands of a study participant was transmitted to a cooking knife and to prepared food (salad). Furthermore, another transmission was found by an unknown person between a frying pan and a faucet.

The strains were divided into 11 different genetic types by RAPD analysis based on two primers, and 12 different genetic types by BSFGE. The PFGE types were completely consistent with the BSFGE types. The types obtained by both techniques were similar for all strains examined. However, in RAPD typing, 8 types (73%) were consistent with the PFGE types, but the other 3 types were not consistent. RAPD provided less discrimination than PFGE.

Key words: *Staphylococcus aureus*, RAPD-PCR, BSFGE, Food preparation facilities, Cross contamination

† 連絡先

*1 ☎460-0007 名古屋市中区新栄 1-9-6

*2 ☎462-8576 名古屋市中区辻町字流 7-6

*3 ☎640-8580 和歌山市湊 1334

*4 ☎424-8610 静岡市清水折戸 3-20-1

*5 ☎501-1193 岐阜市柳戸 1-1

*6 ☎158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

結 言

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) を原因とする食中毒は、おにぎりなどの穀類およびその加工品、弁当、惣菜など複合調理食品、菓子類などの種々の食品によることが報告されている²⁰⁾。食品従事者の衛生管理や施設設備の改善（機械化、自動化）が進み、食中毒発件数は減少傾向にある¹⁰⁾。しかし、依然としておにぎりや弁当により多数の患者が発生する事件もしばしば見られる。仕出し屋や飲食店で製造される弁当類は手作業で調理される場合がほとんどであり、手指や器具・機器からの *S. aureus* 汚染を確実に遮断することが求められる。よって、調理施設における *S. aureus* の汚染実態、伝播実態を把握しておくことは食中毒予防対策上極めて重要であると考えられる。作業者の手指、まな板、水道蛇口カラン、食品などにより病原菌が伝播することもモデル実験で示されている^{3, 15, 16, 31)}が、実際の調理作業で *S. aureus* が伝播する実態を把握した研究は少ない¹²⁾。

これまで *S. aureus* の汚染経路などの解明にはコアグラマーゼ型、エンテロトキシン (SE) 型などが利用されてきたが、最近細菌感染症の疫学調査や汚染原因菌調査に分子生物学的手法、すなわち DNA の多様性により分類する遺伝子多型解析法が多用されており、特に院内感染 *S. aureus* として問題になるメチシリン耐性菌 (MRSA) の疫学的研究については顕著である^{1, 2, 11, 22, 23)}。

S. aureus の遺伝子多型解析法には、Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis (RAPD) 法（または AP-PCR 法）^{1, 5, 23)}、パルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, 以下 PFGE) 法^{9, 22, 23, 26)}、Multilocus Sequence Typing (MLST) 法^{6, 29)}、リボタイピング法^{9, 21, 22)}、Insertion Sequence (IS) タイピング法^{4, 30)}、Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) 法⁷⁾などが用いられている。

PFGE 法による型別は多数報告され、その妥当性、安定性、再現性が高く評価されており^{14, 23)}、本法は泳動原理別に CHEF (Contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis) 法、バイアス正弦電場ゲル電気泳動 (Biased sinusoidal field gel electrophoresis, 以下 BSFGE) 法¹³⁾など 7 つに分類されている。

本研究の目的は、環境由来の *S. aureus* が実際の調理作業中に伝播する実態を把握し、その動態を明らかにすること、そして伝播実態調査における遺伝子多型解析法の有用性を評価、検証することである。

材料および方法

1. *S. aureus* の分離

調理実習生 8 グループ 26 名が使用した実習室の各部所および実習生について *S. aureus* の分離を行った。調理前および調理中の実習生の手指からの試料採取はグ

ローブジュース法²⁸⁾により行った。食品原材料 28 種、調理済み食品 26 検体は常法¹⁷⁾により一定量を採取、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により、また、包丁と菜箸については滅菌処理したものを実習生に使用させ、これを滅菌バッグに入れ、グローブジュース法と同様にサンプリング液を加えて器具表面を十分に洗い、これを試料液として用いた。

2. 分離培養

得られた各試料液は 10 倍段階希釈し、卵黄加マンニット食塩培地 (日水製薬) に 0.1 ml 塗抹後、35°C、48 時間培養を行った。黄色で光沢の白濁環を示す集落を釣菌、純培養を行った。

3. *S. aureus* の同定

分離菌株をグラム染色 (B&M 山中変法; Merck Japan)、コアグラマーゼ試験 (ウサギプラズマ栄研; 栄研化学) を行い、さらに本菌同定キット (APISTAPH; Bio-merieux) を用いて *S. aureus* の同定を行った。分離した菌株は遺伝子多型解析を行うまで -80°C 冷凍庫で保存した。

4. RAPD 法

(1) 使用プライマー

10 塩基のオリゴヌクレオチドプライマー A-03²⁾: 5'-AGTCAGCCAC-3' と F-04²⁾: 5'-GGTGATCAGG-3' (RAPD 10 mer Kits; QIAGEN) を使用した。

(2) ゲノム DNA の調製

分離した *S. aureus* を TSB 寒天培地 (日水製薬) に塗抹し、一夜培養後形成した集落から一白金耳量を採取し、「Gen とる君™ (酵母用) (TaKaRa) を用いてゲノム DNA を分離した。分離ゲノム DNA は TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; シグマアルドリッチジャパン) に溶解し -20°C で保存した。

(3) PCR 反応

AccuPower® PCR PreMix (*Taq* DNA polymerase: 1 U, dNTP: 250 μM, Tris-HCl (pH 9.0): 10 mM, KCl: 40 mM, MgCl₂: 1.5 mM; Bioneer) にゲノム DNA 10 μl, 40 pmol のプライマー A-03 またはプライマー F-04 1 μl, 5 mM MgCl₂ 1.2 μl と蒸留水を加え総量 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行い、3.0 mM および 4.0 mM で良好な泳動像が得られることを確認したのち 3.0 mM を用いた。PCR 反応は EZcycler (EZC-96, 旭テクノグラス) を用い、藤本らの方法⁵⁾に準じて行った。PCR 増幅物の確認は、2.0% アガロースゲル (Agarose H14 「TAKARA」; TaKaRa) で電気泳動 (分子量マーカー: PCR Markers (50-2,000 bp); Novagen) し、エチジウムブロマイド (0.5 μg/ml) で 20 分間染色し、精製水で 30 分間脱色後撮影により行った。

5. BSFGE 法

分離菌株を SCD 寒天培地（日水製薬）に塗抹後一夜培養した。形成集落の一白金耳量を TSB 培地（栄研器材）に接種し、5 時間培養後、遠心分離（8,000 rpm, 10 分間）を行い、沈査に 0.5 M EDTA を加え、次いでリゾスタフィン（SIGMA）とアガロース（BMA）を加えて、鋳型でブロックに固めた。このブロックに溶菌液（リゾスタフィン+0.5 M EDTA（和光純薬工業））1 ml を加え、37°C で一夜保存して溶菌させた。次に、タンパク質分解液（プロテイナーゼ K（Sigma）+1% *N*-ラウロイルサルコシナトリウム（Sigma）+0.5 M EDTA）に置換し、50°C で 8 時間反応させた後、TE バッファーに置換して、プロテイナーゼ K を不活化させた。

ブロックを氷上で制限酵素用バッファー（*Sma*I buffer; TOYOBO）で 30 分間振とうした後、*Sma*I 処理（30°C, 16 時間）を行った。

次に、このブロックを 1% 電気泳動用アガロースゲル（SeaKemGTG; BMA）にセットし TBE バッファー（4.45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA; シグマアルドリッチジャパン）中で泳動（GENOFIELD; ATTO）を行った。泳動は DC=42 V, AC=250 V, start=0.01 Hz, end=0.2 Hz の条件で 20°C, 24 時間行った。なお、DNA 分子量マーカーとして λ -DNA（Lambda DNA Ladders; CAMBEX）と λ -*Hind*III digest（TaKaRa）を用いた。

泳動後ゲルはエチジウムブロマイド（0.5 μ g/ml）で 30 分間染色後、精製水で 1.5 時間脱色し、撮影により観察した。

6. PFGE 法

PFGE（CHEF 法による）法は、*S. aureus* からの DNA 抽出および制限酵素処理については 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。DNA 分子量マーカーとして、緑膿菌の *Sma*I 切断 DNA 断片を用いた。各断片のサイズは λ ラダーの泳動度を比較し算出した。泳動はパルスタイム 1~50 秒、電圧 6.0 V/cm, 内角 120° の条件で、14°C, 22 時間行った。泳動後ゲルはエチジウムブロマイド（2 μ g/ml）で 30 分間染色後、精製水で 2 時間脱色し、撮影により観察した。

結 果

1. *S. aureus* の分離と同定

実習および実習中の実習生手指各々 26 名からのふき取り材料 26 検体、食品原材料 28 検体、調理済み食品 26 検体、実習用調理器具および設備のふき取り材料 56 検体、計 162 検体について *S. aureus* を検査した結果、15 検体が陽性を示し、これら検体から *S. aureus* 64 株を分離した（Table 1）。これらのうち水道カランとフライパンからは増菌培養により陽性であり、9 株を分離した。分離した 64 菌株はグラム染色陽性、コアグララーゼ反応陽性で、同定キットによりすべて *S. aureus* であった。

2. RAPD パターンと多型解析

プライマー A-03 およびプライマー F-04 を用いて、それぞれ RAPD を行った場合のパターンと分離した *S. aureus* を Table 2 および Table 3 に示した。プライマー A-03 により増幅されたバンドは、200 bp から 2,000 bp 付近に 10~12 本のバンドが、プライマー F-04 では同様に 9~10 本のバンドが出現した。RAPD パターンはプライマー A-03 では 7 つの型に、プライマー

Table 1. Distribution of contamination by *Staphylococcus aureus* during cooking.

Items	Sort of experimental sources**	Number of <i>S. aureus</i> sources detected	Number of strains obtained
Participants	Hands; 26 (Before preparation)	4 (2A*, 2B*, 4C*, 8B*)	24
	Hands; 26 (During preparation)	3 (2A*, 7B*, 8B*)	15
Foods	Foodstuffs; 28	2 (2 Chickens)	5
	Prepared food (salad); 26	1 (prepared by 8B*)	7
Equipments	Frying pans; 2	1 (Used by anyone)	4
	Faucets; 2	1 (Used by anyone)	5
Utensils	Knives; 26	2 (Used by 8B*, 7A*)	3
	Chopsticks for cooking; 26	1 (Used by 6C*)	1
Total; 162		15	64

* Identified participants.

** The number shown after the semicolon indicates the number of each source.

Samples were taken from the hands of the 26 participants before and during food preparation activities, and from 28 types of foodstuffs, 26 prepared foods, 4 pieces of equipment, and 52 utensils. Out of the 162 specimens, 64 different strains of *S. aureus* were detected.

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

PAPD-A Types ^b	Representative example of RAPD Patterns								strain code ^c	n ^d
	50	100	300	500	750	1000	1500	2000 (bp)		
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, K76, K77, K80	6

^a Refer to Table 1.^b Classified using A-03 primer.^c Refer to Table 4.^d Number of strains.Table 3. F-04 Primer RAPD patterns of 64 *S. aureus*^a isolates

PAPD-F Types ^b	Representative example of RAPD Patterns								strain code ^c	n ^d
	50	100	300	500	750	1000	1500	2000 (bp)		
f 1									K7, K8, K9	3
f 2									K26	1
f 3									K24, K25, 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 Refer to Table 1.^b Classified using A-04 primer.^c Refer to Table 4.^d Number of strains.

F-04 では8つの型に分けられた。 *S. aureus* 64株は、これら2種類のプライマーによるRAPDパターンから11型 (r1~r11) に別れた (Table 4)。

3. BSFGE パターンと多型解析

BSFGE法による解析は、RAPD法と同様に *S. aureus* 64株について行った。染色体DNAは10~12本に切断され、これらはいずれも50 kbから600 kb付近にバンド形成を示した。後述のPFGEと比較するため *S. aureus* 39株のBSFGEパターンをFig. 1に示した。これらのパターンはb1~b12の12型に分けられた (Table 4)。

4. PFGE パターンと多型解析

無作為に抽出した *S. aureus* 39株についてPFGE法解析を行った結果、染色体DNAは12~13本に切断され、これらはいずれも30から700 kb付近にバンドを形成した (Fig. 2)。これらのPFGEパターンはp1~p12の12型に分けられた。BSFGE法で100 kbから200 kb付近に明瞭に形成されたバンドは、PFGE法では十分分離されなかった。一方、250 kbから600 kb付近に形成された4~5本のバンドはPFGE法では明瞭に分離された。PFGE法でp1~p12型に分けられた菌株は、BSFGE法でもb1~b12型に分けられ各菌株と完全に一致した (Table 4)。

Table 4. Origins and classified genotypes of 64 isolates of *S. aureus*

Origin of isolates	Strain code	n	RAPD types			BSFGE types	PFGE types
			A-03 primer	F-04 primer	A-03+F-04		
Hand of participant 4C (Before preparation)	K7-9	3	a1	f1	r1	b1	p1
Knife (Used by 7A)	K26	1	a2	f2	r2	b2	p2
Hand of participant 7B (During preparation)	K24, 25, 27	3	a3	f3	r3	b3	p3
Chopsticks (Used by 6C)	K51	1	a4	f4	r4	b4	p4
Frying pan	K53-56	4	a5	f5	r5	b5	p5
Water faucet	K57, 59-61	4	a5	f5	r5	b5	p5
	K58	1	a2	f4	r6	b6	p6
Foodstuff (Chicken 1)	K63, 65	2	a5	f6	r7	b7	p7
	K66, 68	2	a5	f6	r8	b8	p8
Foodstuff (Chicken 2)	K80	1	a7	f7	r9	b9	p9
Hand of participant 2A (Before preparation)	K10-21	12					
Hand of participant 2A (During preparation)	K22, 23	2	a6	f8	r10	b10	p10
Hand of participant 2B (Before preparation)	K3-K6	4				b11	p11
Hand of participant 8B (Before preparation)	K31, 33-36	5					
Hand of participant 8B (During preparation)	K37-46	10	a5		r11		
Knife (Used by 8B)	K29, 30	2		f7		b12	p12
Prepared food (Salad: prepared by 8B)	K71, 72	2					
	K73-77	5	a7		r9		
Total		64	7 types	8 types	11 types	12 types	12 types

Strains analyzed by PFGE were 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.

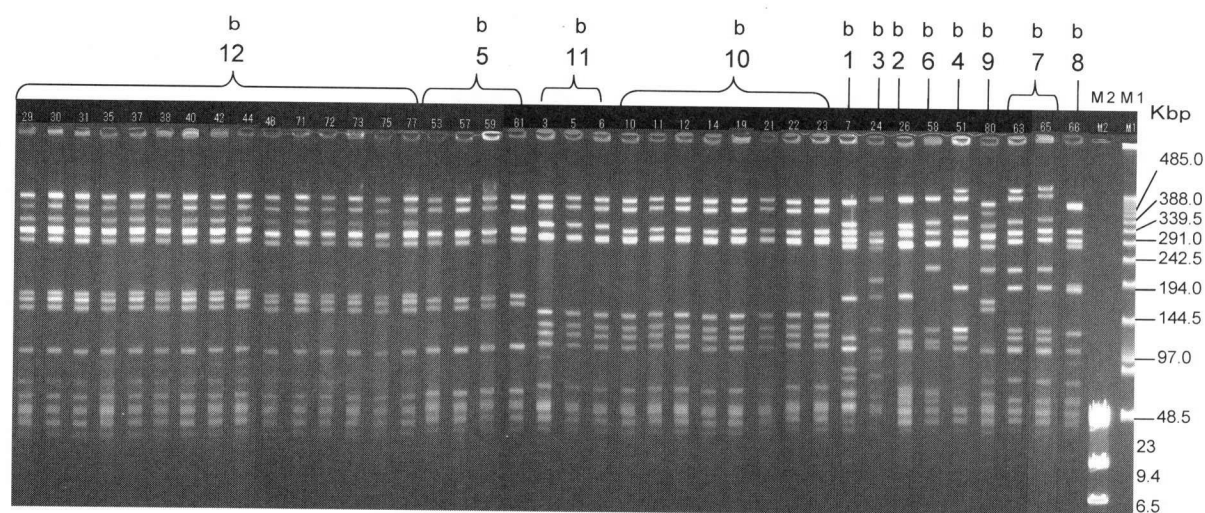


Fig. 1. BSFGE patterns (b1-b12) of selected 39/64 *S. aureus* strains. Refer to Table 4 for the origins of isolates of each classified pattern.

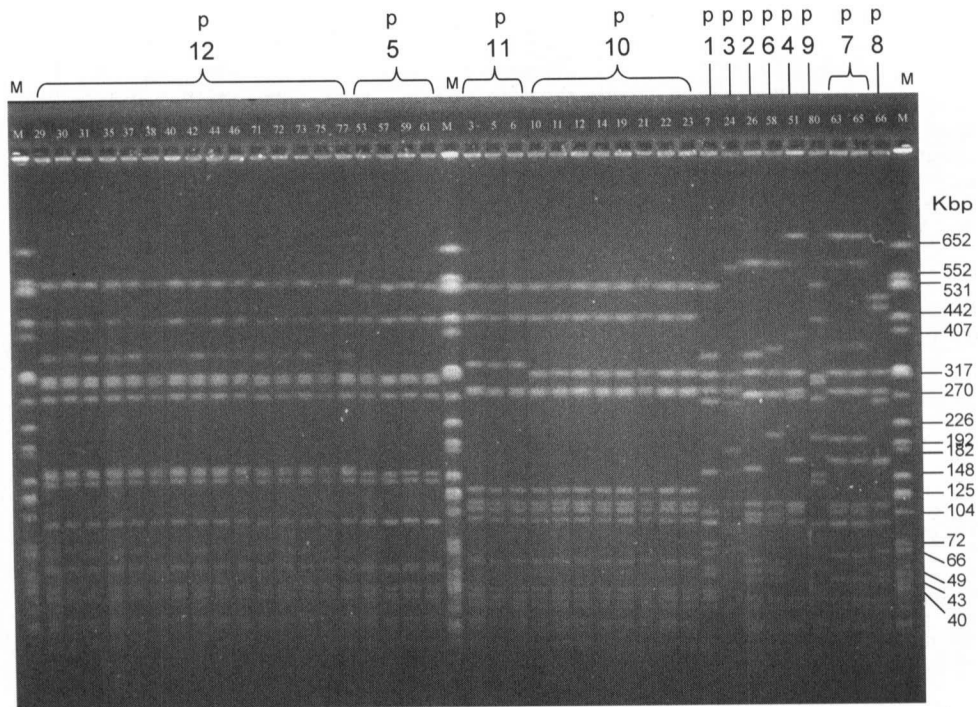


Fig. 2. PFGE patterns (p1-p12) of selected 39/64 *S. aureus* strains. Refer to Table 4 for the origins of isolates of each classified pattern.

Transmission 1 (r5, b5, and p5 type groups)



Transmission 2 (r11, b12, and p12 type groups)

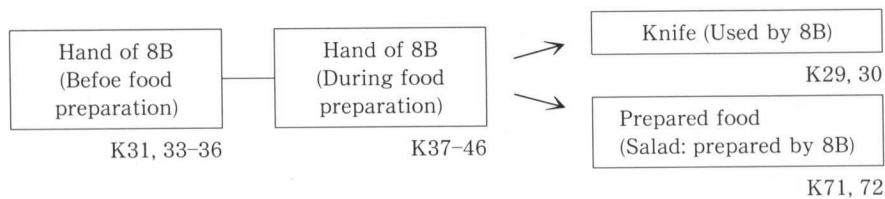


Fig. 3. Proposed transmission patterns of *S. aureus* during cooking.

考 察

Bingen ら¹⁾はコアグラゼ陰性のブドウ球菌(CNS)を8名の小児患者から12株分離し、2種のプライマーによるRAPD法で病棟の同区画内の4名は相互に交差感染があり、他区画の4名の患者には交差感染が見られなかったと考察している。本研究においても、RAPD法、BSFGE法およびPFGE法で同一型の菌株が分離されたことから、調理施設内で*S. aureus*の拡散があったと考えられる。

Fig. 3に示したように、フライパンからの分離菌4株(*S. aureus*; K53~56)とカランからの分離菌の4株(同;

K57, 59~61)は同一型を示したことから、特定の実習生の手指から汚染があったと考えられる。また、実習生8Bの手指からの分離菌15株(同; K31, 33~46)、包丁からの分離菌2株(同; K29, 30)およびサラダからの分離菌2株(同; K71, 72)はいずれの型別法でも同一型を示したことから、実習生8Bが使用した包丁と、調理したサラダに汚染をしたと考えられる。なお、アトピー性皮膚炎症状を有す者は*S. aureus*を多数保菌していることが示されており^{8, 19, 27)}、実習生8Bは手指にアトピー性皮膚炎を呈しており、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、汚染源や汚染経路の解析にコ

アグラーゼ型やエンテロトキシン (SE) 型別などが広く用いられている。しかし、森田¹⁶⁾によると食品環境から分離した *S. aureus* の SE 産生率は 37.5% と低く、またこれらの多くは SE 型別不明であることが報告されている。また、PFGE 法では同一コアグラーゼ型別菌株でもさらに細かく型別でき²⁴⁾、コアグラーゼ型や SE 型などが同一でも PFGE 型別では異なる型に判定される²⁵⁾ことも認められている。それゆえ、本菌の汚染経路などの疫学調査には、PFGE 法などの遺伝子多型解析法が有用であると考えられる。

RAPD 法は PFGE 法に対し再現性および型別能は十分でないと言われている^{6, 11)}。そこで、*TaqDNA* ポリメラーゼの選択や適正なプライマーの検索を行い、さらに複数のプライマーを用いて型別の精度を向上させることが試みられている²³⁾。藤本ら⁵⁾は *TaqDNA* ポリメラーゼ 5 種類の中で *Klen TaqDNA polymerase* (Sigma) により良好な結果が得られたことを報告している。今回筆者らが用いた *AccuPower[®] PCR PreMix* は、*Klen TaqDNA polymerase* と同等の泳動像が得られた。また、使用した 2 つのプライマーは Blanc ら²⁾の 12 種類のプライマーの中で 10 本前後のバンドを形成するプライマーを選択した。なお、各菌株については 2~4 回の実験を行い RAPD パターンの再現性を確認した。

RAPD 法で r9 型と r10 型のパターンを示した菌株は各々 2 種類の PFGE 型に分けられた。また、r11 型と r9 型に分けられた菌株が PFGE 法による型別では同一パターンを示した。RAPD 法による菌株の型別は PFGE 法による型別と 8 型 (r1~r8 型) は一致したが残りの型は一致しなかった。

SmaI 処理による遺伝子多型性は、泳動原理の異なる BSFGE 法と PFGE 法により解析した。BSFGE 法は分画分子量の範囲が 500 bp~3 Mb であり、RFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析、酵母染色体の泳動などに活用できる特徴を有しており¹⁴⁾また、汎用性があり安価に用いる利点がある。これまで BSFGE 法による *S. aureus* の型別報告はないが、Fig. 1 に示すように 100 から 200 kb 付近の分離能が高く、検出バンドも明瞭であり、CHEF 法による PFGE 法と同等またはそれ以上の泳動像が得られた。しかし、250 kb から 600 kb 付近の分離能は PFGE 法に対し、やや劣る傾向が見られた。今後泳動条件などの検討が必要である。

PFGE 法は結果が出るまで数日間を要す。一方、RAPD 法は識別能にやや劣るものの、迅速性に優れ、また簡便に使用できる。食品を取扱う環境から多数の菌株が分離され、これらを短時間に型別などを行い、汚染源を調べる必要がある場合、RAPD 法は有効であると考えられる。なお、われわれは大量調理施設より採取した *S. aureus* の遺伝子多型解析を行い、RAPD 法が汚染源調査の 1 次スクリーニングに有用であることを確認して

いる (投稿準備中)。

要 約

学生の調理実習において、実習生および調理器具、施設から分離した *S. aureus* 64 株について RAPD 法、BSFGE 法および PFGE 法 (CHEF 法) による遺伝子多型解析を行い、施設内での本菌の伝播実態を調べた。型別の結果から特定実習生の手指に保有していた *S. aureus* が使用包丁、調理したサラダに拡散していることが推定された。また、カランとフライパンにも伝播が認められた。

RAPD 法による型別では 2 つのプライマーを組み合わせにより 11 型に、BSFGE 法および PFGE 法では 12 型に区別することができた。また、BSFGE 法と PFGE 法型別では両者は完全に一致したが、RAPD 法と PFGE 法による型別で 8 型 (73%) は一致したが残りの型は不一致であった。

RAPD 法は PFGE 法に比べ識別能では劣るが、迅速性および簡便性の特徴を有しており、*S. aureus* の汚染源調査などに十分に活用できると考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、貴重な情報提供およびご指導をいただきました ATTO 株式会社の田島雅文氏、石田由里氏に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Bingen, E., Barc, M., Brahimi, N., Vilmer, E. and Beaufils, F.: 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 (1995).
- 2) Blanc, D., Francioli, P., Le Coustumier, A., Gazagne, L., Lecaillon, E., Gueudet, P., Vandenesch, F. and Etienne, J.: Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in France: a phylogenetic approach. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2287-2290 (2001).
- 3) Chen, Y., Jackson, K., Chea, F. and Schaffner, D.: Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. J. Food Prot.*, **64**, 72-80 (2001).
- 4) Deplano, A., Vaneechoutte, M., Verschraegen, G. and Struelens, M.: Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of inter-IS256 spacer length polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2580-2587 (1997).
- 5) 藤本秀志, 小島夫美子: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 解析による黄色ブドウ球菌ゲノムタイプング. 九州大学医療技術短期大学部紀要, **28**, 99-

- 105 (2001).
- 6) Grundmann, H., Hori, S., Enright, M., Webster, C., Tami, A., Feil, E. and Pitt, T.: 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 (2002).
 - 7) Gurtler, V. and Barrie, H.: Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. *Microbiology*, **141**, 1255-1265 (1995).
 - 8) 平松啓一: 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 (1998).
 - 9) Hollis, R., Bruce, J., Fritschel, S. and Pfaller, M.: Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **34**, 263-268 (1999).
 - 10) 五十嵐英夫: 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 (1997).
 - 11) 近藤典子, 伊藤輝代, 平松啓一: MRSA の分子疫学の遺伝的基礎. *日細菌誌*, **52**, 417-434 (1997).
 - 12) 小沼博隆: 院内感染と医療環境要因に関する研究 1 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. 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), p. 107-129, 科学技術庁研究開発局 (2000).
 - 13) Kotaka, T., Adachi, S. and Shikata, T.: Biased sinusoidal field gel electrophoresis for the separation of large DNA. *Electrophoresis*, **14**, 313-321 (1993).
 - 14) 満田年宏: 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. p. 30-41, メディカ出版, 大阪 (2002).
 - 15) Montville, R., Chen, Y. and Schaffner, D.: Glove barriers to bacterial cross-contamination between hands to food. *J. Food Prot.*, **64**, 845-849 (2001).
 - 16) Montville, R., Chen, Y. and Schaffner, D.: Risk assessment of hand washing efficacy using literature and experimental data. *Int. J. Food Microbiol.*, **73**, 305-313 (2002).
 - 17) 森地敏樹: 衛生指標菌検査. 食品微生物検査マニュアル. p. 120-123, 栄研器材, 東京 (2002).
 - 18) 森田師郎: 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 薬剤体性を中心とした 4 年間の調査結果から. *食品衛生研究*, **47**(8), 56-57 (1997).
 - 19) 西田 博: 先ずは個人衛生 食品衛生の延長線上で 27
アトピーと個人衛生. *食品工業*, **45** (7), 94-99 (2002).
 - 20) 小田隆弘: ブドウ球菌食中毒の最近の動向. *食品衛生学雑誌*, **39**, J179-J185 (1998).
 - 21) Oliveira, A. and Ramos, M.: PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **35**, 175-180 (2002).
 - 22) Prevost, G., Jaulhac, B. and Piemont, Y.: 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 (1992).
 - 23) Saulnier, P., Bourneix, C., Prevost, G. and Andremont, A.: 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 (1993).
 - 24) 清水 晃, 山本千景, 河野潤一, 犬伏秀樹, 角谷 修, 水上雄三: 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吸引の DNA タイピング. *鶏病研報*, **33**, 24-29 (1997).
 - 25) 清水 晃, 堀江理香: 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 (1999).
 - 26) Shimizu, A., Fujita, M., Igarashi, H., Takagi, M., Nagase, N., Sasaki, A. and Kawano, J.: 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 (2000).
 - 27) 梅田昭子, 古江増隆, 安元慎一郎: 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 (1999).
 - 28) US Department of Health and Human Services, F.a.D.A.: Guidelines for effectiveness testing of surgical hand scrub (glove juice test). *Fed. Regist.*, **43**, 1242-1243 (1978).
 - 29) Van Leeuwen, W., Jay, C., Snijders, S., Durin, N., Lacroix, B., Verbrugh, H., Enright, M., Troesch, A. and Van Belkum, A.: Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* with DNA array technology. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 3323-3326 (2003).
 - 30) Wei, H. and Chiou, C.: Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. *Epidemiol. Infect.*, **128**, 15-20 (2002).
 - 31) Zhao, P., Zhao, T., Doyle, M., Rubino, J. and Meng, J.: Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. *J. Food Prot.*, **61**, 960-963 (1998).