

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：33906

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10838

研究課題名(和文) 院内感染を起こすセレウス菌芽胞汚染を防止する病衣・リネン類の開発と看護手技の改善

研究課題名(英文) Development of patient clothes and hospital linens, and improvement of nursing techniques preventing the *Bacillus cereus* spore contamination which is causative of hospital infections.

研究代表者

石原 由華 (Ishihara, Yuka)

椋山女学園大学・看護学部・教授

研究者番号：30369607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：医療者の手指のセレウス菌芽胞汚染を介した輸液汚染を防止するために、ディスポーザブル手袋の素材や手洗い法を検討した。手袋の素材別に改良ビーズ抽出法を用いて芽胞の付着量を定量測定した。ラテックス、塩化ビニル、ニトリル製手袋の中で塩化ビニル製が最も多くの芽胞が付着し、ニトリル製と塩化ビニル製とでは芽胞の付着量で有意差( $p=0.028$ ,  $p<0.05$ )があり、ニトリル製は最も芽胞の付着しない素材であることが示唆された。また、セレウス菌芽胞の爪汚染に対するラビング法とスクラブ法による洗浄効果を調べた。スクラブ法の方がラビング法よりも芽胞除去効果は高かったが、スクラブ法でも完全に芽胞を除去できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セレウス菌の院内感染は、清拭タオルなどのリネン類へのセレウス菌芽胞汚染が看護師などの医療者の手指を介して患者の末梢静脈留置カテーテルから輸液に混入して菌血症を発症するために起こるとされる。そこで輸液や採血などの医療行為時に着用するディスポーザブル手袋に着目して、素材別に芽胞の付着度を我々が考案した改良ビーズ抽出法を用いて定量的に評価した。素材は塩化ビニル、ラテックス、ニトリル製とし、その中で最も芽胞の付着が少ない素材がニトリル製であることが示唆された。それにより、医療者の手指のセレウス菌芽胞汚染を介した輸液汚染を防止し、セレウス菌芽胞による院内感染のリスクを軽減できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The contamination of *Bacillus cereus* spores on the hands of healthcare professionals may cause blood stream infections via contaminated infusion sets. This study examined the disposable gloves and hand disinfection methods for the elimination of *B.cereus* infections with our modified beads extraction method. We found that *B.cereus* spores adhered to vinyl chloride gloves more than the gloves made of latex and nitrile rubber. The difference of the spore adherence rate between the vinyl chloride glove and the nitrile rubber glove was statistically significant ( $p<0.05$ ), suggesting that nitrile rubber is a preferable material for medical gloves. We also studied the effectiveness of hand hygiene methods such as rubbing method and scrub method for the decontamination of hand nails pre-exposed with *B.cereus* spores. We found that the scrub method was more effective for removing spores from the nails than the rubbing method, although attached spores were not thoroughly removed from the nails.

研究分野：看護学

キーワード：セレウス菌芽胞 改良ビーズ抽出法 ニトリル製ディスポーザブル手袋 ラビング法 スクラブ法 乾燥芽胞付着実験 イミペナム耐性皮膚分離株 食紅添加芽胞懸濁液

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年セレウス菌による院内感染アウトブレイクがしばしば起こり、院内感染原因菌としてのセレウス菌対策が重要度を増している。2013年に国立がん研究センター中央病院でセレウス菌による院内感染で2人が死亡し、未使用の清拭タオルからセレウス菌が多量に検出された (<http://www.ncc.go.jp/jp/ncch/information/20130829.html>)。同様の事例が自治医科大学附属病院など各地の病院で報告され、清拭タオルやシーツのセレウス菌汚染が看護師の手指を介して患者の末梢静脈留置カテーテルから輸液に混入し、菌血症を発症したとされる (Sasahara T, et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011;30:219-226)。また血液内科入院患者3人のセレウス菌血症事例では、患者の病衣に汚染したセレウス菌が末梢静脈留置カテーテルから血液中に侵入したと考えられた (毛谷淳子ら. 第29回日本環境感染学会. 2014年2月. 東京)。セレウス菌は芽胞をつくるために消毒が非常に困難で、芽胞を完全に死滅させるにはオートクレーブ滅菌が高水準消毒薬を使用するしかない。しかしわが国ではリネン類の熱水消毒は80-10分の処理が基本とされ、セレウス菌などの芽胞を完全にゼロにすることは想定していない。さらにタオルやシーツなどのリネン類、病衣の洗浄は委託業者まかせで、洗浄後でもリネン類や病衣はセレウス菌に汚染されたままであることが報告されている (余明順ら. 感染症学雑誌. 2010;84:583-587)。唯一タオルは使い捨てが導入されているが、病衣やシーツ類については使い捨てというわけにはいかず、毎回オートクレーブするというのも現実的ではない。また我々のこれまでの実験によれば、一部の健常者の皮膚にセレウス菌が付着していることがあり、さらにセレウス菌芽胞は病衣 (綿・ポリエステル混紡) の繊維にきわめて付着しやすく、また病衣の繊維に一度付着した芽胞は次亜塩素酸ナトリウムによる消毒や洗剤では除去できないことが確認された。すなわち汚染したセレウス菌芽胞を取り除くのは容易ではない。したがって、病衣やリネン類に汚染したセレウス菌芽胞を洗浄除去することよりも、芽胞付着を減らすことでセレウス菌の感染リスクを低減させることが、感染対策上重要と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究ではすでに我々が考案したセレウス菌芽胞の高感度検出法を用いて、セレウス菌芽胞の付着しにくい繊維を見出し、その繊維で作られた布を用いて芽胞が付着しにくい病衣やリネン類を試作して実用化を目指す。それとともに、点滴針の挿入や点滴ラインの管理について、芽胞付着を可能な限り減少させるように看護手技の改良をめざす。

## 3. 研究の方法

(1) 芽胞の付着が最も少ない布を見出すために、セレウス菌乾燥芽胞付着実験を行い、改良ビーズ抽出法を用いて芽胞の付着量を定量的に評価した。布は、同じ織り方ではあるが繊維の種類が異なる布である染色堅ろう度試験用添付白布 (JIS) を使用した。繊維の種類は8種類で、綿、ナイロン、ジアセテート、毛、ビスコースレーヨン、アクリル、絹、ポリエステルで、織り方は全て綾織であった。

(2) 表面加工した布についても、セレウス菌乾燥芽胞付着実験を行い、改良ビーズ抽出法を用いて定量的に評価した。布は染色堅ろう度試験用添付白布 (JIS) を使用し、布の表面に静電気防止加工を施した。

(3) セレウス菌による敗血症は、清拭タオル等のリネン類の芽胞汚染による患者皮膚・医療者の手指などを介した輸液ラインの汚染が主な原因とされる。医療現場で用いるディスポーザブル手袋にセレウス菌芽胞が付着して汚染源になる可能性があるため、手袋の素材別にセレウス菌乾燥芽胞付着実験を行い、改良ビーズ抽出法で定量的に評価した。ディスポーザブル手袋の素材は、ラテックス、ニトリル、塩化ビニル製とした。対照として、芽胞粉末を付着させずに改良ビーズ抽出法を実施した。実験は3回あるいはさらに数回繰り返した。芽胞粉末は、*B. cereus*NC1241株 (食品由来株、嘔吐毒素非産生) から作製した。

(4) ディスポーザブル手袋を外した時に手にウイルスや細菌などが付着することが報告され、手袋を着脱後は必ず衛生的な手洗いをしなければならない。衛生的な手洗いであるラビング法・スクラブ法を用いて、特にどの手洗いにおいて洗い残しが多い部位である爪からのセレウス菌芽胞除去効果を調べた。最初に、*B. cereus*NC1241株を使用して芽胞懸濁液を作製して、一定量の芽胞を爪の表・裏面に塗布して、爪に芽胞が付着するかどうかを走査電子顕微鏡で確認した。次に、爪にセレウス菌芽胞を付着後に、ラビング法またはスクラブ法を行って、芽胞の除去効果を比較検討した。

(5) セレウス菌芽胞が患者の皮膚を介して末梢静脈留置カテーテルから血中に混入する経路を遮断するために、芽胞の前腕皮膚汚染を消毒・洗浄して除去する方法を検討した。*B.*

*cereus*NC1241 株の芽胞懸濁液を前腕皮膚（右腕、左腕）に一定量塗布後、単包エタノール綿による清拭消毒（の字拭き、縦拭き）水洗浄後の単包エタノール綿による清拭消毒を実施して、芽胞除去効果を調べた。右前腕は対照群（消毒・洗浄は行わない）とした。

(6) 皮膚汚染したセレウス菌芽胞を除去するために、セレウス菌の血液および皮膚分離株（各 10 株）を用いて芽胞の消毒薬に対する耐性度を調べた。消毒薬は、ヒトに使用する中水準消毒薬である 10%ポピドンヨード、70%エタノール、70%イソプロパノールとした。一定量の芽胞懸濁液を 70%エタノール、70%イソプロパノール、10%ポピドンヨード液に添加して、5 分、10 分、30 分後培養により生菌数を調べた。消毒液の処理温度は 4、20、37 とした。なお処理後の液を希釈することによって残留消毒薬の影響を除いた。

(7) 今までに実施した成人への前腕皮膚汚染状況調査から分離されたセレウス菌（17 株）について、セレウリド合成遺伝子の有無や薬剤耐性について調べた。セレウリド合成遺伝子については PCR で解析した。また薬剤耐性については、CLSI ディスク拡散法および E テストを用いて、敗血症患者から分離された（血液分離）株（72 株）と皮膚分離株（9 株）を比較検討した。薬剤はイミペネム（IPM）、アンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CEZ）、バンコマイシン（VCM）、ミノサイクリン（MINO）、ゲンタマイシン（GM）、レボフロキサシン（LVFX）、クリンダマイシン（CLDM）の 8 剤を使用した。またクラス B メタロ ラクタマーゼの検出には、SMA ディスクを使用した。

(8) セレウス菌は染色体上に -ラクタマーゼ遺伝子を少なくとも 2 種類、クラス A -ラクタマーゼとクラス B -ラクタマーゼ（メタロ ラクタマーゼ）の遺伝子が高度に保存されている。クラス A -ラクタマーゼはアンピシリン耐性に関与し、クラス B -ラクタマーゼはアンピシリン、イミペネム耐性に関与すると考えられている。7) で調べた薬剤感受性結果から、さらにカルバペネム耐性がクラス B -ラクタマーゼ遺伝子の発現によると考えてその発現調節遺伝子について検討した。イミペネム耐性株（H27-5 株）のゲノム解析（Illumina HiSeq による次世代シーケンス解析）を行い、クラス A およびクラス B ラクタマーゼ遺伝子構造を解析した。さらに ラクタマーゼ遺伝子の発現調節に関与するとされる *sigP-rsIP* について、耐性株のゲノム解析および PCR 解析を行った。また、血液分離株のアンピシリン耐性株（66 株）についても *sigP-rsIP* 領域が関与している可能性を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) セレウス菌芽胞の付着量が最も少なかったのは、ビスコースレーヨンで、次いでジアセテート、ナイロンで、最も付着量が多かったのが綿、次いでポリエステルであった。しかし、付着芽胞量においてビスコースレーヨンと綿との間に有意差は認められなかった。

(2) 静電気防止加工したどの繊維の布においても、静電気防止加工をしていない布（対照）と比べて、芽胞の付着量は減少しなかった。

(3) 対照実験では 3 種類の素材のディスプレイ手袋の切片において、*B. cereus*NC1241 株のコロニーは全く検出されなかった。それに対して芽胞付着実験では、ラテックス製手袋の 1 cm 平方あたりのコロニー数（平均値）は 106990 で、塩化ビニル製手袋は 130090、ニトリル製手袋は 19380 であった。塩化ビニル製手袋とニトリル製手袋の間では、 $p=0.028$ （*t* 検定、 $<0.05$ ）で有意差があった（図 1）。

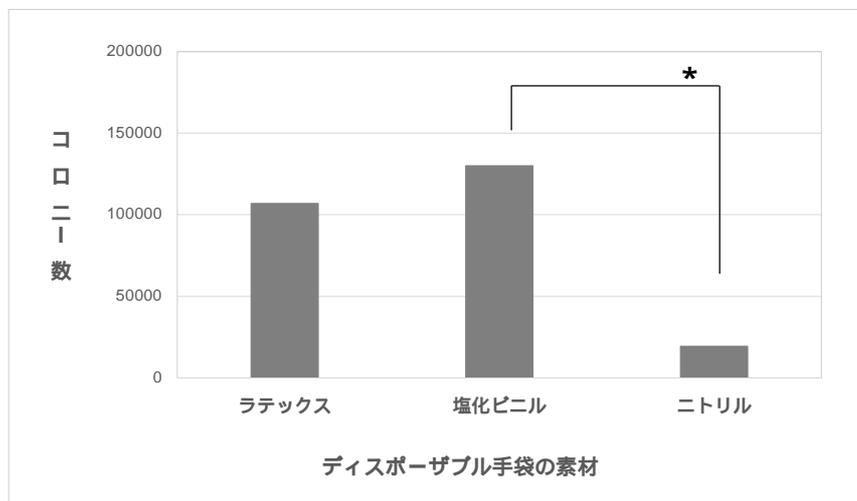


図 1 ディスposable手袋の素材別の *B. cereus*NC1241 株芽胞の付着量（1cm 平方あたり）。\* は *t* 検定で  $<0.05$  を示す。

(4) *B. cereus*NC1241 株芽胞が爪に付着することが明らかとなり、また芽胞は、爪の表面よりも裏面により付着した。

表 1 爪の表・裏面に付着した *B. cereus*NC1241 株芽胞のスクラブ法による除去効果

指		第1指		第2指		第3指		第4指		第5指	
左右側		右	左	右	左	右	左	右	左	右	左
実験前	爪の表	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	爪のうら	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
手洗い後	爪の表	1	0	0	1	0	3	0	0	0	0
	爪のうら	6	8	12	9	8	3	11	2	5	4

コロニー数の平均を示す。

表 2 爪の表・裏面に付着した *B. cereus*NC1241 株芽胞のラビング法による除去効果

指		第1指		第2指		第3指		第4指		第5指	
左右側		右	左	右	左	右	左	右	左	右	左
実験前	爪の表	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	爪のうら	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
手洗い後	爪の表	15	88	19	25	32	30	20	77	35	6
	爪のうら	148	197	26	44	69	11	36	47	44	70

コロニー数の平均を示す。

手洗いについては、スクラブ法の方がラビング法よりも芽胞除去効果が高かった。しかし、スクラブ法でも爪に付着した芽胞を完全には除去できず、特に爪の裏面に付着した芽胞の除去はできないことが示唆された(表 1,2)。

(5) アルコール綿による清拭消毒では芽胞を除去することはできず、また拭き方(の字拭き、縦拭き)の違いによる差はほとんどなかった。しかし、水で洗浄後に滅菌ガーゼで水分を拭き取ってからアルコール綿で清拭消毒した時には、*B. cereus*NC1241 株芽胞を完全に除去することができていた。

(6) 70%エタノールと70%イソプロパノール液では、どの温度・処理時間でも血液分離株・皮膚分離株の芽胞は大多数生存し、耐性を示した。しかし、10%ポピドンヨード液を 37℃ で 30 分間作用では皮膚分離株の芽胞は大部分死滅したが、調べた血液分離株では多く生存していた。以上から、血液分離株の芽胞は皮膚分離株に比べて 10%ポピドンヨードに対して抵抗性を示す傾向が示唆された。

(7) 皮膚分離株(17株)についてセレウリド合成遺伝子を PCR で解析した結果、1株しかセレウリド合成遺伝子を保有していなかった。

薬剤耐性については、皮膚由来 9 株全てが ABPC 耐性を示した(表 3)。また、血液由来 72 株中 70 株が ABPC 耐性を示し、そのうち 3 株(7030 株、7100 株、7275 株)が IPM にも耐性であった(表 4)。

表 3 皮膚分離 *B. cereus* 株の薬剤感受性

菌株	IPM	ABPC	CEZ	VCM	MINO	GM	LVFX	CLDM
H27-5	S*	R	R	I	R	S	S	S
13-2	S	R	R	I	S	S	S	I
7	S	R	R	S	S	S	S	S
3-1	S	R	R	S	S	S	S	S
17-1	S	R	R	S	S	S	S	S
20	S	R	R	S	S	S	S	S
31-1	S	R	R	S	S	S	S	S
1-	S	R	R	S	S	S	S	S
30-	S	R	R	S	S	S	S	S

H27-5：ゲノム解析株

S\*：感受性を示すが阻止円内に耐性コロニーを多数生じる。

表 4 血液分離 *B. cereus* 株の薬剤感受性

菌株	IMP	ABPC	CEZ	VCM	MINO	GM	LVFX	CLDM	菌株	IMP	ABPC	CEZ	VCM	MINO	GM	LVFX	CLDM
5770	S	R	R	S	I	S	S	S	6834	S	R	R	S	S	S	S	I
7030	R	R	R	S	S	S	S	I	6879	S	R	R	S	S	S	S	I
7100	R	R	R	S	S	S	S	I	6694	S	R	R	S	S	S	S	I
7151	S*	R	R	S	I	S	S	I	6693	S	R	S	S	S	S	S	S
7156	S	R	R	R	S	S	S	I	6619	S	R	S	S	S	S	S	I
7195	S	R	R	S	S	S	S	I	6564	S	R	R	S	S	S	S	S
7333	S	R	R	S	S	S	S	I	6482	S	R	I	S	S	S	S	I
7053	S	R	R	S	S	S	S	I	6912	S	R	R	S	S	S	S	S
7328	S	R	R	S	S	S	S	I	6781	S	R	S	S	S	S	S	I
5720	S*	R	R	S	S	S	S	I	6384	S	S	S	S	S	S	S	S
5653	S	R	R	S	S	S	S	S	6281	S	R	S	S	S	S	S	I
5825	S	S	S	S	S	S	S	S	6000	S	R	R	S	S	S	S	I
5753	S	R	R	S	S	S	S	S	5867	S	R	R	S	I	S	S	I
7275	R	R	R	S	S	S	S	I	5307	S	R	R	S	S	S	S	I
7111	S	R	R	S	S	S	S	I	5295	S	R	I	S	S	S	S	I
7245	S	R	R	S	S	S	S	S	4780	S	R	S	S	S	S	S	S
7479	S	R	R	S	S	S	S	I	5354	S	R	I	S	S	S	S	S
7152	S	R	I	S	S	S	S	I	4553	S	R	S	S	S	S	S	S
7177	S	R	R	S	S	S	S	I	5999	S	R	R	S	I	S	S	I
7511	S	R	S	S	S	S	S	I	5971	S*	R	R	S	S	S	S	I
7194	S	R	R	S	S	S	S	I	5949	S	R	R	S	I	S	S	I
6990	S	R	R	S	S	S	S	I	5238	S	R	R	S	S	S	S	I
6460	S	R	R	S	S	S	S	I	5538	S	R	R	S	S	S	S	I
6441	S	R	S	S	S	S	I	S	5514	S	R	S	S	S	S	S	I
6362	S	R	I	S	S	S	S	S	5852	S	R	S	S	S	S	S	R
6444	S	R	S	S	S	S	S	S	4727	S	R	R	S	S	S	S	S
6093	S	R	S	S	S	S	S	I	4781	S	R	I	R	S	S	S	S
6528	S	R	R	S	S	S	S	S	5102	S	R	S	S	I	S	S	S
6539	S	R	R	S	S	S	R	S	4703	S	R	I	S	I	S	S	I
6531	S	R	R	S	S	S	S	S	5434	S	R	R	S	S	S	S	I
6834	S	R	R	S	S	S	S	I	4668	S	R	R	S	S	S	S	I
6954	S	R	R	S	S	S	S	I	5933	S	R	R	S	S	S	S	S
6404	S	R	R	S	S	S	R	S	5904	S	R	I	S	S	S	S	S
6505	S	R	R	S	S	S	S	I	4800	S	R	S	S	S	S	S	I
6493	S	R	R	S	S	S	R	S	4830	S	R	S	S	S	S	S	I
6471	S	R	R	S	S	S	S	S	4857	S	R	R	S	S	S	S	S

IPM 耐性株は全て SMA ディスク感受性であったことから、IPM 耐性はクラス B  $\beta$ -ラクタマーゼによると考えられた。感受性の H27-5 株も SMA ディスクによる阻止円増大効果が見られたことから、感受性株についてもクラス B  $\beta$ -ラクタマーゼがある程度は発現していると考えられる。

(8) H27-5 株のゲノム解析結果から、*sigP-rsiP* 領域配列を検討しプライマーを設計して PCR 解析を行った。IPM 耐性株の *sigP-rsiP* 領域の PCR 解析では、7030 株、7100 株、7275 株は *sigP-rsiP* 領域の 7 と 12 が欠損していた。したがって IPM 耐性株では class B  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現調節に *sigP-rsiP* 領域の関与が示唆された。耐性コロニーを生じる株についても、5720 株、5971 株については変異が検出された。

*B. cereus* の  $\beta$ -lactamase 遺伝子と炭そ菌の  $\beta$ -lactamase 遺伝子はほとんど同一であり、炭そ菌 ABPC 耐性は class A  $\beta$ -lactamase の発現による。その発現は転写因子 *sigP* のリプレッサーである *rsiP* の欠失によると報告されている。*B. cereus* 血液分離 66 株の PCR 解析では、*sigP* 欠失株 (*rsiP* 同時欠失株を含む) が 49 株、*rsiP* 欠失株 (単独) が 8 株、*sigP* および *rsiP* の両方欠損株が 9 株、*sigP* および *rsiP* 両方に欠損検出されずが 9 株であった。以上から、血液分離株では *sigP* 機能の欠損株が一般分離株に比べて非常に多い。それらの株のほとんどは ABPC 耐性なので、炭そ菌と異なり ABPC 耐性に *sigP* 発現は関与していないと結論できる。*rsiP* は *sigP* 遺伝子のリプレッサーであり、*sigP* の発現を抑制する。しかし血液分離株は *rsiP* 単独欠損株が 8 株と少なく、それらの株では *sigP* が過剰発現して ABPC 耐性に寄与しているかもしれないが、他の *sigP* マイナスの ABPC 耐性株の説明ができない。ABPC 感受性の 2 株はいずれも大部分の領域で増幅がかからず、*sigP-rsiP* 領域のすぐ下流にある class A  $\beta$ -lactamase 遺伝子まで含めて欠失している可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 石原由華、宇佐美久枝、社本生衣、太田美智男	4. 巻 35
2. 論文標題 Bacillus cereus芽胞の各種医療用ディスポーザブル手袋への付着に関する定量的評価	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本環境感染学会誌	6. 最初と最後の頁 198-200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4058/jsei.35.198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石原由華、宇佐美久枝、社本生衣、太田美智男
2. 発表標題 血液および皮膚分離Bacillus cereusの ラクタム耐性の解析
3. 学会等名 第34回日本環境感染学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原由華、岡本陽、太田美智男
2. 発表標題 Bacillus cereusの -ラクタム耐性への転写因子SigPの関与はあるか
3. 学会等名 第31回日本臨床微生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原由華、宇佐美久枝、社本生衣、太田美智男
2. 発表標題 爪に付着したBacillus cereus芽胞に対するラビング法とスクラブ法の芽胞除去効果 実験的研究
3. 学会等名 第35回日本環境感染学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原由華、宇佐美久枝、社本生衣、柴山恵吾、太田美智男
2. 発表標題 敗血症患者血液由来および健常者皮膚分離Bacillus cereus株芽胞の消毒薬耐性
3. 学会等名 第37回日本環境感染学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上甲 恭平 (Joko Kyohei) (20310659)	椋山女学園大学・生活科学部・教授 (33906)	2020年3月定年退職
研究分担者	社本 生衣 (Shamoto Ikue) (40593512)	岐阜大学・医学部・准教授 (13701)	
研究分担者	宇佐美 久枝 (Usami Hisae) (80587006)	椋山女学園大学・看護学部・准教授 (33906)	
研究分担者	柴山 恵吾 (Shibayama Keigo) (50283437)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------