

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：35102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293448

研究課題名(和文) 薬剤耐性菌出現防止を目指した、看護師の手指細菌と免疫物質の国際的調査

研究課題名(英文) International Study of Nurse's Hand Normal Flora and Immune Substances Aiming the Drug-resistant Bacterium Prevention

研究代表者

荒川 満枝 (Arakawa, Mitsue)

鳥取看護大学・看護学部・教授

研究者番号：00363549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本とフィリピン共和国の両国で、手指消毒にアルコール擦式手指消毒剤を常用している看護師や長期実習経験者と、手指消毒剤を日常的に使っていない1年生の看護学生の手指常在菌叢の細菌分布を調査し、使用薬剤の量や種類が常在細菌へ与える影響を明らかにすることを目的とした。皮膚表面の優占種であるStaphylococcus属は、種によってアルコールに対する感受性に差があり、アルコールの長期使用により、より感受性の高いものが死滅し、他の属の占度を上げ、通過菌の常在を許すなどアルコールの使用で、皮膚の常在細菌叢の分布には明らかな変化が見られた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to certify the effect of process of hand hygiene to hand flora. We compared first-year nursing students as “without exposure to rubbing alcohol” and nurses or fourth-year nursing students as “with exposure rubbing alcohol” in Japan and Philippine. Some species of genus Staphylococcus, the dominant of hand flora have high sensitivity to alcohol and have been sterilized by long time alcohol usage. And another genus and transient flora could raise the dominant ratio in hand flora. In consequence, we detected the difference the spectrum of hand flora by long time alcohol usage.

研究分野：感染看護

キーワード：看護技術 薬剤耐性菌 手指衛生 常在細菌叢 免疫

1. 研究開始当初の背景

人にとって皮膚が正常であるということは、「常在細菌叢が正常に存在し、微生物に対して正常な防御機能を有している状態」と言える。しかし、医療者の手指衛生に関しては、WHO や米国 CDC より明示されている手洗いや消毒操作等の対策のガイドラインでは、「菌（細菌や真菌を含む）を消毒剤等の薬剤を用いて減らす」という事のみならず、主眼が置かれた研究に基づいており、人が当然持っている免疫という最も有効な抵抗力についての見解は示されていない。現在、安易な抗菌剤の使用が原因で生じた各種耐性菌の出現は、全世界的に大きな問題となっているが、アルコールについても同様のことが言えるだろう。

看護学は、人の持つ「健康を維持しようとする力」「回復する力」を最大限に生かすことに特徴があるが、まさにこのような「人が当たり前持っている力を活用して、余計な薬剤は使わない」という視点から、安易に薬剤に頼ることなく、自身の免疫力をもって常在菌と共生する道を模索すべきである。

研究代表者は長年、看護師の立場で微生物学および免疫学研究に携わり、近年、正常な手指に存在する常在細菌の種類を詳細に解析してきた。さらに H21-22 年度の挑戦的萌芽研究、H23-25 年度の基盤研究(C)において、手指表面にサイトカインや抗体のような免疫物質が存在することや、それらが手洗いによる影響を受けることを明らかにしてきた。

また、研究代表者はフィリピン共和国で看護実習の指導を実施してきた経緯より、世界的に看護職者を巻き込んだ共同研究へつながる土台を構築してきた。フィリピンは上下水道の整備が遅れているため、日本以上に手指消毒には薬剤を使うことが多い。従って、その細菌叢や手指免疫物質に大きな変化が起きている可能性は日本以上に高いと考えられる。研究代表者はこれまで、調査の対象を学生や教職員のような一般の健康な人としてきたが、看護師のような職業として日常的に薬剤による手洗いを継続している人や、日常や実習で多くのアルコールを使用する人を対象とし、アルコールという薬剤の継続使用が常在菌叢へどう影響するのかを調査することによって、薬剤の影響を正確に評価し、耐性菌を生み出さない手指衛生方法の提言へ結びつけることが可能となると考えた。

2. 研究の目的

日本とフィリピン共和国の両国で、手指消毒に1年以上擦式手指消毒剤を常用している看護師を「手指消毒剤常用者」として、手指消毒剤を使っていない人を「手指消毒剤非常用者」として、薬剤の使用状況を調査した上で、常在菌叢の細菌分布を調査し、使用薬剤の量や種類が常在細菌へ与える影響を明らかにする。

また、日本とフィリピン共和国の両国で、

手指消毒剤を使っていない「手指消毒剤非常用者」として人で常在菌叢の細菌分布と手指表面物質を比較し、両国で違いがあるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 研究倫理

ボランティアは基本的に健康な手指を持つ人とした。各国それぞれ手指消毒剤常用者（X 大学医学部附属病院およびサント・トーマス大学附属病院の看護師）、手指消毒剤非常用者（看護学生の1年生）を募集し、細菌採取するため、研究協力を依頼する手指細菌提供者所属の機関の研究倫理委員会への諮問を行った。フィリピンでの研究に関しては、研究協力者であるサント・トーマス大学の教員コルテス助教とナビダット助教が倫理審査書類作成のサポートおよび審査料金の支払い等の手続などの研究機関倫理委員会と研究代表者との仲介を担当した。

研究者所属の研究倫理審査委員会、サント・トーマス大学看護学部の研究倫理審査委員会では、研究実施に関して、特に問題なく承諾が得られた。しかし、サント・トーマス大学附属病院の研究倫理審査委員会からは、約1年間かけて2回の修正を経て、多くの補足説明もしたが、承認が得られなかったため、附属病院での試料採取は断念することとし、サント・トーマス大学（以下 UST とする）の研究協力者の二人と討議を重ね、対象を UST 看護学部の看護学生の1年生と4年生で比較することとした。フィリピンでは、日本に比べて実習期間が長く、実習内容もより臨床的で、注射や採血、投薬などの患者の医療的ケアも教員の下で行うため、ほぼライセンスを持った看護師と同様の体験をしている状況であり、1年生と4年生の比較は有効と判断した。

尚、本研究に関する研究倫理のポイントとしては、次の①～③の説明を、文書および口頭で行うこと、さらに実験に関しては、本研究施設内の BSL2 の実験施設で行い、培養細菌等の微生物や人体より発したサンプルは、各操作および保存終了後即時滅菌して廃棄することであった。

〈説明事項〉

①ボランティアに対しては、手指表面の物質や細菌採取のため、手指を無害な液体に浸漬し、その液体の回収を実施するが、いずれもボランティアの自由意志に基づく協力のため、拒否や中断が可能であること、拒否や中断によって不利益を被る事が全くないことを説明する。

②データやサンプルについては、ボランティア個人を特定できないよう取り扱う。採取したサンプルについては、実験の進行とともに不必要になった時点で、即時滅菌後廃棄することを説明する。

③ボランティアに対しては、研究概要、サンプルの採取方法、結果として出る内容、考え

られる不快や不利益について適切に説明し、質問や結果の説明には全て対応する。

ボランティア募集に関しては、日本国内はポスターによって行い、教員や上司の強制力等が働かないように配慮した。フィリピンに関しては、研究協力者が強制力の排除に努めて学生募集を行い、試料採取中も英語とタガログ語を交えて丁寧に説明を行うなどの配慮を行った。

採取の際は、流水と石けんによる手洗いをし、通過細菌を除去して常在細菌のみを残した状態で実施した。この方法は、世界的に標準化されている方法を使うこととし、実際の手洗いの際には、その方法を図示したものを提示し、徹底した。手洗い後に、グローブジュース法にて手指の常在細菌を採取し、SCD 寒天培地で 48 時間好氣的に培養した。検出したコロニー数から片手あたりの細菌数を算出し、コロニーの特徴ごとに細菌を分類、グラム染色を行った。また、細菌培養後、一部を PCR にかけて DNA を増幅した。増幅した DNA は、精製前後に電気泳動にてその存在を確認し、16S rRNA 部分の遺伝配列を調べ、NCBI の BLAST® でアライメントする分子生物学的な種の同定をし、看護師群と学生群 (国内調査) または、1 年生と 4 年生 (フィリピン調査) とでその特徴を比較した。グラム染色の結果と配列分析からの結果はそれぞれ照合し、矛盾がないことを確かめた上で、種を確定した。PCR で増幅できなかったものについては、増幅不可とし、増幅・精製後の電気泳動にてバンドが確認できるものの、配列が読めないものについては、同定不可とした。

上記得られた結果について統計解析を行い、手指消毒剤の使用の程度を中心としたボランティアの属性の違いによる常在細菌種の種類や量の影響を統計的に分析した。

採取した試料は適宜試料の凍結保存を行った。

4. 研究成果

(1) 対象者の属性

国内調査では、本研究に同意の得られた、健常な手指を持つ者とした。X 大学附属病院看護師 12 名および、X 大学医学部看護学科 1 年生で衛生的手洗い指導前の学生 11 名を対象として、グローブジュース法にて手指の常在細菌を採取し分析、比較を行った。X 大学医学部附属病院は、感染制御チームの活動も盛んで、専従の感染制御ナースが活躍している病院で、6 病棟からの参加があった。

フィリピンの調査では、本研究に同意の得られた、健常な手指を持つ 1 年生と 4 年生の看護学生、それぞれ 16 名を対象とした。調査の対象とした UST の看護学部は、各学年 1,000 人近い学生が在籍していて、毎年フィリピンにおいてトップクラスの国家試験合格実績を誇っている。その中で、本研究に興味を示した学生ばかりが集まっていた。また、

国際的な研究であるということからも、関心が高かった。

いずれの協力者も、自らの手指衛生や手指細菌叢に大変興味を持っている方々であった。

(2) 細菌数とコロニーの種類について

①国内調査

看護師では、片手当たり約 30,000CFU の細菌が検出され、学生の約 70,000~90,000CFU に比して、細菌数が少ない傾向が見られ、利き手に関しては統計学的にも有意な差があった。

②フィリピン調査

フィリピン調査に関しては、1 年生と 4 年生の看護学生を各 16 名リクルートし、グローブジュース法にて手指の常在細菌を採取し分析、比較を行った。

4 年生では、平均すると片手当たり約 50,000CFU が検出された。一方、1 年生では、約 82,000CFU が検出され、国内比較の看護師と学生での差に比して、違いは明らかではなかったが、アルコール消毒をする機会が多い実習期間の長い 4 年生のほうが 1 年生に比して少ないという、同様の傾向は見られた。ただし、細菌数については両群に統計学的な有意差はなかった。また、コロニーの種類については、国内比較と同様、4 年生は 1 年生に比して、その種類数が有意に少なかった。

③両調査を総合

アルコールの長期使用が、細菌数の減少に影響していると考えられた。この減少が、院内感染制御に、一定の効果をもたらしているだろうことは予想できるが、その細菌種の分布内訳も総合して考える必要があると考えられた。

いずれの国も、1 年生では片手当たり平均して 80,000CFU の細菌が検出され、桁数に違いはなく、細菌数に関して両国に大きな相違はなかったが、同群内でも分散は高かった。片手で 400CFU と 253,000CFU の者が混在するなど、最小と最大では 500 倍~600 倍ほどの違いが見られた。特に学生は、その差が大きかった。

(3) 細菌の種

①国内調査

国内調査では、看護学生・看護師のいずれの群も Staphylococcus 属 (ブドウ球菌属) が優占種であったが、看護師では、学生よりも明らかに Staphylococcus 属の種のバリエーションが低く、種に偏りがあった。さらに、芽胞を持つ菌である Bacillus 属は看護師群の方が多く傾向が見られた。Kocuria 属も看護師の方に多く検出された。学生では、DNA の増幅が難しいものやシーケンシングが難しいものの割合が多かった。このような細菌は、アルコールへの感受性が強く、長期間にわたるアルコールの使用により、減少している可能性があると考えられる。

個人によってその細菌種の分布は様々であった。左右で違いが見られるものも多かった。いずれの群も *S.warneri* が優占種であるものが半数であった。看護師では、*S.capitis* が優占種になっているものがあり、学生にはない傾向だった。一方で看護師は学生に比べて *S.epidermidis* が少ない傾向があった。

②フィリピン調査

フィリピン調査も、概ね国内の比較と同様の違いが見られた。1年生・4年生のいずれの群も *Staphylococcus* 属が優占種で、4年生では、1年生よりも明らかに *Staphylococcus* 属の種のバリエーションが低く、種に偏りがあった。1年生では、全て *Staphylococcus* 属で占めていても、いくつかの種が含まれていて、多種類の *Staphylococcus* 属が手指表面を守っている様子があった。4年生では、*Kocuria* 属や *Micrococcus* 属も検出され、*Moraxella* 属さえも検出された。

③両調査を総合

皮膚表面の優占種である *Staphylococcus* 属は、種によってアルコールに対する感受性に差があり、アルコールの長期使用により、より感受性の高いものを死滅させ、*Kocuria* 属や *Micrococcus* 属の占度を上げている可能性が考えられた。また *Moraxella* 属のような、通過菌の常在を許す状況を作り出している可能性も考えられた。芽胞を持つ菌である *Bacillus* 属も同様に、アルコールの長期使用者に多く見られたと考えられる。アルコールの使用で、皮膚の常在細菌叢の分布には明らかな変化が見られた。

(4) 新種の細菌の存在

種の同定を行う際には、得られたコンタミの無い遺伝配列とのアライメントにおいて、ほぼ 100% 合致することとして判断したが、いくつかの細菌については、かなり配列が違っており、新種の細菌である可能性は否定できなかった。分布割合としてはわずかであったため、本研究の目的からは大きな問題とならず、研究倫理の問題からも、追究には限界があった。未だ発見されていない細菌が存在するのは当然のことであるため、今後全ゲノム配列の読解を見越した研究計画を立てるべきだと考えた。

また、同じ種であっても、明らかにコロニーの形状や性状が違っているものもいくつか見られた。これらについては、今後生化学的な特徴を見極め、上記全ゲノムの解明によって、様々なことが解明されるのではないかと考えられた。

(5) 今後の展望

今回、フィリピン共和国の看護師に研究手法を伝え研究協力体制を引くことができたことも、大きな成果であった。本研究では、文化背景の違う 2 国間での比較を行ったが、他の国でも同様であるか、検証することには大きな意義があると考えられる。その際、看護師

ライセンスを持つ看護研究者へ実験技術を伝え、互いに研究協力ができるよう尽力したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

① 荒川満枝、岡山加奈、第 32 回日本環境感染学会総会・学術集会 (神戸国際展示場・神戸国際会議場・神戸ポートピアホテル)、2017.02

② Mitsue Arakawa、Kanna Okayama、Elizabeth Cortez、Florence C. Navidad、21st East Asian Forum of Nursing Scholars (ソウル、韓国)、2018.01

③ 荒川満枝、岡山加奈、第 15 回コ・メディカル形態機能学会 (京都大学医学部)、2016.09

④ 荒川満枝、岡山加奈、第 31 回日本環境感染学会総会・学術集会 (国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都)、2016.02

⑥ 徳丸真由美、岡山加奈、荒川満枝、第 30 回日本環境感染学会、(神戸国際展示場・神戸国際会議場・ポートピアホテル)、2015.02

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 満枝 (ARAKAWA Mitsue)

鳥取看護大学・看護学部・看護学科・教授
研究者番号：00363549

(2) 研究分担者

岡山 加奈 (OKAYAMA Kanna)

大阪市立大学・大学院看護学研究科・准教授
研究者番号：20549117

(3) 研究協力者

コルテス エリザベス (CORTEZ

Elizabeth)

College of Nursing, University of Santo Tomas, Manila, Philippine, Assistant Professor

ナビダット フローレンス (NAVIDAD Florence)

Department of Medical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Santo Tomas, Manila, Philippine, Assistant Professor