

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：33906

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11487

研究課題名(和文) セレウス菌芽胞の病衣・リネン汚染による院内感染の防止対策

研究課題名(英文) A basic research for the contamination of Bacillus cereus spores on hospital clothes and linens to prevent hospital infections caused by Bacillus cereus

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) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：清拭タオルのセレウス菌芽胞汚染の高感度検出のために改良ビーズ抽出法を考案し、検出の報告が無かったA病院の洗浄済み清拭タオルからセレウス菌汚染を高頻度検出した。またセレウス菌芽胞の付着しにくいリネン開発のために、セレウス菌乾燥芽胞の繊維への付着実験法を考案した。その結果、羊毛、絹、アクリルには芽胞が多く付着していたが綿やレーヨンには芽胞の付着が軽度だった。付着の程度は布の織り方にも関係していた。結果を基に安全な病衣の開発を検討している。

一方、点滴ラインからのセレウス菌感染防止のために、健康者前腕皮膚のセレウス菌汚染の有無を調査し、約20%の被験者からセレウス菌が検出、高度耐性菌も見出された。

研究成果の概要(英文)：We modified the beads extraction method and developed a highly sensitive method for the detection of Bacillus cereus spores which contaminate hand towels. We applied this method to hand towels regarded as clean of A hospital and found out a substantial degree of B. cereus contamination of the towels. We also performed an adherence test of B. cereus spores to various fabrics in order to find materials for hospital linens which are resistant to spore adherence. As a result, B. cereus spores adhered highly to wool, silk, and acryl fiber, whereas only slightly to cotton and rayon. We also found that the contexture of clothes affected the adherence of spores. Based on these results, we started developing of safe patient clothes.

We also investigated the colonization of B. cereus spores on the forearm skin of healthy adults and found that 20% of them carried B. cereus spores on their skin. Among these B. cereus isolates, we found a highly resistant strain which needs special attention.

研究分野：看護学

キーワード：セレウス菌 芽胞 清拭タオル 病衣 改良ビーズ抽出法 乾燥芽胞付着実験法 布の織り方 セレウス菌皮膚汚染

1. 研究開始当初の背景

2013年8月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検出された。同様の事例が各地の病院から報告されている¹⁾。セレウス菌は環境に広く存在し芽胞を形成して熱、乾燥、消毒薬に抵抗性を示す。芽胞は清拭タオル、シーツ類、病衣を汚染し、末梢静脈点滴ルートから患者の血液中に侵入する。芽胞は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か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分が基本とされ、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、科学的に根拠のある洗浄方法が確立されてはいる。また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。本研究ではリネン類への芽胞汚染防止ならびに点滴ルートを汚染させない手技（看護技術）などを検討することで、セレウス菌による院内感染の防止を目指すものである。

2. 研究の目的

(1) 医療環境におけるセレウス菌芽胞の汚染源について調べるために、病室、処置室、点滴液調製室および使用物品などを調査する。なお調査においては、セレウス菌の血流感染事例が夏季に増加し、清拭タオル中のセレウス菌数の増加と相関するとの報告もあるため、季節変動なども考慮する。

(2) 芽胞汚染源となる部位や物品が特定されたら、汚染防止対策を検討するとともに、その汚染を病衣やリネンに付着させないための方策、さらに点滴ルートを汚染させない手技（看護技術）を検討する。

(3) 病院で使われている病衣、白衣などの衣類やシーツ類に対するセレウス菌芽胞の付着実験を行い、繊維材料の違い、織り方の違いによる芽胞の付着状態を走査電子顕微鏡で精査する。

(4) 各種繊維に付着したセレウス菌芽胞を除去する方法を検討する。

(5) セレウス菌芽胞が付着しにくく、洗浄によって除去されやすい材質、織り方などについて検討する。そのような安全な布が見いだされたら、病衣・リネン類として利用することを提案する。

3. 研究の方法

(1) 清拭タオルのセレウス菌汚染状況を定量的に測定する方法として、既存のビーズ抽出法をより検出感度の高い方法に改良した。

この改良ビーズ抽出法を用いて、冬季にA大学病院で洗浄済み清拭タオルのセレウス菌汚染状況を調査した。

(2) 病院から提供された清拭タオルの切片(1cm×1cm)をセレウス菌芽胞懸濁液に浸漬後、セレウス菌芽胞の付着状況を走査電子顕微鏡で観察した。

(3) セレウス菌芽胞懸濁液に病院から提供された清拭タオルと病衣の各切片(1cm×1cm)を10分間浸漬し室温で2日間乾燥後、A, B, C社各洗剤で洗浄し(1回洗浄・3回すすぎ)、洗浄効果を走査電子顕微鏡で観察した。

(4) セレウス菌芽胞懸濁液に各種布を浸漬した実験法では水にぬれたままリネンを使用することになり現実的ではない。そこで水成分の影響を排除するために乾燥芽胞を複製して、各繊維への付着実験を行った。

(5) 入院前からすでに土壌やほこりなどの環境からセレウス菌芽胞がヒトの前腕皮膚を汚染しているかをA県在住の40歳以上の成人を対象に調査した。

(6) 14種類の織り方の異なる布について、セレウス菌乾燥芽胞の付着実験を行った。

4. 研究成果

(1) 2015年2～4月にA大学病院のICUにおいて、洗浄業者から納入された清拭カートに入れる前の洗浄済み清拭タオル(30×70cm)を無作為に毎週1本選択した。改良ビーズ抽出法では、1枚のタオル全体から23か所の切片を無菌的にカットし(図1)、各切片を約2cm×2cmとした。

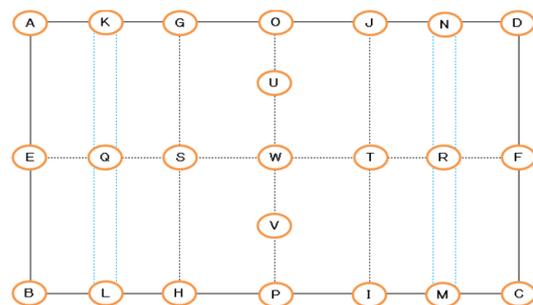


図1 清拭タオルの23か所のカット部位

各切片をそれぞれ20mLの滅菌生理食塩水を直径5mmの滅菌ガラスビーズ30個が入った滅菌遠心管(50mL)に入れた。これをボルテックス・ミキサーで最大強度で20秒間の振とうを10回実施後、滅菌手袋を装着した手で切片を強く搾ってから取り除き、遠心管の中に残った生理食塩水を200μL採

取し、NGKG 寒天培地に接種して 30℃で卵黄反応の有無を確実に判定するため 48 時間培養した。その後、培地上に発育してきたコロニーを観察し、卵黄反応陽性のコロニーをグラム染色後セレウス菌と推定し、コロニー数を測定した。さらにセレウス菌と推定後、羊血液寒天培地に接種してβ溶血の有無を確認してセレウス菌と同定した。その結果、今回調査したタオル全 9 枚中 7 枚にセレウス菌の検出がみられた。また図 2 に示した箇所の清拭タオルの各切片におけるセレウス菌の汚染状況では、最もセレウス菌コロニーが検出された清拭タオル（4 月 2 日）は、全ての切片からコロニーが検出された。切片別のコロニー数では J の部分が 41 個で最も多かった。また提供されたタオル全ての中で、4 枚のタオルで検出されたのは C, T の部分で、次いで 3 枚のタオルでは E, F, L, P, V, W の部分で、2 枚のタオルでは A, B, D, G, H, Q, R であった。23 か所の切片の中で、セレウス菌が検出されなかった部分はなかった。以上から、タオル中心部と比較して周辺部位である C, E, F, J, O などセレウス菌の汚染が多い傾向が見られた。

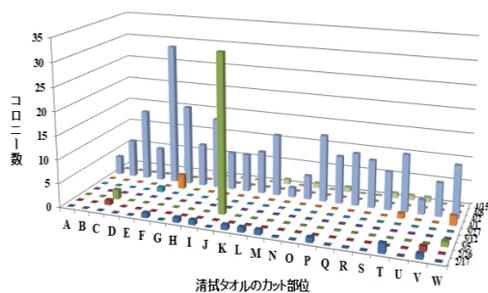


図 2 清拭タオルの各カット部位のセレウス菌コロニー検出状況

(2) 病院から提供された清拭タオルへのセレウス菌芽胞の付着状況について検討した。セレウス菌 NC 12 4 1 株を普通寒天培地に接種し、37℃で 3 日培養して、芽胞染色で 80%以上が芽胞になっていることを確認後、滅菌水に懸濁して OD₅₅₀ = 0.55 (膜ファランド濁度標準液 No. 3) に調整した。そして室温 5℃下でタオル生地切片を芽胞懸濁液に 10 分間浸漬後滅菌水で 3 回洗浄した。さらにデシケーター内で 2 日間乾燥後、金コーティングを 1~2 分間施し、走査電子顕微鏡で布地へのセレウス菌芽胞の付着状況を未処理の対照 (セレウス菌芽胞を付着させていない) と比較して観察した。清拭タオルの素材は綿繊維であり、全体の織り目がゆるく繊維がほつれている部分があった (図 3-A)。芽胞はタオル地繊維の表面ならびに窪みに付着し、特に窪みに付着が多く見られる傾向があった (図 3-B)。

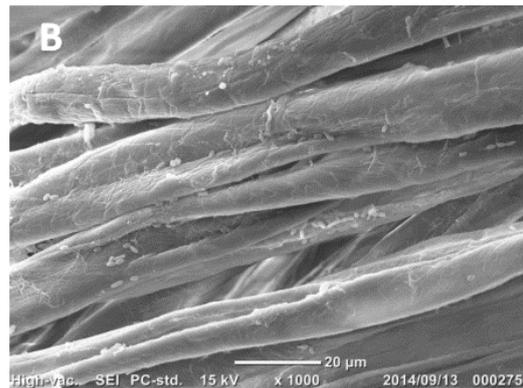
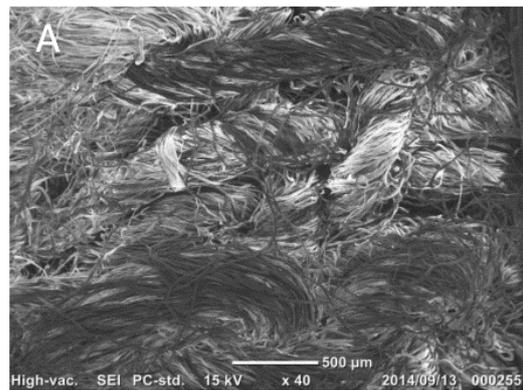
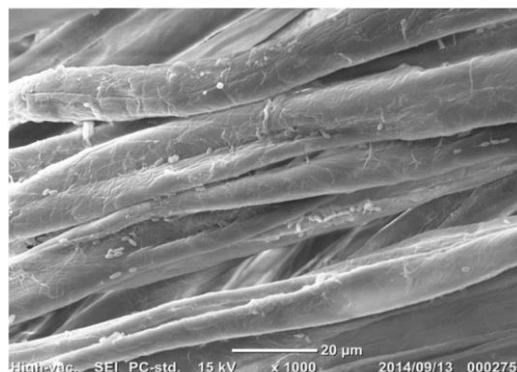


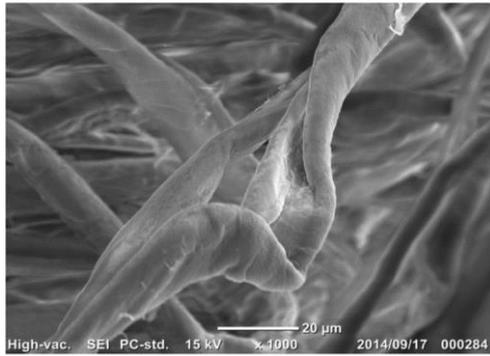
図 3 走査電子顕微鏡によるセレウス菌芽胞のタオルへの付着観察。タオル表面 (A, 100 倍率)、タオル綿繊維に付着した芽胞 (B, 1000 倍率)。

(3) セレウス菌芽胞懸濁液に病院から提供された清拭タオルと病衣 (綿 35%・ポリエステル 65% 混合) の各切片 (1 cm×1 cm) を 10 分間浸漬し室温で 2 日間乾燥後、A, B, C 社各洗剤で洗浄し (1 回洗浄・3 回すすぎ)、洗浄効果を走査電子顕微鏡で観察した。タオルや病衣に付着した芽胞に対する洗浄効果については水のみと洗剤とは違いがほとんどみられず、洗浄後も芽胞は一部残存していた (図 4)。また次亜塩素酸ナトリウムによる消毒を加えた後も、芽胞は残存していた。

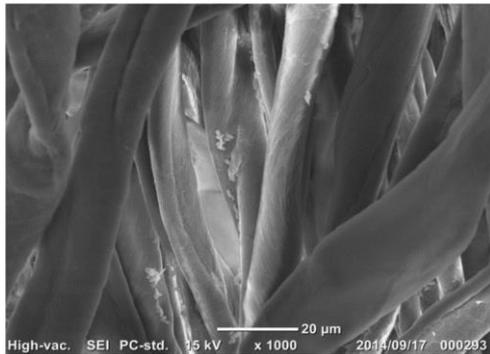
洗浄前



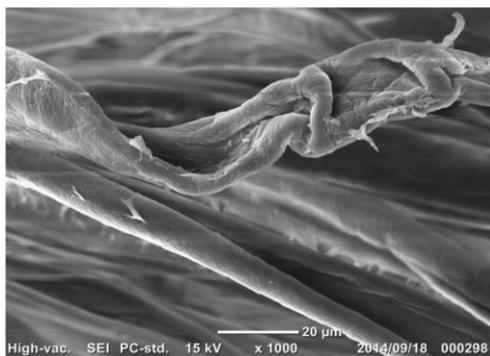
水



A 社洗剤



B 社洗剤



C 社洗剤

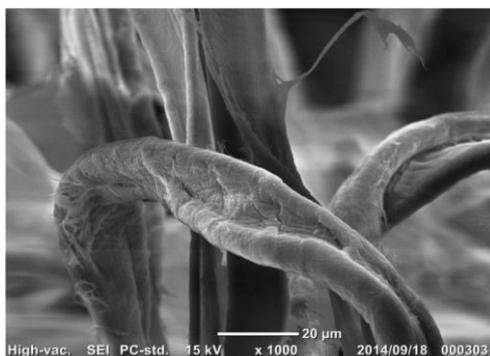


図4 清拭タオルのセレウス菌芽胞汚染に対する各種中性洗剤の洗浄効果（1000倍率）

(4) セレウス菌 NC1241 株の乾燥芽胞を用いて各繊維への付着実験を行った。綿、ナイロン、アセテート、羊毛、絹、ポリエステル、レーヨン、アクリルの中で、綿やレーヨンには最も芽胞が付着していなかった。それに対して、羊毛、絹、アクリルには多くの芽胞が付着していた。したがって、繊維の種類によってセレウス菌芽胞の付着状況が異なることが示唆された。

(5) 2015～2017年にA県在住の20歳以上の成人350名を対象に、前腕皮膚のセレウス菌汚染状況調査を行った。この調査は、椋山女学園大学看護学部研究倫理審査委員会の承認（承認番号 No. 156）を得て行われた。研究への同意を得た被験者の右または左前腕の皮膚（10×10cm）を滅菌生理食塩水で湿らせた滅菌綿棒でぬぐい、NGKG卵黄寒天培地に接種後、30℃で48時間培養した。卵黄反応陽性コロニーについては、グラム染色後セレウス菌と推定し、羊血液寒天培地でβ溶血を確認してセレウス菌と同定した。その結果、被験者の19.4%（68/350名）からセレウス菌が検出された。以上から、入院前からヒトの前腕皮膚はセレウス菌で汚染されていることが示唆され、入院後に点滴針を挿入する時にはアルコール消毒の前にセレウス菌芽胞を洗い除くなどの対策を講じる必要がある。

また分離されたセレウス菌について、CLSIディスク拡散法で薬剤感受性を調べた。イミペネム（IPM）、バンコマイシン（VCM）、アンピシリン（ABPC）、ミノサイクリン（MINO）、ゲンタマイシン（GM）、レボフロキサシリン（LVFX）、クリンダマイシン（CLDM）、セファゾリン（CEZ）、クラリスロマイシン（CAM）の9剤を用いた。またPCRでクラスB1メタロ-β-ラクタマーゼ（MBL）遺伝子を検出した。68株中8株がアンピシリン、セファゾリンに耐性を示し、そのうち1株がイミペネムにも耐性を示した。これらの8株全てがMBL遺伝子を保有していた（表1）。

表1 8株の薬剤感受性と MBL 遺伝子の検出

Strain	IPM	VCM	ABPC	SBT/ABPC	MINO	LVFX	CLDM	CEZ	CAM	ST	GM	MBL gene
5	S	I	R	I	R	S	S	R	S	R	S	(+)
5a*	R	I	R	R	R	S	S	R	S	R	S	(+)
13-2	S	I	R	I	S	S	I	R	S	R	S	(+)
3-1	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	(+)
17-1	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	(+)
20	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	(+)
31-1	S	S	R	I	S	S	S	R	S	S	S	(+)
1-1	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	(+)
30-1	S	S	R	I	S	S	S	R	S	R	S	(+)

* 5a：菌株5のIPM耐性変異株（図5）



図5 菌株5 IPM 耐性

この8株については、アンピシリン・スルバクタム（クラス A β -ラクタマーゼを阻害する）についても抗菌薬感受性試験を行い、8株全てが耐性を示した（表1）。したがって、アンピシリン耐性はクラス A β -ラクタマーゼによるものであることが示唆され、またイミペネム耐性はメタロ β -ラクタマーゼの発現の可能性が考えられた。さらに、このイミペネム耐性株について、メタロ β -ラクタマーゼ遺伝子領域を以前我々が全ゲノムを決定したセレウス菌 NC 7 4 0 1 株と比較したが、遺伝子の配列に大きな違いはなかった。以上から、メタロ β -ラクタマーゼ遺伝子の発現調節を担う領域が起因であることが示唆された。

（6）これまでのセレウス菌 1 2 4 1 株乾燥芽胞の各繊維への付着実験から、我々は綿やレーヨンには芽胞が最も付着しないことを見出した。次に繊維の織り方に着目して、14種類の織り方の異なる布について、セレウス菌乾燥芽胞の付着実験を行った。使用した布は、綿ニット、綿金布、コットンロール、麻100%、麻ブロード、綿ツイル、綿ネル（両面）、ナイロン100%（平織）、ナイロン100%（綾織）、精華パレス、ポリエステル100%シフォンジョーゼット、テトレックス、テンセル、ポリエステル100%うずらちりめんであった。その結果、ナイロンでは平織（図6）よりも綾織（図7）の方が多くの芽胞が付着していた。またポリエステルではシフォンジョーゼットにも、うずらちりめんにも多くの芽胞が付着していた。その一方で、麻では麻100%や麻ブロード、綿ではコットンロールや綿ネルならびに綿金布には僅かな芽胞しか付着していなかった。精華パレスやテンセル、テトレックスにはほとん

ど芽胞は付着していなかった。以上から、繊維の織り方の違いによってセレウス菌芽胞の付着状況が異なることが示唆された。今後は、これまでのデータを基に芽胞が付着しにくい安全な病衣の開発を検討している。

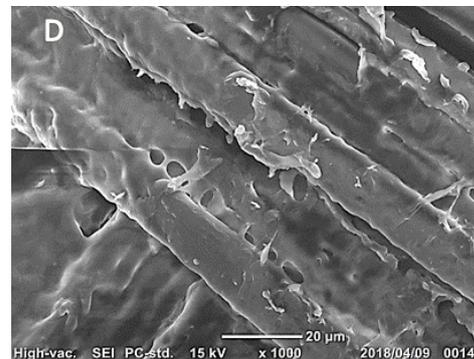
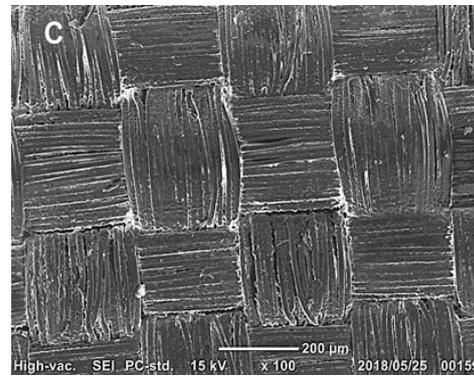
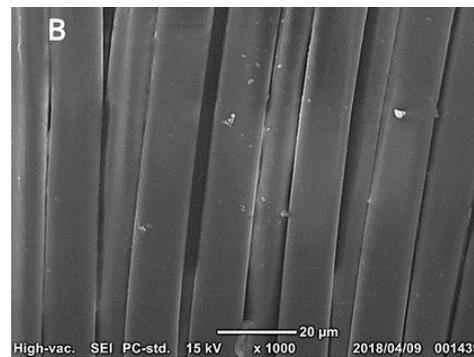
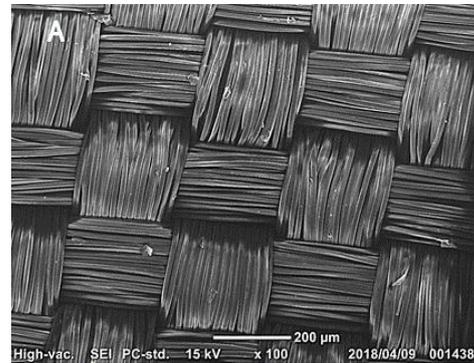


図6 ナイロン（平織）へのセレウス菌 NC 1 2 4 1 株芽胞の付着. A, B は表面、C, D は裏面. A, C は 1 0 0 倍率, B, D は 1 0 0 0 倍率.

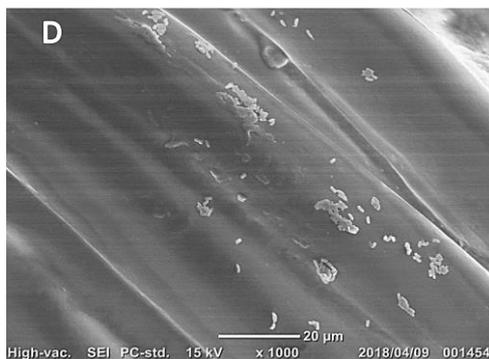
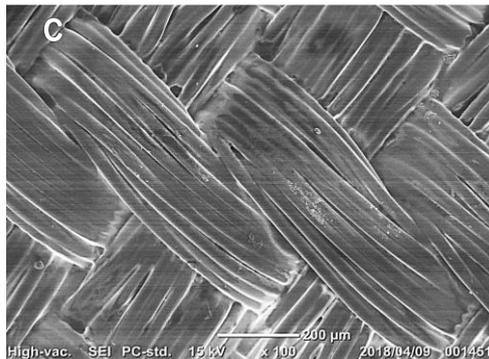
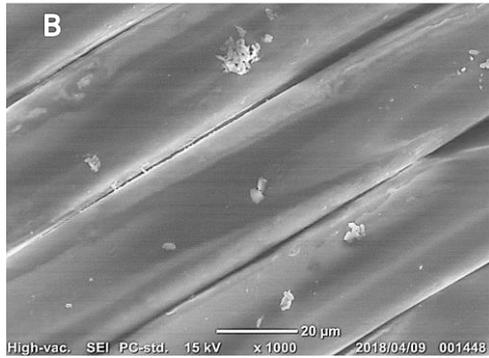
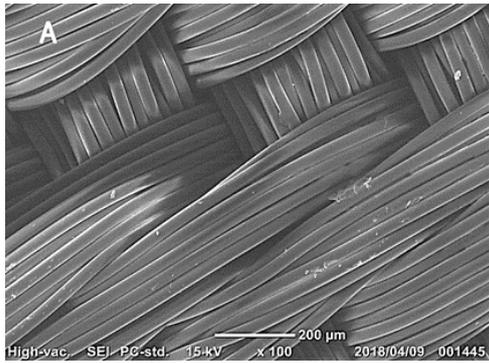


図7 ナイロン（綾織）へのセレウス菌 NC1241株芽胞の付着。A,Bは表面、C,Dは裏面。A,Cは100倍率、B,Dは1000倍率。

<引用文献>

① Sasahara T, et al. *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30, 2011, 219-226

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

① 石原由華、宇佐美久枝、畠山和人、太田美智男、清拭タオルの *Bacillus cereus* 汚染を高感度に検出する改良ビーズ抽出法、日本環境感染学会誌、査読有、32巻、2017、85-88

DOI: <https://doi.org/10.4058/jsei.32.85>

〔学会発表〕(計 6件)

① 石原由華、宇佐美久枝、社本生衣、太田美智男、清拭タオルにおける *Bacillus cereus* の汚染状況ならびに *B. cereus* 芽胞除去対策について、第31回日本環境感染学会、京都、2017年、2月

② 石原由華、宇佐美久枝、社本生衣、太田美智男、健常者における *Bacillus cereus* の皮膚汚染、第32回日本環境感染学会、神戸、2017年、2月

③ 石原由華、岡本陽、太田美智男、*Bacillus cereus* の有機酸感受性 - 食中毒予防に向けて、東京、第91回日本感染症学会、2017年、4月

④ Ishihara Y, Usami H, Shamoto I, Ohta M, CONTAMINATION OF HEALTHY ADULTS' SKIN WITH *BACILLUS CEREUS* IS NOT RARE. The International Conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*, Canada, 2017, October

⑤ Ishihara Y, Okamoto Y, Ohta M, SUSCEPTIBILITY OF *BACILLUS CEREUS* TO ORGANIC ACIDS AND THEIR SODIUM SALTS. The International Conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*, Canada, 2017, October

⑥ 石原由華、岡本陽、太田美智男、*Bacillus cereus* metallo-beta-lactamase の分子疫学解析、第29回日本臨床微生物学会、岐阜、2018年、2月

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

太田美智男 (OHTA, Michio)
 椋山女学園大学・看護学部・教授
 (2017、3月退職)
 研究者番号：20111841
 宇佐美久枝 (USAMI, Hisae)
 椋山女学園大学・看護学部・准教授
 研究者番号：80587006
 佐藤晶子 (SATO, Akiko)
 椋山女学園大学・看護学部・助教
 研究者番号：20593510
 社本生衣 (SHAMOTO, Ikue)
 岐阜大学・医学部看護学科・准教授
 研究者番号：40593512