

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593142

研究課題名(和文) 薬剤耐性菌出現を防止するための、看護師の手指表面免疫物質による抗菌効果

研究課題名(英文) The effect of antimicrobial with hand surface immune materials to prevent appearance the drug resistant bacteria

研究代表者

荒川 満枝 (Arakawa, Mitsue)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00363549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、「手指の免疫機能と皮膚常在菌との相互作用」を明らかにすることを目的として実施した。27名のボランティアの協力を得て、その両手について、手洗い前、また何らかの手洗い(水洗い、液体石けんを用いた流水による衛生的手洗い)後の試料として、手指の細菌と共に手指表面の物質を採取した。予備実験より免疫物質5種類について測定したところ、免疫グロブリン、IL-1 α 、IL-1 β の3種類が検出できた。これらの量は、個人差や左右差も見られ、手洗いによって変動した。手指表面に免疫物質が測定できた試料は、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌の増殖抑制効果を検討したが、明らかな抑制作用の検出には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is the interaction between immune function of the hand surface and commensal bacteria. Hand washing samples from 27 volunteers were harvested before and after hand washing (water hand washing or hand washing with liquid soap). The samples were assumed including bacteria and immune substances like cytokine and immune globulin from hand. Regards to pre-examination, these sample were assayed about 5 immune materials, the 3 material; Immune globulin, IL-1 α and IL-1 β were detected. These values were varied in individual, laterality and kind of hand washing. These samples were assayed about inhibition of coagulase negative Staphylococcus spp. growth. But inhibition effect was not detected clearly.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：看護学・基礎看護学

キーワード：手指衛生 薬剤耐性菌 免疫 サイトカイン 看護師 医療関連感染 標準予防策

1. 研究開始当初の背景

抗菌剤の乱用がもたらした薬剤耐性菌の出現は世界的な問題である。看護師の手指は患者に直接接する機会が非常に多く、手指衛生は院内感染防止の最重要ポイントであるが、その方法は、薬剤の抗菌作用に頼っているのが現状である。本研究では、安易に薬剤に頼らない、つまり耐性菌を生み出さない手指衛生方法の提言を目指した。

医療者の手指衛生に関しては、既に手洗いや消毒操作等の対策のガイドラインが WHO や米国 CDC より明示されているが、「菌(細菌や真菌を含む)を消毒剤等の薬剤を用いて減らす」という事の中に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。また、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、院内感染対策に大きな問題を提起している。

研究代表者は、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という考えを基盤に、これまで、正常な手指に存在する常在細菌の種類を明らかにし、手指表面に存在する免疫物質であるサイトカインの存在検出に成功した。この研究を継続・発展させて、手洗い後にそのサイトカインがどう変化するかなどを明らかにし、人の持つ常在菌に対する人側の免疫という防御システムについて詳細な知見を得ることで、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

(1)安価で有用な手指表面サイトカイン測定システムの構築；サイトカインの検出は測定キットが多く用いられ、全てを測定キットに頼るとかなりのコストがかかる。それで今回は、手指表面に存在する一部のサイトカイン測定方法を独自に最適化し、安価に測定可能なシステム(ELISA法)を構築することとした。

(2)個人特性による手指表面サイトカイン分泌の違いと常在細菌叢への影響；手指表面物質を提供して下さるボランティアを募集し、個人の特性(年齢、性別、抗菌剤の使用歴と種類)とサイトカイン濃度の関係、個人の特性と細菌増殖抑制効果との関係、サイトカイン濃度と、常在する細菌の種類との関係といった、個人特性がサイトカイン分泌に与える影響と、分泌されたサイトカインと常在細菌との相互作用を明らかにすることとした。

(3)手洗い方法が手指表面のサイトカインに与える影響上記ボランティアの方に手洗いを実施してもらい、その後の試料も採取させていただくことで、手洗い方法の違いによって、手指表面のサイトカイン濃度に変化が生じるか、明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1)手指表面物質と手指の常在菌をご提供いただくボランティアを募集するに当たり、所属する機関の研究倫理委員会へ諮問し、承認を得た。ボランティアとして、27名の協力が得られた。いずれも健常な手をもつ方であった。ただし、その属性は年齢や性別、抗菌剤の使用の頻度などが偏っており、またボランティアの数も当初の予定ほど集まらず、被検者の属性によるサイトカイン量の影響は検討することが出来なかった。

(2)手指表面の免疫物質の測定システムの構築；測定するサイトカインは、上皮細胞が分泌するとされているものを8種類選択し、予備実験にて得られた試料を使って、実際に測定してみたところ、手指表面で検出できるものは4種類に絞られた。その4種類について、ELISA法を確立するため、サイトカインの標準品、使用抗体、使用2次抗体、発色剤、ブロッキング剤、緩衝液について、また反応時間や温度について最適化を行い、測定方法を確定した。また、免疫グロブリンについては、本研究室で確立された方法を用いた。標準品として、本研究室の凍結保存血清を用いた。

(3)研究ボランティアからの免疫物質を含む試料採取と測定；研究者が所属する機関の中で、健常な手指を持つ方を研究ボランティアとして募集した。その手指表面の試料採取の際は、手洗いをする前と、何らかの手洗い(水洗い15名、液体石けんを使用した衛生的手洗い12名)をしたものとで試料を採取した。その際、グローブジュース法を改変した方法を採用した。採取した手指表面物質は濾過滅菌により細菌成分を除去した後に実験に供した。試料は適宜凍結保存しながらサンプル数が揃ったところで上記の通り確立した方法でサイトカインと免疫グロブリンを測定した。

(4)研究ボランティアからの手指表面の細菌採取；手指表面の細菌も採取し、これらの細菌は凍結保存しておき、手指表面物質の細菌への増殖抑制効果をもつか、すなわち手指表面物質が抗菌効果を示すかを調べるために供した。保存していた細菌を一日培養後、一部をPCRにかけて16S rRNA配列を調べる方法で細菌種を同定し、コアグラウゼ陰性ブドウ球菌を選んで、上記手指表面物質が細菌の増殖に抑制的に働くかという抗菌効果を判定した。

4. 研究成果

(1)手指表面の免疫物質測定；予備実験で検出できた4種類のサイトカインについて、実際に今回得られた試料で測定したところ、2種類については殆ど検出されず、IL-1と

IL-1 のみが検出できた。免疫グロブリン (Ig) も、予備実験同様測定可能であった。以下にその測定結果について示す。

各物質の手洗い前の値について；IL-1 の手洗い前の最大値は993.2pg/mLで最小値は0 pg/mL，平均は231.5pg/mLであった。IL-1 の手洗い前の最大値は260 pg/mLで最小値は20.4 pg/mL、平均は84.8 pg/mLであった。免疫グロブリンの最大値は1622.4Uで最小値は25.9U、平均は261.7Uというように、いずれも手洗い前の状態から個人差が大きく、左右差も大きかった。

2つの手洗い後も個人差と左右差はあったが、左右差については手洗い後にはその差が緩和される傾向が見られ、水洗いでその傾向が際立っていた。

3つの免疫物質は、係数はそれほど高くはないながらも、相関は見られた。特に IL-1 と Ig の相関は高かった。また、手洗いをした後では、相関は更に高くなった。

IL-1 の手洗いによる変化について；水洗いでは減少したが、液体石けんによる手洗いでは減少するとは限らず、増加する場合も多かった。(図 1-1, 1-2)

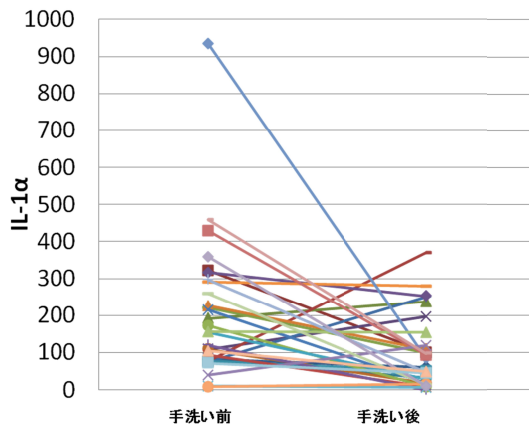


図1-1. 水洗いでのIL-1αの変化

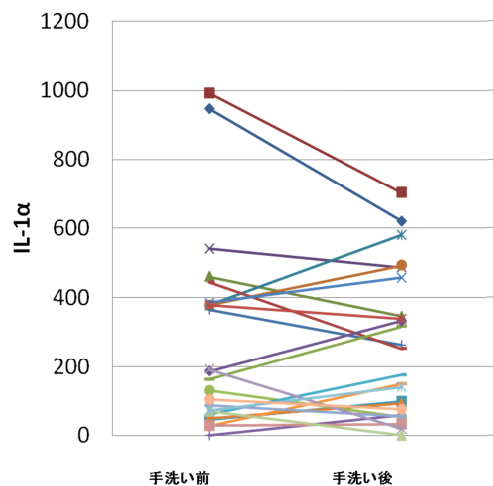


図1-2. 液体石けんによる手洗いでのIL-1αの変化

IL-1 の手洗いによる変化について；水洗いでも液体石けんによる手洗いでも減少す

るとは限らず、増加する場合も多く、特に液体石けんによる手洗いでその傾向が高かった(図 2-1, 2-2)。ただし有意差はなかった。

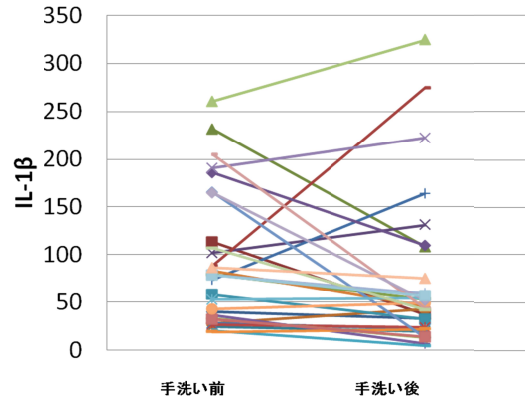


図2-1. 水洗いでのIL-1βの変化

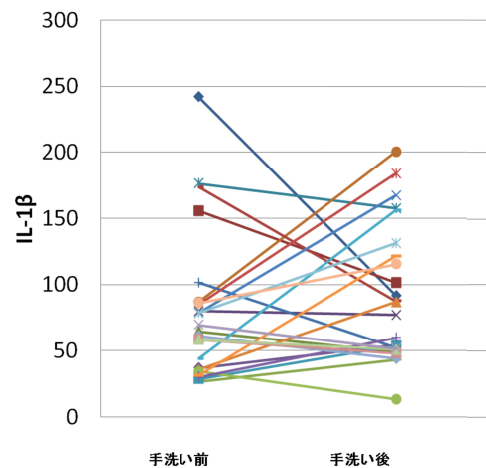


図2-2. 液体石けんによる手洗いでのIL-1βの変化

④免疫グロブリンの手洗いによる変化について；水洗いでも、液体石けんによる手洗いで有意に減少した(図 3-1, 3-2)。しかし、いくつかの試料では、逆に増加しているものもあり、それは液体石けんによる手洗いの方で大きな増加が観察される傾向があった(有意差は見られなかった)。

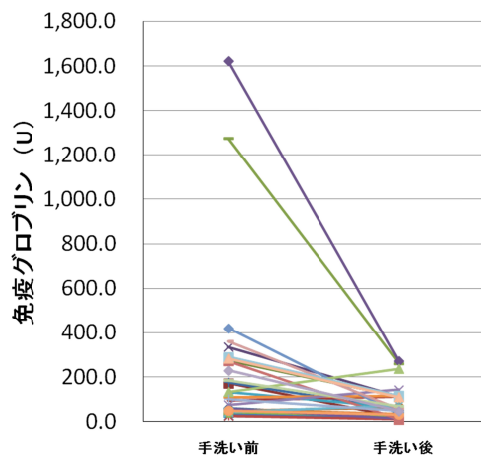


図3-1. 水洗いでのIgの変化

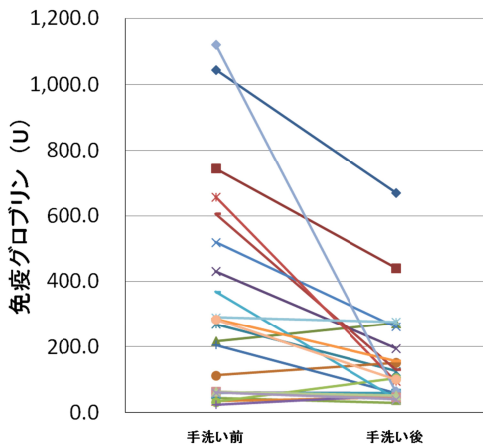


図3-2. 石けんによる手洗いでIgの変化

手洗い前の段階では、各種免疫物質の値に関して水洗い、液体石けんによる手洗いに違いはなかったため、ランダム割り付けにより偏りなく配分で来ていた。

手洗い前後で有意な差（減少）が見られたのは、IL-1 の水洗いと、Ig の水洗い、液体石けんによる手洗いで（図 4-1, 4-3）IL-1 の液体石けんによる手洗いでむしろ若干の増加傾向が見られた（有意差なし，図 4-2）。図には、SD を示しているが、個人差や手の左右差がかなり大きく、ばらつきとなって現れた。

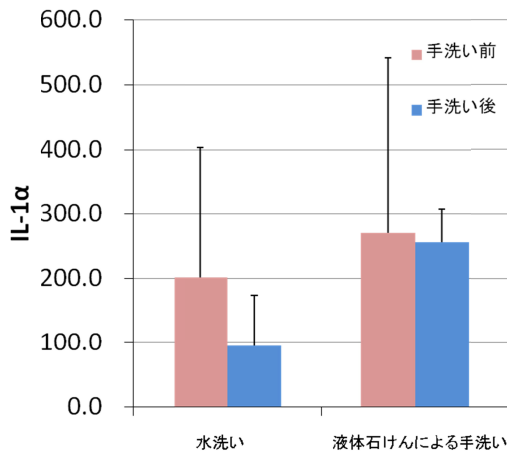


図4-1. IL-1αの手洗い前後の比較

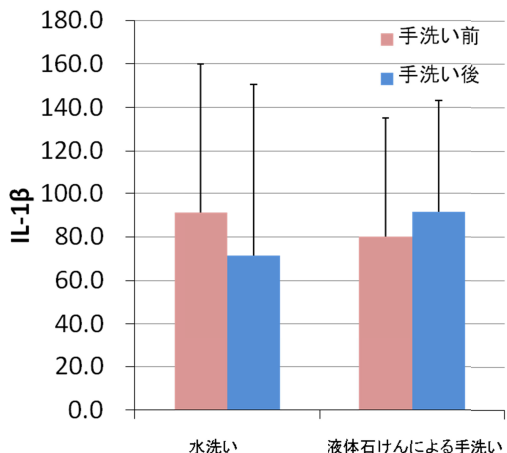


図4-2. IL-1βの手洗い前後の比較

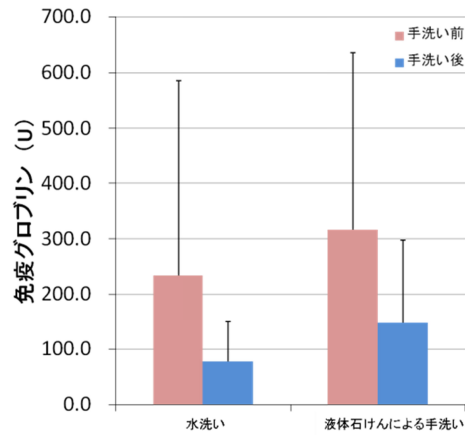


図4-3. Igの手洗い前後の比較

(2) コアグラゼ陰性ブドウ球菌を選んで、培地に播種し、上記手指表面物質が細菌の増殖に抑制的に働くか検討したが、実施した方法では抑制効果を検出できなかった。ただし、精査は出来ていないため、今後物質の濃縮をしたり、顕微鏡下の観察も取り入れるなどすれば、違いを検出できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

荒川満枝，岡山加奈：手指表面の免疫物質に着目した手指衛生の評価，第 29 回日本環境感染学会総会，2014（高輪）

荒川満枝，岡山加奈：手指表面の免疫物質に着目した手指衛生の評価，第 33 回日本看護科学学会学術集会，2013（大阪）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 満枝 (ARAKAWA, Mitsue)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：00363549

(2) 連携研究者

岡山 加奈 (OKAYAMA, Kanna)
岡山県立大学・保健福祉学部・准教授
研究者番号：20549117