

看護学生の黄色ブドウ球菌の保菌状況と 常用消毒剤の効果の検討

基礎科目 片倉 久美子

The Present Condition of *Staphylococcus aureus* and Effect of Various Disinfectants

Kumiko KATAKURA

要 旨

病院実習前後の看護学生の鼻腔から黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) を分離したところ、その保菌者は実習前で63名中14名、実習後で63名中18名であった。これら黄色ブドウ球菌が産生するコアグラーゼを型別した結果、Ⅰ～Ⅷ型のうち5種類が確認され、Ⅶ型がもっとも多く25.0%を占めていた。さらに薬剤感受性試験をおこなった結果、抗生物質に対して抵抗性をもつメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は検出されなかった。また、分離した黄色ブドウ球菌に対する常用消毒剤の殺菌効果について検討した。

I. はじめに

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、自然界に多く存在している微生物のひとつで、ヒトなど各種動物の鼻、咽喉、皮膚、泌尿器や腸管内に存在し、空中・水・塵埃や調理済食品からもしばしば検出される。黄色ブドウ球菌が産生する菌体外毒素によって、食中毒にかかり嘔吐等を起こすこともあるが、症状は軽く1日以内で治癒することが多い。しかし、これらの常在菌と呼ばれる菌によって引き起こされる感染症が、小児や老人、抵抗力の低下している入院患者にとって深刻な問題となる。本調査は、看護学生の病院実習前後に保菌している黄色ブドウ球菌を分離し、その型別とMRSAの検出を試みた。さらに、看護学生の不用意な行為による感染に対する認識を高め、将来の医療従事者としての衛生観念の育成を図るために常用消毒剤のこれらの菌に対する効果を検討した。

II. 方 法

1. 調査対象：1学年63名
 - a. 病院実習前

b. 病院実習後

2. 検体採取および分離方法

学生の鼻腔内を滅菌綿棒 (0.9%の生理食塩水を含む) で擦過し材料の採取をおこない、7.5%食塩加 Brain Heart Infusion 培地で37℃、24時間孵置した。次に、その培養液を分離用培地の卵黄加マンニット食塩培地に塗抹して37℃、48時間孵置した。培地上で直径1~2mmの透明環を形成し、コロニー周辺の培地が乳白色に変色する。その中にS型状に中心が隆起した白色の集落をつくる。この菌集落を分離した。これは、卵黄反応とマンニット分解能の陽性像を示す。

3. 黄色ブドウ球菌の同定

分離した黄色ブドウ球菌の同定には、普通寒天培地で24時間培養した新鮮な菌を用いて次の試験を行った。その試験のすべてが陽性像を示したとき、黄色ブドウ球菌と同定した。

- ① グラム染色
- ② カタラーゼ試験
- ③ コアグラーゼ試験
- ④ クランピンファクター (スライド凝集反応試験)

黄色ブドウ球菌は次のように、同定した。

- ① グラム染色では、クリスタル紫で濃紫色

に染まる。②カタラーゼ試験では、小ディスク上に1ループの菌を乗せて過酸化水素(H₂O₂)につけると発泡を生じる。③コアグラゼ試験では、10%の割合でウサギ血漿を加えたBrain Heart Infusion 培地 1.0mlに1ループを植菌し、37°Cで3、6、24時間後のいずれかに凝固反応を認める。④クランピンファクター(スライド凝集反応試験)はスライドガラス上に、生理食塩水で5~10倍に希釈したウサギ血漿1滴と、さらにブランクとして生理食塩水を1滴のせる。菌をそれぞれ1ループずつ加え、菌液が均等でなく凝集する。

4. コアグラゼ型別の方法

黄色ブドウ球菌と同定されたものについて、ブドウ球菌コアグラゼ型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて型別を判定した。

—試薬の調整—

コアグラゼ抗原液の作成

ウサギ血漿(無菌的)5%を含むBrain Heart infusion 培地 3.0mlに、分離された黄色ブドウ球菌を1ループ植菌し、37°Cで24時間孵置した。次に、血漿凝固が確認されたものを攪拌して血漿凝固塊を碎き、分離したフィブリンをコアグラゼ抗原とした。この時に使用した希釈液は、滅菌蒸留水 1000ml中にポリペプトン 20.0g、クエン酸ナトリウム 10.0g、塩化ナトリウム 8.5g、アジ化ナトリウム 0.5gを溶解させたもの。ウサギ血清は正常ウサギ血清を20倍希釈したもの。ウサギ血漿は乾燥正常ウサギ血漿(デンカ生研)に滅菌精製水 3.0mlを加えて均一に溶解し、これを正常ウサギ原液として5~10倍に希釈したもの。

—操作方法—

コアグラゼ型別用免疫血清 I~VIII各 0.1mlと、対照として希釈正常ウサギ血清 0.1mlを用いた。各血清にそれぞれ抗原液 0.1mlを加えて攪拌し、37°Cで1時間反応させた後、5倍希釈のウサギ血漿液 0.2mlを加え、37°Cで1、2、4、6、24、48時間おき、いずれかに凝固ができた免疫血清で型別を決定する。コアグラゼの産生が弱く、判定が難しい株は、試験用抗原液を作るときに添加する正常ウサギ血漿原液を10V/

V%増やしておこない、さらに普通寒天培地(Nutrient agar)に正常ウサギ血漿原液 10V/V%を加えた平板培地で増殖させ、被検菌のコロニーの周囲に生じる白色のリングが大きいコロニーを選択して、上記と同様に型別をおこなった。

5. MRSA 分離方法

分離した黄色ブドウ球菌のうちメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を区別するため、薬剤感受性試験をおこなった。薬剤感受性試験はNCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)法に従った。すなわち、Muller-Hintonの培地(MHB)を滅菌後、pH7.2~7.4に調整して塩化カルシウム 50mg/lと塩化マグネシウム 25mg/lを添加した寒天培地(CAMHB)を用いて寒天平板希釈法をおこなった。希釈系列は128 μg/mlから0.25 μg/mlの10段階とし、日本化学学会標準法^{1,2)}に準じた。寒天平板希釈法では、オキサシリン(MPIPIC)に対する最小阻止濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)が4 μg/ml以上を示した株がMRSAとされているが、オキサシリンがすでに製造中止で入手困難なことから、アンピシリンナトリウム・オキサシリンナトリウム(複合成ペニシリン:ブロードシリン(萬有))を用いて同様の基準でMRSAの判定をおこなった。

接種菌はBHI培地 4mlで24時間培養後、1ループ約10⁵~10⁹/mlの菌を滅菌生理食塩水(0.85%NaCl含)で1:100に希釈し、アンピシリンナトリウム・オキサシリンナトリウムを含む寒天培地上に1ループ(0.001~0.002ml)を塗抹し、37°Cで24時間孵置した。MICの判定は、発育が肉眼的に認められなかった最小の薬剤濃度とした。対照としてアンピシリンナトリウム・オキサシリンナトリウムを含有しない培地を用いた。

6. 常用消毒剤による殺菌

消毒剤には、常用消毒剤として利用されている①70.0%アルコール(エチルアルコール)、②3.0%ポビドンヨード、③0.1%グルコン酸クロルヘキシジンを用いた。消毒剤の殺菌効果の判

表1 病院実習前後における *Staphylococcus aureus* の保菌状況

時 期	人 数	% (63人中)
病院実習前	14	22.2%
病院実習後	18	28.6%

定には、トリプトソイブイオン (Tryptone Soya broth) で、37°C 24 時間培養した分離黄色ブドウ球菌 1ml を各消毒剤 10ml に接種攪拌し、室温において 15 秒、30 秒、1 分、2 分、5 分、10 分後に、それぞれから 1 ループを採取して、トリプトソイブイオン培地に塗抹し、37°C で 48 時間孵置した間で、移植菌の発育を認めるまでの最短時間を殺菌時間として判定した。

本実験を通じて対照として、岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座の金子克教授より供与いただいた *S. aureus* を用いた。

Ⅲ. 結 果

1. 黄色ブドウ球菌分離状況

学生の黄色ブドウ球菌保菌率は、病院実習前 63 名中 14 名 (22.2%)、病院実習後 63 名中 18 名 (28.6%) で病院実習後に増加していた。(表 1)

2. 黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型別

病院実習前では、Ⅶ型がもっとも多く 5 株、次にⅤ型が 4 株、Ⅰ型とⅣ型とⅥ型は検出されなかった。また、型別不能は 1 株であった。病院実習後では、Ⅶ型が 4 株ともっとも多いが、実習前と比べるとⅤ型は 4 株から 2 株に減少し、Ⅲ型とⅡ型がそれぞれ 2 株から 3 株、1 株から 2 株に増加し、Ⅰ型、Ⅳ型、Ⅵ型とⅧ型は検出されなかった。また、型別不能は 1 株から 7 株と増加していた。病院実習前の保菌者 14 名のコアグララーゼ型別の変化は、病院の実習前後

表2-1 分離同定された *Staphylococcus aureus* のコアグララーゼ型の病院実習前後での変化

サンプル No.	病院実習前 型別	病院実習後 型別
1	—	Ⅱ
2	Ⅲ	Ⅲ
3	—	Ⅱ
4	Ⅶ	Ⅶ
5	Ⅶ	Ⅶ
6	—	Ⅶ
7	Ⅴ	UT
8	Ⅱ	—
9	—	Ⅲ
10	—	UT
11	Ⅴ	UT
12	Ⅴ	Ⅴ
13	Ⅶ	UT
14	Ⅲ	Ⅲ
15	UT	Ⅶ
16	Ⅶ	UT
17	Ⅷ	UT
18	Ⅴ	Ⅴ
19	Ⅶ	UT
合 計	14	18

UT : 型別不能

で同じ型の菌を保持してるものが 6 名、型別不能 (UT) からⅦ型と変化したものが 1 名、型別不能に変化した者がⅤ型で 2 名、Ⅶ型で 2 名、Ⅷ型で 1 名であった。(表 2-1、-2)

3. MRSA 分離

分離黄色ブドウ球菌の中から、MRSA 菌株は検出されなかった。

4. 消毒剤の殺菌効果

前述の分離黄色ブドウ球菌 32 株それぞれについて、70.0% アルコールでは 15 秒未満で 87.5%、30 秒以内で 90.6%、1 分以内で 96.9%

表2-2 分離同定された *Staphylococcus aureus* のコアグララーゼ型別菌株数

時 期	菌 株 数	コアグララーゼ型別菌株数								
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ	UT
病院実習前	14	0	1	2	0	4	0	5	1	1
病院実習後	18	0	2	3	0	2	0	4	0	7

UT : 型別不能

表3 分離同定された *Staphylococcus aureus* の常用消毒剤による殺菌効果時間

消毒剤	菌株数	消毒時間別の生菌株数					
		15秒	30秒	1分	2分	5分	10分
70.0%アルコール	32	4	3	1	3	2	0
3.0%ポピドンヨード	32	2	4	4	11	4	0
0.1%グルコン酸クロルヘキシジン	32	5	5	4	6	4	2

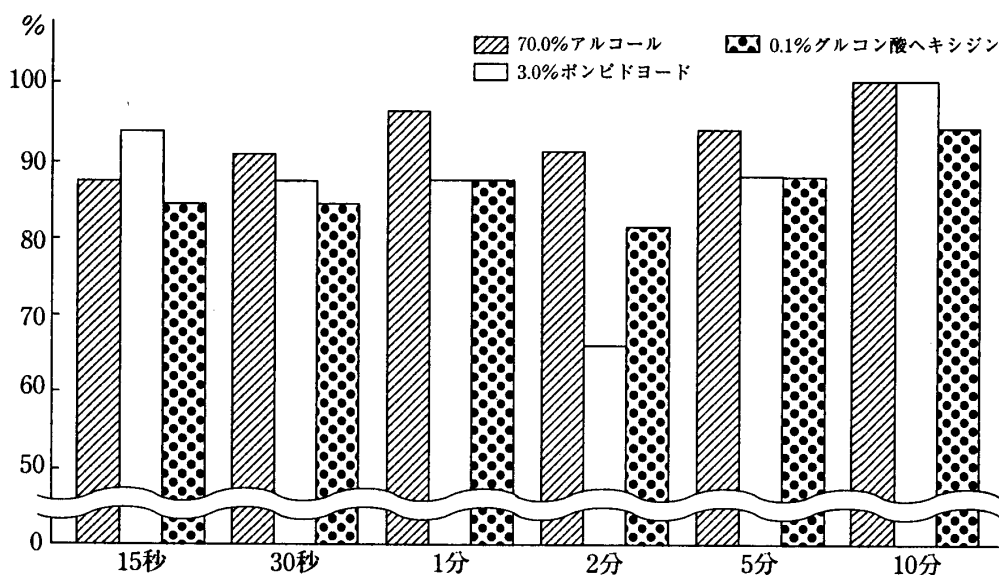


図1 消毒時間別の生菌株割合

分離同定された *S. aureus* 32株に対する常用消毒剤の70%アルコール、3.0%ポピドンヨード、0.1%グルコン酸クロルヘキシジンによる殺菌効果時間

の殺菌効果が得られた。3.0%ポピドンヨードでの殺菌効果は、15秒未満で93.8%、30秒以内で87.5%、1分以内で87.5%、安定した殺菌効果を得るのに5分以上を要した。0.1%グルコン酸クロルヘキシジンでは15秒未満で84.4%、30秒以内で84.4%、1分以内で87.5%の殺菌効果が得られた。(表-3、図-1)

IV. 考 察

病棟の患者や看護婦を対象とした辰己ら⁴⁾の報告では、患者の鼻腔の黄色ブドウ球菌検出率は42.7%、MRSAが18.7%、看護婦では黄色ブドウ球菌は33.3%、MRSAが11.1%と医療施設での検出が調査されている。一方、看護学生の白衣・靴からの黄色ぶどう球菌の分離を行った小穴ら³⁾の報告によると、白衣から26.7%、靴の裏から69.0%、そして、特に白衣の裾から37.9%の黄色ブドウ球菌が検出されている。な

お、MRSAは分離されなかった。

当短大学生の場合、鼻腔の黄色ブドウ球菌の保菌率が実習前に22.2%、実習後に28.6%と増加していた。MRSAの検出はなかった。黄色ブドウ球菌の感染経路としては、病院内外の環境や保菌者を通じた接触、あるいは空中浮遊を介した気道への侵入が多くいわれている。しかし、この調査では学生の病院実習期間が3日間と短いことあるいは、病院や学内での日頃の衛生管理や指導が比較的徹底されていたためか著しい増加は認められず、またMRSAも検出されなかった。

コアグラゼは、黄色ブドウ球菌が増殖する際に菌体外に産生される血漿凝固因子である。黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型別はその株ごとに産生するコアグラゼが異なることを利用している。寺山⁵⁾の報告では、食中毒を引き起こす黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型別は、II、

Ⅲ、Ⅵ、Ⅶ型、Ⅷ型の5種類とされている。一方、臨床材料由来の黄色ぶどう球菌のコアグラーゼ型は、五十嵐ら⁶⁾の報告ではⅦ型が25.5%、次いでⅡ型、Ⅳ型、Ⅲ型がそれぞれ16.5%~22.3% (1981年、東京)を占め、川上ら⁷⁾の報告では、Ⅱ型が79.1% (1984年、千葉)を占めている。MRSAのコアグラーゼ型別では、金山ら⁸⁾の1993年~1994年の調査では、北海道、東北地域でⅡ型が100%を占めているが、九州地方ではⅡ型が9.1%と少なく、Ⅲ型・Ⅶ型が45.5%を占めている。これらの報告から、臨床由来の黄色ぶどう球菌のコアグラーゼ型別が年次や地域によって変化し、流行や地域の局在性を示すとともに感染経路の指標として重要と考えられている。⁵⁻⁹⁾

本調査の結果、全体ではⅦ型が28.1%を占め、次いでⅤ型が18.8%、Ⅲ型が15.6%であった。この中で実習前後のコアグラーゼ型別は全体の25.0%が変化し、Ⅴ型、Ⅶ型の保菌者のうちそれぞれ4株中2株、5株中2株が型別不能に変化した。また、実習前後で異なる型に変化したものはなかった。型別不能への変化は、実習前に保菌していた黄色ブドウ球菌が何らかの影響によりコアグラーゼ産生能が検定不能な量に低下したか、あるいは変異し型別不能になったものと考えられた。本調査の結果で5種類におよぶコアグラーゼ型が得られたのは、学生をとりまく生活環境がさまざま、病院や医療現場の限られた環境での調査と異なるためと考えられる。

これらの結果から、実習前後のコアグラーゼ型別を比較することによる感染経路の把握はできなかった。

黄色ぶどう球菌に起因する疾患は多数報告されており、疾患の種類により特異的な菌株型が関与していることが指摘されている。この場合、コアグラーゼ型別と毒素産生性をマーカーとした疫学的調査の重要性も提唱されている。¹⁰⁾ さらに最近、黄色ぶどう球菌の変異を検出する方法として分子生物学的手法を用いて、PCR (Polymerase Chain Reaction) を用いた型分

けや、PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 解析による型分けなど遺伝子レベルで検討されており、今後疾患との関連性や感染経路の同定などに有効な方法と考えられる。¹¹⁻¹⁵⁾

さらに、分離した黄色ぶどう球菌32株それぞれに対する常用消毒剤の殺菌効果については、皮膚や器具等に用いられる70.0%アルコールや0.1%グルコン酸クロルヘキシジンでは、比較的短い時間での殺菌効果が高かったが、3.0%ポピドンヨードは前二者に比べて長かった。これは、3.0%ポピドンヨードが通常は、傷口や含嗽に用いられる人体に刺激が少ない消毒薬であって、本調査のような実験方法では殺菌効果が得られるのには時間がかかったものと思われる。

本実験で示されたように、それぞれの消毒剤が通常利用されている室温や濃度で用られると、十分な殺菌効果を得るためには、いずれも5分程度の時間を要することが明らかとなった。さらに殺菌を効果的におこなうためには、消毒剤の濃度、温度、時間との関連する条件設定が重要であるとともに、渡邊ら¹⁶⁾の報告にあるように、短時間でも反復消毒をおこなうことも効果的であると考えられる。

従って、院内感染として大きな問題となっているMRSAや日和見感染では、医療従事者がその菌の媒介者となりうるという現状を把握し、看護学生自身が自覚を持ち、処置前後の手洗いの重要性と消毒滅菌した使用器具類の取り扱いに留意しなければならない。また、施設的环境整備や室内の換気や清浄化にも配慮が必要である。本実験の調査結果を踏まえ、学生の日頃の看護援助や行為に際して留意することを今後さらに意識づけたい。

稿を終えるにあたり、ご指導ご助言頂いた岩手医科大学歯学部口腔微生物学の金子克教授、並びに、田近志保子先生、岩手女子看護短期大学の菅原洋子講師、校閲を頂いた矢川寛一教授、協力いただいた学生諸氏に心より感謝いたします。

引用文献

- 1) 五島瑛智故ほか：日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告（1989年）。CHEMOTHERAPY、38（1）、102-105、1990
- 2) 斉藤厚ほか：抗菌薬感受性測定委員会報告。CHEMOTHERAPY、41（2）、183-189、1992
- 3) 小穴こず枝ほか：看護学生の白衣・靴からの *Staphylococcus aureus* の分離調査、臨床と微生物、20（2）、091-097、1993
- 4) 辰己恵子ほか：MRSA 対策のための一考察、藍野学院紀要、8、71-75、1994
- 5) 寺山武：黄色ブドウ球菌のコアグラエゼ4型別、臨床と微生物、15（1）、10-15、1988
- 6) 五十嵐英夫ほか：各種臨床検査材料由来黄色ブドウ球菌の Toxic shock 毒素およびエンテロトキシンの産生性とコアグラエゼ型、第23回日本感染症学会東日本地方総会講演会要旨、22、1983
- 7) 川上浩ほか：臨床材料由来黄色ブドウ球菌の Toxicshock syndrome toxin の産生性について、感染症雑誌、60、133-140、1986
- 8) 金子明子ほか：臨床分離 Methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) の分離地域による疫学的性状および薬剤耐性パターンの比較、臨床と微生物、23（4）、073-078、1996
- 9) 木村昭夫ほか：全国国立大学病院より分離された黄色ブドウ球菌におけるコアグラエゼ型別および毒素産生性と薬剤感受性との関連性に関する研究、感染症学雑誌、67（3）、223-230、1993
- 10) 中山一誠ほか：黄色ブドウ球菌、臨床と微生物、21（1）、023-027、1994
- 11) Jun-ihiko N., et al.: Molecular typing of the methicillin resistance determinant [mec] of clinical strains of *Staphylococcus* based on mec hypervariable region length polymorphisms. *J. Lab. Clin. Med.* 126, 29-35, 1995
- 12) Keiko Y., et al.: DNA Polymorphism in strains of *Staphylococcus aureus*. *Jpn J. Clin. Pathol.* 43, 61-66, 1995
- 13) Volker G., et al.: Typing *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. *Microbiology.* 141, 1255-1265, 1995
- 14) Vito G. DeVecchio, et al.: Molecular Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* via Fluorophore-Enhanced Repetitive-Sequence PCR. *J. Clin. Microbiology.* 33, 2141-2144, 1995
- 15) 北条聡子ほか：Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) 法による Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) のタイピング、感染症学雑誌、68（5）、506-510、1995
- 16) 渡邊好文ほか：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する各種消毒剤の効果に関する検討、感染症雑誌、69（11）、1235-1242、1995