

「報 文」

手洗い・消毒過程における皮膚常在菌の挙動と生残菌の同定

中 室 克 彦

摂南大学理工学部生命科学科
教授・薬博

中 谷 洋 介

摂南大学理工学部生命科学科

平 原 嘉 親

近畿厚生局健康福祉部・薬博

鐵 見 雅 弘

摂南大学理工学部生命科学科・工博

要旨：健康者の手指表面には黄色ブドウ球菌が最も多く存在し、続いて大腸菌・大腸菌群、酵母・カビ、セレウス菌、サルモネラ菌が存在することがわかった。水道水およびオゾン水による流水手洗いによって手指の細菌数は減少し、その減少は水道水よりオゾン水の方が大きかった。消毒用アルコールおよび塩化ベンザルコニウムを用いた揉み手は有効な殺菌方法であることが示された。しかし、これらの手洗い殺菌後、手指表面には再び細菌の出現が認められ、皮膚常在菌である *Staphylococcus warneri* および *Staphylococcus epidermidis* の存在が確認され、皮膚深部から表面に出現する皮膚常在菌を除去することは困難であることが示された。

キーワード：常在菌※、流水手洗い※、オゾン水※、水道水、表皮ブドウ球菌※

分類項目：その他 (120110)、その他 (120410)、その他 (120810)

1. 緒言

ヒトの手指に存在する微生物には外部の環境由来のウイルスを含む微生物（一過性細菌）と元来皮膚に棲みついている細菌（常在菌）に分けられる¹⁾。一過性細菌は皮膚の表層に定着しており、主に医療現場での感染症や食品を取り扱う施設が原因となり食中毒が発生することが多い²⁾。常在菌は、手指の表皮や真皮の表層から比較的深層部に *Staphylococcus epidermidis*、*Corynebacterium acnes* など10種類以上生息していると報告されている³⁾。通常は宿主と相利共生の状態にあり、他の病原菌の侵入を防ぐなどの利益を与えているが、宿主の抵抗力が低下したときには内因感染の原因になることもある⁴⁾。

手洗いは感染症や食品に起因する食中毒を防ぐための有効な手段であり、石鹸、アルコールや各種殺菌剤による様々な方法が医学会⁵⁾、文部科学省⁶⁾、米国ガイドライン^{7,8)}などで提案されている。しかし、これらはいずれも医療機関などにおける衛生的手洗いや手術時の手洗い^{9,10)}を目的とするものであり、家庭、学校、職場等で簡便に行うことができる日常での流水手洗い効果の詳細は

ほとんど知られていない。

そこで、本研究では日常における水道水とオゾン水による流水手洗いの除菌および殺菌効果を定量的に把握することを目的として、グローブジュース法およびバームスタンプ法を用いて水道水やオゾン水による流水手洗を行い、健康者の手指に存在する細菌の挙動を把握するとともに手指に生残する細菌の性状確認および同定を行った。

2. 方法

2.1 グローブジュース法¹¹⁾による手掌細菌叢の把握

ゴム手袋 (VELNEX 社製) を両手に装着し左右両方の手袋の中に滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (Pro-media MV2-90 (エルメックス製) 20mL を添加した。滅菌生理食塩水がこぼれないように両方の手首を輪ゴムで縛り15秒間揉み手を十分に行った。手袋内の液を試料として10、100、1,000、10,000、100,000倍に5段階希釈し、各試料を一般細菌 (TC)、大腸菌・大腸菌群 (EC)、酵母・カビ (YM)、セレウス菌 (XBC)、サルモネラ菌 (SL)、黄色ブドウ球菌 (XSA) 用の6種類の選択培地 (いずれもコンパクトドライ、日本製薬株

製) 各3枚に1 mL 播き、35°Cで48時間培養した。培養終了後の判定は各培地のコロニー数が400~800個/plateを示す希釈試料の値を用いて、手掌あたりのコロニー数に換算した。

2.2 パームスタンプ法¹²⁾による手掌の一般細菌の測定

2.2.1 乾燥状態の揉み手と水道水添加揉み手

日常の手掌の指の間、親指を含む手指を乾燥状態で20秒間揉み手を行った (n=26)。また、別に日常の手掌に水道水1 mLを添加し、20秒間同様に揉み手 (n=40) を行い、スタンプ培地 (トリプトソイ寒天培地: 栄研化学¹³⁾製) に左手を軽くスタンプし、35°Cで48時間培養を行いスタンプ培地当たりのコロニー数を計測した。

2.2.2 流水手洗い

流水手洗い効果を検討するために、日常の手に水道水1 mL揉み手を20秒間行った。その後、キムワイブで水分を十分にふき取った後スタンプ培地に左手を軽くスタンプした。その後、水道水あるいは2.5mg/Lオゾン水 (電解式オゾン水生成器: 荏原実業¹⁴⁾製: 水道水を原水として使用) を用いて、いずれも3L/minの流水で同様に手洗いを20秒間行い、キムワイブで水分を十分にふき取った後スタンプ培地に左手を軽くスタンプした。この流水手洗いを10回連続して行った。次に流水なしで水道水1 mL揉み手を行い、各手洗い時におけるスタンプ培地当たりのコロニー数 (個/掌) を2.2.1と同様の操作によって計測した。

また、水道水1 mL揉み手、水道水あるいはオゾン水での流水手洗いをそれぞれ合計5回繰り返して行い、同様にスタンプ培地当たりのコロニー数 (個/掌) を計測した。

2.2.3 擦り込み殺菌

2.2.1と同様に日常の手に水道水1 mL揉み手を行い、スタンプ培地に左手を軽くスタンプした。その後、手に付着している水分をキムワイブで十分にふき取り、手掌に各種殺菌剤 (消毒用エタノール (和光純薬工業¹⁵⁾製) あるいはベンザルコニウム塩化物0.2w/v%含有エタノール溶液 (オスバンラビングA: 武田薬品工業¹⁶⁾製) 2.5mLを加えて、同様に20秒間擦り込み殺菌を行い、スタンプ培地に左手を軽くスタンプした。この操作

を合計7回繰り返して、スタンプ培地当たりのコロニー数を計測 (個/掌) した。

2.3 皮膚常在菌の同定

2.2.3の方法で消毒用エタノールによる擦り込み殺菌を3回繰り返して行った後、水道水1 mL揉み手を行いスタンプした。この操作を再度行ったときにスタンプ上に表示する皮膚常在菌について、形態観察、生理的性状試験による分離菌の同定およびPCRによる塩基配列の解析を日本食品分析センター多摩研究所に依頼して行った。すなわち、形態観察、生理的性状試験による分離菌の同定は日本食品分析センター編集ビジュアル版食品衛生検査法¹⁷⁾の「マイクロフローラ (菌叢) の解析法」および「形態の解析」に従って行った。また、PCRによる塩基配列の解析における cell lysate の調製は、トリプトソイ寒天培地 (栄研化学¹⁸⁾製) を用いて平石¹⁹⁾の方法に従って行った。PCR 反応は FAST MicroSeq 500 16S rDNA PCR kit (Life Technologies Corporation 社) のプロトコールに従って実施した。PCR におけるアニーリングは64°C、15秒間で30サイクル行った。反応終了後、反応液5 μLについて2%アガロースゲルで100V、20分間電気泳動を行い、トランスイルミネーター (BIO-RAD 社製 Gel Doc XR) を用いてUV照射し、蛍光バンドを確認した。その後、MicroSeq Analysis Software Version 2を用いて塩基配列の解析を行なった。得られた配列を国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に登録されている配列および MicroSeq ID Analysis Software (Life Technologies Corporation 社) のデータベース検索と相溶性検索を行うとともに、近隣結合法 (NJ法)²⁰⁾により系統樹を作成した。

3. 結果及び考察

3.1 手掌の細菌叢および一般細菌数

3.1.1 細菌叢の把握

一過性細菌叢と常在細菌叢の採取が可能なグローブジュース法を用いて健常者の手指の細菌叢を調べたところ、片方の手掌の細菌叢 (n=3) には黄色ブドウ球菌が140,000±29,800 (個/掌)、続いて酵母・カビ (5,120±2,500個/掌)、大腸菌・大腸菌群 (1,400±787個/掌)、セレウス菌 (40±16.3個/掌) およびサルモネラ菌 (20±12.9

個/掌)が検出され、健常者の手指には常在菌である黄色ブドウ球菌が最も多く存在することが明らかになった。これは健常人の皮膚には主に常在菌である *S. epidermidis* (表皮ブドウ球菌) が存在するとの Barrow らの報告¹⁶⁾と一致した。

3.1.2 一般細菌数の把握

グローブジュース法を用いて健常人の手掌の一般細菌数を確認した結果、表-1に示すように、被験者7名の両手を合計した全ての平均値は $2.8 \times 10^5 \pm 4.1 \times 10^5$ 個/掌、最小値 5.0×10^4 ~最大値 1.7×10^6 個/掌であり、健常者の手掌には 10^4 ~ 10^6 レベルの一般細菌が存在することが明らかになった。これらの値は、一般に報告されている皮膚常在菌数である 1.5×10^5 ~ 4.0×10^6 個/掌と同様の値を示した¹⁷⁾。

3.2 揉み手による手洗い効果の検討

流水時の揉み手による手洗い効果を知るために水道水1mLを添加した場合と添加しなかった場合(乾燥状態)に手指から検出される一般細菌数を比較した。その結果、図-1に示すように一般

細菌の検出数は水道水1mLを添加した場合は乾燥状態での揉み手に比べて約3倍多いことが示された。これは、水の存在が指紋、シワ、汗腺、毛根などの汚れを膨張させ、これらに付着している細菌とともに排出しやすくさせたと考えられる。このことから、手洗い時における揉み手は有効であり、その際、水の存在が重要な役割を果たしていることがわかった。また、このことから手掌の一般細菌数を低く保つためには手洗い後に濡れた手をそのままにしないで、清浄なペーパータオルやハンカチ等の布で拭き取っておくことが重要であると考えられた。

3.3 流水手洗い効果の検討

揉み手による手洗いにおいては水の存在が重要であることがわかった。そこで、実際の流水手洗いでどの程度の細菌が取り除かれているのかを知り、手洗い時における流水の効果把握するために、水道水あるいはオゾン水を用いた流水手洗いを10回繰り返した場合と、流水を行わなかった場合における手指の一般細菌数を比較した。

図-2に示すように、水道水またはオゾン水で流水手洗いを行いキムワイプで水分を十分にふき取りスタンプ培地に左手を軽くスタンプする操作を10回繰り返して行った結果、いずれも一般細菌はほとんど検出されなくなった。このことは、ふき取り過程においてキムワイプからの細菌の影響はなく、流水下での手洗いは手指の除菌に有効であることを示している。しかし、手洗い10回後の右の値は、10回流水手洗い後に水道水1mLで揉み手を行うことにより手掌当たり2,000~2,500

表-1 健常人の手掌あたりの一般細菌数

被験者 (年齢)	手掌あたりの一般細菌数	
	左手 (個/掌)	右手 (個/掌)
1 男性 (22)	1.4×10^5	1.8×10^5
2 男性 (69)	5.0×10^4	1.4×10^5
3 男性 (22)	1.7×10^5	1.5×10^5
4 男性 (22)	3.0×10^5	2.0×10^5
5 女性 (22)	2.4×10^5	4.8×10^5
6 女性 (22)	5.4×10^4	6.2×10^4
7 女性 (22)	1.0×10^5	9.2×10^4

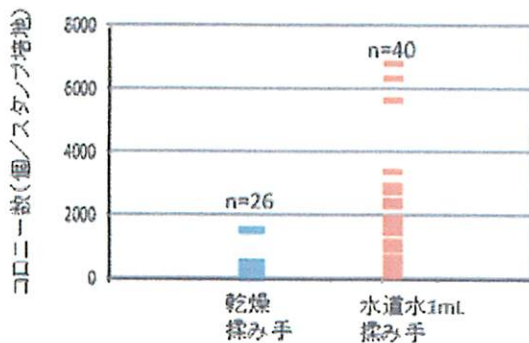


図-1 乾燥揉み手と水道水1mL揉み手による一般細菌の出現数の比較

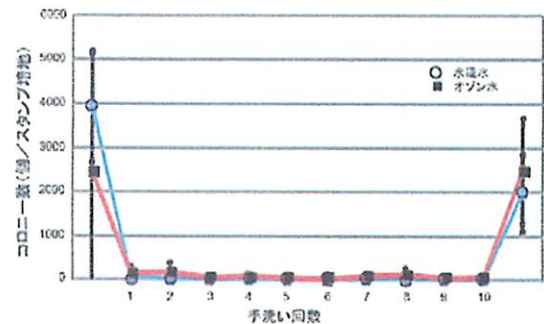


図-2 水道水およびオゾン水による流水手洗い効果
点(○、■)と垂線はそれぞれ3試行の平均値と標準偏差を示す。

個/掌の一般細菌が検出されたことを示す(図-2)。これは、流水時には揉み手によって手指から遊離した細菌が流水によって連続的に洗い流されるが、流水がない場合には細菌が洗い流されず表面に再付着することによると考えられた。以上、水道水での連続した流水手洗いはオゾン水での流水手洗いと同等の効果があることがわかった。これは水道水中にはオゾン水ほどではないが残留塩素の酸化力が寄与している可能性が考えられた。すなわち、水道水による流水では物理的な除菌と併せて水中の残留塩素による殺菌効果もあることが考えられた。

水道水およびオゾン水による流水手洗い効果を検討した。図-1に示すごとく一般細菌のばらつきが大きい挙動は類似していたため、典型的な結果の1例を図-3に示す。すなわち、水道水あるいはオゾン水のいずれにおいても、流水手洗い時には一般細菌数は大きく減少したが、再び手指に水道水1mLを添加し揉み手を行うことにより細菌の出現が確認された。この細菌の出現数は水道水流水手洗いに比べてオゾン水流水手洗いで少なかった。これは、オゾン水中のヒドロキシラジカル^{18,19)}によって皮膚表面近くに付着している細菌の細胞壁や細胞膜が酸化的に破壊される^{20,21)}ことによって手掌に存在する多くの細菌が殺菌されたと考えられる。オゾン水は従来、食品添加物として食品製造工程の殺菌・消毒や食材、食品容器の付着菌の殺菌などには効果があることは知られていたが²²⁾、手洗いにおいても効果が高いことが明らかになった。

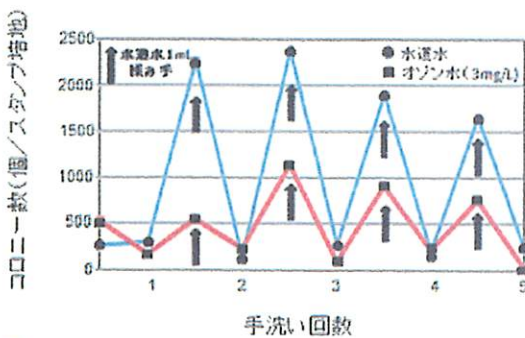


図-3 水道水およびオゾン水による流水手洗い効果

3.4 消毒剤の擦り込み殺菌効果の検討

米国の Centers for Disease Control and Prevention (CDC) の「医療機関における手指衛生のためのガイドライン」では、従来の流水と石けんによる手洗いよりアルコールベースの消毒薬を用いた手指消毒が奨励されている⁷⁾。そこで、消毒剤である消毒用エタノールや塩化ベンザルコニウムの擦り込み方式による手指の殺菌効果を水道水1mL揉み手によって出現する細菌を対照として確認した。挙動が類似していたため典型的な結果の1例を図-4に示す。水道水1mLを手指に添加して揉み手を繰り返す毎に一般細菌数の増加が認められたが、消毒用アルコールや塩化ベンザルコニウムを揉み込んだ場合には水道水やオゾン水を用いた流水手洗いを繰り返した時と同様に細菌は検出されなかった。このことから、消毒剤の擦り込みは高い殺菌効果を有することがわかった。

3.5 消毒用エタノール殺菌後の皮膚常在菌の性状ならびに同定

消毒用エタノール殺菌後に、手指に水道水1mLを添加し揉み手を行うことによって一般細菌の存在が確認された。一過性の通過菌はアルコール消毒によって殺菌されることが知られていることから^{23,24)}、消毒用エタノール殺菌後に手指表面に出現した一般細菌は皮膚内部に潜む常在菌²⁵⁾である可能性が示唆された。そこで、常在菌に着目してこの一般細菌の性状および同定を行った。その結果、表-2に示す2種類の優先種が認められた。これらの性状試験を行った結果、分離菌a、bともカタラーゼ陽性グラム陽性球菌であり、塩基数はそれぞれ461bp、474bpであった。また、

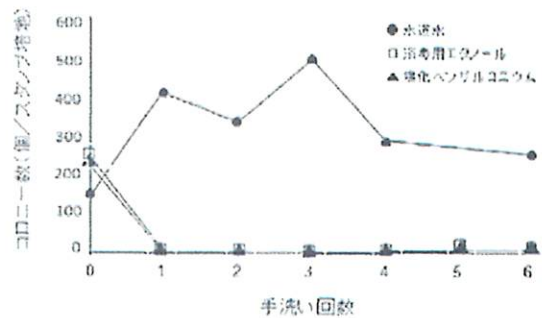


図-4 各種殺菌剤添加後の擦り込みによる殺菌効果の比較

表-2 分離菌 a および b の性状

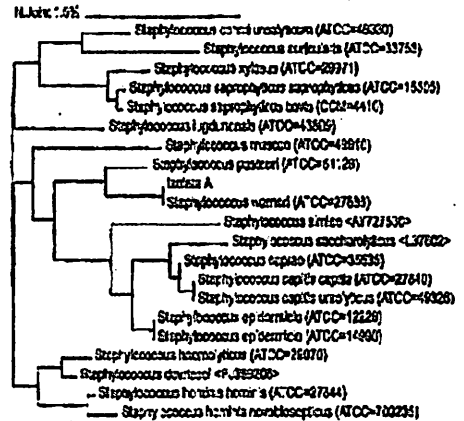
菌種	ATCC 番号	相同性 (%)
分離菌 a		
<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC = 27836	100.00
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	ATCC = 51129	98.62
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC = 12228	97.48
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC = 14990	97.48
<i>Staphylococcus caprae</i>	ATCC = 35538	97.00
<i>Staphylococcus devriesei</i>	FJ389206	96.88
<i>Staphylococcus capitis</i>	ATCC = 27840	96.77
<i>Staphylococcus capitis ureolyticus</i>	ATCC = 49326	96.77
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	ATCC = 43809	96.55
<i>Staphylococcus hominohominis</i>	ATCC = 27844	96.54
分離菌 b		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC = 12228	100.00
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC = 14990	100.00
<i>Staphylococcus caprae</i>	ATCC = 35538	99.12
<i>Staphylococcus capitis</i>	ATCC = 27840	98.90
<i>Staphylococcus ureolyticus</i>	ATCC = 49326	98.90
<i>Staphylococcus Saccharolyticus</i>	L37602	98.45
<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC = 27836	97.76
<i>Staphylococcus simiae</i>	AY72753	97.58
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	ATCC = 6538P	97.56
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	ATCC = 12600	97.56

表-2および図-5に示すように16S rRNA 遺伝子の相同性検索結果から、それぞれ分離菌 a は *Staphylococcus warneri* (ATCC = 27836)、分離菌 b は *Staphylococcus epidermidis* (ATCC = 12228、14990) との相同性が100%であり、これらは皮膚常在菌であることが考えられた。

S. warneri は起炎菌となる可能性は高くないが²⁶⁾ 重篤な感染症を起こすことが知られている^{27,28)}。また、*S. epidermidis* は主にヒトの皮膚に常在する代表的な表皮ブドウ球菌であり²⁾、外部からの病原菌の侵入を防ぎ、皮膚を保護する上で重要な働きをしている^{4,29)}。しかし、日和見感染や易感染患者では感染を起こすことも知られている³⁾。したがって、流水手洗い後や消毒剤による消毒後においても残留が認められる皮膚常在菌は外部からの病原菌に対してバリアーの役割をしているが、抵抗力が低下している病弱者や易感染者に対してはより注意が必要であると考えられた。

以上のことから、健常者の手指には常在菌であるブドウ球菌が最も多く存在するが、水道水やオゾン水による流水手洗いの繰り返しは有効な手指

分離菌 a



分離菌 b

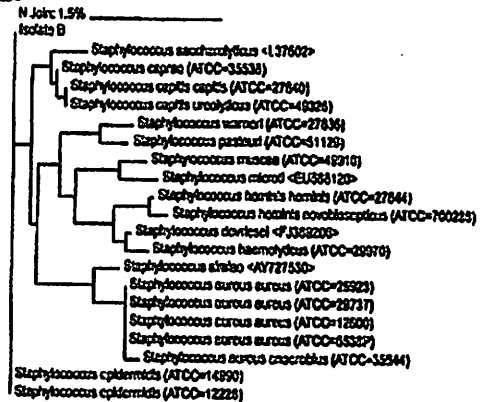


図-5 分離菌 a、b とその近縁種の系統樹

の除菌や殺菌方法であることが明らかになった。特にオゾン水は高い殺菌効果を有するため、オゾン水を用いた手洗いは家庭、学校、職場などで日常的に簡便にできる効果的な手洗い方法であることがわかった。

4. 結論

健常者の手指には黄色ブドウ球菌が最も多く存在し、続いて大腸菌・大腸菌群、酵母・カビ、セレウス菌、サルモネラ菌が存在することがわかった。オゾン水の流水手洗いおよび消毒用アルコールの擦り込みは有効な手指の殺菌方法であることが示された。しかし、手洗い殺菌後、手指表面には再び細菌が出現し、皮膚常在菌である *Staphylococcus warneri* および *Staphylococcus epidermidis* の存在が示唆され、皮膚深層に存在する常在菌を除去することは困難であることがわ

かった。

本研究結果から、水道水およびオゾン水を用いた流水手洗いが、一過性細菌や常在細菌に対する除菌や殺菌効果が考えられるため、家庭、学校、職場等での手指の除菌や殺菌に有効であることを示した。

引用文献

- 1)古田太郎、第7節手洗い・手指消毒の科学、有害微生物管理技術(全2巻)第I巻 原料・製造・流通環境における要素技術とHACCP、pp.983、フジ・テクノシステム(東京)(2000)。
- 2)上田明宏、環境管理技術、13、79-84(1995)。
- 3)西田 博、手洗いのバイブル、pp.193、光琳(東京)(1997)。
- 4)吉田眞一、柳 雄介、吉開泰信、戸田新細菌学改訂第34版、pp.206、南山堂(東京)(2013)。
- 5)<http://jaom.umin.ne.jp/new1001020.html>、手術医療の実践ガイドライン、第7章、日本手術医学会。
- 6)http://www.mext.go.jp/a_menu/sports/syokuiku/08040316.htm、学校給食調理場における手洗いマニュアル、文部科学省。
- 7)Boyce, J.M., and Pittet, D., Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *AM J Infect Control*, 30, S1-46(2002)。
- 8)Larson EL, APIC guideline for handwashing and hand antisepsis in health care settings. *AM J Infect Control*, 23, 251-269(1995)。
- 9)古田太郎、手洗い用液体洗剤・手指消毒剤に関する最近の話題、FRAGRANCE JOURNAL、9、59-64(1993)。
- 10)小林寛伊、手術時手洗いのすべて、pp.59-63、へるす出版(東京)(2000)。
- 11)神木照雄、二永英男、グローブ・ジュース法による手指消毒効果に対する検討、外科診療、513、117-122(1982)。
- 12)Leyden JJ, McGinley KJ, Kaminer MS, Bakel J, Nishijima S, Grove MJ et al., Computerized image analysis of full-hand touch plates, a method for quantification of surface bacteria on hands and the effect of antimicrobial agents. *J Hosp Infect*, 18 (Suppl), 13-22(1991)。
- 13)荘村明彦、ビジュアル版食品衛生検査法手順とポイント、pp.81-89、一般財団法人日本食品分析センター編集、中央法規出版株式会社(東京)(2013)。
- 14)平石 明、PCR を利用した16S rRNA 遺伝子の解析と系統研究-1: 16S rDNA の増幅と制限酵素断片解析、日本微生物生態学会誌、10、(1)、31-42(1995)。
- 15)根井正利、S.クマー共著、根井正利監訳・改訂、大田竜也、竹崎直子共訳、分子進化と分子系統学、培風館(東京)(2006)。
- 16)Barrow, G. I, and Feltham, R. K. A., グラム陽性球菌の性状(坂崎利一監訳)、Cowan and Steel's 医学細菌同定の手引き、pp.61、近大出版(東京)(1993)。
- 17)Jordan, P. A., Iravani, A., Richard, G. A., and Bear H., Urinary tract infection caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *J Infect Dis*, 142, 510-515(1980)。
- 18)中村八寿雄、高木博司、釜瀬幸広、橋本光洋、榎葉紀久雄、オゾンガスによる消毒効果とリネン材への適用検討、環境感染誌、23、(4)、223-279(2008)。
- 19)内藤茂三、オゾンによる微生物制御② オゾンの生体成分との反応と殺菌に及ぼす因子 月刊 HACCP、5月号、60-68(1997)。
- 20)神力就子、オゾンによる細菌機構② 不飽和脂肪酸、タンパク質とオゾンの反応、OZONE 防菌防黴、22、383(1994)。
- 21)中村利彦、板橋家頭夫、小川雄之亮、NICUにおけるオゾン水による手洗いの有用性-他剤手洗いによる手荒れとの比較検討一、日本未熟児新生児学会雑誌、12、(2)、43-46(2000)。
- 22)<http://www.js-mhu-ozone.com/faq/index.html>、日本医療・環境オゾン学会 Q&A。
- 23)古田太郎、消毒液の自動噴霧法による transient flora に対する消毒効果の検討、日本手術部医学会誌、7、(2)、176-179(1986)。
- 24)Ojajarvi, J., Effectiveness of hand washing and disinfection methods in removing transient bacteria after patient nursing. *J Hyg.*, 85, 193-203(1980)。
- 25)白石 正、花王ハイジーンソリューション、6、2-5(2004)。
- 26)光武耕太郎、浦 敏郎、片山善章、臨床検体からの *Staphylococcus warneri* の分離状況、感染症誌、606-608(2002)。
- 27)Abgrall, S., Meimoun, P., Buu-Hoi, A., Couetil J. P., Gutman, L., and Mainardi, J. L., Early prosthetic valve endocarditis due to *Staphylococcus warneri* with negative blood culture. *J Infect.*, 42, 166(2001)。
- 28)Leighton, P. M. and Little, J. A., Identification of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from urinary tract infections. *Am J Clin Pathol*, 85, 92-95(1986)。
- 29)宮野直子、界面活性剤の皮膚常在菌への影響、大阪府公衆衛生研究所報、47、47-52(2009)。

(平成26年12月12日受付)