

手掌面の細菌に関する研究

神野 節子*, 古茂田 恵美子*, 林崎 洋子*,
土居 則子**, 森泉 裕子**

(平成5年9月30日受理)

Studies on the Bacteria of the Palmar Region

Setsuko KANNO*, Emiko KOMODA*, Yoko HAYASHIZAKI*,
Noriko DOI** and Hiroko MORIIZUMI**

(Received September 30, 1993)

緒 言

病原ブドウ球菌(病ブ菌)による食中毒は厚生省の食中毒統計病因物質別食中毒によると、1952年~1989年間の発生件数において1982年は第1位、他の36年間は腸炎ビブリオにつづいて第2位、1990年~1993年の最近の3年間は、サルモネラ菌・腸炎ビブリオにつづいて第3位で、我が国の主要な食中毒である。病ブ菌性食中毒の原因食品は穀類及びその加工食品が第1位で病ブ菌食中毒件数の毎年約30%を占め、仕出し弁当やおにぎりなどによるものが多い。これらは手掌表皮の病ブ菌が食品に移行して増殖した結果と考えられる。

一方、最近、病人や老人等抵抗力の弱い人にMRSA(メチシリン耐性ブドウ球菌)による病院内感染症が多発して、学会の主要シンポジウムに取り上げられ、新聞やテレビでも今日的话题となっている。これらの病ブ菌は何が汚染源なのか、改めてこれらについて見直し、病ブ菌の増殖蔓延阻止対策についても検討する必要がある。

病ブ菌は健康人の手掌の皮膚常在菌なのか、検出率は年齢・性別・健康状態・職業・地域などにより異なりはしないか、又一般に皮膚常在菌としてどの種属が分布しているのか、実態についての報告例は少ないように思う。

そこで我々は、これらの疑問に対する検討を行っているが、今回の報告は本学学生の片手掌面内側全体の皮膚微生物を標準寒天手型平板にスタンプして、一般微生物を分離し、次の項目についての実験した結果について述べる。

* 微生物学研究室

** 食品加工学第2研究室

1) 一般細菌について: 分離細菌の形態的・生理的性質の試験を Cowan の鑑別試験法その他を参照して属レベルで同定した。

2) 病ブ菌の検出: 分離された colony の中から、疑わしい病ブ菌を 3% 卵黄加マンニット食塩寒天平板に塗抹分離して、定型 colony について調べ、検出率を求めた。

3) 殺菌あるいは除菌について: 片手の被検指(5本)

a 指 消毒用エタノール処理

b 指 逆性石けん浸漬

c 指 流水洗浄

d 指 } 未処理

e 指 }

以上出現菌数を比較検討した。

4) 病ブ菌の薬剤及びエタノールに対する耐性: 分離病ブ菌に対するエタノールの有効殺菌濃度と接触時間を検索するために、先ず、被検菌選択のために、薬剤抵抗性試験を行い、2菌株を選択し、殺菌に要する最適エタノール濃度と接触時間との関係を *in vitro* テストした。

以上の実験を通し、手掌皮膚細菌についての認識を深め、食中毒防止、食品及び皮膚の衛生管理についての教育資料を得たのでここに報告する。

実験及び結果

1. 手掌面の細菌の種類

標準寒天手型平板培地を倒置して、片手の手掌面を上に向けて培地と接触させスタンプする。この際培地底を非被検手で押さえて接触が充分行われるように補助する。30℃で48時間培養し、出現 colony について、14名の手型から特徴のある colony を分離して合計72菌株を得た。

これを Cowan の第一次鑑別表他を参照して属レベルで同定した成績を図1に示した。

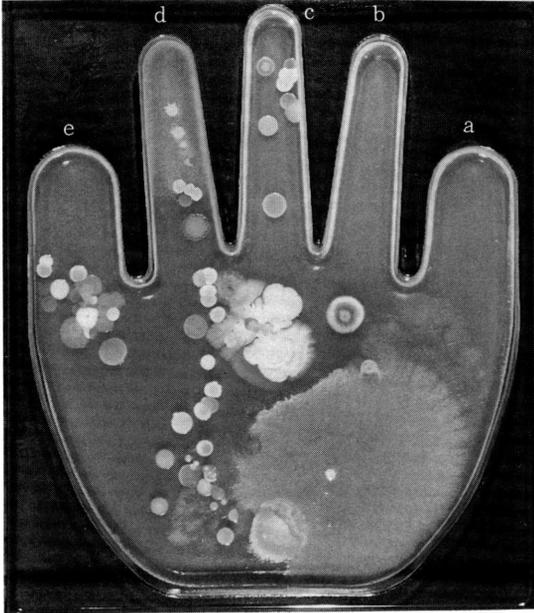


写真1 手型培地に出現した手掌面の細菌の colony

72菌株のうち、グラム陽性菌は58菌株で、判明した属は11属で、その主なものは *Kurthia*, *Corynebacterium* であった。グラム陰性菌は14菌株で、判明した属は5属でその主なものは *Aeromonas*, *Acinetobacter* であった。

2. 病原ブドウ球菌の検出

分離源：学生79名, 45名, 49名

手掌面表皮

分離方法：

培地：パームスタンプ培地マニット食塩寒天手型の平板（手型 株式会社日研生物医学研究所）

方法：1. 同様に培地を倒置して下から手掌面をスタンプした後、37°Cで48時間培養して、病ブ菌と推定される菌を分離した（192株/79名中）。

同定：分離菌について、更に3%卵黄加マニット食塩寒天上に塗抹、定型 colony を分離

して同定した。

病ブ菌検出率：①手型79名中 4名 5.1%

②手型45名中 7名 15.6%

③手型49名中 1名 2.0%

なお①の79名の手型から病ブ菌と疑わしい菌192菌株を分離して、更に3%卵黄加マニット食塩寒天平板に分離菌を塗抹して定型 colony を観察した結果、7菌株3.6%が病ブ菌として同定された。

3. 消毒用エタノール、逆性石けん及び流水洗浄による殺菌・除菌効果

試験方法：片手5本の指のうち、中3本の第2関節から指先の部分を、1本目は非検指でこすりながら流水で3分間洗浄、2本目は0.1%逆性石けん液に30秒浸漬〔a. 集団（50名前後）で1つの洗面器中で処理、b. 数人グループで小わけしたピーカ中で処理〕、3本目は消毒用エタノールを湿ませた脱脂綿による拭き取り方法で処理後、手型スタンプを用いて279名について一般生菌数を調べた。その成績を図2に示した。

結果：被検者279名のうち、消毒エタノールの効果があつて消毒部位に菌が出現しなかった人は約71.7%であつた。逆性石けん液は使用条件によって効果が異なり、一つの液を多数の人で使用するより、小わけして少人数で使用した方が効果があつた。流水での手洗いは通常では数秒であるが、3分間こすり洗ひした場合は約31%の人に除菌効果があつた。

4. 分離した病ブ菌の薬剤に対する抵抗性

分離した病ブ菌の薬剤に対する抵抗性の違いを下記の方法で調べた。

実験方法：

1) 抗菌防黴剤 Nopcoside-N-54-D を蒸留水で1,000倍から75,000倍まで希釈した。

2) 各希釈液を滅菌シャーレに2ml入れ、煮とかし普通寒天培地を18ml混釈して平板とし、一晚37°C定温器に放置して表面を乾燥させた。

3) 試験菌を10mlの pH7.2緩衝生理滅菌水に1白金耳懸濁し、2)の平板に1白金耳塗抹して、37°Cの定温器で48時間培養した。

4) 培地表面に生育したものを+、生育しなかったものを-で表示した。

結果：手掌分離病ブ菌の薬剤抵抗性試験成績は表1に示した。

手掌面の細菌に関する研究

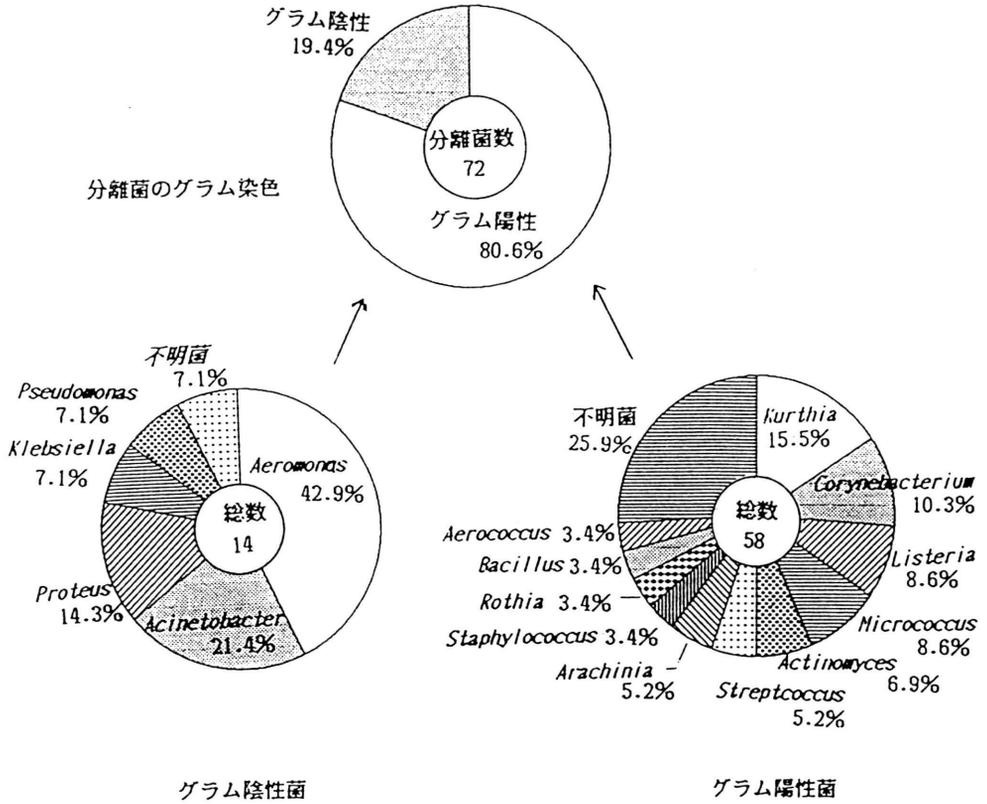


図1 手掌面の細菌の種類

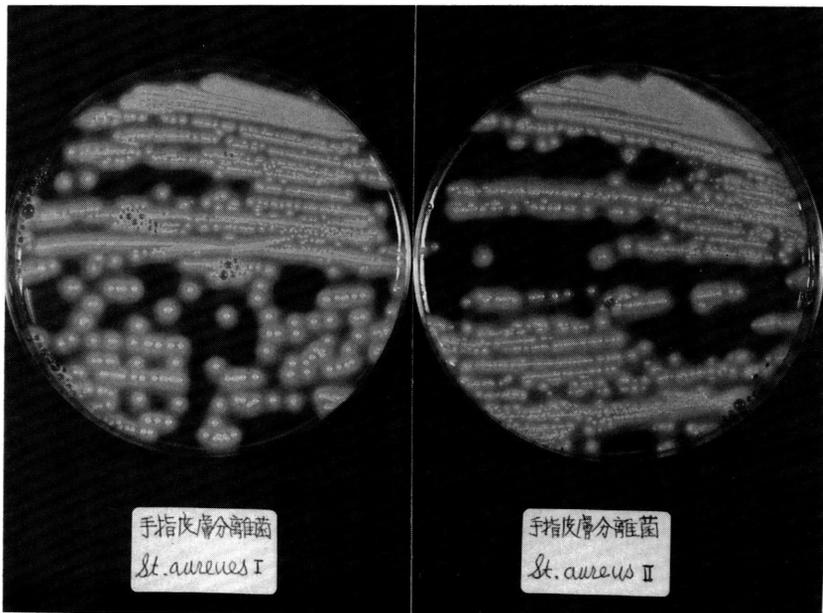


写真2 手掌から分離した*S. aureus*

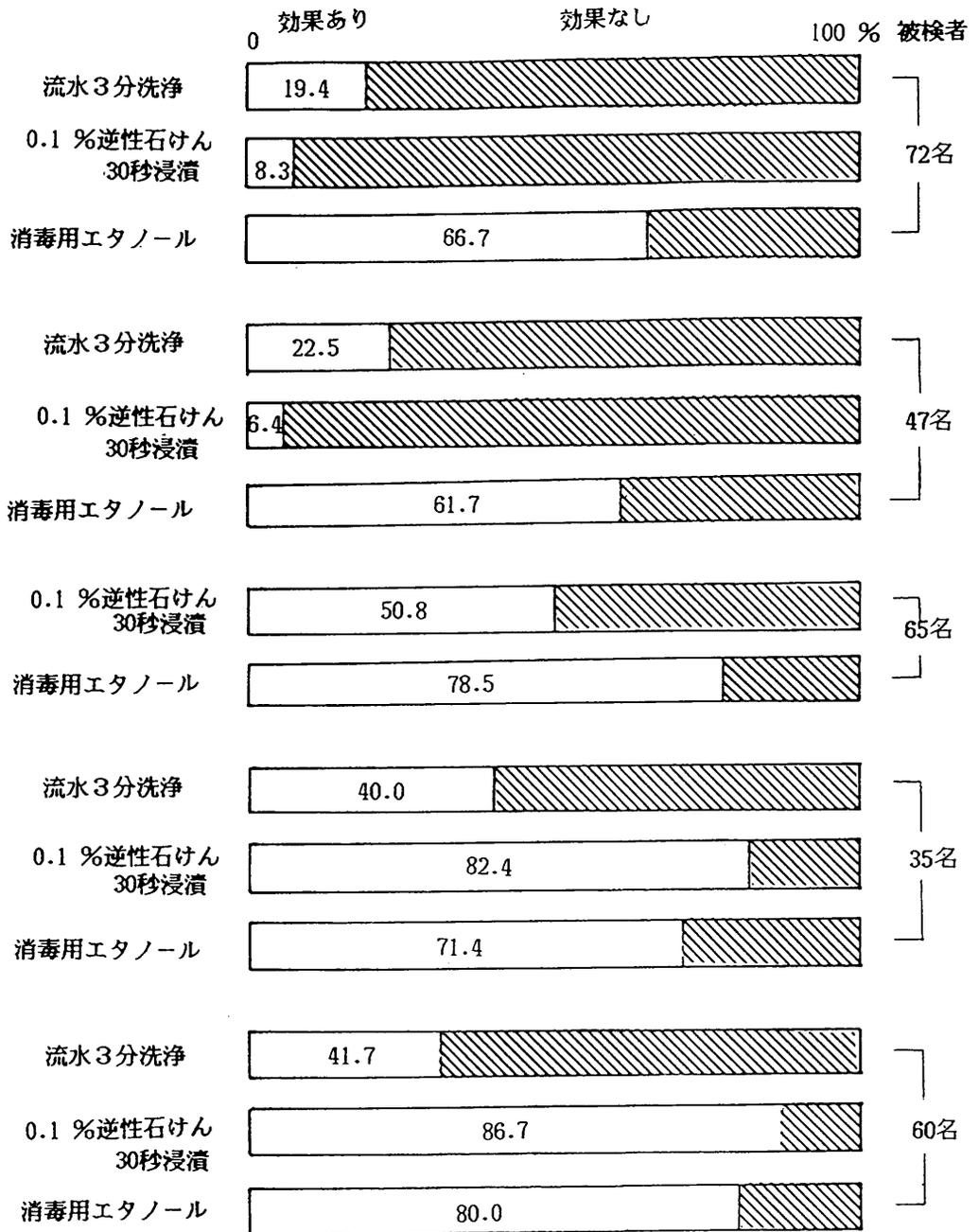


図2 手掌皮膚の一般生菌の殺菌・除菌効果

表1 手掌分離病原ブドウ球菌の薬剤抵抗性試験成績

分離菌No	薬剤 (Nopcoside-N-54-D) の希釈倍率								control
	1,000	2,500	5,000	7,500	10,000	25,000	50,000	75,000	
1	-	-	-	±	+	++	++	++	++
2	-	-	-	+	+	++	++	++	++
3	-	-	-	+	+	++	++	++	++
4	-	-	±	+	+	++	++	++	++
5	-	-	±	+	+	++	++	++	++
6	-	-	-	+	+	++	++	++	++
7	-	-	+	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	++	++	++	++	++

分離No. 1, 2, 3, 6及びcontrolとして用いた既知菌 *S. aureus* 209-P の最小阻止濃度 (MIC) は試験薬 Nopcoside-N-54-D の5,000倍希釈濃度であった。No. 4, 5及び7菌は2,500倍希釈濃度で増殖が阻止された。しかしNo. 4, 5及び7の中ではNo. 7に抵抗性が認められ、供試8菌株中最もこの薬剤に抵抗性があった。

この試験結果、分離病原菌の中で最も薬剤に抵抗性を示したNo. 7と *S. aureus* 209-P と同じ抵抗性を示したNo. 2の2菌株をエタノール殺菌試験の供試菌として選択した。

5. エタノールの殺菌効果
試験方法：試験方法は図3に示した。

5. エタノールの殺菌効果

試験方法：試験方法は図3に示した。

- 1) 供試菌液：*Staphylococcus aureus* 209-P と分離病原菌No. 7をブイヨン培地で3代継代培養して、接種菌液とした。
- 2) エタノール液：未変性エタノール95%、90%、80%、70%、60%、50%及び40%濃度液の7段階

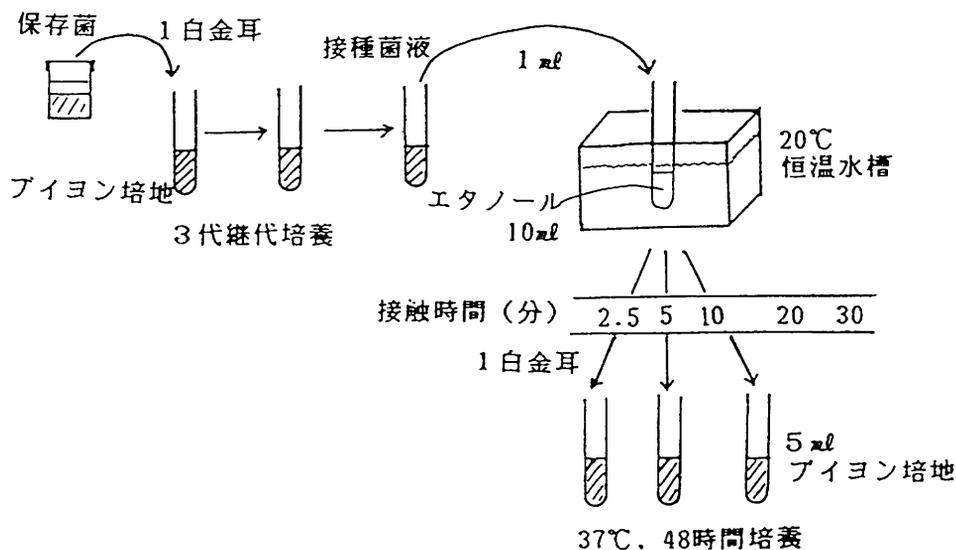


図3 エタノールの接触試験法

表2 エタノールの殺菌効果

供試菌	エタノール (%)		95			90			80			70			60			50			40			control		
	接触時間 (分)		2.5	5	10	2.5	5	10	2.5	5	10	2.5	5	10	5	10	20	10	20	30	10	20	30			
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
手掌分離菌 Na7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
手掌分離菌 Na2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+

を調製した。

- 3) 各濃度のエタノール液を3本の試験管に10mlずつ分注し、アルミキャップをして20℃恒温槽中に保持した。
- 4) 接種菌液1mlをエタノール液に加えて、2.5分、5分、10分、20分、30分後に1白金耳鈎菌して、5mlのブイヨン培地に接種した。
- 5) 37℃、48時間培養後に菌の生育の有無からエタノールの殺菌効果を判定した。

結果：エタノールの殺菌効果は表2に示した。

手掌から分離した病ブ菌Na7と2は、controlとして用いた*S.aureus* 209-Pより95%エタノールに対する抵抗が強かった。特にNa7はNa2より抵抗が強かった。95%エタノール濃度では2.5分、5分、10分接触させても殺菌されなかったが、90%、80%、70%各濃度で2.5分以上接触、60%濃度では5分以上、50%濃度では10分以上、40%濃度では20分以上の接触で殺菌された。Na2は、95%濃度で5分、90%、80%、70%各濃度では2.5分以上、60%濃度では10分以上、50%、40%各濃度では20分以上の接触で殺菌された。*S.aureus* 209-Pは95%、90%、80%、70%各濃度で2.5分、60%濃度で5分以上、50%、40%各濃度では20分以上の接触で増殖は阻止された。

結果の考察

1. 被検者14名の手掌面から分離した72菌株のうち、グラム陽性菌が58菌株80.6%、グラム陰性菌が14菌株19.4%であった。そのうちのグラム陽性菌では、*Kurthia*が15.5%、*Corynebacterium* 10.3%、*Listeria* 8.6%、*Micrococcus* 8.6%、*Actinomyces* 6.9%、*Streptococcus* 5.2%、*Arachinia* 5.2%、*Staphylococcus* 3.4%、*Rothia* 3.4%、*Bacillus* 3.4%、*Aerococcus* 3.4%で、不明菌25.9%であった。

皮膚常在菌¹⁾は、*Staphylococcus*・*Propionibac-*

*terium*がおもであると言われているが、被検者14名、標準寒天手型スタンプ法での分離では*Propionibacterium*は分離されておらず、*Staphylococcus*もおもな菌ではなかった。最近、*Listeria*^{2) 3) 4)}は食中毒菌として注目されているが、食品への汚染経路については明確にされていない。本実験結果から手掌の皮膚からの移行が示唆された。手掌の衛生管理により、リステリア食中毒はかなり阻止出来るであろう。

*Staphylococcus*の中に病ブ菌が含まれている。

次に、分離されたグラム陰性菌14菌株のうちでは、*Aeromonas*が42.9%と最も多く、次いで*Acinetobacter* 21.4%、*Proteus* 14.3%、*Klebsiella* 7.1%、*Pseudomonas* 7.1%、そして不明菌も7.1%であった。

Acinetobacter、*Aeromonas*、*Pseudomonas*は牛肉⁵⁾・豚肉からも我々は分離している。手指からの移行については誰も報告していないように思う。

これらの分離菌が常在菌であるのか、単純汚染菌なのかについては、更に多くの人から菌を分離して確認する必要がある。

2. 病原ブドウ球菌の検出率

173名の学生からの病ブ菌検出率は2.0~15.6%であった。西田⁶⁾はふきとり法で、各種食品従業員17/804、工場の従業員4/96、外食従業員58/1418の病ブ菌を検出し、2.1~4.2%の検出率であったと報じている。従って本学の学生からの検出率がやや高かった。

3. 消毒用エタノールを脱脂綿に含ませて指先を清浄に拭いた後は、61.7%~80%の人に除菌効果があった。

逆性石けん0.1%液2ℓ入洗面器中で72名、47名が同じ液に指を浸漬するだけの操作では、6.4%、8.3%と低い殺菌効果であったが、液を小分けして数名で同様に処理すれば32.4%、86.7%と処理効果が高くなった。今後、濃度・液量そして使用人数との関連の基礎データについて検討する必要がある。

流水による洗浄でも3分位丁寧に行えば19.4%~40%

は除菌された。一般に手洗いは数秒なので、殆んど除菌されないと考えられる。

4・5. 分離病ブ菌7菌株の薬剤耐性をしらべた上で、エタノールに対する抵抗性試験には2菌株を用いた。controlをして*S.aureus* 209-Pを用いたが、いずれも分離菌の方が抵抗性が高かった。しかしエタノール90%、80%、70%では2.5分の接触で有効であった。

要 約

被検学生14名の健康な手掌面から標準寒天平板手型で一般細菌を分離した結果は、グラム陽性菌58/72, グラム陰性菌14/72であった。主要分離菌は*Kurthia*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*などであった。

健康な手掌面から病ブ菌は2.0~15.6%分離された。

消毒用エタノールで拭けば消毒効果は高く、分離病ブ菌は90%、80%、70%エタノール2.5分接触で殺菌された。

逆性石けんは小分けにして、少人数で使用すれば0.1%30秒の浸漬で高い殺菌効果があった。

流水洗浄でも3分程度行なえば、除菌効果が見られた。

文 献

- 1) 天児和磯・南嶋洋一：微生物学，医学書院（東京）1993, p.28
- 2) 小寺正樹：食品衛生研究，47-54（1989）
- 3) 勝部泰次：日本災害医学会会誌，37：454-461（1989）
- 4) 勝部泰次・丸山総一：日獣会誌，44，681-689（1991）
- 5) 神野節子，土居則子，林崎洋子，古茂田恵美子，森泉裕子：平成4年度アルコールの高付加価値的利用に関する研究開発のうち食品保存技術に関する研究報告書，1（1993）
- 6) 西田博：食品工業，2下，1（1985）