

# 鼻腔からのブドウ球菌の採取方法の検討

## ～湿った綿棒と乾燥綿棒の比較～

The study of the method for collecting Staphylococci from nasal cavity

塩田 澄子 (就実大学薬学部)

萩谷 英大 (岡山大学病院)

内田 多恵子 (就実大学薬学部)

見尾 光庸 (就実大学薬学部)

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は院内感染の主たる起因菌であり、院内感染対策上最も重要な菌の一つである。ICU入院時には鼻腔のMRSA保菌調査が推奨されるが、採取に関しては統一した方法はない。鼻腔からの菌の採取に湿った綿棒を使うと記載された論文もあることから、ブドウ球菌の採取の際に、湿った綿棒を使う優位性があるかを検討した。対象は実習中の学生とボランティア学生で延べ192名であった。一方の鼻腔から湿った綿棒、他の鼻腔からは乾燥綿棒を用いて菌を採取し、ブドウ球菌選択培地に生育した菌の数を調べた。培地に生えたすべての菌の菌数を比較した結果、湿った綿棒の方が乾燥綿棒より、有意に多くの菌を採取することができた ( $p < 0.001$ )。黄色ブドウ球菌についても同様であった ( $p < 0.0153$ )。左右両方の鼻腔から湿った綿棒および乾燥綿棒で採取した192人中、黄色ブドウ球菌が検出された人は74人で、検出率は38.5%であった。左右それぞれの鼻腔からの黄色ブドウ球菌の検出率は、湿った綿棒29.7%、乾燥綿棒29.1%となり、両者で差はなかった。今回の結果から、より多くの菌を採取するには乾燥綿棒より湿った綿棒を用いる方が良いことがわかった。黄色ブドウ球菌検出率を上げるためには、片方だけより、両方の鼻腔から採取した方が良いことが示された。

### 緒言

黄色ブドウ球菌は環境における生存性が高く、接触感染で容易に伝播し、薬剤耐性を獲得しやすい点や、カテーテル関連血流感染症 (CRBSI) や感染性心内膜炎 (IE) 等難治性疾患を惹起することから、最も重要な院内感染原因菌とされている。CDCの「血管留置カテーテルに関連する感染予防のガイドライン (2011年)」によると、米国では集中治療室 (ICU) で分離される黄色ブドウ球菌の50%以上がMRSAとされる<sup>1)</sup>。日本の病院においても、2012年の厚生労働省の院内感染対策サーベイランス (JANIS) 年報 (検査部門) によると、臨床分離される黄色ブドウ球菌におけるMRSAの割合は53%であり、2008年

の60%に比較すると、減少しているものの依然として高い分離率を示している<sup>2)</sup>。

MRSAはヒトの皮膚や鼻腔のほか、口腔内、上気道、腸管等に存在する。健常者であればMRSAの保菌自体は問題ないが、易感染者におけるMRSA感染症は、感染者自身が保有する菌による内因性感染である場合が多く、感染対策上、保菌者の確認と管理が重要になる。特に重症患者が集まるICUでは、MRSA保菌者が感染症を起こすリスクは、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)保菌者または非保菌者より有意に高いとされる<sup>3,4,5)</sup>。従って、ICUでは入院時にMRSAの保菌調査を行うことが推奨されている。さらにMRSAを保菌していることが分かった患者に対しては、接触感染予防策に則って、個室管理やコホーティング(同一病原体に感染した患者をまとめ、同じスタッフが看護するなど、周囲への感染の広がりを抑える管理体制を採ること)を行うことが望ましいとされる<sup>6)</sup>。

より確実な保菌調査を行うことが重要であるが、現状は鼻腔からの採取法は各病院の看護スタッフに任されており、調べた範囲では菌の採取の際に、綿棒を用いてとだけ書かれている場合が多い。その中で、湿った綿棒を用いてと記載された論文も一部ではあるが見つかった<sup>7)</sup>。経験的に湿らせた綿棒の方が菌の採取率が高いとされるが、根拠となる論文はほとんどない。そこで、菌の採取に湿った綿棒を使う利点があるかどうかを調べるために、生物系薬学実習Ⅱの微生物学実習の1項目である「鼻腔に存在するMyブドウ球菌の分離と同定」<sup>8)</sup>を利用して、鼻腔のブドウ球菌の採取における湿った綿棒、乾燥綿棒の優位性を検討した。

## 方法

1. 調査方法 2012年10月～11月に、就実大学薬学部学生延べ192名を対象として調査した。学生実習中の3年生とボランティアである4年生にインフォームドコンセントをとり、承諾した学生が調査に参加した。左右の鼻腔の菌数に差があるかを確認するために、菌の採取は2日に分けて左右を逆にして2回行った。学生自身が、一方の鼻腔からは乾燥、他方からは滅菌生理食塩水で湿らせたコットン製綿棒(平和メディック株式会社)を使って菌を採取した。採取条件を鼻腔の内壁の表面を綿棒で3回なぞると決めた。その場でブドウ球菌選択培地である7.5%食塩添加マンニット寒天培地(日水製薬株式会社)の表面全体に、綿棒の向きを変えながら3か所から塗り拡げた。37℃で2日間培養後、黄色コロニー数と白色コロニー数をそれぞれ計測した。数えられないほどの多数のコロニーが形成された場合は、上限の菌数を10000個とした。

2. 黄色ブドウ球菌の同定 7.5%食塩添加マンニット寒天培地の黄色のコロニーを1個選び、コアグラゼ産生性とDNase活性を調べた。コアグラゼ検出用ウサギプラズマ(栄研株式会社)溶液に菌を懸濁し、37℃で培養し、2時間後、凝集したものをコアグラゼ陽性とした。また同時に、DNA培地(日水製薬株式会社)上に菌を塗布し、2日間37℃で培養後培地が青色から紫色に変化したものをDNase陽性とした。どちらか一方が陽性に

なったものは黄色ブドウ球菌と判定した。

3. 統計解析 Wilcoxon signed rank test を用いて解析した。

4. 倫理面における研究の妥当性 本研究は課題名「鼻腔に存在する菌の採取方法に関する検討」で、平成24年度8月22日開催された第10回就実大学研究倫理安全委員会で審議され、「適当と認定する」との結果を得ている。

## 結果

### 1. 左右の鼻腔からの採取菌数の比較

7.5%食塩添加マンニット寒天培地は7.5%の食塩が添加されているために、耐塩性のあるブドウ球菌 (*Staphylococcus*) 属や *Micrococcus* 属しか生育できない。また、マンニットとフェノールレッドを含有するため、マンニット分解性を持つ黄色ブドウ球菌のコロニーは黄色となり、その周囲は黄変する。表皮ブドウ球菌を主体とする他のブドウ球菌属や *Micrococcus* 属は白色コロニーとなるため、黄色ブドウ球菌を判別することができる。今回はマンニット寒天培地に生育したすべての菌と、黄変したコロニーを黄色ブドウ球菌として、それぞれ乾燥綿棒と湿った綿棒で鼻腔から採取した際の菌数を比較した。さらに学生実習では黄色コロニーの一部を採り、黄色ブドウ球菌に特徴的な酵素であるコアグラーゼまたはDNaseが陽性であることを確認した。2日とも参加した52名の学生を対象とした。

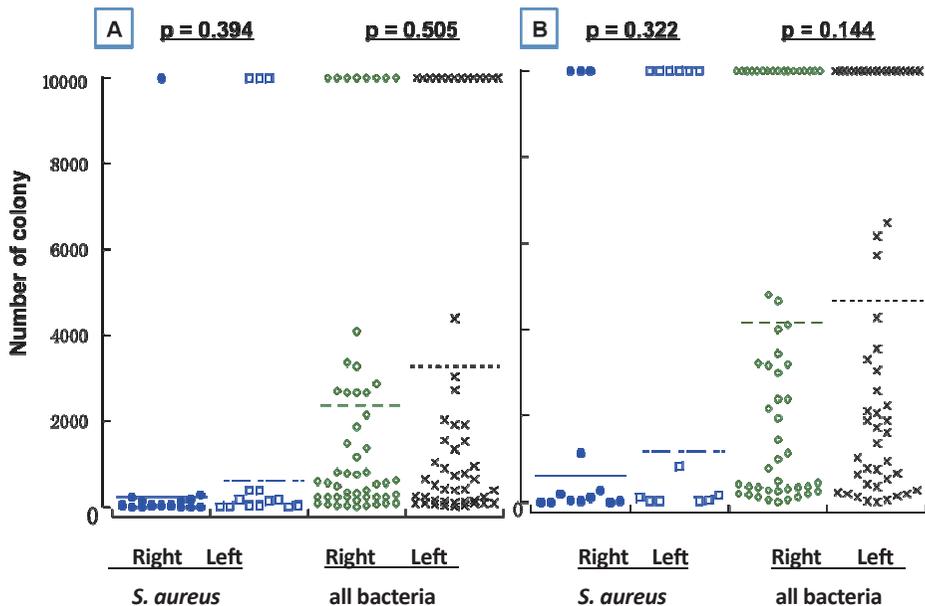


図1 Comparison between the number of colony of *Staphylococcus aureus* or all bacteria grown on the mannitol salt agar plate obtained from right or left nasal cavity, using a dry swab (A) and wet swab (B).

乾燥綿棒を用いて採取したすべての菌、または黄色ブドウ球菌の菌数を Wilcoxon signed rank test を用いて左右の鼻腔で比較したところ、それぞれ  $p=0.505$ 、 $p=0.394$  となり、左右の鼻腔から採取される菌数に有意差は見られなかった (図1・A)。同様に湿った綿棒を用いた時もすべての菌、黄色ブドウ球菌とも左右の鼻腔で採取菌数に有意差は見られなかった (それぞれ、 $p=0.144$ 、 $p=0.322$ ) (図1・B)。ブドウ球菌については、左右の鼻腔から採取される菌数に差はないと考えられた。

## 2. すべての菌数に対する乾燥綿棒と湿った綿棒の比較

左右の鼻腔を変えて2日間で2回菌を採取した学生を含めると、延192名の学生が対象となった。どの学生からもマンニット寒天培地上にコロニーが形成されたことから、鼻腔からのブドウ球菌の採取率は100%であった。湿った綿棒と乾燥綿棒を使って左右の鼻腔から採取したすべての菌数を比較すると、湿った綿棒で採取したほうが、乾燥綿棒より有意に採取菌数は多かった ( $p<0.001$ ) (図2)。

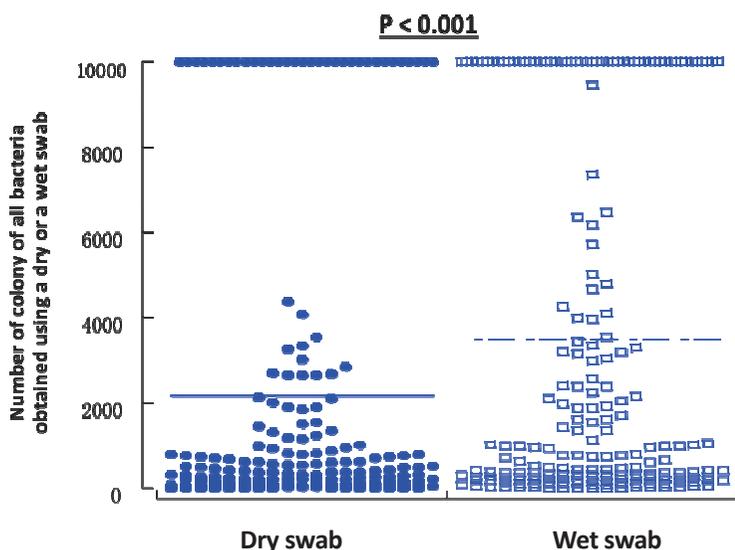


図 2 Comparison between the number of colony of all bacteria obtained from nasal cavities, using a dry swab and a wet swab.

## 3. 黄色ブドウ球菌の菌数に対する乾燥綿棒と湿った綿棒の比較

黄色ブドウ球菌は延べ192名の学生のうち、74名から分離された。調べた大学生の黄色ブドウ球菌の保菌率は38.5%であった。乾燥綿棒と湿った綿棒で採取できた黄色ブドウ球菌の菌数の比較を行った結果、湿った綿棒で採取したほうが採取菌数は有意に多いことが示

された ( $p=0.0153$ ) (図3)。左右それぞれ片方の鼻腔から採取した場合、黄色ブドウ球菌が検出された学生は、湿った綿棒で、192人中57名となり検出率は29.7%、乾燥綿棒では56名で検出率は29.1%となった。黄色ブドウ球菌の検出率は湿った綿棒でも乾燥綿棒でも差はなかった。

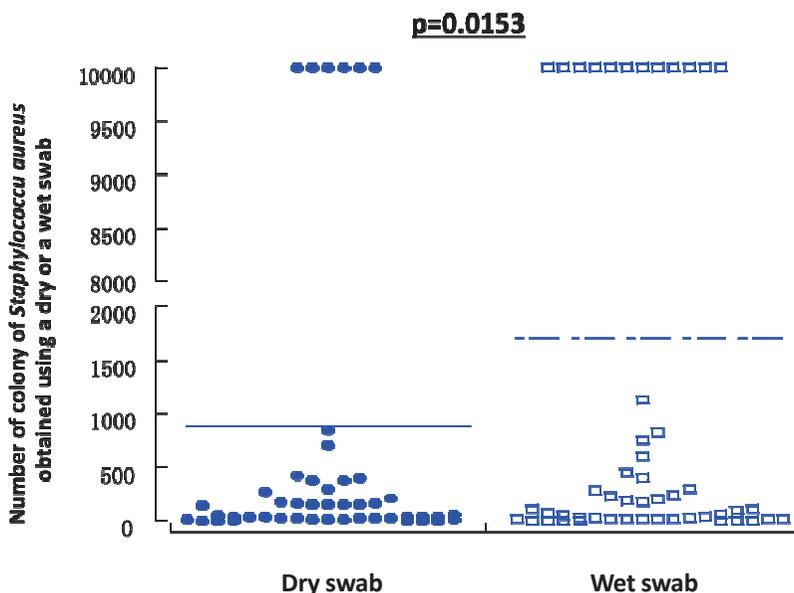


図3 Comparison between the number of colony of *S. aureus* obtained from nasal cavities, using a dry swab and a wet swab.

#### 考察

MRSAの予防と感染管理のためのアクティブ・サーベイランス (MRSAの積極的監視によるMRSAの保菌の判別と隔離政策、除菌も含む) を実施することで、ICUにおけるMRSAの蔓延を確実に防止できるとSHEA米国医療疫学学会 (SHEA) のガイドラインにある<sup>9)</sup>。このため多くの病院ではICU入院時にMRSAの保菌調査を行っている。アクティブ・サーベイランスの基本となるMRSAの保菌の判別を行うためには、確実な鼻腔からの菌の採取が重要となるが、採取方法については明確な基準は示されていない。本研究では、確実なMRSAの保菌の判別をするための手段として、湿った綿棒と乾燥綿棒で採取される菌数を比較し、評価した。

ブドウ球菌選択培地に生育したすべての菌数も、黄色ブドウ球菌もいずれも湿った綿棒を用いた方が有意に多くの菌数を採取することができた。また、鼻腔からの菌の採取率は100%であった。これまででも学生実習で鼻腔からの菌の採取を行ってきたが、採取方法を

学生に任せていたためか、菌が採取できない学生が毎年数人出ていた。採取条件を「鼻腔の内壁の表面を綿棒で3回なぞる」と決めたことにより、採取率が100%になったと考えられる。

今回、黄色ブドウ球菌の検出率は両方の鼻腔から採取した場合、38.5%となった。2001年から2002年にかけて、米国で行われた大規模な黄色ブドウ球菌と MRSA の保菌調査によると、黄色ブドウ球菌の保菌率は32.4%で MRSA の保菌率は0.8%であった<sup>10)</sup>。年齢別に見た場合、10代から20代の保菌率は平均より高いことから、今回の調査における黄色ブドウ球菌の検出率は適正と考えられる。片方の鼻腔だけだと採取率は29~30%となり、両方から採取した時より検出率は低かった。左右の鼻腔で保有する菌種が異なるという報告もあることから<sup>11)</sup>、菌を採取する場合は両方の鼻腔から採取することが望ましい。

一方、並行して行われた津山中央病院の ICU における調査では、湿った綿棒と乾燥綿棒ですべての菌数、黄色ブドウ球菌ともに採取菌数に差がないという結果となった<sup>12)</sup>。採取に用いた綿棒がレーヨン製であるなど調査方法に違いがあったため、今回とは異なる結果になったと考えられる。また12人の MRSA 保菌者を対象として湿った綿棒、乾燥綿棒で鼻腔からの菌を採取した結果、MRSA の検出率に変化はなかったとする論文もあった<sup>13)</sup>。ひと手間かけて湿った綿棒で採取することに関しては、費用対効果の面で、まだ検討の余地があると思われる。今回学生対象の実験では、採取に用いたのはコットン製の綿棒であった。臨床ではレーヨン製の綿棒が用いられていることから、レーヨン製の綿棒を使う必要がある。また、今回の調査では MRSA まで調べることができなかった。鼻腔の保菌調査は MRSA の感染防止のために行われることを考えると、MRSA の採取菌数、検出率などの精査も行うべきであり、より確実な菌の採取方法を確立するためにはさらなる検討が重要となる。

## 謝辞

この研究は、本学の連携病院である財団法人津山慈風会津山中央病院の ICT（インフェクションコントロールチーム）活動の一環として行われました。研究の体制づくりにご尽力くださいました森本直樹副院長、および國米由美氏、村瀬知子氏をはじめとする ICT メンバーの皆様に心から感謝申し上げます。また調査に協力して下さった学生の皆さんに深謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) [http://www.medicon.co.jp/views/pdf/CDC\\_guideline2011.pdf](http://www.medicon.co.jp/views/pdf/CDC_guideline2011.pdf)
- 2) <http://www.nih-janis.jp/report/index.html>
- 3) Altunbas A, Shorbagi A, Ascioğlu S, Zarakolu P, Cetinkaya-Sardan Y. Risk factors for intensive care unit acquired nasal colonization of MRSA and its impact on MRSA infection.

J Clin Lab Anal. 2013 Sep;27(5):412-7

- 4) Rocha LA, Marques Ribas R, da Costa Darini AL, Gontijo Filho PP. Relationship between nasal colonization and ventilator-associated pneumonia and the role of the environment in transmission of *Staphylococcus aureus* in intensive care units. Am J Infect Control. 2013 Jul 23. S0196-6553 (13) 00850-X
- 5) Honda H, Krauss MJ, Coopersmith CM, Kollef MH, Richmond AM, Fraser VJ, Warren DK. *Staphylococcus aureus* nasal colonization and subsequent infection in intensive care unit patients: does methicillin resistance matter? Infect Control Hosp Epidemiol. 2010 Jun;31(6):584-591.
- 6) Lee BY, Singh A, Bartsch SM, Wong KF, Kim DS, Avery TR, Brown ST, Murphy CR, Yilmaz SL, Huang SS. The Potential Regional Impact of Contact Precaution Use in Nursing Homes to Control Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2013 Feb; 34 (2) :151-160.
- 7) 森脇孝博 整形外科病棟入院患者及び同医療従事者より分されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 感染症学雑誌 2003第77巻 第12号 p1058-1066
- 8) 須藤鎮世、塩田澄子、工藤孝之 就実大学薬学部生物系薬学実習Ⅱ（遺伝子・微生物学）テキスト p23-p25
- 9) Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, Farr BM; SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003 May; 24 (5): 362-86.
- 10) Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States. 2001-2002. J Infect Dis. 2006 ;193:172-179.
- 11) Kildow BJ, Conradie JP, Robson RL. Nostrils of healthy volunteers are independent with regard to *Staphylococcus aureus* carriage. J Clin Microbiol 2002; 50:3744-3746.
- 12) Hagiya H, Mio M, Murase T, Egawa K, Kokumai Y, Uchida T, Morimoto N, Otsuka F, Shiota S. Is wet swab superior to dry swab as an intranasal screening test? Journal of Intensive Care 2013 ;1:10.
- 13) Codrington L, Kuncio D, Han J, Nachamkin I, Tolomeo P, Hu B, Lautenbach E. Yield of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on moist swabs versus dry swabs. Am J Infect Control. 2013 Jan 18. pii: S0196-6553(12)01253-9.