

公益社団法人全国ビルメンテナンス協会
令和5年度委託研究

EN16615 に準拠した病院環境における清拭法 に関する研究

福島感染制御ネットワーク研究会

金光敬二

新井和明

仲村究

原靖果

小針朱子

北畠光希

油井優

ワイプ使用方法検討報告書

はじめに

環境に存在する細菌を除去することは感染管理をする上で重要である。特に医療環境は多岐にわたり、それぞれの場面で工夫をしながら進めていかなければならない。そのため出来るだけその環境に合わせた細菌の除去方法を模索する必要がある。また同時に経済性、時間の節約も考慮していかなければならない。そのため場面を想定し、データを収集していく必要があるが本邦の臨床・看護現場に即したデータ蓄積、試験方法の確立は十分でない。特に臨床・看護現場の環境の表面での実践的な多種類のワイプ素材、消毒剤と殺菌剤の統一した効果評価判定方法それも定量的試験方法を確立していく必要がある。

現在欧州では英国の規格である EN16615:2015 が用いられている。

課題として下記の 2 つがあげられる。第一に頻繁に行われる ①オーバーテーブルの清拭方法。第二に ②除菌用シートに水を含ませて清拭した時の効果の是非。について本邦の実情に合わせ EN16615:2015 に準拠し、想定される医療環境の感染管理を実験的に行ったので報告する。

①オーバーテーブルの清拭に関する問題とデータ収集

1. 研究目的

オーバーテーブルの清拭は日常的な業務の 1 つである。その清拭方法について検討した。

その表面の清拭について EN 16615 2015 に準じて実施した。ただその清拭方法は一方向とした。

2. 期間:2023 年 11 月 7 日～17 日

3. 試薬と機器

1) 試験菌株 *Staphylococcus aureus* ATCC6538 (EN16615:2015 5.2.1)を使用した。凍結保存してある同株を試験に供する前日に SDC 寒天培地に接種し 35℃のインキュベーターで培養した。

試験菌株を Trypticase Soy Broth (BD 社製)に McFarland 5 で懸濁した。

2) 試験を行うオーバーテーブルは表面をメラミン塗装したオーバーテーブル:フランスベッド社製(写真 A)と合成樹脂製オーバーテーブルトレイ:フランスベッド社製:半分に切断(写真 B)2 種類を使用した。またその表面に EN16615:2015 に従い油性マジックで図 1 に示した寸法で T1 から T4 を描画した。表面を消毒用アルコールで清拭し、安全キャビネットの中に搬入しキャビネット内で試験を実施した。



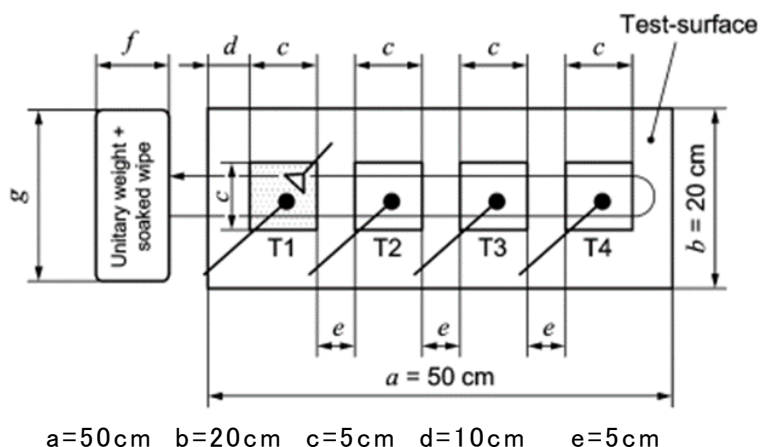


図1 EM16615:2015 準拠試験面のレイアウト概略図

写真 A メラミン塗装オーバーテーブル平滑面

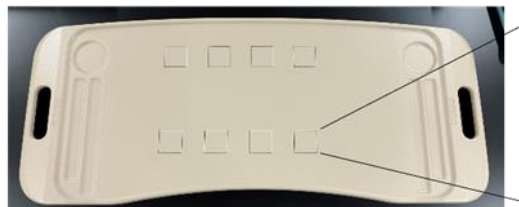


写真 B 合成樹脂オーバーテーブル凹凸面

3) 使用するワイプ、シート、クロス

3M の除菌用シート(スリーエム社製)をそのまま使用、それに滅菌水を 8.5ml 滴下し湿潤化したもの、0.01%塩化ベンザルコニウム溶液に希釈したもの、4 級アンモニウム塩希釈液を既に調整され含んでいる SARAYA 社製環境清拭クロス等、下記の 4 種類のワイプ、シート、クロスを試験用として使用した。

- ① 3M 菌を吸着する除菌用シート
- ② 3M 菌を吸着する除菌用シート(+滅菌水 8.5ml)
- ③ 3M 菌を吸着する除菌用シート(+0.01%塩化ベンザルコニウム 8.5ml)
- ④ SARAYA 環境清拭クロス(調整済)

4) 接触面、幅 8.6cm、長さ 12.1cm の重量 2.5kg の御影石(花崗岩)

5) 100 μ l、1000 μ l のマイクロピペットとチップ、10ml、25ml のディスポーサブルメスピペットと電動ピペット

6) コンラージ棒(樹脂製)

7) ダグロン製綿棒

8) 10ml、50ml ディスポーサブル滅菌遠心管

9) PBS[緩衝液: 1/15M リン酸緩衝液(富士ファルム和光純薬社製)調整済に NaCl(半井化学)を 0.8% の割合で添加した。

10) SCD 寒天培地(アズワン社製)

11) Trypticase Soy Broth(BD 社製)を高圧滅菌しておく。

4. 方法

試験菌株 *Staphylococcus aureus* 懸濁液の 50 μ l をテストフィールド T1 に滴下(写真 C)し、コンラージ棒で隙間なく T1 に塗り広げる。(写真 D)それを 30 分から 50 分放置し、自然乾燥させる。(写真 E)

②と③は滅菌水と 0.1%塩化ベンザルコニウムをワイプに浸透させねばならず、事前に浸透量を測定した 8.5 ml をメスピペットで供給した。(写真 F)

4 種類のワイプ、クロスが Test Field が隠れるように置く、その際 3M の除菌用シートは 2 つ折にして置く

た。(写真 G)その上に 2.5kg の花崗岩を置き、一端を持ち一気に 1 秒で T1 から T4 まで引く。(写真 H、写真 I)花崗岩、ワープ、シート、クロスを取り去った後、下記の図に従いオーバーテーブル上 T1 から T4 の表面に残る細菌のサンプリングを行った。(写真 J)



写真 C T1 フィールドに $50\mu\text{l}$ 滴下



写真 D コンラージ棒で広げる

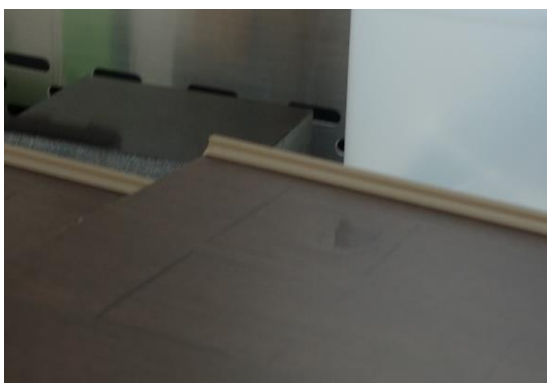


写真 E 30～50 分かけ自然乾燥

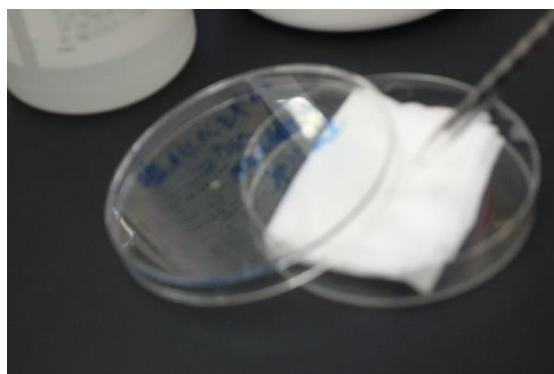


写真 F 水、0.1%塩化ベンザルコニウム



写真 G ワイプを試験面に置く



写真 H T1 ワイプ上に花崗岩を置く



写真 I T1 から T4 まで 1 秒で引く



写真 J Test Field 表面のサンプリング

2ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) の入ったチューブにテーパード型ダクロン製綿棒を一度湿らせチューブの内面に押し付け余計な生食を除去し、テストフィールドに対し回転しながら隙間なく丁寧にふき取って行く。出来たら縦と横、両方向からふき取る方が望ましい。ふき取った綿棒をチューブに戻し中に入り込んだ菌体を洗い出すように回転させながらチューブ内面に押し付けながら洗い出す。

キャップをして転倒混和し均一化する。

(図 A) それをサンプリング水として図 B に

示した希釈による菌数測定に供する。1 つのワイプ、シート、クロスに対し各 T1 から T4 の 4 つのエリアのふき取り綿棒に 1、10、 10^2 、 $10^3 \times$ の 4 つの希釈系列を作成する。

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) サンプル水 2ml 中の *S. aureus* の数が各テストフィールド表面に付着した菌に反映する。9ml PBS を分注したコニカルチューブにサンプリング水 1ml を分注し $10^2 \times$ 希釈を作成、ボルトックスミキサーで攪拌後そこから同様に 1ml 分取し同様に $10^8 \times$ までの希釈系列を作成する。(図 B)

それぞれ希釈したサンプリング水の 100μ を SCD 培地に接種、コンラージ棒で広げ (写真 K)、 35°C インキュベーターで約 24 時間培養した。(写真 生育したコロニーのカウント可能プレートよりカウントし希釈倍数を掛け、最終的に 20 倍掛けることにより 2ml のサンプル水中の菌数を測定することにより Test 表面に残存する菌数を測定することになる。

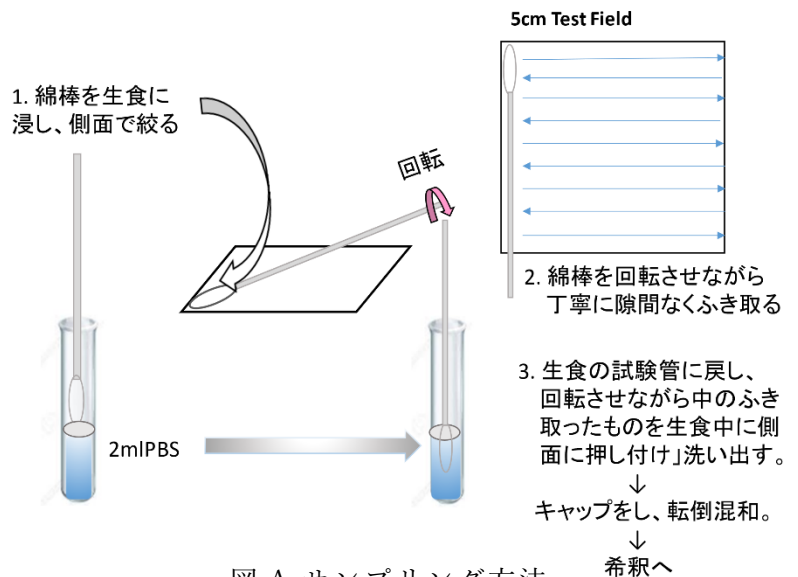


図 A サンプリング方法

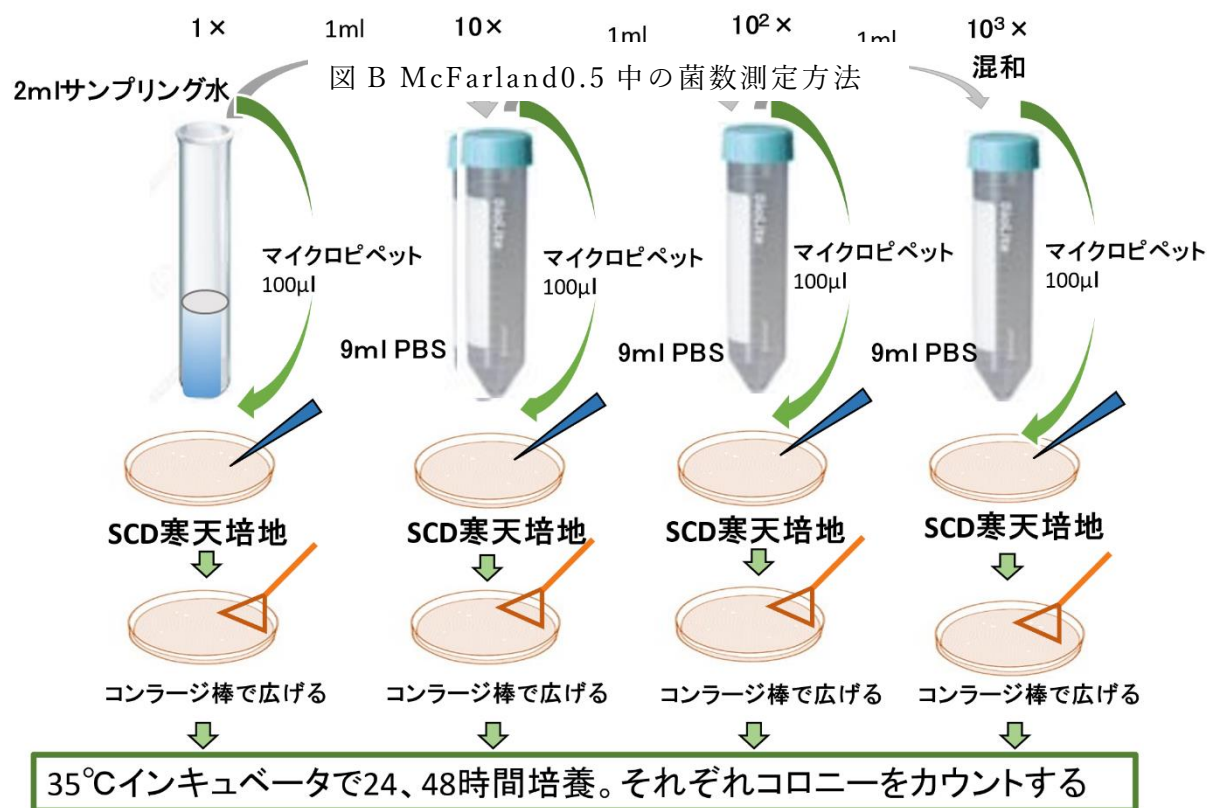


図 B サンプル水の菌数測定法

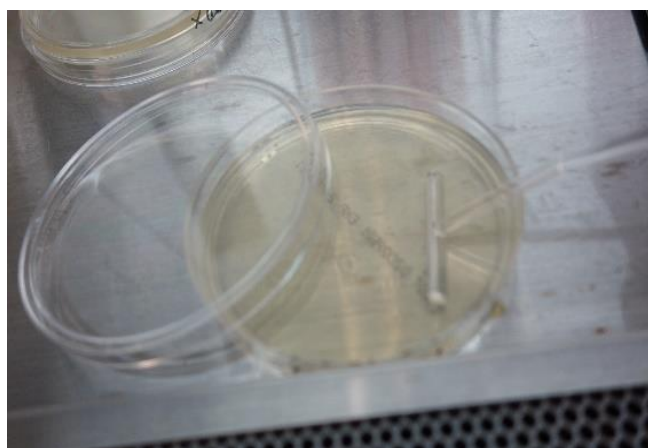


写真 K コンラージ棒で広げる

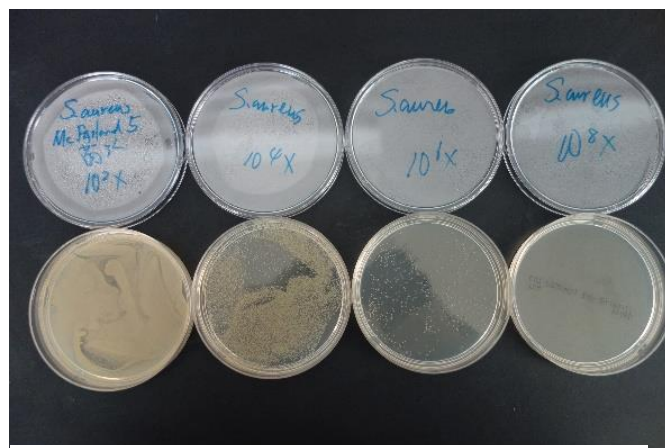


写真 L SCD 寒天培地に生育したコロニー

同時に McFarland 5 に懸濁した菌液についても菌数測定を行った。この菌液は高濃度のため図 C に従い McFarland 5 の 50 μl を TestField1 に接種した菌量を測定した。

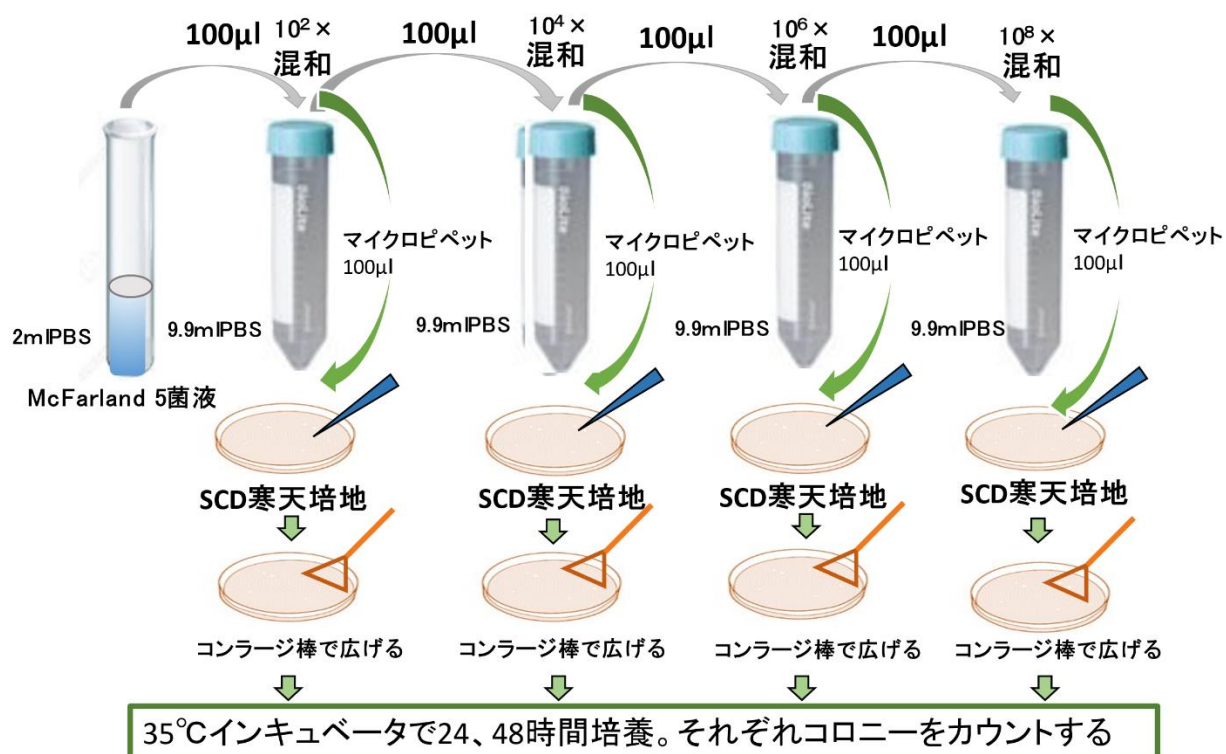


図 C McFarland5 の 50 µl に含まれる菌数測定法

5. 成績

1) テストフィールドへの接種量

概算であるがテストフィールド1に接種した量が基本となる。そこから T2 から T4 へと引き広げるため菌量をカウントしておく必要はある。それによると 50 µl 当たり (T1 テストエリア接種量) は 2.37×10^8 個/CFU である。

表 1 接種菌量の測定

	10 ²	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸
CFU	Lot of	Lot of	473	0
100 µl / 2ml 中 (CFU)	Lot of	Lot of	4.73×10^8	0
50 µl / 接種量 (CFU)	Lot of	Lot of	2.37×10^8	0

2) 試験に用いるシート・クロスの種類、それに含まれる消毒薬における効果

オーバーテーブル 2 種類 (メラミン加工製品、合成樹脂製品 : 両方ともフランスベッド製) と清拭に使用するシート (3M 製)、それに滅菌水を含ませたシート、同じく 0.01% 塩化ベンザルコニウムをフクマセタシート、SARAYA 環境清拭クロス (SARAYA 製) の 4 種類を組み合わせそれぞれの清拭におけるテストフィールド T1 から T4 における菌数を測定した結果が表 2 である。

表 2 オーバーテーブル材質と形状、使用するワイプにおける各テストフィールドにおける菌数

オーバーテーブルの種類		メラミン塗装(平滑面)：フランスベッド				合成樹脂(凹凸面)：フランスベッド			
テストフィールド		T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
種類	3M菌を吸着する除菌用シート(ドライ)	7960000	2030	20	0	5060000	6760	3040	2820
	3M菌を吸着する除菌用シート(+水)	10500	2020	1160	18600	1220	100	40	2160
	3M菌を吸着する除菌用シート(+0.01%塩化ベンザルコニウム)	0	0	0	0	0	0	0	0
	SARAYA環境清拭クロス(4級アンモニウム塩を含む)	0	0	0	0	0	0	0	0

表 2 をグラフ化したのが図 D である。菌数測定でゼロカウントがあったため明確にするため三次元棒グラフによる表示とした。

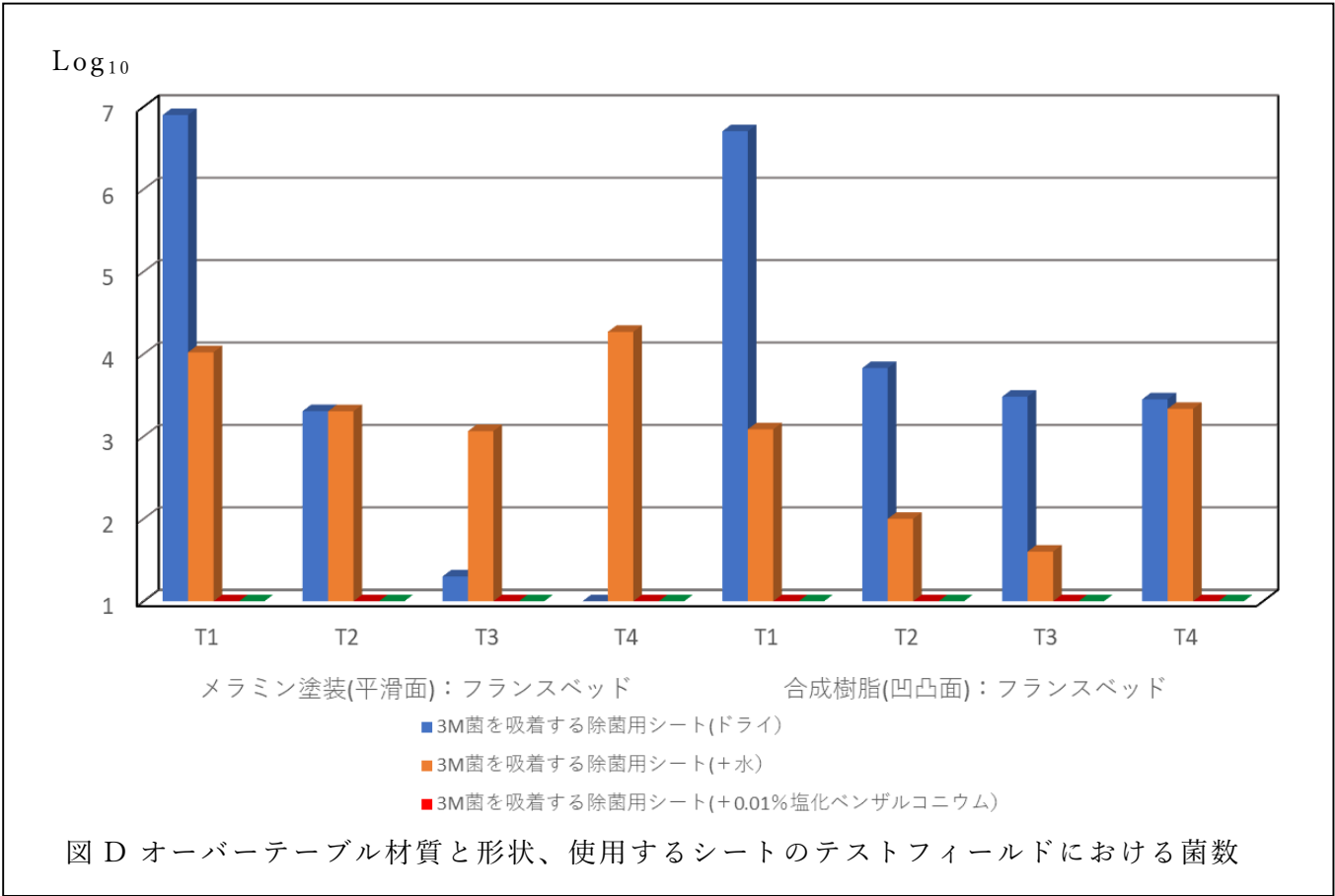


図 D オーバーテーブル材質と形状、使用するシートのテストフィールドにおける菌数

6. 結果と考察

1) 図 D をご覧になっていただきたい。グラフ左側青色棒であるが、平滑表面を持つメラミンオーバーテーブルを「3M を吸着する除菌用シート」つまりドライのシートで清拭をすすめるにつれて T1 では 796 万/CFU あった菌量は T2 では 2030 個/CFU、T3 では 20 個/CFU と劇的に減少し、ついには T4 ではゼロとなり菌は検出されなかった。これは 3M 除菌用シートが表面の不織布の隙間にかからめとられたと考えられる。吸着と言っても過言ではないが、これはシート側にどれだけ吸着されたかを検証することにより証明される。またシートの不織布の顕微鏡写真、電子顕微鏡写真による隙間間距離を測定できればと考える。

図 D の右側青色棒は凹凸の表面を持つ合成樹脂製のオーバーテーブルは推測されるように凹面

Staphylococcus aureus が残ってしまうことを示唆している。T1 で 506 万個/CFU あった菌数は T2 では 6760 個/CFU、3040 個/CFU、2820 個/CFU と微減であり、ゼロになることは難しい。表面の病室で凹凸のオーバーテーブルは上に置いたものが滑ることなく転倒することを防げるかもしれないが、凹部分に細菌やほこりが残存することが考えられる。今回綿棒によるふき取りを行ったが、このような形状の場合、完全にふき取ることは困難であると考ええる。

2) 「3M 菌を吸着するシート」に水を含ませ使用した場合左側痘橙色平滑表面を持つメラミンオーバーテーブル、合成樹脂(凹凸面)オーバーテーブルでも T1 から T2、T3 と減少するが T4 で増加していることがわかる。T1 から T4 まで 2.5kg の花崗岩引く時間は 1 秒後に T4 で減速して停止する。その際一度付着した *Staphylococcus aureus* が慣性の法則で外れてしまうのではないかと考察する。もともと不織布は原料となる繊維の種類により、その表面の電荷が異なる。その電荷が水のような極性の高い物質ではなくなってしまう可能性がある。そのため製造元である 3M 社に出来る範囲で質問することが必要と考える。今回 1 シートあたり 8.5ml の水を添加したが添加量を少なくしたり、増加したりしてその違いによる効果を検証するべきと考える。

3) 「3M 菌を吸着するシート」に消毒薬 0.01% 塩化ベンザルコニウムを水と同様に 8.5ml 添加したシート、SARAYA 環境清拭クロス(4 級アンモニウム塩)を使用した。両社とも T1 から T4 まで菌は検出されなかった。これは当然消毒薬の効果である。

4) T1 テストエリアに接種した菌量は 2.37×10^8 個/CFU である。メラミン樹脂オーバーテーブルでは T1 から T4 まで花崗岩で引いたが T1 と T2、T2 と T3、T3 と T4 の間の菌量測定は実施していない当然 T1 に接種した菌量と T1 から T4 で検出した量は合わない。よってどのくらい接種したかはあまり意味がないかもしれない。

7. 結論

医療機関病室で使われているオーバーテーブルにおける清拭について市販されているシート、クロスをそのまま、あるいは水を含ませ EN16615:2015 5.2.1 に従い検証した。その結果「3M を吸着する除菌用シート」つまりドライのシートで使用は効果がある。ただ 35cm の距離を清拭したわけであるが、実際の病室での環境清拭は往復して行うことが考えられる。そのためそのような実験も必要であるが 2.5kg 花崗岩の往復にしても U ターンして一方通行を維持して行うことは中々困難の可能性もある。検討の余地はある。

「3M を吸着する除菌用シート」に水を含ませて同様の試技を行ったがもう少し検討の余地はある。素材の材質、性質を知ったうえで検討する必要がある。

当然塩化ベンザルコニウムが含まれているシート、クロスはその消毒効果で菌は検出されなかった。消毒目的で清拭を行うのであればそのような製品、必要に応じた消毒薬を選択しシート、クロスを使用すれば良い。ただほこりや汚れを除去するのであれば「3M を吸着する除菌用シート」をドライの状況で使用すればそれらを除去することは可能であるし、付着した細菌も除去できると考える。

②除菌用シートに水を含ませて清拭時の効果

1. 研究目的

前述の①オーバーテーブルの清拭に関する問題とデータ収集の解析実験の際、3M 除菌用シートに滅菌水を含ませそれで T1 から T4 のテストフィールドを清拭した時、T1 から T3 までの菌数は減少したが、T4 のテストフィールドでは増加に転じていた。その原因を明らかにするため実験を行った。

2. 期間:2023 年 11 月 7 日～17 日

3. 試薬と機器

試験菌株は前述①と同様 *Staphylococcus aureus* ATCC6538 を使用し、試験を行うオーバーテーブルは表面をメラミン塗装したオーバーテーブル:フランスベッド社製(写真 A)を使用した。試薬、機材は①で使
用したものと同様のものを使用した。使用するシートは3M(スリーエム)の除菌用シートを上部の取り出し穴
から取り出し使用した。その他使用する各試薬、機器は前述の①と同様である。

4. 方法

シートに滅菌水を含ませるにあたり前述の写真 F に示したようにシャーレにメスピペットで 2、4、8mlとし
ーとに添加した。また滅菌水を添加しないシートをドライとした。

その他方法は①に示した方法に従った。

5. 成績

表3に各テストフィールドにおける *Staphylococcus aureus* の CFU を示す。

またそれを図にしたものを図 D に示す。

6. 結果と考察

シートのためのドライの状態での清拭は①でも示したように平滑面では劇的に表面上の細菌を減少させるこ
とが出来る。ただ滅菌水を含ませた場合2ml、4mlであると十分にシートに水分が至らずむしろ拡大させて
しまう恐れがあり、完全に清拭することは難しい。またシートに飽和した状態を作成した8mlではT1からT2、
T3と減少するが 2.5kg の花崗岩を引いて停止する T4 では一度滅菌水に取り込まれえた *Staphylococcus*
aureus が慣性の法則で離れてしまいそれが検出されたことが推察される。これは①の実験でも同様であっ
た。

7. 結論

M 菌を吸着する除菌用シートはドライの状態で清拭に使用する際は十分に効果が期待できる。ただ最近、水を含ませた方が効果あると言われているが含まれる水の量により違いがある事と清拭の仕方、つまり清拭は最後に止めなくてはならない。その時一度シートについた細菌が外れる可能性がある。また ONE WAY が原則であるが清拭の実際は往復で清拭することが多いので水を過剰に含ませることは細菌の汚染を拡大させてしまう恐れがある。

よって3M 除菌用シートはドライの状態で使用すべきである。または適正な消毒薬を含ませて使用すべきである。

表3 テストフィールドの菌数

(単位:CFU)

	メラミン塗装(平滑面): フランスベッド			
	T1	T2	T3	T4
3M菌を吸着する除菌用シート(ドライ)	27200000	11200	14800	18
3M菌を吸着する除菌用シート+滅菌水 2ml	9380000	172000	14600	432000
3M菌を吸着する除菌用シート+滅菌水 4ml	9020000	238000	236000	186000
3M菌を吸着する除菌用シート+滅菌水 8ml	2800000	84200	3040	25000

