

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590519
 研究課題名（和文） セレウス菌による血流感染症アウトブレイクの研究：原因の解明と対策の確立
 研究課題名（英文） An Outbreak of *Bacillus cereus* Bacteremia: Examination and Control
 研究代表者
 林 俊治 (HAYASHI SHUNJI)
 自治医科大学・医学部・講師
 研究者番号：40260765

研究成果の概要：2006年の夏に自治医科大学附属病院で発生したセレウス菌による血流感染症アウトブレイクの解析を行ったところ、リネンタオルおよびシーツの高度セレウス菌汚染がこの事例の重要な要因であったことが判明した。具体的には、タオルを汚染していた菌が医療従事者の手指を介して輸液に混入し、輸液の中で増殖した菌が患者の血液に入ることにより、今回のアウトブレイクが発生したと考えられる。この解析結果に基づき、リネンおよび医療従事者の手指からのセレウス菌の除去、輸液の安全管理の徹底などの対策を行ったところ、セレウス菌による血流感染症の発生は終息した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・医療社会学

キーワード：病院管理学、セレウス菌

1. 研究開始当初の背景

2006年4～8月において、自治医科大学附属病院において、*Bacillus cereus* (セレウス菌) による血流感染症のアウトブレイクと思われる複数の症例が認められた。具体的には、この期間に患者血液よりセレウス菌が検出された症例が24例あった。このうち、間違いなく菌血症と診断できた症例が10例あり、その中から2例の死亡例、1例の失明例が出た。

セレウス菌による菌血症例が出た病棟の調査を行ったところ、リネン（タオルおよびシーツ）から大量のセレウス菌が検出された。さらに、輸液からもセレウス菌が分離された。

セレウス菌は環境中に広く存在する芽胞産生菌であり、食中毒の起因菌として知られている。免疫抑制状態の患者に対して、セレウス菌が稀に菌血症・眼房炎を起こすことは知られていた。しかし、医療施設におけるセレウス菌による血流感染症のアウトブレイクは極めて稀である。

トブレイクが確認されたのは、国内では今回の事例が初めてである。

したがって、セレウス菌によるアウトブレイクについては、不明な点が少なくなく、具体的な予防策、発生時の対策などについては、ほとんど参考にすべき文献がない。そこで、我々は今回の事例を科学的に解析し、類似例の再発を防ぐための方法を確立する必要があると考えた。

2. 研究の目的

(1) アウトブレイクの解析

自治医科大学附属病院におけるセレウス菌血流感染のアウトブレイクの解析を行う。特に、リネンおよび輸液のセレウス菌汚染を中心に環境調査を行い、菌の汚染源および伝播ルートを解明する。

(2) リネンのセレウス菌汚染の定量法の確立

タオルやシーツなどの布地の細菌汚染を定量測定するための標準法は確立されていない。そこで、リネンのセレウス菌汚染を測定するために、どのような方法で菌を布地から抽出し、どのような培地を用いて菌を培養すればよいかを検討する。

(3) リネンのセレウス菌汚染の多施設調査

自治医科大学におけるリネンのセレウス菌汚染が特殊なものであるか否かを確認する目的で、複数の医療施設を対象にタオルのセレウス菌汚染調査を行う。

(4) 手指からのセレウス菌除去方法の検討

セレウス菌は芽胞産生菌であり、消毒薬に対して強い抵抗力を持つ。したがって、手指がセレウス菌に汚染された場合、それを取り除くことが難しい。そこで、我々は手指よりセレウス菌を除去する方法の検討を行った。

(5) リネンからのセレウス菌除去方法の検討

セレウス菌は芽胞産生菌であり、消毒薬に対して強い抵抗力を持つ。したがって、リネンがセレウス菌に汚染された場合、それを取り除くことが難しい。そこで、我々はリネンよりセレウス菌を除去する方法の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) アウトブレイクの解析

自治医科大学附属病院において、セレウス菌血流感染のアウトブレイクが起きた際に、菌血症と診断された症例の精査を行った。この結果から、どのような因子を持つ患者にセ

レウス菌の菌血症が起きていたかを分析し、危険因子のリストアップを行った。

次に、病院内のセレウス菌汚染の環境調査を行った。特に、菌血症例が出た病棟で使用されていたリネンおよび輸液を中心に環境調査を行った。

患者由来菌株および環境由来菌株の遺伝子をパルスフィールド電気泳動法 (PFGE) によって解析することで菌株の遺伝的異同を調べた。この結果から菌の汚染源および伝播ルートの解析を行った。

(2) リネンのセレウス菌汚染の定量法の確立

セレウス菌に汚染されたタオルを材料にして、汚染の定量法の検討を行った。具体的には、タオルを培地に押し付けるスタンプ法、タオルを綿棒で擦過することで菌を採取するスワブ法、タオルの断片と生理食塩水を入れた試験管を震盪することで菌を抽出する単純抽出法、タオルの断片と生理食塩水の他にガラスビーズを試験管に入れ震盪することで菌を抽出するビーズ抽出法の比較を行った。

また、セレウス菌の培養に適した培地の比較検討も行った。具体的には、血液寒天培地、MYP 寒天培地、NGKG 寒天培地、PEMBA 寒天培地の比較評価を行った。

(3) リネンのセレウス菌汚染の多施設調査

北海道の医療施設 10 箇所および関東の医療施設 10 箇所より、1 年間にわたって毎月タオルおよびシーツを送ってもらい、これらを汚染しているセレウス菌の量を測定した。これによって、施設間の汚染の違い、気温と汚染の関係を調べた。さらに、各施設のリネン洗濯方法を調べることで、どのような場合に、リネンのセレウス菌汚染が起きるのかを解析した。

(4) 手指からのセレウス菌除去方法の検討

人為的にセレウス菌で汚染した手指を様々な方法で洗浄・消毒した後、手指に残存しているセレウス菌の量を測定した。具体的には、アルコールによる消毒、アルコールジェルによる消毒、手指用洗剤による洗浄、消毒剤入り手指用洗剤による洗浄を行い、それぞれの方法によるセレウス菌除去効率の比較を行った。

(5) リネンからのセレウス菌除去方法の検討

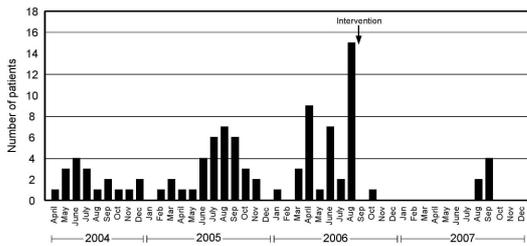
セレウス菌で汚染されたタオルおよびシーツを様々な方法で洗浄・消毒した後、残存しているセレウス菌の量を測定した。具体的には、オートクレーブによる滅菌、アルコールによる消毒、塩素系消毒薬による消毒、各種家庭用洗剤による洗浄を行い、それぞれの方法のセレウス菌除去効率の比較を行った。

4. 研究成果

(1) アウトブレイクの解析

自治医科大学附属病院にて、血液からセレウス菌が分離された全症例の解析を行った。その結果、アウトブレイクが起きた 2006 年以前にも血液培養でセレウス菌が陽性であった症例は少なくなく、特に夏期に症例数が増加する傾向が認められた。この結果はセレウス菌陽性例の数と気温が密接に関連していることを示している。

図1 血液からのセレウス菌分離症例数



血液培養でセレウス菌が陽性であった症例の中から、菌血症と確定診断された 10 例の精査を行ったところ、大腸癌の 1 症例を除き、明確な免疫抑制状態にあった患者はいなかった。また、特定の病棟に患者が多発している傾向が認められた。共通点としては、全ての患者が静脈内留置カテーテルを用いており、抹消静脈輸液がセレウス菌による菌血症の重要な発症要因であったと考えられる。

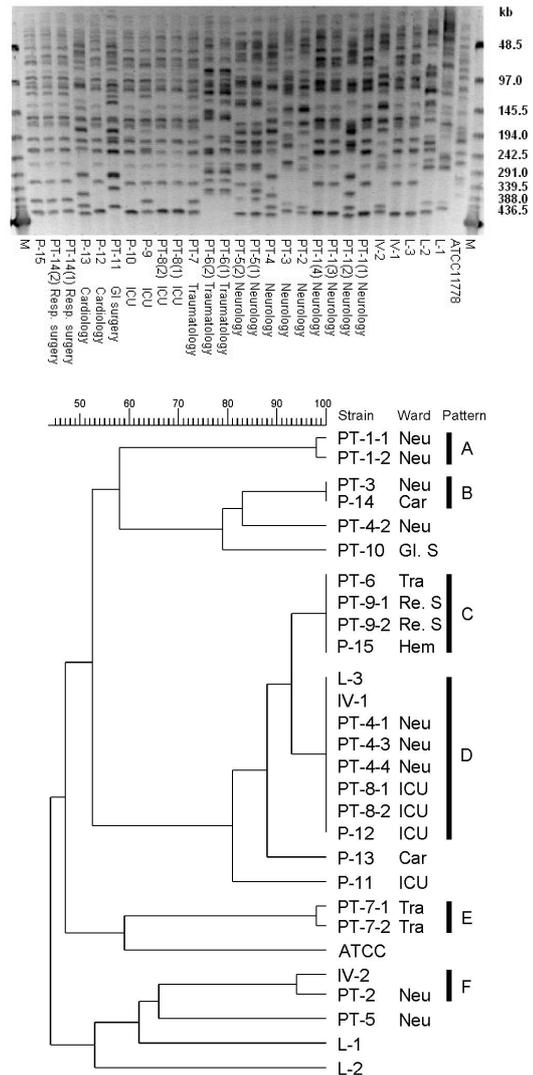
病院内のセレウス菌汚染の環境調査では、様々な場所からセレウス菌が分離されたが、特にタオルおよびシーツから大量のセレウス菌が分離された。また、セレウス菌による菌血症と診断された患者に投与されていた輸液の中からもセレウス菌が分離された。以上の結果から、今回のアウトブレイクの原因となったセレウス菌汚染源はリネンであり、リネンを汚染していた菌が手指などを介して輸液に混入し、それが血液の中に侵入したのだと考えられる。

次に、我々の施設がリネンの洗濯を依頼している洗濯業者の洗濯機の汚染調査を行った。この洗濯機は業務用の大型のものであり、連続式洗濯機と呼ばれるものであった。この洗濯機は、洗いや濯ぎに用いる水を再利用することで、洗濯に必要な水を節約できる構造を持っている。この洗いや濯ぎに用いられていた水を採取し、検査を行ったところ、大量のセレウス菌が分離された。

以上の結果に基づき、汚染タオルを全てオートクレーブで滅菌し、洗濯機内部の洗浄を行い、洗濯機を運用する際の水の再利用を止めた。以上の対策後は、患者血液からセレウス菌が分離される例は激減した。

患者由来菌株およびリネン由来菌株の遺伝子を PFGE によって解析したところ、リネン由来菌株のほとんどは異なる遺伝パターンを示した。この結果は、我々の施設で用いていたタオルが極めて多様なセレウス菌の集団に汚染されていたことを示している。一方、患者から分離された菌株は同じパターンを示す菌株が多く、6 つの遺伝パターンに分けられた。この結果は、セレウス菌の中でも血流感染を起こしやすい株が存在することを示唆している。

図2 セレウス菌株の PFGE 解析と系統樹



PT: 患者由来株、IV: 輸液由来株、L: リネン由来株。患者由来株は A~F の 6 つの遺伝パターンに分けられた。パターン D の菌株はリネンからも輸液からも分離された。

(2) リネンのセレウス菌汚染の定量法の確立

リネンのセレウス菌汚染の定量法として、スタンプ法、スワブ法、単純抽出法、ビーズ抽出法の比較を行ったところ、スタンプ法は

培地上に出現する細菌コロニーが密集しすぎるために、汚染の正確な定量評価には不適であった。スワブ法は抽出法に比べ、検出菌量のはるかに小さかった。抽出法の中では、ビーズ抽出法の方が検出菌量が大きかった。この結果は、人工的に作成した汚染タオルを用いた検討でも、実際に病棟で使用されていた汚染タオルを用いた検討でも、同様に認められた。

図3 人工的汚染タオルを用いた検討

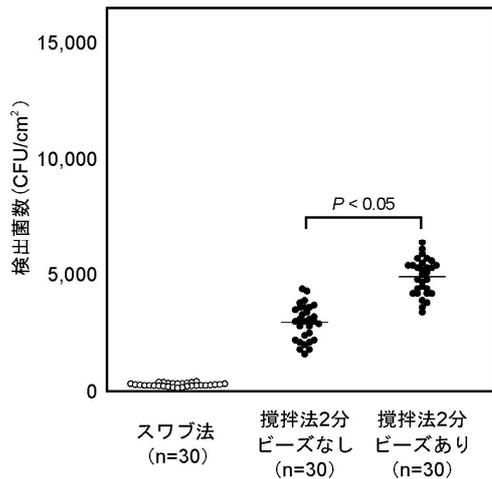
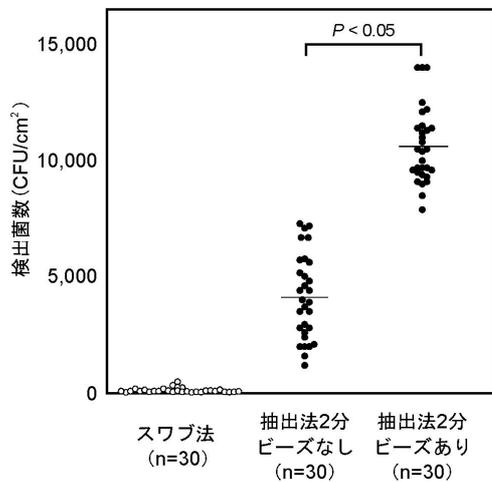
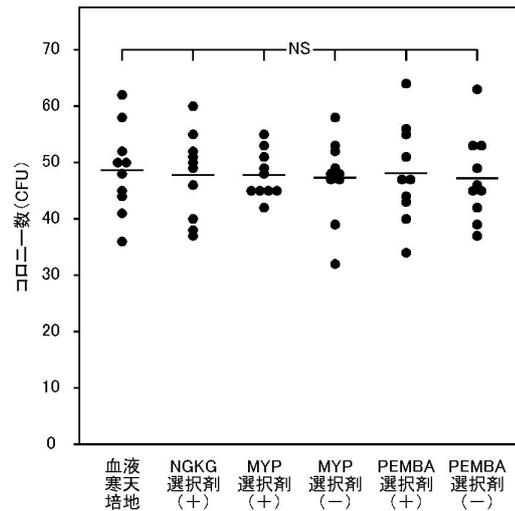


図4 病棟で使用のタオルを用いた検討



セレウス菌の培養に適した培地として、血液寒天培地と3種類の選択培地：MYP寒天培地、NGKG寒天培地、PEMBA寒天培地の比較評価を行ったところ、培地上に出現してくる細菌コロニーの数は、どの培地でもほぼ同じであった。ただし、選択培地上でセレウス菌は特徴的なコロニーを形成するので、菌の判別という点では、選択培地の方が優れていた。

図5 各培地上のコロニー数の比較



(3) リネンのセレウス菌汚染の多施設調査

北海道の医療施設10箇所および関東の医療施設10箇所より提供してもらったタオルおよびシーツの細菌汚染を調査したところ、どの医療施設でも、汚染のレベルは違うが、セレウス菌の汚染は認められた。汚染菌量は夏期に多く、冬期に少ない傾向が認められた。この結果はリネンのセレウス菌汚染に気温が密接に関連していることを示している。

図6 多施設由来タオルのセレウス菌汚染

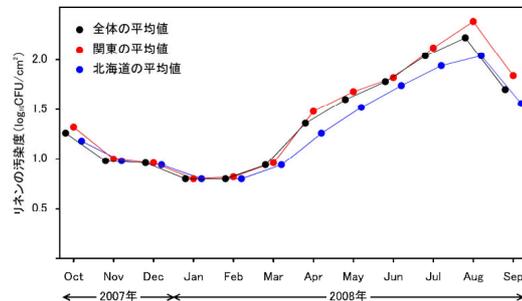
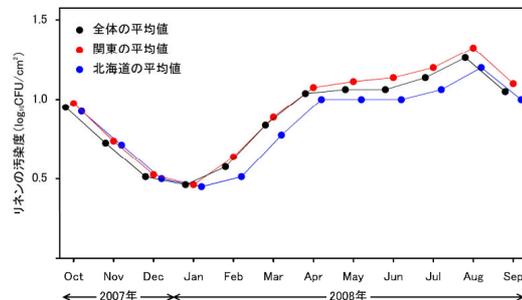


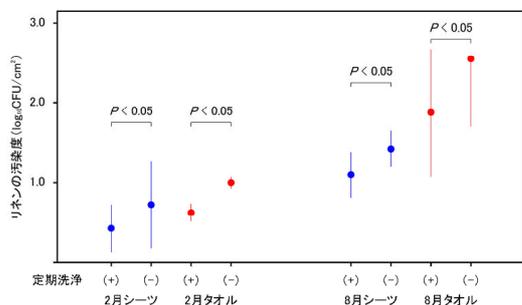
図7 多施設由来シーツのセレウス菌汚染



また、定期的に内部の洗浄を行っている洗濯機で洗われたリネンはセレウス菌の汚染量が明らかに少なかった。したがって、洗濯

機の内部を定期的に洗浄していれば、リネンのセレウス菌汚染を抑制することができ、セレウス菌による院内感染を制御できると考えられる。

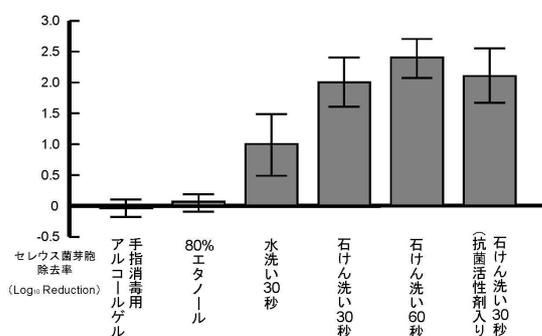
図8 洗濯機の定期洗浄とリネン汚染



(4) 手指からのセレウス菌除去方法の検討

人為的にセレウス菌で汚染した手指を様々な方法で洗浄・消毒し、セレウス菌除去効果を比較したところ、アルコール系消毒薬は、ほぼ無効であった。一方、手指用洗剤による洗浄は菌の除去に有効であった。特に、長時間の手洗いが有効であった。また、洗剤に含まれる消毒薬にも効果は認められなかった。セレウス菌は各種消毒薬に強い耐性を示す菌である。したがって、手指からセレウス菌を除去するためには、消毒薬の使用よりも洗剤による物理的除去の方が有効なのと思われる。

図9 手指からのセレウス菌除去方法

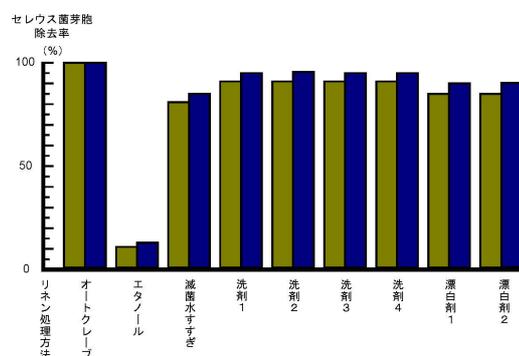


(5) リネンからのセレウス菌除去方法の検討

セレウス菌で汚染されたタオルおよびシーツを様々な方法で洗浄・消毒し、セレウス菌の除去効果を比較した。当然のことだが、オートクレープで滅菌したタオルからは、セレウス菌が全く検出されなかった。一方、アルコール消毒はほぼ無効であった。しかし、単なる水洗いはセレウス菌の約8割を除去することができた。さらに、洗剤を用いて洗うと、セレウス菌の約9割を除去することができた。したがって、リネンからセレウス菌を除去するには、消毒薬の使用より、洗剤によ

る物理的な除去の方が有効であると思われる。さらに、この結果は、洗濯機がセレウス菌に汚染されていないければ、リネンのセレウス菌汚染も起こらないことを示唆している。

図10 リネンからのセレウス菌除去方法



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① 林俊治, 笹原鉄平, 吉村章, 森澤雄司, 高岡恵美子, 平井義一. *Bacillus* 属によるリネン汚染を解析するための培地の比較検討. 臨床検査 53: 501-506, 2009. 査読有
- ② 笹原鉄平, 林俊治, 森澤雄司. *Bacillus cereus* (セレウス菌) が医療現場に与える影響とその対策. ホスコム 5: 1-6, 2008. 査読無
- ③ 笹原鉄平, 林俊治, 森澤雄司. セレウス菌 (*Bacillus cereus*) 一見逃していませんか? その発熱の原因一. INFECTION CONTROL 17: 1076-1080, 2008. 査読無
- ④ 磯貝恵美子, 西川武志, 磯貝浩, 磯貝なゆた, 榎林陽一, 林俊治. 家庭内における除菌のための手洗い効果と環境表面からの細菌の検出. 環境感染 22: 175-180, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

- ① 林俊治, 平井義一. 医療施設で使用されているリネンのセレウス菌汚染調査. 第82回日本細菌学会総会, 名古屋, 2009年3月12-14日.
- ② 林俊治, 笹原鉄平, 吉村章, 森澤雄司, 平井義一, 伊藤千代子, 野沢寿美子, 斉藤由利子, 神田直美, 星亮次, 角田芳江. 複数の医療施設を対象としたリネンのセレウス菌汚染調査. 第24回日本環境感染学会総会, 横浜, 2009年2月27-28日.

- ③ 笹原鉄平, 林俊治, 吉村章, 森澤雄司, 平井義一. 洗淨方法の違いによるセレウス菌汚染リネンからの芽胞除去効果の比較検討. 第 24 回日本環境感染学会総会, 横浜, 2009 年 2 月 27-28 日.
- ④ 林俊治, 笹原鉄平, 吉村章, 森澤雄司, 高岡恵美子, 平井義一. リネンのセレウス菌汚染の解析方法の検討. 第 23 回日本環境感染学会総会, 長崎, 2008 年 2 月 22-23 日.
- ⑤ 笹原鉄平, 林俊治, 森澤雄司, 平井義一. *Bacillus cereus* に汚染された手指の衛生管理方法の検討. 第 23 回日本環境感染学会総会, 長崎, 2008 年 2 月 22-23 日.
- ⑥ Sasahara T, Morisawa Y, Yoshimura A, Hayashi S, Gomi H, Hirai Y. Nosocomial outbreak of *Bacillus cereus* bloodstream infection caused by highly contaminated linens, The 107th General Meeting of American Society for Microbiology, Tronto, May 21-25, 2007.

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 俊治 (HAYASHI SHUNJI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：40260765

(2)研究分担者

平井義一 (HIRAI YOSHIKAZU)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00127581

森澤 雄司 (MORISAWA YUJI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70302685