

[原 著]

Bacillus cereus による偽アウトブレイクと清拭タオルの管理について井沢義雄¹⁾・伊藤 誠²⁾¹⁾ 医療法人豊田会刈谷総合病院・臨床検査科²⁾ 医療法人豊田会刈谷総合病院・病理・検査医学科

(平成 16 年 8 月 23 日受付, 平成 17 年 4 月 25 日受理)

当院は、2002 年夏季から秋季にかけて *Bacillus cereus* による偽アウトブレイクを経験した。血管内留置カテーテル使用中の患者動脈血、留置カテーテルより *B. cereus* を検出した。誘因は、清拭タオルの不適切な運用により *B. cereus* が常温で高濃度に繁殖、患者の皮膚に付着し血液培養採血時、または末梢静脈留置カテーテル施行時に汚染し検知されたものと考えられた。遠因としては、この時期の増改築工事による建物の取り壊しの際に土壤汚染菌である *B. cereus* が病院環境に影響を与えた可能性がある。今回 *B. cereus* が特に多く分離された理由は、清拭車による通常の 60~75°C の加湿処理では清拭タオル中の芽胞をほとんど殺菌できること、また血液採取時のアルコール消毒にも芽胞は、耐性を示したことなどが考えられる。清拭タオル用に納入された乾燥タオルは、汚染状態にあり、それは、*B. cereus* を主とした数種類以上の *Bacillus* 属などのグラム陽性桿菌で、その菌量は年間を通じ清拭タオルの使用状態で、10³~10⁴ CFU/ml レベルであった。追跡調査からは、ある病棟で血液培養の汚染菌として、*B. cereus* を検出したとき、清拭タオルからは、約 1.5×10⁴ CFU/ml の菌量を検出していた。清拭タオルの適切な管理が日本において特徴的な看護技術とされている清拭にとって重要である。

Key words: *Bacillus cereus*, 芽胞菌, 清拭, 清拭車

序 文

Bacillus cereus は、芽胞形成性のグラム陽性桿菌で土壤や水系環境に広く分布する環境微生物である。腸管毒素産生株による食中毒事例を除けばヒトの病原菌となることは極めて希である。しかし、*B. cereus* はコアグラーゼ陰性ブドウ球菌などとともに血液培養で汚染菌としてしばしば分離される細菌である^{1), 2)}。血液培養で *Bacillus* 属が検出される頻度は、厚生労働省の院内感染対策サーベイランスのデータでは全国平均検出率 3~4% であり、そのほとんどは検体採取時の汚染菌と認識されている。*Bacillus* 属などの芽胞は、アルコール消毒、高温蒸気、低濃度の次亜塩素酸ナトリウムに抵抗性を示すため、海外では、アルコール綿、

リネン類の汚染菌として病院での偽アウトブレイクが報告されている^{3)~5)}。

当院では、2002 年 8, 9 月の 2 カ月間に 6 名の血管内留置カテーテル使用中の患者動脈血、留置カテーテルより *B. cereus* が検出されたことにより、安全環境管理室の ICT (Infection Control Team) による原因調査のためのサーベイランスが実施された。この予見的、積極的な患者サーベイランスにより多数の *B. cereus* 検出例を認め、血液培養や血管内留置カテーテルの使用に伴う汚染菌の混入が考えられた。今回の事例では、血液培養検体や留置カテーテルからの菌の検出を招くも、重篤な敗血症に至った例を認めず、環境菌による血液培養材料（検体）の汚染に基づく偽アウトブレイクに相当すると判断した⁶⁾。

清拭は、日本における特徴的な看護技術であり清拭、および清拭タオルに関して、Centers for Disease Control and Prevention (CDC) の具体的な推奨項目はない⁷⁾。本稿の目的は、実施した微生物学的調査の中より、①偽アウトブレイクの状況を明らかにすること、②*B. cereus* およびその類縁菌による清拭タオル

著者連絡先: (〒448-8505) 刈谷市住吉町 5-15

医療法人豊田会刈谷総合病院・

臨床検査科

井沢義雄

TEL: 0566-25-2946 (検査受付)

FAX: 0566-25-8216

E-mail: kensa-jyoho@ad.kariya-gh.or.jp

と汚染との関係を明らかにすること、③適切な清拭タオルの運用と管理について報告することである。

I. 材料と方法

1. 対象

2002年1月から2003年12までの期間、血液培養および血管内留置カテーテル先端部培養からの *B. cereus* 検出状況について検討した。また外部業者から納入された納入直後および1日保管後の乾燥清拭用タオル、病棟等で使用を可とした湿潤タオルの菌種および菌量について約1年間、毎月検討した。さらに清拭用タオルの保管状態の違いによる菌種、菌量の変化および清拭車と清拭タオル中の菌の関係についても検討を行った。

なお、当院での清拭タオルは外部委託業者より洗浄殺菌された乾燥タオルとして搬入され、翌朝、院内の洗濯室にてタオルローリング器により、湿潤なおしづり様のタオル（以下、おしづり様タオル）とされ、各病棟の材料準備室に搬入、保管されていた。本事例以前には乾燥状態で最長3日、また病棟でおしづり様タオルになった状態でも数日（最長3日）の常温保管期間が許容されていた。

2. タオルからの菌の分離培養・同定法

1) タオルからの菌の分離

調査に使用したタオルは、乾燥タオル、おしづり様タオル、清拭車による蒸気処理をして条件付けされたタオルなどで、いずれも各条件、各状態で20枚以上のタオルを用意した中から無作為に抽出しサンプルとした。毎月1回、約1年間調査をしたものについては結果が二重試験、それ以外の調査については結果が三重試験となるようにした。それぞれの結果から平均を求めた。また、タオルの各状態での水分量をほぼ一定にするために、清拭車による処理を施した使用直前のタオルの平均重量、200gを基準とし、乾燥タオルのサンプルに対しては、200gになるように一定量の滅菌水を添加した。他のサンプルはタオルの重量差が10%以上になる場合のみ滅菌水で調整した。そして、タオルを清潔、未使用のビニール袋の中に入れ外側より揉み水分を十分に混和、その後袋内でタオルの水分を搾り出し、菌浮遊液とした。

2) 培養・同定

平板培養は、菌浮遊液中より30μlをヒッジ血液寒天培地（日本水製薬）、およびドリガルスキー改良培地（日本水製薬）にそれぞれ滴下し、コンラージ棒を用いて均等に広げ、37°Cで2日間好気培養した後、さらに室温にて2日間培養した。その後、発育コロニー数を

数え、すなわち、菌の濃度 (CFU/ml) を求めた。

$$\text{菌の濃度 (CFU/ml)} = \frac{X \times 1000}{30}$$

X: ヒッジ血液寒天培地上でカウントしたコロニー数

液体培養は、TGC（チオグリコレート）半流動培地（日本水製薬）9mlに対して、1mlの菌浮遊液を添加し培養液とした。なお菌種の同定にはアピ50CHB、アピ20E（日本ビオメリュー）を用いた。

3) 乾燥タオルに潜在する芽胞の確認

乾燥タオルは、1日保管後に使用されることを考慮し、納入直後の乾燥タオル20枚を未使用のビニール袋に入れ外気が侵入しないように密閉したものを3個用意し、①冷蔵庫（約4°C）、②室温（約15~22°C）、③孵卵器（約37°C）、にそれぞれ24時間保管した。これらのタオルから先述したと同様の手順により菌浮遊液を作製し、20ml用の大試験管を用いて液体培養液の状態にした。その後、それぞれの大試験管に65°C 35分の加熱処理を実施した。この加熱処理によっても死滅しなかったグラム陽性桿菌を発芽せず残った芽胞とした⁸⁾。そして、加熱処理後の大試験管中の培養液より30μlをサンプリングし、先述した平板での培養手順に従い培養した。発育したコロニー数を数え、液体培養で発芽せずに残り平板培養で発育した芽胞の濃度 (CFU/ml) を求めた。

II. 結 果

1. 偽アウトブレイクの前後で血液、血管内留置カテーテルから検出された *B. cereus*

2002年1月から2003年12までの期間の検出を患者単位で調査した。*B. cereus* の偽アウトブレイクは急性期病院（病床数607床）の当院で、2002年8、9月にその兆候があり、10月には、安全環境管理室下での患者調査の対象となった末梢静脈留置カテーテル施行者の多い脳神経外科、神経内科病棟入院患者を中心に動脈血、血管内留置カテーテルから *B. cereus* 陽性者が多数認められた。2002年10月下旬より先行的にカテーテル留置期間の短縮、2003年2月より清拭タオルの運用改善を試行的に行い、その結果、2003年の血液培養での *B. cereus* 検出率は1.1%（2003年9月、2例）に低下した（図1）。次に、2003年2月から実施した清拭タオルの運用の具体的な改善点をまとめた。まず、洗濯時の消毒法は、当院の外部委託業者に次のように依頼した。次亜塩素酸ナトリウムの濃度が0.04%になるよう調整された80°Cの熱湯で10分間消毒し、そのまま洗濯機による洗浄サイクルに通

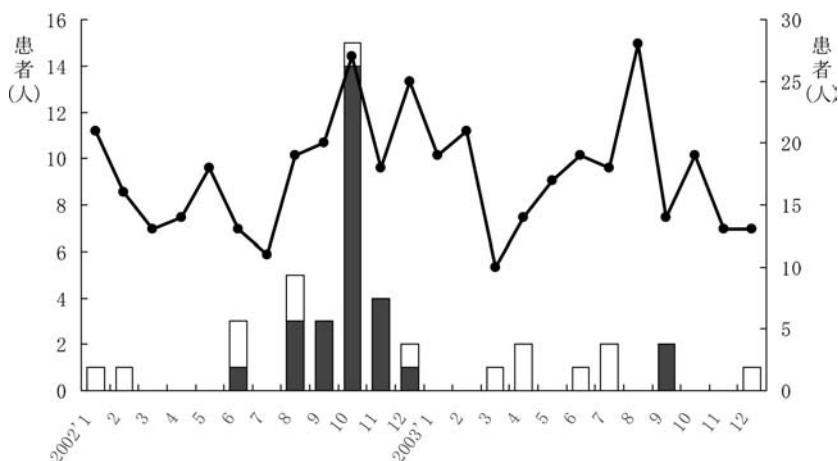


図1 ICT介入前後の血液、血管内留置カテーテルからの*B. cereus*の検出
右軸: —●—血管内留置カテーテルまたは血液培養陽性の全患者数
左軸: *Bacillus*属による血管内留置カテーテルまたは血液培養陽性患者数
■: *B. cereus*, □: *Bacillus*属
当院の抗酸菌を除く月間の細菌培養依頼患者数は約350名(2002年の実績)。

す。その後100°Cの熱風で乾燥を施す。次に、病棟でのおしぶり様タオルの作り置きの制限をした。偽アウトブレイク当時、休日前におしぶり様タオルを病棟に配布していたが、休日中に細菌が増殖することから、このタオルの作り置きを禁止し、当日作製分のみを使用可とした。ただし、ICUはおしぶり様タオルでの保管は禁止し、乾燥タオルを保管し、清拭車利用時におしぶり様にすることとした。そして、清拭タオルの蒸気殺菌処理の改善を施した。一般病棟においては、清

拭車の電源を投入し最高温度に達してから2時間経過後の清拭タオルを使用可とした。また、ICUでは、清拭車による100°C、2時間の蒸気殺菌を実施後の清拭タオルを使用可とした。

2. 清拭タオルから検出される菌

1) 乾燥タオルに潜在する菌量と菌種

2003年5月から翌年4月までの乾燥タオルの汚染菌量の推移を提示した(図2)。年間を通じ全体として、 $10^3\sim10^4$ CFU/mlの菌量があった。納入日の菌

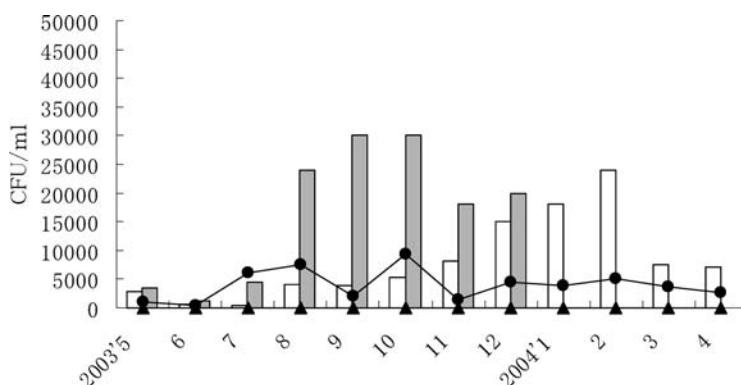


図2 2003年5月から2004年4月までの乾燥タオル、清拭(使用)タオルの菌量
■: 乾燥タオル: 納入日の菌量
■: 乾燥タオル: 1日保管後の菌量
●: 使用タオル: モニター病棟の菌量
▲: 使用タオル: ICUの菌量

量は、秋季より増加傾向を示し、冬季に、 10^4 CFU/ml レベルとなり春夏季より増加する傾向を示した。また、乾燥タオルは納入後、院内の洗濯室での保管中に1日で、冬季の温度、湿度で2~3倍、夏季は同様に10倍近く増殖していた。2003年9月のデータより、湿度65~80%、温度25~29°Cで納入時の乾燥タオルの菌量 3.8×10^3 CFU/ml は、1日保管後に、 3.0×10^4 CFU/mlとなっていた。乾燥タオル1日保管後の2004年1月以降は調査をしなかった。なお、同時に行った官能試験では、ほとんど無臭、わずかな臭いはあるがいやな匂いではないという結果だった。乾燥タオルの保管場所は年間を通じて、温度約20~26°C、湿

度約55~85%であった。

検出された菌種は、*B. cereus*, *B. subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* (推定, Type strainとのDNA/DNA hybridization未確認)、およびその類縁菌を検出した。*B. cereus*は最も多かった。上記の3種類の菌は、月1回、約1年間の調査期間中、乾燥タオルからほとんど毎月確認された。

2) ICU、病棟で使用を可とした清拭タオルからの検出菌

ICUで利用される清拭タオルは、2003年5月より清拭車による100°C、3時間の蒸気殺菌に実施変更した。これ以来、*Bacillus*属の検出が、ほぼ皆無となっ

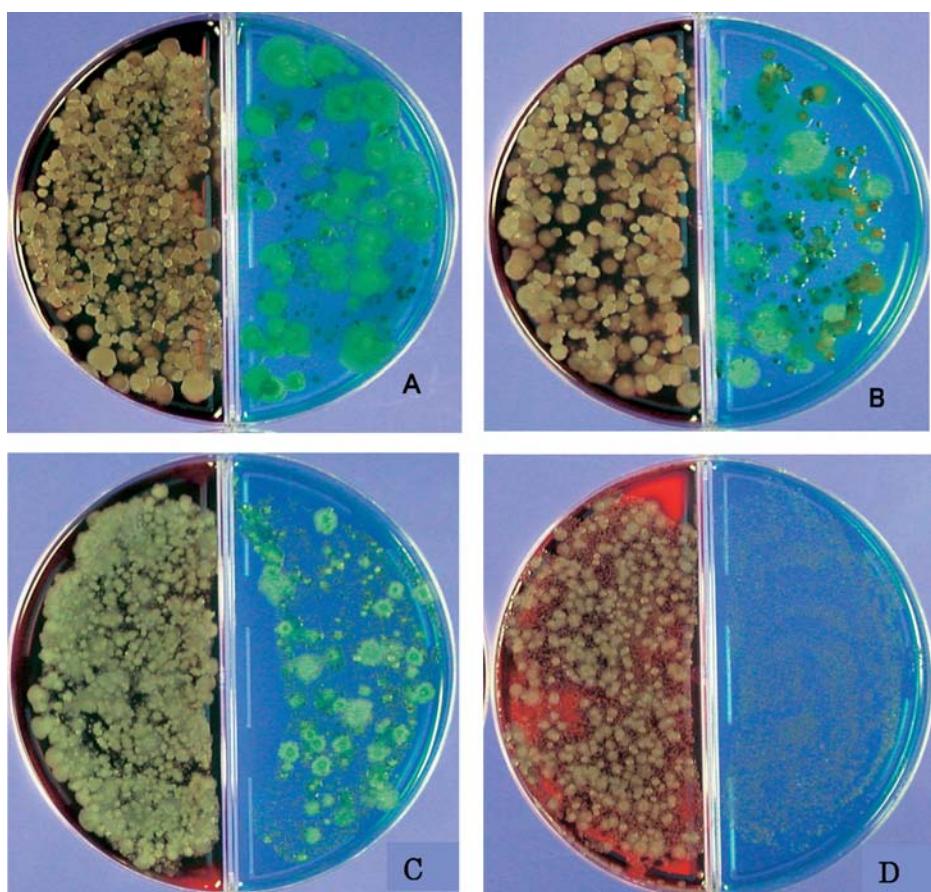


図3 おしぶり様タオルの室温放置日数の違いにより増殖、変化した菌叢
培地はヒツジ血液寒天培地/ドリガルスキー改良培地(日水製薬)。

- A) 乾燥タオルをおしぶり様にした直後で、グラム陽性桿菌以外は確認ができなかった。
- B) おしぶり様状態の1日経過後で、黄色いムコイドコロニーは *P. polymyxa* (推定)。
- C) 2日経過後に微小なブドウ糖非発酵菌を背景に多数認めた。
- D) 3日経過後はグラム陽性桿菌よりブドウ糖非発酵菌が急増し優勢となった。D)からはこのときブドウ糖非発酵菌を3種類確認した。

た。また、一般病棟のモニターとした病棟の清拭車は、当院で標準的に利用している機種であり温度 75°C で持続的に蒸気加温し、一度も 100°C にならないものである。結果は、年間を通じて $5.0 \times 10^2 \sim 9.3 \times 10^3$ CFU/ml であった(図 2)。この病棟で 7, 8, 10 月に使用タオルの菌量が乾燥タオル(1 日保管後)より多いのは、保管中の高温多湿が菌の増殖を促進させ、その後の清拭車による殺菌量を上回ったためと考えられた。おしほり様タオルを保管したこの病棟の材料準備室は年間を通じて温度約 21~26°C、湿度約 50~76% であった。

3) おしほり様タオルが室温保管された時に検出される菌の推移

乾燥タオルをおしほり様タオルにした直後では、*Bacillus* 属およびその類縁菌が約 6.6×10^3 CFU/ml 存在し、その後 2 日間で、約 10 倍に増加した。3 日目では潜在していたと考えられるブドウ糖非発酵菌が 10^5 CFU/ml 以上と急増し、高濃度汚染状態を示した(図 3)。保管場所の温度は約 16~21°C、湿度約 45~60% であった。

4) 清拭車と清拭タオル中の菌の関係

まず、清拭車の温度コントロールの違いによる、蒸気加温後の清拭タオルの菌量は、100°C で連続蒸気加温できる機種では、菌はほぼ死滅したが、60~75°C

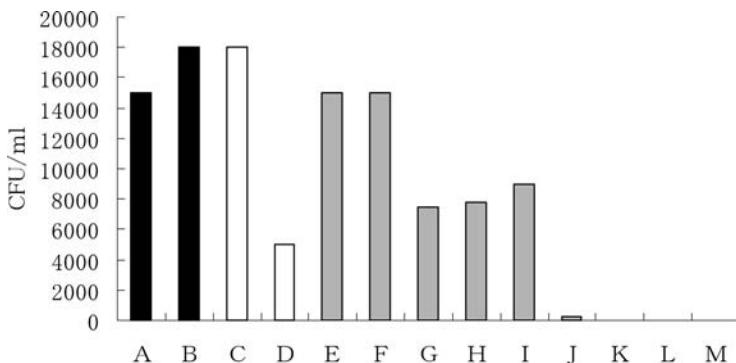


図 4 清拭車の温度コントロールの違いによる蒸気加温後の清拭タオルの菌量

清拭車の機種による電源投入後の温度変化は以下のとおりである。

A, B の機種: 95°C まで上昇、その後約 60°C になるまで下降する。

C, D の機種: 100°C を 40 分間維持し、その後約 70°C になるまで下降する。

E, F, G, H, I の機種: 75°C まで上昇、その後 75°C を継続的に維持する。

J, K, L, M の機種: 100°C を連続維持。

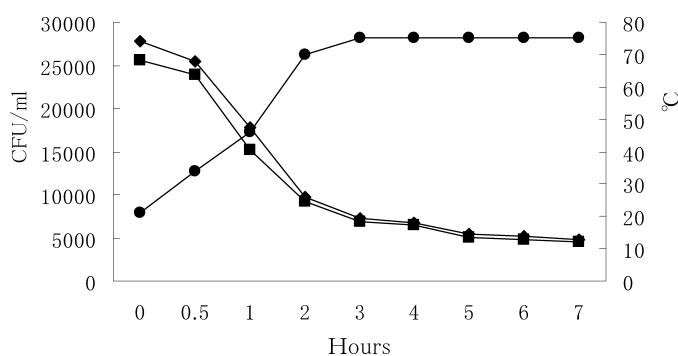


図 5 清拭車の電源投入後の温度変化と清拭タオルの菌量の経時的変化

—●— 右軸: 清拭車庫内の温度変化

—◆— 左軸: 菌量の推移 1 回目

—■— 左軸: 菌量の推移 2 回目

の範囲での蒸気加温を標準とする機種では、 $10^3\sim10^4$ CFU/ml の菌量が確認された（図4）。データは清拭車の加温能力と投入されるタオルの本数および投入位置、配列、蒸気として対流する水分量により、2~3割変動した。次に、清拭車の電源投入後の温度変化と清拭タオルの菌量の経時的变化については、病棟で標準的に運用されている清拭車では、最大容量の使用で 75°C に到達するのに約3時間要した。そしてタオル内の菌量が約1/5となるのに、約5時間必要であった（図5）。

3. 乾燥タオルに潜在する芽胞の確認

乾燥タオルに潜在する芽胞は1日保管中の温度により影響を受けている結果となった。実験的な設定であったが、1日保管後の芽胞の量（液体培養、0時間）は、①冷蔵庫（約4°C）、②室温（約15~22°C）、③孵卵器（約37°C）の順に多かった。菌量はそれぞれ、① 1.2×10^4 CFU/ml、② 0.7×10^4 CFU/ml、③ 0.5×10^4 CFU/ml であった。平板培養で発育したコロニーに対してはグラム染色、芽胞染色を行いグラム陽性桿菌と芽胞の存在を確認した。

III. 考 察

今回の偽アウトブレイクの誘因は、清拭タオルの不適切な運用により *B. cereus* が常温で高濃度に繁殖、患者の皮膚に付着し血液培養採血時、または末梢静脈留置カテーテル施行時に汚染し、検知されたものと考えられた。今回 *B. cereus* が特に多く分離された理由は、清拭車による通常の 60~75°C の加湿処理では清拭タオル中の芽胞化した菌をほとんど殺菌できないこと、また血液採取時のアルコール消毒にも芽胞は、耐性を示したと考えられる。また *B. cereus* は血管内留置カテーテルなど医療材料の表面でバイオフィルムを形成する性質を有することも培養時汚染の原因となりやすい要因である⁹⁾。

日本ではリネン類の熱湯消毒は 80°C、10 分が基本とされているが、当院では、使用済みの清拭タオルに対して、0.04% の次亜塩素酸ナトリウムでこの処理をするよう依頼している。だが、年間を通じ、 $10^3\sim10^4$ CFU/ml の菌量が洗浄後の乾燥した清拭タオルに残存し、そこに含まれる芽胞菌は乾燥タオルでさえ発芽、増殖し、保管時間、温度、湿度の管理も必要であることを示唆した。特に、高温多湿期では芽胞からの繁殖が促進されることから適切な保管場所の設定が推奨される。

Bacillus subtilis の芽胞に対して、湿熱による殺菌効果は 85°C 以上からあるとされる。また、同様に次

亜塩素酸ナトリウムにより芽胞を 5 分以内に殺菌するためには pH 9 以下の条件で最低でも 500 ppm の有効塩素が必要とされている⁸⁾。なお、CDC では、リネン類に対して高温洗濯機が使われていれば、華氏 160 度以上（摂氏 71°C 以上）で 25 分以上かけて洗剤を使って洗うよう示されている⁷⁾。

当院においては、血液培養で *B. cereus* が検出された際の追跡調査として行った3例の該当病棟の清拭タオルの菌量は 10^4 CFU/ml 以上であった。当院では、納入時に滅菌タオルを業者に要求していない。清潔なタオルを必要以上に用意せず、適切に保管し、速やかに清拭車によって殺菌することでその菌量を抑えることを基本にしている。特に、おしづり様タオルの作り置きを廃止し、この時点での菌の増殖を防止することが高濃度汚染を防ぐ最も有効な手段であった。

清拭車による通常運転の温度範囲である 60~75°C では芽胞化した菌をほとんど殺菌できなかった。*Bacillus subtilis* は、100°C の温度で最初の芽胞数を 1/10 に減少（90% 死滅）させるのに必要な時間は、 0.7 ± 0.1 分と報告されている⁸⁾。調査結果では、100°C 30 分では、芽胞菌が残存し、100°C 60 分では、処理直後は検出される菌は皆無であったが、冷却後に再び検出された。100°C 120 分では、冷却しても菌は検出しなかった（成績略）。当院では、ICU、および外科的患者の多い病棟、易感染性患者の多い病棟では、100°C による蒸気加温を施すことを推奨した。特に ICU においては 100°C 3 時間の処理を実施したものを使用可とした。また、今後、清拭車を購入する場合は、100°C による蒸気加温が可能なことを選定条件とし、85°C 60 分程度の蒸気加温を設定できるものがあれば一般病棟用に検討することとした。

偽アウトブレイクの遠因として、この時期の当院の増改築工事による建物の取り壊しが病院環境に与えた影響も否定できなかった。院内の洗濯室は、偽アウトブレイク当時、工事現場に近接していた。この時期の職員の鼻腔培養の調査（2002年10月実施）より、対象職員の131名中13名より、従来検出しなかった *B. cereus* が検出された。病院の増改築を機に土壤汚染菌の飛散を招く懸念があるときには、環境微生物のモニタリングの強化も必要と考えられる。

今後も情報の発信元として、アウトブレイクの出現をいち早く把握し、安全環境管理室、ICTとともに病院の安全管理を実施していく必要がある。

謝 辞 *Bacillus* 属および芽胞に関する基礎的な資

料の提供と指導を朽久保邦夫教授、安田陽子助教授（名古屋市立大学大学院医学研究科感染生体防御学講座 感染防御・制御学分野）より賜りました。また *Paenibacillus polymyxa* に関しては、川上由行教授（信州大学医学部保健学科）にコンサルテーションを賜りました。心より謝意を表します。

文 献

- 1) Souvenir, D., D. E. Anderson, Jr., S. Palpant, et al. 1998. Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1923–1926.
- 2) Qian, Q. F., Y. W. Tang, C. P. Kolbert, et al. 2001. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3578–3582.
- 3) Liu, P. Y., S. C. Ke, S. L. Chen. 1997. Use of pulse-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1533–1535.
- 4) Hsuh, P., L. Teng, P. Yang, H. Pan, S. Ho, K. Luh. 1999. Nosocomial pseudoepidemic caused by *Bacillus cereus* traced to contaminated ethyl alcohol from a liquor factory. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2280–2284.
- 5) Barrie, D., P. N. Hoffman, J. A. Wilson, J. M. Kramer. 1994. Contamination of hospital linen by *Bacillus cereus*. *Epidemiol. Infect.* 113: 297–306.
- 6) 荒川宜親. 2003. 医療施設内で感染症が発生した際の臨床微生物学. p. 14–33, エビデンスに基づいた感染制御 第3集—展開編 (小林寛伊, 吉倉廣, 荒川宜親, 他), メディカルフレンド社, 東京.
- 7) CDC: Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) 2003. June 6, Vol. 52/No. RR-10. <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/enviro/guide.htm>
- 8) 福地茂穂. 1994. 湿熱および各種消毒剤の枯草菌芽胞に対する殺芽胞作用. 名古屋市立大学医学会雑誌 45: 63–80.
- 9) Oosthuizen, M. C., B. Steyn, J. Theron, et al. 2002. Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2770–2780.

Outbreak of *Bacillus cereus* Pseudobacteremia Linked to Contaminated Washcloths

Yoshio Izawa,¹⁾ Makoto Ito²⁾

¹⁾ Divisions of Clinical Microbiology,

²⁾ Infection Control and Epidemiology, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Toyota Medical Corporation, Kariya General Hospital, 5-15 Sumiyoshi, Kariya, Aichi 448-8505, Japan

During the summer and autumn seasons of 2002 in an acute-care tertiary hospital, an outbreak of pseudobacteremia caused by *Bacillus cereus* occurred in chronically ill patients with an indwelling peripheral venous catheter. The source of *Bacillus* contamination was examined by analyzing extensive surveillance cultures of the patient's skin, fabrics, medical equipment, and environmental surfaces. An unexpectedly high level of *B. cereus* contamination was identified in washcloths that were routinely used in nursing practices, such as backrubs, towel baths, and perineal care. The laundry of washcloths was outsourced. Clean, dry washcloths that were supplied following washing and sodium hydrochloride disinfection, were then soaked in water and heated in a steam bath at 65–70°C in the hospital ward before being used for care. Under these conditions, we consistently found 10^3 – 10^4 CFU/ml of *Bacillus* species in the freshly prepared washcloths. Up to 10^6 CFU/ml of contaminating microorganisms could be recovered

from washcloths stored at ambient temperature for more than 72 hours. It was postulated that the *Bacillus cereus* present in these washcloths might be transferred to the patient's skin during sanitary care, which would then cause contamination of blood culture specimens following needle sticks. Spore-forming *Bacillus* species that are naturally resistant to ethanol-based antiseptics may comprise the majority of *B. cereus* found in hospital environments. Thus, the policies and procedures for washcloths were revised to include steam heating beyond 85°C for 60 minutes and prohibition of prolonged storage in a wet state. These control measures were effective and substantially reduced the occurrence of pseudobacteremia due to *Bacillus* species. In conclusion, caregivers should be aware that washcloths may become contaminated with environmental spore-forming bacteria such as nonpathogenic *Bacillus* species.