

**ATP 検査法を用いた新規感染源スクリーニング
法の考察と MRSA 分布における実態調査から
みる来院者の影響についての検討**

2016 年

柴田 高洋

目次

序論	1
第1章 ATP測定法と付着細菌拭き取り検査による院内環境調査	2
1-1. 方法	3
1-1-1. ATP量と培養法による生菌数の関連調査	3
1-1-2. 細菌の同定と薬剤感受性の検討	4
1-2. 結果	5
1-3. 考察	10
第2章 PCR法を用いた院内の実態調査からみる来院者がMRSA分布に及ぼす影響	12
2-1. 方法	14
2-1-1. 細菌の採取	14
2-1-2. MRSAの同定	14
2-1-3. PVL陽性MRSAの同定	14
2-1-4. 統計解析	
2-2. 結果	16
2-2-1. 外来病棟待合用長椅子における好気性細菌数, <i>S. aureus</i> , MRSAの検出結果	16
2-2-2. 小児科病棟プレイルームにおける検出結果	19
2-2-3. 採取されたMRSAにおけるSCC _{mec} タイプ分類	22
2-2-4. 採取されたMRSAにおけるPVL遺伝子の有無	22
2-3. 考察	23
総括	26
引用文献	29
謝辞	35

序論

医療機関における感染（院内感染）は本来起きてはならないもので、安心、安全で、かつ質の高い医療を確保し、提供するうえで、院内感染対策は最も重要な課題の一つである。

病院は、外来、入院患者だけでなく、見舞客、そして医師、看護師をはじめとする医療従事者や病院事務関係者などの健常者もまた共有する施設である。一方、感染対策の標準予防策によれば、手指の洗浄・消毒は感染対策上極めて重要であるとされている。従って、このような病院の特殊な空間環境を考慮すると、院内環境が、今現在どのような状況にあるかを把握しておくこと、すなわち、手指による高頻度接触部位およびその状況を把握しておくことは、院内感染のアウトブレイクの予防や、発症に際して感染経路の特定や迅速な遮断対策を考えるうえで、極めて有益な情報となると思われる。

著者は、手指による高頻度接触部位を特定しその細菌学的状況に関する情報を得ることを目的として、ATP測定法を用いたスクリーニング法の検討と、PCR法を用いた病院内におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分布の実態調査を行った。

第 1 章 ATP 測定法と付着細菌拭き取り検査による 院内環境調査

医療施設にとって院内感染は大きな問題であり、現在でも、アメリカでは毎年約 170 万件の院内感染とそれに伴う 99,000 人の死者が報告されている¹⁾。我が国では、厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業（Japan Nosocomial Infections Surveillance, JANIS）の公開情報（<http://www.nih-janis.jp/report/zen.html>）によれば、毎年 14,000 件を超える新規感染症患者数が報告されているが、近年複数の大学病院において発生した院内感染では多数の死亡例を出す事態にまでなった（横浜市感染症情報センター：セラチア菌による院内感染、日和見（ひよりみ）感染について、2009.

<http://www.city.yokohama.lg.jp/kenko/eiken/idsc/disease/serratia1.html>；東京都保健福祉局：多剤耐性アシネトバクター・バウマニによる院内感染事例の発生について、2010. <http://www.metro.tokyo.jp/INET/OSHIRASE/2010/09/20k96800.htm>）。また、感染力が強く抗生物質に対し幅広く耐性を獲得したスーパー耐性菌の出現も稀ではなくなり、問題はさらに深刻化している²⁾。

医療従事者を中心とする施設利用者はこのような現状を把握し、院内感染発生・拡大の防止に努める責任がある。しかし、感染から患者を守る立場にあるはずの医療従事者が感染拡大に関与³⁻⁵⁾していることさえある。この背景にあるのは、タイムリーな感染リスク情報の欠如である。現在、細菌検出手段として培養法が広く用いられている。本法は、検出自体に時間を要するため、細菌の存在が判明しても、その情報を得た時点ですでに人を介した細菌の伝播が生じていることが考えられる。したがって、感染拡大を未然に防ぐという点において培養法単独で十分でないことは明らかである。

本調査研究では、感染リスク検出のスクリーニング法として ATP 拭き取り検査に着目した^{6, 7)}。この検査では、結果判明までに要する時間が約 10 秒と非常に短く、現状を迅速にフィードバックすることができる。まず、院内環境中の感染源検出における ATP 拭き取り検査の応用について、同一の調査対象箇所に対し ATP 量の測定と培養法による生菌数の計測を行い、両者の関係を調べることから検討した。調査対象箇所は、不特定多数の人が利用する病棟集合トイレ

内の高頻度接触表面と、ナースステーションとした。この際、視覚的評価と微生物学的評価による合格率の間にはほとんど関連がないという報告もあり^{8,9)}、汚染認識と細菌検出の結果は必ずしも一致しないことが考えられたため、汚染の認識が低い場所も含め感染源になり得ると推察した箇所について、拭き取り調査を行った。さらに、ブドウ球菌をターゲットとして当該箇所に存在する細菌の同定と薬剤感受性を検討した。

1-1. 方法

1-1-1. ATP 量と培養法による生菌数の関連調査

調査対象として、各病棟の集合トイレ内の高頻度接触表面と考えられる、壁、補助手すり、シャワートイレ操作ボタン、ドアレバー、トイレトペーパーカバーの5箇所を設定した。通常のATP拭き取り検査では10×10 cmの枠を用いた100 cm²程度の面積の拭き取りが推奨されているが⁷⁾、今回はATP量測定と生菌数計測を同時に行うために、調査対象箇所を同程度の面積となるように分け、それぞれの拭き取りに割り当てた。ただし、壁は10 cm四方の拭き取りを異なる場所で2度行った。シャワートイレ操作ボタンについてはボタン部分のみの拭き取りであり、半分に分けることは不可能であったため、同じ部分を2度拭き取った。その際はATP量測定を先に行い、その後生菌数調査のための拭き取りを行った。

ATP量は、ルシパック Pen (キッコーマンバイオケミファ株式会社)の綿棒の先端を水道水で湿らせ、調査対象箇所を拭き取り、ルミテスターPD-20 (キッコーマンバイオケミファ株式会社)にセットし測定した。一方、生菌数の測定は、滅菌生理食塩水で先端を湿らせた滅菌チェックスティック (サンセイ医療機材株式会社)を用いて調査対象箇所を拭き取った後、先端部分を2 mLの滅菌生理食塩水を入れた小試験管に入れ、1分間激しく攪拌して被検液とした。この被検液、およびそれを滅菌生理食塩水で10倍希釈したものを、トリプチケースソイ寒天培地 (BBL, BD ジャパン)に100μLずつ塗布し、35°Cで4日間培養し、コロニー数を計測した。

1-1-2. 細菌の同定と薬剤感受性の検討

培養法により得られたコロニーについてグラム染色，選択分離培地であるマンニット食塩寒天培地（日水製薬株式会社）への塗布，コロニーダイレクト PCR による黄色ブドウ球菌特異的遺伝子 *nucA* の検出を行い，ブドウ球菌属を同定した¹⁰⁾．さらに，メチシリン耐性遺伝子 *mecA* の検出を行い，メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）およびメチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌（MRCNS）を同定した¹⁰⁾．

薬剤感受性試験では，アミカシン硫酸塩（AMK; シグマ-アルドリッチジャパン），硫酸アルベカシン（ABK; Meiji seika ファルマ株式会社），セファゾリン硫酸塩（CEZ; 和光純薬工業株式会社），シプロフロキサシン（CPFX; バイエル薬品株式会社），エリスロマイシン（EM; シグマ-アルドリッチジャパン），硫酸ゲンタマイシン（GM; シグマ-アルドリッチジャパン），イミペネム（IPM; MSD 株式会社），レボフロキサシン（LVFX; 第一三共株式会社），塩酸ミノサイクリン（MINO; シグマ-アルドリッチジャパン），テイコプラニン（TEIC; ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社），塩酸バンコマイシン（VCM; シグマ-アルドリッチジャパン）の 11 種類の抗生物質に対する感受性を検討した． S

（Susceptible : 感受性）， I （Intermediate : 中等度耐性）， R （Resistant : 耐性）の判定は米国臨床検査標準協会（Clinical and Laboratory Standards Institute : CLSI）が示す staphylococci 感受性判定基準に基づき行い， ABK については GM のブレイクポイントを代用した¹¹⁻¹³⁾．

1-2. 結果

ATP 量と生菌数の関係を図 1 に示した。滅菌器具表面を除く全調査対象箇所（114 例）において ATP 量は 350 RLU 以上を示し、そのうち、生菌数が 10 CFU 以上を示したものは 95 例（83%）で、残り 19 例からは細菌を検出することができなかった。生菌数が 10 CFU と少ない場合でも、ATP 量は 350～10,000 RLU を示した。陰性対照である滅菌器具表面の ATP 量は 40～80 RLU であったが、本調査における細菌検出時の最低 ATP 量は 350 RLU であった。

ATP 量測定による環境調査について、病棟集合トイレでの結果を図 2 に、ナースステーションでの結果を図 3 に示した。どちらの結果も各調査対象箇所における平均 ATP 量を表している。集合トイレでの調査の結果、どの箇所も 350 RLU を大きく上回った。ナースステーションでは、集合トイレの結果よりも低値ではあったが、どの箇所も同様に 350 RLU を超えており、とくに点滴準備台の支柱が高い値を示した。

検出菌のグラム染色の結果を図 4 に、グラム陽性球菌のうちブドウ球菌属と同定されたものの内訳を図 5 に示した。検出された細菌の 71% がグラム陽性球菌であった。ブドウ球菌属として同定された細菌のうち、コアグララーゼ陰性ブドウ球菌（CNS）が 84% を占めていて、MRSA、MRCNS はそれぞれ 2%、7% であった。それらのブドウ球菌属細菌が検出された調査対象箇所を表 1 に示した。MRSA がシャワートイレ操作ボタンから、MRCNS が補助手すり、シャワートイレ操作ボタン、トイレトペーパーカバーから検出された。さらに検出されたメチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA）の薬剤感受性試験結果について、代表的な株を表 2 に示した。グリコペプチド系薬剤である VCM および TEIC に耐性の株は認められず、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA）のなかに、第一選択薬であるセフェム系薬剤の CEZ に耐性を有するものが補助手すりから検出された。CNS でも CEZ に耐性を示す株が補助手すり、トイレトペーパーカバーから検出された（データは示していない）。

図 6 は、エタノール清拭前後での ATP 量と生菌数を示したものである。エタノール清拭後、清拭前と比較して ATP 量、生菌数共に顕著に減少した。

表 1 ブドウ球菌属の検出箇所

サンプル採取箇所	コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (MRCNS*)		黄色ブドウ球菌 (MRSA**)	
壁	3	(0)	0	(0)
手すり	12	(1)	3	(0)
ボタン	12	(1)	2	(1)
レバー	1	(0)	1	(0)
カバー	21	(2)	3	(0)
計	49	(4)	9	(1)

* MRCNS: メチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌

** MRSA: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

表 2 メチシリン感受性黄色ブドウ球菌の薬剤感受性

株番号*	薬剤感受性**										
	CEZ	IPM	ABK	AMK	GM	EM	MINO	CPFX	LVFX	TEIC	VCM
TU101027h	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
TU101028b	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
TU101032h	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
TU101052c	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
TU101061h	R	R	R	R	R	I	S	R	R	S	S
TU101066l	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
TU101074c	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TU101075c	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S

* 株番号末尾のアルファベットは採取箇所を表す；b, ボタン；c, カバー；h, 手すり；l, レバー

** 供試した抗生物質：AMK, アミカシン；ABK, アルベカシン；CEZ, セファゾリン；CPFX, シプロフロキサシン；EM, エリスロマイシン；GM, ゲンタマイシン；IPM, イミペネム；LVFX, レボフロキサシン；MINO, ミノサイクリン；TEIC, テイコプラニン；VCM, バンコマイシン

抗生物質耐性：S, 感受性；I, 中等度耐性；R, 耐性

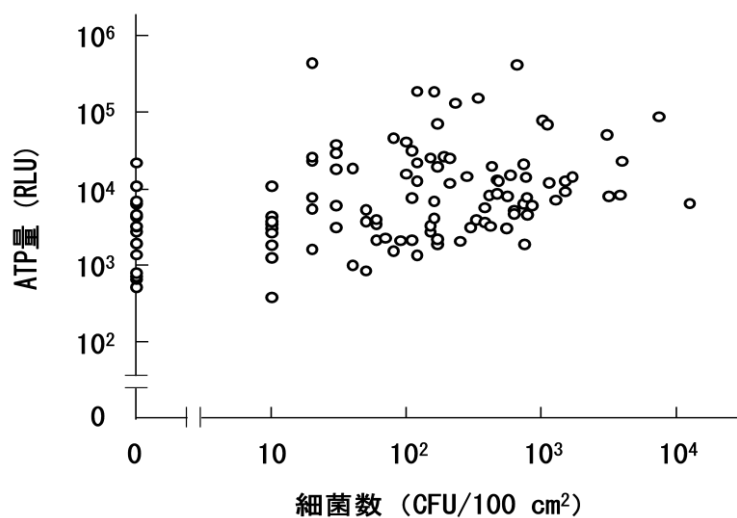


図 1 ATP 量と生菌数の関係

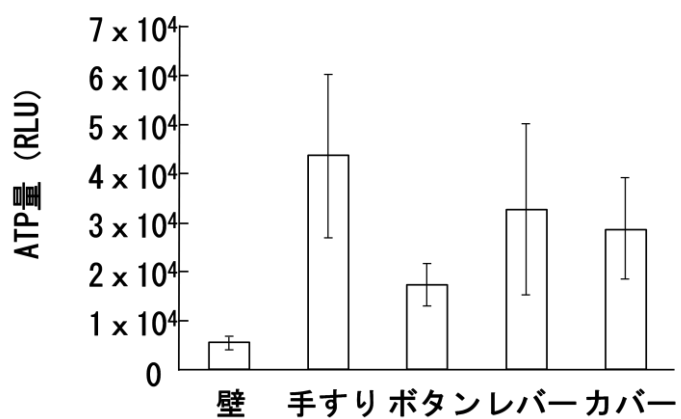


図 2 病棟集合トイレの調査対象箇所における平均 ATP 量

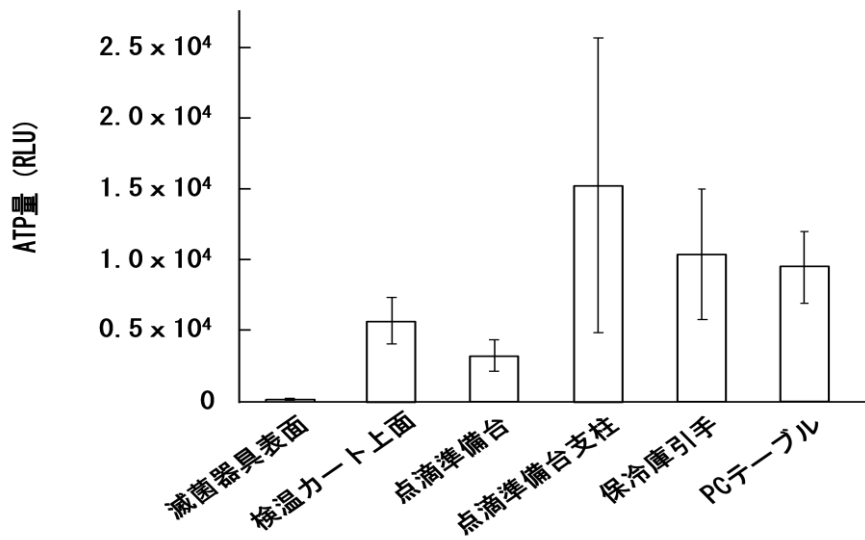


図 3 ナースステーションにおける調査対象箇所の平均 ATP 量

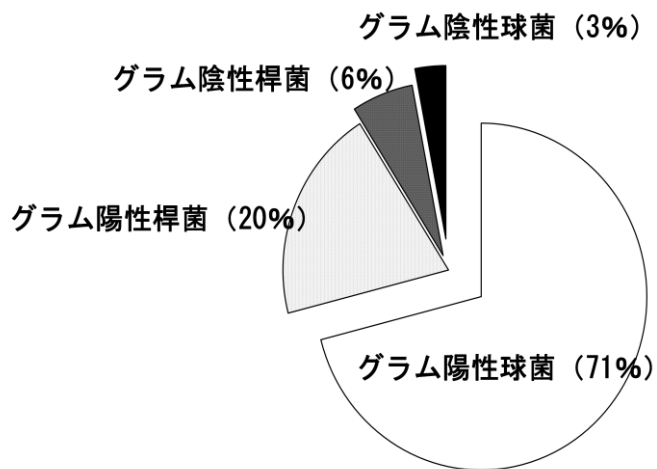


図 4 検出菌のグラム染色結果

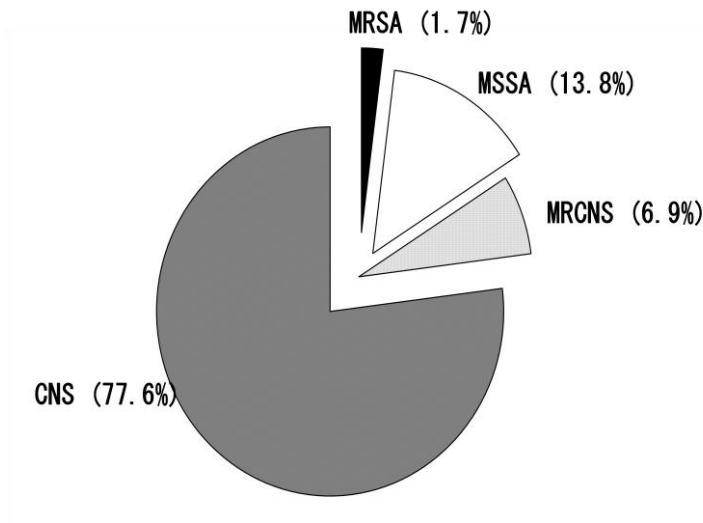


図5 検出されたブドウ球菌属の内訳

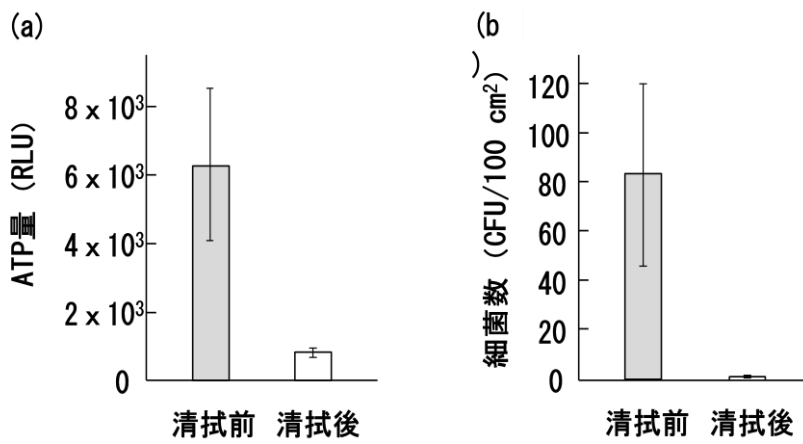


図6 エタノールによる清拭前後におけるATP量 (a) と生菌数の変化 (b)

1-3. 考察

ATP 拭き取り検査は、操作が簡便でありかつ迅速に ATP 量を測定・数値化できるという特徴がある⁷⁾。そこで、本検査法を、感染リスク検出のためのスクリーニング法として活用することの有効性について、細菌の存在に対する感度を検討することから評価した。同一の拭き取り対象に対し、培養法による生菌数の計測および ATP 量測定を行い比較した結果、調査対象箇所 114 例において ATP 量はすべて 350 RLU 以上を示し、そのうち、生菌数が 10 CFU 以上を示したものは 83% で、残り 17% からは細菌を検出することができなかった。生菌数が 10 CFU とごく少ない調査対象箇所でも、ATP 量は 350~10,000 RLU を示した(図 1)。滅菌器具表面の ATP 量が 40~80 RLU であったことを考慮すると、非常に高い値である。しかし、培養法では細菌が検出されなかったサンプル採取箇所においても ATP 量は 350 RLU 以上であった。この ATP の供給源のひとつとしては、本調査で使用した培養法では検出することができなかった細菌や真菌などの存在が考えられる。実際、自然界の微生物の 99% 以上が培養不可能な未知の微生物であるともいわれている¹⁴⁾。したがって、350 RLU 以上の ATP 量を示した調査対象箇所に関しては細菌の存在を疑い、感染源として指摘しても支障はない。すなわち、ATP 拭き取り検査は、感染源のスクリーニング法として感染リスクマネジメントの強化に非常に有益なものといえる。

細菌懸濁液を用いた実験では、ATP 量と培養法により求めた生菌数との間に非常に高い相関が示されているが^{7, 15, 16)}、本調査においては両者に期待したような相関はみられなかった(図 1)。その理由として、環境中には食物残渣に由来する ATP が存在すること、そして生存状態が異なる様々な細菌が混在していることが挙げられる。実際、様々な種類の細菌、とくに芽胞形成細菌が多く検出された。環境中では、芽胞形成細菌は芽胞を形成し、活動を停止していると推察されるため¹⁷⁾、生菌数が多くても ATP 量として反映されないのかもしれない。

本調査における調査対象箇所は、複数の病棟集合トイレとナースステーションにおける高頻度接触表面であるが、その全てが 350 RLU 以上の値を示した(図 2, 3)。よって、これらの場所には細菌が存在する可能性が非常に高いと推察され、感染源として認識すべきであるといえる。

集合トイレから検出した細菌の分離・同定を試みたところ、グラム陽性球菌が最も多く検出された(図 4)。対象が高頻度接触表面であったため、表皮ブド

ウ球菌などを含むグラム陽性球菌が多いことは予測された^{18, 19)}。一方で、トイレという場所柄、湿潤環境を好む緑膿菌などグラム陰性桿菌が多く検出されることも予想されたが²⁰⁾、その割合は全株数の5%にとどまった。しかし、MRSAやMRCNSをはじめとした抗生物質に耐性を有するブドウ球菌属細菌が、シャワートイレ操作ボタンやペーパーカバー、補助手すりから検出された(図5, 表1, 2)。このことから、ATP拭き取り検査が感染リスクを判断する有用なツールであることが示された。

トイレは一般的に汚いという印象を持つが、院内感染源として認識している医療従事者はほとんどいない。細菌は、医療従事者などの手指を介し患者に伝播する²¹⁻²⁴⁾。したがって、シャワートイレ操作ボタンや、ペーパーカバーなどを感染源として認識し、重点的に清掃を行い日常的に清潔に保つことが重要である。エタノール清拭は、ATP量と生菌数を確実に減少させる(図6)、ヒトの手指を介した細菌の拡散を防止するための適切な処置である。

このように、ATP拭き取り検査を用いることで、タイムリーな感染リスク関連情報を取得できた結果、予見していなかった箇所を感染源として指摘することができた。今後、この手法を用いてさらなるデータの収集を行うことにより、医療従事者を中心とした人々の感染に対する意識改革に大きな役割を果たすと考えられる。

本調査では、病棟の集合トイレ内の高頻度接触表面とナースステーションを中心的な調査箇所としたが、病室の設備などを調査対象箇所に加えることにより、リスクマネジメントに役立つリアルタイムな情報をより多く得ることができると考えられる。また、ATP拭き取り検査はデータがすぐに得られる迅速性、結果の数値化による比較の容易さ、どこでも検査ができる携帯性など多くの利点があり⁷⁾、それらを生かし、培養法との併用で欠如している情報を補足し合うことにより、患者を感染リスクから保護する充実した体制を構築することができる。ATP拭き取り検査が感染リスク検出のスクリーニング法として一般化し、多くの施設で利用されるようになると、コストダウンも期待できる。そして、リアルタイムな情報伝達とそれに伴う医療従事者間の情報共有が可能となり、感染に対する日常的な認識が向上することにより、感染リスクマネジメントの強化、すなわちより充実した活動体制の構築に繋がることが期待される。

第 2 章 PCR 法を用いた院内の実態調査からみる来院者が MRSA 分布に及ぼす影響

入院患者や医療従事者に起因するメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) の院内伝播は長年のテーマであり、各施設において対応策が講じられてきた。しかし減少傾向にあるとはいえ、厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 (Japan Nosocomial Infection Surveillance: JANIS) の 検 査 部 門 2014 年 報 (http://www.nih-janis.jp/report/open_report/2014/3/1/ken_Open_Report_201400.pdf 2015/11/28)によると、MRSA の分離率 (MRSA 分離患者数/検体提出患者数×100) は中央値として 6.93% で依然として薬剤耐性菌では最も高い割合を示し、対象病院 897 機関すべてから検出されている。

また近年は、病院環境だけでなく市中環境からも MRSA が検出されるようになってきており、さらにその感染対策が重要視されている。院内環境から検出される MRSA (hospital-associated MRSA: HA-MRSA) と市中環境から検出される MRSA (community-associated MRSA: CA-MRSA) は、メチシリン耐性領域カセット (staphylococcal cassette chromosome *mec*: SCC*mec*) の遺伝子型により、HA-MRSA は主に II 型 (I, III 型を含む)、CA-MRSA は主に IV 型 (V 型を含む) に分類される²⁵⁾。CA-MRSA は小児や若年層の健常人が感染し学校などでの流行が認められることがあり²⁵⁾、薬剤感受性は反応良好で、疾患としては皮膚・軟部組織感染症が挙げられ、その予後は良好ではあるが、肺炎を起こすと致死率が高いとされている^{26,27)}。CA-MRSA は近年では世界中で検出されるようになり、年々増加傾向にある。

また、黄色ブドウ球菌が産生する外毒素はトキシックショック症候群など様々な皮膚疾患とつながりがあることが見出されている。ロイコシジン (leukocidin) は白血球崩壊作用と赤血球崩壊作用を有しているが、なかでも、Panton-Valentine leukocidin (PVL) は白血球に対する特異性が極めて高い毒素である。PVL を保有する株は重大な皮膚や軟部組織感染症を引き起こし、電撃性紫斑病や壊死性筋膜炎のような重篤な侵襲性疾患をもたらすことがある^{28,29,30)}。米国では USA300 という CA-MRSA の流行株が存在するが、これらの大半が PVL

産生株であるとして注目された^{31,32)}。世界でのデータを見ると PVL 陽性 *S. aureus* の有病率は、中国では 12.8%³³⁾、ドイツは 30%³⁴⁾、アイルランド 1.8%³⁵⁾、韓国では 0.9%³⁶⁾、シンガポールでは 11.6%³⁷⁾、タイでは 4%³⁸⁾、であるが、アメリカでは 97%^{39,40)}だった。これらのデータからも、その有病率には国や地域環境によって大きく異なっていることがわかる。

病院環境中には CA-MRSA と HA-MRSA が混在している可能性が考えられるが、その割合は不明であり、また病院環境や周囲の環境にも大きく左右される可能性がある。より良い病院環境を構築していくためには、病院内における MRSA の分布パターンを理解しておく必要がある。

そこで今回、地域中核の教育研究病院（入院ベッド数：696 床）の外来診療棟と入院病棟から細菌を採取し、polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて、MRSA の分布頻度、およびその SCCmec タイピングを行うことで、病院内の MRSA 汚染の実態調査を行った。

2-1. 方法

2-1-1. 細菌の採取

菌の採取は、卵黄加マンニット食塩クリーンスタンプ培地（日水製薬株式会社、東京都）を用いて、ローダックプレート法に準じて行った。調査対象は、外来診療棟においては、患者が接触する機会が多いと思われる小児科の患者待合用長椅子の座面、背もたれ、肘掛けを調査対象とした。玄関ホールおよび内科の患者待合用長椅子の座面、背もたれ、肘掛けを比較対照のための調査対象とした。また、小児科入院病棟のプレイルームの壁や遊具も調査対象とした。

2-1-2. MRSA の同定

MRSA の判定は、採取された菌株についてコロニーダイレクト PCR 法を用いた SCC*mec* タイピングを行うことにより同定した。SCC*mec* はメチシリン耐性遺伝子(*mecA*)を保有しており、 β -ラクタム系抗生物質に低親和性の細胞壁合成酵素 (Penicillin Binding Protein 2 prime: PBP2')をコードしている。SCC*mec* は、*mecA* を含む *mec* gene complex と *ccr* gene complex の組み合わせによって、大きく 6 つの型に分けることができる。採取された菌株において Kondo らの報告⁴¹⁾を参考に、プライマー条件を設定した(表 1)。Deoxyribonucleic acid (DNA) ポリメラーゼには KOD Dash (東洋紡績株式会社、大阪府)を用い、PCR の条件は denaturation 94°C, 2min, annealing 57°C, 1min, extension 72°C, 2min, 30cycles とした。

2-1-3. PVL 陽性 MRSA の同定

検出されたMRSAすべての株においてPVL遺伝子 (*lukS-PV-lukF-PV*) の存在をPCR法を用いて確認した。プライマーはLina Gらの報告⁴²⁾を参考にし、PCR条件は、denaturation 94°C, 30sec, annealing 55°C, 30sec, extension 72°C, 1min, 30cyclesとした(表1)。

2-1-4. 統計解析

検出頻度の比較には、カイ 2 乗検定および Fisher の正確確率検定を用いた。また、検出細菌数の分布の比較解析は、Mann-Whitney の *U* 検定を用いて行った。

表1 本調査で使用したプライマー

primer	nucleotide sequence (5'→3')	primer pair	size (bp)	type
mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	mA1-mA2	286	mecA
mA2	AACGTTGTAACCACCCAAGA			
ccr gene complex				
α 1	AACCTATATCATCATCAATCAGTACGT	α 1- β c	695	ccr1
α 2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	α 2- β c	937	ccr2
α 3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	α 3- β c	1791	ccr3
β c	ATTGCCTTGATAATAGCCTTCT			
α 4.2	GTATCAATGCACCAGAACTT	α 4.2- β 4.2	1287	ccr4
β 4.2	TTGCGACTCTCTTGGCGTTT			
γ R	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	γ R- γ F	518	ccr5
γ F	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT			
mec gene complex				
mI6	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	mA7-mI6	1963	classA
IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	mA7-IS7	2827	classB
IS2(iS-2)	TGAGGTTATTAGATATTTTCGATGT	mA7-IS2(iS-2)	804	classC
mA7	ATATACCAAACCCGACAACACTACA			
PVL				
<i>luk-PV-1</i>	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	<i>lukS-PV-lukF-PV</i>	433	PVL
<i>luk-PV-2</i>	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC			

2-2. 結果

2-2-1. 外来病棟待合用長椅子における好気性細菌数, *S. aureus*, MRSA の検出結果

調査は、2013年6月から8月にかけて、外来病棟の玄関ホールに設置された長椅子19脚、小児科外来の廊下に設置された長椅子18脚、内科外来の廊下に設置された長椅子14脚を対象として、それぞれ2回行った。

この期間の外来患者数（1ヶ月平均）は、病院全体では33,092人（100%）、小児科1,369人（4.1%）、内科6,756人（20.4%）であった（表2）。

表2に示したように、調査したすべての長椅子から好気性細菌が検出された。そのうち、*S. aureus*は、玄関ホールの長椅子では29脚（好気性細菌検出長椅子に占める割合76.3%）、小児科外来の長椅子では25脚（69.4%）、内科外来の長椅子では22脚（78.6%）から検出された。MRSAは、玄関ホールの長椅子と内科外来の長椅子では、それぞれ14脚（*S. aureus* 検出長椅子に占める割合36.8%）と16脚（57.1%）から検出されたが、小児科外来の長椅子で検出されたのは1脚（2.8%）であった（表2）。

外来病棟玄関ホール、小児科および内科の待合用長椅子から検出された好気性細菌数の分布を図7に示した。玄関ホールと小児科の間には統計的に有意な差はみられなかったが、玄関ホールと内科、および小児科と内科を比較すると、いずれも内科が高い分布域にあることが示された。

図8は、外来病棟待合用長椅子から検出された好気性細菌数の分布を調査部位ごとに示したものである。また、検出された*S. aureus*の菌数分布を図9に示した。

玄関ホールの長椅子について、背もたれと座面で比較したが、顕著な差はみられなかった（図8）。しかし、*S. aureus*検出数の分布域は、背もたれにおいて統計的に有意に低い分布域を示した（ $P=0.027$ ）（図9）。

小児科外来の長椅子から検出された好気性細菌数の分布は、肘掛けにおいて背もたれよりも統計的に有意に高い分布域が示されたが（ $P=0.039$ ）、背もたれと座面、肘掛けと座面では顕著な差はみられなかった（図8）。また、*S. aureus*の検出菌数の分布については、肘掛、背もたれ、座面の間で統計的に有意な差はみられなかった（図9）。

内科の長椅子から検出された好気性細菌数の分布は、玄関ホールや小児科のそ

れよりも高い傾向がみられた。また、ここでも小児科の長椅子と同様、肘掛けが背もたれよりも統計的に有意に高い分布域を示したが (P=0.018)、背もたれと座面、肘かけと座面では統計的に有意な差はみられなかった (図 8)。 *S. aureus* 検出菌数の分布については、肘掛、背もたれ、座面の間で統計的に有意な差はみられなかった (図 9)。

表 2 外来病棟待合用長椅子における好気性細菌, *S. aureus* および MRSA の検出頻度

調査場所	患者数/月 ¹⁾	好気性細菌 ²⁾	<i>S. aureus</i> ³⁾	MRSA ⁴⁾
玄関ホール (19脚×2)	33,092	38/38	29/38 (P=0.798) ⁵⁾	14/29 (P=0.412) ⁶⁾
小児科 (18脚×2)	1,369	36/36	25/36 (P=0.486) ⁵⁾	1/25 (P<0.005) ⁶⁾
内科 (14脚×2)	6,756	28/28	22/28 (P=0.622) ⁵⁾	16/22 (P<0.005) ⁶⁾

1) 2013年6月から8月の1ヶ月平均外来患者数

2) 調査した長椅子の数に対する好気性細菌が検出された長椅子の数

3) 好気性細菌が検出された長椅子の数に対する *S. aureus* が検出された長椅子の数

4) *S. aureus* が検出された長椅子の数に対する MRSA が検出された長椅子の数

5) カイ2乗検定

6) Fisherの正確確率検定

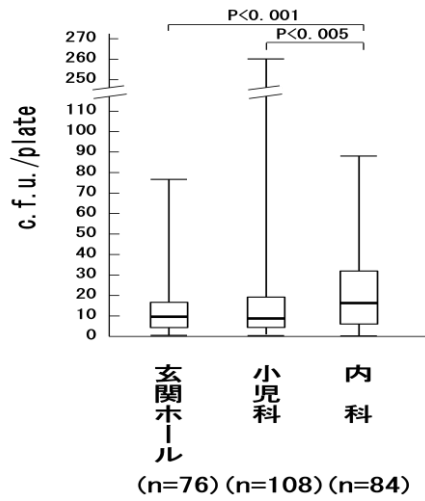


図 7. 外来病棟待合用長椅子における好気性細菌数分布

各プロットの下線は最小値，ボックスの下辺は第 1 四分位数（25%），太い線は中央値，ボックスの上辺は第 3 四分位数（75%）、上の線は最大値を示す。

データの解析はマン・ホイットニーの U 検定で行った。

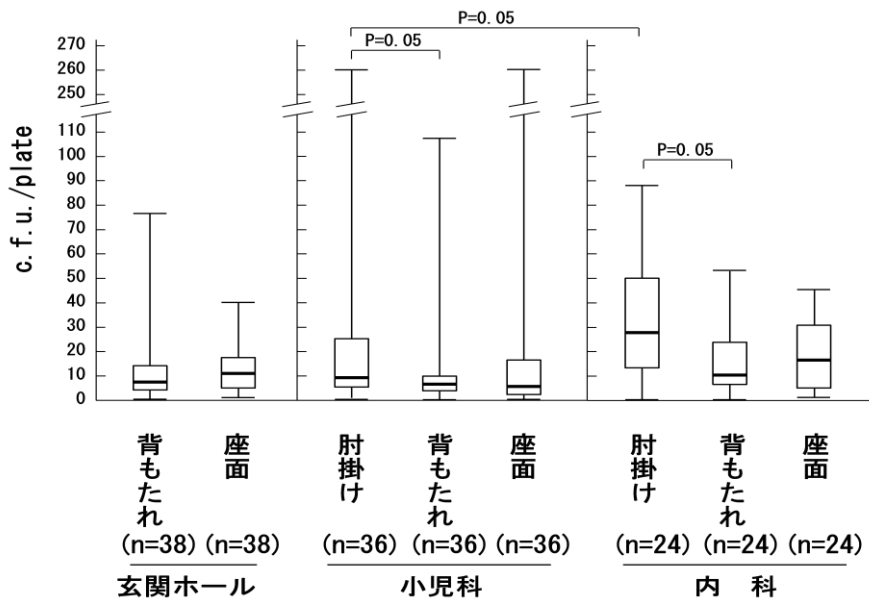


図 8. 外来病棟待合用長椅子における各調査部位の好気性細菌数分布

各プロットの下線は最小値，ボックスの下辺は第 1 四分位数（25%），太い線は中央値，ボックスの上辺は第 3 四分位数（75%）、上の線は最大値を示す。

データの解析はマン・ホイットニーの U 検定で行った。

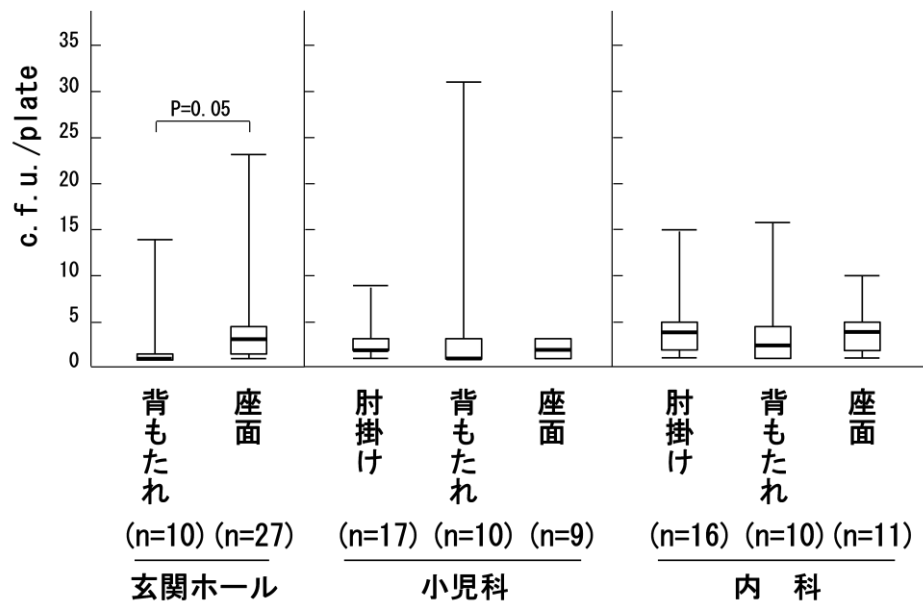


図9. 外来病棟待合用長椅子から検出された *S. aureus* の菌数分布

各プロットの下線は最小値，ボックスの下辺は第1四分位数（25%），太い線は中央値，ボックスの上辺は第3四分位数（75%）、上の線は最大値を示す。

データの解析はマン・ホイットニーのU検定で行った。

2-2-2. 小児科病棟プレイルームにおける検出結果

小児科病棟プレイルームの壁面（28ヶ所）、壁の開口部下縁（6ヶ所）および遊具（テトラポッド型遊具10ヶ所とチューブ型遊具6ヶ所）をそれぞれ4回調査した(表3).

好気性細菌は、壁面を除き、ほぼすべての調査部位（95.8%-100%）から検出された。壁面からの検出は43.8%であった。*S. aureus*の検出頻度については、テトラポッド型遊具（60%）が統計的に有意に高く、壁面（26.5%）は有意に低いこと、そして壁の開口部下縁（47.8%）とチューブ型遊具（39.1%）では統計的に有意な差はないことが認められた。

検出された好気性細菌数の分布は、壁面は壁開口部下縁など他の調査部位よりも統計的に有意に低い（ $P < 0.001$ ）分布域であり、壁開口部下縁および遊具はより高い分布域を示し、各分布域の間に統計的に有意な差は認められなかった（図10）。*S. aureus*検出数の分布は、それぞれの分布域の間で統計的に有意な差は認められなかった（図11）。

表3 小児入院病棟における好気性細菌、*S. aureus* およびMRSAの検出頻度

調査場所	好気性細菌 ¹⁾	<i>S. aureus</i> ²⁾	MRSA ³⁾
壁 (28ヶ所×4)	49/112	13/49 (P=0.026) ⁴⁾	4/13 (P>0.1) ⁵⁾
壁開口部下縁 (6ヶ所×4)	23/24	11/23 (P=0.586) ⁴⁾	3/11 (P>0.1) ⁵⁾
テトラポッド型遊具 (10ヶ所×4)	40/40	24/40 (P=0.023) ⁴⁾	11/24 (P>0.1) ⁵⁾
チューブ型遊具 (6ヶ所×4)	23/24	9/23 (P=0.764) ⁴⁾	2/9 (P>0.1) ⁵⁾

- 1) 調査部位の数に対する好気性細菌検出部位の数
- 2) 好気性細菌検出部位の数に対する*S. aureus*検出部位の数
- 3) *S. aureus*検出部位の数に対するMRSA検出部位の数
- 4) カイ2乗検定
- 5) Fisherの正確確率検定

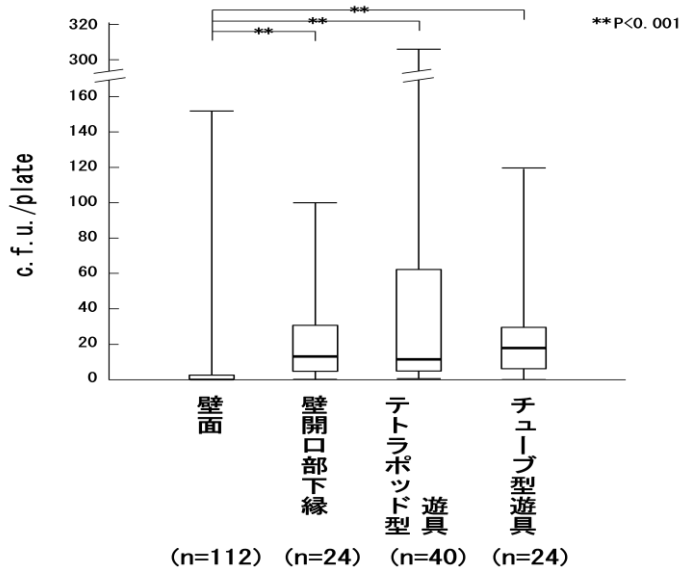


図 10. 小児病棟プレイルームにおける各調査部位の好気性細菌数分布

各プロットの下の線は最小値，ボックスの下辺は第1四分位数（25%），太い線は中央値，ボックスの上辺は第3四分位数（75%）、上の線は最大値を示す。

データの解析はマン・ホイットニーのU検定で行った。

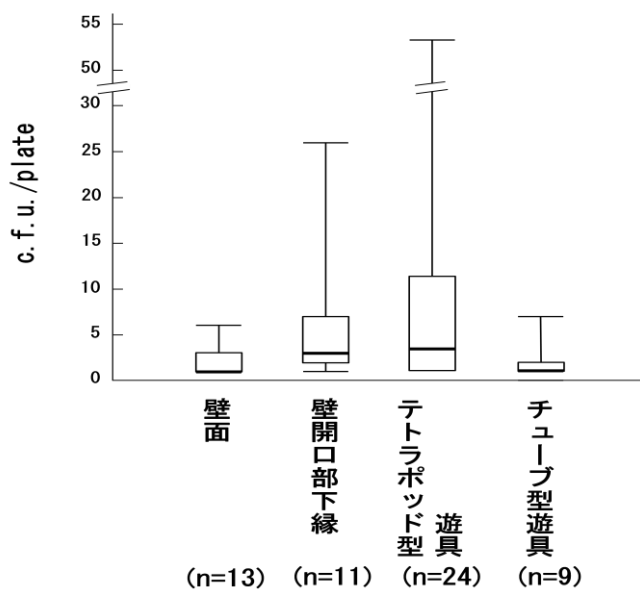


図 11. 小児病棟プレイルームの各調査部位から検出された *S. aureus* の菌数分布

各プロットの下は最小値，ボックスの下辺は第1四分位数（25%），太い線は中央値，ボックスの上辺は第3四分位数（75%）、上の線は最大値を示す。

データの解析はマン・ホイットニーのU検定で行った。

2-2-3. 採取された MRSA における SCCmec タイプ分類

今回の調査で採取されたすべての MRSA の SCCmec タイプを表 4 に示した。玄関ホール待合用長椅子から得られた MRSA は 24 株であり、V 型 (19 株) がもっとも多く、次いで IV 型 (4 株)、I 型 (1 株) であった。小児科外来待合用長椅子から得られた MRSA は 1 株であり、この株は I 型であった。内科外来待合用長椅子から検出された MRSA 50 株でも V 型がもっとも多く (38 株)、I 型 (8 株)、IV 型 (3 株)、II 型 (1 株) の順であった。小児科病棟プレイルームの壁、壁開口部下縁、テトラポッド型遊具、およびチューブ型遊具から得られた MRSA 34 株については、II 型 (20 株) がもっとも多く、次いで多いのが V 型 (11 株) で、IV 型 (2 株)、I 型 (1 株) がそれに続いた。III 型、VI 型はまったく検出されなかった。

2-2-4. 採取された MRSA における PVL 遺伝子の有無

得られた MRSA 109 株における PVL 遺伝子の有無を PCR 法を用いて確認した (表 4)。小児科病棟プレイルームの壁開口部下縁から得られた SCCmec タイプ IV 型株 1 株が PVL 陽性であった。また、小児科病棟プレイルームに設置されているテトラポッド型遊具から採取された SCCmec タイプ II 型株 4 株が PVL 陽性であった。

表4 本調査で得られたMRSAにおけるSCCmecタイプとPVL遺伝子の検出結果

調査場所	MRSA	SCCmec type						PVL(+)
		I	II	III	IV	V	VI	
外来病棟								
玄関ホール (19 脚×2)	24	1	-	-	4	29	-	-
小児科 (18 脚×2)	1	1	-	-	-	-	-	-
内科 (14 脚×2)	50	8	1	-	3	38	-	-
入院病棟								
壁 (28 ケ所×4)	5	1	-	-	1	3	-	-
壁開口部下縁 (6 ケ所×4)	4	-	2	-	1	1	-	1(IV×1)
テトラポッド型遊具 (10 ケ所×4)	19	-	14	-	-	5	-	4(II×4)
チューブ型遊具 (6 ケ所×4)	6	-	4	-	-	2	-	-

2-3. 考察

病院内環境の細菌学的汚染，とくに MRSA の分布を理解するために，診察室や病室⁴³⁾といったこれまで調査されてきた場所ではなくて，主に外来患者が利用する待合用長椅子を対象として，調査を行った．比較対象として，小児科入院病棟のプレイルームを調査した．その結果，ほぼすべての調査対象箇所から好気性細菌を検出した．例外的に，低い検出率を示したプレイルームの壁面ですら，調査した 43.8% から好気性細菌を検出した．

これは，人の生活圏である以上当然の結果といえる．表皮の鱗屑は毎日 10⁶ 個が剥がれ落ちていくといわれている⁴⁴⁾．表皮の細菌叢もこれと共に落ちていく．鱗屑は，人の移動に伴って，舞い上がり拡散すると考えられるため，周辺環境が汚染されることは想像するに難くない．

しかし，小児科外来の長椅子においては，*S. aureus* はほとんど検出されず，そのうち MRSA は小児科外来長椅子における調査で 1 株しか検出されなかった．病院全体からみると小児科は外来患者数が 4% と少ないことが原因しているのかもしれない．検出された MRSA は HA-MRSA とされる I 型ではあったが，1 株しか検出されなかったことから蔓延しているという状況ではない．

玄関ホールの長椅子は多くの診療科の患者や家族など大多数の人が触れる機会が多いと思われるが，予想に反して，その好気性細菌数は内科よりも統計的に有意に低く，小児科とは有意差が認められなかった．SCC*mec* タイプは CA-MRSA が多く検出された．背もたれでは 100.0% (4/4, V 型 4 株)，座面でも 95.0% (19/20, IV 型 4 株, V 型 15 株) が CA-MRSA であった．玄関ホールの長椅子において検出された MRSA は CA-MRSA が優位であり，市中環境からの持ち込みによる汚染を示唆している．

内科外来の患者数は病院全体の 20% を占める．好気性細菌数に対する *S. aureus* の検出頻度も玄関ホールや小児科よりも統計的に有意に高い値を示した．検出対象部位別にみると，もっとも手が触れると思われる肘掛けにおいて好気性細菌数が統計的に有意に高い値を示した．検出された MRSA のうち，肘掛けでは 81.5% (22/27, IV 型 2 株, V 型 20 株)，背もたれは 88.9% (8/9, V 型 8 株)，座面では 78.6% (11/14, IV 型 1 株, V 型 10 株) が CA-MRSA であり，市中環境由来とされる SCC*mec* タイプ IV 型もしくは V 型の MRSA がほとんどを占めていた．上記の玄関ホールでの結果とも合わせて考慮すると，この結果は，外来の環境

が市中環境と同じであることを如実に反映しており，市中環境から持ち込まれた CA-MRSA が，外来診療に携わる医療従事者を介して病院内に伝播する危険性を含んでいる可能性がある^{45,46)}。

小児科病棟プレイルームの壁面から得られた MRSA は計 5 株であったが，HA-MRSA は 1 株(I 型 1 株)検出されたのみで残りの 4 株は CA-MRSA であった(IV 型 1 株，V 型 3 株)。小児科外来の長椅子ではほとんど MRSA が検出されていないにも関わらず，CA-MRSA が多かったことについては，入院患者との関係等を検討する必要がある。

プレイルームの壁開口部は，廊下からプレイルームが見渡せるようになっている。この開口部は小児のみならず見舞客も高頻度に接触する可能性がある。この壁開口部下縁と遊具は，好気性細菌および *S. aureus* の検出頻度，検出数はいずれにおいても統計学的にほぼ同等であり，高度の細菌汚染が認められた。検出された MRSA 4 株のうち HA-MRSA は 2 株(II 型 2 株)，CA-MRSA は 2 株(IV 型 1 株，V 型 1 株)検出された。さらに，PVL 陽性の MRSA が 1 株(IV 型)検出された。

テトラポッド型遊具では，PVL 陽性 MRSA が 4 株(全て II 型)検出された。チューブ型遊具からは MRSA の SCCmec タイプ II 型が 4 株，V 型が 2 株検出されたが，PVL 陽性株は検出されなかった。小児の入院患者が大量に汗をかくような激しい運動をすることは少ないかもしれないが，手汗などが付着すると細菌の増殖は格段に増加すると予想される。保菌者の接触を避けることは困難であるため，細菌が生息しやすい環境を作らないようにすることが重要である。

MRSA は自然環境で長期間生存することが知られていることから，⁴⁷⁾ 病院環境に MRSA が付着して生存していると，医療従事者をはじめとする病院を利用する人々が何時伝播に関与するか分からず，また院内感染のアウトブレイクが生じた際にもその原因追及が困難を極めることになる。適切な環境清掃を実施することが強く求められる。

今回の調査から，病院内における HA-MRSA と CA-MRSA の分布頻度が確認できた。外来診療棟においては CA-MRSA が多く検出され，入院病棟でも CA-MRSA が検出された。この結果は，外来患者や見舞客らによる CA-MRSA の持ち込みの可能性を強く示唆しており，院内における来院者の動向が院内環境における MRSA の分布に影響を及ぼす要因の一つであることが強く示唆された。

MRSA 感染症は院内感染症として広く認知されているが、市中環境由来の MRSA の検出頻度からも、その対策には外来診療棟の環境対策の徹底がこれまで以上に重要になってくることが証明された。これらの結果を Infection Control Team (ICT) を介して各診療科へフィードバックすることにより、遊具を撤去するなどの対策が取られ、清拭の重要性や徹底についても再度確認が行われた。PVL 陽性株については、本邦ではその検出頻度は非常に少ないことが報告されているが、まだまだ調査の報告は少なく、その動向・病勢など今後さらなる調査が必要と思われる。

総括

院内感染症はこれまでも各施設において対応策が講じられてきたが、現在でも世界中でその発生が報告されている。我が国においても、年間 10000 件を多く超える新規感染症患者が報告されている。これらの事実が示すように、院内感染を防ぐことは非常に困難である。

その要因の一つとして、健常者と易感染者の共存という病院の特異な環境が挙げられる。病院には、入院、外来を問わず、高齢者はもちろん、免疫抑制薬による治療や抗がん剤による治療等を必要とする患者が多数存在する。高齢やこうした治療は、患者の免疫能力を低下させる原因である。すなわち、これらの患者は健常人に比べ易感染状態にある。易感染者においては、健常人には無害な細菌が命を脅かす存在と成りうる。この事実を、医療従事者のみならず、患者はもちろん、患者と接する付き添い人や見舞客も認識しておくことが重要である。そして、それら細菌の伝播は、手すりや椅子など、何気なく普段の生活で触れているもの（高頻度接触表面）を介して起こり得る。医療従事者も例外ではなく、実際、医療従事者が院内感染拡大に寄与していたとする報告もある。

著者は、本研究において、より良い病院環境を構築するための一助となることを目的として2つの項目について調査研究を行った。

まず、感染リスクの迅速なスクリーニング法としての ATP 測定法の可能性について検討するため ATP 測定法を用いた院内環境調査を行った。

現在用いられている細菌検出法としては培養法がもっとも一般的である。しかし、培養法では細菌検出に数日を要し、その間さらなる伝播を阻止することができない。院内感染の拡大を防ぐには、より迅速な感染部位のスクリーニング手段が必要となる。そこで、著者は、感染リスク検出のスクリーニング法として ATP 拭き取り検査に着目した。この検査では、結果判明までに要する時間が約 10 秒と非常に短く、現状を迅速にフィードバックすることができる。そこで、院内環境中の感染源検出における ATP 拭き取り検査の応用について、同一の調査対象箇所に対し ATP 量の測定と培養法による生菌数の計測を行い、両者の関係を調べることから検討した。さらに、ブドウ球菌をターゲットとして当該箇所に存在する細菌の同定と薬剤感受性を検討した。調査対象箇所は、不特

定多数の人が利用する病棟集合トイレ内の高頻度接触表面と、ナースステーションとした。

その結果、調査対象箇所において ATP 量は 350~10,000RLU の高い値を示した。培養法においては 10CFU 以上を示したものは全調査対象箇所の 83% で、薬剤感受性試験から MRSA や MRCNS をはじめとした抗生物質に耐性を有するブドウ球菌属細菌が検出された。ATP 測定法と培養法との間で期待した直接の相関を示す成績を得ることはできなかったが、滅菌器具表面が 40~80 RLU であったことを考慮すると、本研究において調査対象とした箇所は、細菌が生息または生息しやすい環境にあると推察され、感染源となり得ると仮定して問題ないといえる。すなわち、ATP 拭き取り検査は、感染源のスクリーニング法として感染リスクマネジメントの強化に非常に有益なものであるといえる。

ATP ふき取り検査は迅速な検査が可能であり、数値による比較検討が容易で、携帯性の利便性もある。従って、リアルタイムな情報を医療従事者に視覚的に示すことができる。そして、培養法と併用することで情報を補足し合うことが可能であり、より良いリスクマネジメントを考察する情報源として非常に有効な手段の一つであることが証明された。

つぎに、病院内の MRSA 分布における実態調査を行った。

MRSA は院内感染症における原因菌として最も有名であるが、近年では病院由来の MRSA(HA-MRSA)だけでなく、市中環境由来の MRSA(CA-MRSA)の出現も問題視されている。病院は、患者はもちろんその家族、見舞客らなど非常に多くの人々が訪れる。そこで、病院内の HA-, CA-MRSA の実態調査を行うことで、来院者が MRSA の分布に及ぼす影響を考察した。また併せて、Panton-Valentine leukocidin (PVL)陽性 MRSA の検出についても調査した。PVL は白血球に対する特異性が極めて高い毒素で、PVL を有する MRSA は重篤な侵襲性疾患をもたらすとされている。PVL の陽性率は各国で様々であり、地域性などにも関連が見られなかったという報告があることから、各施設での調査が重要である。調査対象箇所は来院者が多く接触すると思われる外来診療棟の待合長椅子を選択し、比較対照として小児科病棟プレイルームを選択した。

調査の結果、小児科外来の長椅子においては、*S. aureus* はほとんど検出されず、そのうち MRSA は HA-MRSA1 株しか検出されなかった。玄関ホールの長椅子は、背もたれでは 100.0% (4/4) , 座面でも 95.0% (19/20) が CA-MRSA で

あった。この結果は、玄関ホールの長椅子において検出された MRSA は CA-MRSA が優位であり、市中環境からの持ち込みによる汚染の可能性が高いことを示唆している。内科外来の長椅子において検出された MRSA のうち、肘掛けでは 81.5%(22/27)、背もたれは 88.9%(8/9)、座面では 78.6%(11/14)が CA-MRSA であった。玄関ホールでの結果とも合わせて考慮すると、この結果は、外来の環境が市中環境と同じであることを如実に反映しており、市中環境から持ち込まれた CA-MRSA が、外来診療に携わる医療従事者を介して病院内に伝播する危険性を含んでいる可能性がある。実際、今回の調査でも入院病棟からも CA-MRSA が検出された。この結果は、来院者による CA-MRSA の持ち込みの可能性を強く示唆しており、院内における来院者の動向が院内環境における MRSA の分布に影響を及ぼす要因の一つであることが強く示唆された。従って、入院病棟だけでなく外来診療棟においても、これまで以上に環境対策の徹底が重要であることが示された。PVL 陽性株は 5 株検出された。本邦ではその検出頻度は少ないとの報告があるが、まだまだ情報が十分とは言えず、これからもその動向や病勢についてさらなる研究が必要である。

以上述べてきたように、ATP 拭き取り検査を用いた感染源の迅速なスクリーニング法の評価と MRSA の実態調査という 2 つの観点から、より良い病院環境を構築するための一助となることを目的として研究を行った。このような調査研究を行う上で重要なことは、結果を公表し、医療従事者の感染に対する意識を向上させることである。実際、本調査結果の一部は院内感染対策部門を通して病院側へフィードバックし、医療従事者間において情報の共有がなされ、小児科プレイルームの遊具の撤去といった危険対応策を具現化に繋がった。

感染対策は非常に困難を極める。そのリスクを少しでも減らすためには、既知の対応策の徹底はもちろん、これまでと同様の対策だけでなく、新しい対応策の考察や、個々の病院における環境データの把握が重要である。国や地域の違いだけでなく、病院の規模や診療部門によってもその環境は異なる。それぞれの病院において、実際に感染リスクとなりうる場所を把握し共有することで、病院全体で感染対策に対する意識を向上していくことが重要である。著者が施行した 2 つの調査研究は、病院内環境の改善、向上に大いに寄与するものと確信する。

引用文献

- 1) Klevens RM, Edwards JR, Richards CL, Horan TC, Gaynes RP, Pollock DA, Cardo DM, Estimating health care-associated infections and death in US hospitals. 2002, *Public Health Rep*, 2007, **122**, 160-166.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention (CDC), “Antibiotic resistance threats in the United States”, CDC, Atlanta, 2013.
- 3) Simor AE, Lee M, Vearncombe M, Jones-Paul L, Barry C, Gomez M, Fish JS, Cartotto RC, Palmer R, Louie M, An outbreak due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a burn unit: risk factors for acquisition and management, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2002, **23**, 261-267.
- 4) El Shafi, SS, Alishaq M, Leni Garcia M, Investigation of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in trauma intensive care unit. *J Hosp Infect*, 2004, **56**, 101–105.
- 5) Markogiannakis A, Fildisis G, Tsiplakou S, Ikonomidis A, Koutsoukou A, Pournaras S, Manolis EN, Baltopoulos G, Tsakris A, Cross-transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal strains causing episodes of sepsis in a trauma intensive care unit, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008, **29**, 410-7.
- 6) Lewis T, Griffith C, Gallo M, Weinbren M, A modified ATP benchmark for evaluating the cleaning of some hospital environmental surfaces, *J Hosp Infect*, 2008, **69**, 156-163.
- 7) 財団法人東京顕微鏡院, 伊藤武, ATPふき取り検査研究会, “新しい衛生管理法 ATPふき取り検査” 改訂版, 月刊HACCP編, 株式会社鶏卵肉情報センター, 東京, 2005.
- 8) Griffith CJ, Cooper RA, Gilmore J, Davies C, Lewis M, An evaluation of hospital cleaning regimens and standards, *J Hosp Infect*, 2000, **45**, 19-28.
- 9) Malik, RE, Cooper, RA, Griffith CJ, Use of audit tools to evaluate the efficacy of cleaning systems in hospitals, *Am J Infect Control*, 2003, **31**, 181-189.

- 10) Shibata H, Shirakata C, Kawasaki H, Sato Y, Kuwahara T, Ohnishi Y, Arakaki N, Higuti T, Flavone markedly affects phenotypic expression of beta-lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated clinically, *Biol Pharm Bull*, 2003, **26**, 1478-1483.
- 11) Clinical and Laboratory Standards Institute, “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twentieth Informational Supplement. Vol 30. M100-S20”, CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2010.
- 12) Clinical and Laboratory Standards Institute, “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-First Informational Supplement. Vol 31. M100-S21”, CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2011.
- 13) 石井良和, 薬剤感受性試験とブレイクポイント, その問題点と今後の展望, 日化療会誌, 2011, **59**, 454-459.
- 14) 木野邦器, 4. 微生物資源からの有用機能開発, *Microbiol Cult Coll*, 2006, **22**, 149.
- 15) Chen F-C, Godwin SL, Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers’ refrigerators, *J Food Protect*, 2006, **69**, 2534-2538.
- 16) Perez-Rodriguez F, Posada-Izquierdo GD, Valero A, Garcia-Gimeno RM, Zurera G, Modelling survival kinetics of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel surfaces soiled with different substrates under static conditions of temperature and relative humidity, *Food Microbiol*, 2013, **33**, 197-204.
- 17) 柴田洋文, 谷勇, 細菌芽胞の発芽開始機構, 日細菌誌, 1983, **38**(特), 27-30.
- 18) Von Eiff C, Becker K, Machk K, Stammer H, Peters G, Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study group, *N Engl J Med*, 2001, **344**, 11-16.
- 19) Baker CJ, Why has methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* become such a successful pathogen? A pediatric perspective, *Infect Dis Clinic Pract*, 2010, **18**, 231-234.

- 20) Breathnach AS, Cubbon MD, Karunaharan RN, Pope CF, Planche TD, Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in two hospitals: association with contaminated hospital waste-water systems, *J Hosp Infect*, 2012, **82**, 19-24.
- 21) Kramer A, Schwebke I, Kampf G, How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review, *BMC Infect. Dis*, 2006, **6**, 130.
- 22) Bhalla A, Pultz NJ, Gries DM, Ray AJ, Eckstein EC, Aron DC, Donskey CJ, Acquisition of nosocomial pathogens on hands after contact with environmental surfaces near hospitalized patients, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2004, **25**, 164-167.
- 23) Boyce JM, Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection, *J Hosp Infec*, 2007, **65**, 50-54.
- 24) Hedin G, Bromkvist A, Janson M, Lindblom A, Occurrence of potentially pathogenic bacteria on the hands of hospital patients before and after the introduction of patient hand disinfection, *APMIS*, 2012, **120**, 802-807.
- 25) Said-Salim B, Mathema B, Kreiswirth BN, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2003, **24**, 451-455.
- 26) Watkins RR, David MZ, Salata RA, Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J Med Microbiol*, 2012, **61**, 1179-1193.
- 27) Chen LF, Chastain C, Anderson DJ, Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infections: Management and Prevention, *Curr Infect Dis Rep*, 2011, **13**, 442-450.
- 28) Miller LG, Perdreau-Remington F, Rieg G, Mehdi S, Perlroth J, Bayer AS, Tang AW, Phung TO, Spellberg B, Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles, *N Engl J Med*, 2005, **352**, 1445-1453.
- 29) Kravitz GR, Dries DJ, Peterson ML, Schlievert PM, Purpura fulminans due to *Staphylococcus aureus*, *Clin Infect Dis*, 2005, **40**, 941-947.

- 30) Mcgrath, B, Rutledge Fionna, Broadfield E, Necrotising pneumonia, *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine leukocidin, *Journal of the Intensive Care Society*, 2008, **9**, 170-172.
- 30) Farr AM, Aden B, Weiss D, Nash D, Marx MA, Trends in hospitalization for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in New York City, 1997-2006: data from New York State's Statewide Planning and Research Cooperative System, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2012, **33**, 725-731.
- 31) Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN, Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA), *Curr Opin Microbiol*, 2012, **15**, 588-595.
- 32) Yu F, Chen Z, Liu C, Zhang X, Lin X, Chi S, Zhou T, Chen Z, Chen X, Prevalence of *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalised patients in China, *Clin Microbiol Infect*, 2008, **14**, 381-384.
- 34) Monecke S, Slickers P, Ellington MJ, Kearns AM, Ehricht R, High diversity of Panton-Valentine leukocidin-positive, methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* and implications for the evolution of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*, *Clin Microbiol Infect*, 2007, **13**, 1157-1164.
- 35) Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O'Connell B, Coleman DC, The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (*pvl*) reveal that *pvl* is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland, *J Clin Microbiol*, 2007, **45**, 2554-2563.
- 36) Kim JS, Park JS, Song W, Kim HS, Cho HC, Lee KM, Kim EC, Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* isolated from blood in Korea, *Korean J Lab Med*, 2007, **27**, 286-291.
- 37) Hsu L-Y, Koh T-H, Kurup A, Low J, Chlebicki MP, Tan B-H, High Incidence of Panton-Valentine Leukocidin-Producing *Staphylococcus aureus* in a Tertiary Care Public Hospital in Singapore, *Clin Infect Dis*, 2005, **40**, 486-489.

- 38) Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, Koyuncu E, Dolapci I, Akan OA, Investigation of Panton-Valentine leukocidin genes and SCCmec types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey, *Microb Drug Resist*, 2008, **14**, 203-210.
- 39) Skiest DJ, Brown K, Cooper TW, Hoffman-Roberts H, Mussa HR, Elliott AC, Prospective comparison of methicillin-susceptible and methicillin-resistant community-associated *Staphylococcus aureus* infections in hospitalized patients, *J Infect*, 2007, **54**, 427-434.
- 40) Baggett HC, Hennessy TW, Rudolph K, Bruden D, Reasonover A, Parkinson A, Sparks R, Donlan RM, Martinez P, Mongkolrattanothai K, Butler JC, Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Panton-Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska, *J Infect Dis*, 2004, **189**, 1565-1573.
- 41) Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K, Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions, *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, **51**, 264-274.
- 42) Lina G, Piémont, Godial-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J, Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia, *Clin Infect Dis*, 1999, **29**, 1128-1132
- 43) Boyce JM, Potter-Bynoe G, Chenevert C, King T, Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1997, **18**, 622-627.
- 44) Noble WC, Dispersal of skin microorganisms, *Br J Dermatol*, 1975, **93**, 477-485.
- 45) Oie S, Hosokawa I, Kamiya A, Contamination of room door handles by methicillin-sensitive/methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J Hosp Infect*, 2002, **51**, 140-143.
- 46) 東野 督子, 神谷 和人, ICUにおける患者療養環境への methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* の汚染状況, *環境感染誌*, 2015, **30**, 309-316.

- 47) 東野 督子, 神谷 和人, 医療施設で使用される資材や器材に付着した methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の各種温度条件における生存性. 環境感染誌, 2011, **26**, 67-73.

謝辞

論文作成だけでなく、学会発表においても、御指導、御鞭撻を賜りました、徳島大学 大学院医歯薬学研究部 医科学部門 内科系 臨床薬剤学分野 石澤啓介教授に深謝します。

修士課程から、公私にわたり御指導、御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院 医歯薬学研究部臨床薬学実務教育学分野 川添和義教授に深謝します。

微生物学に全く縁がなかった私に一からていねいに御指導、御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院 医歯薬学研究部臨床薬学実務教育学分野 柴田洋文助教に深謝します。

公私にわたり、特に学会発表時には本当にご尽力いただきました、徳島市民病院 伏谷秀治氏に深謝します。

最後にこれまでどんな時も暖かく見守ってくださった両親、姉に感謝致します。