

〈原 著〉

画像データを利用した蛍光マーカーの定量的ふき取り評価方法の検討

黒図 肇^{1,2)}・菅原えりさ²⁾・佐伯 康弘²⁾
梶浦 工²⁾・木村 哲²⁾

A Quantitative Fluorescent Marker Method for Evaluation of Surface Cleanliness Using Digital Image Data

Hajime KUROZU^{1,2)}, Erisa SUGAWARA²⁾, Yasuhiro SAEKI²⁾,
Takumi KAJIURA²⁾ and Satoshi KIMURA²⁾

¹⁾Rejoice-company CO., Ltd., ²⁾Division of Infection Prevention and Control, Division of Postgraduate School of Healthcare Tokyo
Healthcare University

(2022 年 4 月 13 日受付・2022 年 5 月 31 日受理)

要 旨

医療環境の清掃を評価する方法の一つである蛍光マーカー法は安価で簡便でリアルタイムに清掃状態を可視化できるが評価は定性的で微生物除去との関連性も十分検討されていない。そこで今回写真画像に着目し蛍光マーカー (Fm) を撮影した画像のピクセル値 (PX) を用いた定量法の構築と微生物 (Bc) 除去率との関連性を検討した。まず「ピクセル上の Fm 量の増加に従い PX 値は最大 PX 値 (255) に対して指数関数的に漸近する」との仮説式により総 Fm 量 (Xt) を算出した。次に市販の Fm の希釈液の一定量を塩化ビニール黒、白、ステンレス (S) の 3 種の基板に塗布しデジタルカメラで撮影してその各画像の PX から Xt を算出し実塗布量との相関係数 R から仮説式を検証した。Bc 除去率には *Staphylococcus aureus* を使用した。白、S の各板上に Bc および Fm を隣接塗布し含水ワイプで一方方向にふき取りその後の Fm と Bc の各除去率を算出した。結果、仮説式に基づき算出した Xt と実塗布量は良好な相関性 (黒、白、S 板上での相関係数は各々 0.99, 0.99, 0.99) を示した。また白、S 板上の Bc、Fm の各除去率の決定係数は各々 0.46, 0.61 であった。一方 Fm 除去率 90% 以上に限れば Bc 除去率との一致性は良好な傾向を示した。これらより Fm 量を画像データから定量化することは可能であることが検証された。

Key words : 清掃評価, 蛍光マーカー法, 定量評価, 画像データ, ピクセル値

序 文

医療施設において医療関連感染 (Healthcare associated infections, HAI) は、重要な課題で、HAI の推定 20~40% は、医療従事者の患者や汚染された環境表面の接触による交差感染であるとの報告がある¹⁾。また、先に病室を利用していた患者がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌やバンコマイシン耐性腸球菌を保菌していた場合、次にその病室を利用した患者がそれらの微生物を獲得する可能性が高いなど^{2~4)}、微生物に汚染された環境表面

からの医療関連感染について多数の報告がある^{5~7)}。

CDC Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities⁸⁾ は、高頻度接触表面に対して頻繁に清掃・消毒することを推奨し (カテゴリー II), CDC Prevention Toolkits Options for Evaluating Environmental Cleaning⁹⁾ も同様に、高頻度接触表面の清掃を徹底するためのプログラムの開発を奨励している。これらのことから医療施設は、効果的な清掃・消毒の方法を策定することに加えて、それらが適切に実施されているかを評価することが求められる。現在その評価方法には、直接作業観察法、微生物検査法、ATP (adenosine triphosphate) 法、蛍光マーカー法の 4 つがある。それ

¹⁾株式会社リジョイスカンパニー, ²⁾東京医療保健大学大学院医療保健学研究科感染制御学領域

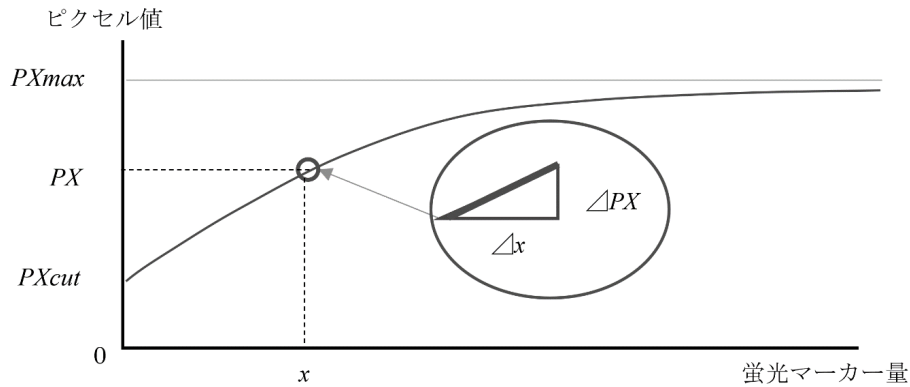


図1 ピクセル値と蛍光マーカー量の関係図

PX_{max} : 最大ピクセル値

PX : マーカー量 x の時のピクセル値

PX_{cut} : カットオフとなるピクセル値, 塗布前のピクセル値のヒストグラムにおいて累積相対度数が99.99%となる値

曲線: ピクセル上の蛍光マーカー量に対し観測されるピクセル値. 蛍光マーカー量が増えるに従い PX_{max} に漸近していく.

円内の図: 曲線上のある1点(丸)の拡大図. 微量な蛍光マーカー量の増分 (Δx) に対するピクセル値の増分 (ΔPX) を表している. 仮説では, ピクセル値を連続変数として, この時の増分率 ($\Delta PX / \Delta x$) は PX_{max} とその点のピクセル値 (PX) との差分 ($PX_{max} - PX$) に比例 (比例定数 k) すると仮定した.

ぞれ目的に応じて使用するが, より簡便で安価で可視化しやすいのが蛍光マーカー法である. しかし, 評価は目視で判断するため定性的で客観性に乏しい.

そこで, 本研究では, 蛍光マーカーそのものをデジタルカメラで画像化し, そのピクセル(画素)値を活用した定量評価方法の構築を試みた. また, 微生物学的データとの関連性を明らかにすることで, 清掃評価方法としての有用性について検討した.

材料と方法

1. 蛍光マーカー量とピクセル値に関する仮説と仮説式の立案

デジタルカメラの画像データから得られたピクセル値は, 光量により0から255の値を取る. 0は最も暗く, 255は最も明るい状態を表している. そこで, 蛍光マーカー量をピクセル値から推定する以下のような仮説に基づき仮説式を立案した.

画像データ上の1つピクセルに注目し, そのピクセル上の蛍光マーカー量 (x) とそのピクセル値 (PX) について次のような仮説を立てた.

(1) 一定ピクセル値以下をカットオフ値* (PX_{cut}) とし, PX_{cut} 以下のピクセル値を除外する. ピクセル上に蛍光マーカーが存在すれば, カットオフ値以上の値が蛍光マーカー量 (x) に関連している.

(2) 本来 PX 値はデジタル値であるが, 仮説の中では連続値として考える.

(3) 図1は, 蛍光マーカー量 (x) に対応するピクセル

値 (PX) における微量な蛍光マーカー量の増分 (Δx) に対するピクセル値の増分 (ΔPX) を表している. この時の増分率 ($\Delta PX / \Delta x$) は PX_{max} とその点のピクセル値 (PX) との差分 ($PX_{max} - PX$) に比例 (比例定数 k) する.

*カットオフ値

塗布前の画像データからカットオフ値を算出する. 図2で示すように塗布前のピクセル値のヒストグラムにおいて累積相対度数が全度数の99.99%となる値をカットオフ値と定め, カットオフ値以下のピクセル値をゼロにする.

上記の3つの仮説に基づくと, 下記の微分方程式(1)が成り立つ.

$$\frac{dPX}{dx} = k \cdot (PX_{max} - PX) \cdots (1)$$

ここで PX_{max} は最大ピクセル値 (=255) を表す.

上記(1)式は変数分離形の微分方程式となるので, 以下の積分形に書き換えられる.

$$\int \frac{1}{(PX_{max} - PX)} dPX = \int k dx$$

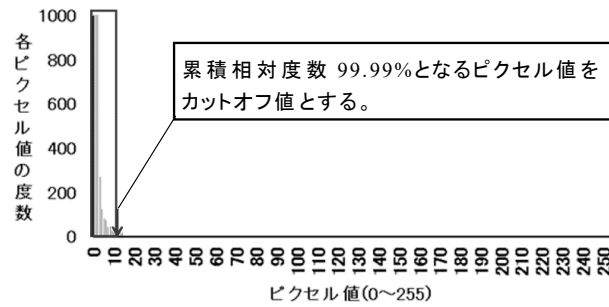
上記不定積分式を解くと以下のようになる. (Const. は積分定数)

$$-\log (PX_{max} - PX) = k \cdot x + Const.$$

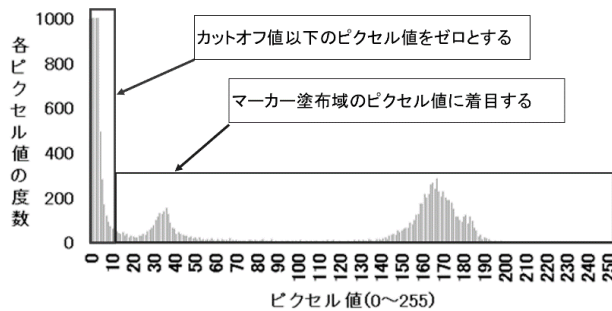
カットオフ条件である $x=0$ の時, $PX = PX_{cut}$ を加えて解くと, Const. は

$$Const. = -\log (PX_{max} - PX_{cut})$$

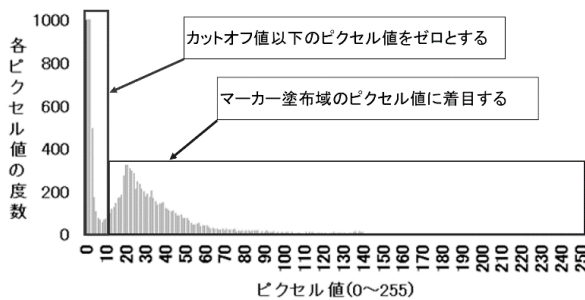
となり, 元の式に戻し変形すれば,



塗布前



ふき取り前



ふき取り後

図2 塗布前およびふき取り前後のピクセル値のヒストグラムと画像データ
右側の画像のピクセル値を Python にて算出しヒストグラムを作成

$$\log \left(\frac{PX_{max} - PX_{cut}}{PX_{max} - PX} \right) = k \cdot x$$

これをマーカー量 (x) について解くと、以下の (2) 式が得られる。

$$x = \frac{1}{k} \log \left(\frac{PX_{max} - PX_{cut}}{PX_{max} - PX} \right) \cdots (2)$$

(2) 式は 1 個のピクセル上のマーカー量とピクセル値の関係式を表している。

全体のマーカー量 X_t , 各ピクセル上のマーカー量を x_i , 対象ピクセル数を N , 各ピクセルのピクセル値を PX_i

とすれば,

$$X_t = \sum_{i=1}^N x_i = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^N \log \left(\frac{PX_{max} - PX_{cut}}{PX_{max} - PX_i} \right) \cdots (3)$$

となる。ここで、検証値 Y を以下のように定義すると

$$Y = \sum_{i=1}^N \log \left(\frac{PX_{max} - PX_{cut}}{PX_{max} - PX_i} \right) \cdots (4)$$

(3) 式は

$$X_t = \frac{Y}{k} \cdots (5)-1$$

$$k = \frac{Y}{X_t} \cdots (5)-2$$

$$Y = k \cdot X_t \cdots (5)-3$$

となる。

以上が仮説から導いた関係式である。(5)-3式に示されたように X_t と Y とが比例するならば仮説が成立する。これにより、ふき取り前後の画像データ（ピクセル値）からマーカー量の定量的評価が可能となる。

なお、ピクセル値、ヒストグラムデータ、各式の値等の算出には、プログラム言語 Python にて画像データ処理プログラムを作成し本検討に使用した。

2. 仮説式の検証実験

仮説の検証実験は、実際の医療現場で汎用されている蛍光マーカーを一定条件で処理した後デジタルカメラで撮影し、その蛍光マーカー画像のピクセル値を、前項で立案した仮説式（(5)-3式）で検証した。

1) 検証実験に用いた材料

蛍光マーカー（Diversey VeriClean[®]シーバイエス）を塗布する背景色は、色によるバイアスを避けるため、今回は無彩色の、黒（塩化ビニール板（板厚 1 mm, サイズ 200 mm×300 mm）：塩ビ黒板）、白（塩化ビニール板（同サイズ）：塩ビ白板）および灰色（ステンレス板（同サイズ）：ステンレス板）の 3 色を用いた。

その上に載せた透明アクリル板（板厚 1 mm, サイズ 110 mm×150 mm）に蛍光剤を塗布し撮影した。撮影はデジタルカメラ（Canon EOS70D[®]）を使用した。今回供試した蛍光マーカーの励起波長範囲は 420~440 nm、蛍光波長は 440~550 nm に分布し、485 nm 付近に極大値を持つ。またこの度使用した UV ライト（Beesum UV100[®]）の波長は 209.5, 239, 276, 349 (nm) に極大値を持つため、蛍光マーカーの蛍光特性を考慮し（マーカーの蛍光波長範囲下限側の UV ライト由来による光をノイズとしてカットするため）カメラレンズには 450 nm 以下の波長をカットする光学フィルター（短波長カットフィルター VIS450 nm[®], 朝日分光）を取り付けた。

2) 実験用蛍光マーカーとサンプル数

蛍光マーカーの定量評価をするための評価域としては、原液濃度の 25%, 10%, 5%, 2.5% 及び 1% とし、消毒用エタノール（富士フイルムワコーケミカル）にて希釈した液 10 μ L を透明アクリル板上に直径約 10 mm の円状に塗布し、室温で約 30 分間乾燥させた。

サンプル数については、各濃度の蛍光マーカーを塩ビ黒板、塩ビ白板は各 16 塗布、ステンレス板は 5 塗布準備し、3つの背景色別に 1 塗布につき 1 回撮影した。従って、各塩ビ板では 80 画像（5 種の濃度×16 撮影数）、ステンレス板は 25 画像（5 種の濃度×5 撮影数）を分析対象とした。

3) 撮影方法

図 3 に示したような撮影環境を準備した。被写面となる平面上に背景色となる塩ビ黒板、塩ビ白板、ステンレス板を敷き、その上の中央にマーカーを塗布した透明アクリル板を置いた。UV ライトは固定アームを用い、デジタルカメラのファインダーに反射光が映り込まないように、被写面から高さ 15 cm、垂直方向に対して 20° の角度にセットした。レンズに光学フィルターを取り付けたデジタルカメラは、ピントが合うようにマーカー塗布面から真上となる 22 cm の高さに固定し、撮影時は全体を暗幕で覆った。

4) 解析方法

撮影した各濃度の画像より実測ピクセル値から (4) 式を用いて Y 値を算出し、一番高い濃度（25%）の Y 値を 100 として他の 4 種の濃度の Y 値の相対値を算出した。蛍光マーカーの濃度を横軸に Y 値の相対値を縦軸にプロットし各背景色別の相関係数を求め、(5)-3 式の妥当性を評価した。なお、カットオフ値は、各濃度の撮影の度に蛍光マーカー未塗布の表面を撮影し、その画像のピクセル値より算出した。

3. 蛍光マーカー除去率と細菌除去率の相関

実際の清掃作業を想定したふき取り実験モデルで得た蛍光マーカー画像と細菌データから、蛍光マーカー除去率と細菌除去率の相関について検討した。

1) 使用材料

蛍光マーカー、UV ライト、デジタルカメラ、暗幕の撮影環境は「仮説式の検証実験」同様で、背景色は塩ビ白板およびステンレス板の 2 色とした。供試菌には *Staphylococcus aureus* ATCC6538 を用い、Soybean-Casein Digest (SCD) 寒天培地（SCD 寒天培地 アテクト）で 30℃ 約 24 時間培養後の発育コロニーをかき取り、リン酸緩衝液（pH7.2）（アテクト）内で十分攪拌した菌混濁液にウシ血清アルブミン（Bovine serum albumin, BSA）液を添加し、0.3%BSA 含有の約 10⁹ CFU/mL 菌液を調製した。

準備した清拭ワイプ（ワイプオール[®]X60 4つ折り[®] 335 mm×343 mm 日本製紙）を用い、1枚あたりに滅菌精製水（吉田製薬）を約 17 mL 含浸させた。ふき取り加重は、通常大人がワイプを持ってふき取る時の重さ（研究者測定）から 3 種の基準値（500 g, 1,000 g, 1,500 g）を設定し、それに相応する重りとして、プラスチックトレイ（411 g）、プラスチックトレイ+500 mL ペットボトル 1 本（952 g）、プラスチックトレイ+500 mL ペットボトル 2 本（1,502 g）を使用した。尚、プラスチックトレイはそれ自体を重りとして使用することのほか、ペットボトル使用時における荷重の偏りを抑えるために使用した。

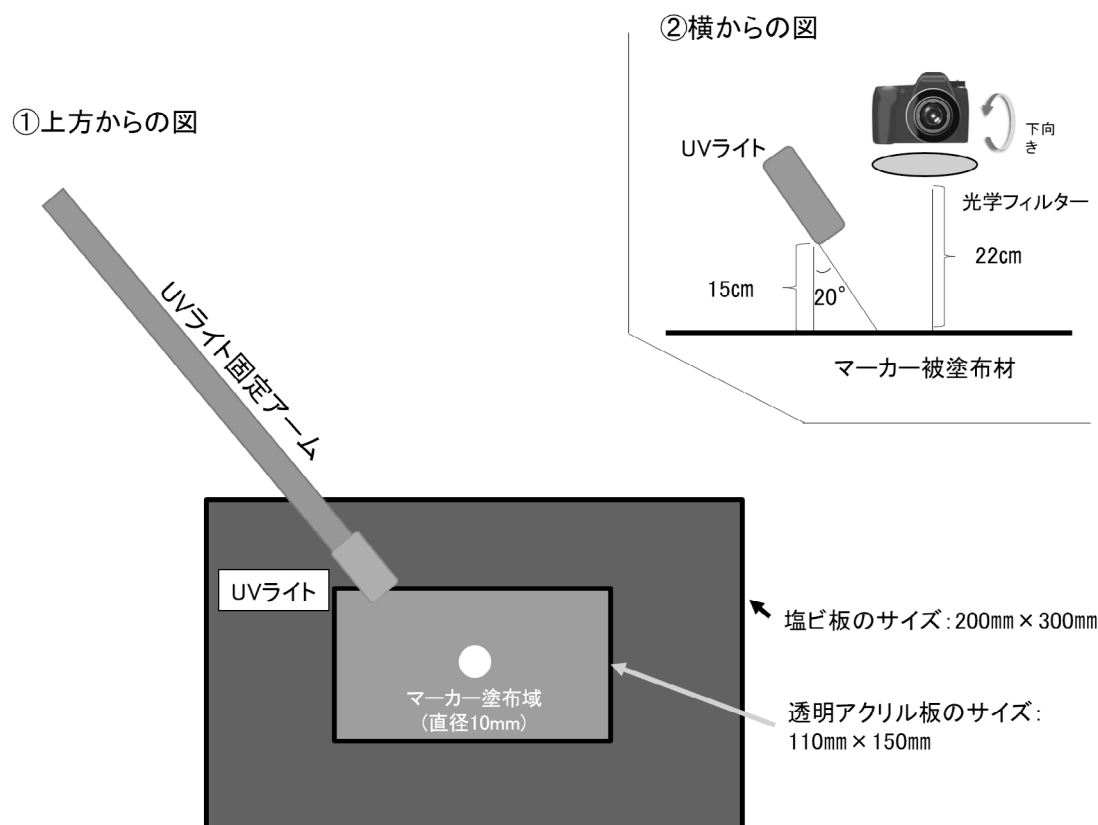


図3 蛍光マーカーの撮影条件

被写面となる平面上に背景色となる塩ビ黒板、塩ビ白板、ステンレス板を敷き、その上の中央にマーカーを塗布した透明アクリル板を置いた。

UVライトは固定アームを用い、デジタルカメラのファインダーに反射光が映り込まないように、被写面から高さ15cm、垂直方向に対して20°の角度にセットした。

レンズに光学フィルターを取り付けたデジタルカメラは、ピン트가合うようにマーカー塗布面から真上となる22cmの高さに固定し、撮影時は全体を暗幕で覆った。

2) 実際の清掃作業を想定したふき取り実験モデル

図4に示したように、マーカーレーン(A)、細菌レーン(B)、細菌(細菌を含んだ培養液、コントロール)レーン(C)の3レーンを設定し、A点とB点の距離は3cm、B点からC点は5.5cmとした。レーンのサイズは3cm×8cmである。

ふき取り開始地点にレーン全体を覆うようにふき取りワイプを敷き、一定加重で一方向に一定の力(研究者手動)でレーンの端(矢印先端)まで1.5秒間かけて牽引した。

3) データ収集、培養、撮影の方法

供試菌の採取と培養は以下のように実施した。

ふき取り前データ(コントロール)は、図4に示したように、B点とC点に、供試菌液10μLを直径約10mmの円状にそれぞれ塗布し、乾燥時間の短縮のため30℃のインキュベータ内で約15分間放置して菌液を乾燥させた。乾燥後、C点を含むコントロールレーンを回収液(0.05%ポリソルベート80含有リン酸緩衝液(PH

7.2))に含浸させた滅菌綿棒(栄研)で拭き取り回収した。菌数測定は、回収綿棒を10mLの回収液中で1分間ボルテックスし、リン酸緩衝液で10~1,000倍希釈し、各0.1mLをSCD寒天培地に塗布し、30℃48時間培養後、発育コロニーをカウントして菌数を算出した。

マーカーのコントロールデータは、塗布前のAレーンを撮影した画像と、25%濃度の蛍光マーカー10μLを直径約10mmの円状に塗布し、室温で約30分間乾燥させた後、A点を含むマーカーレーン撮影域の画像とした。尚、撮影方法は、上述と同様の方法で行った(図3)。

次に、上述2)で示した方法にてふき取った後、A点を含むマーカーレーン及びB点を含む細菌レーンを、それぞれ同様の方法で撮影、及び菌数を求めた。

なお、交差汚染を防止するために、供試菌回収の度に、細菌レーンおよびコントロールレーンは消毒用エタノールで消毒した。

この一連の手順を、加重を変えて、塩ビ白板では、411

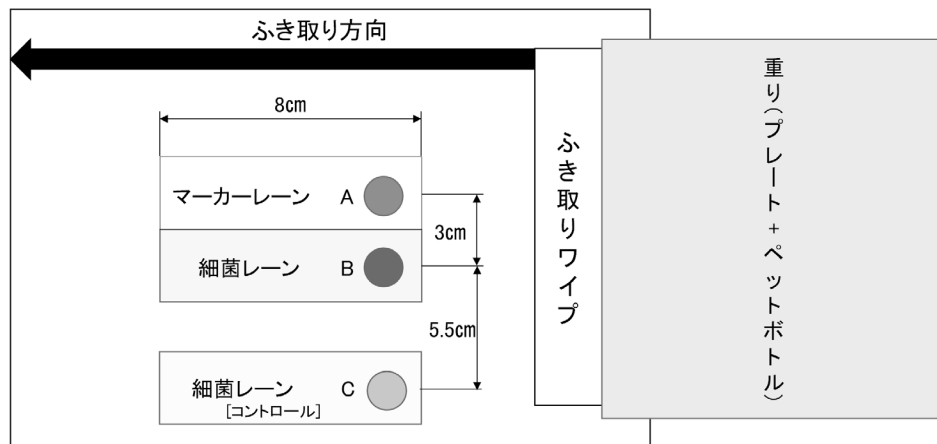


図4 蛍光マーカーと細菌のふき取り実験図

3cm×8cm サイズのマーカーレーン (A)、細菌レーン (B)、細菌 (コントロール) レーン (C) を設定し、A 点と B 点の距離は 3cm、B 点から C 点は 5.5cm とした。
レーン全体を覆うふき取りワイプの上に重りを載せ、1.5 秒で一定の方向と力でレーンの端（矢印先端）まで引く。

g を 3 回、952 g を 5 回、1,502 g を 4 回の計 12 回、ステンレス板では、411 g を 4 回、952 g を 5 回、1,502 g を 3 回の計 12 回をそれぞれ実施した。

4) 解析方法

マーカー除去率は、塗布前の画像とふき取り前後の画像データから算出した。すなわち、マーカー塗布前画像データから PX_{cut} を算出し、ふき取り前画像データから (5)-2 式の k 値を算出した。得られた PX_{cut} 、 k の値を用い、ふき取り後画像データから (4) 式、(5)-1 式より、残存しているマーカー量 X_2 を算出した。塗布したマーカー量 X_1 と残存マーカー量 X_2 から、下記の式によりマーカー除去率を求めた。

$$\text{マーカー除去率}(\%) = (1 - X_2/X_1) \times 100 \cdots (6)$$

また、細菌除去率は、コントロールレーンのコロニー数を Z_1 、清掃操作による拭き取り後の細菌レーンのコロニー数を Z_2 とし、下記の式により求めた。

$$\text{細菌除去率}(\%) = (1 - Z_2/Z_1) \times 100 \cdots (7)$$

2 色の背景色別にマーカー除去率を横軸に細菌除去率を縦軸にプロットし決定係数 R^2 を求めた。また、マーカー除去率に対する細菌除去率の相対値を縦軸に、マーカー除去率を横軸としたグラフを作成した。このグラフにより除去率に関連した両除去率の近似性の傾向を示すことができる。

結 果

1. 仮説式の検証実験

仮説より、塗布マーカー量 X_t と (4) 式で求めた検証値 Y は (5)-3 式 $Y = k \cdot X_t$ のように比例することが示されている。このことより、塩ビ黒板 ($n=80$)、塩ビ白板 ($n=80$)、ステンレス板 ($n=25$) について塗布マ

ーカー量 X_t と X_t の最高濃度時の Y 値を 100 とした相対値について回帰直線を求めたところ、図 5 に示したように、いずれも 0.99 以上の相関係数を示す強い直線的な関連性が確認された。すなわち、マーカー量とピクセル値との仮説から得られる (5)-3 式は実測と整合し、仮説の妥当性が検証され、画像データから塗布された蛍光マーカー量を定量化できることが示された。

2. 蛍光マーカー除去率と細菌除去率の相関

塩ビ白板、ステンレス板におけるマーカー除去率を (6) 式より求めた。また、同時に行った細菌除去率は (7) 式により求めた。図 6 に示したように横軸にマーカー除去率、縦軸に細菌除去率をプロットしたところ、塩ビ白板では 0.46、ステンレス板では 0.61 の、決定係数 R^2 を示す関連性がそれぞれ確認された。

また、マーカー除去率と細菌除去率との相関について、マーカー除去率に対する両除去率の比 (%) をプロットしたところ、図 7 に示したように、塩ビ白、ステンレス共に 90% 以上のマーカー除去率においては、細菌除去率との一致性が向上する傾向にあった。つまり、しっかりとふき取り操作時には細菌除去率も高くなることが推測される結果であった。

考 察

医療環境の清掃評価において、蛍光マーカーによる評価法は手軽に利用されているが、主観的、定性的であることから、比較や基準は施設内など特定のグループ内に限定せざるを得ない。しかし、安価で簡便な蛍光マーカーのメリットを有効利用すべく、蛍光マーカーをデジタルカメラで撮影した画像データのピクセル（画素）値を活用し、定量化する方法を検討した。蛍光マーカーで定量

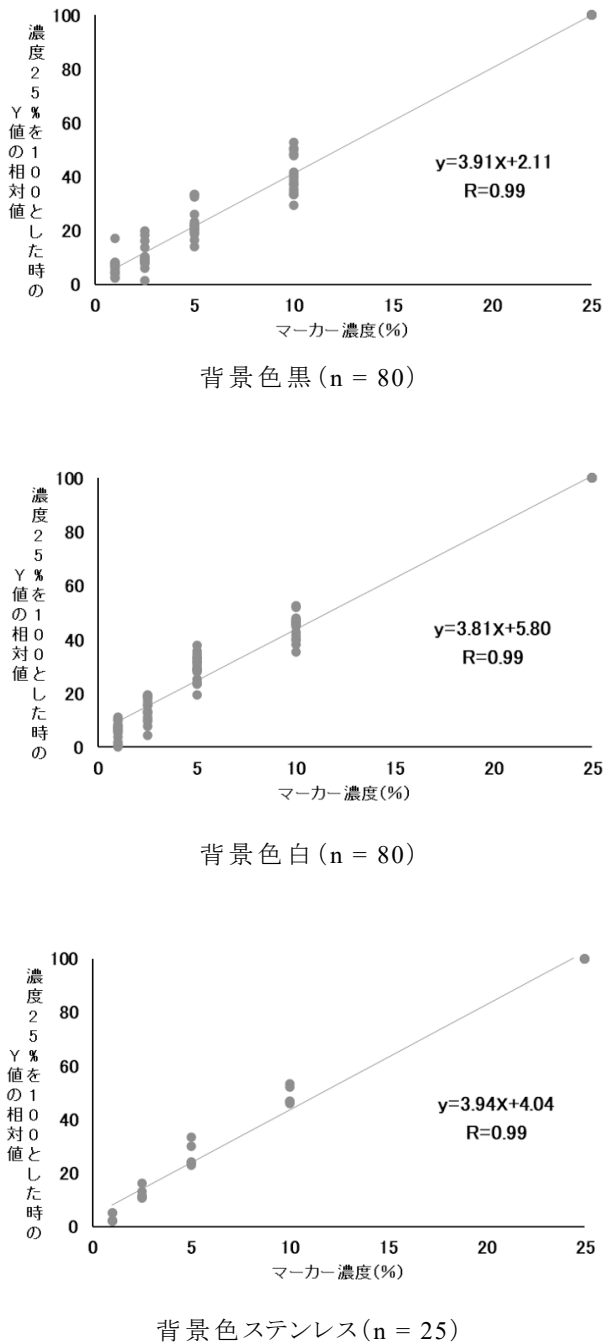


図5 背景色別の仮説式の検証結果

背景別にマーカー量 X_i に対する検証値 Y との回帰直線。 X_i と Y とが比例するならば仮説が成立する。

評価法を確立できれば、国内の清掃業務基準の標準化や国際的な標準化を推進する身近な道具として期待できる。

画像データをピクセル値で処理するにあたり、仮説としてピクセル上の蛍光マーカー量が増加するに従いピクセル値は最大ピクセル値 (255) に対し指数関数的に漸近することを数式で表した。それを実験的に検証した結果、蛍光マーカー量とピクセル値は背景色3色 (黒、白、ステンレス) において強い相関で漸近することが証明さ

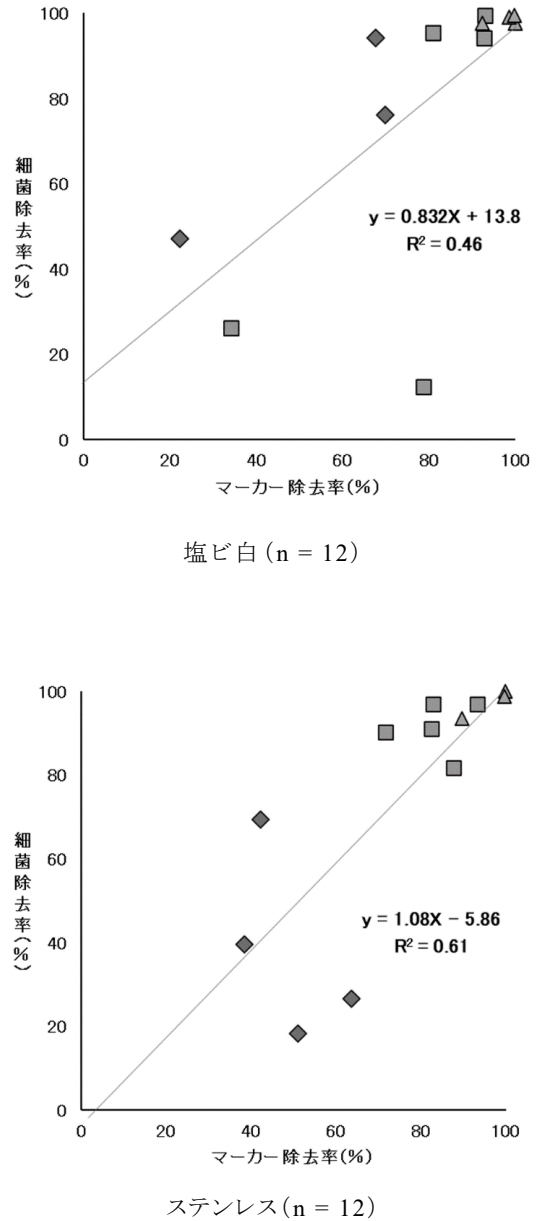
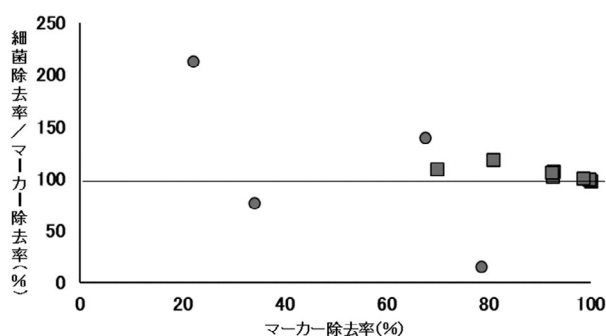


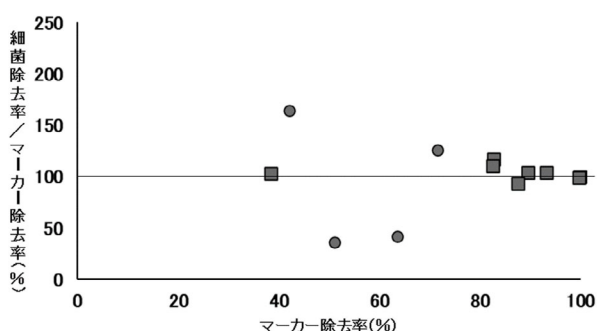
図6 マーカー除去率と細菌除去率の比較
ふき取り時の加重: ◆ 411g ■ 952g ▲ 1502g

れた。これは、蛍光マーカー画像をピクセル値で定量的に評価することを可能とする、本研究の目的の第1歩を達成したものである。

しかしながら、今回の検証実験にはいくつかの課題がある。実験で使用した市販の蛍光マーカーは汎用されているものであるが、詳細な成分については非公開であった。今後基礎データの収集にあたっては、現在臨床現場で使用されているものに限らず、安全性が担保された上で成分の明らかな蛍光剤を吟味する必要がある。また、光源によっては画像データにノイズとして影響を与える。今回使用したUVライトは長時間使用で徐々に光量低下がみられ、光量低下がデータにどの程度影響したか



塩ビ白 (n = 12)



ステンレス (n = 12)

図7 マーカー除去率と細菌除去率の一致性

●細菌除去率/マーカー除去率 (%) 比が100%から±20%以上離れているサンプル

■細菌除去率/マーカー除去率 (%) 比が100%から±20%未満のサンプル

細菌除去率/マーカー除去率 (%) 比をそのマーカー除去率に従ってプロットした。

塩ビ白、ステンレス共に高いマーカー除去率 (90% 以上) 時に細菌除去率との一致性が見られる傾向にあった。

は不明ではあるが、より安定した光源下でのデータ収集については論を待たない。さらに、今回使用した背景色は3色 (白色、黒色、ステンレス) のみであったが、現実には多様な色があり、また環境表面の材質・形状も多様であるため、それらを想定した検討が必要である。

さて、医療関連感染対策における病院清掃への期待として、環境表面の微生物の低減がある。今回の検討では、蛍光マーカーの除去率と細菌除去率の相関は必ずしも強いとは言えなかった。

医療施設における清拭による環境清浄化において、消毒を目的にするには消毒薬の使用は欠かせない^{10,11)}。今回の検討は、消毒薬は使用せずふき取りによる微生物除去に重点を置いたもので、塩ビ板、ステンレス板ともにマーカー除去率が90%以上であれば細菌も同様に除去された。この結果は、汚れを強い力で取り除くことがで

きれば微生物の除去にもつながることを可視化したものであり、有用な情報である。一方、90%以下の低い除去率では相対値にばらつきが見られた。これは比較的弱い力でふき取った結果を意味し、弱い力では、汚れへの密着が弱く荷重も不均一になりやすいことが推測された。

最後に、今回の検討は蛍光マーカー量とピクセル値に関する仮説の理論形成と、その実証を目的とした基礎的検討である。簡便で身近な蛍光マーカーを活用した定量評価の可能性が見いだせたことは有用であり、将来の実用化に向けた発展が期待される。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- 1) Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E: Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: Norovirus, Clostridium difficile, and Acinetobacter species. *Am J Infect Control* 2010; 38: S25-33.
- 2) Huang SS, Datta R, Platt R: Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants. *Arch Intern Med* 2006; 166: 1945-51.
- 3) Drees M, Snyderman DR, Schmid CH, Barefoot L, Hansjosten K, Vue PM, *et al.*: Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 678-85.
- 4) Shaughnessy MK, Micieli RL, DePestel DD, Arndt J, Strachan CL, Welch KB, *et al.*: Evaluation of hospital room assignment and acquisition of Clostridium difficile infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011; 32: 201-6.
- 5) Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Meitus I, Navon-Venezia S, Carmeli Y: Environmental contamination by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 177-81.
- 6) Shimose L, Masuda E, Sfeir M, Caban AB, Bueno MX, de-Pascale D, *et al.*: Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii: Concomitant Contamination of Air and Environmental Surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016; 37: 777-81.
- 7) Gavalda L, Pequeño S, Soriano A, Dominguez A: Environmental contamination by multidrug-resistant microorganisms after daily cleaning. *Am J Infect Control* 2015; 43: 776-8.
- 8) CDC Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities: <https://www.cdc.gov/mmwr/PDF/RR/rr5210.pdf>. accessed March 18, 2022.
- 9) Guh A, Carling P: Environmental Evaluation Workgroup: Options for Evaluating Environmental Cleaning: <https://www.cdc.gov/hai/toolkits/evaluating-environmental-cleaning.html>. accessed February 26, 2022.
- 10) Assadian O, Harbarth S, Vosd M, Knobloch JK, Asensio A, Widmer AF: Practical recommendations for routine cleaning and disinfection procedures in healthcare institutions: a narrative review. *J Hosp Infect* 2021; 113: 104-14.
- 11) Becker B, Henningsen L, Paulmann D, Bischoff B, Todt D, Steinmann E, *et al.*: Evaluation of the virucidal efficacy of disinfectant wipes with a test method simulating practical conditions. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019; 8: 121-9.

[連絡先：〒105-0012 東京都港区芝大門 2-3-6 大門アーバンスト 2
F
株式会社リジョイスカンパニー 黒岡 肇
E-mail: h-kurozu@rejoice-company.co.jp]

A Quantitative Fluorescent Marker Method for Evaluation of Surface Cleanliness Using Digital Image Data

Hajime KUROZU^{1,2)}, Erisa SUGAWARA²⁾, Yasuhiro SAEKI²⁾,
Takumi KAJIURA²⁾ and Satoshi KIMURA²⁾

¹⁾Rejoice-company CO., Ltd., ²⁾Division of Infection Prevention and Control, Division of Postgraduate School of Healthcare Tokyo
Healthcare University

Abstract

The fluorescent marker method is a simple and inexpensive way to evaluate the cleanliness of healthcare environments in real time. However, quantitative relationships between fluorescent signal and microbial removal have not been established.

Here, a quantitative method was developed using pixel values from digital photographic images of fluorescent markers, and the relationship between the rate of removal of fluorescent markers and the rate of removal of microorganisms from three surfaces: stainless steel and black and white vinyl chloride was determined.

Specific amounts of solutions of commercially available fluorescent markers were applied adjacent to the samples of *S. aureus*, and the surfaces were photographed before and after wiping with a hydrophobic wipe. The fluorescent marker was quantified based on an assumed exponential relationship between the fluorescent marker and measured pixel values with respect to the maximum pixel value (255); coefficients of correlation between the calculated and actual amounts of fluorescent marker were in excess of 0.99 for each surface. The coefficients of determination for the removal rates of *S. aureus* and fluorescent marker on the white and stainless steel surfaces were 0.46 and 0.61, respectively. Notably, the agreements were good only when the fluorescent marker removal rate was 90% or higher. These results confirm the possibility in quantifying the amount of fluorescent marker on a surface using digital image data, and this measurement can be used to estimate surface cleanliness.

Key words: cleaning evaluation, fluorescent marker method, quantitative evaluation, image data, pixel value