

低濃度オゾン水を応用した歯科用ユニット給水管路内汚染の制御

～有効性と安全性の検討～

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻
病態機構学講座 歯周病態学分野

大久保 圭祐

Control of contamination in dental unit water lines applying low-concentrated ozonized water - Effectiveness and Safety -

Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Okayama University
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Keisuke Okubo

(平成28年12月15日受付)

緒言

近年、我が国における高齢者や易感染性宿主の増加に伴い、院内感染の防止は医療行為全般において重大な問題として認識されるようになってきた。歯科においては、以前から特に欧米を中心として、デンタルユニット給水管路（dental unit water line : DUWL）の内部では微生物による汚染が生じている¹⁾との報告がある。歯科治療では歯の切削時、および口腔内の洗浄時において水が必須であるが、DUWL内部に経時的に形成されたバイオフィルムが原因となり、注水に汚染が生じる²⁻⁷⁾。デンタルユニット（dental unit : DU）を通じて使用する水の汚染に関しては、1960年代に最初の報告がされていた^{8,9)}。その汚染経路として、当時特に問題視されていたのは、エアータービン停止時に生ずる陰圧によって口腔内細菌や唾液、血液がハンドピース内に吸引される現象、通称「サックバック」によって生ずる汚染であった^{10,11)}。実際に海外における既報では、DUWLから採取した水中において、一般的に口腔菌叢に存在するような微生物（*Canidida albicans*等）を検出した^{7, 12)}ものも存在する。

さらにその一方で、1990年頃からDUWL内部に経時的に形成されるバイオフィルムに起因する汚染が注目されはじめた。バイオフィルムは診療終了後の夜間や休診日といった長時間にわたる給水の停止時に、DUWL内に滞留した水中において微生物が増殖して形成される⁹⁾。DUWL内部のチューブは直径が小さく、径の中心に向かうほど水流速度は速いが、

逆に内壁付近では遅くなるため、チューブ内壁にバイオフィームが形成されやすい環境である¹³⁾。このような過程で形成されたバイオフィームから剥落した微生物が注水時のハンドピース等から放出されるとの報告がされるようになった。使用する水は一般の水道水であり、その中には微生物の存在は少なくとも、経時的にはバイオフィームを形成して、ユニット使用時には水中にバイオフィームを巻き込むこととなり、結果的に微生物を含んだ汚染水を患者に使用することになる。デンタルユニット水中の生存細菌数は水道水よりも多く、診療開始前の初流水では $10^4\sim 10^7$ cfu/mLに達すると報告^{6, 14-20)}されており、バイオフィームを構成する大部分の微生物は従属栄養細菌である^{6, 14, 15)}。また、易感染性宿主において日和見感染症を惹起しうる*Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Legionella*属などが検出されたという報告がある²¹⁾。しかし、この事実は、世界的に見てもまだ明確な根拠や院内感染事例等の症例報告は確立されていない状態であり²²⁾、日本でも明確な対策基準は提示されていない¹¹⁾。

このような日本における現状に対して、米国はDUの汚染対策の基準を示した。具体的には、米国歯科医師会（American Dental Association）は従属栄養細菌数を200 cfu/mLと制定し¹⁾、また、米国疾病対策センター（Centers for Disease Control and Prevention）は米国飲料水と同等の水質基準に倣って500 cfu/mL以下の従属栄養細菌数の達成と、さらに外科処置では滅菌水の使用を推奨している²²⁾。院内感染を未然に防ぎ、安心・安全な歯科治療を行う

ためには、DUWL汚染の現状について理解し、DUWLにおける微生物汚染の制御システムの開発が急務である。

一般的に現在行われている汚染対策としては、マイクロフィルターの使用やタービン回路への逆流防止装置の設置による口腔内細菌の逆流防止や、定期的な水排出(フラッシング)を挙げることができる。毎日の診療開始前に切削機器を数分間空回しすることで、DUWLから水と空気を排出するのであるが、経時的にフラッシング水量が増えるに従って微生物数は減少するものの、バイオフィルムを完全に除去することはできない^{11, 22)}。そのため、一度形成されたバイオフィルムを除去するには、定期的に殺菌剤を用いたDUWLの化学的洗浄を行うショックトリートメント²³⁻²⁸⁾と呼ばれる方法が必要とされている。

このような現状を受けて、化学薬品を用いてDUWL内部の微生物汚染を制御する種々のシステムが以前から考案されてきた。しかし、これらのシステムが実際に院内感染の予防策として有効であったと報告するエビデンスレベルが高い文献が少ないことから、日本ではガイドラインが設定されておらず²⁹⁾、DUWLの水質保証が義務化されていない背景がある。加えて、生体およびDUWL構成部品の両者に対して長期的な安全性を検討した報告も少ない⁹⁾ため、さらに一般の歯科医院においては導入にあたってのコストも考慮された結果として、DUWL内部の汚染制御システムが十分な普及には至っていないものとする。

以上の背景を鑑みた上で、新規のDUWL汚染制御システムを検討するにあたり、広く一

般の歯科医院に普及させることも考慮して、取り扱いが容易でかつ安価、そして安全に利用することが可能な材料を用いることを考えた。そこで、使用する殺菌剤として殺菌効果を持つ反面で作用後の残留性の少ないオゾン水を利用することに着目した。

オゾンは大気中に0.005 ppm程度存在する³⁰⁾。そして、結合している第三原子 (O) を容易に分離するために強い酸化作用を有していることが知られている。その特徴を応用することで、殺菌、消毒、漂白、そして脱臭などを目的に、様々な分野で既に利用されている^{30, 31)}。また、医療現場では院内感染予防、さらには治療にも応用され、その効果が報告されている³²⁻³⁴⁾。そのような性質を持つオゾンを水中に溶解したオゾン水は、水中でさらにオゾンが水と反応して、他の活性酸素種を生成することによって、低い濃度でも優れた殺菌効果を発揮すると言われている³¹⁾。

最終的には、空気中の酸素を主に利用してオゾンを生成し、さらに直接水中へオゾンを含んだマイクロバブルを発生させることによって簡便かつ安全な方法で、生体に影響を与えることのない低濃度のオゾン水を産生することができ、さらにDUへの搭載が容易と考えるサイズまで小型化を実現し、既に他分野で実用されているオゾン水発生装置の臨床応用を目指す。

上記背景のもと、本研究は*in vitro*における低濃度オゾン水のDUWL汚染に関与する微生物およびバイオフィルムに対する殺菌効果と、DUWL構成部品に対する影響について検討

を行った。

材料ならびに方法

1. 材料

1) 試験水

オゾン水は小型発生装置OZS-PTDX（桜川ポンプ，大阪）から生成した低濃度オゾン水（low-concentrated ozonized water : OZW）を使用した。陰性対照として，水道水（tap water : TW : 岡山市水道局），およびリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline : PBS : pH7.4, Gibco, USA）を使用した。また，陽性対照として，塩化セチルピリジニウム（cetylpyridinium chloride : CPC : Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）を，蒸留水に溶解させ，含嗽剤としての最高濃度である0.05 %を基準に，その2倍濃度の0.1 %に希釈したものを使用した。

2) 供試微生物

① 真菌

単一菌種として*Candida albicans* (*C. albicans*) を選定した。*C. albicans* ATCC10231株を，37 °Cで好氣的にbrain heart infusion (BHI : Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 液体培地を用いて12時間培養したものを使用した。

② 従属栄養細菌を含むバイオフィルム

従属栄養細菌のバイオフィームは、実際の臨床現場で形成されたものを供試した。具体的には、DUのタービンハンドピースに接続され、耐用年数を越えたことで交換されたDUWLチューブの内面から得た。DUWLの水中に含まれる微生物は、DUのスリーウェイシリンジから採水したものを試験水（DUWL水）として用いた。培養は、従属栄養細菌の検出用培地であるR2A液体培地（和光純薬，大阪，日本）を使用した。

3) DUWL構成部品

本研究で用いたDUWLの構成部品を表1に示した。これらは、モリタ製作所営業部技術企画2課（大阪，日本）から提供を受けた未使用品であり、構成部品の中で代表的なものを使用した。

2. 溶存オゾン濃度の測定

溶存オゾン濃度は、反応試薬を試験水と混合して発色させ、比色計で比較する溶存オゾン測定器O3-1Z（笠原理化工業，埼玉，日本）を用いて測定した。OZS-PTDXからOZWを10 mL採水し、その全量を測定に用いた。採水後1時間までは15分間隔，6時間後までは1時間間隔，さらに24時間後までは6時間間隔で測定を行った。

3. 浮遊状態の単一菌種に対する殺菌効果の検討

1) アデノシン三リン酸 (ATP) 量の測定

前述の方法で培養した*C. albicans*に、4 °C、2,000回転/分、15分間の遠心分離を行った。上清を除去し、菌体のみの状態とした上で、各試験水で 1×10^8 cfu/mLとなるように調整し、室温で1時間、緩やかに振盪した。試験水作用後に生存した*C. albicans*の細胞内に存在するアデノシン三リン酸 (ATP) 量を検討するために、ルシフェールHSキットおよびルミテスターC-110 (キッコーマンバイオケミファ, 東京, 日本) を用いて発光量を測定し, relative light unit (RLU) の値を記録した (検出範囲: $1.0 \times 10^{-16} \sim 3.0 \times 10^{-11}$ mol ATP)。なお, 微生物以外のATPはキット付属の試薬で測定前に消去した。

2) 走査電子顕微鏡 (SEM) による形態観察

上記3の1) と同様の条件で, TW以外の各試験水を用いて*C. albicans*をそれぞれ 1×10^8 cfu/mLとなるように菌液を調整した。室温で1時間緩やかに振盪した後, 各々を即時に菌液1 mLずつ孔径0.6 μm , 膜厚10 μm のフィルタ (ナノパーコレータ/SEM pore : JEOL, 東京, 日本) を用いて総量5 mLの濾過を行った。試料表面に真空蒸着器 (Neocネオオスミウムコーター : メイワフォーシス, 東京) を用いてオスミウムによる真空蒸着を行った後, 加速電圧15 kVの条件下で電界放射型走査電子顕微鏡 (FE-SEM DS-720 : Topcon, 京都, 日本) を用いて, 菌体の形状を観察した。

4. DUWL内面のバイオフィルムを構成する微生物に対する殺菌効果の検討

1) アデノシン三リン酸（ATP）量の測定

採取したDUWLのチューブを1 cm長に截断し，縦割して二分割した。そして，3 cm長分（6片）を各30 mLの試験水中に浸漬し，室温下で1時間，緩やかに振盪した。その後，各試験水を静かに除去し，試験水と同量のR2A液体培地に置換して，32 °Cで96時間，静置培養した。上記3の1)と同様の方法で，試験水を作用した後に生存したバイオフィルム中の微生物が含有するATP量を測定した。

2) 走査電子顕微鏡（SEM）による形態観察

上記4の1)と同様の条件で，培養後のチューブに対して表面に存在する微生物の形状をSEMで観察した。観察にあたり，チューブを試験体としてエタノール上昇系列（50，70，90，95%，および無水エタノール）にて脱水した後，酢酸3-メチルブチルに1時間浸漬して置換したものを，臨界点乾燥器（JCPD-5：JEOL，東京，日本）を用いて昇華させた。さらに，試料表面に対してオスミウムによる真空蒸着を前処理として行った。

5. DUWL水中の微生物に対する殺菌効果の検討

DUWL水とOZWを1：9の割合で混合した水50 mLと，DUWL水5 mLを，それぞれ室温で1時間，緩やかに振盪した。その後，上記3の2)と同様の方法で処理を行い，SEMを用いて試

験水中に含まれた微生物の形態観察を行った。

6. DUWL構成部品に対する影響の検討

DUWL構成部品に対して、平日のみ6ヵ月間、1日1回、継続的なOZWおよびTWへの浸漬を反復して行った。その後、試料表面に対してオスミウムによる真空蒸着を前処理として行った上で、SEMを用いて表面形状の観察を行った。

7. 統計処理

統計処理は、Student's *t*-testにて行った。統計学的有意差の判定基準は、 $p < 0.05$ とした。

結果

1. OZW中の溶存オゾン濃度の経時的変化

OZW中の溶存オゾン濃度は経時的に変化した（図1）。溶存オゾン濃度は、採水直後において最大の0.4 mg/Lを示した。その後、溶存オゾン濃度は約2時間で半減し、さらに約6時間で0.1 mg/Lまで低下した。これは、TWに対して同様の測定を実施した際に得られた結果と同等であった。この結果を基に、本研究に供与するOZS-PTDXから生成したOZWが有する殺菌効果の有効時間は1時間と判断し、以下の実験に反映した。

2. 浮遊状態の単一菌種に対する殺菌効果

1) ATP量に対する影響

OZWを作用させた*C. albicans*のATP量は、陰性対照と比較して有意に低下し、概ね半減した（図2）。PBSおよびTWを作用させた陰性対照同士のATP量は同程度であった。一方、抗菌力を有する0.1% CPC水溶液を作用させた陽性対照のATP量は検出限界以下であった。

2) 菌体の形態変化

陰性対照であるPBSを作用させた*C. albicans*は、辺縁が明瞭で球体に近い形態をしており、菌体間には糸状の胞子様の構造が観察された（図3 : d）。反対に、陽性対照である0.1% CPC

溶液を作用させたものでは、辺縁が不明瞭化し、その形状は楕円形かつ扁平なものが観察された（図3：f）。一方、OZWを作用させたものにおいては、菌体の明確な破壊像は観察されなかった。しかし、菌体の膨張や辺縁の不明瞭化といった陽性対照に類似した変化が観察された（図3：e）。

3. DUWL内面のバイオフィルムを構成する微生物に対する殺菌効果

1) ATP量に対する影響

陰性対照であるTWおよびPBSを作用させたものでは同程度のATP量であった（図4）。OZWを作用させたものでは、これら陰性対照と比較して有意差はなかったが、ATP量は半減する傾向にあった。なお、これら3種の試験水では、ATP量にばらつきが多かった。その一方で、陽性対照である0.1% CPC水溶液を作用させたものでは、ATP量は検出限界以下であった。

2) バイオフィルムを形成する微生物の形態観察

OZWで処理したDUWL内面のバイオフィルム上に存在する微生物の形態（図5：c, g, k）は、陰性対照であるTWおよびPBSを作用させたもの（図5：b, f, jとa, e, i）と比較して、バイオフィルム表面上の菌数が減少し、さらに形態は変形傾向にあった。また、TWを作用させたものではバイオフィルム表面上に存在する菌体からの分枝像（図5：f, j）が観察さ

れたが、陽性対照である0.1% CPC水溶液を作用させたチューブ内面のバイオフィームでは菌体の構造が平坦に近く（図5：h, l）、OZWで処理したものではこれらの中間の状態であった（図5：g, k）。

4. DUWL水中の微生物に対する殺菌効果（図6）

SEMを用いて、OZWを作用させたDUWL水中の微生物の形態変化を観察した像を示す（図6）。SEM観察では、DUWL水からは、球形をした微生物の存在を観察した（図6：b, c）。他方で、DUWL水にOZWを混合したものでは、フィルタ表面上に球形の微生物ではなく破壊物様の物が存在した（図6：e, f）。

5. DUWL構成部品に対する影響

SEM観察では、OZWで処理したものでもTWに浸漬したものでも、顕著な凹凸、荒れ、あるいは歪みなどの表面形状の差はなかった（図7）。

考察

本研究では、安全かつ有効にDUWL内部におけるバイオフィーム形成を抑制する新規の洗浄システムの開発を目的として、過去に他分野での実用例が報告^{30, 31)}されているオゾン水を応用することに着目し、その安全性と有効性を検討した。その結果、本研究で用いた最大0.4 mg/Lの濃度を有するオゾン水は、DUWL汚染に関与する微生物に対して殺菌効果があり、配管内部におけるバイオフィームの増殖を抑制しうること、また、DUWLを構成する部品に対しての影響は低いことが示唆された。

文献的にDUWLの汚染濃度は、診療開始前の初流水では $10^4\sim 10^7$ cfu/mLと報告されていたが、これらは国外における報告^{6, 14-20)}であった。本研究を開始する前に、予備検討として実際のDUWLの汚染状況を確認したところ、文献報告と同等以上の汚染 ($\sim 10^8$ cfu/mL) を確認した。この点に関して、DUの使用年数や使用状況、気候条件による温度、供給される水道水の水質や含有される従属栄養細菌の細菌叢などによって汚染状況が異なってくることは推測されるが、我が国においても米国のDUWL水質基準値を超える汚染が起こりうることを確認した。

本研究を開始するにあたり、試験に用いるオゾン水発生装置から生成するOZWの経時的な溶存オゾン濃度の変化を確認した (図1)。その結果、溶存オゾン濃度は最大で0.4 mg/Lであり、約2時間で半減後、さらに約6時間では0.1 mg/Lまで低下することを確認した。こ

のことから、本装置から生成したOZWの殺菌効果を有効に利用できる時間は約1時間以内であると判断し、以降の実験を行うにあたり作用時間の基準とした。

次に、*C. albicans*を使用して、浮遊状態にある単一菌種に対する殺菌効果を確認した。単一菌種として*C. albicans*を選択した理由は、文献的に、DUWLから採取した水中に存在する微生物の1種であることが既に報告されていること^{7, 12)}、またその中でも真菌であることから、細菌と比較してキチン等により構成される強固な細胞壁を有しており³⁵⁾、オゾン水の殺菌機序から考察して効果が得られにくいものと考え、本研究で供試した。その結果、OZWを作用させた*C. albicans*のATP量は、陰性対照と比較して有意差をもって低下し、その値は概ね半減していた(図2)。また、SEM観察においてはOZWの作用によって菌体が膨潤して変形している像が観察できた(図3)。これは、オゾン水の殺菌メカニズムが細胞構造の破壊によって菌体を溶菌させるという知見³⁶⁾と一致する所見であった。

次に、実際に臨床現場で使用されたDUWL内のチューブ内表面においてバイオフィルムを形成している微生物に対する効果を確認した。バイオフィルムは層構造であることから、チューブ内表面に先行して付着する微生物、すなわちバイオフィルムの深部において優位に存在する微生物と、バイオフィルムの表層に存在してユニット使用時の流水によって剥落することでDUWL水中に混入しやすい微生物の2種に大別することができる。そのため、DUWLのチューブ本体の内面とDUから採水したDUWL水、それぞれに対してOZWを作用

させて効果を確認した。前者において、バイオフィルム上に存在する微生物のATP量は陰性対照と比較して半減する傾向を確認したが、有意差は得られなかった（図4）。しかし、SEMを用いた形態観察においては、OZWを作用させたチューブにおいてバイオフィルムを構成する微生物の増殖が抑制された像を観察した（図5）。また、後者においてもDUWLから採水した水中に含まれている微生物が破壊された様子を示す像を確認した（図6）。このことから、バイオフィルムの深部に存在する微生物に対しては十分な殺菌効果は確認できないものの、その表層に存在し、DU使用時の水流速においてDUWLの内面に形成されたバイオフィルムから剥落するような微生物に対しての殺菌においては効果が得られていると考察した。今後は、蛍光色素染色、および共焦点蛍光顕微鏡を用いてバイオフィルム上の微生物の生死を観察する方法も、OZWの殺菌効果の確認に有効であると考えられる。

以上の結果をまとめると、OZWの単回作用によって、DUWL内の微生物の増殖を概ね半減できることが確認された。しかし、微生物は変形しながらでも残存することから、実際の使用においては、バイオフィルムが形成されていない未使用状態のチューブからOZWの利用を継続することが必要となると考える。また、微生物に対してOZWの作用を反復させることで、さらに効果的な殺菌が期待できる。

最後に、DUWLを構成する主要部品における、OZWが有する酸化作用による影響の有無を確認した。肉眼観察および実体顕微鏡による観察において表面形状の差は観察されず、

さらにSEMによる観察においても、OZWを使用することによる著明な表面構造の劣化や異常な所見はなかった。検体表層に一部、微生物の付着らしき像もあるが、これは長期的に試験を継続する間に生じた混入と考える。また、柔軟フッ素チューブにおいては通常のウレタンチューブと比較して、表層に微生物の付着が観察されなかった（図7）。すなわち、使用するチューブに表面形状の変性・劣化を防止する加工処理を施した材料を用いることで、更にバイオフィルムの形成抑制効果を得ることができると考える。

本研究では、OZWの作用による殺菌効果を定量するにあたって、生存状態にある微生物が含有するATP量を指標とした。具体的には、まずadenosine phosphate deaminaseを含むATP消去試薬によって、試験水中に存在する生菌細胞外に遊離したATPを失活させた後に、残存した生菌に対してATP抽出試薬を作用させ、得られたATPに対するルシフェラーゼ反応による発光量をrelative light unit (RLU) 値として測定するものである。この方法は、浴場施設でのレジオネラ対策における衛生状態検査にも用いられた事例があり³⁷⁾、また、医科分野では透析治療における微生物汚染の状態を把握する方法としても使用が試みられている³⁸⁾。さらに、RLU値と生菌数を比較すると、両者には高い相関があることも報告されており³⁹⁾、微生物汚染の状態を迅速に数値化できるという有用性を利用し、本研究の定量方法とした。しかし、バイオフィルムのように種々の微生物が存在する状態や、同一菌種でも増殖段階の相違が生ずる環境においては、微生物のATP合成量に変動が生じるとの報告⁴⁰⁾

もある。そのため、今後の検討ではATP量の測定と寒天平板培地を用いた培養法による試験を併せて行うことで、より正確な生菌数の把握と殺菌効果の定量が可能になると考える。

今回の研究では、*in vitro*の条件におけるOZWのDUWL汚染に関与する微生物、およびバイオフィルムに対する殺菌効果と、DUWL構成部品に対する影響の検討を行った結果、その有効性と安全性が示唆された。しかし、実際は水道水の水質やDUの稼働状況など、DUWL内のバイオフィルム形成には様々な因子が存在するため、今後は臨床環境を想定した条件を設定しての検討を考える。具体的には本オゾン水発生装置を実際のDUに組み込んだ模擬試験器を使用する。試験器のDUWL内で経時的に形成されるバイオフィルムに対してのOZW作用による増殖抑制効果の確認、さらには他の殺菌剤との比較、および長期的な構成部品に対する影響の検討を行い、効果的かつ安全なOZWの応用方法を追求していく。

結論

最大0.4 mg/Lの濃度を有するOZWは、DUWL構成部品の表面形状に対する顕著な影響がなく、給水管路汚染に関与する微生物に対して殺菌効果を示したことから、DUWLのバイオフィルム汚染制御に有用であることが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に際し、本研究の立案当初から終始懇切なる御協力を頂きました。株式会社桜川ポンプ製作所の関係者様に深く感謝いたします。本研究を行うにあたり様々な面からご協力いただいた、岡山大学産学官連携本部の桐田泰三氏に御礼申し上げます。様々な面にわたり貴重な御助力と御協力をくださいました、岡山大学病院新医療研究開発センターの伊東孝助教、そして歯周病態学分野および歯周科の諸先生に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の一部は平成26年度橋渡し研究加速ネットワークプログラムシーズAの助成を受けたものです。

参考文献

- 1) Shearer, B.G.: Biofilm and the dental office. *J. Am. Dent. Assoc.*, **127**, 181-189, 1996.
- 2) Mayo, J.A., Oertling, K.M. and Andrieu, S.C.: Bacterial biofilm: a source of contamination in dental air-water syringes. *Clin. Prev. Dent.*, **12**, 13-20, 1990.
- 3) Schulze-Robbecke, R., Feldmann, C., Fischeider, R., Janning, B., Exner, M. and Wahl, G.: Dental units: an environmental study of sources of potentially pathogenic mycobacteria. *Tuber. Lung. Dis.*, **76**, 318-323, 1995.
- 4) Atlas, R.M., Williams, J.F. and Huntington, M.K.: *Legionella* contamination of dental-unit waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1208-1213, 1995.
- 5) Challacombe, S.J. and Fernandes, L.L.: Detecting *Legionella pneumophila* in water systems: a comparison of various dental units. *J. Am. Dent. Assoc.*, **126**, 603-608, 1995.
- 6) Barbeau, J., Tanguay, R., Faucher, E., *et al.*: Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3954-3959, 1996.
- 7) Walker, J.T., Bradshaw, D.J., Bennett, A.M., Fulford, M.R., Martin, M.V. and Marsh, P.D.: Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3363-3367, 2000.
- 8) Blake, G.C.: Incidence and control of bacterial infection in dental spray reservoirs. *Br. Dent. J.*, **115**, 413-416, 1963.

- 9) O'Donnell, M.J., Boyle, M.A., Russell, R.J. and Coleman, D.C.: Management of dental unit waterline biofilms in the 21st century. *Future Microbiol.*, **6**, 1209-1226, 2011.
- 10) Ozawa, T., Nakano, M. and Arai, T.: *In vitro* study of anti-suck-back ability by themselves on new high-speed air turbine handpieces. *Dent. Mater. J.*, **29**, 649-654, 2010.
- 11) 小澤寿子, 中野雅子, 木村泰子, 新井高: 歯科用ユニット給水管路の新クリーンシステムの評価. *日歯保誌* **54**, 193-200, 2011.
- 12) Szymańska, J.: Evaluation of mycological contamination of dental unit waterlines. *Ann. Agric. Environ. Med.*, **12**, 153-155, 2005.
- 13) Costerton, J.W.: *The Biofilm Primer*. Ecckey C (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, 2007.
- 14) Mills, S.E., Lauderdale, P.W. and Mayhew, R.B.: Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine 10 %. *J. Am. Dent. Assoc.*, **113**, 280-284, 1986.
- 15) Williams, J.F., Johnston, A.M. and Johnson, B.: Microbial contamination of dental unit waterlines: prevalence, intensity and microbiological characteristics. *J. Am. Dent. Assoc.*, **124**, 59-65, 1993.
- 16) Williams, J.F., Andrews, N. and Santiago, J.I.: Microbial contamination of dental unit waterlines: current preventive measures and emerging options. *Compend. Contin. Educ. Dent.*, **17**, 691-709, 1996.
- 17) Miller, C.H.: Microbes in dental unit water. *J. Calif. Dent. Assoc.*, **24**, 47-52, 1996.

- 18) Williams, H.N., Paszko-Kolva, C., Shahamat, M., Palmer, C., Pettis, C. and Kally, J.: Molecular techniques reveal high prevalence of *Legionella* in dental units. *J. Am. Dent. Assoc.*, **127**, 1188-1193, 1996.
- 19) Barbeau, J., Gauthier, C. and Payment, P.: Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review. *Can. J. Microbiol.*, **44**, 1019-1028, 1998.
- 20) 荒木孝二, 臼井和弘, 毎熊容子, 黒崎紀正: デンタルユニット水ラインの細菌汚染について. *日歯保誌* **43**, 16-22, 2000.
- 21) Tall, B.D., Williams, H.N., George, K.S., Gray, R.T. and Walch, M.: Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes. *Can. J. Microbiol.*, **41**, 647-654, 1995.
- 22) Kohn, W.G., Collins, A.S., Cleveland, J.L., Harte, J.A., Eklund, K.J. and Malvitz, D.M.: Guidelines for infection control in dental health-care settings--2003. *MMWR Recomm. Rep.*, **52**, 1-61, 2003.
- 23) Meiller, T.F., Kelly, J.I., Baqui, A.A. and DePaola, L.G.: Laboratory evaluation of anti-biofilm agents for use in dental unit waterlines. *J. Clin. Dent.*, **12**, 97-103, 2001.
- 24) Wirthlin, M.R., Marshall, G.W.Jr. and Rowland, R.W.: Formation and decontamination of biofilms in dental unit waterlines. *J. Periodontol.*, **74**, 1595-1609, 2003.
- 25) Larsen, T. and Fiehn, N.E.: The effect of Sterilex Ultra for disinfection of dental unit waterlines.

Int. Dent. J., **53**, 249-254, 2003.

26) Walker, J.T., Bradshaw, D.J., Fulford, M.R. and Mars, P.D.: Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 3327-3332, 2003.

27) Coan, L.L., Hughes, E.A., Hudson, J.C. and Palenik, C.J.: Sampling water from chemically cleaned dental units with detachable power scalers. *J. Dent. Hyg.*, **81**, 80, 2007.

28) Zhang, W., Onyango, O., Lin, Z., Lee, S.S. and Li, Y.: Evaluation of Sterilox for controlling microbial biofilm contamination of dental water. *Compend. Contin. Educ. Dent.*, **28**, 586-592, 2007.

29) 日本歯科医学会厚生労働省委託事業「歯科保健医療情報収集等事業」一般歯科診療時の院内感染対策作業班：厚生労働省委託事業「歯科保健医療情報収集等事業」一般歯科診療時の院内感染対策に係る指針。2014.

30) 金田俊一，林信哉，猪腹哲，佐藤三郎，山部長兵衛：バルク放電・浴面放電複合型オゾン発生器によるオゾン生成。 *Rep. Fac. Sci. Engrg. Saga Univ.* **30-1**, 21-24, 2001.

31) 木村博一，森川幸雄，太田郁朗，高齋進也，小澤邦壽：オゾン水による微生物の殺滅。 *臨と微生物* **33**, 281-285, 2006.

32) Werkmeister, H.: Subatmospheric ozone/oxygen gas treatment in radiation ulcers. *Erfahrungshkunde*, **25**, 180, 1976.

- 33) Rokitansky, O.: Clinical consideration and biochemistry of ozone therapy. *Hospitalis*, **52**, 643-711, 1982.
- 34) 赤堀幸男, 村上篤司, 星昭二: オゾン水の殺菌効果と院内感染予防への応用. 日集中医誌 **7**, 3-10, 2000.
- 35) Burnett, J.H. and Trinci, A.P.J.: Fungal Walls and Hyphal Growth. *Cambridge University Press*, 1, 1979.
- 36) Rich, S. and Tomlinson, H.: Mechanisms of ozone injury to plants. *Am. Chem. Soc. Symp. Series*, **3**, 76-82, 1974.
- 37) 村上光一, 野田多美枝, 久良木亜由子, 西成子, 烏谷竜也, 井上博雄, 中村祥子, 江藤良樹, 濱崎光宏, 竹中重幸, 堀川和美, 石黒靖尚: レジオネラ対策に資するATP値測定による浴槽の衛生状態の評価. 福岡保健環境研年報 **35**, 117-119, 2008.
- 38) 島崎大, 秋葉道宏: 透析用水製造過程および原水におけるATP測定による生菌迅速スクリーニング手法の検討. 土木学会論文集G (環境) **70**, III-25-III-31, 2014.
- 39) 西山敏郎, 柴田猛, 金田史香, 高橋充男, 金田浩: 透析液清浄化ATPアナライザによる透析液生菌数測定の迅速化. 腎と透析 **63**, 82-84, 2007.
- 40) Hironaka, I., Iwase, T., Sugimoto, S., Okuda, K., Tajima, A., Yanaga, K. and Mizunoe, Y.: Glucose triggers ATP secretion from bacteria in a growth-phase-dependent manner. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 2328-2335, 2013.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座

歯周病態学分野（指導：高柴正悟教授）

本文の一部は、以下の学会において発表した。

1. 第139回日本歯科保存学会秋季学術大会（2013年10月，秋田）
2. 第34回岡山歯学会・学術大会（2013年10月，岡山）
3. 医療展示会岡山メディカル・イノベーション（2014年3月，岡山）
4. 2014 4th Research Week-International Symposium of Oral Medicine（2014年5月，台北，中華民国）：Research for International Collaboration Award受賞
5. 第140回日本歯科保存学会春季学術大会（2014年6月，滋賀）
6. The 92nd General Meeting, International Association for Dental Research（2014年6月，ケープタウン，南アフリカ共和国）
7. 岡山大学知恵の見本市2014（2014年11月，岡山）

本論文に関連し、開示すべき利益相反関係にある企業は下記のとおりである。

- ・株式会社桜川ポンプ製作所（オゾン水発生装置の無償提供）
- ・株式会社モリタ製作所（デンタルユニット構成部品の無償提供）

図の説明

図1. OZWの経時的溶存オゾン濃度変化

OZS-PTDXから採水したOZW（10 mL）の溶存オゾン濃度の変化を、溶存オゾン測定器を用いて測定した。試薬で染色したOZWの溶存オゾン濃度は、付属のカラーテスターを用いて数値化した。

グラフは独立した3回の実験の平均値を示す。なお、各実験において3回の測定を行ったが、全て同じ結果を示したため標準偏差は表示しない。

図2. OZWによる*C. albicans*のATP量変化

12時間培養した*C. albicans*に対して、上清を除去して菌体のみとし、最終濃度が 1×10^8 cfu/mLとなるように各試験水で希釈し、さらに1時間作用させた後にATP量を測定した。

縦軸はRLU値を、横軸は各試験水を示す。

グラフは独立した3回の実験のうち、代表的なものを示す。なお、各実験において3回の測定を行った。エラーバーは標準偏差を示す。*, $p < 0.05$

図3. OZWによる*C. albicans*の形態変化

実験3の1)と同様の方法で*C. albicans*に対して試験水を作用させたものを試料として、SEM poreを用いて濾過後フィルタ底面における菌体の構造を走査型電子顕微鏡で観察し

た。図は、独立して撮影した2検体の中で、代表的な画像を示す。

各試験水につき、3,000倍拡大像、10,000倍拡大像を示す。スケールバー：3,000倍拡大像：10 μm 、10,000倍拡大像：3 μm

図4. OZWによるDUWL内面のバイオフィルム微生物のATP量変化

歯科用ユニットから除去した給水チューブ内面の従属栄養細菌を含むバイオフィルムに対して、各試験水30 mL中に1時間浸漬し、その後同量のR2A液体培地にて静置培養したのについてATP量を測定した。縦軸はRLU値を、横軸は各試験水を示す。

グラフは同一検体に対して6回の測定を行い、最大値と最小値を除いた平均の結果を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

図5. OZWによるDUWL内面のバイオフィルム微生物の形態変化

実験4の1)と同様の方法で歯科用ユニットから除去した給水チューブ内面の従属栄養細菌を含むバイオフィルムに対して試験水を作用させたものを試料として、チューブ内表面に存在する菌体の形態を走査型電子顕微鏡で観察した。図は独立して撮影した2検体の中で、代表的な画像を示す。

各試験水につき、300倍拡大像、3,000倍拡大像、10,000倍拡大像を示す。スケールバー：300倍拡大像：100 μm 、3,000倍拡大像：10 μm 、10,000倍拡大像：3 μm

図6. OZWによるDUWL水中の微生物の形態変化

菌科用ユニットから採水した水中に含まれる微生物に対してOZWを1時間作用させたものを試料として、存在する微生物の形態を走査型電子顕微鏡で観察した。図は独立して撮影した2検体の中で、最も典型的な画像を示す。

各試験水につき、1,000倍拡大像、10,000倍拡大像、30,000倍拡大像を示す。スケールバー：1,000倍拡大像：30 μm 、10,000倍拡大像：3 μm 、30,000倍拡大像：1 μm

図7. DUWL構成部品に対するOZWの長期使用条件下における表面形状の観察

6ヵ月間1日1回、TWもしくはOZWに反復して浸漬を行ったDUWL構成部品を試料として、検体表面の形状や構造を走査型電子顕微鏡で観察した。図は独立して撮影した2検体の中で、最も典型的な画像を示す。

各試験水につき、200倍拡大像もしくは300倍拡大像、および1,000倍もしくは3,000倍拡大像を示す。スケールバー：200倍拡大像、300倍拡大像：100 μm 、1,000倍拡大像：30 μm 、3,000倍拡大像：10 μm

表1. 使用したDUWL構成部品

名称	材料
接手小	C3604BD
接手小 (SUS)	SUS304
Oリング	NBR
柔軟フッ素チューブ	PVC樹脂
ウレタンチューブ	PU (エーテル系)

C : 真鍮 (銅合金) のJIS規格名称

3604 : 快削黄銅を意味する合金成分の系統を示す数字

BD : bar drawing

SUS : steel use stainless

304 : 米国の鉄鋼協会規格であるAISIに準じた鋼種記号を示す数字

NBR : acrylonitrile-butadiene rubber

PVC樹脂 : polyvinyl chloride (外側) + polyvinylidene difluoride (内側)

PU : polyurethane