

氏名	大久保 圭祐		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5484号		
学位授与の日付	平成29年3月24日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	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～		
論文審査委員	鳥井 康弘 教授	苔口 進 准教授	高柴 正悟 教授

## 学位論文内容の要旨

### 【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、デンタルユニット給水管路 (dental unit water line : DUWL) は、その構造上の特性から、給水チューブ内表面に従属栄養細菌を主とするバイオフィームが形成されやすく、水中の汚染度は $10^4 \sim 10^7$  cfu/mLに及ぶ。さらには日和見感染症の原因となる微生物 (*Candida albicans*など) も検出されており、院内感染との関連が示唆されている。

現在、米国ではDUWLの汚染について具体的な対策基準を提示しているが、日本においてはDUWLの水質保証は明確に義務化されていないのが実情である。過去に化学物質などを用いた種々の除染システムが考案されてきたが、導入におけるコストの問題、また実際の臨床現場における有効性・安全性を評価したエビデンスレベルの高い文献が少ないこともあり、十分な普及までには至っていない。従って、広く安全・安心な歯科治療を行うためには、低コストで維持管理が容易なDUWLのバイオフィーム形成抑制システムの開発が急務である。

我々はこのようなシステムを開発するために、低濃度オゾン水 (low-concentrated ozonized water : OZW) の応用に着眼した。オゾン水は、強い酸化力を持つ故に生体に危険である反面、分解しやすいので低濃度では残留が少なく安全である。そのため、オゾン水は殺菌作用を有する機能水として既に様々な分野で利用されている。

本研究ではデンタルユニット (dental unit : DU) への応用を想定し、臨床的な汚染を想定した単一菌種の微生物およびDUWL内部で実際に形成されたバイオフィームに対するOZWの有効性、さらにDUWLを構成する主要な部品に対する影響について、*in vitro*での検討を行った。

### 【材料と方法】

1. 試験水 : OZW は、オゾン水発生装置 (OZS-PTDX) で作成した。陽性対照として殺菌剤である0.1%塩化セチルピリジニウム (cetylpyridinium chloride : CPC) 水溶液、陰性対照として水道水 (tap water : TW) , リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline : PBS) を使用した。
2. 微生物 : ①単一菌種として、*Candida albicans* ATCC10231 株を brain heart infusion 液体培地で12時間培養したものを供試した。*C. albicans* を4°C, 2,000回転/分, 15分間の遠心分離を行って上清を除去した後に、各試験水で $1 \times 10^8$  cfu/mLに調整し、緩やかに振盪した (室温, 1時間)。  
②従属栄養細菌を含むバイオフィームは、実際の臨床現場で長期間使用したことによって DUWL の内面に形成されたものを回収し、供試した。すなわち、裁断した DUWL チューブを試験水中へ浸漬して緩やかに振盪した (室温, 1時間)。その後、各試験液を R2A 液体培地に置換して、静地培養した (32°C, 96時間)。

③水中の従属栄養細菌は、DU から採水（DUWL 水）した中に含有されたものを供試した。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 1 時間、穏やかに振盪した。

3. DUWL 構成部品: 未使用の DUWL を構成する代表的な部品を選定した。これらを平日のみ 6 ヶ月間、1 日 1 回、継続的に OZW および TW へ反復浸漬した。
4. 溶存オゾン濃度測定: 反応試薬を試験水と混合して発色させて比色計で比較する溶存オゾン測定器 O3-1Z (笠原理化学工業) を用いて測定した。10 mL の OZW を採水して経時的に濃度測定を行った。
5. 微生物のアデノシン三リン酸 (ATP) 量の測定: ルシフェール HS キットおよびルミテスター C-110 (ともにキッコマンバイオケミファ) を使用して、微生物の ATP 量を測定した (検出範囲:  $1.0 \times 10^{-16} \sim 3.0 \times 10^{-11}$  mol ATP)。微生物以外の ATP はキット付属の試薬で消去した。
6. 表面形状観察: 菌体および DUWL 構成部品の表面は、電界放射型走査電子顕微鏡 (SEM: FE-SEM DS-720, Topcon; 加速電圧 15 kV) を用いて観察した。
7. 統計処理: Student's *t*-test を用いて対照群との比較を行い、有意水準は 5 % とした。

## 【結果】

1. OZW 中の溶存オゾン濃度の経時変化: OZW 中の溶存オゾン濃度は、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。
2. 浮遊状態の単一菌種 (*C. albicans*) に対する殺菌効果: ATP 量は、OZW では陰性対照群から有意に低下し、概ね半減した。SEM 観察では、菌体の明確な破壊像は観察されなかったが、菌体は膨張してその辺縁は不明瞭化し、形状は球体から楕円形へ、更に扁平へと変形した。
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: ATP 量は、陰性対照群との間では有意差はなかったが、結果 2 と同様に半減する傾向を示した。SEM 観察では、OZW 処理によって DUWL 内部のバイオフィルムを構成する微生物の形態が結果 2 と同様に変形する傾向にあった。
4. DUWL 水中の微生物に対する殺菌効果: SEM 観察では DUWL 水単独では、球体をした微生物が存在した。他方で、DUWL 水を OZW と混合したものでは、微生物が破壊された様子を示す像を観察した。
5. DUWL 構成部品に対する為害性: 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、表面に顕著な凹凸、荒れ、あるいは歪みなどの形状に差はなかった。

## 【考察】

OZW の溶存オゾン濃度は最大 0.4 mg/L であったが、6 時間後には 0.1 mg/L まで低下したことから数時間で自然に、安全とされる濃度レベルになると考えられた。OZW の単回作用で標準株の *C. albicans* と、DUWL 内のバイオフィルムを構成する微生物の ATP 量を概ね半減できたが、菌体は変形しながらでも残存することから、一度形成されたバイオフィルムを除去するためには他の方法と組み合わせる必要があると考えられる。また、実際の使用においては DUWL チューブが未使用の時から OZW の利用を継続することが必要となると考える。

一方で、DUWL 構成部品に対しては顕著な形状の変化が観察されなかったため、実際の DUWL における使用は安全であると考えられ、OZW の利用を継続することが可能となると考える。

今回の研究では、*in vitro* の条件における OZW の殺菌効果および DUWL の構成部品への影響を検討した。今後は、さらに臨床的な環境を想定した条件下での試験を行い、効果が確実な応用方法を模索する必要がある。

## 【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。

## 論文審査結果の要旨

近年、我が国では高齢者や易感染性宿主の増加に伴い、院内感染の防止が重要視されている。歯科では、デンタルユニット給水管路（dental unit water line : DUWL）内で、従属栄養細菌を主としたバイオフィーム（biofilm : BF）が形成され、その中には日和見感染症の原因菌も検出されており、院内感染発生のリスクとなり得ることが示唆されている。過去に様々な除染システムが考案されてきたが、現在日本では DUWL の水質保証は明確に義務化されていないこともあり十分な普及には至っていない。従って、低コストで維持管理が容易な新規の DUWL 汚染抑制システムの開発が急務である。ところで、オゾンは強い酸化力を持つ気体故に生体に危険である反面、水溶液中では分解しやすく低濃度では残留が少ないので、殺菌作用を有する安全な機能水として既に様々な分野で利用されている。そこで、低濃度オゾン水（low-concentrated ozonized water : OZW）の歯科領域への応用に着目し、効果的かつ安全性の高い DUWL 汚染抑制システムを開発する第一歩として、OZW の DUWL 汚染に関する微生物および BF 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したところ、以下の結果が得られた。

### 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、採水直後において最大の 0.4 mg/L を示し、その後約 2 時間で半減、さらに約 6 時間で 0.1 mg/L まで低下した。

### 2) 浮遊菌 (*Candida albicans*) に対する殺菌効果

Brain heart infusion 液体培地で 12 時間培養した *Candida albicans* ATCC10231 株を供試菌とした。殺菌効果は菌の ATP 量で判定した。OZW を作用させた *C. albicans* の ATP 量は、非作用群と比較して有意に低下し、概ね半減した。走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察では、菌体は膨張してその辺縁は不明瞭化し、形状は球体から楕円形へ、更に扁平へと変形していた。

### 3) DUWL 内面の BF を構成する微生物に対する殺菌効果

長期間、臨床現場で使用された DUWL の内面に形成された BF を回収し供試した。すなわち、裁断した DUWL チューブを試験水中へ浸漬し、緩やかに振盪後、各試験水を R2A 液体培地に置換して静置培養した (32 °C, 96 時間)。OZW を作用させた BF を構成する微生物の ATP 量は非作用群との間で有意差はなかったが、結果 2) と同様に半減する傾向を示した。SEM 観察では、OZW 処理によって DUWL 内部の BF を構成する微生物の形態が、結果 2) と同様に変形する傾向にあった。

### 4) DUWL 水中の微生物に対する殺菌効果

DUWL から採取した水 (DUWL 水) の中に存在する微生物を供試した。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 1 時間振盪した。SEM 観察では DUWL 水単独では、球体状の微生物が存在した。一方、DUWL 水を OZW と混合したものでは、微生物が破壊された様子を示す像を観察した。

### 5) DUWL 構成部品に対する影響

DUWL を構成する代表的な部品を選定し、6 ヶ月間継続的に OZW および水道水へ反復浸漬した。SEM 観察では、両者の間に表面形状の顕著な差はなかった。

以上のことから、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影響を与えることなく、給水管路汚染に関する微生物に対して殺菌効果を示したことから、DUWL の BF 汚染制御に有

用であることが示唆された。本研究で得られた結果は，DUWL 汚染に対する新たな対応策としての一助となり，また歯科領域に留まらない発展が期待されるものである。

よって，審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。