

図2 残留塩素濃度測定結果

4カ月目より、H-2の残留塩素濃度は0.10～0.37 ppmに低下し、H-1、コップ給水との相違が認められた。21カ月以降、H-2の残留塩素濃度は、H-1の残留塩素濃度(0.64～0.77 ppm)より低く、0.06～0.71 ppmであった。ユニット給水元から採取した水の残留塩素濃度はH-1、H-2、コップ給水よりも高い値を示した。

10² CFU/ml以下であった。

ユニット流入元の水の微生物による汚染状況は4カ月目までは検出限界以下であった。5カ月目から9カ月目にかけて、10～4.4×10² CFU/ml検出されたが、水採取部のバルブを洗浄消毒後、10カ月以降は7×10 CFU/ml以下であった。

いずれの場合も同時に標準寒天培地上で37°C、48時間の培養を行った結果では、一般細菌は検出されなかった(表1)。

塩基配列解析した優勢菌種は、*Methylobacterium populi*, *Sphingobium chlorophenolicum*, *Caulobacter vibrioides*であった。

3) チューブ内面のSEM観察の結果

6カ月以降、H-1、H-2、コップ給水部で、バイオフィーム様の形態がわずかに観察されたが、いずれのDUWLにおいてもごく少量であり、18カ月後もバイオフィームが広がっている状態は観察されなかった。H-1、H-2、コップ給水部の相違は明らかでなかった(図3)。

考 察

過酸化水素水をDUWL洗浄に選択した理由は、人体に対する安全性が比較的高く、生物体以外の表面では殺菌消毒効果が持続し、管路の部材に対する腐食性が少ないためである。

過酸化水素水による洗浄が行われているコップ給水に水の汚染は認められなかった。また同様にH-1では、10カ月後までは汚染は認められなかったが、11カ月以降に30～180 CFU/mlのコロニーが観察された。研究用装置の設定上の不具合が原因であったと考えられ、設定変更後は良好であった。また、21カ月後に10⁴ CFU/mlレベルの水質汚染がH-1、H-2ともに認められたが、カップリング除去後およびカップリング部の洗浄直後は検出限界以下になったことから、給水管路内の汚染ではなく、カップリング内部の特に給水管路など水が滞留する部分からの汚染があったと考えられた。カップリング部はハンドピース未装着時には専用キャップを装着するよう努めているが、キャップ未装着時の外部からの汚染、キャップ自体の汚染を回避することが必ずしもできないため、カップリング部の定期的洗浄を行うことが必要である。

ユニット流入元では、5カ月目から9カ月目にかけて10～4.4×10² CFU/mlの微生物による汚染が検出された。採取口バルブの交換を行った後検出限界以下となったので、水自体の汚染ではなく水採取口の汚染が原因と考えられた。

洗浄システムから分離し、通常どおり水道水のみを使用しているH-2では、残留塩素濃度の低下が認められた4カ月以降、微生物のコロニーが検出されはじめ、H-1との相違が認められた。しかしながら、診療後の水質検査で微生物が検出されたH-2においても、始業前のフ

表 1 微生物学的分析結果

経過月数	H-1		H-2		コップ給水
	カップリングあり	カップリングなし	カップリングあり	カップリングなし	
0	ND	—	ND	—	ND
1	ND	—	ND	—	ND
2	ND	—	ND	—	ND
3	ND	—	ND	—	ND
4	ND	—	10	—	ND
5	ND	—	ND	—	ND
6	ND	—	140	—	ND
7	ND	—	/	—	ND
8	ND	—	220	—	ND
9	ND	—	140	—	ND
10	ND	—	30	—	ND
11	30	—	180	—	ND
12	40	—	100	—	ND
13	180	—	20	—	ND
14	10	—	230	—	ND
15	ND	—	ND	—	ND
16	300	—	30	—	ND
17	30	—	140	—	ND
18	100	—	370	—	ND
19	30	—	150	—	ND
20	ND	—	40	—	ND
21	1,100	ND	7,200	670	ND
22	ND	ND	ND	ND	ND
23	ND	ND	300	180	ND
24	ND	ND	60	170	ND
25	ND	ND	630	10	ND

ND：検出限界以下，/：分析除外，単位：CFU/ml

ラッシング後には、汚染は認められなかった。また、7カ月目より24週間、始業前と診療後の両方を測定した結果、始業前のラッシング後には残留塩素濃度が高かったため、ラッシング後にH-2の水を使用することには問題がないと考えて日常臨床に使用している。

塩基配列解析の結果、優勢菌種は、主に土壌など自然界に分布している従属栄養細菌の種類であった。従属栄養細菌は上水道にも含まれ、低栄養環境で、体温より低い温度で生育しやすい。日本の水道水の水質基準の目標設定項目として、従属栄養細菌2,000 CFU/ml以下（暫定）と提示されている。R2A培地は、飲用水の従属栄養細菌の培養用に開発され、酵母エキスやカゼインペプトン量が標準寒天培地の1/5であり、水道法の水質管理目標でも使用が指示されている培地であるため今回使用した。

チューブ内面のSEM観察の結果では、H-2およびコップ給水部では6カ月目から、またH-1では9カ月目

から、ごく少量の菌の付着が認められた。給水管路チューブとして、バイオフィーム形成の抑制効果がある内面の材質がフッ素樹脂の積層チューブ²³⁾を使用している。フッ素樹脂は表面自由エネルギーが小さいので、分子間力が小さく、非特異的な付着抑制効果がある。そのため、洗浄システムから分離したH-2においても、バイオフィーム形成が抑制されていると考えられる。

これらの結果はチューブ先端の一部分の観察であり、長いチューブ全体の状態を把握できていないが、バイオフィーム状の付着物が増えていくようであれば、また、水中の微生物数が増加していくようであれば、ショックトリートメントやチューブ交換などの対策を講じていく必要がある。

今後、国内でDUWLの水質に関する社会の認識が高まり汚染対策が普及すること、さらに、水質維持のための目標値が提示されることが望まれる。

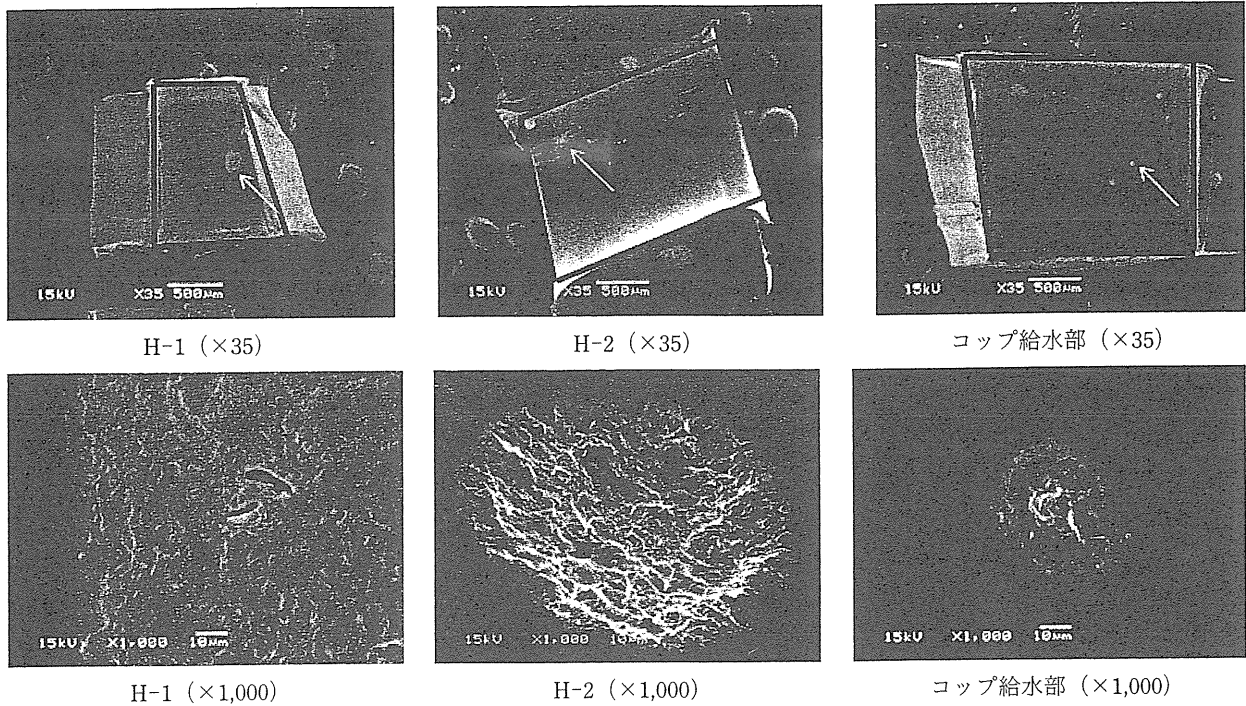


図3 チューブ内面のSEM観察結果(18カ月後)

18カ月後も、バイオフィーム状小付着物が点在しているが、チューブ内面を覆うように広がっている様子は観察されなかった。

黒枠：チューブ内面の概形、矢印：×1,000に拡大した部分

結 論

過酸化水素水による自動洗浄装置搭載の本クリーンシステムは、DUWLの水質維持に有効であることが示唆された。

文 献

- Williams JF, Andrews N, Santiago JI: Microbial contamination of dental unit waterlines: current preventive measures and emerging options; *Compend Contin Educ Dent* 17, 691-709, 1996.
- Miller CH: Microbes in dental unit water; *J Calif Dent Assoc* 24, 47-52, 1996.
- Barbeau J, Gauthier C, Payment P: Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review; *Can J Microbiol* 44, 1019-1028, 1998.
- Williams HN, Paszko-Kolva C, Shahamat M, Palmer C, Pettis C, Kelley J: Molecular techniques reveal high prevalence of *Legionella* in dental units; *J Am Dent Assoc* 127, 1188-1193, 1996.
- Barbeau J, Tanguay R, Faucher E, Avezard C, Trudel L, Côté L, Prévost AP: Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units; *Appl Environ Microbiol* 62, 3954-3959, 1996.
- Mills SE, Lauderdale PW, Mayhew RB: Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine 10%; *J Am Dent Assoc* 113, 280-284, 1986.
- Williams JF, Johnston AM, Johnson B: Microbial contamination of dental unit waterlines: prevalence, intensity and microbiological characteristics; *J Am Dent Assoc* 124, 59-65, 1993.
- 荒木孝二, 白井和弘, 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; *日歯保存誌* 43, 16-22, 2000.
- Tall BD, Williams HN, George KS, Gray RT, Walch M: Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes; *Can J Microbiol* 41, 647-654, 1995.
- American Dental Association: Infection control recommendations for the dental office and the dental laboratory; *J Am Dent Assoc* 127, 672-680, 1996.
- Kohn WG, Collins AS, Cleveland JL, Harte JA, Eklund KJ, Malvitz DM: Guidelines for infection control in dental health-care settings--2003; *MMWR* 52, 1-61, 2003.
- Coan LL, Hughes EA, Hudson JC, Palenik CJ: Sampling water from chemically cleaned dental units with detachable power scalers; *J Dent Hyg* 81, 80, 2007.

- 13) Zhang W, Onyango O, Lin Z, Lee SS, Li Y: Evaluation of Sterilox for controlling microbial biofilm contamination of dental water;. *Compend Contin Educ Dent* 28, 586—592, 2007.
- 14) Wirthlin MR, Marshall GW Jr, Rowland RW: Formation and decontamination of biofilms in dental unit waterlines; *J Periodontol* 74, 1595—1609, 2003.
- 15) Larsen T, Fiehn NE: The effect of Sterilex Ultra for disinfection of dental unit waterlines; *Int Dent J* 53, 249—254, 2003.
- 16) Schel AJ, Marsh PD, Bradshaw DJ, Finney M, Fulford MR, Frandsen E, Østergaard E, Ten Cate JM, Moorer WR, Mavridou A, Kamma JJ, Mandilara G, Stösser L, Kneist S, Araujo R, Contreras N, Goroncy-Bermes P, O'Mullane D, Burke F, O'Reilly P, Hourigan G, O'Sullivan M, Holman R, Walker JT: Comparison of the efficacies of disinfectants to control microbial contamination in dental unit water systems in general dental practices across the European Union; *Appl Environ Microbiol* 72, 1380—1387, 2006.
- 17) Walker JT, Bradshaw DJ, Fulford MR, Mars PD: 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.
- 18) Meiller TF, Kelley JI, Baqui AA, DePaola LG: Laboratory evaluation of anti-biofilm agents for use in dental unit waterlines; *J Clin Dent* 12, 97—103, 2001.
- 19) 小澤寿子, 中野雅子, 新井 高, 前田伸子, 斉藤一郎: 歯科用ユニット水ラインのショックトリートメントの効果—鶴見大学歯学部附属病院での実践—; *日歯保存誌* 52, 363—369, 2009.
- 20) Meiller TF, Kelley JI, Zhang M, DePaola LG: Efficacy of A-dec's ICX dental unit waterline treatment solution in the prevention and treatment of microbial contamination in dental units; *J Clin Dent* 15, 17—21, 2004.
- 21) von Fraunhofer JA, Kelley JI, DePaola LG, Meiller TF: Effect of a dental unit waterline treatment solution on composite-dentin shear bond strengths; *J Clin Dent* 15, 28—32, 2004.
- 22) Ozawa T, Nakano M, 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.
- 23) Yabune T, Imazato S, Ebisu S: Assessment of inhibitory effects of fluoride-coated tubes on biofilm formation by using the *in vitro* dental unit waterline biofilm model; *Appl Environ Microbiol* 74, 5958—5964, 2008.

緑膿菌性バイオフィーム形成阻害剤のスクリーニングにおける新規マイクロデバイスの有用性について

狩山玲子¹⁾, 金原和秀²⁾, 高野和潔³⁾, 妹尾典久⁴⁾, 大森啓士⁵⁾, 光畑律子¹⁾, 桐田泰三⁶⁾, 公文裕巳^{1,6)}

1) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学

2) 静岡大学工学部物質工学科

3) 岡山県産業振興財団

4) 岡山県工業技術センター

5) 協和ファインテック (株)

6) 岡山大学研究推進産学官連携機構新医療創造支援本部

I. はじめに

生体の細菌バイオフィームは医学・歯学における個別の領域の枠を超えて総合的に理解されるべき病態であり、バイオフィーム感染症の予防と制御のための新しい治療法・医療材料・抗バイオフィーム剤の開発に向けてブレークスルーが求められている^{1,2)}。岡山大学泌尿器病態学分野では、尿路でのバイオフィーム形成のモデル実験系として *in vitro* および *in vivo* の各種実験系を使用して、緑膿菌を中心に尿路バイオフィーム感染症に対する予防法と治療法に関する検討を行ってきた³⁻⁸⁾。平成14年度に導入した *in vitro* バイオフィーム実験モデル系のキャピラリーフローセルシステムを使用して、各種阻害候補化合物を評価してきたが⁶⁻⁸⁾、より効率的にスクリーニングできるデバイスの開発が望まれた。

平成20年6月6～7日に岡山で開催された第56回日本化学療法学会総会に Dr. Philip S. Stewart (Director and Professor, Center for Biofilm Engineering, Montana State University) を招請し、異分野連携プロジェクトの立ち上げを目指して Biofilm Research Project Meeting を開催した。一方、岡山県が推進してきた「マイクロものづくり岡山」創成事業において、産学官連携の「マイクロものづくり加工技術」は集積・高度化していた。このような背景におい

て、「バイオフィーム形成阻害剤を効率的にスクリーニングするための新規マイクロデバイスの開発」を推進した。

本稿では、産学官連携プロジェクトの成果としての新規マイクロデバイス^{9,10)}を概説すると共に、緑膿菌性バイオフィーム形成に対する阻害候補化合物を用いて最新型マイクロデバイス(薬剤混合型)の有用性について検討した成績を報告する。

II. 材料と方法

1. マイクロデバイスの設計と改良

初めて設計試作したデバイス(プロトタイプ)は、上部カバーガラス、シリコンパッキン、上部チャンバー、スペーサー(透析膜)、下部チャンバー、シリコンパッキン、下部カバーガラスから構成され、ステンレス製の押さえ板で上下を挟んで固定する構造であった。プロトタイプデバイスは、顕微鏡のステージに入るサイズ(64×54×9 mm)で、上下を逆にする事で、正立顕微鏡、倒立顕微鏡の両方で観察可能である。14の培養室と薬液室を有し、1種類の菌体を7種類の薬剤で評価できる。チャンバー側面の各注入口は直径1.23 mmであり、カニューラ(日本シャーウッド製)の外径にあわせた口径になっている。薬剤浸透タイプと薬剤混合タイプの2種類の構造のデバイスを作製

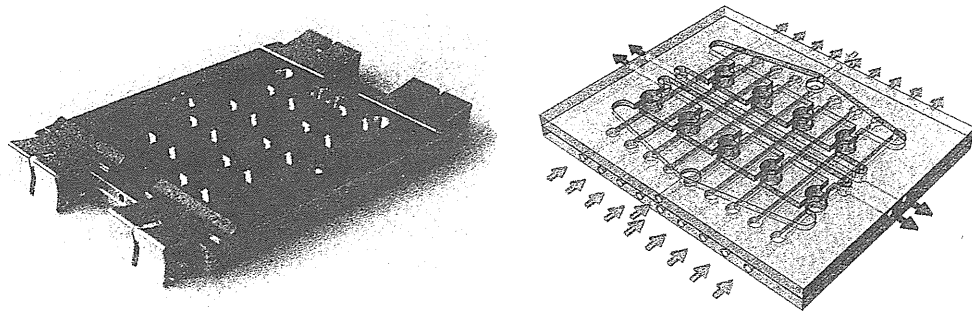


Fig. 1 A new type of microdevice with porous media (50 × 40 × 5 mm).

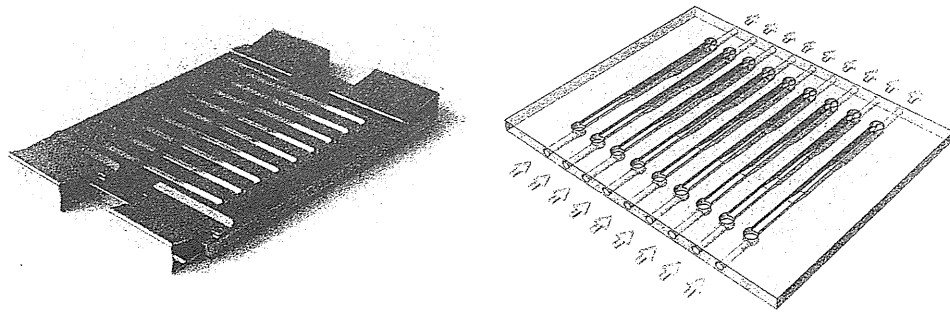


Fig. 2 A new type of microdevice without porous media (50 × 40 × 2.4 mm).

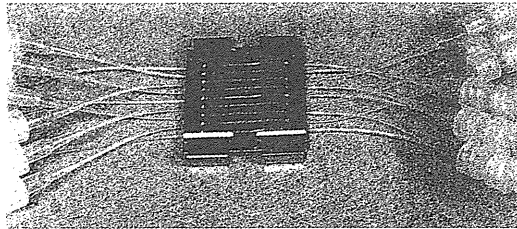


Fig. 3 A new type of microdevice without porous media connecting cannulae.

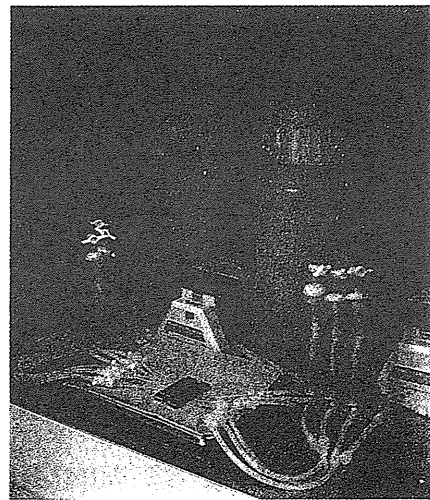


Fig. 4 A biofilm flow cell system with a new type of microdevice without porous media connecting cannulae.

した。薬剤浸透タイプは、バイオフィーム形成系と薬剤供給系が異なる二重構造とした。薬剤混合タイプは、バイオフィーム形成チャンネルに勾配（深さ 0.5 mm, 1 mm, 1.5 mm）をつけ、流速の変化によるバイオフィーム形成の変動を観察できる構造とした¹⁰⁾。

上記プロトタイプデバイス（両タイプ）を基本として、小型化を図ると共に流路と培養室等のサ

イズ改良を行った。最新型マイクロデバイスは、プロトタイプに比較して、コンパクトかつシンプルであり、より多くの菌体あるいは薬剤の検討が可能となった。薬剤浸透タイプ（Fig. 1）は 2 種類の菌体のバイオフィームに対して 9 種類の薬剤の検討、薬剤混合タイプ（Fig. 2）は 9 種類の培養条件で検討可能である。

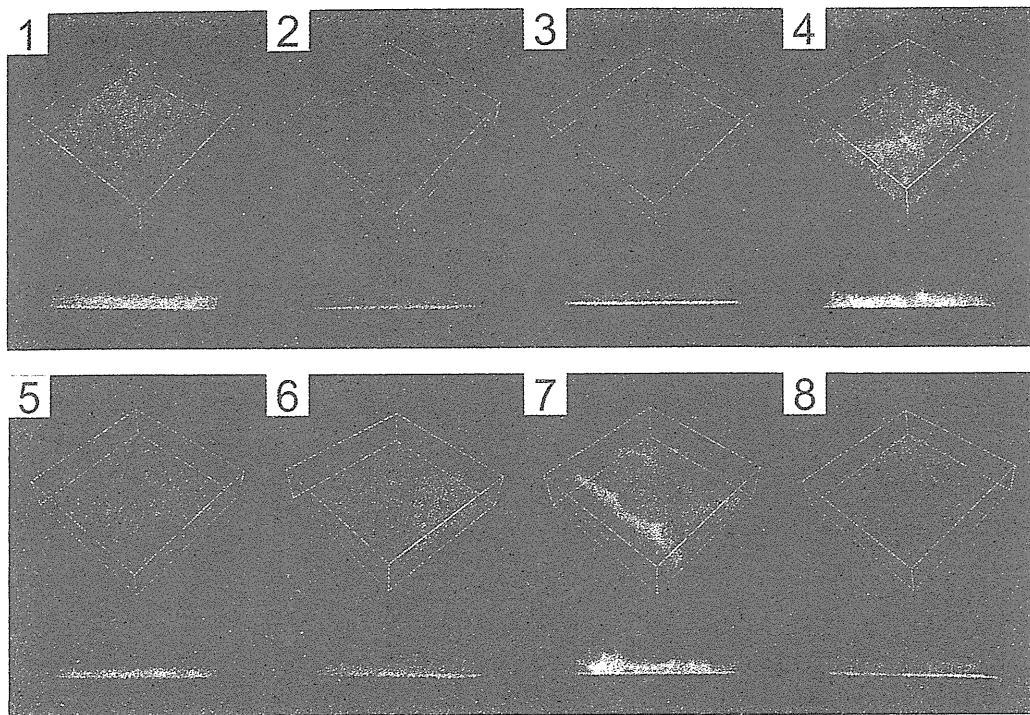


Fig. 5 Representative reconstructed three-dimensional images of GFP producing *P. aeruginosa* biofilms after 48-h in the absence and presence of quorum sensing inhibitors (100 μ M). Confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 510) with 20 \times microscope objective was used to examine. 1: no treatment, 2: compound-1, 3: compound-2, 4: compound-3, 5: compound-4, 6: compound-5, 7: compound-6, 8: compound-7. The thickness of biofilms was 5 to 70 μ m.

2. 新規バイオフィームフローセルシステム

Fig. 3 にカニューラを装着した最新型マイクロデバイス (薬剤混合タイプ) を示した。新規バイオフィームフローセルシステムにおける最新型マイクロデバイス (Fig. 4) に、GFP (green fluorescent protein) 産生緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* OP14-210 (pMF230) 株を接種して、37 $^{\circ}$ C、2 時間放置したのち、人工尿を 20 mL/hr で灌流させた。デバイスに形成されたバイオフィームを 48 時間後に共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM: Zeiss LSM 510) にて観察した。同様に、緑膿菌におけるクオラムセンシング機構の阻害剤として見出された 16 種類の化合物 (100 μ M) を人工尿に添加し、バイオフィーム形成阻害効果を比較検討した。

III. 成績

最新型マイクロデバイス (薬剤混合タイプ) に形成されたバイオフィームの代表的 CLSM 三次元構築像を Fig. 5 に示した。本稿の実験では、最新型マイクロデバイスの評価を目的とし、キャピラリーフローセルシステム⁶⁻⁸⁾において評価済みの化合物

を用いた。化合物無添加を含めて 7 種類の化合物を同時に評価すると、キャピラリーフローセルシステム⁶⁻⁸⁾で最も高い阻害効果を示した化合物が、本実験系においても最も高い阻害効果を示した。同様に、その他 9 種類の化合物についても評価を行い、阻害効果の差異を確認した。

IV. 考察

近年、多剤耐性菌による感染症の医療現場への影響は一層拡大しており、耐性菌と院内感染対策の観点から抗バイオフィーム剤の開発を推進する必要がある。新規マイクロデバイスを設計試作し、改良を重ねた成果として、バイオフィーム形成阻害剤を効率的にスクリーニング可能なデバイスの基本設計がほぼ完成に近づいた。最新型デバイス (薬剤混合タイプ) を用いて、抗菌薬 (レボフロキサシンとホスホマイシン) の単独ならびに併用での効果を検討した結果、キャピラリーフローセルシステムでの CLSM 画像と同様の成績が得られた¹⁰⁾。さらに、本稿ではクオラムセンシング機構の阻害剤として見出された 16 種類の化合物を用い

て、最新型デバイス（薬剤混合タイプ）を評価した成績を示した。一連の実験において得られた画像は、キャピラリーフローセルシステムを使用して得られた画像に比較して、遜色ないことが明らかになった。一定の流速下でのスクリーニングを目的とするのであれば、勾配のないデバイスの使用も可能であり、我々は勾配のない（深さ1 mm）デバイスでの評価も開始した。これらのデバイスを用いて、バイオフィーム感染症に有効な新規化合物ならびに各種阻害候補化合物の併用効果をスクリーニングすることが可能である。

バイオフィーム研究の基盤技術については、これまでにも多くの提案がなされ、各種デバイスが開発されてきた^{11,12)}。各々の菌種が単独あるいは複数で形成するバイオフィームは、環境条件により多様性に富む構造体となることから、構造体内部の微生物の生態は複雑で捉えがたい。従って、バイオフィーム感染症の予防と制御のための新しい治療法・医療材料・抗バイオフィーム剤の開発には、様々な研究手法による多面的アプローチが必要である^{1,2)}。

本産学官連携プロジェクトを推進するにあたり、フローセルシステムにおいて、これまででない効率でバイオフィーム形成阻害剤のスクリーニングが可能となるマイクロデバイスの開発を目指した。新規マイクロデバイスは、①顕微鏡のステージに装着可能、②培養しながら観察可能（サーモプレートで保温可能）、③チャンバーはステンレス製で、耐薬品性に優れ、オートクレーブによる滅菌も可能、④チャンバー側面の各注入口はカニューラの外径に適合していて、チューブをワンタッチで接続可能、⑤市販のカバークラス使用可能、⑥形成阻害剤のスクリーニングに最適、⑦複数の条件で同時に観察可能という特長を有する。薬剤浸透タイプと薬剤混合タイプとも量産可能な構造と構成であり、同一サイズで相互の部品に互換性があるため、使用者独自のシステムを組むことが可能である。本デバイスは協和ファインテック株式会社 (<http://www.kyowa-ft.co.jp>) に特許技術実施許諾済みであり、各研究室の観察・検討内容に応じて、オリジナルのデバイスの製作（カスタムメイド）に対応できる体制が整っている。

V. 謝 辞

平成 20 年 6 月 7 日に開催された Biofilm Research Project Meeting において、貴重なアイデアをご提供

いただきました諸先生方（敬称略）、池田 幸（宇都宮大学）、常田 聡（早稲田大学）、野村暢彦（筑波大学）、加藤純一（広島大学）、菅 裕明（東京大学）、Philip S. Stewart (Center for Biofilm Engineering, Montana State University) に深謝いたします。新規マイクロデバイスの開発は、平成 20 年度メディカルテクノおかやま共同研究委託事業（財団法人岡山医学振興会）、平成 21 年度特別電源所在県科学技術振興事業（財団法人岡山県産業振興財団）、平成 21 年度 JST シーズ発掘試験（独立行政法人科学技術振興機構）および日本学術振興会科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究:No.20659251）の助成を受けて行った。また、最新型マイクロデバイスの有用性に関する検討は、厚生労働科学研究費補助金（H22-医療—一般—026）の助成を受けて行った。

VI. 文 献

- 1) Donlan R. M. et al.: Clin. Microbiol. Rev., 15: 167-193, 2002.
- 2) Høiby N. et al.: Int. J. Antimicrob. Agents, 35: 322-332, 2010.
- 3) Kumon H. et al.: Antimicrob. Agents Chemother., 39: 1038-1044, 1995.
- 4) Mikuniya T. et al.: Acta Med. Okayama, 59: 209-216, 2005.
- 5) Mikuniya T. et al.: J. Infect. Chemother., 13: 285-290, 2007.
- 6) 狩山玲子、他：緑膿菌感染症研究会講演記録, 40: 135-138, 2006.
- 7) 狩山玲子、他：緑膿菌感染症研究会講演記録, 41: 39-43, 2007.
- 8) 狩山玲子、他：化学療法の領域, 26: 71-78, 2010.
- 9) 金原和秀、他：水環境学会誌, 33(A): 100-105, 2010.
- 10) 狩山玲子、他：Bacterial Adheren. & Biofilm, 24: 69-73, 2010.
- 11) 八幡穰、他：化学療法の領域, 26: 37-44, 2010.
- 12) Benoit M. R. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 76: 4136-4142, 2010.

Usefulness of new types of microdevice for screening compounds against *P. aeruginosa* biofilms

Reiko Kariyama¹⁾, Kazuhide Kimbara²⁾, Kazukiyo Takano³⁾, Norihisa Senoo⁴⁾, Keishi Ohmori⁵⁾, Ritsuko Mitsuhashi¹⁾, Yasuzo Kirita⁶⁾, Hiromi Kumon^{1,6)}

¹⁾ *Department of Urology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University*

²⁾ *Department of Materials Science and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Shizuoka University*

³⁾ *Okayama Industrial Promotion Foundation*

⁴⁾ *Industrial Technology Center of Okayama Prefecture*

⁵⁾ *Kyowa Fine Tech Co., Ltd.*

⁶⁾ *Organization for Research Promotion & Collaboration, Research Promotion Office for Innovative Medicine, Okayama University*

It is necessary to make a major breakthrough toward the development of novel therapies, medical devices and innovative antibiofilm agents for the prevention and control of biofilm infections. Under these circumstances, we started to develop a new type of microdevice to screen antibiofilm agents efficiently. We designed the new type of microdevice which might be set on microscope stages and evaluated the effects of many samples simultaneously. The specification of a model of microdevice with porous media is a double structure with a layer of biofilm formation and a layer of drug supply. The specification of a model of microdevice without porous media is three-step slopes which are able to observe changes in biofilm phenotype by different flow rates. A GFP (green fluorescent protein)-producing strain, *Pseudomonas aeruginosa* OP14-210 (pMF230) was used. By using a biofilm flow cell system with a new type of microdevice (the latest model without porous media), quorum sensing inhibitors (100 μ M) were tested. Biofilms were grown in a new type of microdevice under continuous flow conditions with artificial urine, and were observed by confocal laser scanning microscopy. The thickness of reconstructed three-dimensional images of GFP producing *P. aeruginosa* biofilms was 5 to 70 μ m. Our previous findings by using a capillary flow cell system regarding quorum sensing inhibitors were also confirmed using the new type of microdevice. The basic design of a new type of microdevice for efficient screening of antibiofilm agents was almost established by continuous improvements. By using the new type of microdevice, it is possible to screen novel compounds and the combination of possible antibiofilm agents for the treatment of biofilm infections.

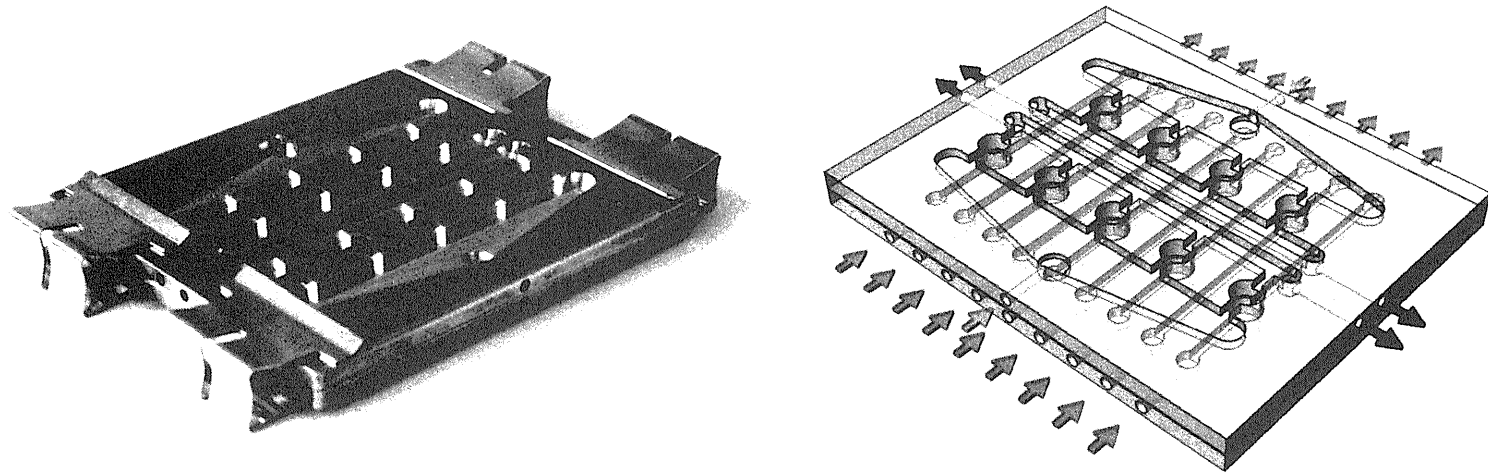


Fig. 1

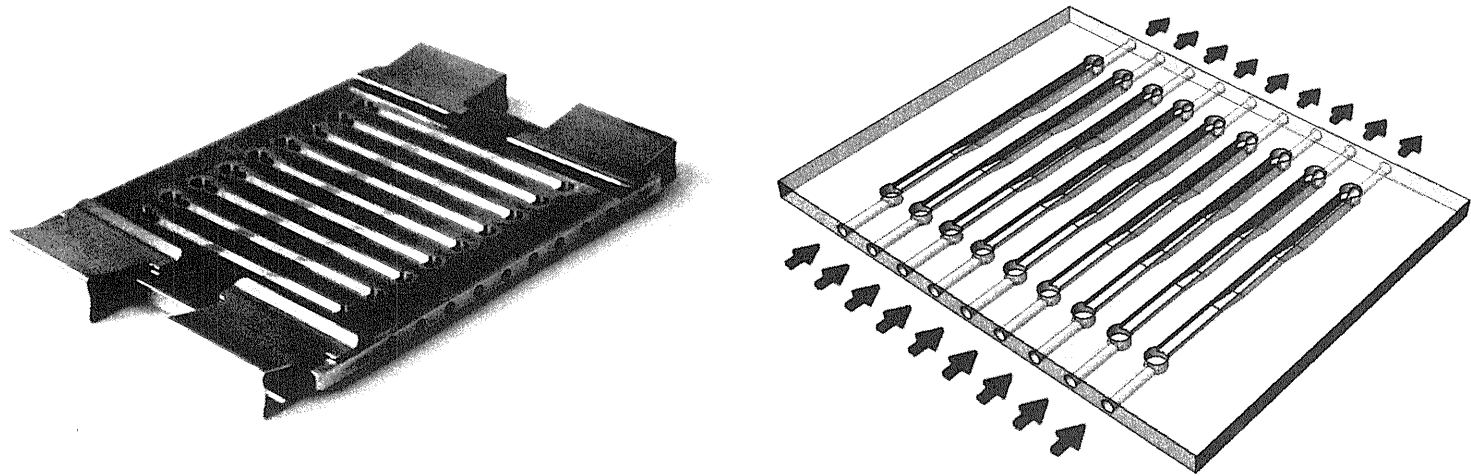


Fig. 2

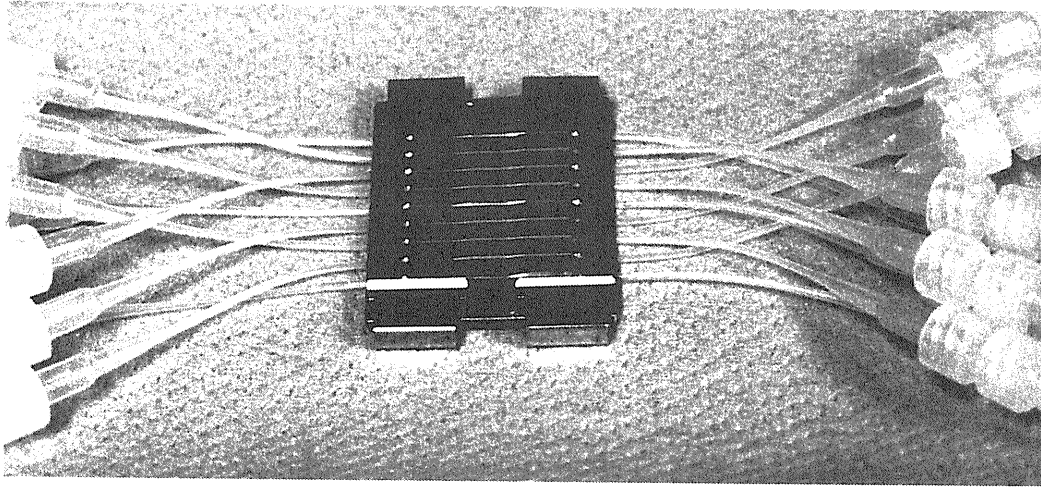


Fig. 3

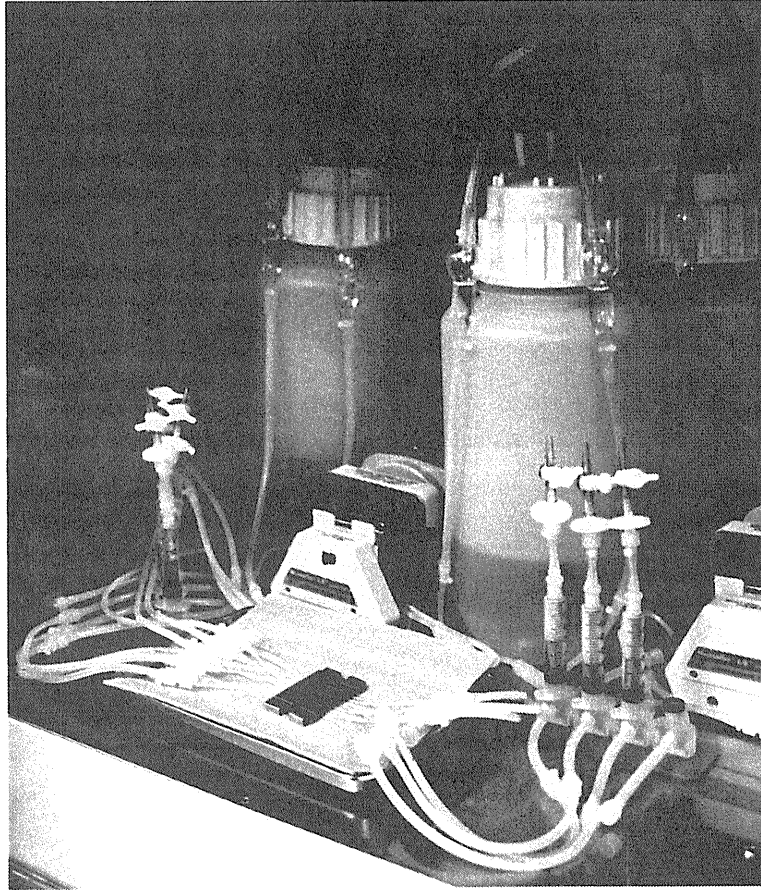


Fig. 4

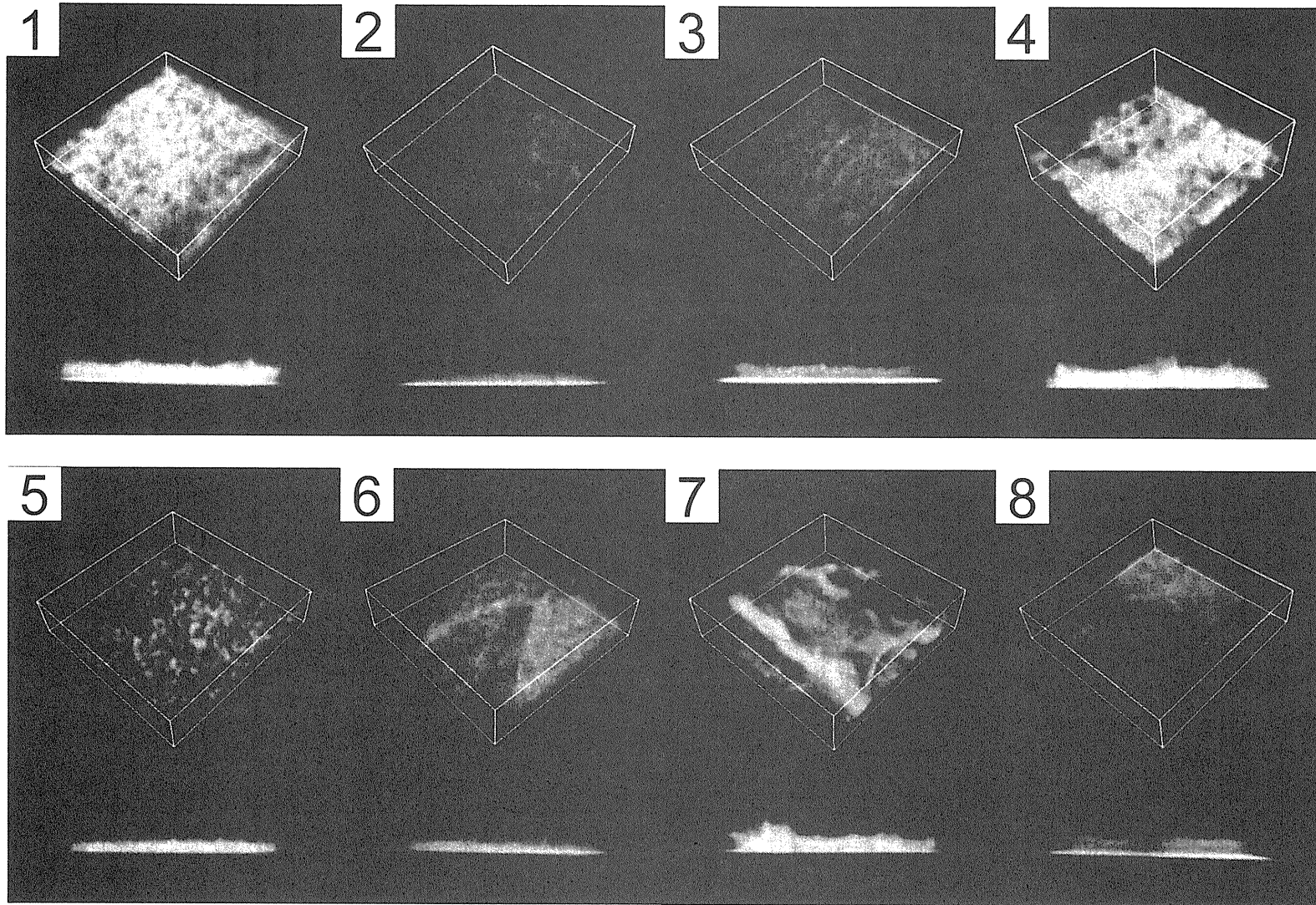
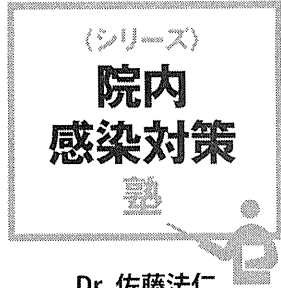


Fig. 5



Dr. 佐藤法仁
INFECTION CONTROL AND PREVENTION

はじめに

医療分野において、滅菌・消毒・洗浄は日常的な作業の一つです。ただ、この日常的な作業は、とても重要な作業といえます。例えば、本来は滅菌が必要な器具を洗浄だけで済ませていたり、消毒剤の使用方法が間違っていた場合などは、結果的に患者さんが安心して歯科医療を受ける環境を損なうことになります。日常的かつ重要性の高い滅菌・消毒・洗浄という操作をすべてのスタッフが理解し使いこなすことは、社会により良い歯科医療を提供することにもつながります。シリーズの第3回は、「滅菌・消毒・洗浄の基礎」と題して、まず基本的な点を2回に分けて紹介します。

滅菌

滅菌とは、すべての微生物を物理的・化学的手段を用いて殺滅させるか、完全に除去し無菌状態をつくることです。物理的手段には、高圧蒸気滅菌（オートクレーブ）、低温プラズマ滅菌などがあり、化学的手段にはエチレンオキシドガス（EOG）滅菌などが利用されます¹⁾。

医療現場で求められている滅菌後の微生物汚染の水準は、 10^{-6} （1,000,000回滅菌したうち1回が汚染される水準）とされています。この水準は、無菌性保証水準（SAL）といわれ、限りなく微生物に汚染されていないことを示します。滅菌作業を行う際、器具などに付着している汚染物が少ないほど 10^{-6} に達する時間が短くなり、滅菌後のSALが高くなります²⁾。つまり、事前に洗浄できる器具の場合は、付着している汚染物を洗浄することが重要といえます。

第3回 滅菌・消毒・洗浄の基礎①

「どうせ滅菌するのだから洗浄なんて必要ないのでは？」と思う場面があるかもしれませんが、滅菌前の洗浄にはちゃんとした意味があります。また、洗浄後の乾燥は、器具の水分を除去することによって滅菌の効率を上げることが目的としています。オートクレーブ、EOG滅菌具に水分が残っていると滅菌が不十分になります。なお、臨床現場でよく使用されているオートクレーブは管理が容易なことから数多くの歯科医院で使用されていますが、121℃以上で使用されるため器具の損傷が起こりやすい欠点があります。また大量に滅菌が可能です。滅菌機への詰め込みは器具の損傷だけでなく、十分な滅菌が得られない場合があります。オートクレーブの使用時は、取扱説明書の記載事項の確認と定期検査などを行うことが重要です。

消毒

消毒とは、人体に有害な微生物の感染性を物理的・化学的手段を用いてなくすか量を少なくすることで、物理的手段には煮沸や濃過があり、化学的手段には消毒剤などが利用されます。現在、市販されている消毒剤は数多くありますが、その使用については、次の「消毒剤の3要素」を押しさえておく必要があります。

1. 消毒剤の3要素

①濃度：消毒剤は適切な濃度でなければ、その効果を十分に発揮することはありません。使用する際は、必ず取り決められた濃度で使うことが重要です。消毒剤を希釈して使用する時は、取扱説明書に記載されている有効濃度を確認したうえで希釈する必要があります（「いまさら希釈の計算方法が聞けない…」と思われる方は、表1を参照してください。また、希釈する際に用いる水は、水道水で構いませんが、時間が経過した水道水は微生物が増殖している可能性があるため、希釈した消毒剤は速やかに使用することを勧めます。

なお、クロルヘキシジングルコン酸塩は水道水に含まれている硫酸イオンにより硫酸クロルヘキシジンに沈殿が起こることがあります。また、ベンザルコニウム塩化物は硬度の高い水道水（硬水）で希釈すると殺菌力が低下することがあります³⁾。

②時間：消毒剤を吹きかければ瞬時に微生物が死ぬ訳ではありません。消毒剤が微生物に作用するには時間がかかります。例えば、黄色ブドウ球菌は一般に30秒以上の作用時間が必要とされています。また、速効性といわれる消毒用エタノールやイソプロパノールも10～15秒程度の接触時間が必要⁴⁾。つまり、消毒剤を吹きかけて、すぐに拭き取ることは「消毒」にはなりません。

③温度：使用する消毒剤には適切な使用温度があり、低すぎても高すぎてもその効果を十分に引き出すことができません。大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌に対しては、10℃の消毒剤よりも26℃の消毒剤の方が殺菌効果が高いとの報告などが出されています⁴⁾。そのため、消毒剤の保存方法や保管場所も含めて消毒剤の取扱書に記載されている内容に従い、適正に取り扱う必要があります。

2. 消毒剤のスペクトル

「スペクトル（スペクトラム）」というのは簡単に言えば、その消毒剤がどの微生物に効果があるのかということ。つまり、「スペクトルが広い」とは多くの微生物に効果を示すということになります。主な消毒剤のスペクトルと適応対象は、表2のようになっています⁵⁾。

表2の消毒用エタノールは、B型肝炎ウイルス（HBV）に対して「有効である」との報告もありますが、逆に「有効ではない」という報告も出されているため、厚生労働省監修の「ウイルス肝炎対策ガイドライン」では「有効ではない」と分類されています。また、一般向けの情報公開でも「有効ではない」と

の基礎①

とされています⁶⁾（したがって前号の回答はeとなります）。皆さんの歯科医院でHBVキャリアの方を診療した際に器具類を消毒する場合は、消毒用エタノールではなく、次亜塩素酸ナトリウム製剤など、HBVに対して有効な消毒剤を使用するようにしましょう。

おわりに

今回は日常でもっとも作業頻度の高い、「滅菌・消毒・洗浄」について取り上げました。今回は、滅菌と消毒について紹介しましたが、消毒剤の選択などは難しいことがあるかもしれません。特に、消毒剤のスペクトルは微生物への有効の有無が違ってくるので注意する必要があります。ただ、このスペクトルをすべて覚えることは難しいので、院内の作業場にスペクトル表を掲示し

ておくことも適切な消毒剤選択に繋がるでしょう。また、HBVの消毒用エタノールの効果の有無など、日々研究で消毒剤の効果が変わってくる可能性があります。日ごろから、「滅菌・消毒・洗浄」に関する情報にアンテナを張っておくことが必要でしょう。

今回は、基礎の2回目として洗浄や紫外線殺菌などについて紹介したいと思います。それでは最後に皆さんに滅菌・消毒・洗浄に関する問題を紹介します。

紫外線殺菌灯で正しくないものはどれか？

- a. 紫外線は人体に有害である
- b. 紫外線は残留毒性がない
- c. 紫外線は常温で使用できる
- d. 紫外線は透過性が強い

著者プロフィール

佐藤 法仁 (せとう・のりひと)
独立行政法人日本学術振興会特別研究員 奈良よび岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔感染生物学分野所属、同志社大学大学院総合政策学系研究科修士後、企業・研究機関を経て岡山大学学務部部長、専門は感染制御学、感染政策学。

解答は次号で紹介いたしますので、スタッフミーティングなどの際にスタッフの皆さんと問題を解いてみてください。

【参考文献】

- 1) 佐藤法仁: すぐに役立つ院内感染対策のレベラップポイント. DH style. 53:17, 2011.
- 2) 伏見 了 他: これで解決! 洗浄・消毒・滅菌の基本と具体策. ヴァンメダイカル. 2008.
- 3) 白石 正 他: エタノール、イソプロパノール、メタノール変性アルコール製剤に関する殺菌力の検討. 環境感染. 13 (2): 208, 1998.
- 4) 島崎 啓彦: 紫外線殺菌灯の実験的条件下における殺菌力の検討. 北里医学. 12:512, 1982.
- 5) 栗原英真 他: 徹底しよう! 感染予防策と滅菌・消毒・洗浄. デンタルハイジーン. 29(2): 452007.
- 6) 厚生労働省: B型肝炎について (改訂第3版). <http://www.mhlw.go.jp/bunya/hepatitis/h.html>

表1 消毒剤の希釈計算方法

{A}%の消毒剤を希釈して {B}%の消毒剤を {Y} mL 作る時に必要な原液の量 {X} mL を求める計算式は、

$$X \times (A) / 100 = Y \times (B) / 100$$

$$X = (Y) \times (B) / (A)$$
 例えば、6% (A)の次亜塩素酸ナトリウムを希釈して、0.01% (B)の溶液を1,000mL (Y) 作る時の計算は、

$$X = 1,000 \text{ mL} \times (Y) \times (0.01\% / 6\% (A))$$

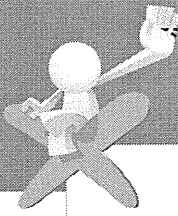
$$X = \text{約 } 1.7 \text{ mL より}$$
 原液 1.7mL に水 998.3mL を加えることになる。

参考資料: 伏見 了 P11の表より改変²⁾

表2 消毒剤の微生物スペクトルと適応対象

消毒剤	微生物 適応対象	細菌						真菌	ウイルス			適応対象		
		グラム陽性菌			グラム陰性菌				一般 ウイルス	HBV	HIV	手指 皮膚	粘膜	器具
		一般 細菌	MRSA	芽胞	一般 細菌	緑膿菌	結核菌							
広域	グルタラール	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	×	×	◎
中域	消毒用エタノール	◎	◎	×	◎	◎	◎	○	◎	×	◎	◎	×	◎
	次亜塩素酸ナトリウム	◎	◎	○	◎	◎	○	◎	◎	◎	◎	○	×	○
狭域	ポビドンヨード	◎	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	×
	ベンゼトニウム塩化物	◎	○	×	◎	○	×	○	×	×	×	◎	◎	◎
	ベンザルコニウム塩化物	◎	○	×	◎	○	×	○	×	×	×	◎	◎	◎
	クロルヘキシジングルコン酸塩	◎	○	×	◎	○	×	○	×	×	×	◎	×	◎
	アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	◎	○	×	◎	◎	○	○	×	×	×	◎	○	◎

微生物…◎有効 ○効果弱い ×無効 適応対象…◎使用可 ○注意して使用 ×使用不適 資料参考: 栗原英真, 新井裕子表2, 3より改変⁵⁾



感染制御学ノート

佐藤法仁 *Norito SATOH*

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
口腔微生物学分野
日本学術振興会特別研究員

vol.①

感染制御と微生物

今月号から、「感染制御学ノート」の連載がはじまりますが、そもそも「感染制御ってなに？」と思う人が多いかもしれません。感染制御を定義する言葉は定かではありませんが、私なりに簡単に説明すると、「感染する、するであろう事例に対して、予防・対策を講じること」といえます。

感染する「事例」には、例えば病原微生物からの感染、医療事故の一つである針刺し事故や入院患者内での感染症伝播など、あらゆる事例が存在します。「予防・対策」としては、病原微生物に感染しないためのワクチン接種、医療従事者の教育、行動学習、医療施設の整備、はたまた QOL（生命の質）向上なども含まれます。

このように感染制御は、医療現場・人におけるほぼすべての領域をカバーすると言っても過言ではないかもしれません。これだけ広い領域だと、「どこをどうすればよりよい感染制御ができるの？」と困惑してしまうと思います。そこで本連載では、「病原微生物とのかかわり」に視点を置いて、できるだけ専門用語は避け、わかりやすい言葉を用いて、歯科臨床現場で役立つ知識と技術をみなさんに紹介できればと思います。

まず第1回目は、「感染制御と微生物」について述べたいと思います。



感染制御の前提

感染制御の歴史は太古の昔にさかのぼります。

ヒポクラテス（B.C. 460頃～370頃）は、煮沸、手洗い、薬物付きの被覆材などに効果があることを知っていました¹⁾。その後、文明の発展、戦役での発明、ペストなどの感染症の大流行などさまざまな要因を経て、現代の「科学的根拠に基づいた感染制御」が医療現場で用いられています。

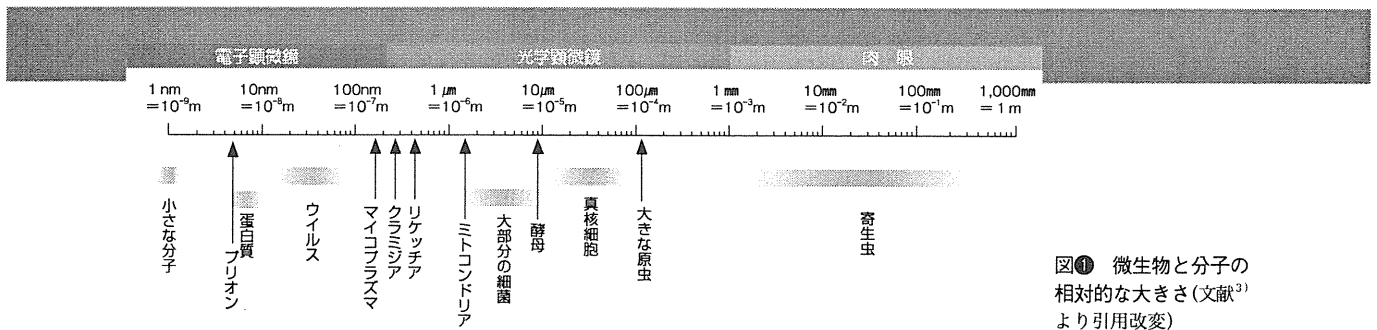
つまり、「この病原微生物の感染制御には、この方法（対策）を行う。その科学的根拠は〇〇だからである」という公式が必ず成り立つことが前提となります。経験則によるものは意味がありません。

また、感染制御を行う者、例えば歯科医療従事者は歯科医療のスペシャリストであるかもしれませんが、感染制御は前述したように多種多様な領域にわたります。そのため、感染制御を行う者は、スペシャリストではなくジェネラリスト（総合家）としての認識とそれに見合う知識と技術をもつことが前提となります。そのため、職域や学域にとらわれず広い視野をもち、貪欲に知識と技術を取り入れる姿勢が必要となります。



微生物

感染制御を微生物とのかかわりからみてみましょう²⁾。まず、「微生物」には、細菌、ウイルス、真菌、寄生虫などに分類されます。なお、細菌には、リケッチア、クラミジアが含まれます³⁾。これらのなかで、ヒト（動物を含む）に感染症を引き起こすものを「病原微生物」と呼びます。



図① 微生物と分子の相対的な大きさ(文献²⁾より引用改変)

微生物を大きい順に並べると寄生虫、真菌、細菌、ウイルスになります(図1)。寄生虫のなかには肉眼で見られるものもありますが、単一の真菌、細菌、ましてやウイルスは肉眼で見えません。これらを見るためには顕微鏡(光学顕微鏡、電子顕微鏡)を利用しなくてはなりません。

1. 細菌

細菌は、単細胞生物に分類されます。私たちの身体の中はもとより、地球上のあらゆる場所に生息しています。その一部が病原細菌として私たちに感染症をもたらします。歯科では、「むし歯菌」、「歯周病菌」といわれるように、細菌が最もよく知られています。また、抗生物質^{b)}のなかには土壌細菌から発見されたストレプトマイシンやテトラサイクリンなどがあり、感染症治療薬(化学療法薬剤)として利用されています。

2. ウイルス

ウイルス^{c)}は、遺伝情報を蛋白質の殻で包んだ粒子で、生物の基本的な性質である細胞としての構造をもちません。人など細胞に感染し、増殖することで子孫を残します。インフルエンザやAIDS(後天性免疫不全症候群)の原因となるHIV(ヒト免疫不全ウイルス)などが有名です。

3. 真菌

世間でよく耳にする「カビ」(黴)^{d)}です。菌糸を伸ばして多核細胞として発育するのを糸状菌(カビ)、単細胞として生息するのを酵母といいます。食用キノコやパン酵母、日本酒のコウジカビ

など古くから私たちの生活のなかで利用されています。ヒトに対して病原をもつものを病原真菌(医真菌ともいう)といいます。

4. 寄生虫

寄生動物の総称で、身体の内部に寄生するものを内部寄生虫といい、原虫類、蠕虫類がいます。外部寄生虫としては、ダニなどの節足動物が挙げられます。熱帯地域で患者が多いマalariaは、ハマダラ蚊がもつマalaria原虫が吸血の際にヒトの身体に入り感染し、発症に至ります。

第1回目として「感染制御と微生物」について簡単に触れました。多忙な臨床現場にいと学生時代に学んだことは遠い記憶の彼方に飛んでいってしまうのは誰もが経験することです。今回、改めてこれら遠い記憶に触れることを大切にすれば、きっと自分自身のスキルアップや職場改善など、さまざまなことに役立つと思います。そのように行動できるように私もみなさんとともにこの連載を進めていきたいと思っています。

それでは次回は、細菌について少し詳しく説明したいと思っています。興味がある方は、家で眠っている教科書を起こしてあげてください。

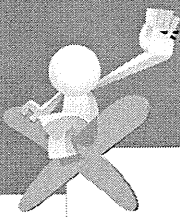
【参考文献】

- 1) LaForce FM: The control of infections in hospital. Williams & Wilkins, 1987.
- 2) 藤本秀士(編著):病原体・感染・免疫. 南山堂, 東京, 2010.
- 3) 山口恵三, 松本哲哉(監訳):イラストレイテッド微生物学. 丸善, 東京, 2008.

言葉の窓



- a) リケッチア、クラミジアは、生きた細胞の中でしか増殖できないなど、他の細菌と異なる性質を持つため別格として扱われています。そのため、リケッチア、クラミジア以外の細菌を「一般細菌」とも呼びます。
- b) 微生物同士の戦いを「抗生」と言うことから名前がつけられました。
- c) 「ウイルス」は誤表記で、正しくは「ウイルス」と表記されます。
- d) 「バイキン」は漢字で「黴菌」と書きます。つまり漢字でカビ(黴)と細菌(菌)のことを指しています。

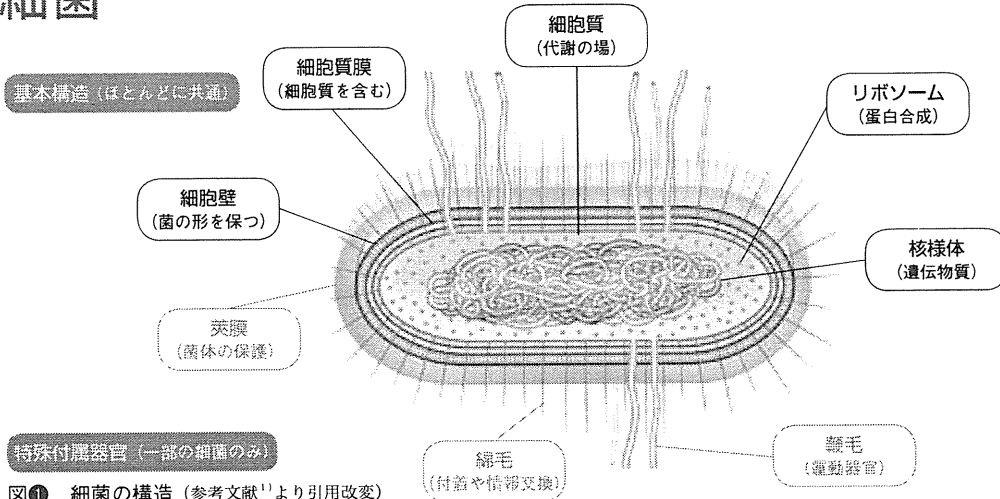


感染制御学ノート

佐藤法仁 *Norito SATOH*
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
口腔微生物学分野
日本学術振興会特別研究員

vol.②

細菌



図① 細菌の構造 (参考文献¹⁾より引用改変)

今月号は、細菌 (bacterium, 複数形 bacteria) について紹介しますが、細菌のすべてを1回で説明するのはとても難しいです。そこで、細菌の構造と感染制御とかかわりの深い毒素を中心に紹介したいと思います。



細菌の構造

1. 組成

人の身体の60～70%が水分であるように、菌体の約80%は水分で構成され、残りの約20%は固形成分となっています。20%の内訳は、蛋白質が約10%、炭水化物や脂質が約6%、DNA・RNAが約3%、残りが無機質(ミネラルなど)です。

2. 構造

この世の中には、数えきれないほど細菌が生息しており、その構造も実にさまざまです。しかし、図1にみるように、基本構造(ほとんどの細菌に共通しているもの)と特殊付属器官(一部の細菌

のみもっているもの)があります¹⁾。

今回、そのなかで注目するのが「細胞壁」です。細胞壁は、主にペプチドグリカン^{a)}という細菌特有の物質で構成されています。グラム陽性菌は分厚い細胞壁をもちます。他方、グラム陰性菌の細胞壁は薄いですが、その代わりに外膜などをもっていて、陽性菌よりも複雑な構造をしています。

3. 形態

細菌を光学顕微鏡で見たとき、その形の違いによって分けられています。「球菌」は文字どおり丸状をしたもので^{b)}、「桿菌」は四角い棒状をしたもの(紡錘形も含む)、「らせん菌」はねじれたらせん状をしています。



グラム陽性菌とグラム陰性菌

先ほど、「グラム陽性菌」、「グラム陰性菌」と述べましたが、これは1884年にオランダのHans Christian Joachim Gram (1853-1938)が発見

した染色法「グラム染色」という細菌を色分けする方法により、グループ分けをしています。これは、染色過程で用いるアルコールに脱色されないものがグラム陽性菌（青色に染まる）、脱色されるものがグラム陰性菌（赤色に染まる）です。

グラム染色が発見された当時は、細胞壁の構造が詳しくわかっていませんでしたが、後に細胞壁の構造の違いにより、染色性が変わることがわかり、現在でも細菌を観察するうえで一般的かつ重要な染色法として利用されています¹⁾。

毒素

細菌のもつ毒素には「外毒素」と「内毒素」があります。外毒素はグラム陽性菌・陰性菌に関係なく、特定の細菌がもち、菌体内で合成された後に分泌されます。大半は易熱性ですが、毒性が強いです。内毒素はグラム陰性菌だけがもち、細胞壁（外膜）の構成成分として存在しているので分泌されることはありません。しかし、細菌が死滅あるいは破壊されたときに放出されます。耐熱性ですが、毒性は弱いです。

細菌はそれぞれ異なった毒素をもっているのです。ヒトに感染したとき、その毒素が引き起こす症状も異なってきます。表1に主な細菌の毒素が引き起こす症状をまとめました²⁾。例えば、「食後にお腹が痛くなった」というとき、検査をしてグラム陰性桿菌が出てくれば、黄色ブドウ球菌は陽性球菌なので原因菌から除くことができます。もちろん精密検査を行います。ここでもグラム染色性は重要な役割を果たしています。

言葉の窓



- ペプチド（アミノ酸が繋がった分子）グリカン（グリカン鎖＝糖鎖）は網状構造をしています。唾液に含まれるリゾチームはペプチドグリカンを分解します。「唾液の多い人はむし歯になりにくい」と言いますが、このリゾチームがむし歯菌に作用していることを言い換えたものかもしれません。もちろん、唾液だけではむし歯を防ぐことができませんが、唾液が感染予防の重要な一因であることも確かです。
- 葡萄状の球菌をブドウ球菌、連鎖状に連なった球菌をレンサ球菌というように見た目で見分けられています。
- すべての細菌がグラム染色で綺麗に染め分けられるわけではありません。また、グラム陰性菌はアルコール脱色されてしまい、このままでは見ることができないので、赤色の染色液で染めることで見ることができます。陽性菌の青色も染色液の色です。つまり、菌がもともと青色や赤色をしているわけではないのです。

表① 主な細菌の毒素が引き起こす症状

細菌名（和名）	グラム染色性・形態	主な症状（感染症）
黄色ブドウ球菌	グラム陽性球菌	皮膚化膿症、骨髄炎、食中毒など
肺炎レンサ球菌	グラム陽性球菌	肺炎、髄膜炎、副鼻腔炎、中耳炎など
ボツリヌス菌	グラム陽性桿菌	食中毒など
百日咳菌	グラム陽性桿菌	咳（百日咳）など
炭疽菌	グラム陽性桿菌	皮膚炭疽、肺炭疽など
結核菌	グラム陽性桿菌（抗酸菌）	肺結核、肺外結核（結核症）など
腸管出血性大腸菌	グラム陰性桿菌	出血性大腸炎など
緑膿菌	グラム陰性桿菌	気管支肺炎、敗血症、熱傷感染など
ピロリ菌	グラム陰性桿菌	慢性胃炎、十二指腸潰瘍など
コレラ菌	グラム陰性桿菌	水溶性下痢など
レジオネラ	グラム陰性桿菌	肺炎など（レジオネラ症）
腸炎ビブリオ	グラム陰性桿菌	食中毒など
梅毒トレポネーマ	スピロヘータ（らせん状菌）	梅毒、進行麻痺、脊髄痲など

今回は細菌の構造と毒素について、基本的な事柄を中心に紹介しましたが、ここで記載された内容は後に紹介する各論（細菌感染症）でも必要です。臨床現場にいるとむし歯菌や歯周病菌以外の細菌を耳にすることは少なくなってしまうかもしれませんが、今回の内容を改めて見直すことで細菌がどのような生き物なのかを再確認いただければ幸いです。

それでは次回は、ウイルスについて少し詳しく説明したいと思います。興味がある方は、家で眠っている教科書を起こしてあげてみてください。

【参考文献】

- 藤本秀士（編著）：病原体・感染・免疫．南山堂，東京，2010.
- 古開泰信（編集）：ウイルス・細菌と感染症がわかる．羊土社，東京，2004.