

Figure 2. Effects of human saliva and salivary components in *S. mutans* colonization. Colony numbers of *S. mutans* in (A) NOD/SCID wild type, (B) NOD/SCID.*e2f1*^{-/-}, (C) NOD/SCID.*e2f1*^{-/-} female mice, 4 months of age, at 120 min after inoculation. All mice were pre-treated with human saliva or salivary components prior to bacterial inoculation. Data are expressed as the means ± SDs of the results for 6 mice per strain (**P*<0.05, ***P*<0.01).

doi:10.1371/journal.pone.0032063.g002

(693±500 CFU/ml) and in NOD/SCID.*e2f1*^{+/-} (193±190) were significantly higher than those in wild type mice (17±32) (Fig. 4 D). The colonization was significantly higher in 1% sucrose-water and diet than non-sucrose water and diet in NOD/SCID.*e2f1*^{-/-} mice (Fig. 4 C, D).

Inhibition effects by FruA on colonization of *S. mutans* in vivo

In our previous report, purified and commercial fructanase (FruA) from *Aspergillus niger* completely inhibited *S. mutans* GS-5 biofilm formation on saliva-coated polystyrene and hydroxyapatite surfaces [36]. Therefore, we examined inhibition using FruA in *S. mutans* colonization in the established mouse model system. The bacterial load in NOD/SCID.*e2f1*^{-/-} mice pre-treated with sIgA and supplied sucrose-water containing FruA (13±20 CFU/ml) decreased as compared to that without FruA (104±159); however, there was no significant difference (*P*=0.088).

Discussion

In this study we demonstrated homozygous E2F-1-deficient NOD/SCID (NOD/SCID.*e2f1*^{-/-}) mice are highly susceptible to

S. mutans colonization when NOD/SCID.*e2f1*^{-/-} mice are pre-treated with human saliva or sIgA using a low concentration (1%) sucrose supplement (Fig. 1 D, Fig. 4 D). The colonization levels were remarkably higher in NOD/SCID.*e2f1*^{-/-} mice than other mouse strains including commercial strains: C57BL/6, B10.D2 and NOD mice [31,37]. The high *S. mutans* susceptibility in NOD/SCID.*e2f1*^{-/-} mice may be explained because of impaired salivary clearance. The systemic dysfunction of the salivary gland (e.g., enlarged nuclear size, increased numbers of ducts) caused by the E2F-1 deficiency is the principal reason for the decrease of saliva volume in the mice [33]. Previously we showed that the percent inhibition of saliva production volume (μl/100 g BW) in NOD/SCID.*e2f1*^{-/-} mice was higher than that in other NOD-background mice [33,35,37].

Salivary component molecules that agglutinate bacteria include sIgA, mucins, parotid agglutinin, lysozyme, β₂-microglobulin, and Ca²⁺ ions [38]. Some reports suggest that salivary components may promote colonization of certain strains of bacteria [8,39]. Here we show the positive and negative effects of exogenous human salivary components in *S. mutans* colonization on the tooth surface. In particular, 0.25 mg/ml sIgA promoted colonization of *S. mutans* as compared to mucin, α-amylase, and others. sIgA is the

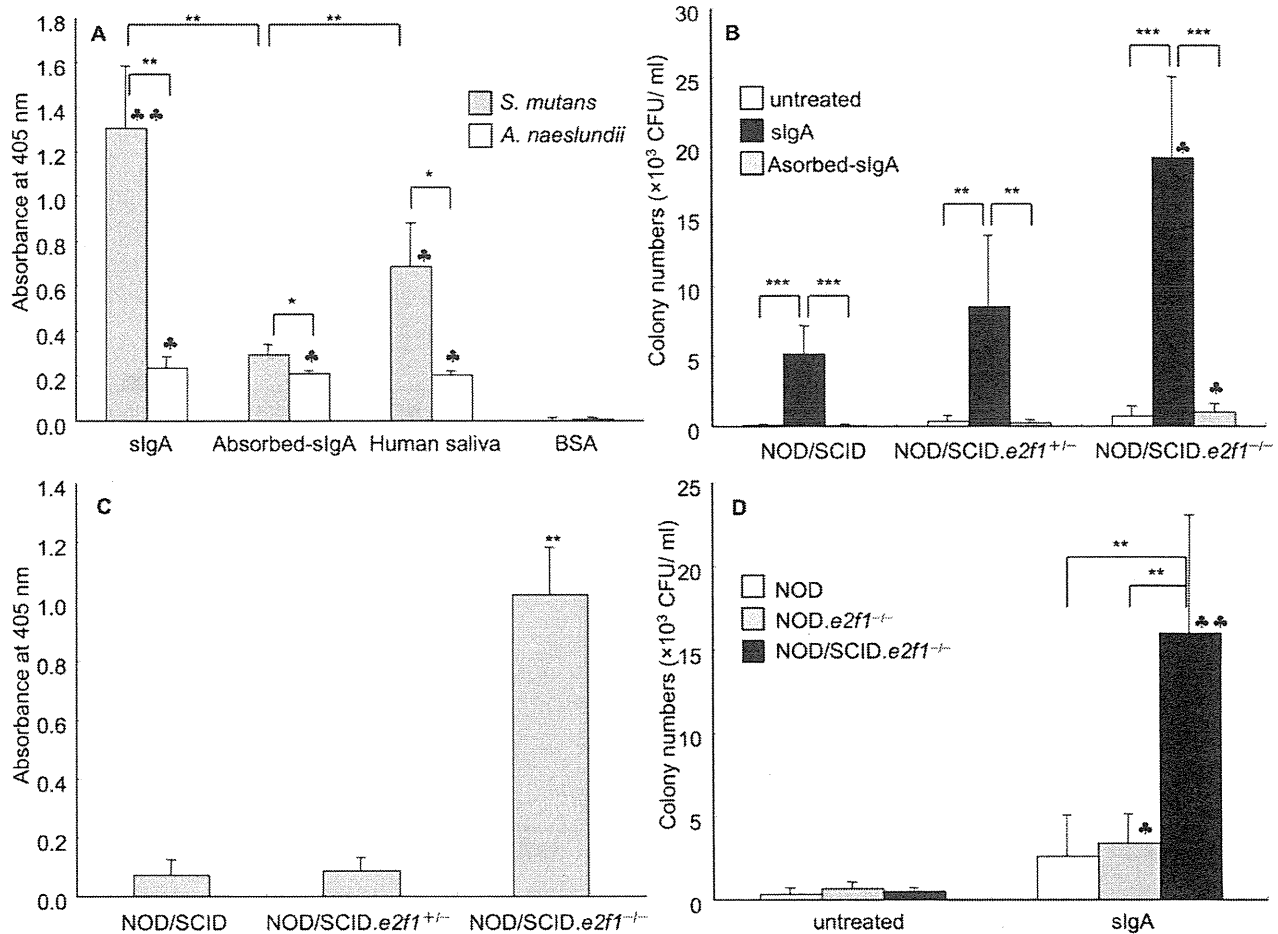


Figure 3. Effect of sIgA in *S. mutans* colonization. (A) Measurement of sIgA, absorbed sIgA and human saliva with *S. mutans*. BSA was the control. The ELISA results are expressed as the mean \pm SD of absorbance obtained in three independent experiments. (Significant differences vs BSA, $P < 0.01$, $P < 0.001$.) (B) Colonization assay on the tooth surface from NOD/SCID.e2f1^{-/-} mice pre-treated with sIgA and absorbed sIgA at 120 min after inoculation. Untreated mice were controls. The results are expressed as the mean \pm SD of absorbance obtained in six mice independent experiments. (Significant differences vs NOD/SCID, $P < 0.05$.) (C) Confirmation of residual sIgA on the tooth surface using ELISA, at 120 min after treatment. The ELISA results are expressed as the mean \pm SD of absorbance obtained in three independent experiments. (Significant differences vs NOD/SCID and NOD/SCID.e2f1^{+/-}, $P < 0.05$.) (D) Evaluation of antibody deficiency and decreased saliva in the colonization assay, at 120 min after inoculation. The pre-treatment of sIgA was compared with the untreated group. Data are expressed as the means \pm SDs of the results for 6 mice per strain (Significant differences vs untreated group, $P < 0.01$, $P < 0.001$).
doi:10.1371/journal.pone.0032063.g003

predominant immunoglobulin found in all mucosal secretions including saliva. In general, sIgA is thought to participate in the local disposal of environmental antigens in the oral cavity [38]. Indeed, the inhibitory effects of sIgA against bacterial biofilm formation are well demonstrated [40,41]. However, conversely in this study, sIgA played a role in aiding the colonization of *S. mutans* onto the tooth surface.

Physiological concentrations of amylase, mucin, and sIgA in human saliva are 0.4, 2.7 and 0.25 mg/ml respectively. Amylase at 0.4 mg/ml and 2.7 mg/ml mucin showed significantly lower colonization by *S. mutans* than 0.25 mg/ml sIgA, which showed higher colonization than human saliva treatment in NOD/SCID.e2f1^{-/-} mice (Fig. 2). We considered that sIgA supported the attachment because specific sIgA against *S. mutans* was associated with the colonization. The activities of human saliva for colonization show dependency on specific sIgA (Fig. 3). In contrast, higher concentrations (0.4 mg/ml) of sIgA than physiological concentrations showed inhibiting activities as compared to physiological concentrations. The negative effects are also

indicated by the effects of specific sIgA antibody on attachment. Therefore, multiple effects of specific sIgA may be dependent on sIgA concentration. The antibody titer to surface protein antigen from *S. mutans* was negatively correlated with the numbers of *S. mutans* in saliva from humans and mice [40,42,43]. The concentration of absorbed sIgA may be an important step for the colonization of *S. mutans* on the tooth surface and regulates the microbial flora in the oral cavity. Hapfelmeier *et al.* recently report reversible microbial colonization in germ-free mice during a dynamic IgA immune response [44]. They indicated the intestinal IgA system lacks classical immune memory characteristics; the intestinal IgA repertoire is characterized by constant attrition and thus represents the dominant species currently present in the intestine. In the oral cavity, a similar function of IgA production to intestinal IgA may cause and control commensal microbial flora. Our findings also show the dynamics of sIgA immune response, and sIgA may function to equalize the bacterial numbers in the oral cavity for the continuous presence of commensal oral bacteria.

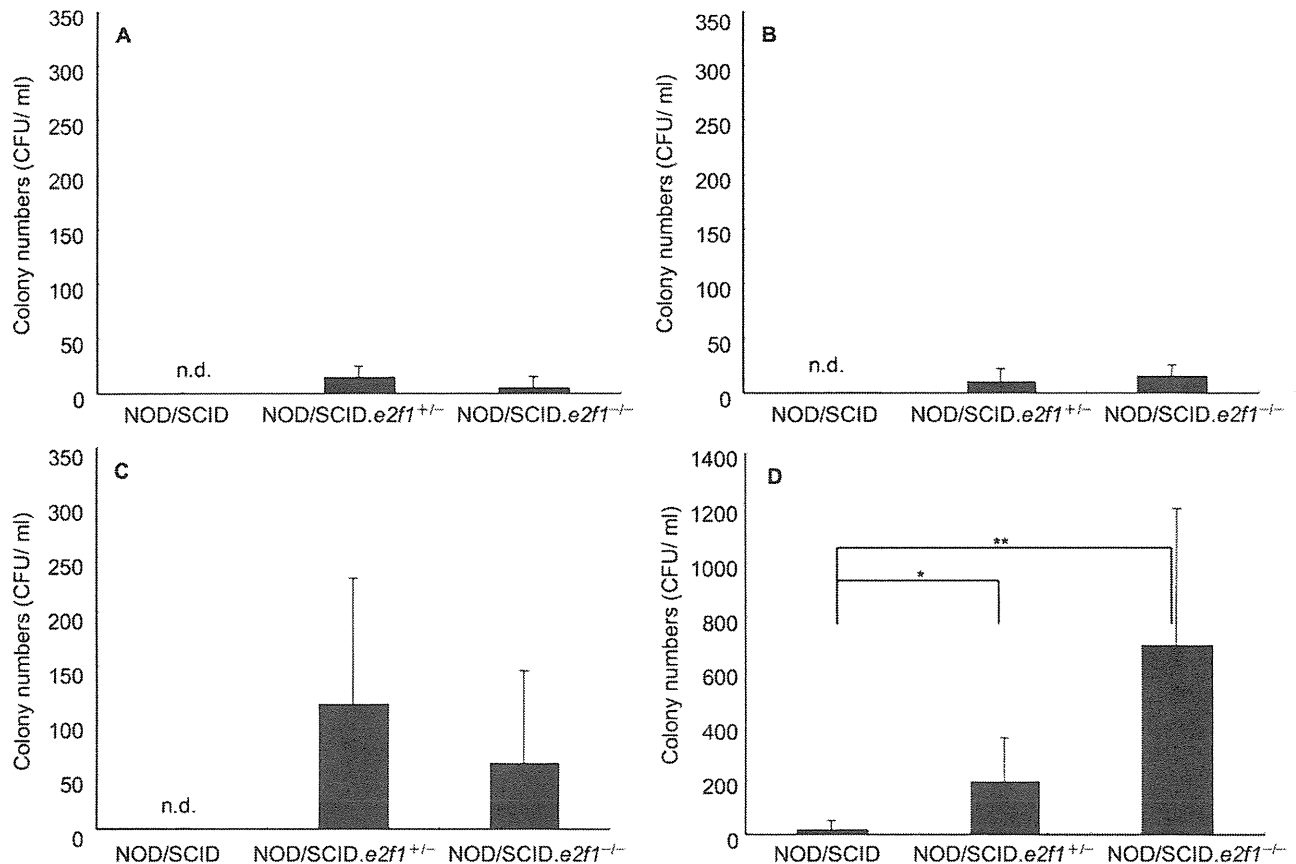


Figure 4. Comparison of different diet groups in *S. mutans* colonization. (A) group was not supplied with water or diet; (B) group was supplied with only 1% sucrose water; (C) group was supplied with both water and diet; (D) group was supplied with both 1% sucrose-containing water and diet. Samples were collected at 24 h after inoculation in NOD/SCID, NOD/SCID.e2f1^{+/-} and NOD/SCID.e2f1^{-/-} mice pre-treated with human saliva. Data are expressed as the means \pm SDs of the results for 6 mice per strain (* P <0.05, ** P <0.01). doi:10.1371/journal.pone.0032063.g004

Our *in vivo* colonization mouse system has a number of advantages to study specific sIgA effects because sIgA was absorbed on the tooth surface after exposure of sIgA to NOD/SCID.e2f1^{-/-} mice. In our previous report, the production of protein per minute in 1 μ l of saliva was significantly lower in NOD/SCID.e2f1^{-/-} mice as compared to NOD/SCID mice [33]. NOD/SCID.e2f1^{-/-} mice lack mature immunoglobulins due to severe combined immunodeficiency in NOD.e2f1^{-/-} mice and a decreased volume of saliva as compared to both parent strains; NOD and NOD/SCID mice [33]. Therefore, sIgA was easily absorbed without competition with mouse IgA, and by decreasing the supply of proteins and poor salivary clearance on the tooth surface in NOD/SCID.e2f1^{-/-} mice as compared to NOD.e2f1^{-/-} mice [32] and NOD/SCID mice (Fig. 3 C). Further, absorbed specific sIgA against *S. mutans* was responsible for the colonization of *S. mutans* (Fig. 3 D). We show sIgA from human colostrum included sIgA against various microorganisms including *S. mutans*. Therefore, exposure of specific sIgA in the oral cavity may induce the first colonization and initial attachment of bacteria.

The effect of specific sIgA did not persist with the colonization over a long-term and as a result showed small numbers of *S. mutans* at 24 hours after inoculation, enough time to construct the biofilm on the tooth surface. sIgA supports attachment of *S. mutans*, but its effect was limited in the natural condition exposed with commensal bacteria and saliva in the oral cavity. Therefore, the sucrose water and diet were given as nutrients for *S. mutans* biofilm

formation. Using 1% sucrose water and the usual mouse diet after inoculation supported long-term colonization in NOD/SCID.e2f1^{-/-} and NOD/SCID.e2f1^{+/-} mice in comparison to NOD/SCID mice (Fig. 4 D). We demonstrated that a concentration of 1% sucrose in drinking water with non-sucrose diet could induce significant colonization at 24 hours after inoculation. This shows the solid diet without sucrose enhanced colonization in combination with 1% sucrose drinking water (Fig. 4 B and D). The diet contains a few other carbohydrates, and carbohydrates in food debris or sucrose involved in debris absorbed with sucrose water after eating the diet and drinking for 24 hours may be employed in the production of the biofilm matrix. This was not observed previously using animal models for *S. mutans* infections. Possibly this biofilm formation closely resembles the natural environment of the oral cavity when humans consume various foods. In previous reports, conditions were dependent on excessive insoluble glucan formation in high sucrose water [45–48]. Their data showed rapid insoluble glucan formation and they likely generated these extreme effects under the high-sucrose experimental conditions favorable for production of biofilm. Humans eat a variety of foods, but they consciously control the oral condition to maintain oral health and view control of the intake of sucrose as very important. Therefore, we propose that the mouse model system observed here is more representative of the normal human oral environment; and better than previous model systems utilized for demineralization studies.

If this animal model system is used for assessment of various preventive dental caries agents, new preventative materials may be developed. Recently we reported fructanase (FruA) from *Streptococcus salivarius* and *Aspergillus niger* as a preventative. FruA can digest sucrose and prevent colonization [36,49]. In this animal model, experiments using FruA in the mice supplied with 1% sucrose drinking water and diet at 24 hours after the inoculation, FruA inhibited the colonization by *S. mutans*; however, there were no significant differences ($p=0.088$). It was considered that the animal model system may be useful in assessment of inhibiting agents recognized *in vitro*. However, the present system requires modifications to develop models for various oral infectious diseases as well as for dental caries. Our future studies will use this animal

model to find inhibitory agents for infection by biofilm bacteria using the interaction of saliva, nutrients, and bacteria.

Acknowledgments

We thank Naoki Narisawa, Norihiko Kanaguchi, Xi Zhang, Youstake Kinoshita, and Ryoma Nakao for their technical support, helpful discussions, and advice.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HS TI TM. Performed the experiments: TI HS. Analyzed the data: TI TM. Contributed reagents/materials/analysis tools: HS TI. Wrote the paper: TI HS.

References

- Hamada S, Slade HD (1980) Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 44: 331–384.
- Loesche WJ (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 50: 353–380.
- Demuth DR, Golub EE, Malamud D (1990) Streptococcal-host interactions. Structural and functional analysis of a *Streptococcus sanguis* receptor for a human salivary glycoprotein. J Biol Chem 265: 7120–7126.
- Rudney JD, Ji Z, Larson CJ, Liljemark WF, Hickey KL (1995) Saliva protein binding to layers of oral streptococci *in vitro* and *in vivo*. J Dent Res 74: 1280–1288.
- Rudney JD, Hickey KL, Ji Z (1999) Cumulative correlations of lysozyme, lactoferrin, peroxidase, S-IgA, amylase, and total protein concentrations with adherence of oral viridans streptococci to microplates coated with human saliva. J Dent Res 78: 759–768.
- Russell MW, Mansson-Rahemtulla B (1989) Interaction between surface protein antigens of *Streptococcus mutans* and human salivary components. Oral Microbiol Immunol 4: 106–111.
- Rudney JD, Ji Z, Larson CJ (1996) Saliva protein binding to streptococcal layers placed at different oral sites in 48 persons. J Dent Res 75: 1789–1797.
- Lamont RJ, Demuth DR, Davis CA, Malamud D, Rosan B (1991) Salivary-agglutinin-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to early plaque bacteria. Infect Immun 59: 3446–3450.
- Liljemark WF, Gibbons RJ (1972) Proportional distribution and relative adherence of *Streptococcus mitis* on various surfaces in the human oral cavity. Infect Immun 6: 852–859.
- Kuramitsu HK (1993) Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. Crit Rev Oral Biol Med 4: 159–176.
- Kopec LK, Vacca-Smith AM, Wunder D, Ng-Evans L, Bowen WH (2002) Influence of antibody on the structure of glucans. Caries Res 36: 108–115.
- Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK (1993) Role of the *streptococcus mutans* *glf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. Infect Immun 61: 3811–3817.
- Jespersgaard C, Hajishengallis G, Huang Y, Russell MW, Smith DJ, et al. (1999) Protective immunity against *Streptococcus mutans* infection in mice after intranasal immunization with the glucanbinding region of *S. mutans* glucosyltransferase. Infect Immun 67: 6543–6549.
- Suzuki N, Kurihara Y, Kurihara Y (1998) Dental caries susceptibility in mice is closely linked to the H-2 region on chromosome 17. Caries Res 32: 262–265.
- Zhang P, Jespersgaard C, Lamberty-Mallory L, Katz J, Huang Y, et al. (2002) Enhanced immunogenicity of a genetic chimeric protein consisting of two virulence antigens of *Streptococcus mutans* and protection against infection. Infect Immun 70: 6779–6787.
- Keyes PH, Jordan HV (1964) Periodontal lesions in the Syrian hamster. III. Findings related to an infectious and transmissible component. Arch Oral Biol 9: 377–400.
- Michalek SM, McGhee JR, Shiota T, Devenyns D (1977) Virulence of *Streptococcus mutans*: Cariogenicity of *S. mutans* in adult gnotobiotic rats. Infect Immun 15: 466–471.
- Bergdahl M, Bergdahl J (2000) Low unstimulated salivary flow and subjective oral dryness: association with medication, anxiety, depression, and stress. J Dent Res 79: 1652–1658.
- Dawes C (2008) Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. J Am Dent Assoc 139: 18S–24S.
- Almstahl A, Kroneld U, Tarkowski A, Wikstrom M (1999) Oral microbial flora in Sjögren's syndrome. J Rheumatol 26: 10–4.
- Almstahl A, Wikstrom M (1999) Oral microflora in subjects with reduced salivary secretion. J Dent Res 78: 1410–1416.
- Helin K, Lees JA, Vidal M, Dyson N, Harlow E, et al. (1992) A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. Cell 70: 337–350.
- Kaelin WG, Jr., Krek W, Sellers WR, DeCaprio JA, Achenbaum F, et al. (1992) Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. Cell 70: 351–364.
- Shan B, Lee WH (1994) Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. Mol Cell Biol 14: 8166–8173.
- Nevins JR (1992) E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. Science 258: 424–429.
- Sørensen TS, Girling R, Lee CW, Gannon J, Bandara LR, et al. (1996) Functional interaction between DP-1 and p53. Mol Cell Biol 16: 5888–5895.
- Field SJ, Tsai FY, Kuo F, Zubiaga AM, Kaelin WG, Jr., et al. (1996) E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. Cell 85: 549–561.
- Lillibridge CD, O'Connell BC (1997) In human salivary gland cells, over expression of E2F1 overcomes an interferon- γ -and tumor necrosis factor- α -induced growth arrest but does not result in complete mitosis. J Cell Physiol 172: 343–350.
- Murga M, Fernandez-Capetillo O, Field SJ, Moreno B, Borlado LR, et al. (2001) Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. Immunity 15: 959–970.
- Rounbehler RJ, Rogers PM, Conti CJ, Johnson DG (2002) Inactivation of E2f1 enhances tumorigenesis in a Myc transgenic model. Cancer Res 62: 3276–3281.
- Matsumoto N, Salam MA, Watanabe H, Amagata T, Senpuku H (2004) Role of gene *E2f1* in susceptibility to bacterial adherence of oral streptococci to tooth surfaces in mice. Oral Microbiol Immunol 19: 270–276.
- Salam MA, Matin K, Matsumoto N, Tsuha Y, Hanada N, et al. (2004) *E2f1* mutation induces early onset of diabetes and Sjögren's syndrome in nonobese diabetic mice. J Immunol 173: 4908–4918, 2004.
- Matsu-Inohara H, Uematsu H, Narita T, Satoh K, Yonezawa H, et al. (2009) E2F-1-deficient NOD/SCID mice developed showing decreased saliva production. Exp Biol Med 234: 1519–1524.
- Senpuku H, Matin K, Salam MA, Kurauchi I, Sakurai S, et al. (2001) Inhibitory effects of MoAbs against a surface protein antigen in real-time adherence *in vitro* and recolonization *in vivo* of *Streptococcus mutans*. Scand J Immunol 54: 109–116.
- Salam MA, Matsumoto N, Matin K, Tsuha Y, Nakao R, et al. (2004) Establishment of animal model for initial adhesion of oral streptococci using recombinant NOD.*B10.D2* mice. Clin Diagn Lab Immunol 11: 379–386.
- Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J, Kawarai T, et al. (2011) Inhibition of *Streptococcus mutans* Biofilm Formation by *Streptococcus salivarius* FruA. Appl Environ Microbiol 77: 1572–1580.
- Senpuku H (2010) Model mouse designed for oral biofilm formation studies. Int J Oral-Med Sci 8: 125–131.
- Scannapieco FA (1994) Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. Crit Rev Oral Biol Med 5: 203–248.
- Brack CM, Reynolds EG (1988) Colonization of rat molar teeth by mutans streptococci with different salivary agglutination characteristics. Arch Oral Biol 33: 695–699.
- Russell MW, Hajishengallis G, Childers NK, Michalek SM (1999) Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. Caries Res 33: 4–15.
- Murthy AK, Chaganty BK, Troutman T, Guentzel MN, Yu JJ, et al. (2011) Mannose-containing oligosaccharides of non-specific human secretory immunoglobulin A mediate inhibition of *Vibrio cholerae* biofilm formation. PLoS ONE 6: e16847.
- Tsuha Y, Hanada N, Asano T, Abei T, Yamaguchi S, et al. (2004) Role of peptide antigen for induction of inhibitory antibodies to *Streptococcus mutans* in the human oral cavity. Clin Exp Immunol 137: 393–401.
- Takahashi I, Okahashi N, Matsushita K, Tokuda M, Kanamoto T, et al. (1991) Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen. J Immunol 146: 332–336.
- Hapfelmeier S, Lawson MAE, Slack E, Kirundi JK, Stiel M, et al. (2010) Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. Science 328: 1705–1709.
- Culp DJ, Quivey RG, Bowen WH, Fallon MA, Pearson SK (2005) A mouse caries model and evaluation of Agp5-1-knockout mice. Caries Res 39: 448–454.

46. Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, et al. (1999) Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* 274: 20071–20074, 1999.
47. Krane CM, Melvin JE, Nguyen HV, Richardson L, Towne JE, et al. (2011) Salivary aciner cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *J Biol Chem* 276: 23413–23420.
48. Catalán MA, Scott-Anne K, Klein MI, Koo H, Bowen WH, et al. (2011) Elevated incidence of dental caries in a mouse model of cystic fibrosis. *PLoS ONE* 6: e16549.
49. Meyers C (2011) A bacterium that acts like a toothbrush. *Science Now* 1 April: <http://news.sciencemag.org/sciencenow/2011/04/a-bacterium-that-acts-like-a-toothbrush.html?ref=hp>.

解説

「歯科領域と口腔感染症について」

泉 福 英 信

口腔バイオフィーム：口腔は、700種類以上の微生物が存在し、5%CO₂環境下においてBrain Heart Infusion 寒天培地上で唾液を培養すると1 ml 中 1 x 10⁸以上の微生物が検出される。実際には、培養できない菌も存在しており、莫大な菌数の存在する環境である。食事をして菌数が減り、食後口腔清掃してさらに大幅に菌数が減るが、2～3時間もするとまた元に戻る。よって、口腔には常に一定の菌数が維持されている。それらの菌の中で多くの割合を占めるのが連鎖球菌であり、*Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* などである。その他に、*Actinomyces*, *Naisseria*, *Veillonella* など多くの菌が存在している¹⁾。これらの菌は、歯表面において初期付着菌と呼ばれている。これらの菌が歯表面に生息する理由は、主に唾液タンパク質と相互作用する菌群だからである(図1)。

歯表面を構成しているハイドロキシアパタイトはタンパク質吸着性が強く、唾液に常に曝されている歯表面では唾液タンパク質が吸着している。それを、獲得ペリクルと呼んでいる。この獲得ペリクルに結

合できる菌群を初期付着菌と呼び、それらが初めに菌叢を形成する。一度全体に菌叢が出来てしまうと、たとえ新しい菌が口腔に入ってきてても定着しにくくなる。初期付着菌は、一定の他の菌とも相互作用することができ、その結果、菌と菌の凝集が起こってくる(図2)。

口腔粘膜上でも、唾液成分や口腔粘膜細胞と相互作用しながら細菌叢が形成されて、それが歯表面細菌叢とともに常在菌叢を形成している。このような常在菌叢を近年では、バイオフィームと呼ぶようになってきている。これは、菌体が表面に付着し生存している様を表している。歯表面では、このバイオフィームを昔から歯垢と呼んでいる。これは、一般的な呼称として広く浸透している。このような常在細菌叢は、外環境から侵入した微生物を口腔に定着させないように働いている。その一方、糖の含まれた食事を摂取した際に糖を栄養源として取り込み、代謝する。その結果、口腔ではたちまちのうちに酸が微生物から産生されて、口腔内 pH が低下してくる。しかし、唾液による緩衝作用が働き、pH を

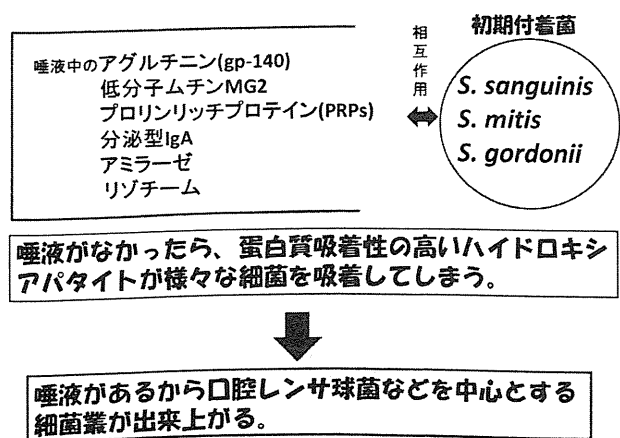


図1 バイオフィーム形成における歯表面唾液の意義

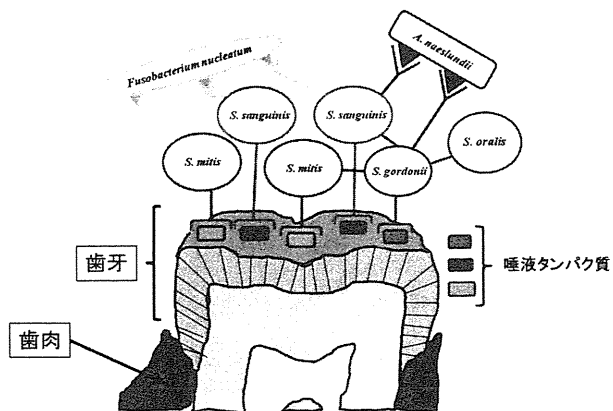


図2 初期の口腔バイオフィーム形成 唾液タンパク質と口腔連鎖球菌、口腔連鎖球菌と他の菌の相互作用 (カラーページ i に再掲)

すぐに元に戻す。このような唾液の作用によって、口腔内 pH は中性に維持され、酸性環境下では脱灰してしまう歯を守っている。よって、唾液は、外来微生物を感染させないように菌に対して抗菌的に働きかつ酸産生菌を引き寄せると同時に菌にとって有害な酸を緩衝能力により中和し何も問題なく口腔の健康を維持している。このように口腔に存在する物質は、それぞれが意味をなして存在している。

う蝕：砂糖を頻回に摂取すると、主に歯表面の連鎖球菌群では過少な存在である *Streptococcus mutans* は、分泌した酵素作用により砂糖を基質として水に溶けにくい非水溶性グルカンを合成する²⁾。この非水溶性グルカンが存在すると、粘着性物質であるため自分以外の様々な菌を取り込んで分厚く密なバイオフィームが形成されてしまう。さらに、唾液に含まれる重炭酸イオンなどがバイオフィーム内に浸透しにくい状況となる。その結果、糖成分の代謝によるバイオフィーム内 pH の低い状態が、唾液の緩衝作用により元に戻らず低い pH が維持され、Ca と P でできているハイドロキシアパタイトは、Ca と P がイオン化し遊離するようになる。これが、続くと歯表面の一部が欠損するほどの脱灰が起これ、これがう蝕発症である。よって、う蝕は *S. mutans* の感染のみで発症するのではなく、食物摂取におけ

る砂糖の過剰摂取や口腔清掃習慣の乱れなど生活習慣のバランスが崩れたことが関わって発症するものである。微生物の感染により起こることに間違いはないが、他の条件が揃って発症するものであり、一般的な全身感染症とは異なっている。

このように口腔疾患は、感染症であるものの、様々な因子のバランスが加わって発症するものである。具体的な因子には、年齢、歯の修復物、唾液分泌量、義歯、食物の摂取、全身疾患などがある。このような因子のバランスが崩れてくると、う蝕に加えて歯周病、口腔粘膜疾患、誤嚥性肺炎なども発症してくる。これらのバランスの崩れに対応することが、口腔疾患を予防および治療することにつながる。バランスの崩れに敏感に反応するのが、バイオフィーム形成である (図3)。

米国モンタナ州モンタナ州立大学の Costerton らによって、川の中の石表面や船底に存在するぬるぬるした菌の固まりと歯牙表面にできる歯垢は似た構造物でありそれらを総称としてバイオフィームと呼ばれるようになった³⁾。すでにバイオフィームは歯科の世界でも一般的に使われるようになり、口腔の病原性を発揮する主な原因物質と考えられている。う蝕と共に口腔に2大疾患である歯周病もバイオフィームが形成されることで導かれる。

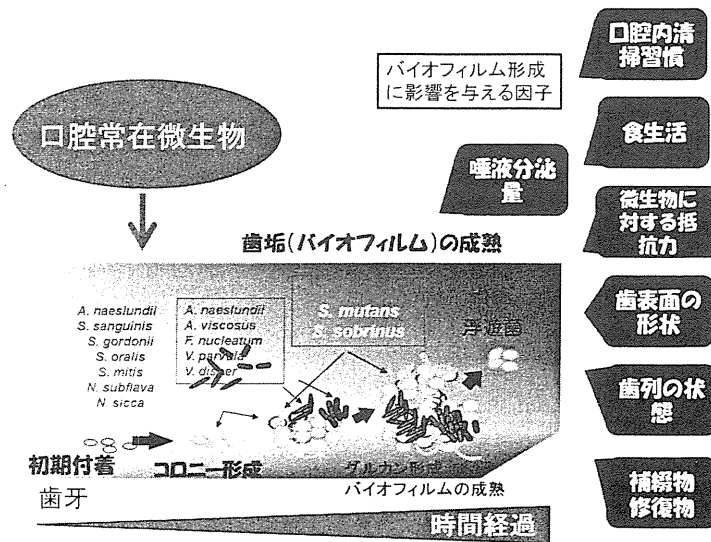


図3 様々な口腔バイオフィーム形成に影響を与える印紙 (カラーページ i に掲載)

歯周病：この *S. mutans* 依存した病原性バイオフィームは、摂取された砂糖を介した非水溶性グルカン合成が関与しているが、歯周病発症に関わるバイオフィームは必ずしも砂糖摂取に依存しているわけではない。歯石形成によるポケット内の嫌気性環境下が増える嫌気性菌がバイオフィームを形成し残存する。それらがバイオフィームから遊離し歯周組織へ大量に侵入、炎症を引き起こし、歯槽骨の吸収の結果、骨量が減少し歯を支えられなくなることが歯周病の原因と考えられる（図4）。

歯周病発症の最初のスイッチに関わる歯石形成は、そのメカニズムについて明確にされていないが、バイオフィームが形成されそれが石灰化した結果と考

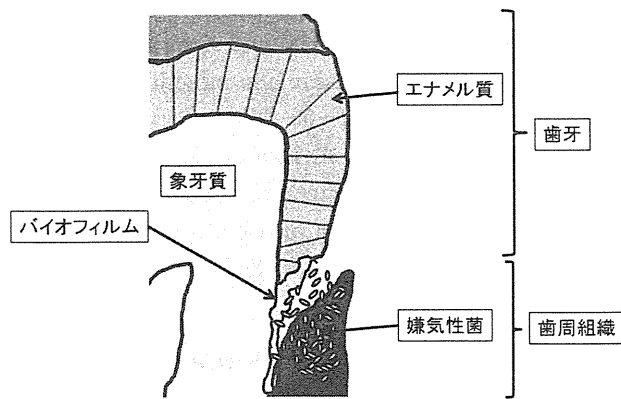
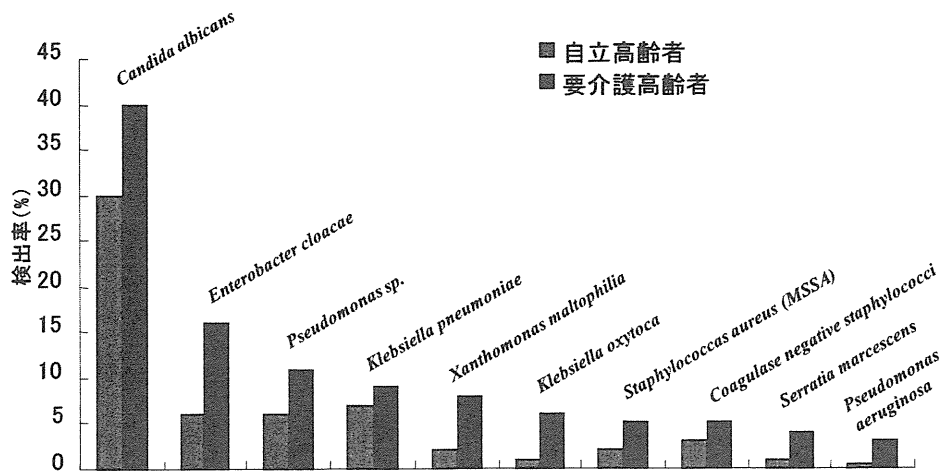


図4 バイオフィームから嫌気性菌の歯周組織への侵入 (カラーページに再掲)

えられる。歯垢は、その中身を調べてみるとかなりの割合で死菌が存在している。バイオフィーム内での死菌が形成される研究が近年行われ、そのメカニズムも明らかになってきた。ある一定レベル以上の菌が蓄積し、分厚いバイオフィームが形成されると、Quorum Sensing が起こり、自菌や他菌を破壊する酵素を分泌するようになり、バイオフィーム内細菌が破壊される⁴⁾。その結果、死菌が蓄積してくる。これら死菌が多くなることが、歯石形成に関わっている可能性が考えられる。歯周病は、近年、糖尿病発症、低体重児出産、誤嚥性肺炎発症、パーキンソン病発症、HIV ウイルスの活性化に関わることが報告された^{5, 6)}。しかし、賛否両論があり定説になるまでには至っていない。今後の検証が必要とされているが、いずれにしても歯周病が発症しないように予防しようという概念は変わらない。

誤嚥性肺炎：現在の日本は少子高齢化が進んでいる。以前の日本では、歯が無くなる前に死亡するケースが多かったが現在では長寿のため歯が無くなるのが問題となってきている。高齢者になっても美味しく自分の歯で食べられた方が楽しく生きられるという Quality of Life に歯は関わっている。一方、歯を多く残した状態で要介護施設へ入居すると、介護士による口腔ケアは無歯顎の高齢者より



Sempuku et al., Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. Gerontology 2003; 49: 301-309.より改変

図5 歯垢における日和見菌検出率 (自立高齢者と要介護高齢者の比較)

も大変になる。よって、全身状態も関わるが要介護施設入居高齢者の口腔は、常在菌以外に日和見菌が多種類検出されるケースが増えている⁷⁾ (図5)。

脳梗塞を起こした高齢者では、嚥下障害が重なり、口腔の日和見菌を含めた微生物が肺に入り、誤嚥性肺炎を起こして亡くなるケースが増えてきている。よって、要介護施設高齢者の口腔ケアは重要な位置づけとなっている。歯科衛生士や歯科医師などによる専門的な口腔ケアにより、歯石や口腔バイオフィルムを除去し、日和見菌を限りなく減少させ、口腔常在菌のみに満たされるような口腔環境に整えることが重要と考えられている。

その他：HIV感染者、白血病、骨髄移植患者など口腔の病原菌感染が多く見られる疾患が他にも多々ある。口腔疾患は、直接死に至らないためでないがしるにされる場合がある。しかし、近年では、入院日数の減少、術後感染症の減少、予後が良好など口腔感染症を予防することによって多様な利点が見出されるようになってきた。医療が充実していくためには、口腔感染症の予防が大きなキーワードになる日も近いと考える。

参考文献

- 1) Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.* 54 : 413–37, 2000.
- 2) Rølla G, Scheie AA, Ciardi JE. Role of sucrose in plaque formation. *Scand J Dent Res.* 93(2) : 105–11, 1985.
- 3) Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. *Science.* 284 (5418) : 1318–22, 1999.
- 4) Spoering, A. L. and Gilmre, M. S. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 9 (2) : 133–7, 2006.
- 5) Taylor GW, Loesche WJ, Terpenning MS. Impact of oral diseases on systemic health in the elderly : diabetes mellitus and aspiration pneumonia. *J Public Health Dent.* 60(4) : 313–20, 2000.
- 6) Slots J, Slots H. Bacterial and viral pathogens in saliva : disease relationship and infectious risk. *Periodontol.* 2000. 55(1) : 48–69. 2011.
- 7) Senpuku H, Sogame A, Inoshita E, Tsuha Y, Miyazaki H, Hanada N. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology.* 49(5) : 301–9, 2003.

(国立感染症研究所 細菌第一部 第六室)



(シリーズ)
**院内
感染対策
塾**

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となります。日常的で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} に達する時間が早くなり、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

「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を目的としています。オートクレーブ、EOG滅菌共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が、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超音波があり、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用する事が重要です。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²⁾。

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なければ死なないとされています。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です³⁾。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)」というのは簡単にいえば、その消毒剤がどの微生物に効果があるのかということです。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対応対象は、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、消毒用エタノールはHBVに対して「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」

の基礎①

とされています⁶⁾(したがって前回の回答は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ります。また、HBVの消毒用エタノールの効果の有無など、日々の研究で消毒剤の効果が変わってくる場合があります。目下から、「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(さとう・のりひと)
独立行政法人日本学術振興会特別研究員および岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔総合生物学分野所属。同志社大学大学院総合政策学研究所教授を経て、企業・研究機関を経て岡山大学歯学部卒業。専門は感染制御学、疫学政策学。

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ルアップポイント」.DH style.55:17,2011.
- 2) 伏見 了:「これで解決! 洗浄・消毒・滅菌の基本と具体策」.ヴァンメディカル.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効力の検討」.環境感染.13(2):208,1998.
- 4) 島崎建彦:「常用消毒剤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) 栗原英見 他:「徹底しよう! 感染予防対策と消毒・洗浄」.アクトハルハイジーン.290:245,2007.
- 6) 厚生労働省:「B型肝炎について」(改訂第3版).http://www.mhw.go.jp/_bunya/kenkou/kekaku-kansenshou09-1aq_11hepatitisB.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、

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

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

参考資料: 伏見 了 P77の表より改変²⁾

表2 消毒剤の微生物スペクトルと対応対象

消毒剤	微生物 適応対象						真菌	ウイルス				対応対象		
	グラム陽性菌		グラム陰性菌		結核菌	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	
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	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	ポビドンヨード	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	×
狭域	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 ◎効果が高い ×無効 対応対象◎◎使用可 ◎注意して使用 ×使用不適 資料参考: 栗原英美, 新井裕子 表2, 3より改変⁵⁾

(シリーズ)
**院内
感染対策
塾**

Dr. 佐藤法仁
INFECTION CONTROL
AND PREVENTION

第4回
**滅菌・消毒・洗浄
の基礎②**

はじめに

「滅菌・消毒・洗浄の基礎①」では、滅菌と消毒について紹介しました。シリーズ第4回は、「滅菌・消毒・洗浄の基礎②」として、洗浄と紫外線照射について紹介します。

洗浄

洗浄とは、流水と洗浄剤を用いて目視可能な汚染物を洗い流すことで、物理的手段としては水流圧があり、化学的手段としては洗剤などが利用されています。なお、洗浄で微生物を完全に殺すことはできません。洗浄法にはさまざまなものがありますが、手間の掛らない超音波洗浄機やウォッシャーディスインフェクターを使用している歯科医院が多いと思います。ある報告でどのような洗浄方法でも洗浄力の優れた洗浄剤を使用した場合は、残存蛋白質量に大きな違いがないことが報告されています(表1)¹⁾。つまり、「絶対に超音波洗浄機でないとダメ」ということはありません。手間を掛けない、鋭利な器具での切削の防止などという点で洗浄機器を利用することがよいでしょう。

①超音波洗浄機
現在、数多くの歯科医院では、超音波洗浄機が利用されていると思います。この超音波洗浄機は、器具などに付着した血液や体液などの有機物を除去します。しかし、除去効果

はあっても消毒効果はありません。洗浄する器具で注意が必要な物にスケレーやメスや剪刀などが挙げられます。これらは刃が触れ合うことで切れ味が鈍くなることがあるため、刃同士がぶつからないように注意する必要があります。また、プラスチック類や網の目の細かい金属トレイに器具を入れて洗浄する場合は、超音波が吸収されて汚れが落ちにくくなるので、併せて注意が必要です。なお、洗浄中は周囲に汚染物質を含んだ洗浄液などが眼部まで飛散する可能性があるため、作業を行う際は必ず歯科用ゴーグル、マスク、フェイスシールドを着用しましょう。

②ウォッシャーディスインフェクター
強力水流による洗浄と温湯(60～70℃) リンスを自動的に行うのがウォッシャーディスインフェクターです。蛋白質が熱変性を起こさない微温湯(30～40℃)で強力な水流で噴射し洗浄後、温湯・熱湯(100℃)で灌ぐことで微生物の希釈、除去ができます。また、温湯の界面活性作用により、洗浄効果が高いとされています。

対象物は、熱に耐性のある金属類、ゴム製品の大部分、ガラス器具、プラスチック製品などです。ラン

ニングコストが安く、環境負荷が小さい、取扱者への毒性がない、小型機種があるなどの理由から数多くの歯科医院で使用されています。ただ、頻繁に使用するものなので定期検査が重要となります。なお、食器洗い乾燥機を使用している場合があるかもしれませんが、食器洗い乾燥機はウォッシャーディスインフェクターと比較して、湯漏が断続的にかかるため、消毒ではなく、簡単な洗浄レベルであり、本当に医療現場で活用できるかは疑問が残ります。

紫外線照射

紫外線は電磁波の一つで、253.7nmの波長で照射されると微生物に対して殺菌効果があり、これを利用したのが紫外線殺菌灯です。紫外線殺菌灯の利点としては、常温、常湿、常圧で使用できる、残留毒性がない、簡便で安価であるなどが挙げられます。欠点としては、紫外線は人体に有害(皮膚紅斑、色素沈着、角結膜炎、皮膚がんなどを引き起こす)である、直接照射された部分しか効果がない、透過性が極めて弱い、殺菌対象物の変性(プラスチックの変色・劣化破損)、紫外線殺菌灯のメンテナンス(紫外線殺菌灯の交換は約4,000

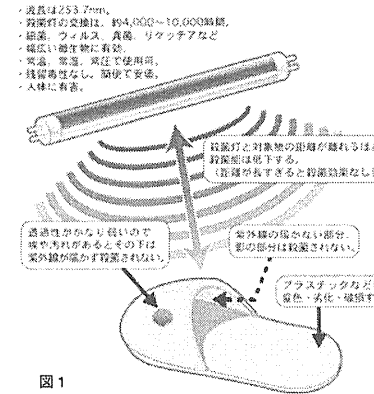


図1

～10,000時間)が必要であるなどが挙げられます(図1)²⁾(したがって前回の回答はdとなります)。

紫外線殺菌灯の波長は253.7nmですが、315nm以上の波長(可視光線など)になると大腸菌などは再び増殖することがあります(光再賦活化現象)。これは、253.7nmの波長で損傷された菌のDNAが完全に破壊される前に、315nm以上の波長に再度あたるとDNAの損傷が修復され、増殖することができるというものです³⁾。そのため、紫外線波長の管理(殺菌灯の寿命、遮蔽物の有無など)を確実に行う必要があります。また、一昔前の病院などでは、白衣などを紫外線殺菌装置に入れ、紫外線殺菌を行っていたことがありますが、この方法では確実な殺菌効果が得られないことから使用を控える施設が増えました。これは、前述したように紫外線殺菌灯は影ができた部分や蛋白汚染などがある場合に、汚染内部までは殺菌できないという点にあります。他方、診療室に置いてある患者さん用スリッパを紫外線殺菌灯で殺菌する場合がありますが、足指部分の中敷まで紫外線が届かず殺菌されない場合があります。歯科でも歯科器具の保管場などで利用することがありますが、歯科器具の汚れの残りや塵や埃が付着していた場合は、どれだけ長時間紫外線を照射しても殺

菌が確実に行えないことから、より確実に効率的な洗浄・消毒・滅菌作業を優先すべきだといえます。

また、紫外線殺菌は結核菌などの空気感染を起こす病原菌の殺菌効果があるとの研究報告から、ダクトや室内上部の紫外線照射が有効とされています⁴⁾。しかし、非空気感染を取り扱う一般診療環境において紫外線殺菌灯を設置し、その有効性を調べた調査では、有効性を認める根拠が示されておらず⁵⁾、科学的根拠がないことを認識しておく必要があります。

また、市販されている空気洗浄機や空気洗浄機能付きエアコンなどの中には、紫外線殺菌の装置を組み込み、取り込んだ空気中の微生物を殺菌するという機能が付けられているものがあります。これら市販品が一般生活環境とかけ離れた環境である歯科診療環境において、どれだけ有効性を示すのかという科学的データは未だありません。そのため、「紫外線殺菌灯付空気清浄機を置いているから安心」という安易な憶測での対応は、院内感染対策の点からは不十分です。

おわりに

今回は「滅菌・消毒・洗浄②」として、洗浄と紫外線照射について取り上げました。洗浄はどうしても手を動かすことが必要となり、手間に感じるこ

著者プロフィール

佐藤 法仁(さとう・のりひと)
独立行政法人日本学術振興会特別研究員
および岡山大学大学院医歯薬学総合
研究科口腔微生物学分野所属。同志社
大学大学院総合政策科学研究科修了後、
企業・研究機関を経て岡山大学歯学部
卒業。専門は感染制御学、医療政策学。

が多いかもしれません。また、紫外線照射は逆に手軽であることから「紫外線を当てていれば大丈夫」という安易なことになるかもしれません。洗浄、紫外線照射ともにメリット、デメリットがあり、その手間、手軽さにはそれぞれ意味があることをしっかりと認識し、日々の診療業務に活かすことが大切です。

今回は、応用編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。

診療中、患者使用済の麻酔針を自分の指に深く刺してしまった。その後の正しい対応はどれか?

- a. 診療継続
- b. 診療中断→院長に報告
- c. 診療中断→流水で傷口を優しく洗う
- d. 診療中断→流水で洗いながら傷口周辺を押り出す
- e. 診療中断→消毒薬グルタラルールで傷口を消毒する

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下さい。

【参考文献】

- 1) 伏見 他: これぞ解決! 洗浄・消毒・滅菌の基本と具体策。ヴァンメディカル, 2008.
- 2) 高橋成輔 監修: 院内感染予防対策 Q&A 200. 医歯薬出版, 2001.
- 3) 高島征助: 紫外線照射の理論と実際。医歯薬学, 64(5):27, 1994.
- 4) CDC: Guidelines for Preventing the Transmission of Mycobacterium tuberculosis in Health-Care Facilities. MMWR, 43(RR13), 1994.
- 5) 渡邊好文 他: 空中浮遊菌に対する紫外線空気清浄機の効果の追跡調査。環境感染, 12(3): 174, 1997.

表1 洗浄方法の違いによる残存蛋白質量の比較成績

洗浄方法	サンプル	平均残存蛋白質量 (μg) (残存率)	
		剪刀	鉗子
対照(未洗浄)		3108	3247
浸漬		16.2 (0.5%)	32.6 (1.0%)
浸漬+手洗い		11.7 (0.4%)	10.2 (0.3%)
超音波洗浄機		15.8 (0.5%)	25.1 (0.8%)
ウォッシャーディスインフェクター		16.4 (0.5%)	26.7 (0.8%)

クマシーブリアリメントブルー (CBB) 法にて測定
参考資料: 伏見 7 p40 の表6より改変¹⁾

