

【研究報告】

オゾンを利用した義歯洗浄器のメチシリン耐性ブドウ球菌(MRSA)
とウイルスに対する殺菌効果

村上弘,水口三保,服部正巳,池戸泉美,河合達志

日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.9,No.3, 2-5. (2002)

オゾンを利用した義歯洗浄器の メチシリン耐性ブドウ球菌(MRSA) とウイルスに対する殺菌効果

村上弘^{1,5)}，水口三保¹⁾，服部正己²⁾，池戸泉美³⁾，河合達志^{4,5)}

1) 愛知学院大学歯学部歯科補綴学第三講座 2) 同第二講座 3) 同第一講座
4) 愛知学院大学歯学部歯科理工学講座 5) 愛知学院大学歯学部口腔先端研究所

要旨 我々が開発した義歯洗浄器のメチシリン耐性ブドウ球菌（以下，MRSA）とウイルスに対するオゾンの効果について検討した．ウイルスについてはエンテロウイルスと物理化学的性状が似ている細菌ウイルスである大腸菌ファージ T1（以下，T1ファージ）を代用して実験を行った．その結果，MRSAにおいて，初期細菌数 3.1×10^3 CFU/ml が 10 分後には 1.0×10^0 CFU/ml になった．それに比較して，空気のみでは，初期細菌数 3.4×10^3 CFU/ml が 60 分後においても 3.0×10^3 CFU/ml であった．T1ファージでは，オゾン処理前では， 1.2×10^6 PFU/ml であったが，10 分後では 1/10 となり，約 40 分後には， 6.1×10^0 PFU/ml となり，オゾン義歯洗浄の効果が確認された．

キーワード：義歯洗浄器，オゾン，MRSA，ウイルス

1. はじめに

歯科領域においても，MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）感染症やウイルス感染症が問題となっている．MRSAは院内感染の原因菌であるが，寝たきり老人の褥瘡や咽頭部からもきわめて高頻度に検出される^{1,2)}．特に老人は義歯の装着率が高く³⁾，食事後にベッドサイドや洗面所で義歯を清掃する機会が多い．この際に義歯や義歯用ブラシからスタッフや周囲の老人などに感染する可能性⁴⁾も考えられる．さらに，免疫力の低下した老人には感染しやすく，感染した場合の治療も困難である．また，最近では，寝たきり老人に対する歯科の往診も多くなる傾向にあり，歯科医や歯科スタッフも感染の危険にさらされている．

また，歯科外来にも肝炎やエイズなどのウイルス性疾患をもつ患者が，しばしば訪れることがあり，義歯の調整や新義歯を製作しなければならないことがある．可及的に感染対策を講じるが，外来では限界がある．したがって，診療前に患者の義歯の殺菌、消毒が簡単にできれば，歯科医師やそのスタッフあるいは周囲の患者への感染の機会は減少すると思われる．そこで，今回、我々が開発した義歯洗浄器のMRSAとウイルスに対する殺菌効果について検討した．ウイルスについてはエンテロウイルスと物理化学的性状が似ている細菌ウイルスである大腸菌ファージT1を代用して実験を行った．

2. 実験方法

1) 実験機器

実験には三恵技研工業社製オゾン義歯洗浄器 (SA-100A, 写真 1) を使用した．本器は高電圧装置，オゾナイザー，生成したオゾンシリコンチューブを通して発泡材へ送るエアープンプ，発泡材と義歯を入れる水槽部から構成されている．オゾナイザーによって生成されるオゾン濃度は 10ppm である．洗浄器のオゾンガス濃度はオキトロニクス社製オゾン濃度計 OZM-G21-ZW によって確認した．また，水中のオゾン濃度は東亜電業社製液相オゾン濃度計 OZ-20 によって計測したが，測定限界以下 (0.01ppm 以下) であった．詳細は既報^{5), 6)} を参照されたい．

2) MRSA

MRSAの培養は *Staphylococcus aureus* IID11677(MRSA) を白金耳にて平板培地に塗布し，37℃にて24時間培養した．

供試菌液の調製は平板培地に生育した供試菌を白金耳で鈎菌し，吸光度計を用いて濁度が0.4程度になるように滅菌水10mlに懸濁させた．この懸濁液0.2mlを滅菌水2L

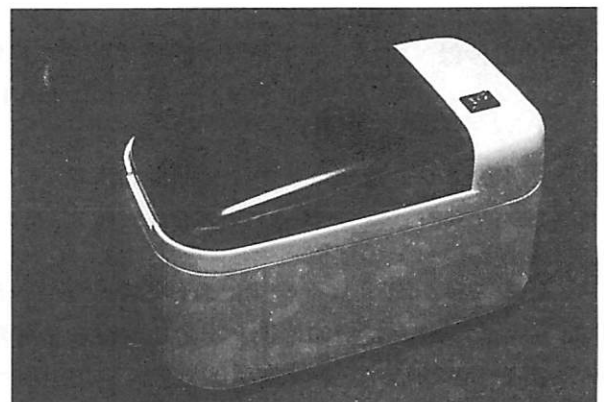


写真 1 オゾン義歯洗浄器

に加えてよく混合し、供試菌液とした。

供試菌液700mlを洗浄器の水槽に入れ、0.1mlを採取した後、洗浄器を稼働させた。60分後まで10分毎に供試菌液0.1mlを採取し、それぞれ10倍連続希釈し、37℃にて24時間培養した。培地表面上に形成されたコロニー数から菌数を求めた。

3) T1ファージ

T1ファージの培養は普通ブイヨンに宿主である大腸菌(IFO13168)およびファージを接種し、37℃、24時間培養を行った。なお、試験には培養液を8000rpmで20分間遠心し、沈査物を除いた後、用いた。

大腸菌の培養は普通ブイヨンに大腸菌を接種し、37℃、24時間培養を行った。

供試菌液の調整は滅菌水700mlにT1ファージの培養液1mlを加え、十分攪拌した。供試菌液を義歯洗浄器の水槽に入れ、開始時および稼働後10分毎に6回採取し、それを試料とした。ファージ数の測定および培養は滅菌シャーレに滅菌後約50℃に冷ました普通寒天培地を10ml採り、水平に凝固させた。次いで、大腸菌の培養液1mlおよび試料を普通寒天培地に接種し、さらに滅菌後約50℃に冷ました半流動普通寒天培地10mlを加える。このシャーレを前後左右に揺り動かし攪拌した後、静置した。寒天培地が十分に凝固した後、シャーレを静置のまま37℃、24時間培養を行い、培地表面上に形成されたプラークの数からファージ数を求めた。なお、試料は必要に応じて10倍、100倍希釈をした。

3. 結果

オゾンを利用した義歯洗浄器のMRSAとT1ファージに対する殺菌効果を調べた結果、MRSAはオゾン処理前に 3.1×10^3 CFU/mlだったが、10分後には 10×10^0 CFU/mlになった。一方、コントロールとしてエアレーションのみ行ったものでは 3.4×10^3 CFU/mlが60分後においても 3.0×10^3 CFU/mlで、処理前と変化はなかった(図1)。

T1ファージは、オゾン処理前 1.2×10^6 PFU/mlだったものが10分後に約1/10に減少し、20分後に $1/10^3$ に減少、40分後には 6.1×10^0 PFU/mlになった(図2)。

4. 考察

1) MRSA

最近、歯科領域においても、MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)感染症やウイルス感染症が問題となっている。MRSAは院内感染の原因菌であるが、寝たきり老人を多く収容する施設ではより深刻な問題となっている。高齢者は、加齢に伴う諸臓器の退行性変化を有しており、骨折、腫瘍、脳血管障害など種々の原因で入院すると寝たきり状態になりやすいため、栄養補給などのためにカテーテルや胃腸管チューブを挿入されることが多く、感染の機会がより増大する。免疫力の低下した高齢者は感染しやすく、感染した場合の治療も困難であるため、高齢者の院内感染のリスクは若年者の3倍高いとされている。寝たきり老人に発症するMRSA感染症は誤嚥性肺炎、褥瘡感染症、敗血症などがあり、咽頭部や褥瘡からきわめて高頻度に検出される^{1,2)}。それに加え、高齢者は義歯の装着率がき

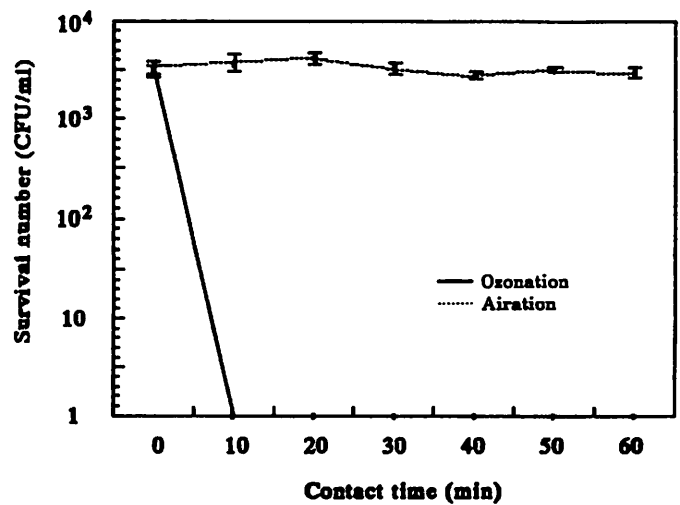


図1 MRSAに対する義歯洗浄器の殺菌効果

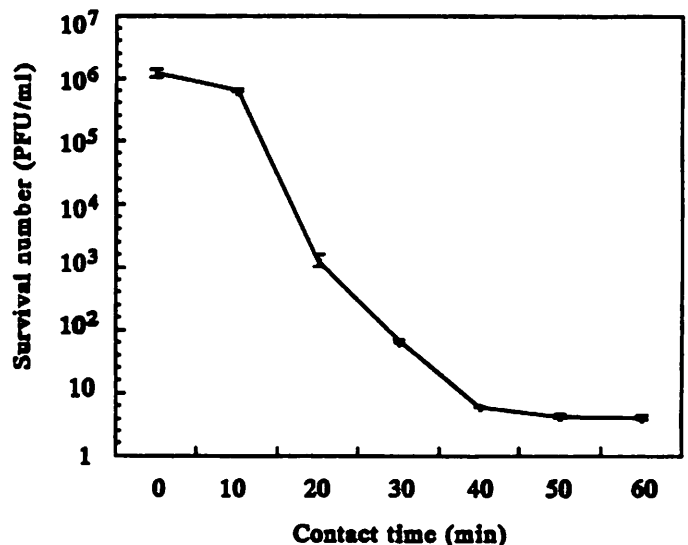


図2 T1ファージに対する義歯洗浄器の殺菌効果

わめて高く³⁾、義歯に付着するデンチャープラーク中からもMRSAが検出される^{7,8)}。これらの義歯は食事後にベッドサイドや洗面所で清掃される機会が多く、この際に義歯や義歯用ブラシを通してスタッフや家族、周囲の高齢者などに感染する⁹⁾可能性も考えられる。

さて、メチシリンに代表される β -ラクタム系薬剤はペニシリン結合蛋白質 (PBPs)の活性部位に結合して細胞壁合成をストップさせることにより抗菌活性を発揮し、いわゆる細菌の機能を障害している。MRSAは β -ラクタムの標的酵素であるPBPsの変化によることが明らかにされている。すなわち、MRSAでは β -ラクタム系薬剤の存在下で誘導されるPBP2'が新たに出現するが、多くの β -ラクタム系薬剤はこれに低い親和性しか示さないため、MRSAはほとんどの β -ラクタム系薬剤に対して交差耐性を示す^{9,10)}。

一方、オゾンは特有の臭気をもった酸素の同素体であり、酸素にくらべわめて高い反応性をもっている。この性質によって強い酸化殺菌力を持つ。オゾンによる殺菌機構^{12,13)}はいまだ明確に解明されていないが、オゾンとオゾンからつくられる活性酸素種によると考えられる。細菌に対するこれらのオゾンや活性酸素種の最初の作用点は細胞壁や細胞膜である。これらの構成成分である不飽和脂肪酸や蛋白質のオゾン反応性がScottら¹⁴⁾、Goldsteinら¹⁵⁾により報告されている。Scottらは大腸菌の殺菌機構を検討した結果、オゾンは細胞膜を損傷し、膜透過性を変化させ、細胞内容物の漏出がおきると報告している。また、Goldsteinらは脂質の過酸化がおきると報告している。これに対して、殺菌機構は細胞膜の損傷、酵素や核酸の失活などとする報告もある。しかし、いずれにしても、細胞の表面構造の損傷が第一に起きることは事実と考えられ、その後、オゾンはオゾンと易反応性の官能基を求めて表面から中へと侵入し、その過程の中で、様々な反応性に富むアミノ酸残基と反応して、細胞質内にある様々な小器官、酵素類を不活性化させ、最終的にはRNA、DNAのグアニン、チミン残基を破壊し、遺伝子本体までも不活性化する¹⁶⁻¹⁸⁾と考えられる。すなわち、オゾンによる殺菌は薬剤による細菌の機能障害とは異なり、構造破壊であるため、耐性菌が生じない。

2) ウイルス

歯科領域においても、いろいろなウイルス感染症がある。単純ヘルペス、水痘、带状疱疹、手足口病、麻疹、風疹、上気道感染症、B型肝炎、C型肝炎、AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome)などが急速に増加している。特に、B型、C型肝炎、AIDSは血液のような体液を通して感染するため、口腔内における観血処置や常に慢性出血を伴う重度の歯周病患者は注意を要する。歯科医やデンタルスタッフは歯牙の切削や印象採得時などに血液や唾液を含んだ切削霧を浴びたり、義歯の削合、調整時に切削粉を浴びたりして、眼や鼻などから感染する可能性もある¹⁹⁾。診療室では可及的に感染を防ぐため、グローブ、マスクはもちろんであるが、キャップやゴーグルを装着するよう心がけるとともに、歯科学生においてもそのように教育をしている。従来、肝炎などの患者に使用した器具は2% グルタルアルデヒドに浸漬し、デンタルチェアや床などは次亜塩素酸ナトリウムなどで清拭している。義歯は従来の殺菌剤では消毒できず、オゾン水などを使用して、調整前にできるだけ殺菌し、可及的に菌数や感染機会を減らすことが重要である。加えて、保菌患者の義歯や歯ブラシなどから家族や周囲の関係者が感染する可能性もあるため、家庭内においても、日々殺菌することが重要である。

さて、ウイルスはDNAあるいはRNAを芯として規則正しい構造を持つ蛋白質の外殻(コート)から成り立っており、オゾンにおけるウイルスの不活化の要因として、神力^{20,21)}はコート蛋白質の吸着点の破壊、コート蛋白質の変性、DNA、RNAの損傷などを上げている。本器は初期菌数の1/100になるために30~40分を要するが、短時間でも、できうだけ使用することが、感染の機会を減少させる。

5. 結論

オゾン義歯洗浄器はMRSA、T1ファージに対して有効であり、その殺菌時間は30~40分を要した。義歯には、デンチャープラーク1g中に 10^{11} 細胞の微生物が存在すると言われている。したがって、義歯用ブラシなどの機械的除去法のみでなく、オゾン処理などの化学的な除去法を併用すれば感染機会がより減少し、非常に有効であると思われる。

なお、本稿は著者らによる文献 22) を改編して、掲載したものである。

謝辞

本実験を行うにあたり、多大なご協力を得ました三恵技研工業(株)森田耕三氏、(株)愛研の杉浦実氏に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 紺野昌俊：MRSA感染症のすべて。pp.315-322, 医薬ジャーナル社, 大阪, 1991.
- 2) 島田馨：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)。日本臨床, **44** (9), 190-199, 1986.
- 3) 品田佳世子, 寺岡加代, 浅香次夫, J.G.Cordeiro, 尾崎文子, 下山和弘, 長尾正憲：
高齢者の *Candida* と *Mutans Streptococci* の口腔内分布および口腔環境との関連について。口病誌, **64**, 512-517, 1997.
- 4) Glass,R.T. : The infected toothbrush, the infected denture, and transmission of disease. A review. *Compend Contin Educ Dent*, **13** (8), 592-599, 1992.
- 5) Murakami,H., Ito,Y., Fujii Y., Hattori,M., Asai A., Noguchi,T., Kawai,T. and Hasegawa,J. : New denture cleaner using ozone-influence of temperature and humidity on formation of ozone. *Aichi-Gakuin Dent Sci*, **8** (1), 47-52, 1995.
- 6) Murakami,H., Sakuma,S., Nakamura,K., Ito,Y., Hattori,M., Asai,A., Noguchi,T., Maeda,H., Kameyama,Y., Kimura,Y., Nagao,T., Kawai,T. and Hasegawa,J. : Disinfection of removable denture using ozone. *DMJ*, **15** (2), 220-225, 1996.
- 7) 市川哲雄, 広田克彦：感染症防止のためのデンチャープラークコントロール： *Candida* spp. と *Helicobacter pylori* を中心として。補綴誌, **43**, 640-648, 1999.
- 8) Tawara,Y., Honma,K. and Naito,Y. : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* on denture surfaces. *Bull Tokyo Coll*, **37** (3), 119-128, 1996.
- 9) 東匡伸, 小熊恵二：シンプル微生物学。pp. 68-77, 南江堂, 東京, 1995.
- 10) 吉川昌之介, 笹川千尋編：医科細菌学。pp.111-133, 南江堂, 東京, 2001.
- 11) 神力就子：MRSA院内感染に対するオゾン殺菌法の有効性。 *Mebio*, **10** (8), 138-143, 1993.
- 12) 野村節三：オゾンによる殺菌・不活性化, オゾン利用の理論と実際 (太田静行, 清水博則編), pp.177-179, リアライズ社, 東京, 1991.
- 13) 神力就子：オゾンによる細菌, ウイルスの不活性化機構, 新版オゾン利用の新技术, 三ユ-書房, 1993.
- 14) Scott,D.B.M. and Leshner,E.C. : Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, **85**, 567-576, 1962.
- 15) Goldstein,B.D., Lodi,C., Collinson,C. and Balchum,O. : Ozone and lipid peroxidation, *Arch Environ Health*, **18** (4), 631-635, 1969.
- 16) Shinriki,N., Ishizaki,K., Sato,S., Miura,K., Sawadaishi,K. and Ueda,T. : Degradation of nucleic acids with ozone. VI. Labilization of the double-helical structure of calf thymus deoxyribonucleic acid, *Chem Pharm Bull*, **32** (9), 3636-3640, 1984.
- 17) Sawadaishi,K., Miura,K., Ohtsuka,E., Ueda,T., Shinriki,N. and Ishizaki,K. : Structure- and sequence-specificity of ozone degradation of supercoiled plasmid DNA, *Nucleic Acid Research*, **14** (3), 1159-1169, 1986.
- 18) 神力就子：オゾンによる殺菌機構。2. 不飽和脂肪酸, タンパク質とオゾンの反応。防菌防黴誌, **22** (6), 61-64, 1994.
- 19) 北野繁雄, 山本美朗編：これからの口腔感染症。pp. 3-6, 学建書院, 東京, 1993.
- 20) 神力就子：オゾンによる殺菌機構。1. 核酸とオゾンの反応。防菌防黴誌, **22** (5), 57-62, 1994.
- 21) 神力就子：オゾンによる殺菌機構。3. ウイルスの不活性化機構と殺菌機構。防菌防黴誌, **22** (7), 43-50, 1994.
- 22) Murakami,H., Mizuguchi,M., Hattori,M., Ito,Y., Kawai,T. and Hasegawa,J. : Effect of denture cleaner using ozone against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *E. coli T1 Phage*. *DMJ*, **21**, 53-60, 2002.