

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791396  
 研究課題名（和文） デンタルユニット給水系バイオフィームの実験モデルの確立と  
 関連遺伝子の解析  
 研究課題名（英文） Establishment of *in vitro* biofilm model and analysis of related  
 gene in dental unit waterline  
 研究代表者  
 藪根 敏晃（YABUNE TOSHIAKI）  
 大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
 研究者番号：90423144

## 研究成果の概要：

近年、歯科治療用ユニットの給水チューブ内面に細菌バイオフィームが形成され、治療に使用される水が細菌の汚染を受けていることが問題視されている。そこで本研究では、細菌バイオフィームについて詳細に解析するため、給水チューブ内のバイオフィームをシミュレートした実験モデルの確立を試みた。その結果、三種の従属栄養菌がバイオフィーム形成に関与する主要細菌であることが分かり、これら三菌を一定条件のもとで混合培養することにより、臨床で観察されるものに酷似したバイオフィームを作製することに成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学、細菌、バイオフィーム、デンタルユニット、実験モデル

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者人口や易感染性宿主の増加に伴い、院内感染の防止は医科領域全般における重大な問題として認識されるようになってきている。近年、デンタルユニットの給水チューブ内面に細菌バイオフィームが形成され、治療に使用される水から、日本の水道法の基準をはるかに超える量の細菌が検出されているとの報告がある。これは診療終了後の夜間や休診日といった長期間にわたる給水の停止

時に、デンタルユニットの給水チューブ内に滞留した水中で最近が増殖してバイオフィームが形成され、増殖した細菌やバイオフィームから剥離した細菌が放出されるためと考えられている。そのため、給水チューブ内面のバイオフィーム形成を予防し、デンタルユニットの汚染防止する方策の検討は重要な課題であると思われる。しかし、デンタルユニット給水系チューブ内でのバイオフィーム形成については、*in vitro* モデルがな

いためにその形成メカニズムに関する解析が十分に行われておらず、有効な汚染防止法の研究が進んでいるとは言い難い。

## 2. 研究の目的

本研究では、デンタルユニット給水系の汚染防止法の開発ツールとしての *in vitro* の汚染シミュレーションモデルを確立することを目的とした。すなわち、まず、臨床で使用されているデンタルユニットを対象に、バイオフィーム形成に関与する細菌を分離・同定する。各細菌に関し、給水チューブへの付着性について検討後、これらの細菌を混合培養して、*in vitro* モデルの作成を試みる。さらにこの *in vitro* モデルをもとにバイオフィーム形成に関与する遺伝子の解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 実際に診療室で使用されているデンタルユニットより水サンプルとバイオフィームサンプルを採取した。滅菌蒸留水（大塚製薬、東京）を用いて採取したサンプルを希釈し、R2A 寒天平板培地（Becton Dickinson, New Jersey, USA）に播種し、25°C、7日間の好気培養を行った。培養後、形成された優勢なコロニーを単離培養して、グラム染色後、カタラーゼ、オキシダーゼおよび糖発酵反応を調べるとともに、グラム陰性桿菌同定キット（IDテスト NF-18, 日本製薬、東京）を用いて、生化学性状により細菌種の同定を行った。

(2) (1)において優勢な菌であると判定された *S. paucimobilis*, *M. mesophilicum*, *A. haemolyticus* について、各細菌の給水チューブとして使用されているウレタンチューブへの付着性について検討した。*S. paucimobilis*, *M. mesophilicum*, *A. haemolyticus* を 25°C で 72 時間培養して、それぞれ  $3.0 \times 10^8$  CFU/ml,  $3.0 \times 10^6$  CFU/ml,  $3.0 \times 10^8$  CFU/ml の濃度に増菌し、R2A 液体培地（Becton Dickinson）を用いて、各培養原液を 10 倍段階希釈した菌液 10ml を調整し、ウレタンチューブを浸漬して、25°C で 24 時間の静置培養を行った。培養終了後にチューブを取り出して縦断し、チューブ内面を走査型電子顕微鏡（SEM, JSM-5310LV, 日本電子、東京）にて観察し、細菌種ごとのチューブへの付着性を評価した。

(3) 同定された細菌の混合懸濁液中にウレタンチューブを浸漬し、静置・振盪、培養時間混合比率などの各種の条件下で培養後、チューブ内面の走査型電子顕微鏡観察を行い、臨床でのバイオフィーム像に近い培養条件を

検索した。

(4) バイオフィームの菌体外多糖の形成に関与する遺伝子として glycosyltransferase が知られているが、同定された各細菌に関して塩基配列をもとにプライマーを作成し、glycosyltransferase の有無に関して調べた。

## 4. 研究成果

(1) デンタルユニット給水系バイオフィーム形成の原因菌として、口腔内細菌は全く検出されず、*Sphingomonas paucimobilis*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Acinetobacter haemolyticus* の三種の従属栄養菌が検出された。これらの細菌はいずれも上水道由来の毒性の弱い細菌であり、また、過去のいくつかの論文でも同様に検出されたとの報告がある。ただし、従属栄養菌であっても易感染性宿主にとっては日和見感染の原因になる可能性があり、例えば *S. paucimobilis* は髄膜炎、敗血症、菌血症、腹膜炎において検出されたとの報告があるため、これらの細菌を減少させることは易感染性宿主に対する日和見感染のリスクを低下させるという意味で意義があると思われる。

(2) 細菌種毎のウレタンチューブへの付着性を調べた結果、桿菌である *S. paucimobilis* と *A. haemolyticus* の場合、菌体が凝集して多量に付着している様子が観察された（図 1a, c）。また、糸状菌である *M. mesophilicum* でも桿菌よりも付着量は少ないものの、数個の菌体が凝集して付着していた（図 1b）。

(3) 図 2a~c に三種の菌の混合懸濁液中にウレタンチューブを浸漬して 24, 48, 96 時間培養後の内面の SEM 観察像を示す。培養 24 時間後には、主に桿菌が凝集して多量に付着する様子が観察され（図 2a）、この状態は 48 時間後も同様であった（図 2b）。しかし、96 時間培養後には桿菌層の上に糸状菌の付着が認められ（図 2c）、臨床でのバイオフィーム像（図 3）と類似した観察像が得られた。したがって、*S. paucimobilis*, *M. mesophilicum*, *A. haemolyticus* をそれぞれ 18:1:1 の比率で混合した菌液を用い、静置下にて 25°C、96 時間の好気培養を行うと臨床像に類似したバイオフィームを再現できることが分かり、デンタルユニット給水系の *in vitro* バイオフィームモデルを確立することに成功した（図 2c）。また、この *in vitro* バイオフィームモデルの経時的な走査型顕微鏡観察の結果より、デンタルユニット給水系のバイオフィームは、桿菌がはじめにチューブ内面に付着して層をつくるのがわかり、桿菌の初期付着・凝集に続き、それを足場として糸状菌の付着が起こるとい

プロセスであることが明らかとなった(図 4)。

(4) *S. paucimobilis*, *M. mesophilicum*, *A. haemolyticus*からはglycosyltransferaseは認められず、デンタルユニット給水系バイオフィームへのglycosyltransferaseの関与は明らかとはならなかった。

(5) これまでのデンタルユニット給水系の汚染防止対策法の効果判定は実際の臨床使用により行われているため、多大な時間と労力を要し、様々な方法や条件を検討するうえでは非能率的である。今回、確立した *in vitro* モデルは、臨床使用の代替として利用できる世界初の給水チューブバイオフィームモデルであり、これによって、汚染防止法の開発を加速度的に促進することが可能となるものと期待される。

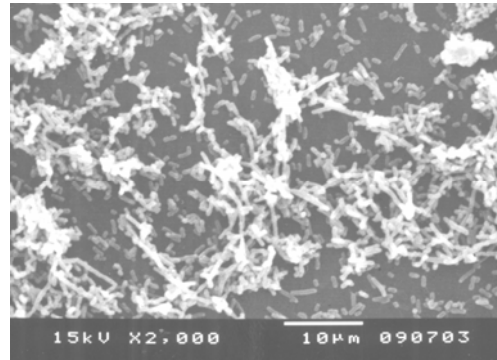


図 1a *S. paucimobilis*のウレタンチューブへの付着 (2000 倍像)

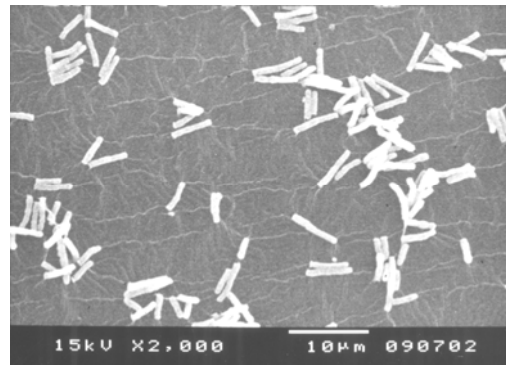


図 1b *M. mesophilicum*のウレタンチューブへの付着 (2000 倍像)

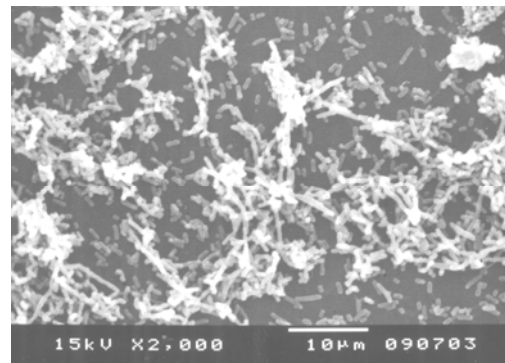


図 1c *A. haemolyticus*のウレタンチューブへの付着 (2000 倍像)

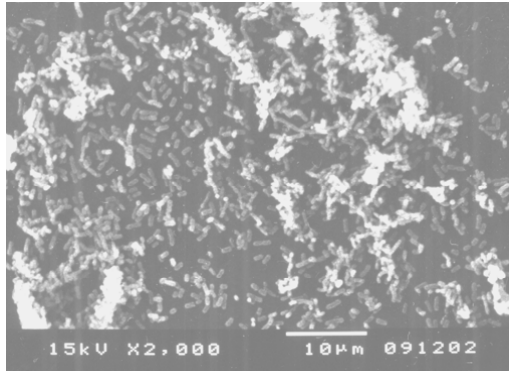


図 2a 3種の細菌の混合懸濁液中で24時間培養後のチューブ内面

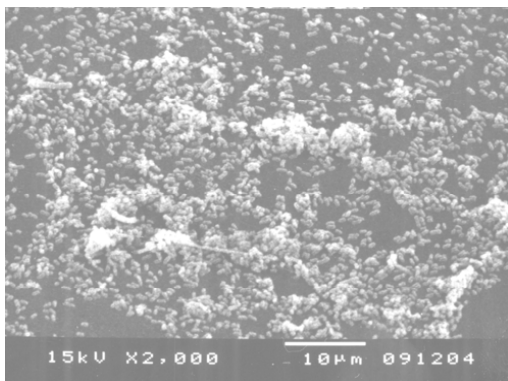


図 2b 3種の細菌の混合懸濁液中で48時間培養後のチューブ内面

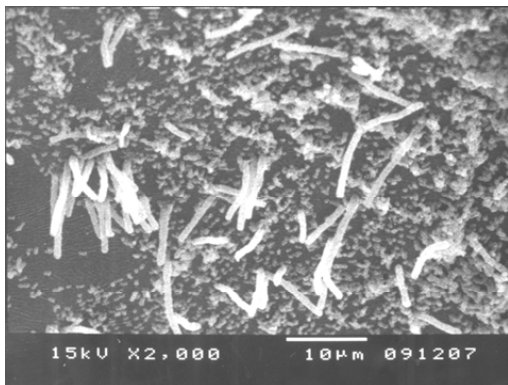


図 2c 3種の細菌の混合懸濁液中で96時間培養後のチューブ内面

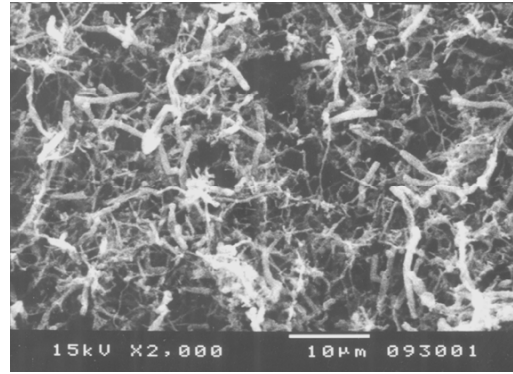
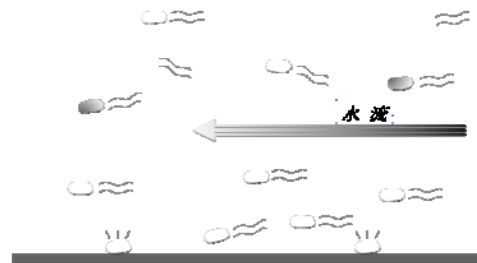
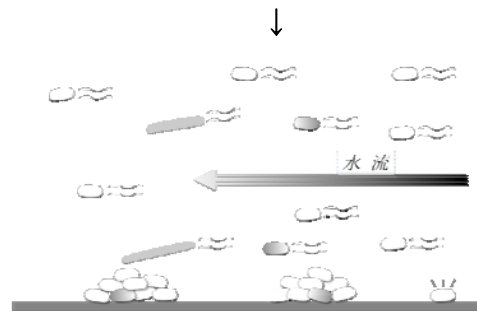


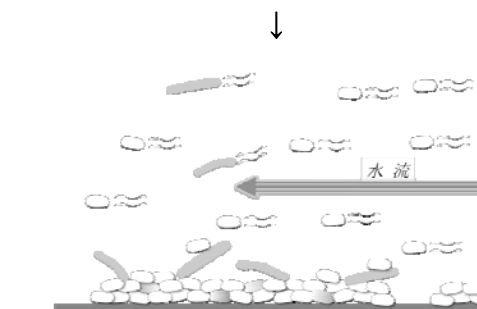
図 3 臨床で使用した給水系チューブの内面



ステージ1：桿菌が初期付着



ステージ2：桿菌が凝集



ステージ3：桿菌層上に糸状菌が付着

図 4 デンタルユニット給水系バイオフィルムの形成プロセス

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Yabune T, Imazato S, and Shigeyuki Ebisu. Assessment of Inhibitory Effects of Fluoride-Coated Tubes on Biofilm Formation by using the In Vitro Dental Unit Waterline Biofilm Model. Applied and Environmental Microbiology. 74. 5958-5964. 2008. 査読有り
- ② 今里 聡、藪根敏晃、恵比須繁之. デンタルユニット給水系の汚染とその防止-チューブ内面でのバイオフィルム形成とフッ素コートチューブの汚染防止効果-. 日本歯科医師会雑誌. 第61巻. 15-22. 2008. 査読無し.

[学会発表] (計1件)

- ① Yabune T, Imazato S, and Ebisu S. Establishment of *in vitro* DUWLs biofilm model and assessment of inhibitory effects of fluoride-coating tube on biofilm formation. International Dental Materials Congress 2007. 2007/11/24. Bangkok.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藪根 敏晃 (YABUNE TOSHIAKI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：90423144

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：