

## 走査型電子顕微鏡による機能水(BK水)が石膏模型 および細菌に与える影響

藤 原 周 南 温 藤 井 輝 久

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科補綴学分野全部床義歯学(主任：藤井輝久教授)

**抄録** 流水式洗浄殺菌効果水製造装置は、食塩を含む電解質溶液を電気分解することにより、殺菌効果の高い次亜塩素酸を含む殺菌能を持つ水(以下BK水)を製造することができる。このBK水を用いることによって流水下で汚染物を洗浄し、さらに殺菌作用によりアルジネート印象材、石膏模型を効果的に消毒できることが報告されている。そこで本研究ではBK水を用いて石膏を消毒した場合の石膏表面および細菌の形態に与える影響を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

その結果、BK水は石膏表面を一層溶解させ、また細菌に対しても形態変化を惹起せしめることが明らかになった。この結果はBK水が石膏を溶解させることにより表層の細菌を効果的に洗い流し、さらに細菌にも直接作用することによって、消毒効果を発揮するものと考えられた。

キーワード：BK水、走査型電子顕微鏡、消毒効果

### 緒 言

歯科診療の特徴のひとつは、口腔内での処置にとどまらず、義歯や冠を始めとする補綴物を製作する過程で、患者の唾液、血液で汚染された印象物、技工物、歯科治療関連材料を取り扱うことである。従って技工操作を伴う治療においては、印象物、技工物などを即時に消毒して感染経路を遮断することが重要である<sup>1-3)</sup>。汚染された印象物、技工物が感染経路となり、歯科医師、歯科衛生士、歯科技工士等のdental health-care workersを危険にさらす可能性が指摘されている<sup>4,5)</sup>。歯科治療関連材料では、強力な薬剤等への浸漬が必要であり<sup>6,7)</sup>、材料の物性面等にも影響を与える<sup>8,9)</sup>。そのため日常の臨床では治療に関する材料は完全に消毒することが困難であると言われている<sup>10)</sup>。

近年、殺菌能を有する各種の機能水が歯科関連材料の消毒に応用され、その有用性が認められている<sup>11,12)</sup>。流水式洗浄殺菌効果水製造装置は、食塩を含む電解質溶液を特殊な電極で電気分解することにより、中性付

近で次亜塩素酸ナトリウムよりはるかに殺菌効果の高い次亜塩素酸(遊離残留塩素濃度10~30ppm)を含む殺菌水(以下BK水)を必要に応じて、連続的に製造することができる。このBK水は*in vitro*において、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌や緑膿菌をはじめとする細菌に殺菌的に作用することが報告されている<sup>11,12)</sup>。汚染物の消毒においては、付着している細菌や血液、タンパク質などを洗浄作用により除去し、なお残存している細菌にも効果を有することが重要である<sup>13)</sup>。BK水装置は流水式であり、持続的な流水下で汚染物を洗浄することに加えて、BK水の持つ殺菌作用によりアルジネート印象材、石膏模型で優れた消毒作用を示す<sup>14,15)</sup>。

そこで本研究ではBK水を用いて石膏を処理した場合、石膏表面および細菌の形態にどのような影響を与えるかを走査型電子顕微鏡を用いて観察し、その消毒効果について考察を加えた。

### 材料および方法

流水式洗浄殺菌効果水製造装置(テー・アール・ピー社製、大阪)は原液である電解質溶液を、毎分30mlの割合で一定に電解通路に導入し、電解反応で生じた次亜塩素酸を含む電解水に毎分6lの水道水を混合したBK水を製造する。今回使用した条件では製造され

るBK水はpH6.8であり、pH・残留塩素測定器(マイテスター、センラル科学株式会社、大阪)を使用して計測したところ、残留塩素量は常に10ppmの値を示した。

### 供試菌株

*Candida albicans* ATCC 18804, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* 209 P, *Escherichia coli* ATCC 17750を供試した。*E. coli*および

*S. aureus*はTrypticase Soy agar (Difco, Detroit, MI, U. S. A.)で*S. mutans*はBrain Heart Infusion agar (Difco)で継代培養した後、それぞれの培地50mlに接種し37℃、18時間静置培養を行った。*C. albicans*はSabouraud Dextrose寒天斜面培地 (Difco)で継代培養し50mlの同液体培地中で37℃で18時間静置培養した。なお、*S. mutans*は嫌氣的条件下(90%N<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>-5%H<sub>2</sub>)で培養した。菌液を遠心分離(10,000×g, 10分)し沈渣をPBSで3回洗浄しPBS中に懸濁し試供菌液とした。それぞれの試供菌液濃度はCFUにて算定し*C. albicans* (3.0×10<sup>6</sup> cell/ml), *S. mutans* (8.9×10<sup>4</sup> cell/ml), *S. aureus* (1.7×10<sup>5</sup> cell/ml)および*E. coli* (2.0×10<sup>5</sup> cell/ml)であった。

BK水処理後の石膏表面の観察においては、真鍮製の円柱(直径10mm×10mm)をシリコン印象材(Duplicate, 松風社製)で印象し、それに歯科用硬質石膏(デントロック, 丸石石膏株式会社製)を滅菌蒸留水で指定の混水比で練和して注入し、石膏片を作製した。マイクロチップで各試供菌液10μlをこの石膏片表面に

## 結 果

### 1. BK水処理後の石膏模型表面観察

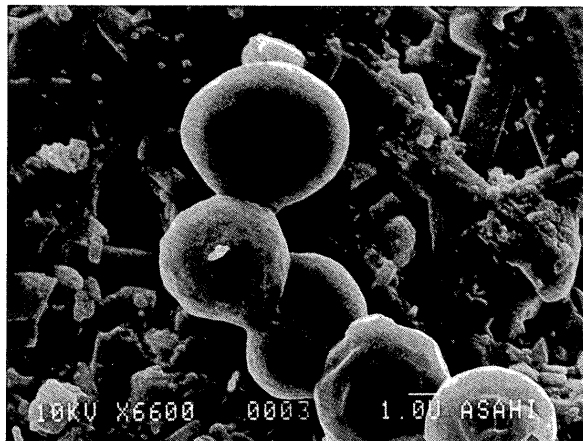
石膏表面に*C. albicans*および*S. mutans*の菌液を塗抹したSEM像を示す(図1)。図1-a, bはBK水未処理の像であり、石膏の結晶構造の上に*C. albicans*および*S. mutans*が観察される。図2は*C. albicans*を接種した石膏試料をBK水で30秒間処理した後の像であり石膏表層には*C. albicans*を認めず、石膏の不完全な結晶部分と表層が除去され、鋭利な結晶構造を示していた。*S. mutans*を塗抹した石膏でも同様に、完全に菌が除去されていた(写真は示さず)。また図3はBK水処理30秒後と未処理の石膏試料のSEM像である。BK水処理により図2で観察されたと同様に結晶部分の溶出のために表層が粗造になり小針状の結晶が見られた。図4は石膏に2%グルタルアルデヒドあるいは1%次

位置を特定しながら滴下し、5分間放置乾燥を行った。その後、石膏片をBK水流水下で30秒間処理した。また、BK水処理が細菌の形態に与える影響の観察の目的でSEMpore(7801 31801, 日本電子)を使用した。この装置はメンブレンフィルター(ポリカーボネート, 孔径0.6μm)の付属したSEM試料載台を有している。メンブレン上に各菌液10μlを滴下、陰圧で吸引し菌をメンブレンに残存させた。その後、BK水500μlの滴下・吸引(4回および8回)を繰り返した(吸引処理)。また、菌液1mlにBK水24mlを添加攪拌後直ちに遠心により集菌し上清を吸引した。なおこの操作は6回繰り返した。その後、各菌液10μlをSEMporeに上で同様に観察試料に供した(混合処理)。SEMpore試料は、2%グルタルアルデヒドで5分間固定後、PBSで洗浄した。また、石膏試料は乾燥のみとした。通法に従い、エタノール系列を用いて脱水操作を行った。試料は臨界点乾燥を行いイオンコーター(E-1030, 日立製作所)によりPdコーティングし、走査型電子顕微鏡(JSM-35C型, 日本電子およびS-4500, 日立製作所)で観察した。

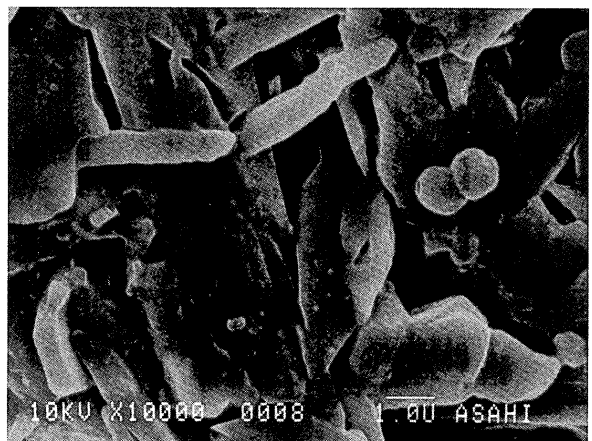
亜塩素酸溶液を30秒作用させた後のSEM像を示す。BK水を作用させた像(図2)と比較すると次亜塩素酸溶液およびグルタルアルデヒドで処理した石膏表面は強度の溶解を示し小さな結晶は減少し、大きな結晶も角が溶解しているのが確認される。特にグルタルアルデヒドでは石膏表面の微小な結晶部はほとんど見られなかった。

### 2. BK水処理が細菌の形態に与える影響

SEMpore上で菌をBK水で吸引処理した後の*S. aureus*と*E. coli*のSEM像を図5~7に示した。図6-a, bはそれぞれ*S. aureus*をBK水吸引処理(4回および8回)した像である。コントロール(図5)と比較すると明らかに菌体が破裂したものや、赤血球状に押しつぶされた形態を示すものが多かった。一方、図7に示



a  
*C. albicans* × 6600



b  
*S. mutans* × 6600

図1 菌を付着させた未処理石膏表面像

した *E. coli* は4回のBK水吸引処理で全ての菌体が損傷を受け、菌体内容物が溶出している様子が観察された。

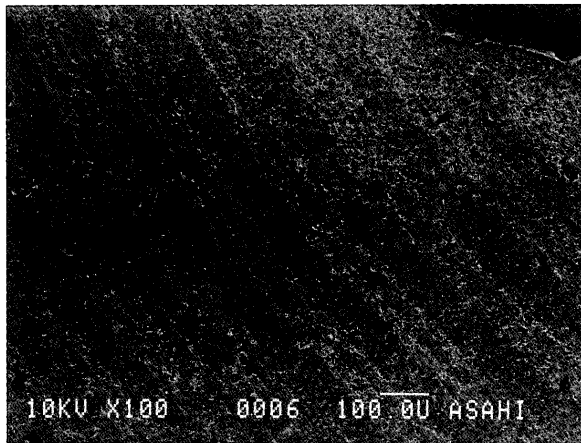
BK水で菌体を混合処理した場合のSEM像を図8、9に示す。BK水吸引法とほぼ同様の傾向を示すSEM

像が見られた。しかし、*S. aureus* では2回、6回の混合処理によっても完全に破壊された菌体は顕著には観察されなかったが菌体にしわが見られ、内容物の溶出が窺われた(図8-a, b)。一方、*E. coli* では2回のBK水混和処理で完全に菌体が破壊されていた(図9)。

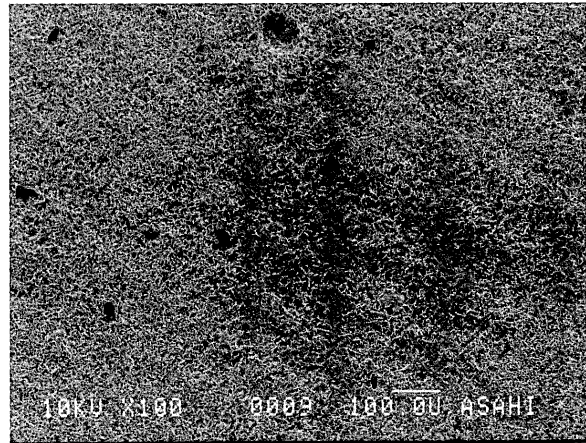


*C. albicans* (処理時間：30秒) × 6600

図2 BK水による石膏処理



a  
未処理 × 100



b  
BK水(処理時間：30秒処理) × 100

図3 BK水による処理後の石膏表面像

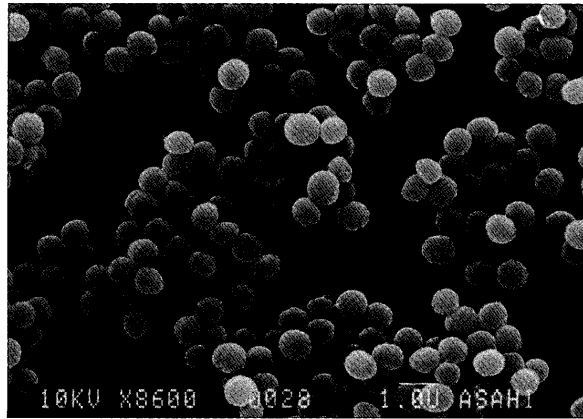


a  
2% グルタルアルデヒド処理  
(処理時間：30秒) × 6600



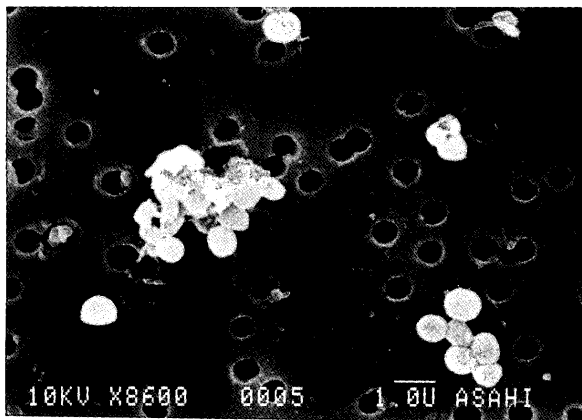
b  
1% 次亜塩素酸溶液処理  
(処理時間：30秒) × 6600

図4 グルタルアルデヒドおよび次亜塩素酸溶液処理後の石膏表面像



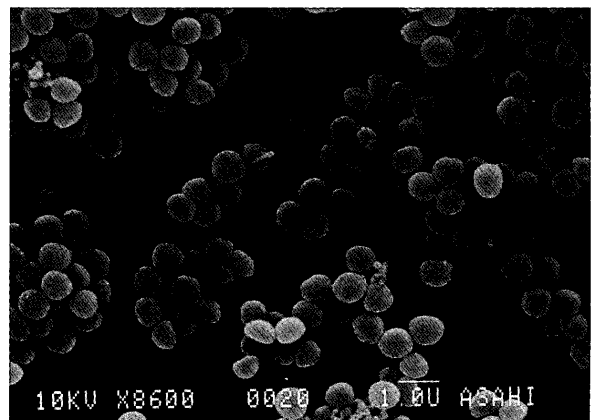
*S. aureus* (未処理) × 8600

図5 BK水による連続処理が細菌の形態に与える影響 (吸引法)



a

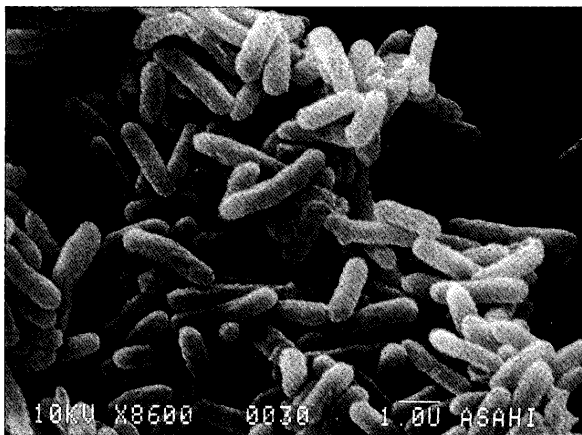
*S. aureus* × 8600  
(BK水 4 回吸引)



b

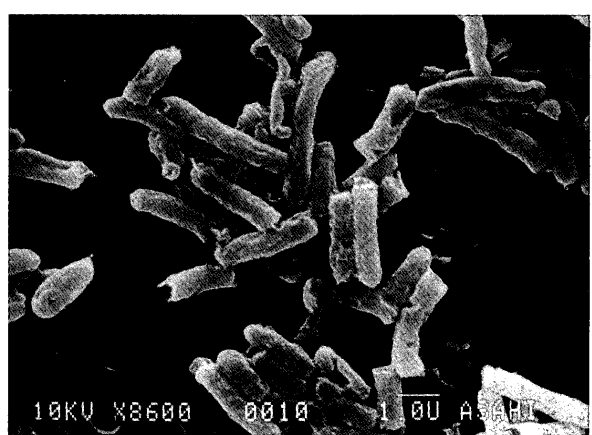
*S. aureus* × 8600  
(BK水 8 回吸引)

図6 BK水による連続処理が細菌の形態に与える影響 (吸引法)



a

*E. coli* × 8600  
(処理なし)



b

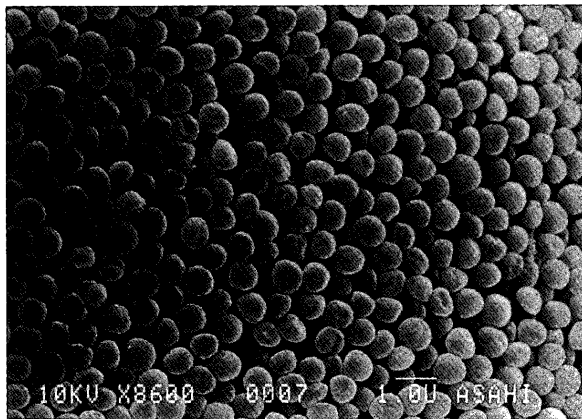
*E. coli* × 8600  
(BK水 4 回吸引)

図7 BK水による連続処理が細菌の形態に与える影響 (吸引法)

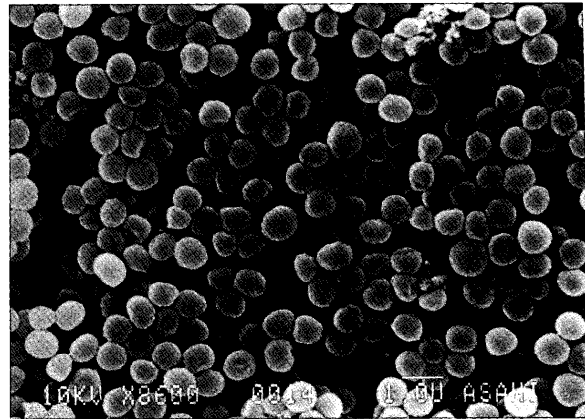
### 考 察

近年、機能水として強酸性水などが注目され、その幅広い活性とともに多くの分野での応用が試みられて

いる。強酸性水は殺菌作用が強いことから歯科領域でも使用されている<sup>14-17)</sup>。強酸性水(pH 2~3, 酸化還

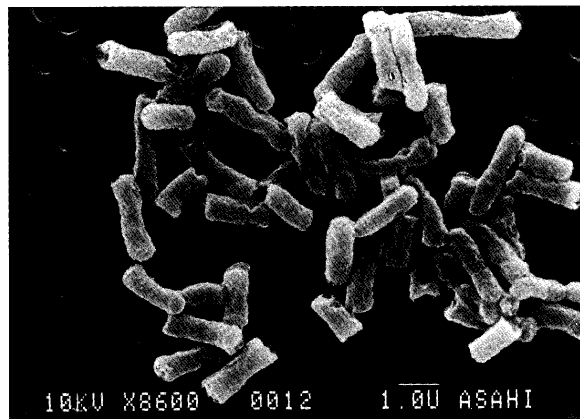


a  
*S. aureus* × 8600  
(BK水 2 回処理)



b  
*S. aureus* × 8600  
(BK水 6 回処理)

図8 BK水による連続処理が細菌の形態に与える影響(混和法)



*E. coli* × 8600  
(BK水 2 回処理)

図9 BK水による連続消毒が細菌の形態に与える影響(混和法)

元電位1, 100mV以上)は従来, 生物の生存範囲を逸脱したpH, 酸化還元電位を持つことから殺菌効果を示すと考えられてきたが, 近年低いpHと残留塩素の相乗効果とその殺菌性に関与していると考えられるようになってきた<sup>12)</sup>. 大久保らは強酸性水は腐食電位が高く, 残留塩素濃度の低下に伴い殺菌効果が低下することを報告している<sup>12)</sup>. そこで, 残留塩素の効果を最大限に利用するために次亜塩素酸(HOCL)の存在率が高い中性水が注目されている. BK水は, 強い殺菌力を有する遊離塩素と次亜塩素酸を含有している. 次亜塩素酸がタンパク質と接触した場合, タンパク質を塩素化あるいは酸化させる. また, 石膏の消毒, アルジネート印象材の消毒に, 物性面での影響をほとんど与えないという特性のために臨床応用が試みられている<sup>14)</sup>. さらに細菌の塩素化により代謝を阻害するだけでなく膜の透過性を変化させ, 酸化作用により, 酵素を破壊すると考えられている<sup>11, 12, 16)</sup>.

細菌で汚染された石膏模型をBK水で30秒間処理し

た場合のSEM観察では, 石膏の不完全な結晶部分が除去されている様相が観察できた. BK水による流水処理は, 石膏表面を一層溶解することで付着している菌体を洗い流すと考えられる. また, 1%次亜塩素酸溶液, 2%グルタルアルデヒドにおいても同様に石膏表面の溶解が確認された. しかしBK水処理された石膏表面と比較すると, 1%次亜塩素酸溶液, 2%グルタルアルデヒド処理では石膏の結晶部分の角まで溶出し, より大きなダメージを受けていた.

SEMによる菌の形態的な変化観察については, BK水による吸引処理と混合処理の両方について観察した. 吸引処理4回と混合処理2回の菌体の観察では, ほぼ同様な形態的な変化が観察された. 吸引, 混合処理のどちらも新鮮なBK水が持続的に菌体に接触することを想定したもので, BK水の流水下での処理と同様の効果があると考えられる. 菌体の形態的变化に関しては, *S. aureus*では完全に菌体が破壊されているものもあるが, その変化は比較的少なかった. 奥田ら<sup>19)</sup>は酸化

電位水を用いて細菌の形態変化から殺菌効果を検討し、本検索と同様にSEM観察で*S. aureus*では表面形状に変化が少ないが、TEMによる観察では、細胞壁の構造が保たれているものでもリボゾームなどの細胞小器官は観察されなくなり、核は拡散していると述べている。

## 結 論

歯科診療では印象物、石膏模型、試適された技工物等は高度に汚染されているが、歯科医はinfection controlに責任を負う立場にある。そこで連続的に製造することができ、流水としての洗浄効果と、殺菌効果の両面が期待されるBK水の効果を形態的に検討した。その結果、BK水は単に石膏上の菌体を洗い流すというだけでなく石膏表面を適度に溶解することにより菌を除去すること、さらに細菌自体にも高度の形態的変

化を与えることが認められた。石膏や印象材のような変形や変質が問題になる歯科用材料の消毒にあたっては、細菌等を物理的に洗い流し、その絶対量を減少させ、その後に残存する菌に対して抗菌作用を示すことが肝要である。BK水は、そのような条件を同時に満たす可能性が確認され院内感染予防に有効であると考えられた。

## 文 献

- 1) CDC : Recommended infection-control practices for dentistry. *MMWR*, **35** : 237~246, 1986.
- 2) Council on Dental Therapeutics, Council on Prosthetic Services and Dental Laboratory Relations : Guidelines for infection control in the dental office and the commercial dental laboratory. *JADA*, **110** : 969~972, 1985.
- 3) Council on Dental Materials and Devices, Council on Dental Therapeutics : Infection control in the dental office. *JADA*, **97** : 673~677, 1978.
- 4) Kimondollo P. K. : Guidelines for developing a dental laboratory infection-control protocol. *Int. J. Prosthodont.*, **5** : 452~456, 1992.
- 5) Leung R. L. and Schonfeld S. E. : Gypsum casts as a potential source of microbial cross contamination. *J. Prosthet. Dent.*, **49**(2) : 210~211, 1983.
- 6) Ivanovski S., Savage N. W., Brockhurst P. J. and Bird P. S. : Disinfection of dental stone cast: Antimicrobial effects and physical property alterations. *Dent. Mater.*, **11** : 19~23, 1995.
- 7) Beyerle M.P., Hensley D. M., Bradley D. V., Schwartz R. S. and Hilton T. J. : Immersion disinfection of irreversible hydrocolloid impression with sodium hypochlorite. *Int. J. Prosthodont.*, **7** : 234~238, 1994.
- 8) Vadewalle K. S., Charlton D. G., Schwartz R. S., Reagan S. E. and Koeppen R. G. : Immersion disinfection of irreversible hydrocolloid impressions with sodium hypochlorite. Part II : Effect on gypsum. *Int. J. Prosthodont.*, **4** : 315~322, 1994.
- 9) 鬼塚 雅, 門川明彦, 松下容子, 自見 忠 : 支台歯石膏模型の消毒方法の研究, 第1報消毒液浸漬が石膏硬化体の表面粗さと表面微細構造に及ぼす影響. 補綴誌, **40**(4) : 695~702, 1994.
- 10) 中本匡美, 玉本光弘, 浜田泰三 : アルジネート印象材に対する感染予防の実態. 広大歯誌, **28** : 330~334, 1994.
- 11) 大久保 憲, 犬塚和久, 河合浩樹 : 電解酸性水の新しい知見. 感染と消毒, **2** : 14~19, 1995.
- 12) 余 明順, 秋山美章, 下川樹也, 本多武司 : 食塩電気分解産物を利用した流水式手洗い消毒. 環境感染, **9** : 20~23, 1994.
- 13) 川名林治 : 院内感染対策テキスト(感染防止対策と消毒・滅菌法)(日本感染症学会編), 1版, ヘルス出版(東京), 29~41, 1997.
- 14) 藤原 周, 斎藤繁徳, 中島国男, 南 温, 藤井輝久 : 食塩電気分解水を利用したアルジネート印象材と石膏模型の洗浄消毒について. 補綴誌, **43** : 73~79, 1999.
- 15) Fujiwara S., Minami A., Saito S., Nakajima K. and Fujii T. : Flow water disinfection for alginate impressions and stone casts with electrolytic of sodium chloride. *J. Gifu. Dent. Soc.*, **25** : 223~227, 1998.
- 16) 塚崎弘明, 尾関雅彦, 芝 燁彦, 酒井敏博, 豊嶋 康, 瀧澤秀 : 機能水と特に強電解酸性水の誕生から医療分野への進出への挑戦. 昭歯誌, **21** : 126~132, 2002.
- 17) 丹保憲仁, 小笠原絃一 : 浄水の技術, 1版, 技報堂出版(東京), 101~104, 1994.
- 18) 岩沢篤郎, 中村良子, 水野徳次 : 臨床分離株に対するアクア酸化水の効果. 環境感染, **8** : 11~16, 1993.
- 19) 奥田禮一, 笹崎弘己, 兼平正史, 岡部太一, 安部 敏, 田上 篤, 岩松洋子, 宮 豊, 清水義信 : 形態変化から観た酸化電位水の殺菌効果. 日歯保誌, **37** : 755~765, 1994.

## Scanning Electron Microscopic Study of the Effects of BK Water on Dental Cast Stone and Bacterial Cell

SHUU FUJIWARA, ATSUSHI MINAMI and TERUHISA FUJII

*Department of Prosthodontics, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation (Complete Denture)*

*Asahi University School of Dentistry*

*(Chief: Prof. Teruhisa Fujii)*

*1851 Hozumi, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan*

**Key words** : Function water, Scanning electron microscope, Disinfection

**Abstract** *It is well recognized that infection control is essential for both dental patients and dental health-care workers (dentists, hygienists, technicians and other staff).*

*Recently, function water has been used for disinfection of dental materials. A flow water system with electrolytic products of sodium chloride (BK) is used for the disinfection of alginate impression materials and dental cast stones.*

*In this study, the effects of BK water on dental cast stones and bacterial cell were investigated using scanning electron microscopy (SEM).*

*The results obtained were as follows :*

- 1. The surface of dental stone casts was slightly dissolved, and bacterial cell on the dental stone casts were effectively removed by BK water treatment.*
- 2. SEM revealed that E. coli cells were completely destroyed by BK water treatment.*
- 3. S. aureus showed reduced morphological changes, compared to E. coli, by BK water, however, cells were obviously damaged by the treatment.*