

Effects of HClO Incorporated Electrolyzed Water on Proliferation of KB-cells

*ZAMAN S^{1,2}, MATIN K^{1,3}, OKADA A^{1,2}, HANADA N⁴ and TAGAMI J^{1,3,5}

¹Cariology and Operative Dentistry, Department of Restorative Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University. ²Department of Oral Health, National Institute of Public Health. ³Support Program for Improving Graduate School Education at TMDU. ⁴Department of Translational Research, School of Dental Medicine, Tsurumi University. ⁵Global Center of Excellence Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases at TMDU.

電解水に含まれる有効塩素の上皮細胞 (KB-cells) 増殖に及ぼす影響

*ザマン ショウカット^{1,2}、マティン カイルール^{1,3}、岡田彩子^{1,2}、花田信弘⁴、田上順次^{1,3,5}

¹ 東京医科歯科大学大学院う蝕制御学分野、² 国立保健医療科学院口腔保健部、³ 東京医科歯科大学 大学院教育改革支援プログラム、⁴ 鶴見大学歯学部探索歯学講座、⁵ 東京医科歯科大学 グローバル COE プログラム「歯と骨の分子疾患科学の国際教育拠点 - デント・メドミクス of インテリジェンスハブ - 」

Objectives: Recently, a new electrolyzed water; PerfectPerio™ water (PPW; Noguchi Dental Medical Research Institute, Tochigi, Japan,) was introduced containing high concentrations of free chlorine (Okada A *et al.*, 86th IADR) to control oral infections. However, the effects of PPW on the oral tissue have not been evaluated yet. Thus, the aim of this study is to investigate cytotoxic effects of PPW on human epithelial cell line (HeLa-KB). **Methods:** An MTT assay was employed to evaluate the effects of the PPW on KB cell proliferation and a permeability test was performed using fluorescence microscopy after staining with a LIVE/DEAD *BacLight*™ Bacterial Viability Kit. The KB cells were grown (1×10^4 cells/well) and incubated for 1-9 days. On the 3rd day of culture, 10sec treatment was performed with different functional chlorine concentrations of PPW; PPW1 (600ppm), PPW2 (300ppm), PPW4 (150ppm) and PPW6 (100ppm). Mineral water (MW), Listerine and 0.12% NaOCl were used as controls. MTT data were taken on day 1, 3, 5, 7 and 9 after treatment using 20μl of MTT solution in each well, followed by further incubation for 4 hours. **Results:** Statistically significant increase in Optical Density (OD) was observed in KB cells treated with PPW4 and PPW6. However, OD remained unchanged in PPW1 and PPW2 groups. Permeability tests displayed absolute co-relationship with MTT data as most of the cells fluoresced green indicating integrity in the nuclear membrane in case of PPW4 and PPW6 which was almost same as

untreated and MW treated control groups on the 5th day after treatment. **Conclusion:** The results indicate that the 4 or 6 times dilution of original PPW concentrations can be considered for prophylactic treatment to control cariogenic and periodontal infections and would serve as very useful baseline information for further clinical studies. This study was supported by G-COE Program, IRCMSTBD at TMDU and Noguchi-DMRI.

目的：高濃度次亜塩素酸電解水（PerfectPerio：PPW、野口歯科医学研究所、日本）が、う蝕予防に有効である事が報告された(Okada A *et al.*, 86th IADR)。しかしながら、口腔軟組織への影響に関しては検証が行なわれていない。そこで、PPW のヒト上皮細胞株（HeLa-KB）に対する影響を検証する事を本研究の目的とした。

方法：PPWを2倍希釈（PPW2）、4倍希釈（PPW4）及び6倍希釈（PPW6）した溶液を準備した。ミネラルウォータ（MW）、リステリン（ジョンソン・エンド・ジョンソン、アメリカ）及び0.12%次亜塩素ナトリウム溶液はコントロール群とした。HeLa-KB細胞を10%ウシ胎児血清及び抗生物質含有DMEMにて、37度、5%CO₂、95%Air条件化にて3日間培養し、細胞がコンフルエントになった時点で(1x10⁴ cells/well)、実験に用いた。次に、培養したHeLa-KB細胞に、各洗浄剤を10秒間作用させた。その後、MTT分析法により、酵素活性を測定した。尚、MTT分析法によるデータは、各溶液の作用から1日、3日、5日、7日及び9日後において行った。また、溶液作用直後及び5日後に、LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes、Invitrogen Detection Technologies、アメリカ)を用いて染色し、蛍光顕微鏡観察により細胞生死判定を行った。

結果：HeLa-KB細胞における吸光度の上昇は、PPW4及びPPW6において認められたが、PPW2以上の高濃度に関しては、認められなかった。溶液作用5日後の蛍光顕微鏡観察像に関しても、PPW4及びPPW6は、MW及び未処理群とほぼ同程度の細胞透過性を示し、MTT分析法の結果と同様の傾向が認められた。

結論：う蝕及び歯周病予防として使用する際には、安全面から4倍以上の希釈（有効塩素濃度 = 150ppm）が必要である事がわかった。本実験の結果は、今後の臨床研究を含むさらなる実験において、大いに寄与すると考えられる。本研究は東京医科歯科大学 グローバル COE プログラム「歯と骨の分子疾患科学の国際教育拠点 - デント・メドミクス of インテリジェンスハブ - 」及び野口歯科医学研究所の補助を受けて遂行された。