

Electrolyzed Water with Functional-chlorine Effectively Penetrates Deep into Cariogenic Biofilms

*OKADA A^{1,2}, MATIN K^{1,3}, ZAMAN S^{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.

次亜塩素酸電解水の効果的なう蝕バイオフィームへの浸透作用

*岡田彩子^{1,2}、マティン カイルール^{1,3}、ザマン ショウカット^{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・メドミクスのインテリジェンスハブ - 」

Objective: This study was designed to evaluate the efficacy of electrolyzed waters containing different functional-chlorine concentration levels on cariogenic bacteria and biofilm. **Methods:** Electrolyzed hypochlorite water (PerfectPerio™ water; PPW, Noguchi Dental Medical Research Institute; Noguchi-DMRI, Japan), PPW was diluted; x2 (PPW-2), x4 (PPW-4), x6 (PPW-6) and x10 (PPW-10). Milli-Q water and 0.5% NaOCl were included as controls. Viability of the bacterial cells was assessed by staining with BacLight™ Bacterial Viability Kit followed by fluorescence microscopy and counting colony forming units (CFU/ml) after 10sec PPW treatment. Proteins of PPW treated *Streptococcus mutans* MT8148 (*S. mutans*) were inspected by using SDS-PAGE and two-dimensional gel electrophoresis (2DE). Also, biofilms were grown on equal-shaped bovine enamel coupons using four species of oral streptococci (*S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus mitis*) at 37°C for 12 hrs in an oral biofilm reactor. After treatment with PPW the bacteria were separated from three different levels (upper, middle and bottom) of the biofilms by shaking and CFUs/ml counted in each level. Further, to neutralize the functional-chlorine, PPW was diluted with solution of sodium ascorbate (pH7.5). **Results:** Viability test and CFU data showed that almost all bacteria were killed by the diluted PPW down to the

concentration of 100ppm. Protein analysis indicated that *S. mutans* proteins were damaged on PPW treatment. Interestingly, no colony formation could be detected even in case of samples were plated from the most bottom part of biofilms. Further, it was confirmed that the functional-chlorine concentration in PPW was reduced to 2ppm from 600ppm by sodium ascorbate, but maintained low alkali pH level. **Conclusion:** PPW maintained as potential bactericide even after penetrating deep into the bottom of the cariogenic biofilms. Also, it was found that sodium ascorbate solution effectively neutralizes PPW. This study was supported by G-COE Program, IRCMSTBD at TMDU and Noguchi-DMRI.

目的：う蝕病原菌及びう蝕バイオフィルムの制御に有効である次亜塩素酸電解水の有効塩素濃度を検証する事を本研究の目的とした。

方法：次亜塩素酸電解水(PerfectPerio:PPW、野口歯科医学研究所、日本)を2倍希釈(PPW-2)、4倍希釈(PPW-4)、6倍希釈(PPW-6)及び10倍希釈(PPW-10)した溶液を準備した。Milli-Q water (MQ) 及び0.5%次亜塩素ナトリウム水(NaOCl)はコントロール群とした。

4種のう蝕病原菌; *Streptococcus mutans* MT8148(*S. mutans*), *Streptococcus sobrinus* 6715(*S. sobrinus*), *Streptococcus gordonii* ATCC10558(*S. gordonii*) and *Lactobacillus casei* IAM12473を培養後、リン酸緩衝液 (PBS) 中で再懸濁した細菌懸濁液を準備した。次に遠心操作を行い、上澄みを除去後の菌塊に各溶液を加え、10秒間静置した。その後、CFU 及びLIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes、Invitrogen Detection Technologies、アメリカ)を用いて染色後、蛍光顕微鏡観察を行った。また、*S. mutans*におけるタンパク質に与える影響に関して、溶液を作用後にタンパクを抽出し、一次元電気泳動 (SDS-PAGE) 及び二次元電気泳動 (2-DE) を用いてタンパク解析を行い、検証した。さらに、う蝕バイオフィルムに対する浸透性の検証のために、人工口腔装置 (Oral Biofilm Reactor: OBR) 内にウシエナメル質を切断して作製した試料を固定し、試料上部から、四種のう蝕病原菌(*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. gordonii* and *Streptococcus mitis* ATCC6249) 懸濁液、1%スクロース含有Heart infusion、PBSを連続的に12時間滴下し、人工バイオフィルムを形成した。その後、試料は各溶液に浸漬し、振動によりバイオフィルムを三層に分けた。各層において、CFUを行い、コロニー数を計測した。一方で、使用後に残存する有効塩素を懸念し、即座に有効塩素を失活可能なアスコルビン酸ナトリウム水を用いた溶液を開発し、作用後のPPWのpH及び有効塩素濃度を計測し、上記同様にう蝕病原菌に対する影響を検証した。

結果：バクライト染色による蛍光顕微鏡観察の結果、PPW-6 (有効塩素濃度 = 100ppm)までの群において、全菌種に死滅が認められた。タンパク解析の結果に関して、*S. mutans* のタンパクにダメージを与える事が認められた。また、PPWのバイオフィルム浸透性の検討に関して、PPWを作用させた群では、バイオフィルム最下層におけるコロニーは、ほとんど認

められなかった。さらに、有効塩素濃度の失活剤の検証においては、作用後の PPW は、中性から弱アルカリ性を保持したまま、その有効塩素濃度を 600 ppm から 2ppm まで即座に減少した。

結論：PPW は 100ppm 以上の有効塩素濃度において、う蝕病原菌を死滅する事がわかった。また、PPW の有効塩素濃度が高くなるにつれ、う蝕バイオフィルムへの浸透作用が強まる事がわかった。さらに、アスコルビン酸ナトリウムは、有効塩素濃度を即座に失活する事がわかった。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・メドミクスの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。