

Two Pathways for Two Functional Waters in Controlling Cariogenic Activities

A. OKADA¹, K. MATIN^{1,2}, M. ONO¹, and J. TAGAMI^{1,2}

¹Tokyo Medical and Dental University, Japan

²COE Program, FRMDRTB at TMDU, Japan

二種機能水の異なる経路からのう蝕予防コントロール

岡田彩子¹、Khairul MATIN^{1, 2}、小野雅洋¹、田上順次^{1, 2}

¹東京医科歯科大学大学院う蝕制御学分野

²東京医科歯科大学 21世紀COEプログラム 歯と骨の分子破壊と再構築のフロンティア

Objectives: This study was designed to evaluate the efficacy of two functional waters, ozonated alkali-ion water (AW-OZ) and hypochlorite water (HCIO), on caries controlling activities. **Methods:** Artificial biofilms were grown on equal-sized bovine enamel coupons using freshly cultured *Streptococcus mutans* MT8148 (*S. mutans*) at 37°C for 12 hrs in an oral biofilm reactor. After a rinse in PBS the coupons were inoculated in waters with varying pH levels: tap water = TW 7.0, AW (TK7705, National, Japan) 10.67, AW-OZ (HealOzone, Kavo, Germany) 8.54 and ozonated TW = TW-OZ 3.79; followed by shaking and measurements of detached biofilms. The detached biofilms were estimated by measuring water insoluble glucan (WIG) using Phenol-H₂SO₄ method and measurement by a plate reader. BacLight bacterial viability kit was used to detect the live and dead cells after incubating different mutans streptococci cells in the above waters and HCIO (PerfectPerio, Noguchi Dental Medical Research Institute, Tochigi, Japan). All experiments were repeated for reproducibility (n=4). In addition, extra-cellular proteins of functional water treated *S. mutans* were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and selected protein spots were analyzed. **Results:** Two-way ANOVA indicated that significantly higher amount of glucan was dissolved by AW-OZ compared to AW, TW and TW-OZ (p<0.05). BacLight viability test and CFU count showed that almost all bacteria were killed by only 10 sec HCIO treatment. AW-OZ also has shown some potency in inactivating oral streptococci. Interestingly, larger glucan binding protein spot was detected on 2-DE gel after AW-OZ treatment compared to TW-OZ. **Conclusion:** AW-OZ has the efficacy to remove biofilm by disintegrating WIG from cariogenic biofilm, while HCIO has proven to be a potential bactericide. Therefore, appropriate use of these functional waters would definitely be useful and careful application is important for safe caries control. This study was supported by COE Program, FRMDRTB at TMDU.

目的) う蝕は多因性疾患であり、主要因の一つにう蝕病原菌が形成したバイオフィルム中でのう蝕病原菌の活発な酸産生活動によるものであると認知されている。すなわち、う蝕前段階であるバイオフィルム形成を除去する事或いは、菌の活動性を抑制する事により、効率良い予防且つ治療が期待できる。そこで本研究では、オゾン添加アルカリ電解水 (AW-OZ) のバイオフィルム主要素であるグルカンに対する溶解能、並びに高濃度次亜塩素酸電解水 (HC10; PerfectPerio、野口歯科医学研究所、日本) のう蝕病原菌に対する影響に関して検討した。

方法) バイオフィルム剥離性の評価;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た。試料上部から、*Streptococcus mutans* MT8148 株 (*S. mutans*)懸濁液、1%スクロース含有 Heart infusion、リン酸緩衝液を連続的に 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 pH の異なる水道水=TW 7.0、アルカリ電解水=AW (TK7705、松下電器、日本) 10.67、オゾン水=TW-OZ 3.79、AW-OZ (HealOzone、Kavo、ドイツ) 8.54 に浸漬し、振動を加えた。その後、剥離したグルカン量をフェノール硫酸法にて測定した。**う蝕病原菌に与える影響;**う蝕病原菌 3 菌種を培養し、上記溶液及び HC10 内に常温にて浸漬した。その後、LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes、Invitrogen detection technologies、アメリカ)を用いて染色し、蛍光顕微鏡下にて観察を行った。さらに *S. mutans* 表層タンパク質に与える影響に関して、二次元電気泳動 (2-DE) を用いてタンパク解析を行った。

結果) AW-OZ 群は、AW、TW 及び TW-OZ 群と比較し、有意にグルカンを溶解した ($p < 0.05$)。バクライト染色による生死判定では、HC10 群に関して、う蝕病原菌 3 菌種に 10 秒の適用で、全試料において死滅が認められた。AW-OZ 群に関してはコントロール群と比較し、死菌数が多く見られた ($p < 0.05$)。タンパク解析では、2-DE ゲル上のスポット数を比較した場合、AW-OZ 群のスポット数は TW-OZ 群と比較し多く認められた。また画像解析により、Glucan binding protein と推定されるタンパク質や他タンパク質に関して、AW-OZ 群は、TW-OZ 群と比較しタンパク濃度が高い事が示された。

結論) 本研究において、AW-OZ はグルカンを溶解し、HC10 は殺菌作用が強い事がわかった。従って、機能水の口腔内への使用は、その機能や安全性を十分に考慮した上で、効果的にカリエスコントロールを行う必要がある。

本研究は東京医科歯科大学大学院 21 世紀 COE プログラム歯と骨の分子破壊と再構築のフロンティアにより遂行された。