歯周病原菌に対するアクア酸化水の殺菌効果

荻原和孝* 鈴木安里 加藤千穂美 三上正人
宮丸昌久 斎藤和子

Bactericidal Effect of Aqua Oxidizing Water Against Periodontopathic Bacteria

Kazutaka Ogiwara* Anri Suzuki Chihomi Kato Masato Mikami
Masahisa Miyamaru and Kazuko Saito

There are many types of equipment of making acidic electrolyzed water from tap water. We utilized one of them : OXILYZER which is made by Miura Electric Co., Akita, Japan. Aqua oxidized water (AOW) is acidic water with a pH under 2.7 and is processed by electrolysis through a small NaCl mediated specific membrane. It has over 1,100 mV of oxi-redx potential and includes Cl_2 , $\text{OH} \cdot$, O_3 , ClO .

This acidic water has a strong bactericidal effect to bacteria and virus but there are few reports concerning its bactericidal activity to periodontopathic bacteria. We investigated the bactericidal effect of AOW to periodontopathic bacteria, two strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), two strains of *Porphyromonas gingivalis* (Pg) and a strain of *Fusobacterium nucleatum* (Fn). *Staphylococcus aureus* (Sa) 209 P, *Escherichia coli* (Ec) B and *Salmonella enteritidis* (Se) SER were used for comparison of the bactericidal activity of AOW to periodontopathic bacteria.

AOW was obtained from an OXILYZER and stored in a polyethylene bottle and kept in a dark cold place totally blocked from light.

Bacterial strain Aa : Y4 and ATCC 29522, Pg : 381 and ATCC 33277, Fn : ATCC 23726 were grown at 37°C in BHI (5% CO_2), BHI contained hemin, menadion and yeast extract (anaerobic condition), and GAM broth (anaerobic condition), respectively. After washing by centrifugation, each bacteria was suspended in PBS and adjusted to the optical density of 0.3 at 540 nm light length with 0.1% gelatin containing Hanks' balanced salt solution (GHBSS).

Serum and saliva were obtained from volunteers of healthy student. Saliva was sterilized through a millipore filter with a 0.45 μm pore size.

Bactericidal activity was performed by colony count seeding and grown on BHI or Anaero columbia blood agar or GAM medium after treatment with AOW.

The following results were obtained :

1. Bactericidal effect and effective concentration of AOW

Periodontopathic bacteria were AOW sensitive and were killed in one minute, from the original 25% AOW, while it needed more time and a higher concentration to kill Ec, Sa and Se.

日本歯科大学新潟歯学部口腔微生物学教室

* 日本歯科大学歯学部歯周病学教室

2. The effect of serum and saliva on bactericidal activity of AOW.

To Aa and Pg, the addition of serum or saliva in a concentration of 1% of AOW had the effect of bactericidal activity. However, the bactericidal activity was completely lost by the addition of 10% serum in AOW. To Fn, the bactericidal effect was lost in only 1% of serum or 10% salivary addition.

3. Stability of bactericidal activity of AOW.

AOW was kept in a polyethylene bottle at 4°C with shading from light. The bactericidal activity was examined by withdrawing AOW from the shielded bottle weekly. The activity was well preserved until 5 months. After 21 weeks, a slight decrease of bactericidal activity was observed in 25% AOW.

4. Cause of decrease of bactericidal activity by addition of 10% serum to AOW.

The addition of serum to AOW caused a decrease of oxi-red potential from 1144.8 to 479.0. pH from 2.52 to 5.60, and HClO from 19.4 ppm to undetectable.

In conclusion, AOW is a useful disinfectant of periodontopathic bacteria *in vitro*. The oral environment is very complex. We must pay careful attention not only to the decrease of bactericidal activity of AOW by salivary flow and bleeding, but also the effect of AOW on the mucosa.

唾液・血清の添加による殺菌への影響を調べた。

緒 言

近年、食塩水を利用し隔膜を介して電気分解することで陽極側に得られる強電解水が、抗細菌・抗ウイルス効果を示すことが報告され¹⁾、歯科領域においてもその応用が期待されている。

また、アクア酸化水 (AOW) は OXILYSER (三浦電子社製) から生成される強酸性水で、pH は 2.7 以下、酸化還元電位は、1,100 mV 以上の高いポテンシャルを有し、Cl₂, OH・, O₃, ClO などが含まれており、これらが殺菌力を発揮するのに関与すると考えられる。

現在まで、医科・歯科領域において AOW の細菌、ウイルス、真菌に対する殺菌効果が検討され、その殺菌効果のあることやプラーク抑制効果が報告されている²⁻¹⁰⁾。しかし歯周病原菌に関する殺菌の報告は見られない。

そこで本実験では、AOW の歯周病原菌に対する殺菌力を検討し、口腔内環境下で、その殺菌力が保持されるかをあきらかにする目的で *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* を対照として、歯周病原菌 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* への AOW の殺菌効果について検討を加え、さらに

材料と方法

1. AOW の使用条件

実験に使用した AOW は、調整直後の酸化還元電位 1,100 mV 以上、pH 2.5 付近のものでヨウ化カリウム澱粉紙が青紫色に変色することを確認してから実験に供した。

殺菌力の持続性を検討するため、同条件の AOW をポリ容器に採取後、遮光密封して 4°C にて保存した。

2. 使用菌株

歯周病原菌として *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (以下 Aa と略す) Y 4 株, ATCC 29522 株, *Porphyromonas gingivalis* (以下 Pg と略す) 381 株, ATCC 33277 株, *Fusobacterium nucleatum* (以下 Fn と略す) ATCC 23726 株, 対照細菌群として *Staphylococcus aureus* (以下 Sa と略す) 209 P 株, *Escherichia coli* (以下 Ec と略す) B 株, *Salmonella enteritidis* (以下 Se と略す) SER 株の 6 菌種, 8 菌株を使用した。

3. 菌の培養方法とその調製法

Aa 群は, BHI 液体培地 (BBL. Co., USA) を用い, 5% CO₂, 95% Air の炭酸ガス培養器 (トキワ, 東京) 中で 37°C, 24 時間培養を行った。Pg 群は, 1% hemin (Sigma Co., USA), 0.02% menadione (半井化学, 東京), 5% Yeast (Difco, USA) 含有 BHI 液体培地を, Fn は GAM ブイヨン培地 (ニッスイ, 東京) をそれぞれ用い, AnaeroPack・ケンキ® (三菱ガス化学, 東京) を利用した嫌気条件下で 37°C, 24 時間培養を行った。Sa, Se, Ec は, BHI 液体培地を用い, 好気条件下で 37°C, 24 時間培養を行った。

培養後, 10,000×g, 10 分間遠心して集菌し, phosphate buffered saline (PBS) にて洗浄後, 0.1% gelatin (Difco) 含有 Hank's balanced salt solution (GHBS) にて希釈し, 分光光度計 Spectronic 20 型 (島津製作所, 京都) を用い, 540 nm の波長における optical density (O.D.) 0.3 の菌懸濁液を調製した。

4. 血清および唾液の調製

使用血清は, 臨床的に健康と思われるボランティア男子学生から末梢血を採取し, 室温にて凝血させた後, 遠心上清を採取した。唾液は, 全唾液採取後, 10,000×g, 5 分間遠心分離した後の上清を, ポア・サイズ 0.45 μm のメンブラン・フィルターにてろ過滅菌したものを使用した。

5. AOW の殺菌効果と希釈による影響

反応液組成は, 実験群として AOW 原液および最終濃度 50, 25% AOW 希釈液のそれぞれ 0.9 ml に, O.D. 0.3 に調製した菌懸濁液 0.1 ml を加え全量を 1 ml とした。対照には, 生理食塩水を使用した。反応は室温で行い, 反応開始 1, 5, 10 分後の反応液 20 μl を採り増菌に使用した培地で連続 10 倍希釈後, 寒天平板 Spot 法にて生菌数を求めた。寒天平板培地上に各希釈菌液を 10 μl 滴下, 前述培養条件で 2~4 日間培養後, 得られたコロニー数を基に colony forming unit/ml (生菌数) に換算し, 生理食塩液中の対照生菌数と比較して判定した。

Aa 群, Sa, Ec, Se は 1.5% 寒天 (BBL. Co.) 含

有 BHI 寒天平板培地を, Pg 群が Anaero コロンビア寒天平板培地 (BBL. Co.), Fn には GAM 寒天平板培地 (ニッスイ) をそれぞれ用いた。

6. AOW の殺菌効果への血清および唾液の添加による影響

AOW 原液の反応液に, 実験群として 1% ないしは 10% 相当量の血清または唾液を添加して生菌数の変化を測定し, Aa 群, Pg 群, Fn に対する AOW の殺菌効果への影響を生菌数にて検討した。

7. AOW の殺菌力の持続性について

Aa Y 4 株を用い, 前述した条件で保存した AOW の殺菌効果と希釈による影響を, 調製直後, 8 週間後, 15 週間後, 21 週間後と経時的に検討した。

8. AOW の性質について

1) ラジカルの変化について

各条件下での AOW 中に含有されているラジカルを, ルミノール依存性ケミルミネッセンス反応 (CL 反応) を用い測定した。

AOW の各条件の反応液 0.6 ml に luminol solution (フタバ・メディカル東京) 0.05 ml を加え, ただちに Lumiphotometer TD 4000 (フタバ・メディカル) にて 37°C, 1 秒間隔で経時的に測定した。

2) pH および酸化還元電位の変化について

各条件下での AOW の pH と酸化還元電位を, 複合電極を使用し Φ34pH メーター (Beckman, 東京) により測定した。

3) AOW の HClO 量について

各条件下での AOW の HClO 量を, ヨウ素—デンプン法¹¹⁾により, NaOCl による検量線に対比させて求めた。

結 果

1. AOW の殺菌効果と希釈による影響

1) 対照細菌群に対する AOW の殺菌効果と希釈による影響 (表 1)。

AOW 原液では, Sa と Ec を1分以内に生残菌 10^8 から 10^3 以下へと著しく減少させた。しかし, Se に対しては, 生残菌 10^3 以下に減少させるのに1分以上5分以内の時間を必要とした。

また AOW 50%希釈液では, Ec と Se に対し AOW 原液と同様の傾向を示したが, Sa では10分後でも 10^6 個の菌が生残し, 抵抗のあることを示した。さらに AOW 25%希釈液において, Ec は1分で 10^3 個に減少したが以後10分経過後もそれ以上の減少を示さなかった。Sa と Se ではほとんどの菌が10分後でも生残していた。

2) 歯周病原菌に対する AOW の殺菌効果と希釈による影響 (表2)

AOW 原液では, Aa 群, Pg 群, Fn の3菌種とも生残菌が1分以内に 10^8 から 10^3 以下にと著しい減少を認め, さらに AOW 25%希釈液でも Aa 群と Pg 群, Fn で, 1分以内に生残菌が 10^3 以下と著しい減少を示した。

2. AOW の殺菌効果への血清および唾液の影響 (表3)

1) AOW の殺菌効果への血清添加の影響

血清1%の添加では, Aa 29522 株や Pg 群を1分以内に生残菌 10^8 から 10^3 以下に減少させた

が, Aa Y4 株には生残菌 10^3 以下の減少を得るのに1分以上5分間の時間を必要とした。また, Fn に対しては血清1%の添加により10分後でも 10^6 個の菌が生残した。

さらに, 血清10%の添加では, 3菌種とも生残菌の減少を認めなかった。

2) AOW の殺菌効果への唾液添加の影響

唾液10%添加により, Aa 群や Pg 群に対しては1分以内に生残菌が 10^3 以下と著しい減少を示したが, Fn では10分後でも 10^5 個の菌が生残していた。

3. AOW の殺菌力の持続性 (表4)

ポリ容器に採取後, 遮光密封して4℃で保存した AOW について, Aa Y4 を用いて調製直後から経時的に21週後までの殺菌力を検討した。その結果, 21週後でも調製直後と同様, AOW 原液および50%希釈液では1分以内に生残菌が 10^3 個以下となる著しい減少が認められた。しかし, 21週後 AOW 25%希釈液では生残菌が 10^3 以下に減少するには1分以上5分以内の時間を必要とした。

4. 各条件下での AOW の性質

1) CL 反応ラジカルの変化 (図1)

表1 *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* に対する AOW の殺菌効果と希釈による影響

細菌の種類	AOW 濃度	生残菌数 (個)			
		0 min	1 min	5 min	10 min
<i>S. aureus</i> (Sa)	生理食塩液		2.0×10^8	1.9×10^8	2.2×10^8
	AOW (原液)	2.0×10^8	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (50%)		1.8×10^8	1.1×10^8	1.9×10^6
	AOW (25%)		1.7×10^8	1.1×10^8	2.0×10^8
<i>E. coli</i> (Ec)	生理食塩液		8.0×10^7	8.0×10^7	8.0×10^7
	AOW (原液)	8.0×10^7	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (50%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (25%)		4.0×10^3	1.2×10^3	1.0×10^3
<i>S. enteritidis</i> (Se)	生理食塩液		2.0×10^8	1.9×10^8	2.2×10^8
	AOW (原液)	1.9×10^8	9.0×10^5	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (50%)		1.0×10^7	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (25%)		1.0×10^8	9.0×10^7	8.4×10^7

くり返し2回実験を行い, その平均値を示した。以下の表も同様。

表 2 歯周病原菌に対する AOW の殺菌効果と希釈による影響

細菌の種類	AOW 濃度	生 残 菌 数 (個)			
		0 min	1 min	5 min	10 min
<i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4 (Aa)	生理食塩液		5.0×10^8	4.9×10^8	4.4×10^8
	AOW (原液)	5.0×10^8	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (50%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (25%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
<i>A. actinomycetemcomitans</i> 29522 (Aa)	生理食塩液		4.6×10^8	4.6×10^8	4.7×10^8
	AOW (原液)	4.6×10^8	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (50%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (25%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
<i>P. gingivalis</i> 381 (Pg)	生理食塩液		3.4×10^8	3.4×10^8	3.3×10^8
	AOW (原液)	3.5×10^8	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (50%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (25%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
<i>P. gingivalis</i> 33277 (Pg)	生理食塩液		2.9×10^8	2.9×10^8	2.8×10^8
	AOW (原液)	3.0×10^8	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (50%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (25%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
<i>F. nucleatum</i> 23726 (Fn)	生理食塩液		3.1×10^8	3.1×10^8	3.1×10^8
	AOW (原液)	3.1×10^8	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (50%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	AOW (25%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$

図 1 AOW に含有されているラジカルについて
くり返し 2 回実験を行い、その平均値を示した

AOW 原液および AOW 50%希釈液, 25%希釈液は, AOW 濃度依存的に CL 反応性のラジカルを検出することができた。しかし, 10%血清や 10%唾液を添加することによって CL 反応は消失しラジカルの減少することを示した。

2) pH, 酸化還元電位, HClO 量の変化 (表 5)

AOW の pH (AOW 原液; pH2.5) は, AOW 25%希釈液で pH 6.92 となり, 希釈とともに中性に近づく傾向を示した。また, AOW 原液における 1%血清および 10%唾液の添加では pH の変化は少なかったが, 10%血清の添加では pH 5.60 と中性に近づく傾向を示した。

AOW の酸化還元電位 (AOW 原液; 1144.8 mV) は, 25%希釈でも 1000.6 mV の値を示した。さらに, AOW 原液において 1%血清および 10%唾液を添加しても 1,070 mV 付近の値を示した

表3 歯周病原菌への AOW 100%の殺菌効果における血清および唾液の添加による影響

細菌の種類	血清および唾液濃度	生 残 菌 数 (個)			
		0 min	1 min	5 min	10 min
<i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4 (Aa)	生理食塩液	5.0×10^8	5.0×10^8	4.9×10^8	4.4×10^8
	血清 (1%)		2.8×10^4	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	血清 (10%)		4.5×10^8	4.8×10^8	4.1×10^8
	唾液 (10%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
<i>A. actinomycetemcomitans</i> 29522 (Aa)	生理食塩液	4.6×10^8	4.6×10^8	4.6×10^8	4.7×10^8
	血清 (1%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	血清 (10%)		2.9×10^8	2.4×10^8	2.2×10^8
	唾液 (10%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
<i>P. gingivalis</i> 381 (Pg)	生理食塩液	3.5×10^8	3.4×10^8	3.4×10^8	3.3×10^8
	血清 (1%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	血清 (10%)		2.7×10^8	1.9×10^8	2.3×10^8
	唾液 (10%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
<i>P. gingivalis</i> 33277 (Pg)	生理食塩液	3.0×10^8	2.9×10^8	2.9×10^8	2.8×10^8
	血清 (1%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
	血清 (10%)		2.4×10^8	1.9×10^8	2.4×10^8
	唾液 (10%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
<i>F. nucleatum</i> 23726 (Fn)	生理食塩液	3.1×10^8	3.1×10^8	3.1×10^8	3.1×10^8
	血清 (1%)		5.4×10^7	1.0×10^7	1.4×10^6
	血清 (10%)		3.3×10^8	2.4×10^8	9.0×10^7
	唾液 (10%)		6.6×10^5	2.4×10^5	1.2×10^5

が、10%血清の添加では 479.0 mV と低下した。AOW の HClO 量 (AOW 原液; 19.4 ppm) は、AOW 25%希釈でも 4.5 ppm 含まれていた。さらに、AOW 原液における 10%唾液の添加で 6.0 ppm、1%血清の添加で 0.7 ppm 含まれていたが、10%血清の添加では検出できなかった。

考 察

口腔内は数多くの細菌が生息し、細菌学的検索から、いくつかのグラム陰性嫌気性桿菌 (総括して歯周病原菌) による感染が歯肉炎・歯周炎の発症および進行に関与していると考えられている¹²⁾。またメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染症や HIV、血清肝炎などの院内感染も問題となっている¹³⁾。

一方、数年前から食塩水の電気分解により得られる強酸性水が、広範囲の微生物に対して殺菌効果を示すことが示され^{2~10)}、日常臨床への応用が期待されている。

本実験では、歯周疾患に対する応用へのアプローチとして、Sa, Ec, Se を対照細菌群として歯周病原菌群 Aa, Pg, Fn に対する AOW の殺菌力を検討し、さらに口腔内でもその殺菌力が保持されるかをあきらかにする目的で、血清や唾液添加における殺菌効果への影響も検討した。

AOW 原液は、Sa, Ec, Aa 群、Pg 群、Fn の生残菌を 1 分以内に 10^8 から 10^3 以下と著しく減少させ、強力な殺菌効果を示した。Se も 1 分以上 5 分以内に生残菌が 10^8 から 10^6 付近となり、比較的效果が認められた。

また、AOW を希釈すると、歯周病原菌群の Aa

表 4 AOW の殺菌力の経時的変化

AOW 保存日数・濃度	生 残 菌 数 (個)			
	0 min	1 min	5 min	10 min
生理食塩液		5.0×10^8	4.9×10^8	4.4×10^8
AOW (調製直後; 原液)	5.0×10^8	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
AOW (調製直後; 50%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
AOW (調製直後; 25%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
生理食塩液		4.8×10^8	4.8×10^8	5.0×10^8
AOW (調製 8 週後; 原液)	4.8×10^8	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
AOW (調製 8 週後; 50%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
AOW (調製 8 週後; 25%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
生理食塩液		5.0×10^8	4.9×10^8	5.1×10^8
AOW (調製 15 週後; 原液)	5.1×10^8	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
AOW (調製 15 週後; 50%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
AOW (調製 15 週後; 25%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
生理食塩液		5.0×10^8	5.0×10^8	5.0×10^8
AOW (調製 21 週後; 原液)	5.0×10^8	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
AOW (調製 21 週後; 50%)		$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$
AOW (調製 21 週後; 25%)		1.0×10^4	$1.0 \times 10^3 \downarrow$	$1.0 \times 10^3 \downarrow$

表 5 各条件下での AOW の性質への検討

使用条件	pH	酸化還元電位 (+mV)	HClO 量 (ppm)
生理食塩水	7.13	467.5	検出できず
AOW (原液)	2.52	1144.8	19.4
AOW (50%)	6.50	1014.4	12.7
AOW (25%)	6.92	1006.6	4.5
AOW (原液) + 1% 血清	2.61	1072.3	0.7
AOW (原液) + 10% 血清	5.60	479.0	検出できず
AOW (原液) + 10% 唾液	2.71	1070.4	6.0

群, Pg 群, Fn に対しては AOW 25% 希釈液でも強力な殺菌効果を示し, これらの菌は比較的殺菌されやすいことがわかった。一方, 対照細菌群の Sa, Se に対しては, AOW を 25% に希釈するとほとんど殺菌効果が失われ, Ec に対しても殺菌力が低下したので, AOW の歯周病原菌群に対する殺菌は, 今回用いた対照細菌群に対してより大きく作用することが分かった。

この結果から, 日常臨床においては歯周病の予

防または治療に AOW 原液の使用が効果的であることが示唆された。

AOW 原液に血清 1% や唾液 10% を添加したところ, Pg 群に対して添加前と同様の傾向を示し, 強力な殺菌効果にも影響しなかった。Aa 群への強力な殺菌効果にも影響は少なかったが, Y4 株では血清 1% 添加で 1 分後 10^4 の菌が生残しており, 株差による若干の違いも認められた。しかし, Fn に対しては血清 1% や唾液 10% の添加に

よって10分後でも 10^5 以上の菌が生残し、殺菌効果の減少が見られた。また、血清10%の添加では、3菌種とも生残菌の減少をほとんど認めず、AOWの殺菌作用は消失した。

強電解水の殺菌効果に唾液蛋白質などの有機物の存在が影響を及ぼす報告^{6,9)}もあり、血清や唾液の蛋白質濃度が高くなるに従い殺菌効果が消失する本実験でも同様のことが考えられた。さらに血清や唾液を添加した際、Aa群、Pg群に比べFnが殺菌効果に抵抗性を示したことは、菌種や菌株の表層構造の違いによるほか、血清や多形核白血球の殺菌作用に抵抗性を示すことにも関連すると推察された。

In vitro ながらこれらの結果から、日常臨床において、AOWは歯周疾患などの口腔内疾患の予防・治療への応用の可能性を示した。しかし、大量に血液の存在する部位での使用には殺菌力低下の点で注意が必要であると考えられた。

次に、AOWの殺菌力の持続性について検討した結果、4°Cで遮光ポリ容器保存したAOWは、21週後でも調製直後のAOWと同様の殺菌力を認めた。AOWの保存状況の違いによる酸化還元電位と溶存塩素濃度の経時的関係を測定し、4°C、遮光密封容器保存では38日後でも安定である⁷⁾ことも報告されており、4°C、遮光密封容器保存であれば21週後でもかなり殺菌効果を保つことができると思われた。

また、本実験で行った各条件のAOWのラジカルをCL反応にて測定した結果、AOW中のラジカルはAOW濃度に依存していった。しかし、血清や唾液を添加するとこの反応は1秒以内にほとんど消失してしまい、ラジカルの組織傷害性を考えると、添加直後の消失は口腔内使用の際の安全性に関連すると思われるが、今後、口腔内組織への傷害性の検討も必要であると考えられた。

以上の結果と各条件のAOWの性質を比較して検討すると、AOW25%希釈液ではpHが中性に近づくにもかかわらず殺菌効果を示したことから、低いpHが直接的に殺菌効果を示すことは否定できた。また、1%血清もしくは10%唾液の添加によってCL反応がほぼ完全に消失したことは、ラジカルも殺菌効果の主体にならないと考え

られた。

HClO量は10%血清の添加ではほとんど検出できなかったのに対し、1%血清の添加において0.7ppm検出された。また酸化還元電位は殺菌効果に比例した結果となった。酸化還元電位や溶存塩素ガス濃度は平衡状態にあることを考えるとおそらく酸化還元電位や、HClO、溶存塩素ガスが安定した殺菌効果に関与すると考えられた。

ま と め

AOWの歯周病原菌に対する殺菌効果を検討し、また口腔内環境における効果をあきらかにする目的で実験を行い、以下の結論を得た。

1. AOWの殺菌効果は、Sa、Ec、Seと比較して歯周病原菌(Aa、Pg、Fn)で効果が大きいことが分かった。さらにその殺菌効果は瞬時に起こると考えられた。

2. AOWの殺菌効果への血清の影響は、血清1%の添加でAa群およびPg群に対する殺菌効果への影響がほとんどなかったのに比べ、Fnに対しては著しい殺菌効果の減少が認められた。また、血清10%の添加で、いずれの菌に対しても殺菌力は完全に消滅した。したがって、AOWは血液が存在する部位での歯周病予防または治療を目的とした使用には不向き、もしくは頻繁な洗浄を必要とすると考えられた。

3. AOWの殺菌効果への唾液の影響は、Aa群およびPg群では唾液10%の添加で殺菌効果に影響がなく、口腔内における歯周病巣局所の消毒には有効であろうと考えられた。しかし、Fnに対しては殺菌効果の低下を認めたことから、口腔内使用の際には考慮が必要であると思われた。

4. 4°C、遮断密封したポリ容器中での保存によるアクア酸化水の殺菌力は、21週、約5カ月以上経過しても持続した。

5. 安定した殺菌効果を示す因子として、酸化還元電位やHClOの関与が示唆された。

以上の結果から、AOWが歯周疾患など口腔内疾患の予防・治療に有効である可能性が示された。

稿を終えるにあたり、器械をご供与下さいました東

京歯材社, 三浦電子株式会社ならびに日本歯科大学強酸性水研究グループをとりまとめていただきました日本歯科大学歯周病学教室鴨井久一教授に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 清水義信, 古沢利武: 電解による酸化電位水の殺ウイルス, 殺細菌および殺真菌の作用. 歯科ジャーナル, 36: 1055-1060, 1992.
- 2) 岩沢篤郎, 中村良子, 岡田 淳, 水野徳次: アクア酸化水の抗ウイルス効果. 臨床と微生物, 20: 231-236, 1993.
- 3) 岩沢篤郎, 中村良子: アクア酸化水の抗微生物効果. エンテロウイルス・抗酸菌・真菌に対する作用. 臨床と微生物, 20: 469-473, 1993.
- 4) 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. 日環誌, 8: 11-16, 1993.
- 5) 岩沢篤郎, 中村良子, 中村國衛, 村井哲也: アクア酸化水の殺菌効果に対する検討. 薬理と臨床, 3: 1555-1562, 1993.
- 6) 酒井敏博, 芝 燁彦, 万代倫嗣, 中根文誉, 飯沼浩之, 迎 和彦, 三浦頴剛, 池田益夫, 芝 紀代子, 水野徳次: OXILYZER による電解水の歯科領域への応用 第一報 使用条件について. 補綴誌, 37: 920-927, 1993.
- 7) 芝 燁彦, 酒井敏博, 塚崎弘明, 尾関雅彦, 中根浩之, 鈴木哲史, 加瀬智夏, 三浦頴剛, 小花照雄, 飯沼浩之: 電解水の歯科領域への応用. 歯界展望, 84: 931-941, 1994.
- 8) 西田哲也, 辻 康男, 菅井健二, 音琴淳一, 古沼直人, 鈴木邦治, 村井正大: アクア酸化水のプラーク形成抑制効果. 日歯周誌, 35: 692-697, 1994.
- 9) 浅井昭士郎, 山村正次, 野田充宏, 高瀬市将, 平田健一, 滝 永一, 南 晋介, 青野正男, 磯貝昌彦, 並河 勇: 酸化電位水による殺菌効果と変異原性の検討. 歯基礎誌, 37: 152-161, 1995.
- 10) 奥田禮一, 笹崎弘巳, 兼平正史, 岡部太一, 阿部 敏, 田上 篤, 岩松洋子, 宮 豊, 清水義信: 形態変化から見た酸化電位水の殺菌効果. 日歯保誌, 37: 755-765, 1994.
- 11) 日本化学会編: 実験化学講座 15 分析. 丸善(東京) 229, 1991.
- 12) Page, R. C. and Schroeder, H.F.: Periodontitis in man and other animals. Karber, basel.: 239-346, 1982.
- 13) 浅利誠志, 妙中信之: MRSA の教訓と今後の院内感染防止対策 院内感染防止の立場から見た適切な消毒剤の使用法. 最新医学, 49: 1009-1014, 1994.

別刷請求先: 荻原和孝

日本歯科大学歯学部歯周病学教室