原 著

新しく開発された超還元性水の各種細菌に対する 殺菌効果と細胞毒性について

葛 城 啓 彰 大 竹 美 嶺 子 倉 沢 郁 男
鈴 木 安 里 斎 藤 和 子

日本歯科大学新潟歯学部口腔微生物学教室（主任：斎藤和子教授）

〔受付：平成 12 年 9 月 6 日，受理：平成 12 年 11 月 28 日〕

Bactericidal Effect against Several Genera of Bacteria and Cytotoxicity of Newly Developed Super Reductive Water

Hiroaki Katsuragi, Mineko Ohtake, Ikuo Kurasawa, Anri Suzuki and Kazuko Saito

Department of Oral Microbiology, Nippon Dental University, School of Dentistry at Niigata
(Chief : Prof. Kazuko Saito)

1-8, Hamaura-cho, Niigata 951-8580, Japan

〔Received on September 6, 2000 ; Accepted on November 28, 2000〕

Key words : super reductive water / bactericidal effect / cytotoxicity / alamar blue assay

Abstract : The purpose of this study was to investigate the bactericidal effect against several genera of bacteria and fungi of the newly developed super reductive water (SRW) and its cytotoxicity. SRW has -310 mV oxidation reduction potential when the pH is 12.0. We used 14 strains of 11 genera of bacteria and 1 strain of fungi. Each genus of bacteria (initial concentration of 10^8 cells/ml) was incubated with SRW for one and ten min. at room temperature. Then the survival rate was determined by colony formation. For the genus *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, and *P. gingivalis*, the number of cells that survived less than 10^2 cells/ml, but for the genus *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *E. faecalis*, *L. acidophilus*, *B. subtilis* and *C. albicans*, cell survival was more than 10^6 cells/ml. The bactericidal activity against *E. coli* was not reduced in the presence of serum or thiourea. The cytotoxicity of SRW was tested by alamar blue assay with L 929 cell lines established from subcutaneous tissue in C 3 H mice. The cytotoxicity (LD 50) of SRW determined by alamar blue assay was 33 w/w%. These results suggested that newly developed SRW has an excellent bactericidal effect against only gram-negative bacteria and lower cytotoxicity, and that the application of SRW is restricted to the disinfection of gram-negative bacteria.

抄録：超還元性水の各種細菌（11 属 14 種）および真菌に対する殺菌効果と細胞毒性について検討した。超還元性水は，グラム陰性菌である *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, および *P. gingivalis* に対しては優れた殺菌効果を示したが，グラム陽性菌，真菌，細菌芽胞には有効な殺菌効果を示さなかった。また，このグラム陰性菌に対する殺菌効果は血清添加および OH ラジカル消去剤の添加で抑制されな

かった。一方、細胞毒性は、LD 50 値が 33 w/w% であり、他の汎用される消毒剤に比べ毒性は軽度であった。これらの結果より、超還元性水は有効菌種と使用範囲を適確に選択すれば消毒剤として有用であると考えられる。

緒 言

近年、MRSA や VRE などの抗生物質耐性菌が出現し、特に院内感染における大きな問題となっている。従来までの消毒剤では、消毒効果と環境汚染という二律背反に縛られて十分な対応ができていなかったのが現状である。そのような背景を元に、食塩水を電気分解して得られる強酸性電解水が開発された。強酸性電解水は、スペクトルの広い殺菌効果を有し、抗生物質のように耐性菌の出現を招来する恐れが少ないことから、消毒剤としての臨床応用が期待された¹⁻⁵⁾。しかし、強酸性電解水の本体は次亜塩素酸であること^{1,2)}が結論づけられ、その細胞毒性⁶⁾や腐蝕性ならびに電解水作製中に発生する塩素ガスの毒性などにより、消毒剤としての応用はかなり限定されているのが現状である。

本実験で使用した超還元性水は、その強酸性水の対極に位置するような性格を有している。具体的には、低濃度重炭酸ナトリウム溶液を電気分解して生成されるものであり、pH 12.0、酸化還元電位が -310 mV、フリーラ

ジカル量 8.8×10^2 rlu の性質を有しており、当初はアルカリ性洗淨剤というコンセプトで開発されたものである。

さらに、この超還元性水中に含まれるフリーラジカル (OH ラジカル) が、殺菌効果を発揮するものと期待され、今回の実験を行い各種細菌ならびに真菌に対する殺菌効果と細胞毒性について検討したので報告する。

材料および方法

1. 超還元性水の作成

超還元性水 (東京、特許出願; 平 10-24631) は、日本電子により供与されたものを用いた。この超還元性水は、pH/COND Meter D-24 (堀場製作所, 東京), カニスター ACTpH メーター D-13 (堀場製作所, 東京), ルミホトメーター TD-4000 (Labo Science Co., 東京) により測定し、pH 12.0 ± 0.4 , 酸化還元電位 -310 mV, フリーラジカル量 8.8×10^2 rlu であった。また、フリーラジカル の主要な活性酸素種はスピントラップ法により OH ラジカルであることを確認した (Fig. 1)。

Fig. 1 Detection of superoxide anion from super reductive water (SRW) using a Electron Spin Resonance Spectrometer.

Power : 4 mW, ModWid : 0.1 mT, C. Field : 336.500 mT, Amp : 100,
SwWid < $\pm$ > : 5 mT, TimeC : 0.1 sec, SwTime : 1 min, mT : milli Tesla.

Table 1 List of microorganisms for the experiments**Bacteria**

(Gram-positive)

Staphylococcus aureus 209 P (*S. aureus*)
Staphylococcus epidermidis No. 1 (*S. epidermidis*)
Streptococcus mutans MT 6 R (*S. mutans*)
Streptococcus salivarius HHT (*S. salivarius*)
Streptococcus sanguis HA 34 (*S. sanguis*)
Enterococcus faecalis 10541 (*E. faecalis*)
Lactobacillus acidophilus ATCC 356 (*L. acidophilus*)
Actinomyces viscosus NIAH 1010 (*A. viscosus*)
Bacillus subtilis (TESPER-G, Eiken, Tokyo) (*B. subtilis*)

(Gram-negative)

Escherichia coli B (*E. coli*)
Pseudomonas aeruginosa (clinical isolate) (*P. aeruginosa*)
Actinobacillus actinomycetemcomitans Y 4 (*A. actinomycetemcomitans*)
Fusobacterium nucleatum ATCC 25586 (*F. nucleatum*)
Porphyromonas gingivalis FDC 381 (*P. gingivalis*)

Fungi

Candida albicans YU-1200 (*C. albicans*)

2. 使用菌株

本実験に使用した細菌は Table 1 に示す 11 属 14 種 (グラム陽性菌 9 種, グラム陰性菌 5 種) である。また, 口腔内常在真菌の代表真菌として, *Candida albicans* (*C. albicans*) を用いた。

3. 菌の培養および調整方法

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*), *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) および *C. albicans* は, ブレーンハートインフュージョン培地 (ニッスイ, 東京) を用いて 37°C, 24 時間フラン器中で培養した。

Actinomyces viscosus (*A. viscosus*) および *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) は, ブレーンハートインフュージョン培地を用いて 37°C, 24 時間炭酸ガス培養器中 (5%CO₂, 95%air) で培養した。*Fusobacterium nu-*

cleatum (*F. nucleatum*) は, GAM ブイヨン培地 (ニッスイ, 東京) を用い, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は, 1%ヘミン (Sigma Co., St. Louis, MO), 0.02%ビタミン K (Sigma Co., St. Louis, MO) および 5%イーストエキストラクト (Sigma Co., St. Louis, MO) 含有ブレーンハートインフュージョン培地を用いて 37°C, 24 時間嫌気培養器中 (10%CO₂, 10%H₂, 80%N₂) で培養した。おのおのの増殖した菌体は, 生理食塩液で 2 回洗浄後, 分光光度計 Spectronic 20 (島津, 東京) にて optical density 0.3 (540 nm) に調整し菌数を 10⁸⁻⁹ 個/ml になるよう調整し以下の実験に用いた。*Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) については, 芽胞に対する殺菌効果を調べる目的で, *B. subtilis* 芽胞を滅菌ペーパーに 10⁶ 個付着させ, 器具器材の滅菌が確実にされているか否かを試験するためのインディケーターとして汎用されている滅菌 TESPER-G (栄研, 東京) を用いて殺菌試験を行った。

4. 超還元性水の殺菌試験

殺菌試験における試験液の割合は, 超還元性水 9.9 ml に対し, 菌液 0.1 ml を加え全量を 10.0 ml (超還元性水: 菌液=100:1) とした⁴⁾。対照には超還元性水の代わりに生理食塩液 9.9 ml を用いた。上記試験液は室温で混合し, 混合開始後 1, 10 分後に試験液より 1.0 ml を採取し連続段階希釈法を行い, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *E. faecalis*, *L. acidophilus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* は, ブレーンハートインフュージョン寒天培地で, *C. albicans* はサブロー寒天平板培地 (ニッスイ, 東京) で 37°C, 24 時間フラン器中で培養した。*A. viscosus* および *A. actinomycetemcomitans* は, ブレーンハートインフュージョン寒天培地を用いて 37°C, 48 時間炭酸ガス培養器中 (5%CO₂, 95% Air) で培養した。また, *F. nucleatum* は GAM 寒天平板培地 (ニッスイ, 東京) を用い, *P. gingivalis* は 1%ヘミン, 0.02%ビタミン K および 5%イーストエキストラクト含有血液寒天平板培地を用いて 37°C, 96 時間嫌気培養器中 (10%CO₂, 10%H₂, 80%N₂) で培養した。

これらの各菌について培養終了後にコロニー数を計測し, 生菌数 (CFU/ml) に換算した。

B. subtilis に関しては, 超還元性水 10.0 ml 中に滅菌 TESPER-G を浸漬し 1, 10, 30, 60 分室温でインキュベートした後, ブレーンハートインフュージョン培地に滅菌 TESPER-G を移し替えて 37°C, 24 時間フラン器中で培養し, 培養液表層の菌膜形成による増殖の有無で判定した。

5. 電子顕微鏡による観察

超還元性水による *E. coli* の殺菌試験終了後に、試験液の一部を採取し、グルタルアルデヒド-オスミウム酸二重固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、エタノール系列で脱水、エポン包埋し超薄切片を作成し、酢酸ウラン-クエン酸鉛で二重染色した。これらの試料を透過型電子顕微鏡 JEM-1200 EX（日本電子、東京）にて観察した。

6. 超還元性水の *E. coli* 殺菌効果に与える血清およびチオウレアの影響

1) 血清が殺菌効果に及ぼす影響

仔牛胎児血清（大日本製薬、東京）を 10% になるよう超還元性水に添加し、この 10% 血清添加超還元性水 9.9 ml に対し、*E. coli* 菌液 0.1 ml を加え全量を 10.0 ml とし室温で混合し、混合開始後 1 分および 10 分後に試験液より 1.0 ml を採取し連続段階希釈法を行いプレーンハートインフュージョン寒天培地で、37°C、24 時間フラン器中で培養し、培養終了後にコロニー数を計測し生菌数 (CFU/ml) に換算した。

2) チオウレア (OH ラジカル阻害剤) が殺菌効果に及ぼす影響

チオウレア（和光純薬、東京）を超還元性水に 0.01, 0.1, 1.0 M 濃度となるよう添加し、このチオウレア含有超還元性水 9.9 ml に対し、菌液 (*E. coli*) 0.1 ml を加え全量を 10.0 ml とし室温で混合し、混合開始後 1 分および 10 分後に試験液より 1.0 ml を採取し連続段階希釈法を行い、プレーンハートインフュージョン寒天培地で、37°C、24 時間フラン器中で培養した。培養終了後出現したコロニー数を計測し、生菌数 (CFU/ml) に換算した。

また、超還元性水中の活性酸素が、血清およびチオウレア添加によりどのように変化するかをルミホトメーター TD-4000 にて、ルミノール依存ケミルミネッセンス法にて検討した。

7. 細胞毒性試験

1) 使用細胞

マウス皮下由来 L 929 細胞⁷⁾ (ATCC CCL-1) を 10% FBS-MEM (大日本製薬、東京) にて 37°C、炭酸ガス培養器中 (5%CO₂, 95%Air) で継代培養し、サブコンフルエントの状態の実験に供した。

2) 細胞毒性試験

アラマーブルー法による細胞毒性試験⁸⁾は、96 ウェルマイクロプレートに、L 929 細胞を 5×10³個/ウェル (大日本製薬、東京) 分注し 24 時間、37°C、炭酸ガス培養器

Table 2 Bactericidal effect of SRW against gram-positive bacteria

strain	condition	time (min)	CFU*/ml
<i>S. aureus</i>	saline		1.0×10 ⁸
	SRW	1	3.0×10 ⁷
		10	2.0×10 ⁶
<i>S. epidermidis</i>	saline		1.0×10 ⁸
	SRW	1	2.0×10 ⁷
		10	1.0×10 ⁷
<i>S. mutans</i>	saline		1.0×10 ⁸
	SRW	1	3.2×10 ⁶
		10	3.5×10 ⁵
<i>S. salivarius</i>	saline		6.0×10 ⁸
	SRW	1	5.0×10 ⁷
		10	1.0×10 ⁷
<i>S. sanguis</i>	saline		1.0×10 ⁸
	SRW	1	5.0×10 ⁷
		10	1.0×10 ⁷
<i>E. faecalis</i>	saline		1.0×10 ⁸
	SRW	1	1.5×10 ⁷
		10	1.2×10 ⁷
<i>L. acidophilus</i>	saline		1.0×10 ⁸
	SRW	1	8.0×10 ⁶
		10	5.0×10 ⁶
<i>A. viscosus</i>	saline		5.5×10 ⁸
	SRW	1	1.0×10 ⁷
		10	6.0×10 ⁶

* : Colony forming unit, data shows the mean of 2 replicates

中 (5%CO₂, 95%air) で培養後、MEM にて希釈した超還元性水 (1~75%) 100 μl を各ウェルに分注しさらに、24 時間、37°C、炭酸ガス培養器中 (5%CO₂, 95%air) で培養した。培養終了後アラマーブルー (大日本製薬、東京) を 10%w/w 濃度に添加し 4 時間、37°C、炭酸ガス培養器中 (5%CO₂, 95%air) でインキュベートし、Fluoroskan Ascent FL (大日本製薬、東京) にて 540 nm-590 nm の 2 波長蛍光測定を行い、細胞生存率を計測した。

結 果

1. 各種細菌および真菌に対する超還元性水の殺菌効果

Table 2 に、グラム陽性菌に対する殺菌効果を示す。グ

Table 3 Bactericidal effect of SRW against gram-negative bacteria

strain	condition	time (min)	CFU*/ml
<i>E. coli</i>	saline		1.0×10^8
	SRW	1	1.0×10^3
		10	<100
<i>P. aeruginosa</i>	saline		1.0×10^8
	SRW	1	<100
		10	<100
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	saline		2.0×10^9
	SRW	1	<100
		10	<100
<i>P. gingivalis</i>	saline		6.0×10^8
	SRW	1	<100
		10	<100
<i>F. nucleatum</i>	saline		1.0×10^8
	SRW	1	<100
		10	<100

*: Colony forming unit, data shows the mean of 2 replicates

ラム陽性菌に対しては、超還元性水を1分間作用させただけではほとんど殺菌効果が認められず、10分間作用させることにより菌数が10分の1から100分の1まで減少したにとどまった。Table 3にグラム陰性菌に対する殺菌効果を示す。

E. coli に対しては、超還元性水を1分間作用させると菌数が1万分の1、10分間作用させると 10^2 個/ml以下に減少した。また、*P. aeruginosa* *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* に対しては超還元性水を1分間作用させただけで菌数が 10^2 個/ml以下に減少した。

一方、真菌である *C. albicans* に対しては、超還元性水は10分間作用させても菌数の減少は100分の1程度にとどまり、グラム陽性菌に対する殺菌効果とほぼ同様であった。また、*B. subtilis* 芽胞に対しては、超還元性水を60分間作用させても殺菌効果は認められなかった (Table 4)。

Fig. 2に、*E. coli* を生理食塩水で10分間処理したコントロール群 (Fig. 2-A) および *E. coli* を超還元性水で10分間処理した群 (Fig. 2-B) の電子顕微鏡像を示す。グラム陰性菌である *E. coli* では、細胞外膜が不整形となり断裂している状態が観察された。

Table 4 Bactericidal effect of SRW against *C. albicans* and *B. subtilis*

strain	condition	time	CFU* ¹
<i>C. albicans</i>	saline		1.0×10^8
	SRW	1	1.0×10^7
		10	1.0×10^5
strain	condition	time	growth
<i>B. subtilis</i>	saline		+* ²
	SRW	1	+
		10	+
		30	+
		60	+

*¹: Colony forming unit, data shows the mean of 2 replicates

*²: Formation of bacterial pellicle in the cortical layer of BHI broth

2. 超還元性水の殺菌効果に与える血清およびチオウレアの影響

Fig. 3に示すとおり、超還元性水の殺菌効果は10%血清添加において、*E. coli* に対する殺菌効果は、作用時間1、10分とも10分の1程度に減少した。

また、チオウレアの添加では、チオウレア濃度0.1–1.0 Mの範囲で *E. coli* に対する超還元性水の殺菌効果はまったく影響を受けなかった。

また Fig. 4に示すとおり、超還元性水中の1.0 mM Fe^{2+} 刺激による活性酸素産生は、10%血清添加および0.01 M チオウレア添加で著しく抑制された。

3. 超還元性水の細胞毒性について

Fig. 5に、アラマーブルー法による超還元性水を作用させた L 929 細胞の細胞生存曲線を示す。細胞内酵素活性は、70%超還元性水処理群で $0.2 \pm 1.5\%$ 、50%超還元性水処理群で $5.0 \pm 15.0\%$ 、30%超還元性水処理群で $65.0 \pm 5.0\%$ 、20%超還元性水処理群で $90.0 \pm 3.0\%$ 、10%超還元性水処理群で 98.0 ± 5.0 を示し、その生存率曲線から LD 50 値は33 w/w%を示した。

この超還元性水の LD 50 値をほかの消毒剤の LD 50 値と比較した結果を、Table 5に示す。われわれが比較検討した消毒剤⁹⁾のなかで、この超還元性水の細胞毒性はアクリノールに次いで低い値を示した。

Fig. 2 Transmission electronmicrographs of SRW-treated *E. coli*.

A : *E. coli* were treated with physiological saline for 10 min (control), magnification $\times 25,000$, bar : 200 nm.
 B : *E. coli* were treated with SRW for 10 min, magnification $\times 20,000$, bar : 200 nm, arrow : damaged cell membrane.

考 察

近年、低濃度食塩水を電気分解して得られる強酸性水 (pH 2.7 前後, 酸化還元電位 1,100 mV) が話題になった¹⁻⁵⁾が、その本体が次亜塩素酸であり、高い殺菌効果を示すものの、細胞毒性や腐蝕性ならびに電解水作製中に発生する塩素ガスの毒性などの種々の問題が指摘され、有効に活用するには難しい状況にあると考えられている。

本実験で使用した超還元性水は、その強酸性水の対極に位置するような性格を有しており、当初はアルカリ性洗浄剤というコンセプトで開発されたもので、超還元性水中に含まれる OH ラジカルが、殺菌効果を発揮するものと予測された。

しかし今回の実験結果から、超還元性水はグラム陰性菌に対しては優れた殺菌効果を示すが、グラム陽性菌に対してはほとんど殺菌効果を示さないことが確認された。

今回われわれが使用した超還元性水は、pH 12.0、酸化還元電位が -310 mV という性質を有しており、一般に、医療用として普及しているアルカリ性電解水⁹⁾ (pH 9-10、酸化還元電位 -150 — -200 mV) と比べ pH、酸化還元電位の点で異なっている。一般に微生物が増殖する環境は pH 4.0—8.0、酸化還元電位は 800 — 400 mV であり、特殊な好アルカリ性細菌でさえ pH 9.0 前後であることを考えると、pH 12.0 という条件は微生物の生育条件からみて生存不可能な条件である。しかし本実験では、グラム陰性桿菌は 1 分間の作用で殺菌されること、およびグラム陽性菌は 10 分間作用させてもほとんど殺菌効果を認めないことから、殺菌効果の主体は単に pH に依存するとは考えられない。また、酸化還元電位の観点からみると、本実験で用いた *P. gingivalis*, *F. nucleatum* は -300 mV 前後の酸化還元電位で増殖する嫌気性菌であるにもかかわらず、超還元性水で殺菌されていることから、超還元性水の殺菌効果が酸化還元電位によるものであるという考えも否定される。

さらに、超還元性水中のフリーラジカルを消去しても、

Fig. 3 The influence of serum or thiourea on bactericidal activity of SRW.

A : 1 min, B : 10 min

□ : control (philological saline), ▨ : SRW only, □ : SRW containing with 1.0 M thiourea, ▨ : SRW containing with 0.1 M thiourea, ■ : SRW containing with 10% fetal calf serum.

E. coli に対する殺菌効果が持続することから、本実験で使用した超還元性水の殺菌効果は、OH ラジカルに依存するものでもないことが明らかである。

本実験で使用した超還元性水は、先にも述べたように pH 12.0, 酸化還元電位 -300 mV という性質を有するために、その溶液中に大量のマイナスイオンを保有していると考えられる。このマイナスイオンと酸化還元電位が、分子間引力現象および剥離現象促進効果を生み出し、迅速かつ強力な洗浄効果¹⁰⁾を生み出していると考えられる。

それゆえ、微生物に対する殺菌効果の主体にも、この剥離作用と洗浄効果が大きく働いているものと考えられる。超還元性水を作用させた *E. coli* において細胞外膜および細胞壁に断裂像が認められるのは、その考えを支持するものと考えられる。

一方、グラム陽性菌に対して本実験で使用した超還元

Fig. 4 The influence of serum or thiourea on Fe^{2+} dependent superoxide production from SRW.

○ : SRW only, ▲ : SRW containing with 0.01 M thiourea, ■ : SRW containing with 10% fetal calf serum.

Reaction mixture was composition of 0.49 ml SRW and 0.10 ml luminol and stimulated with 0.01 ml Fe^{2+} (1.0 mM).

性水が殺菌効果を示さないのは、グラム陽性菌の細胞壁は厚いペプチドグリカン層から構成されているために、超還元性水の剥離洗浄効果が及ばないためだと考えられる。

この超還元性水のグラム陰性菌に対する高い殺菌効果は、細菌性食中毒（病原性大腸菌、サルモネラなど）や水系伝染病の原因菌の多くがグラム陰性菌であることを考えると、これらの細菌の殺菌に有効に活用できる可能性を示唆している。また、院内感染においても緑膿菌やセラチア菌、レジオネラ菌などのグラム陰性菌が原因になっている場合には、殺菌効果のある洗浄剤として有効に活用できる可能性を示唆している。さらに、口腔内の感染症について考えてみると、歯周炎の原因である歯周病原性細菌、すなわち今回の実験でも使用した *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* はいずれもグラム陰性桿菌であり、これらの歯周病原性細菌に超還元性水が高い殺菌効果を示すことから、小川ら¹¹⁾も述べているように歯周治療へ応用できる可能性があると考えられる。

また、細胞毒性の面では、アクリノールには及ばないにしても、強酸性水はもちろん、3.0%過酸化水素水よりも低い毒性しか示さないことは、生体への適応を考えるうえでは有用である。また、強酸性水と異なり塩素ガスの発生や溶液中の残留塩素による変異原性^{12,13)}の発現や、環境を汚染する心配がないこともこの超還元性水の

Fig. 5 Alamar blue assay for cell survival and proliferation.

A : Linearity of the alamar blue assay. L 929 cells (1×10^3 — 1×10^4 cells/well) were plated in 0.1 ml/ 10% FBS-MEM.

Alamar blue was added immediately to all wells, and plates were incubated at 37°C for 4 hours, developed and measured. Each point shows the mean and standard deviation of 3 replicates. *RFU : relative fluorescent unit.

B : Cell survival curve of L 929 cells treated with SRW. Each point shows the mean and standard deviation of 3 replicates.

Table 5 A comparison of cytotoxicity in cultured cells among disinfectants

Disinfectant	LD 50 (W/W%)
Acrinol (0.1%)	65
SRW	33
3.0% H ₂ O ₂	30
Electrical Oxidized Water	25
Ethanol (70%)	25
Crezol (1.0%)	15
Benzalkonium chloride (0.025%)	15
Chlorhexidine (0.05%)	5

大きな利点である。それゆえ、歯周治療に応用する際にもポケット内への局所洗浄が可能と考えられる。

従来、消毒剤が開発されるにあたり、できうる限りすべての微生物に有効かつ強力な殺菌力をもつものが優れているという考え方が一般的であった。しかし、グルタルアルデヒド、ホルマリン、次亜塩素酸ナトリウムなどは、強力な殺菌力をもつ反面、その乱用は環境汚染^{14,15)}や化学物質過敏症^{16,17)}などの不快事項を引き起こすことが知られている。

今後、ますます生活を取り巻く環境が複雑かつ多様化していくことを考えれば、現在の高水準、中水準、低水準という大まかな枠組みだけでなく、原因微生物個々に対応できる、感受性に優れ、環境汚染や細胞毒性の少ない消毒剤の開発と使用を検討すべきだと考えられる。

結 論

1. 超還元性水はグラム陰性菌には優れた殺菌効果を示すが、グラム陽性菌、真菌、細菌芽胞には有効な殺菌効果を示さない。

2. 超還元性水の主要な活性酸素種はOHラジカルであるが、殺菌効果にはOHラジカルより界面活性効果に関与している。

本論文の要旨の一部は、第41回歯科基礎医学会学術大会(平成11年9月)において発表した。

本研究の一部は、日本歯科大学新潟歯学部先端研究センターの施設を利用して行われた。

文 献

- 1) 葛城啓彰, 斎藤和子: 新しく開発された電解酸化水の各種細菌に対する殺菌効果の検討. 歯学 **86**: 72-78, 1998.
- 2) 斎藤和子, 葛城啓彰, 鈴木安里: 強酸性電解水の腸管出血性大腸菌 O157:H7 に対する殺菌効果. 歯学 **85**: 507-508, 1997.
- 3) 岩沢篤郎: アクア酸化水の抗微生物効果. 臨床検査 **37**: 918-919, 1993.
- 4) 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 **372**: 1055-1059, 1993.
- 5) 甲田雅一, 佐藤喜春, 原口義座, 星野正巳, 松崎広子: 機能水 (強酸性水) の消毒効果. 薬理と治療 **23**: 75-79, 1995.
- 6) 葛城啓彰, 鈴木安里, 長曾一成, 岡村勝文, 斎藤和子: 強酸性電解水の細胞毒性について. 歯基礎誌 **38**: 57-64, 1996.
- 7) 大野忠夫: L 株. 組織培養 **6**: 85-91, 1980.
- 8) Springer, J. E., Azbill, R. D. and Carlson, S. L.: A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue. Brain Res. Protoc. **2**: 259-263, 1998.
- 9) 田代博一, 北洞哲治: アルカリイオン水と胃腸症状. 治療 **81**: 132-134, 1999.
- 10) 藤崎順子, 桂 俊司, 鳥居 明, 鈴木博昭: 内視鏡の洗浄・消毒における各種電解水の有用性と問題点. 消化器内視鏡 **12**: 569-572, 2000.
- 11) 小川智久, 中村治彦, 原田博之, 鴨井久博, 仲谷 博, 鴨井久一: 歯周病原菌に対する弱アルカリ性電解水の殺菌効果. 歯薬療法 **17**: 81-85, 1998.
- 12) Onodera, S., Muratani, T., Igarashi, K., Fukuda, A. and Suzuki, S.: Chemical change of organic compounds in chlorinated water XVII. Production of mutagens in reaction of naphtarene compounds with hypochlorite in aqueous solution. EISEI KAGAKU **36**: 201-210, 1990.
- 13) 中村清一, 鶴川昌弘, 飯塚勝美, 酒井映男, 金 善浩, 森本兼翼: 塩素処理されたアミノ酸の変異原性について. 大阪府立公衛研所報 労働衛生編 **30**: 13-18, 1992.
- 14) 安藤正幸: 地球環境の現状とその保全 環境汚染とアレルギー. 臨床検査 **43**: 1231-1236, 1999.
- 15) 早福正孝: 居住環境での化学物質汚染. 臨床検査 **43**: 1398-1405, 1999.
- 16) 宮田幹夫: 化学物質過敏症. 総合臨床 **48**: 2510-2511, 1999.
- 17) 市邊義章: 微量薬物と過敏反応 (化学物質過敏症). あたらしい眼科 **17**: 43-47, 2000.