

# Electrolyzed Waters with Different Hypochlorite Concentrations in Controlling Cariogenic Biofilms

A. OKADA<sup>1,2</sup>, K. MATIN<sup>1</sup>, N. HANADA<sup>2</sup>, and J. TAGAMI<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Tokyo Medical and Dental University, Japan, <sup>2</sup>National Institute of Public Health, Japan, <sup>3</sup>COE Program, FRMDRTB at TMDU, Japan

## う蝕予防に効果を及ぼす次亜塩素酸電解水の有効塩素濃度

岡田彩子<sup>1,2</sup>、マティン カイルール<sup>1</sup>、花田信弘<sup>2</sup>、田上順次<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> 東京医科歯科大学大学院う蝕制御学分野、<sup>2</sup> 国立保健医療科学院口腔保健部、<sup>3</sup> 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

**Objective:** This study was designed to evaluate the efficacy of electrolyzed waters containing different hypochlorite (HClO) concentration levels on cariogenic biofilm controlling activities. **Methods:** Electrolyzed hypochlorite water (PerfectPerio water; PPW, Noguchi Dental Medical Research Institute, Tochigi, Japan), PPW was diluted; x10 (10-PPW), x100 (100-PPW) and x1000 (1000-PPW). In addition, electrolyzed low acid water (ELW; pH5.5) and electrolyzed strong acid water (ESW; pH2.5) were produced by a water electrolysis device (TK7705, National, Japan). Milli-Q water (MW) was included as controls. Pellets of the cariogenic bacteria were prepared from fresh cultures and resuspended in the above waters and incubated for 10 sec at room temperature. Viability of the bacteria was assessed by staining with BacLight bacterial viability kit followed by fluorescence microscopy and counting colony forming units (CFU/ml). To investigate effects on biofilms, sucrose dependent artificial biofilms were grown on equal-sized bovine enamel coupons using three species of freshly cultured cariogenic bacteria (*Streptococcus mutans* MT8148, *Streptococcus sobrinus* 6715 and *Streptococcus gordonii* ATCC10558) at 37°C for 12 hrs in an oral biofilm reactor. After a rinse in PBS the coupons were inoculated in above waters followed by shaking and measurements of retained and detached biofilms. Water insoluble glucan (WIG) of the biofilms were measured by using Phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method. **Results:** BacLight viability test showed that almost all bacteria were killed by original PPW (HClO = 600ppm). One way ANOVA and Tukey's HSD indicated significant reductions in the CFU counts down until 10-PPW dilution compared to other waters (p<0.05). In addition, a considerably larger amount of biofilms was detached (dissolved WIG) by the original concentration of PPW compared to ELW or ESW. **Conclusion:** PPW have proven to be a potential bactericide and it also dissolves WIG up to a considerable amount. Therefore, it is suggested that appropriate use of PPW would definitely be beneficial and careful application is important for safe caries control. More investigations are in progress in this regard. This study was supported by COE Program, FRMDRTB at TMDU and Noguchi Dental Medical Research Institute, Tochigi, Japan.

目的：う蝕予防可能な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10倍希釈(10-PPW)、100倍希釈(100-PPW)及び1000倍希釈(1000-PPW)した。これに加えて、弱酸性電解水(Electrolyzed low acid water:ELW; pH5.5)及び強酸性電解水(Electrolyzed strong acid water ESW; pH2.5)は、電解水装置(TK7705、松下電器、日本)を用いて生成した。Milli-Q waterはコントロール群とした。う蝕病原菌を培養後、リン酸緩衝液(PBS)中で再懸濁し、その後遠心操作を行い、上澄みを除去した後の菌塊を各溶液に浸漬した。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、蛍光顕微鏡観察及びCFUを行った。さらに、バイオフィームに対する影響を調べるために、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、三種のう蝕病原菌(*Streptococcus mutans* MT8148, *Streptococcus sobrinus* 6715 and *Streptococcus gordonii* ATCC10558)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、人工バイオフィームを形成した。その後、試料は各溶液に浸漬し、振動を加え、残存及び剥離したバイオフィームを測定した。

結果：BacLight染色による蛍光顕微鏡観察の結果、PPW(HClO = 600ppm)群においては、全ての菌において死滅が認められ、10-PPW群においても生菌数は、僅かであった。CFUの結果においては、One way ANOVA 及び Tukey's HSD にて統計処理を行った結果、PPW 群及び10-PPW 群は他の群と比較し、有意にコロニー数が少なかった( $p < 0.05$ )。バイオフィームに関しては、有効塩素濃度が高くなるに従って、バイオフィームの剥離量が大きくなる傾向がみられた。

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及び野口歯科医学研究所の補助を受けて遂行された。