

In vitro カンジダバイオフィームに対する電解次亜水の効果*In Vitro* Efficacy of Electrolyzed Dilute Sodium Hypochlorite Solution on *Candidal* Biofilm

柏原 稔也¹⁾, 米山 武義²⁾, 中道 敦子³⁾, 本田 剛¹⁾
東岡紗知江¹⁾, 後藤 崇晴¹⁾, 永尾 寛¹⁾, 市川 哲雄¹⁾

Toshiya Kashiwabara¹⁾, Takeyoshi Yoneyama²⁾, Atsuko Nakamichi³⁾, Tsuyoshi Honda¹⁾
Sachie Toko¹⁾, Takaharu Goto¹⁾, Kan Nagao¹⁾ and Tetsuo Ichikawa¹⁾

抄録：口腔ケアは、要介護高齢者などの誤嚥性肺炎の予防など易感染性宿主に対する感染症予防において、医療現場で高く認知されている。効果的な口腔ケアをするにあたって適切な洗浄剤や清掃材料が求められる。本研究は、強力な殺菌効果が期待される電解次亜水に着目し、そのカンジダバイオフィームに対する洗浄効果の評価法を用いて、その有効性と可能性について検討した。

試験液として、強アルカリ性電解水、弱酸性電解水、電解次亜水、2種類の市販の洗口液、滅菌蒸留水、計6種類を用いた。カンジダバイオフィームを形成させた被着試料を用いて、各試験液の抗バイオフィーム効果およびバイオフィーム浸漬前後の有効塩素濃度の変化を検討した。歯科用金属に対する腐食性を検討するために、スチールバー、歯科用コバルトクロム合金、金銀パラジウム合金、計3種類の歯科用金属を用いて、試験液浸漬前後のpHの変化を測定した。また、試料表面の肉眼観察も行った。

電解次亜水は高いカンジダバイオフィーム殺菌・洗浄効果を認め、安定した有効塩素濃度が確保されたものの、金属腐食作用は強いことが示唆された。

キーワード：電解次亜水、タンパク分解型、機能水、カンジダバイオフィーム、口腔ケア

緒 言

口腔ケアは、米山らの報告¹⁾以来、要介護高齢者などの誤嚥性肺炎の予防など易感染性宿主に対する感染症予防において、医療現場で高く認知されている。効果的な口腔ケア法についてはさまざまな方法が提案され、また、これに関連して多くの口腔ケア製品が提供されている^{2,3)}。口腔ケアには機械的清掃と化学的清掃があり、より安全でより効果的な消

毒剤の選択、開発が進められている。その中で、強酸性電解水などの機能水は、日本機能水学会で「人為的な処理によって再現性のある有用な機能を獲得した水溶液の中で、処理と機能に関して科学的根拠が明らかにされたもの、及び明らかにされようとしているもの」と定義され⁴⁾、一般的に殺菌などの生物学的効果を有すると同時に、ほかの消毒剤に比べて生体安全性が高く、安価であることを特徴としている。そのため医療現場はもとより、食品衛生、農業など幅広い分野に利用されている^{5~7)}。歯科領域においては、酒井ら⁸⁾が1990年に電解水の有用性を提案して以来、“パーフェクトペリオ”のような歯内歯周治療領域、口腔洗浄、義歯洗浄などのさまざまな領域への応用の研究が進められてきた^{9~14)}。われわれは義歯に付着するデンチャープラークを対象とした研究において、*in vitro* で形成させたカンジダバイオフィームを用いて、デンチャープラーク

¹⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔顎顔面補綴学分野

²⁾米山歯科クリニック

³⁾神戸常盤大学短期大学部口腔保健学科

¹⁾Department of Oral and Maxillofacial Prosthodontics, The University of Tokushima, Institute of Health Biosciences

²⁾Yoneyama Dental Clinic

³⁾Faculty of Oral Health, The University of Kobe Tokiwa

表1 使用した試験液

試験液 (略号)	生成器・提供 【主な成分】	pH	有効塩素 濃度
強アルカリ性電解水 (EA)	強電解水生成器 スーパーオキシードラボ (葵エンジニアリング, 静岡)	11.0	0 ppm
弱酸性電解水 (AC)	弱酸性電解水生成器アクエス (モリタ, 東京)	5.0	30 ppm
電解次亜水 (Poic)	POIC® 研究会(東京)	8.5	115 ppm
市販洗口液1 ピュオーラ(PY)	花王(東京) 【塩化セチルピリジニウム, トリクロサン, エリスリトール】	—	—
市販洗口液2 ネオステリングリーン (NG)	日本歯科薬品(山口) 【0.2% 塩化ベンゼトニウム】	—	—
滅菌蒸留水 (DW)	—	—	—

コントロールに対する電解機能水の有効性を示した¹⁵⁾。

本研究は, そのカンジダバイオフィームに対する殺菌・洗浄効果の評価法を用いて, 口腔ケア用に应用可能な種々の洗浄剤, 特に強力な殺菌効果が期待される電解次亜水に着目し, その有効性と可能性について検討した。また, 臨床的に問題となる歯科用金属材料に対する影響についても検討した。

研究方法

1. 使用した試験液

本研究で使用した口腔ケア用の洗浄剤を想定した試験液は表1のとおりである。つまり, 強電解水生成器スーパーオキシードラボ (葵エンジニアリング, 静岡) で生成した強アルカリ性電解水 (EA と略す), 弱酸性電解水生成器アクエス (モリタ, 東京) で生成した弱酸性電解水 (AC と略す), NPO 法人 POIC® 研究会より供与された電解次亜水 POIC® water ホームケア用タンパク分解型除菌水 (Poic と略す, POIC® 研究会, 東京), 市販の洗口液としてピュオーラ (PY と略す, 花王, 東京) と, ネオステリングリーンうがい液0.2% (NG と略す, 日本歯科薬品, 山口) を用いた。コントロールとして滅菌蒸留水 (DW と略す) を用いた。

2. *in vitro* カンジダバイオフィームの作製

カンジダバイオフィームを形成する被着試料としてセルタイト C-1 セルデスク LF (住友ベークライト, 東京) を用いた。カンジダバイオフィームの作製は, Li ら¹⁶⁾の方法に準じ, 被着試料を 24 well-平底プレートの底面に置き, 各被着試料上に 1.0 ml 当たり 10 μ g を含むムチンを 200 μ l ずつ加え, 75 rpm で 37°C, 2 時間振盪培養させた。次に, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 500 μ l で 2 回洗浄後, YNB 培地 (Yeast Nitrogen Base, Difco, Detroit, MI, USA) にグルコース 100 mmol/l と N-アセチルグルコサミン 2.5 mol/l を加えた溶液 950 μ l に, 1.0 ml 当たり 2.0×10^7 CFU に調製した義歯より分離した臨床分離株 *Candida albicans* CAD1 菌液を 50 μ l 加えた菌液 1.0 ml を加え, 75 rpm で 37°C, 90 分間振盪培養させた。次に, PBS500 μ l で 2 回洗浄後, 被着試料上に YNB 培地にグルコースと N-アセチルグルコサミンを加えた溶液を 1.0 ml 加え 37°C, 75 rpm, 48 時間振盪培養し, 被着試料上にカンジダバイオフィームを形成させた (図1)。

3. 抗バイオフィーム効果の検討

カンジダバイオフィームを形成させた試料をピンセットで保持し, 約 4 Hz の間隔で PBS 洗浄液 15 ml 中に 5 秒間振盪後, その試験液中に静置, 5 分

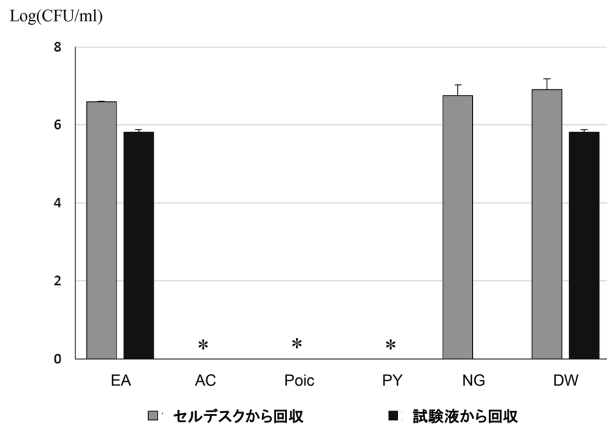


図3 セルデスクおよび試験液から回収したカンジダ菌数 (*検出限界以下)

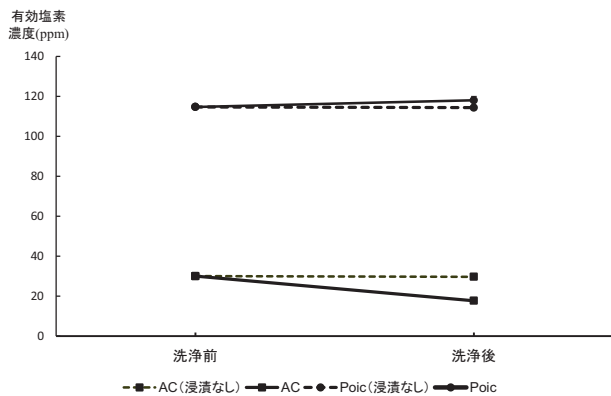


図4 バイオフィーム浸漬前後の試験液の有効塩素濃度

残存していた生菌数を図3に示す。AC, Poic, PYのいずれの生菌数も検出限界以下であった。EAとNGはコントロールのDWよりわずかに減少したものの、殺菌・洗浄効果は認められなかった。試験液に残存していた生菌数も、AC, Poic, PYのいずれも検出限界以下であった。EAはコントロールのDWと同じであったが、NGはセルデスクと違い試験液の生菌数は検出限界以下であった。

図4にバイオフィーム浸漬前後の試験液の有効塩素濃度を示す。最初に30 ppmの有効塩素濃度をもつACは、セルデスク浸漬後17 ppmになり、40%以上減少した。一方、Poicは洗浄後も、最初の有効塩素濃度を維持あるいはわずかながら増加した。

図5に金属浸漬前後の試験液のpHを示す。セルデスクの浸漬によってpHは減少したものの、金属の浸漬では変化しないか若干増加した。

図6に試験液浸漬後の金属表面写真を示す。Poicに浸漬した試料はACに比べて著しい腐食が観察さ

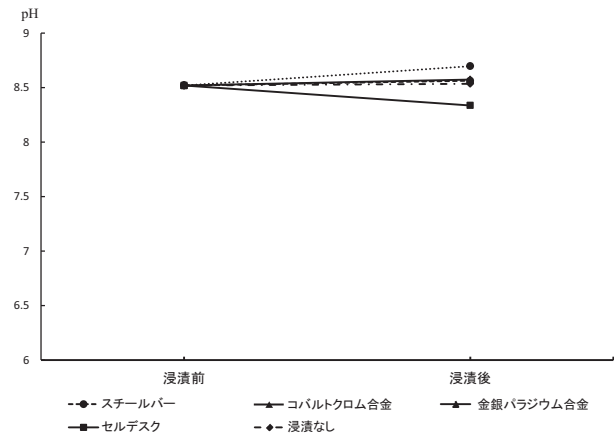


図5 金属浸漬前後の試験液のpH

れ、特にスチールバーは顕著であった。

考 察

近年、感染症は、バイオフィームという概念が常識になり、それぞれの微生物にとって実験室での培養とは違った状態の集団を形成しているとされている。これは、微生物が菌体外多糖体である glyco-calyxなどを産出し、さらに、異種微生物と共凝集したり、フィブリンなどを取り込んだりして、より強固な集団を形成しているものである^{17,18)}。バイオフィームは、難治性あるいは慢性感染症の原因として注目され、尿路感染症、細菌性心内膜炎や生体材料の周囲の感染症などが知られている。口腔衛生が十分に行き届かない要介護高齢者におけるデンタルプラーク、デンチャープラークもこのバイオフィームであり、このようなバイオフィームに対して使用された殺菌薬は、バイオフィーム表層の菌のみに作用し、深部に存在する菌に対してはほとんど効果がないとされている¹⁹⁾。そこで、口腔および補綴装置で使用する殺菌洗浄剤の場合、バイオフィームを念頭に置いて効果判定をしなければならない。また、カンジダは口腔カンジダ症として高齢者の口腔内でしばしば見られ、特に義歯の床下粘膜でよく観察される。カンジダ自体はそれほど病原性が強いものではないが、日和見感染、深在性カンジダ症、または他の病原性の高い微生物と共凝集することで問題視される。われわれは、長年カンジダのバイオフィームを作製し、今回のような電解次亜水などの機能水の効果判定に用いてきた。

電解機能水の殺菌作用については、低いpHと高

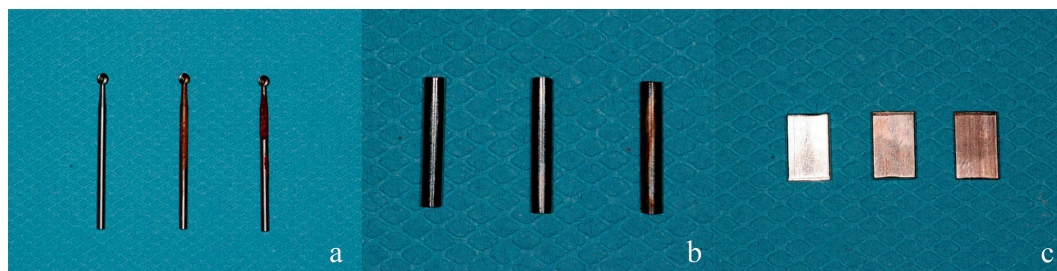


図6 各試験液浸漬後の金属表面写真
 a : スチールバー, b : コバルトクロム合金, c : 金銀パラジウム合金。各写真とも左から DW 浸漬, AC 浸漬, Poic 浸漬

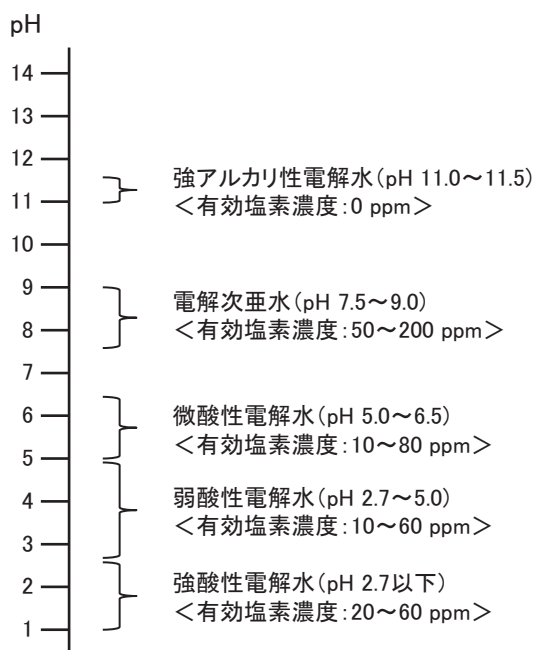


図7 電解機能水の分類 (財団法人機能水研究振興財団ホームページ http://www.fwf.or.jp/pdf/top_shingi.pdf, 文献14,20から作図)

い還元電位によるものとされていたが、現在、その機序としては電解水中に含まれる次亜塩素酸および、次亜塩素酸イオンが主体であるという考えが主流となっている²⁰⁾。そのため、pHにこだわらず、次亜塩素酸および次亜塩素酸イオンが高い状態に保たれる弱酸性域から弱アルカリ性域のpH値に設定された電解水が登場してきた。現在、これらの次亜塩素酸等による効果を期待する電解機能水は、pH、次亜塩素酸率により分類される。財団法人機能水研究振興財団で示されている電解機能水の分類を図7に示す^{14,20)}。今回使用したPOIC[®] waterのような機能水は、100 ppm以上の有効塩素濃度とpH7程度で電解次亜水に分類されるものである。一方、ア

クエスで生成されるものは、有効塩素濃度30 ppm、pH5で弱酸性電解水に分類される。強アルカリ電解水は有効塩素濃度0 ppmでpH11にあるものである。

強アルカリ性電解水以外の機能水とピュオーラに浸漬した試料ではセルデスク、試験液とも生菌が全く観察されず、カンジダバイオフィームに対する強い殺菌効果を示した。強アルカリ性電解水は、わずかながらセルデスクからの洗浄作用が認められたものの、試験液からは生菌が観察され、バイオフィームを洗い流す作用のみを有していることが推察された。ネオステリングリーンに浸漬した試料では、セルデスクからは生菌が観察されたが、洗浄液からは観察されなかった。つまり、バイオフィームを形成しているものに対する洗浄効果は不十分であることが示された。

バイオフィーム浸漬前後の有効塩素濃度の変化については、弱酸性電解水の有効塩素濃度は低下したが、電解次亜水の有効塩素濃度は高くなる傾向を示した。次亜塩素酸(HClO)は次亜塩素酸イオン(ClO⁻)より強力な殺菌効果を示し、HClOの遊離が一番高くなる弱酸性に溶液のpHを設定するものが弱酸性電解水である。一方、POIC[®] waterは、溶液のpHをアルカリ性の領域にさせ、タンパク溶解作用も期待しながら殺菌効果をもつものと理解される。さらに、残留塩素としては500 ppmとされ、有機成分と接触してpHが低下してもHClOの比率が高くなり、有効塩素濃度としては逆に高くなったと考えられる。

一方ピュオーラには、口腔でよく用いられる消毒剤、塩化セチルピリジニウム(CPC)とトリクロサン(TC)と糖アルコールのエリスリトールが配合

され、エリスリトールが微生物間に浸透し、バイオフィームを拡散させる効果に殺菌剤が効果的に作用するものである²¹⁾。塩化ベンゼトニウム配合のネオステリングリーンは、殺菌剤の効果はピュオーラと大差はないと考えられるが、バイオフィームの拡散効果をもたないためバイオフィーム表面上のカンジダのみ殺菌剤が作用していることが考えられる。

機能水の特徴として、浸漬による金属への腐食作用が懸念される^{22~29)}。電解次亜水に浸漬した試料は弱酸性電解水に比べて著しい腐食が観察された。一般的に電解次亜水は、通常の酸や次亜塩素酸ナトリウムに比べて金属腐食性が低いと考えられているが、安定化された高い有効塩素濃度と相まって金属表面に塩化物が生成され、腐食が進むことが示唆された。しかし、口腔における使用はわずかな時間(含嗽で20~30秒、清拭で1,2分程度)であり、影響は少ないと考えられる。

POIC[®] water を含め電解次亜水や弱酸性電解水の電解機能水の一部は、食品添加物としては認められている。特に電解次亜水は化粧品(はみがき類)として製造販売されているものもあり、一般的にオーラルリンスとしての位置づけとして口腔内の使用が認められているが、口腔用の殺菌洗浄剤用としては認められていない。したがって、その用途で使用する場合には歯科医師の裁量権での使用であることを認識しなければいけない。

基本的に電解機能水は強力な殺菌効果と、効果が持続しにくく水に戻りやすい性質上より安全な消毒剤との位置づけと考えられる^{27,28)}。ただし、電解次亜水は有効塩素濃度が低下しにくく、強力な殺菌・洗浄効果は他の電解水より持続するため、その分タンパク溶解作用とともに生体有害性も相対的に大きくなりやすく、前述の金属腐食性とともに、オーラルリンスとしての使用を極端に逸脱する長時間、大量の使用には注意しなければならない。しかし、誤嚥性肺炎予防で口腔ケア用を実施する際に使用する殺菌洗浄剤としては有望な溶液であり、今後の臨床研究が期待される。

なお、被験液電解次亜水 POIC[®] water は NPO 法人 POIC[®] 研究会から供与されたものであり、著者の米山は本研究会の会長である。

文 献

- 1) Yoneyama, T., Yoshida, M., Matsui, T. and Sasaki, H.: Oral care and pneumonia, *Lancet*, **354**: 515, 1999.
- 2) 大田洋二郎: がん患者への口腔ケアの実践—口腔ケア用品の開発とその応用—, 訪問看護と介護, **14**: 912~916, 2009.
- 3) 角 保徳: 要介護高齢者に役立つ口腔ケア用品, 日歯医師会誌, **62**: 409~420, 2009.
- 4) 川瀬義矩編: 水の役割と機能化—その多様性と利用—, 第一版, p.70, 工業調査会, 東京, 2007.
- 5) 堀田国元: 強酸性電解水の殺菌機構と応用, 食品と開発, **33**: 5~7, 1998.
- 6) 佐藤久聡, 前原信敏, 井川房欣, 斎藤洋介, 阿知波信夫, 松井英則, 小宮山寛機: 厨房内の消毒における電解水の有用性, 日化療会誌, **48**: 768~774, 2000.
- 7) 吉水 守: 魚類ウイルス病とその防疫・防除に関する研究, 日水産会誌, **78**: 358~367, 2012.
- 8) 酒井敏博, 芝 燁彦, 万代倫嗣, 中根文誉, 飯沼裕之, 迎 和彦, 三浦頡剛, 池田増夫, 芝 紀代子, 水野徳次: Oxilizer[®]による電解水の歯科領域への応用—第1報 電解水の使用条件—, 日補綴歯会誌, **37**: 920~927, 1990.
- 9) 芝 燁彦, 芝 紀代子編: 強電解水ハンドブック, 第一版, p.17~103, 医学情報社, 東京, 1995.
- 10) 奥田禮一編: 酸化電位水の原理とその医療における応用, 第一版, p.173~179, 医歯薬出版, 東京, 1995.
- 11) 川本苗子, 市川哲雄, 蟹谷英生, 柏原稔也, 堀内政信, 弘田克彦, 三宅洋一郎, 松本直之: 電解水の義歯洗浄効果—細菌学的検討—, 日補綴歯会誌, **40**: 574~579, 1996.
- 12) 芝 燁彦, 村井正大, 天笠光雄編: 強電解酸性水の歯科臨床, 第一版, p.8~42, クインテッセンス出版, 東京, 1997.
- 13) 田上順次, 小柳岳大, マティン カイルール: 臨床理工講座—次亜塩素酸電解水「パーフェクトベリオ」の臨床応用—, 日歯評論, **69**: 91~95, 2009.
- 14) 鴨井久一, 芝 燁彦編: 機能水ではじめるヒトと環境に優しい歯科臨床, 第一版, 砂書房, 東京, 2012.
- 15) 柏原稔也, 弘田克彦, 市川哲雄, 寺田容子, 永尾寛, 河野文昭: 義歯洗浄剤としての電解水の効果—in vitro の *Candida albicans* バイオフィームへの影響—, 日補綴歯会誌, **43**: 513~517, 1999.
- 16) Li, J., Hirota, K., Goto, T., Yumoto, H., Miyake, Y. and Ichikawa, T.: Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal, *J. Dent.*, **40**: 686~692, 2012.
- 17) Millis, J., Pulliam, L., Dall, L., Marzouk, J., Wilson, W. and Costerton, J.W.: Exopolysaccharide production by viridans Streptococci in experimental endocarditis, *Infect. Immun.*, **43**: 359~367, 1984.
- 18) Costerton, J.W.: The etiology and persistence of cryptic bacterial infection: a hypothesis, *Rev. Infect. Dis.*, **6**: 608~616, 1984.

- 19) Donlan, R.M. and Costerton, J.W. : Biofilms : survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, Clin. Microbiol. Rev., **15** : 167~193, 2002.
- 20) 機能水研究振興財団学術選考委員会編 : 電解水ガイド, 第一版. (財) 機能水研究振興財団, 東京, 2001.
- 21) 矢納義高, 三宅洋一郎, 市川哲雄 : オーラルケアにおけるエリスリトールの有用性, フレグランスジャーナル, **36** : 13~18, 2008.
- 22) 西田哲也, 内山寿夫, 郷家英二, 伊藤公一, 村井正大, 野本成晃 : 酸化水の口腔内金属修復物におよぼす影響—金属修復物の電位—, 日歯周病会誌, **38** : 78~87, 1996.
- 23) 舞田健夫, 田中 収, 山田 雄, 田西和伸, 加藤千佳子 : 強電解水と電解中性水の金属腐食性について, 北海道歯医師会誌, **52** : 143~147, 1997.
- 24) 堀場直樹, 永松久美子, 樋口直也, 北村成孝, 鈴木一吉, 鳥村敏明, 松本 享, 中村 洋 : 中性機能水浸漬による歯科用切削具および根管治療用小器具の金属腐食と消毒効果, 愛院大歯誌, **38** : 581~589, 2000.
- 25) Dong, H., Nagamatsu, Y., Chen, K.K., Tajima, K., Kakigawa, H., Shi, S. and Kozono, Y. : Corrosion behavior of dental alloys in various types of electrolyzed water, Dent. Mater. J., **22** : 482~493, 2003.
- 26) 舞田健夫, 遠藤一彦, 大野弘機, 田村 誠, 川上智史, 疋田一洋, 藤井健男, 越智守生 : 電解水中における歯科鑄造用合金の腐食・変色挙動—強酸性電解水と弱酸性電解水の腐食性の比較—, 日歯産会誌, **19** : 38~46, 2005.
- 27) 青木春美, 吉田隆一 : 機能水と金属腐食—特に歯科用クレンザーを目安として—, 日歯産会誌, **19** : 49~56, 2005.
- 28) 福崎智司 : 次亜塩素酸ナトリウムを用いた洗浄・殺菌操作の理論と実際, 調理食品と技術, **16** : 1~14, 2010.
- 29) Morita, C., Nishida, T. and Ito, K. : Biological toxicity of acid electrolyzed functional water : effect of oral administration on mouse digestive tract and changes in body weight, Arch. Oral. Biol., **56** : 359~366, 2011.

In Vitro Efficacy of Electrolyzed Dilute Sodium Hypochlorite Solution on *Candidal* Biofilm

Toshiya Kashiwabara¹⁾, Takeyoshi Yoneyama²⁾, Atsuko Nakamichi³⁾, Tsuyoshi Honda¹⁾
Sachie Toko¹⁾, Takaharu Goto¹⁾, Kan Nagao¹⁾ and Tetsuo Ichikawa¹⁾

¹⁾Department of Oral and Maxillofacial Prosthodontics, The University of Tokushima, Institute of Health Biosciences

²⁾Yoneyama Dental Clinic

³⁾Faculty of Oral Health, The University of Kobe Tokiwa

The effectiveness of oral care interventions for preventing aspiration pneumonia and barriers to compromised elderly is universally-recognized in present medical practice. Quick and effective methods and materials are needed for oral health care. An electrolyzed dilute sodium hypochlorite solution was chosen as a sterilizing solution for oral health care and the sterilizing effect was evaluated using an *in vitro* candida biofilm.

Three electrolyzed functional waters, namely strongly alkaline water, weakly acidic water, dilute sodium hypochlorite solution, two kinds of commercial mouth wash and distilled water were used as test solutions. Antibiofilm efficacy and residual chlorine concentration were evaluated before/after immersing candidal biofilm specimens in each solution. pH changes of the solutions and macroscopic observations of metal surface were evaluated before/after immersing three kinds of dental metals : steel bar, cobalt-chromium alloy and gold-silver-palladium alloy in the solutions to test the corrosion behavior.

An electrolyzed dilute sodium hypochlorite solution showed high bactericidal capability of candida biofilm on cell desks and stable concentration of available chlorine, but high induction of metal corrosion.

Key words : electrolyzed dilute sodium hypochlorite solution, proteolytic, functional water, *Candida* biofilm, oral health care