

口腔細菌バイオフィルムモデルを用いた酸化電位水(EO 水)による 抗菌効果の評価

東京歯科大学微生物学講座¹⁾・東京歯科大学口腔健康臨床科学講座²⁾

加藤哲男¹⁾・山中あゆみ¹⁾・山田清貴²⁾・君塚隆太¹⁾・石原和幸¹⁾・奥田克爾¹⁾

要 旨：口腔細菌およびカンジダに対する酸化電位水(EO 水)の抗菌活性について、浮遊菌および単一菌からなるバイオフィルムモデルを用いて検討した。アクアメディカル社製 EO-003 から生成された EO 水を用いた。*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* および *Candida albicans* を供試した。供試菌を EO 水に、15 秒間および 60 秒間作用させ、浮遊菌に対する抗菌活性を検討した。*S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. actinomycetemcomitans* および *C. albicans* を用い、96-well plate 上に形成されたバイオフィルムに対する EO 水の抗菌効果を検討した。バイオフィルム形成量は、クリスタル紫染色法によって測定した。また ATP 量測定法によってバイオフィルムの bioactivity を調べた。浮遊細菌に対する抗菌活性を検討した結果、用いた EO 水は供試した菌数では、15 秒間で顕著に殺菌することが確認できた。*C. albicans* バイオフィルムでは、EO 水処理 30 分後からバイオフィルム量および ATP 量が減少しはじめ、1 時間後には有意 ($p < 0.01$) に減少した。供試したミュータンスレンサ球菌および *A. actinomycetemcomitans* バイオフィルムについては、3 分間処理ではバイオフィルム量の減少はみられなかったが、ATP 量は 15 秒間処理から有意な減少 ($p < 0.05$) がみられた。ATP 量の減少がみられたものは、さらに培養を続けても、バイオフィルム形成量の増加はみられなかった。

Key words : electrolyzed oxidizing water (EO water), anti-microbial activity, periodontopathic bacteria, cariogenic bacteria, *Candida albicans*

序 文

抗菌薬やワクチンの開発によって、多くの感染症が征圧可能となったが、今また種々の感染症が問題となっており、感染予防の重要性が再認識されている。その背景としては、薬剤耐性菌の出現などによる新興・再興感染症の問題や、高齢化社会における易感染性宿主や院内感染の問題などが挙げられる。多くの微生物に効果を示す酸化電位水 (electrolyzed oxidizing water; EO 水) は、環境保全の観点からも有用なものとして注目されている。

口腔には 500 種類以上の細菌が³⁾、唾液 1 ml あたりあるいはプラーク 1 mg あたり、 10^8 から 10^9 生息している¹⁾。それらのうち齲蝕や歯周病の原因となる細菌は、病原性を発揮しそれぞれの感染症をひきおこす。近年、それらの病原細菌が肺炎や心血管系疾患などにも関わっていることが示されてきている²⁾。*Candida albicans* は、義歯にバイオフィルムを形成し、義歯性潰瘍の原因となる。そのような背景の中、我々は天然の抗菌物質について検討を加えその有用性を報告してきている^{3,4)}。本研究では、口腔病原細菌および *C. albicans* に対する EO 水の抗菌活性について、浮遊菌および単一菌からなるバイオフィルムモデルを用いて検討した。

材料と方法

1. EO 水

アクアメディカル社製 EO-003 から生成された EO 水を用いた (pH 2.4-2.7, 酸化還元電位 1,100-1,160 mV, 溶存塩素 10 ppm 以下, 溶存酸素約 25 ppm, 溶存オゾン約 0.1 ppm).

2. 供試微生物

Streptococcus sobrinus 6715, *Streptococcus mutans* JC2, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 と ATCC 29523, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 および *C. albicans* JCM 1542 を供試した. *P. gingivalis* および *P. intermedia* の培養には, hemin と menadione を含む Trypticase soy broth を用い, その他

の口腔細菌の培養には Trypticase soy broth を用いた. *C. albicans* の培養には, glucose および peptone に yeast extract を添加した培地を用いた.

3. 浮遊菌に対する抗菌活性

供試菌をそれぞれ 10^4 - 10^8 CFU/ml で EO 水に, 15 秒間および 60 秒間作用させた. その後, 100 μ l を取り, 10 倍希釈系列をつくり, それぞれ 100 μ l を寒天培地に接種した. *C. albicans* には, glucose および peptone に yeast extract を添加した寒天培地を, その他の口腔細菌には 10% 馬脱繊維血液, hemin および menadione を含む血液寒天培地を用いた. *C. albicans* は, 室温で好気培養し, その他の口腔細菌は, 37 $^{\circ}$ C で嫌気培養した. 培養後, コロニー数を算定し, 抗菌活性を評価した. 蒸留水, 酢酸水 (pH 2.5) および塩酸水 (pH 2.5) を対照として用いた.

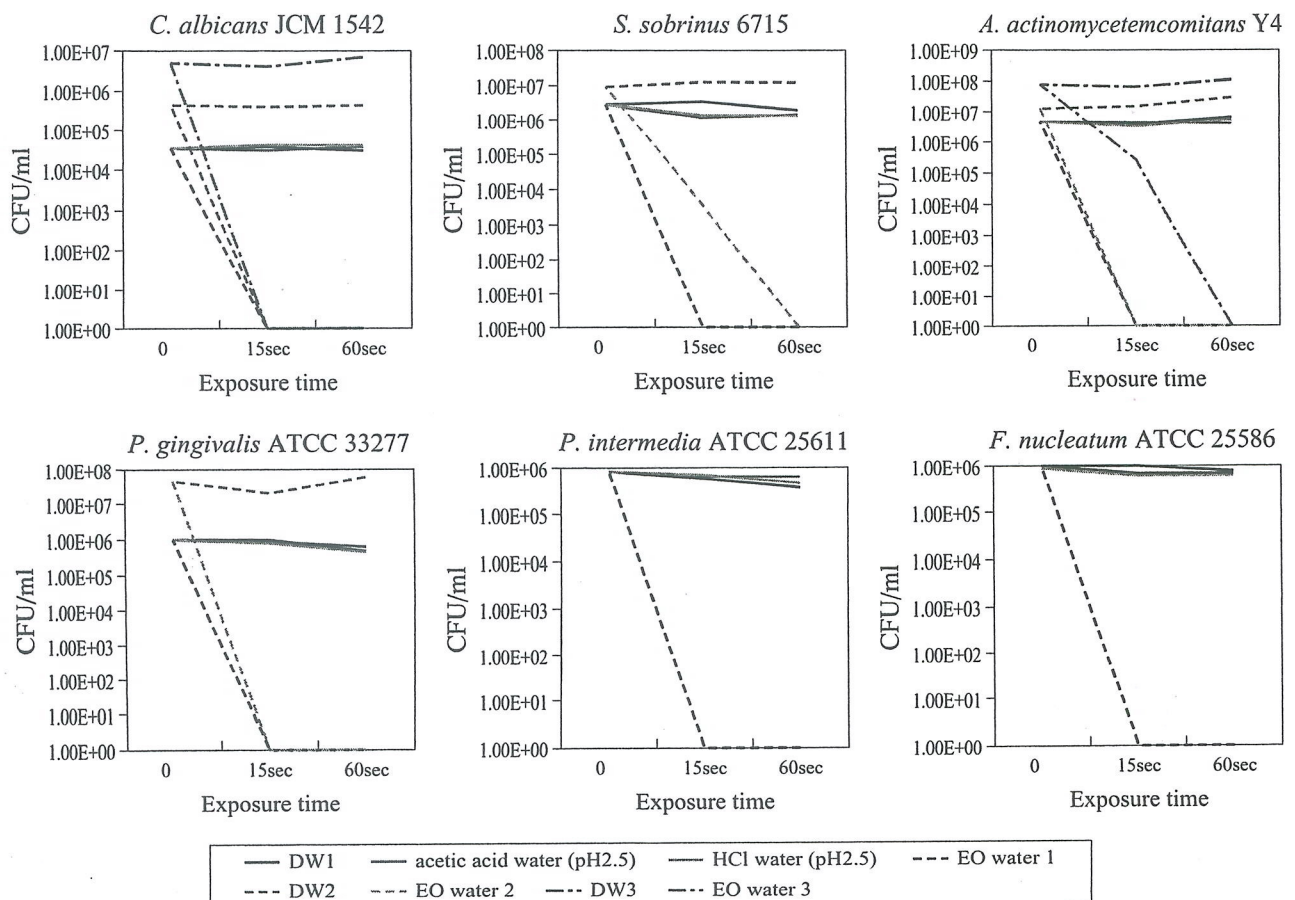


Fig. 1 Antimicrobial effect of EO water on planktonic cells
DW; distilled water, EO water; electrolyzed oxidizing water

4. EO水の抗菌活性に対するタンパク質の影響

前述の浮遊菌に対する抗菌活性を調べる実験系を用いて、タンパク質存在下でのEO水の抗菌活性について検討した。タンパク質としてウシ血清アルブミン(BSA)を用いた。反応液中にBSAを、300 $\mu\text{g/ml}$ あるいは 3 mg/ml になるように加え、

EO水の抗菌効果を評価した。

5. バイオフィルムに対する抗菌効果

S. mutans, *S. sobrinus*, *A. actinomycetemcomitans* および *C. albicans* を用い、96-well plate 上に形成されたバイオフィルムに対するEO水の抗菌効果を検討した。*C. albicans* は、最長16時間、その他

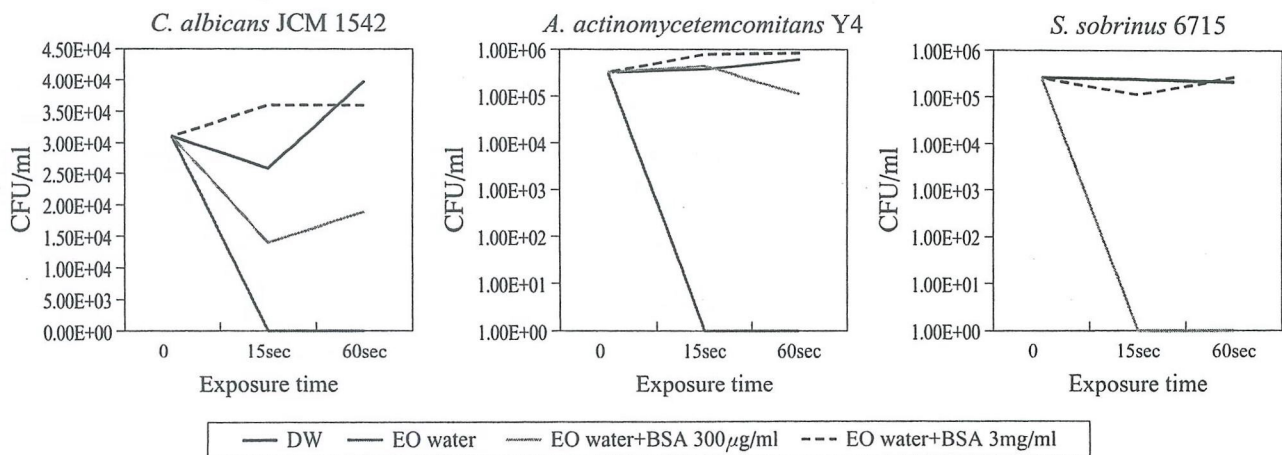


Fig. 2 Inhibitory effect of protein (BSA) on antimicrobial activity of EO water

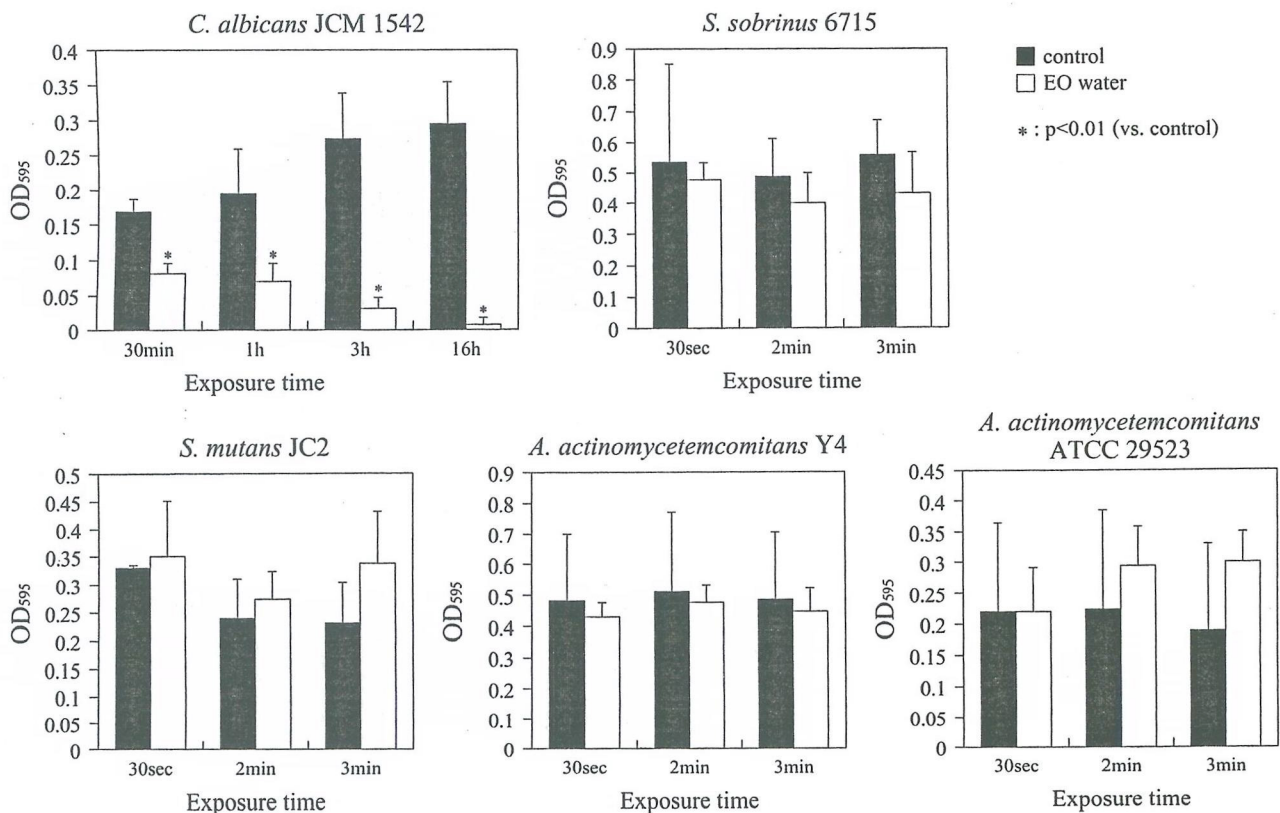


Fig. 3 Effect of EO water on biofilm

の細菌は、最長3分間作用させた。バイオフィルム形成量は、クリスタル紫染色法によって測定した^{4,5)}。またATP量測定法によってバイオフィルムのbioactivityを測定した。ATP量の測定は、Promega BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Madison, WI, USA)によって行った。PBS 100 μ lに懸濁したバイオフィルム菌体と同量のBacTiter-Glo™ Reagentを混ぜてauto lumicounterで測定した。

C. albicans 以外は、EO水作用後、新たな培地を加えて培養を続け、バイオフィルム形成量の増加を検討した。

成績および考察

1. 浮遊菌に対するEO水の抗菌活性とタンパク質の影響

浮遊細菌に対する抗菌活性を検討した結果、EO-003から生成されたEO水は、15秒間で供試

した菌数で顕著な殺菌効果を示すことがわかった(Fig. 1)。その反応液中にBSAが存在した場合、*C. albicans* および *A. actinomycetemcomitans* に対しては、300 μ g/mlの濃度でも、抗菌活性は減弱した(Fig. 2)。 *S. sobrinus* に対しては、BSAが300 μ g/mlでは、その抗菌活性に影響はみられなかったが、3mg/mlでは抗菌活性は阻害された(Fig. 2)。対象物に多くの血液やタンパク質などが付着している場合は、EO水に漬けるというのではなく、洗い流すというような方法で作用させる必要があらう。

2. バイオフィルムに対するEO水の抗菌効果

C. albicans バイオフィルムでは、EO水処理30分後からバイオフィルム量およびATP量が減少しはじめ、1時間後には有意($p < 0.01$)に減少した(Fig. 3, 4)。1時間以上作用させれば形成された*C. albicans* バイオフィルムを破壊することができたことから、義歯等を浸漬洗浄するには有効であらう。*S. mutans* JC2株、*S. sobrinus* 6715株および

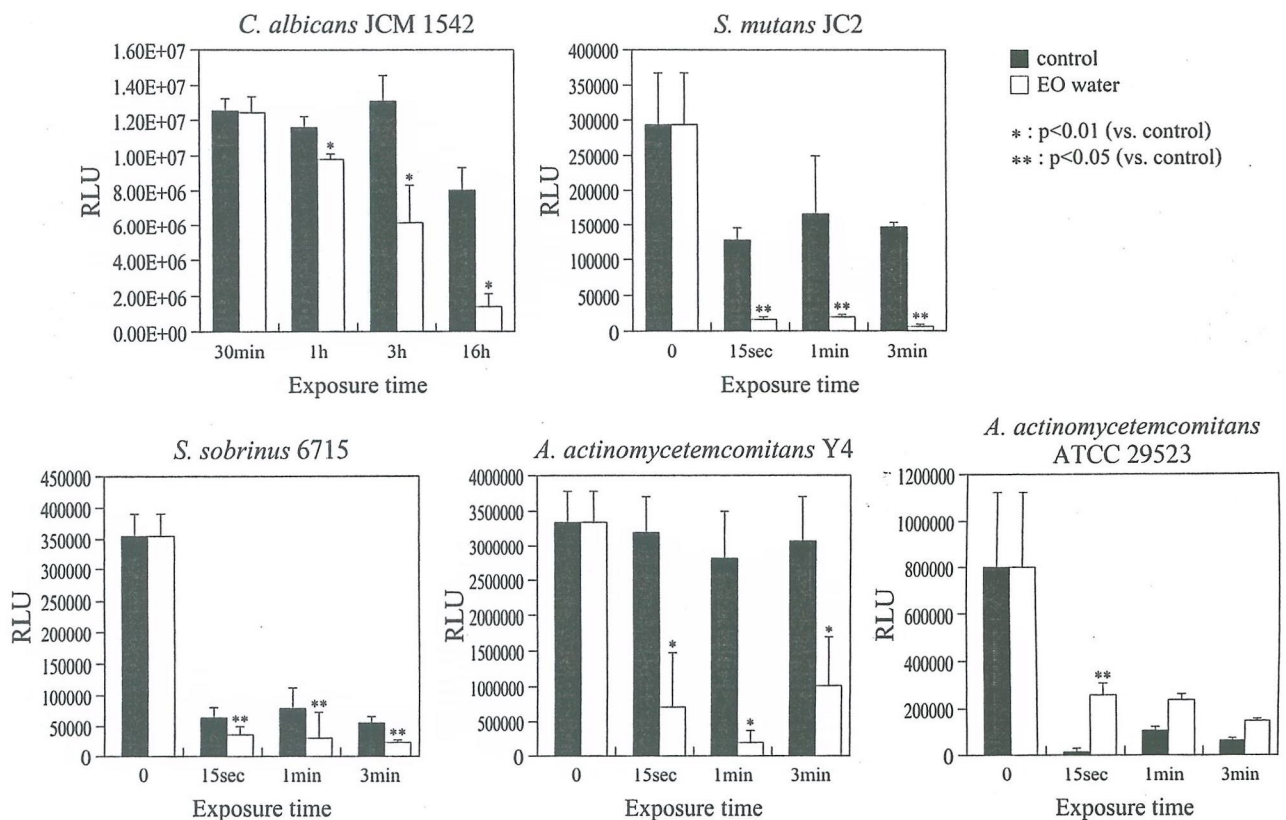


Fig. 4 ATP activity of biofilm exposed with EO water

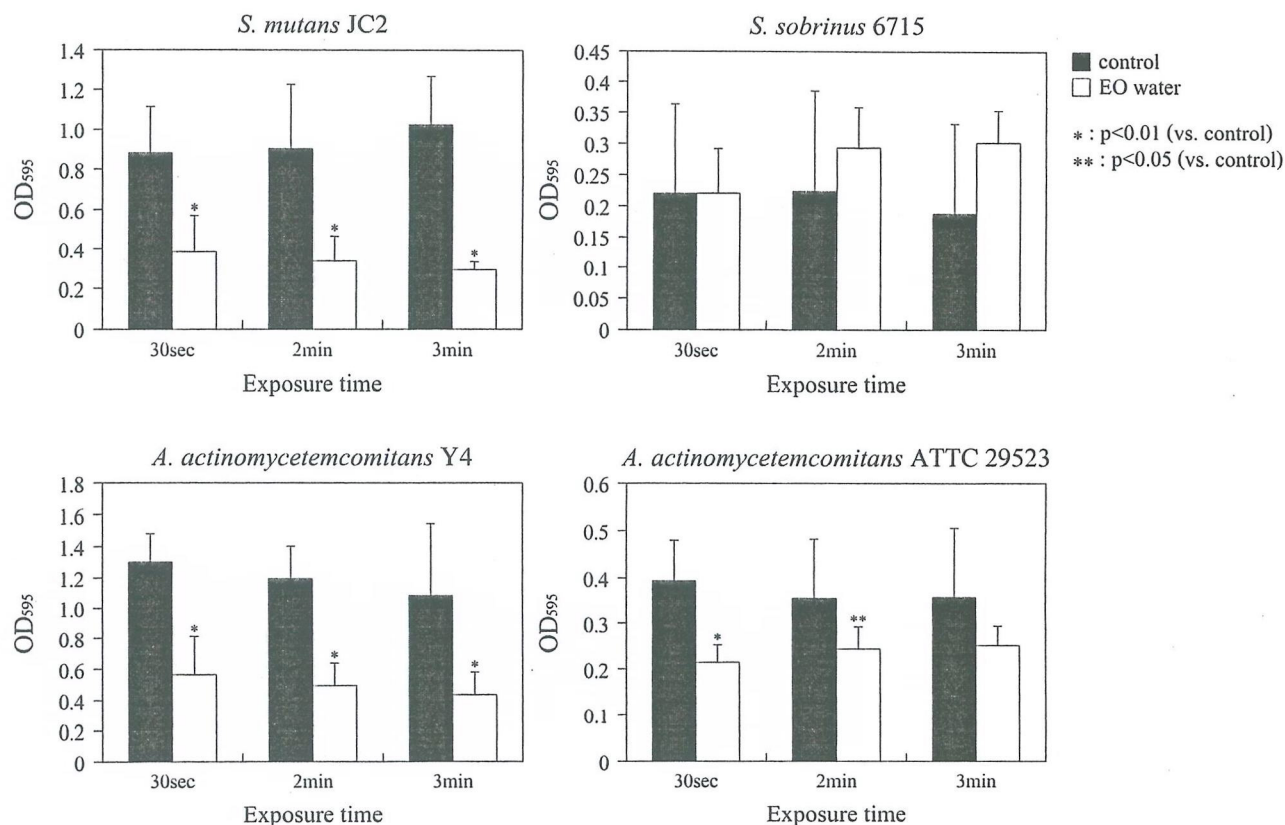


Fig. 5 Biofilm formation after EO water exposure

A. actinomycetemcomitans Y4 株バイオフィルムについては、3 分間処理ではバイオフィルム量の減少はみられなかったが (Fig. 3), ATP 量は 15 秒間処理から有意な減少 ($p < 0.05$) がみられた (Fig. 4). しかし, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 バイオフィルムでは、対照として用いた蒸留水の方が ATP 活性は低かった (Fig. 4). この違いは、それぞれの株におけるもとのバイオフィルム形成能が異なるためと思われる。EO 水作用後、さらに培養を続けた場合、*S. sobrinus* 以外はバイオフィルム形成量の増加はみられなかった (Fig. 5). 以上のように、今回用いた EO 水は、バイオフィルムにも効果があることが示された。

文 献

- 1) Rosan, B., and Lamont, R. J. 2000. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2: 1599-1607.
- 2) Okuda, K., Kato, T., and Ishihara, K. 2004. Involvement of periodontopathic biofilm in vascular diseases. *Oral Dis.* 10: 5-12.
- 3) Takarada, K., Kimizuka, R., Takahashi, N., Honma, K., Okuda, K., Kato, T. 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol. Immunol.* 19: 61-64.
- 4) Yamanaka, A., Kimizuka, R., Kato, T., and Okuda, K. 2004. Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. *Oral Microbiol. Immunol.* 19: 150-154.
- 5) Loo, C. Y., Coliss, D. A., and Ganeshkumar, N. 2000. *Streptococcus gordonii* biofilm formation. Identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J. Bacteriol.* 183: 1374-1382.

Evaluation of antimicrobial effect of electrolyzed oxidizing water (EO water) using oral microbial biofilm models

Tetsuo Kato, Ayumi Yamanaka, Kiyotaka Yamada, Ryuta Kimizuka, Kazuyuki Ishihara,
Katsuji Okuda

Departments of Microbiology and Clinical Oral Health Science, Tokyo Dental College, Chiba

In this study, we investigated the antimicrobial activity of electrolyzed oxidizing water (EO water) against oral bacteria and *Candida* using planktonic cells or biofilm model. EO water was prepared using EO-003 (Aqua Medical Co.). *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Candida albicans* were tested in this study. Planktonic cells of each microorganism were treated with EO water at 10^4 - 10^8 CFU/ml for 15 and 60 seconds. As a control, distilled water, acetic acid water (pH 2.5) and hydrochloric acid water (pH 2.5) were used. Biofilms of *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. actinomycescomitans*, and *C. albicans* were prepared on a 96-well culture plate, and the effect of EO water on these biofilms was investigated. Biofilm was exposed to EO water for between 3 minutes to several hours. Biofilm formation was measured by the crystal violet staining method. Biofilm bioactivity was measured by the ATP measurement method. Culture of the bacteria excluding *C. albicans* was continued after EO water treatment by adding fresh broth, and biofilm formation was investigated. EO water used in this study killed the microorganisms within 15 seconds. *C. albicans* biofilm and its ATP level decreased with EO water treatment, and the decreases were significant at 1 hour ($p < 0.01$). *Streptococcus mutans* and *A. actinomycescomitans* biofilms showed no reduction with 3-minute treatment, although ATP levels started to significantly decrease at 15 seconds after initiation ($p < 0.05$). However, in some strains, no significant differences from the results of control were noted. In strains in which the ATP levels were reduced, biofilm formation showed no increase, even though culture was continued. In conclusion, the present study demonstrates that the EO water used in this study is effective against biofilms.

1165 Inhibitory Effect of Electrolyzed Oxidizing (EO) Water on Biofilm

T. KATO, A. YAMANAKA, K. YAMADA, R. KIMIZUKA, K. ISHIHARA, and K. OKUDA,
Tokyo Dental College, Chiba, Japan

Objective: Electrolyzed oxidizing (EO) water is effective against many microorganisms, and has been attracting attention due to its environmental safety. In this *in vitro* study, we investigated the antimicrobial activity of EO water against biofilms of oral bacteria and *Candida albicans*.

Methods: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, and *C. albicans* were used in this study. Planktonic cells of each microorganism were treated with EO water for 15 and 60 sec. As a control, distilled water, acetic acid water (pH 2.5) and hydrochloric acid water (pH 2.5) were also used. Biofilms of *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. actinomycetemcomitans*, and *C. albicans* were prepared on a 96-well culture plate, and the effect of EO water on these biofilms was investigated. Biofilm was exposed to EO water for between 3 min to several hours. Biofilm formation was measured by the crystal violet staining method. Biofilm bioactivity was measured by the ATP measurement method. With the exception of *C. albicans*, the bacteria were further cultured following EO water treatment by addition of fresh broth to determine biofilm formation.

Results: EO water killed the planktonic microorganisms within 15 sec. *C. albicans* biofilm and its ATP level decreased with EO water treatment, showing a significant decrease at 1 hr ($p < 0.01$). *Mutans streptococcus* and *A. actinomycetemcomitans* biofilms showed no reduction with 3 min treatment, although the ATP levels started to significantly decrease at 15 sec after initiation ($p < 0.05$). However, in some strains, no significant differences from the results of the controls were noted. In strains in which ATP levels were reduced, biofilm formation showed no increase, even though culture was continued.

Conclusion: The results of the present study suggest that EO water is effective against some biofilms.

Seq. #126 - Microbes and Oral Infections

3:30 PM-4:45 PM, Thursday, 22 March 2007 Ernest N. Morial Convention Center
Exhibit Hall I2-J

Back to the Microbiology / Immunology and Infection Control Program

Back to the IADR/AADR/CADR 85th General Session and Exhibition (March 21-24, 2007)

[Top Level Search](#)