

アルカリイオン水の *Porphyromonas gingivalis*
に対する殺菌および病原性抑制効果

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座

助手 岩崎 宏泰

(指導：伊藤 公一 教授，田村 宗明 助教)

緒 言

口腔細菌叢は未同定の菌種を含め、約 700 種にも及ぶ細菌種により構成され、生体と細菌との相互作用によりバランスを保っている。しかし、口腔ケアが欠如した場合、デンタルプラーク（プラーク）中の菌数の増加ならびに遷移が誘導され、過剰のプラークの蓄積により、う蝕ならびに歯周病の発症の原因^{1,2)}となる。さらに近年、歯周病が糖尿病などさまざまな全身疾患の誘因となる可能性が報告^{3, 4)}されており、プラークの形成抑制および除去は口腔のみならず全身疾患の発症予防につながるものと考えられる。一般的なプラークコントロールは、歯ブラシ、デンタルフロスおよび歯間ブラシなどが用いられるが、これらが適正に行われたとしても、機械的除去のみでは不十分であることが多い。そこでプラーク除去率向上を目的に、抗生物質やポビドンヨードなど、さまざまな薬剤⁵⁻¹²⁾が補助的に使用されている。しかし、これら薬剤は副作用として歯の変色、口腔粘膜への刺激、薬剤耐性菌の出現が報告¹⁰⁻¹²⁾されている。そこで、より副作用や為害性の少ない化学的プラークコントロール剤の開発が急務となっている。

水を隔膜で仕切って電気分解を行うと、陽極側には酸性溶液が、陰極側にはアルカリ性溶液が生成される。この酸性溶液（酸性電解水）は、高い殺菌効果と強い細胞傷害性を持つことが報告^{13, 14)}されている。一方、アルカリ性溶液の一つであるアルカリイオン水（AIW 溶液）に関しては、飲料による消化器官への影響などを検討した報告¹⁵⁻²⁰⁾はあるものの、抗菌効果ならびに歯科医療分野

に関する報告は極めて少ない。しかし、強いアルカリ性はタンパク変性作用を有するとの報告²¹⁾から、AIW 溶液が抗菌効果を示す可能性が考えられるものの、十分な検討はなされていない。

本研究では、AIW 溶液の化学的プラークコントロールとしての可能性を考え、AIW 溶液が歯周病原菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* に及ぼす影響を検討する目的で、AIW 溶液処理による殺菌および口腔上皮粘膜細胞への付着抑制効果やタンパク分解酵素除去などの短時間処理における病原性因子に及ぼす影響について検討した。さらにヒト上皮細胞に対する為害作用についての検討も加えた。

材料と方法

1. 試料および供試菌株

AIW 溶液はアルカリイオン整水器 (ミネリッチ ロイヤル[®], OSG コーポレーション, 東京) を用いて, pH が 10.2 ± 0.1 , 9.2 ± 0.1 および 8.5 ± 0.1 となるように調整した 3 種の溶液を作製した。なお, control として PBS (50 mM リン酸ナトリウム, 150 mM 塩化ナトリウム, pH 7.2) を用いた。被験菌として *P. gingivalis* ATCC33277 株を供試し, GAM broth (ニッスイ, 東京) に $7.7 \mu\text{M}$ ヘミンならびに $2.9 \mu\text{M}$ メナジオンを添加した培地にて, 37°C , 48 時間嫌気培養を行った。

2. 被験菌の AIW 溶液処理

培養後の被験菌を遠心操作 (4°C , $5,000 \times g$, 10 分間) で集菌し, 滅菌 PBS にて 2 回洗浄した。遠心分離にて約 2.0×10^9 CFU に調整し, pH の異なる AIW 溶液 5 ml を添加して攪拌, 室温で 30 秒から 5 分間処理後, 10 分の 1 量の 1.0 M PBS (pH 7.2) を添加して pH を 7.2 に補正した。

3. 殺菌効果

AIW 溶液で処理した被験菌を PBS で希釈し, $100 \mu\text{l}$ を前述の GAM 寒天培地に塗抹後, 37°C , 48 時間嫌気培養を行い, 形成コロニー数 (CFU) を算定した。

実験は $n = 4$ で 3 回繰り返した。

4. 口腔上皮粘膜細胞への付着抑制効果

口腔上皮粘膜細胞は, 健康成人男子に日本大学歯学部倫理委員会 (承認番

号：倫 2006-4) の規定に基づいて十分にインフォームドコンセントを行い，同意を得た後，頬粘膜から滅菌木ベラで採取した。採取した粘膜細胞は，滅菌 PBS に懸濁し，細胞付着細菌を除去する目的で Ultrafree[®]-MC フィルターチューブ (ポアサイズ 5 μm , Millipore, MA, USA) を用いて PBS にて 2 回遠心 (RT, 1,000 \times g, 3 分間) 洗浄した²²⁾。粘膜細胞懸濁液 150 μl (細胞数約 $7.0 \times 10^5 / \text{ml}$) に，各 AIW 溶液で 30 秒間処理した被験菌懸濁液 150 μl (約 $7.0 \times 10^6 \text{CFU} / \text{ml}$) を添加，混和後，37 $^{\circ}\text{C}$ ，30 分間静置した。その後，前述のフィルターチューブを用いて PBS で 5 回遠心洗浄して未付着の被験菌を除去し，粘膜細胞をスライドガラスに塗抹，火炎固定後，クリスタルバイオレット液で染色した。粘膜細胞に付着した被験菌数を光学顕微鏡下にて計測した。細胞当たりの平均付着菌数は 25 粘膜細胞の測定値から算出した。

5. 走査電子顕微鏡観察

殺菌効果 (実験 3.) および付着抑制効果 (実験 4.) の成績から最も効果が高かった AIW 溶液 (pH 10.2) を用い，30 秒間処理した供試菌をニトロセルロース膜上に静置し，2.5%グルタルアルデヒド (pH 7.4) にて 30 分間固定した²³⁾。次に，1%オスミウム溶液にて 60 分間固定し，続いてアセトン濃度上昇系列 (20, 40, 60, 80, 90 および 95%でそれぞれ 10 分間浸漬後，ついで 100%で 20 分間 2 回浸漬) および酢酸イソペンチル溶液 (100%で 20 分間を 3 回浸漬) で脱水し，CO₂ にて臨界点乾燥後，20 nm の厚さで金イオンコーティングを施した。電子顕微鏡用試料は走査電子顕微鏡 (S-4300, 日立, 東京) を用いて加速電圧 10 kV

にて観察を行った。

6. AIW 溶液処理上清中のタンパク量およびプロテアーゼ活性

AIW 溶液 (pH 10.2) で 30 秒間処理した被験菌液の遠心上清をサンプルとした。サンプル中のタンパク量はプロテインアッセイキット (Bio-Rad, CA, USA) にて測定した。

活性測定実験の基質溶液は、2.5 mM *N*-ベンゾイル-L-アルギニン-*p*-ニトロアニリド (BAPNA, 和光化学, 東京) およびアッセイバッファー (50% DMSO, 0.05 M トリス-塩酸, 0.2 M 塩化ナトリウム, 5 mM ジチオトレイトール, pH 7.5) を用いた。96 穴マイクロプレートのウェル中で、サンプル 10 μ l とアッセイバッファー 40 μ l と混和して 37°C, 5 分間反応させた。次に、基質溶液 50 μ l を加え 37°C, 30 分間処理後、マイクロプレートリーダー (Model 550, Bio-Rad) にて波長 405 nm で測定した。実験は $n = 4$ で 3 回繰り返した。

7. ウェスタンブロット法

AIW 溶液 (pH 10.2) で 30 秒間処理した被験菌液の遠心上清 20 μ l を SDS-PAGE サンプルバッファーで 95°C, 5 分間熱処理し、12.5% ジェルで電気泳動 (Mini-protean[®] II cells, Bio-Rad, CA) を行った。泳動後、セミドライホライズンブロットトランスファー装置 (アトー, 東京) にてニトロセルロース膜へ転写し、3% ウシ血清アルブミン添加トリス緩衝溶液 (TBS) で 4°C, 18 時間ブロッキングした。ニトロセルロース膜をスクリーナーブロッターミニ D-12 (サンブラテック, 東京) に設置し、1 次抗体としてウサギ抗線毛 (FimA) 抗体

²⁴⁾ , またはウサギ抗アルギニン-ジンジパイン (RGP) 抗体 ²⁵⁾ (それぞれ 1:1,000 希釈) で 1 時間処理した。膜を 3 回洗浄し, 2 次抗体としてヤギ抗ウサギ IgG 抗体で 1 時間処理した。その後 3 回洗浄し, NBT/BCIP で処理してバンドを検出した。

8. 毒性試験

ヒト上皮細胞 Ca9-22 は, 10% ウシ胎児血清を添加した EMEM 培地 (イワキガラス, 東京) に播種, 培養した。死細胞比率の評価はセルカウントキット (同仁, 東京) を用いた。ヒト上皮細胞約 2.0×10^5 に 100 μ l の AIW 溶液 (pH 10.2) を添加し, 37°C, 5 分間処理した。遠心分離 (4°C, 500 \times g, 10 分間) 後, 上清 50 μ l に染色液 50 μ l を添加し, 室温にて 45 分間静置した。その後, 反応停止液 100 μ l を添加し, 分光光度計 (Multiskan MS, Labsystems, Finland) にて波長 450 nm で測定し, 検量線より死細胞数を算定した。なお, positive control として 0.2% グルコン酸クロルヘキシジン (CHX) を用いた。なお, 実験は n = 4 で 3 回繰り返した。

9. 統計処理

統計処理は One-way Factorial ANOVA および Scheffe's test を用い, 各群間の比較を行った。なお, 有意水準は 0.01 とした。

結 果

1. 殺菌効果

AIW 溶液 (pH 10.2) の 30 秒間処理後の *P. gingivalis* 形成コロニー数は control と比較して約 1/3, 1 分間処理では約 1/5 および 5 分間処理では約 1/9 であり, いずれの処理時間においても有意差が認められた (第 1 図 A)。また, AIW 溶液の pH による影響を検討したところ, pH の上昇に伴って形成コロニー数は有意に減少した (第 1 図 B)。

2. 口腔上皮粘膜細胞への付着に及ぼす影響

AIW 溶液処理被験菌の口腔上皮粘膜細胞への付着菌数は, pH 依存的に減少傾向が認められ, pH 9.2 および 10.2 の条件では control と比較して, 有意な差が認められた (第 2 図)。

3. 走査電子顕微鏡観察

Control では被験菌表面に無数のフィラメント状構造物が観察された (第 3 図 A)。しかし, AIW 溶液 (pH 10.2) の 30 秒間処理では, フィラメント状構造物がほぼ消失した (第 3 図 B)。

4. AIW 溶液処理上清中のタンパク量およびプロテアーゼ活性

上清中のタンパク量は control で 0.284 ± 0.055 mg/ml, AIW 溶液 (pH 10.2) で 0.782 ± 0.093 mg/ml であり, AIW 溶液処理で有意に増加した。

AIW 溶液処理上清中のプロテアーゼ活性は control と比較し, 有意に上昇した (第 4 図)。

5. ウェスタンブロット法

AIW 溶液処理後の被験菌液上清の SDS-PAGE, およびウェスタンブロット法で実験を行った結果, 抗 FimA 抗体をでは, control にバンドが検出されなかったが, AIW 溶液処理では約 41-, 約 55-および約 67-kDa にバンドが認められた (第 5 図 A)。抗 RGP 抗体の実験では, control にバンドは確認されなかったものの, AIW 溶液処理では約 45-kDa にバンドが検出された (第 5 図 B)。

6. 細胞毒性

AIW 溶液処理における細胞毒性は低く, control との間に有意差は認められなかった。一方, positive control として用いた 0.2% CHX は高い毒性を示し, control および AIW 溶液処理との間に有意差が認められた (第 6 図)。

考 察

口腔組織への口腔細菌の付着は、プラーク形成の第一ステップであり、その後の菌数増加および菌相の遷移はう蝕や歯周病の原因となる^{1,2)}。さらに口腔疾患はさまざまな全身疾患の原因となり得る可能性が報告されており^{3,4)}、口腔細菌の付着抑制、プラーク形成抑制と除去は全身疾患の発症予防に重要である。現在のプラークコントロールの主流は機械的清掃であるが、これだけでは不十分であるため、プラーク除去率の向上には副作用や為害性の少ないプラークコントロール剤の開発が必要と考えられる。

AIW 溶液は Pt-Ti 電極を用いた水の電気分解によって生成される機能水の一つであり^{15,17)}、その他の電解水と比較して殺菌効果は弱いとされている²⁶⁾が詳細は不明である。そこで著者は、アルカリがタンパク変性をさせること²¹⁾から、AIW 溶液の歯周病原菌に及ぼす殺菌ならびに病原性因子への影響について検討した。

まず、AIW 溶液 (pH 10.2) の *P. gingivalis* に及ぼす殺菌効果について検討したところ、処理時間に依存して形成コロニー数は減少し、30 秒間では約 1/3 に、5 分間では約 1/9 になった(第 1 図 A)。さらに、この殺菌効果と pH との関連性について検討したところ、pH の低下に伴い、形成コロニー数の増加が認められたことから、この殺菌効果は pH に依存している可能性が示唆された (第 1 図 B)。AIW 溶液 (pH 10.2) が最も適当であると思われたが十分な殺菌効果を得るためには 5 分間処理が必要であり、30 秒間処理では形成コロニー数が減少す

るものの 1/3 程度であったことから、殺菌効果は十分に期待できるものではなかった。さらに 5 分間処理は長く、口腔内での AIW 溶液の臨床応用はやや困難であると思われる。そこで、AIW 溶液の短時間処理が *P. gingivalis* の病原性に及ぼす影響について検討した。

口腔上皮粘膜細胞を採取し、AIW 溶液で短時間処理した被験菌の粘膜細胞付着能を検討したところ、AIW 溶液の pH 上昇に伴って付着菌数の減少が認められた。この結果は、AIW 溶液処理が被験菌表層の付着関与構造に何らかの変化を与えるものと考えられた。そこで、AIW 溶液処理後の被験菌を走査電子顕微鏡で観察したところ、control で観察された表層に存在する無数のフィラメント状構造物が AIW 溶液処理で消失しており (第 3 図 A, B) , 被験菌の表層構造物を除去することで付着能が低下した可能性が示唆された。*P. gingivalis* の表層には線毛やタンパク分解酵素などが存在し、これらは口腔内諸組織への付着、他口腔常在菌との共凝集ならびに宿主組織の破壊など、*P. gingivalis* の重要な病原因子であることが報告²⁷⁻³⁰⁾ されている。したがって、AIW 溶液処理によって *P. gingivalis* の病原因子である菌表層の線毛やタンパク分解酵素などが除去される可能性が考えられた。

次に、AIW 溶液処理により、上清中に遊離する成分について検討を加えた。処理後の遠心上清中のタンパク量を測定したところ、control と比べて有意に上昇し、AIW 溶液処理で菌表層のタンパク成分が上清中に遊離することが示された。*P. gingivalis* が産生するタンパク分解酵素の大部分は、トリプシン様のシス

テインプロテアーゼ²⁷⁾であることから、BAPNAを基質としてのプロテアーゼ活性を測定したところ、AIW溶液処理上清中に高い活性が認められ、*P. gingivalis*のタンパク分解酵素がAIW溶液処理により遊離されたと考えられた(第4図)。

さらに、上清中へと遊離する成分として*P. gingivalis*の付着に関与する線毛が存在する可能性が考えられることから、同様に抗FimA抗体を用いて検討した。その結果、AIW溶液処理では約41-, 約55-ならびに約67-kDaにバンドを認め、上清サンプル中に線毛成分³¹⁾が検出された。AIW溶液処理による口腔上皮粘膜細胞への付着能の低下は、AIW溶液処理による線毛の消失が関与している可能性が強く示唆された。

*P. gingivalis*の付着能にタンパク分解酵素が深く関与している³²⁾ことが報告されている。そこで、*P. gingivalis*が産生するタンパク分解酵素の大部分がジンジパインである²⁷⁾ことから、上清中のジンジパイン存在を確認するために、抗RGP抗体を用いてウエスタンブロット法で解析を行った。その結果、AIW溶液処理では約44-kDaにバンドが認められ、アルギニン-ジンジパイン(RGP)³³⁾の存在を確認した。AIW溶液処理による前述のタンパク分解酵素の菌表層からの遊離は、付着阻害にも働くものと示唆された。今後、リジン-ジンジパイン(KGP)に関する検討が必要であると思われる。

一方、ヒト細胞に対する為害性について検討する目的で、ヒト上皮細胞Ca9-22株に対するAIW溶液の毒性について検討した。その結果、AIW溶液処

理では細胞毒性が 10%で、control と有意差は認められず、為害性は低いと考えられた。

以上のように本実験の結果から、AIW 溶液の *P. gingivalis* に及ぼす影響は、pH 依存性を示し、pH が高いほど菌数が抑制されることが確認された。また、長時間の処理では殺菌作用を、短時間では付着能やタンパク分解能などの病原性を抑制することが示された。さらに、毒性が低いことからプラークコントロール剤としての臨床応用の可能性が示唆された。今後、口腔内において使用する場合、唾液などの環境因子による影響についても、検討を加えることが必要と思われる。

結 論

AIW 溶液 (pH 8.5, 9.2, 10.2) を用いて歯周病原菌 *P. gingivalis* の殺菌および病原性因子に及ぼす影響について検討した結果、以下の結論を得た。

1. AIW 溶液処理は、処理時間および pH 依存的に *P. gingivalis* 形成コロニー数を減少させた。
2. 口腔上皮粘膜細胞への *P. gingivalis* 付着菌数は AIW 溶液 (pH 10.2) 処理により抑制された。
3. AIW 溶液 (pH 10.2) の短時間処理は、*P. gingivalis* 表層のフィラメント状構造物を除去した。
4. AIW 溶液 (pH 10.2) の短時間処理後の上清から、ウエスタンブロット法により RGP および線毛成分が確認された。
5. AIW 溶液 (pH 10.2) の短時間処理は Ca9-22 細胞に対して毒性は低かった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、懇切なるご指導およびご校閲を賜りました日本大学歯学部歯科保存学教室第Ⅲ講座 伊藤公一教授および本学部細菌学講座 田村宗明助教，ならびに研究にご協力戴きました本学部歯科保存学教室第Ⅲ講座に感謝の意を表します。

また、抗 FimA 抗体ならびに抗 RGP 抗体を供与していただきました日本大学松戸歯学部の安孫子宜光教授，アルカリイオン整水器を貸与していただきました OSG コーポレーションの齊藤靖宏氏に深く謝意の意を示します。

文 献

- 1) L e H, Theilade E, Jensen SB (1965) Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 36, 177-187.
- 2) Van der Reijden WA, DelleMijn-Kippuw N, Stijne-van Nes AM, de Soet JJ, van Winkelhoff AJ (2001) Mutans streptococci in subgingival plaque of treated and untreated patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 28, 686-691.
- 3) Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K (2007) Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect* 13, 3-10.
- 4) Parahitiyawa NB, Jin LJ, Leung WK, Yam YC, Samaranayake LP (2009) Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clin Microbiol Rev* 22, 46-64.
- 5) Ratka-Kr ger P, Schacher B, B rklin T, B ddinghaus B, Holle R, Renggli HH, Eickholz P, Kim TS (2005) Non-surgical periodontal therapy with adjunctive topical doxycycline: a double-masked, randomized, controlled multicenter study. II. Microbiological results. *J Periodontol* 76, 66-74.
- 6) Ramberg P, Furuichi Y, Volpe AR, Gaffar A, Lindhe J (1996) The effects of antimicrobial mouthrinses on de novo plaque formation at sites with healthy and inflamed gingivae. *J Clin Periodontol* 23, 7-11.

- 7) Rosin M, Kramer A, Bradtke D, Richter G, Kocher T (2002) The effect of a SCN⁻/H₂O₂ toothpaste compared to a commercially available triclosan-containing toothpaste on oral hygiene and gingival health – a 6-month home-use study. *J Clin Periodontol* 29, 1086-1091.
- 8) Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T (2004) Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 19, 240-246.
- 9) Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter JP, Pineill JL, Sixou M (2005) Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol* 20, 244-252.
- 10) Meurman P, Meriläinen L, Pienihäkkinen K, Alanen P, Trahan L, Söderling E (2005) Xylitol-resistant mutans streptococci strains and the frequency of xylitol consumption in young children. *Acta Odontol Scand* 63, 314-316.
- 11) Del Peloso Ribeiro É, Bittencourt S, Ambrosano GM, Nociti FH Jr, Sallum EA, Sallum AW, Casati MZ (2006) Povidone-iodine used as an adjunct to non-surgical treatment of furcation involvements. *J Periodontol* 77, 211-217.
- 12) Gürkan CA, Zaim E, Bakirsoy I, Soykan E (2006) Short-term side effects of 0.2% alcohol-free chlorhexidine mouthrinse used as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a double-blind clinical study. *J Periodontol* 77, 370-384.
- 13) Ito K, Nishida T, Murai S (1996) Inhibitory effects of acid water prepared by an

- electrolysis apparatus on early plaque formation on specimens of dentine. *J Clin Periodontol* 23, 471-476.
- 14) Shimada K, Ito K, Murai S (2000) A comparison of the bactericidal effects and cytotoxic activity of three types of oxidizing water, prepared by electrolysis, as chemical dental plaque control agents. *Int J Antimicrob Agents* 15, 49-53.
- 15) Kikuchi K, Takeda H, Rabolt B, Okaya T, Ogumi Z, Saihara Y, Noguchi H (2001) Hydrogen particles and supersaturation in alkaline water from an Alkali-Ion Water electrolyzer. *J Electroanal Chem* 506, 22-27.
- 16) Kikuchi K, Takeda H, Rabolt B, Okaya T, Ogumi Z, Saihara Y, Noguchi H (2001) Hydrogen concentration in water from an Alkali-Ion-Water electrolyzer having a platinum-electroplated titanium electrode. *J Appl Electrochem* 31, 1301-1306.
- 17) Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Tomatsuri N, Matsuyama K, Fujii T, Yagi N, Yoshida N, Yoshikawa T (2002) Chronic administration with electrolyzed alkaline water inhibits aspirin-induced gastric mucosal injury in rats through the inhibition to tumor necrosis factor- α expression. *J Clin Biochem Nutr* 32, 69-81.
- 18) Nishikawa R, Teruya K, Katakura Y, Osada K, Hamasaki T, Kashiwagi T, Komatsu T, Li Y, Ye J, Ichikawa A, Otsubo K, Morisawa S, Xu Q, Shirahata S (2005) Electrolyzed reduced water supplemented with platinum nanoparticles suppresses promotion of two-stage cell transformation. *Cytotechnology* 47, 97-105.

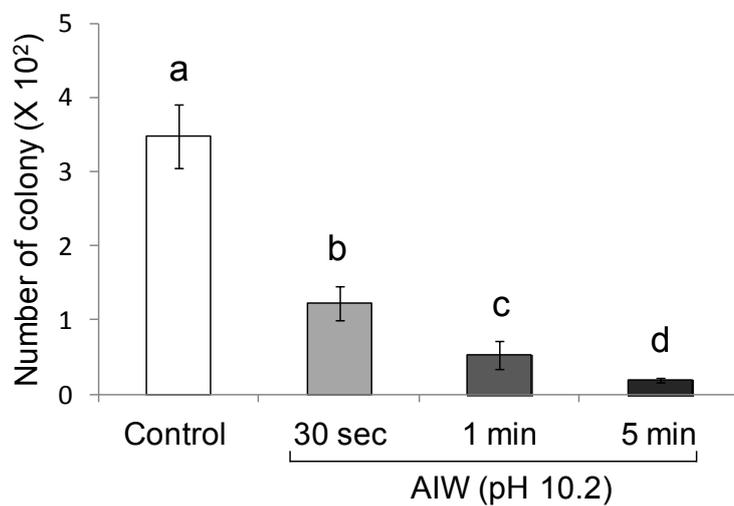
- 19) Kim MJ, Kim HK (2006) Anti-diabetic effects of electrolyzed reduced water in streptozotocin-induced and genetic diabetic mice. *Life Sci* 79, 2288-2292.
- 20) Huang KC, Yang CC, Hsu SP, Lee KT, Liu HW, Morisawa S, Otsubo K, Chien CT (2006) Electrolyzed-reduced water reduced hemodialysis-induced erythrocyte impairment in end-stage renal disease patients. *Kidney Int* 70, 391-398.
- 21) Nelson DL, Cox MM (2000) The Three-Dimensional Structure of Proteins. In, Morgan R, Linda S, Valerie N, eds. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Third Edition. New York, Worth Publishers, 159-202.
- 22) Tamura M, Hirano Y, Kuroda K, Kuwata F, Hayashi K (2005) Effects of zinc and copper on adhesion and hemagglutination of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol* 20, 339-343.
- 23) Hongo H, Takano H, Morita M (2007) Dense fimbrial meshwork enhances *Porphyromonas gingivalis* adhesiveness: a scanning electron microscopic study. *J Periodont Res* 42, 114-118.
- 24) Hiratsuka K, Hayakawa M, Kiyama-Kishikawa M, Sasaki Y, Hirai T, Abiko Y (2008) Role of the hemin-binding protein 35 (HBP35) of *Porphyromonas gingivalis* in coaggregation. *Microb Pathog* 44, 320-328.
- 25) Ohno T, Okahashi N, Kawai S, Kato T, Inaba H, Shibata Y, Morisaki I, Abiko Y, Amano A (2006) Proinflammatory gene expression in mouse ST2 cell line in response to infection by *Porphyromonas gingivalis*. *Microbes Infect* 8, 1025-1034.

- 26) 岩崎宏泰, 田村宗明, 西田哲也, 嶋田浩一, 五十嵐建夫, 菅野直之, 伊藤公一 (2004) アルカリイオン水の口腔細菌に対する影響 — 殺菌効果, 細胞毒性および変異原性—. 口腔機水誌 5, 3-6.
- 27) Potempa J, Pike R, Travis J (1995) The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either arg-gingipain or lys-gingipain. Infect Immun 63, 1176-1182.
- 28) Amano A, Fujiwara T, Nagata H, Kuboniwa M, Sharma A, Sojar HT, Genco RJ, Hamada S, Shizukuishi S (1997) *Porphyromonas gingivalis* fimbriae mediate coaggregation with *Streptococcus oralis* through specific domains. J Dent Res 76, 852-857.
- 29) Agnani G, Tricot-Doleux S, Du L, Bonnaure-Mallet M (2000) Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to gingival epithelial cells: modulation of bacterial protein expression. Oral Microbiol Immunol 15, 48-52.
- 30) Chen T, Nakayama K, Belliveau L, Duncan MJ (2001) *Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. Infect Immun 69, 3048-3056.
- 31) Hamada N, Sojar HT, Cho MI, Genco RJ (1996) Isolation and characterization of a minor fimbria from *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 64, 4788-94.
- 32) Duchesne P, Grenier D, Mayrand D (1995) Demonstration of adherence properties of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles using a new microassay. Oral Microbiol Immunol 10, 76-80.

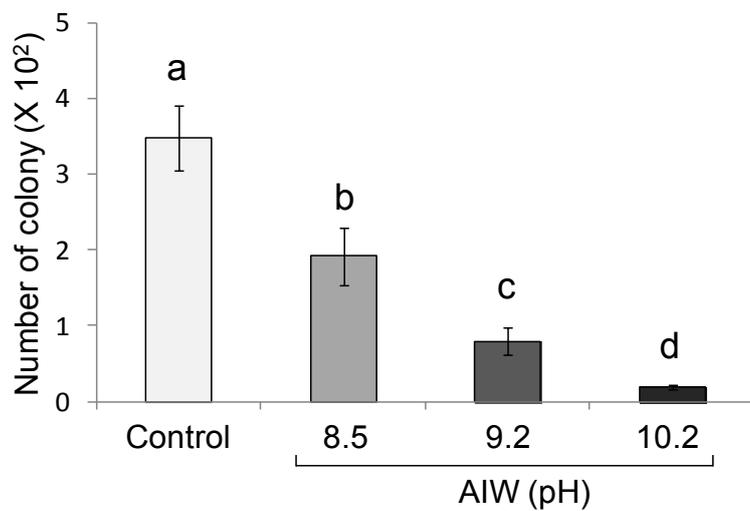
- 33) Nakagawa T, Sims T, Fan Q, Potempa J, Travis J, Houston L, Page RC (2001)
Functional characteristics of antibodies induced by arg-gingipain (HRgpA) and
lys-gingipain (Kgp) from *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol Immunol 16,
202-211.

図および表

A) 処理時間の影響

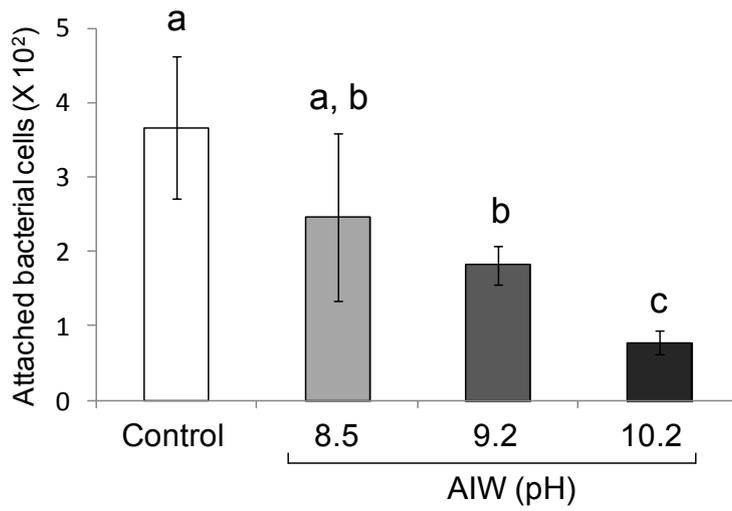


B) pH の影響



第1図 形成コロニー数

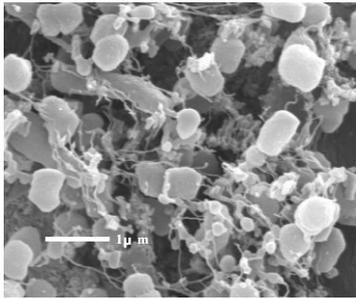
a, b, c, d: 小文字間で有意差あり ($p < 0.01$)。



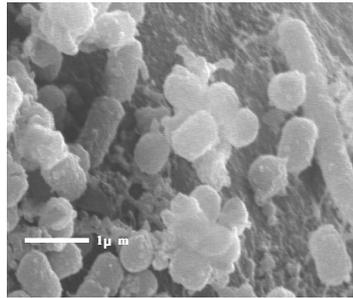
第 2 図 口腔上皮粘膜細胞への付着菌数

a, b, c : 小文字間で有意差あり ($p < 0.01$)。

A) Control

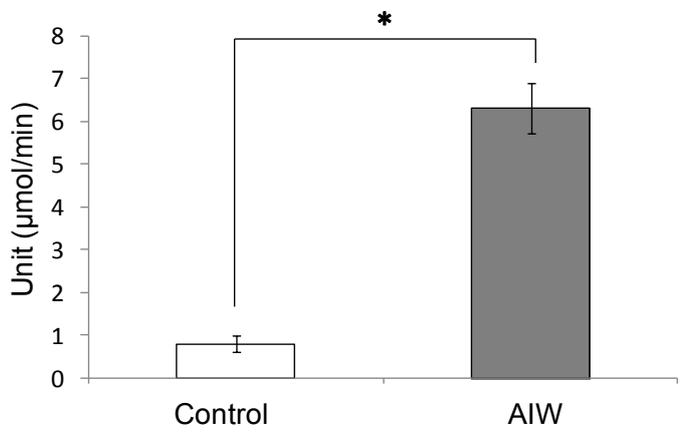


B) AIW



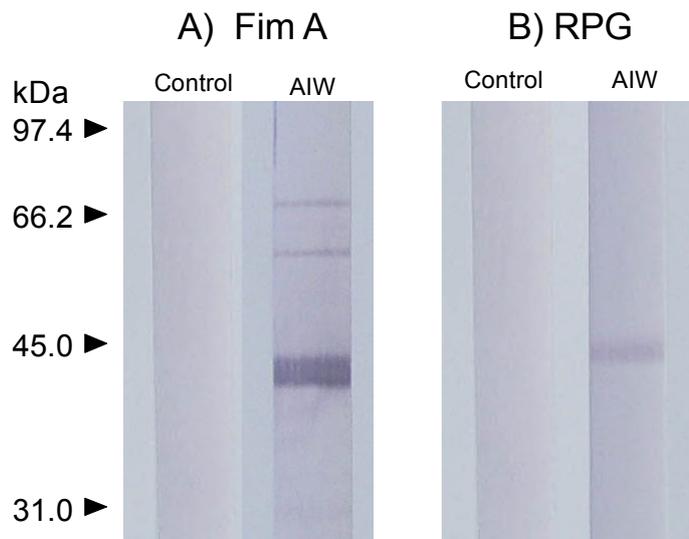
(X 10,000)

第 3 図 走査電子顕微鏡像

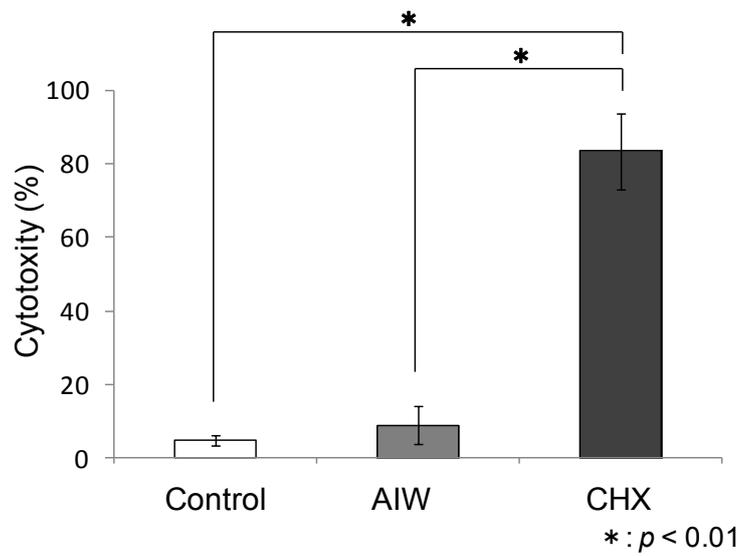


* : $p < 0.01$

第 4 図 プロテアーゼ活性



第5図 ウェスタンブロット法



第6図 細胞毒性