

過酸化水素と 405 nm LED 照射から発生した
ヒドロキシラジカルによる *Candida albicans* の殺菌効果

日本大学松戸歯学部口腔健康科学講座

歯科臨床検査医学分野

中西一、小西賀美、小峯千明

(指導：福本雅彦教授)

Abstract

In recent years, various methods have been applied to prevent aspiration pneumonia in elderly people, such as oral rinsing and denture cleaning. Antimicrobial photodynamic therapy (a-PDT), which has fewer side effects, is attracting attention.

Many studies have demonstrated that using a-PDT for bactericidal effect requires many variables to be taken into account. So, when developing the a-PDT protocol, including light parameters, photosensitizers, and light delivery techniques. However, although a-PDT has been shown to induce bactericidal effects by reactive oxygen species (ROS), the details of the amount of generated ROS is unclear. Also, the degree of bactericidal effects have not yet been clarified. Especially, little is known on the fungicidal effect on *Candida albicans* (*C. albicans*), which is one of the causative bacteria of aspiration pneumonia, by using a-PDT. Therefore, the details of ROS's effect via a-PDT on *C. albicans* that propagate in oral devices, such as dentures, should be examined. Moreover, it is necessary to investigate whether a-PDT is effective

in preventing aspiration pneumonia.

Thus, this study aimed to examine the amount of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) generated from hydrogen peroxide (H_2O_2) via 405 nm LED irradiation by using an electron spin resonance (ESR). Then, to clarify the effect of $\cdot\text{OH}$ on *C. albicans* was studied using a fungicidal test.

The photocatalyst and the visible light were used with a 1M H_2O_2 , and 405 nm LED light source (8.69 mW/cm^2). The experimental groups were allocated into four groups; phosphate buffered saline (PBS) only (control group), 1M H_2O_2 only (H_2O_2 group), 405 nm irradiation only (405 nm group), and combined with 1M H_2O_2 +405 nm irradiation (405 nm+ H_2O_2 group).

The amount of $\cdot\text{OH}$ was measured by an ESR by a spin-trapping method using DMPO. The mixture of PBS or 1M H_2O_2 (510 μM) with DMPO (90 μM) was immediately left at room temperature or irradiated by 405 nm LED for 60, 120, 180, 240, and 300 seconds. *C. albicans* was grown on a brain heart infusion agar and was adjusted to 1×10^6 cells/mL of PBS. The mixture of PBS or 1M H_2O_2 (510 μM) with *C. albicans* suspension (90 μL) was irradiated by

405 nm LED for 60, 180, and 300 seconds. Then, *C. albicans* was incubated at 37°C for 48 hours on the agar plate and counted the colony forming unit (CFU) per volume of *C. albicans* suspension (CFU/mL) to investigate the fungicidal effects of $\cdot\text{OH}$. The survival rate compared to the control was then evaluated.

In 405 nm+ H₂O₂ group, the amount of $\cdot\text{OH}$ -generated was increased significantly by irradiation in a time-dependent manner compared with the other groups (p<0.05). In brief, at least 59 μM , 143 μM , and 179 μM of $\cdot\text{OH}$ were detected after 60, 180 and 300 seconds, respectively. In the fungicidal test, control and 405 nm groups showed no fungicidal effect. The H₂O₂ group showed a significant fungicidal effect after 180 (60%) and 300 (56%) seconds compared to the control and 405 nm groups (p<0.05), however, no significant difference was observed in the 405 nm + H₂O₂ group (p>0.05). In 405 nm + H₂O₂ group, the survival rate decreased dependently on the LED irradiation time: 60 (34%), 180 (7%), and 300 (2%) seconds showing a significant decrease compared to all groups (p<0.05).

From the above, our findings suggest that at least 179 μM generated $\cdot\text{OH}$

are necessary to achieve the fungicidal effects (>95%) on *C. albicans*.

Additionally, it is considered that a-PDT using $\cdot\text{OH}$ is an effective cleaning method.

Keywords:

405 nm LED, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, electron spin resonance,

Candida albicans

緒言

2017年より厚生労働省が人口動態統計の中で「肺炎」から「誤嚥性肺炎」を別項目として集計するようになった。誤嚥性肺炎は本邦死因の第7位である。肺炎は今後、減少傾向を辿ると予測されている。一方、誤嚥性肺炎は将来的に2030年まで増加が予想される¹⁻³⁾。超高齢社会を向かえている我が国においては、歯科診療所においてのみではなく在宅や介護施設において高齢者の口腔環境を良好に保つことが誤嚥性肺炎対策として重要とされている⁴⁾。

高齢者は加齢や何らかの全身疾患に対する服薬などによる唾液量の減少⁵⁾や歯の喪失⁶⁾に伴い義歯を装着した場合、義歯の清掃不良など口腔環境の悪化を引き起こす因子をもつことが多い。一方、口腔環境の悪化に関連する菌として *Candida* 属がある。その中の *Candida albicans* (以

下 *C. albicans*) は通常は病原性や増殖性が弱い日和見菌だが、加齢や服薬などにより全身の免疫力が低下すると増殖して病原性を示し日和見感染を発症させる⁷⁾。また高齢者に装着頻度が高い有床義歯において義歯床用レジンは特に義歯床粘膜面は唾液による自浄作用が少ないため、デンチャープラークが付着しやすいことが知られている⁸⁾。デンチャープラークは口腔常在菌から構成されるがその中でも高頻度で *C. albicans* が検出される^{9,10)}。*C. albicans* のように菌糸型あるいは仮性菌糸と酵母型の二形性を示す菌種では、菌糸が粘膜へ侵入し強固に固着することによって再発を繰り返し難治性口腔カンジダ症に進行することも稀ではない。更に、誤嚥により真菌性肺炎を惹起するリスクも高くなる。それ故、義歯をはじめとする口腔内装置における *C. albicans* 生息の温床となり得るデンタルプラークをコントロールすることは極めて重要であると考えられる。

一般に有床義歯の清掃には、義歯用ブラシを使用する機械的清掃と義歯用洗浄剤を用いる化学的清掃の 2 つに大きく分けることができる¹¹⁾。

特に後者の方法では、酵素系洗浄剤や過酸化物を加えた酵素系洗浄剤のタイプに分類され高いデンチャープラークの除去効果を示している^{9,11)}。

しかし、佐藤ら¹²⁾は肉眼で確認できる *Streptococcus mutans* と *C. albicans* の混合培養のバイオフィルム付着が認められる義歯の場合において、義歯洗浄剤に義歯を 5 分浸漬した条件で、そのバイオフィルムの殺菌率は約 60% 程度でそのまま 24 時間放置すると元の菌数に戻ってしまうこと、さらに一晩浸漬した条件においてもその殺菌率は約 85% 程度の除菌効果であることから完全な除菌は困難であり、そのため義歯の望ましい清掃方法は、義歯用ブラシで徹底したバイオフィルムを除去した後、一晩浸漬する必要があると報告している。

近年、光増感剤に特定の励起光を照射しそこから発生する活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)によって殺菌する抗菌的光線力学療法 (antimicrobial Photodynamic Therapy; a-PDT)をはじめとする様々な光線力学反応を用いた殺菌方法^{13,14)}が着目されている。特に光線力学反応を使用した方法は発生させる ROS の種類によっては真核細胞には比較的安全に使用可能であることが報告^{15,16)}されている。Tatsumi-Araiらは有床義歯上に培養した *C. albicans* に対して 405 nm LED 青色光を照射することでその光線力学反応によって照射時間依存的に殺菌効果を示したと報告している¹⁷⁾。また Ikaiらのグループは過酸化水素 (H_2O_2)を光触媒として用い、青色光を照射することで発生する ROS の中でも最も強い酸化力を有するヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)でう蝕病原菌、歯周病関連菌および難治性根尖性歯周炎関連菌の殺菌をするシステムの先駆者

としてその効果を多数報告¹⁸⁻²³⁾している。しかしながら、 H_2O_2 を光触媒として用いた $\cdot\text{OH}$ の発生量と *C. albicans* の殺菌効果を検討した報告はない。

そこで本研究では、科学的根拠に基づいた義歯をはじめとする口腔内装置洗浄方法の構築のため、 H_2O_2 に対して 405 nm LED 青色光を照射する事で発生した $\cdot\text{OH}$ 量を測定し *C. albicans* の殺菌効果を検討した。

方法および材料

1. H₂O₂ および光源

H₂O₂ の光分解による・OH 発生系は Ikai らの報告¹⁸⁾より、1M H₂O₂ (富士フイルム和光純薬、大阪)を使用した。また、光源には 405 nm LED 照射器(8.69 mW/cm²、モリタ製作所、京都)を用いて最大 5 分間照射 (2.6 J/ cm²)を行った。

2. *C. albicans* の培養

C. albicans (ATCC18804 株) は、brain heart infusion (BHI、Becton、Dickinson and Co., NJ、USA) 培地を用いて 37°C、24 時間好気培養を行った。その後、増殖した菌体を遠心分離 (10,000 rpm x 10 min) 行い、phosphate buffered saline (PBS, pH7.4) で 2 回洗浄後、1 x 10⁶ 個/mL となるように調整した。

3. H₂O₂に光照射することで得られた・OHの測定および定量

実験群は 1M H₂O₂ に対して 405 nm LED 照射した群 (405 nm + H₂O₂ 群)、PBS に対して 405 nm LED 照射した群 (405 nm 群)、1M H₂O₂ を室温放置した群 (H₂O₂ 群) およびコントロールとして PBS を室温放置した群 (control 群) の 4 群とした。

・OH の測定には 2,2-Dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole N-oxide (DMPO、890 mM/L、Labotec、東京) を捕捉剤として用い、その酸化によって生じた安定ラジカル生成物である DMPO 付加物 (DMPO-OH、図 1a) を電子スピンの共鳴 (ESR、JES JFA-200、JEOL、東京) において捕捉し測定を行った。つまり 24 well plate の 1 well 内に PBS もしくは 1M H₂O₂ (510 μL) と DMPO (90 μL) を混和し、そこへ室内放置あるいは照射を 60、120、180、240 および 300 秒間の経時的な・OH spin adduct の測定を行った

(n=5)。

得られた spin adduct は、標準マーカーであるマンガン (MnO) マーカーとの高さの比からそれぞれ signal intensity (SI 値) を求め、予め測定しておいた安定な標準物質である 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidine-1-oxyl (TEMPO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) の各濃度から得た SI 値 (図 1b) と比較することで、発生した $\cdot\text{OH}$ 量を定量した。

$\cdot\text{OH}$ を検出した際に使用した ESR 測定条件を以下に示す。すなわち、microwave power 4 ± 0.05 mW、magnetic field 335 ± 5 mT、modulation width 0.1 mT、time constant 0.03 seconds、sweep width 5 mT、sweep time 1 minutes、amplitude 80 で測定を行った。

4. *C. albicans* の殺菌試験

実験群は上記と同様に control 群、 H_2O_2 群、405 nm 群および 405 nm

+ H₂O₂ 群とし行った。つまり、1M H₂O₂ (510 μL)に対して DMPO (90 μL)を *C. albicans* 混濁液 (90 μL)に置換し混合後、それぞれの群の 60 秒、180 秒および 300 秒作用後の試料液を 100 μL 分取し連続段階希釈法を行い、サブロー寒天平板培地 (Difco, MI, USA) 上において 37°C で 48 時間好気培養を行った。さらに培養終了後、コロニー数から生菌数 (CFU/mL) を測定し、その後 control 群の CFU と比較した生存率を評価した。

5. 統計処理

得られた結果は、分散分析後、Scheffe の多重比較検定を行った。なお、解析は統計解析ソフト IBM SPSS Statistics ver.22 (IBM, Tokyo, Japan) を用い、いずれの検定手法も有意確率は 5%とした。

結果

1. H₂O₂ に光照射することで得られた・OH 量の測定および定量

405 nm + H₂O₂ 群では、DMPO-OH の spin adduct を示す 1:2:2:1 (超微細結合定数 $a_N=1.49$ mT) を示し (図 2)、LED 照射時間依存的に DMPO-OH 生成量は増加した。また、照射 60 秒後からすべての群間との比較において DMPO-OH 生成量は有意に増加した ($p < 0.05$)。

さらに、H₂O₂ 群では時間依存的に・OH 発生量は増加したが、control 群と比較し DMPO-OH 生成量に有意な差は認めなかった ($p > 0.05$)。一方、control 群および 405 nm 群においてはほとんど・OH の発生は認めなかった (図 3)。

2. *C.albicans* の殺菌試験

control 群および 405 nm 群では、300 秒作用した際の生存率に変化は

認められなかった。また H₂O₂ 群では、作用 180 秒後から生存率 60% 程度、300 秒後で 56% 程度であり、作用 180 秒後から *C. albicans* の生存率は control 群および 405 nm 群と比較して有意な低下を示した。一方、405 nm + H₂O₂ 群においては作用 60 秒後から生存率が 34% 程度、180 秒後では 7%、300 秒後では 2% と LED 照射時間依存的に生存率の低下を認めた。さらに、60 秒後以降の *C. albicans* の生存率においては control 群、405 nm 群および H₂O₂ 群間と比較して有意な生存率の低下を認めた (図 4)。

考察

義歯を使用している高齢者において、義歯を適切に清掃できる人の割合は 16.7%しかいないという報告がある²⁴⁾。この原因として、義歯の形態が複雑であること²⁵⁾や、義歯の正しい清掃方法を理解していない²⁶⁾ということが挙げられる。そのような背景からより簡易で効率の良い義歯清掃方法の開発が求められ、様々な方法が試みられている²⁷⁻²⁹⁾。しかしながら、選択肢の幅こそ増加しているものの、劇的な効果を得るまでには至らないのが現状である。

そこで本研究では、a-PDT を義歯洗浄に応用すべく日常においても外用殺菌消毒剤として頻用される 2.5~3.5 w/v% オキシドール (約 1 M H_2O_2 に相当) を光触媒として用いて、そこへ人体にも使用可能な可視光線である 405 nm LED を照射することで H_2O_2 の光分解反応より発生し

た・OHの*C. albicans*に対する殺菌効果を評価した。結果、1 M H₂O₂に405 nm LEDを照射することで照射時間依存的に・OH発生量が増加し、それに伴って*C. albicans*の生存率は低下した。つまり、*C. albicans*を60%、90%および95%以上殺菌するためには少なくとも・OH発生量がそれぞれ約59 μM、143 μMおよび179 μMが必要であったことが示唆できる。すなわち光分解反応を用いた*C. albicans*の殺菌は、60秒照射という短時間で一定の効果を示すことが可能である。

一方、・OHが発生しなかったcontrol群および405 nm群では*C. albicans*の殺菌効果を認めなかったため、本方法における*C. albicans*の殺菌効果には・OHがその殺菌メカニズムに関与していると推察できた。しかしながら、H₂O₂群においてもまた*C. albicans*に対して若干ながら殺菌効果を認めた。この効果については、発生していた微量の・OHが少

なからず影響しているものと考えられるが、それ以外にも H_2O_2 自身を持つ性質が大きく関わっていると考ええる。すなわち、 H_2O_2 は不対電子を持たず、ROS ではあるがフリーラジカルではない物質であるため、不安定で酸素を放出しやすい性質を有する。すなわち、光分解されない環境下においても Fe^{2+} などの金属イオン存在下で $\cdot\text{OH}$ を産生しやすい性質 (Fenton 反応もしくは Fenton 様反応) を有している。また、 H_2O_2 自身が細胞膜を自由に通過できるため細胞内の Fe^{2+} と Fenton 反応することで $\cdot\text{OH}$ に変換可能なことが知られている³⁰⁾。 *C. albicans* は真核細胞であり、細胞内の維持恒常のため Fe 代謝機構を有しており、細胞膜を通過した H_2O_2 によって Fenton 反応が惹起され $\cdot\text{OH}$ が細胞内から発生したことも考えられる。 *C. albicans* の細胞内で発生した $\cdot\text{OH}$ は DNA 損傷³¹⁾ や蛋白質あるいは細胞膜の脂質分子を攻撃を与える³²⁾。さらにそこから

二次的なより寿命の長いラジカルを発生させる可能性もあり、脂質過酸化連鎖反応等を起こすこと³³⁾から、微量に発生した $\cdot\text{OH}$ であっても *C. albicans* の殺菌効果を認めたことが推察できる。

同時に H_2O_2 自身もまた一般細菌やウイルスを 5~20 分で、芽胞を 3 時間で殺菌でき、広範囲抗微生物スペクトルを示すことが報告³⁴⁾あるため、このようなことから H_2O_2 単独作用であっても *C. albicans* に対して殺菌効果が認められたものと考えた。

一般に $\cdot\text{OH}$ をはじめとする生体内で産生された ROS の場合、体内に侵入する微生物に対しては殺菌作用を示し感染から宿主を感染から守っている。一方で、ROS はラジカル連鎖反応により生体機能を障害しうる有毒反応産物を増加させ、様々な病態を増悪させる危険性を有するといわれている³⁵⁾。今回の結果から光分解反応を用いた *C. albicans* の殺菌

方法は完全な殺菌効果は得られなかったものの、機械的清掃と併用することによって有意義な方法であると考えられた。さらに、我々はメチレンブルーを光増感剤として、および励起光に 660 nm レーザー光を用いて a-PDT から発生した ROS の一種である一重項酸素を発生させ *C. albicans* に作用し殺菌メカニズムの検討した研究¹³⁾では、その有効な殺菌効果には照射 20 分以上を要したことから・OHを用いた a-PDT は短時間で有効な殺菌効果を得られるものと期待できる。・OHを応用するにあたり留意しなくてはならない点は、*C. albicans* に対して高い殺菌効果を示した約 179 μM の・OH量は非常に強い酸化力を有し、生体に対しては強い為害性があることである。その点に関しては、本研究は本法を口腔外で使用することで応用しようと考えているため生体為害性については除外できる。しかし、多量な・OHがレジン床などの口腔内装置に対し

て表面を粗造にさせる可能性も否定できない。粗造になってしまうとデンチャープラークの容易に再付着しやすくなることも考えられるため、今後・OHを暴露させた際のレジン床表面の形態変化についても検討していく必要があると考える。

結論

本研究では H_2O_2 を光触媒として 405 nm LED を照射し、光分解反応から発生した・OH を ESR spin trapping 法を用いて測定し、*C. albicans* に対する殺菌効果を評価した。その結果、405 nm LED を H_2O_2 に対して照射することで照射時間依存的に・OH 発生量が増加し、*C. albicans* を 60%、90% および 95% 以上殺菌するためには少なくとも・OH 発生量が約 59 μM 、143 μM および 179 μM がそれぞれ必要であった。以上のことから、可視光線領域の光源を用いた光分解反応を用いた洗浄方法は、*C.*

albicans が繁殖しうる義歯などの口腔内装置に対して、照射 60 秒という短時間で効率よく殺菌可能であり、さらに光源出力や H₂O₂ 濃度の条件設定を変えることで口腔カンジダ症や誤嚥性肺炎の予防に有効な方法として期待できる。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP19K19076 の助成を受けたものである。

利益相反

著者全員に一切の利益相反はない。

参考文献

1. 厚生労働省：平成 30 年人口動態統計年報、2018.

(<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suii09/deth2.html>)

2. 木田厚瑞：嚥下性肺炎、Geriatr Med、19: 1251-1254、1981.
3. 桂秀樹、山田浩一、木田厚瑞：高齢者における反復した顕性誤嚥症例の臨床的研究、日老医誌、35：363-366、1998.
4. 米山武義：誤嚥性肺炎予防における口腔ケアの効果、日老医誌、38：476-477、2001.
5. 秋本和宏、下山和弘：薬物による口腔乾燥症とその対処法、老年歯科医誌、19：178-183、2004-2005.
6. 金田敏郎：口腔の老化（歯牙喪失）、日老医誌、27：138-142、1990
7. Sakaguchi H: Treatment and Prevention of Oral Candidiasis in Elderly

- Patients. Jpn. j. med. mycol, 58: 43-49, 2017.
8. 佐藤 薪、大島 朋子、前田 伸子、大久保 力廣：義歯床用レジンの洗浄法によるバイオフィルム除去効果と表面粗さの変化、日補綴会誌、5: 174-183、2013.
 9. 二川 浩樹、浜田 泰三：デンチャープラーク 口腔ケアのためのフォローアップシステム、補綴臨床別冊：225-227、1996.
 10. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T: Denture plaquepast and recent concerns. J Dent, 26: 299-304, 1998.
 11. 二川 浩樹、田地 豪：義歯洗浄剤 何を使ったら良いのでしょうか？、日補綴会誌、10: 40-45、2018.
 12. 佐藤 薪、漆原 優、大島 朋子、前田 伸子、大久保 力廣：義歯の正しいメンテナンス指導----義歯床用レジンの洗浄法によるバイオフィルム

除去効果と表面粗さの変化(解説)、 補綴臨床 47 : 304-311、2014.

13. Komine C, Tsujimoto Y: A Small Amount of Singlet Oxygen Generated via Excited Methylene Blue by Photodynamic Therapy Induces the Sterilization of *Enterococcus Faecalis*. J Endod,39:411-413, 2013.

14. Komine C, Takahashi C, Omori H, Ogura Y, Konishi Y, Suzuki H, Otsuka I, Fuchigami M, Tsuzukibashi O, Fukatsu A, Tsujimoto Y, Fukumoto M: Bactericidal Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy Using Visible Light - responsive Titanium Dioxide - the First Report -. Int J Oral-Med Sci, 18:155-163, 2020.

15. Nakano M, Kambayashi Y, Tatsuzawa H, Komiyama T, Fujimori K: Useful $^{1}O_2$ ($^{1}\Delta_g$) generator, 3-(4'-methyl-1'-naphthyl)-propionic acid, 1',4'-endoperoxide (NEPO), for dioxygenation of squalene (a skin surface lipid)

- in an organic solvent and bacterial killing in aqueous medium. FEBS Lett, 432: 9-12, 1998.
16. Tatsuzawa H, Maruyama T, Misawa N, Fujimori K, Hori K, Sano Y, Kambayashi Y, Nakano M : Inactivation of bacterial respiratory chain enzymes by singlet oxygen. FEBS Letters, 439: 329-333, 1998.
17. Tsutsumi-Arai C, Arai Y, Terada-Ito C, Takebe Y, Ide S, Umeki H, Tatehara S, Tokuyama-Toda R, Wakabayashi N, Satomura K: Effectiveness of 405-nm blue LED light for degradation of Candida biofilms formed on PMMA denture base resin. Lasers in Medical science, 34: 1457-1464, 2019.
18. Ikai H, Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Iwasawa A, Sasaki K, Niwano Y, Kohno M: Photolysis of hydrogen peroxide, an effective disinfection system via hydroxyl radical formation. Antimicrob Agents Chemother, 54:

5086-5091, 2010.

19. Ikai H, Nakamura K, Kanno T, Shirato M, Meirelles L, Sasaki K, Niwano

Y: Synergistic effect of proanthocyanidin on the bactericidal action of the

photolysis of H₂O₂. *Biocontrol Sci*, 18: 137-141, 2013.

20. Kanno T, Nakamura K, Ikai H, Kikuchi K, Sasaki K, Niwano Y: Literature

Review of the Role of Hydroxyl Radicals in Chemically-Induced

Mutagenicity and Carcinogenicity for the Risk Assessment of a

Disinfection System Utilizing Photolysis of Hydrogen Peroxide. *J Clin*

Biochem Nutr, 51: 9-14, 2012.

21. Oyamada A, Ikai H, Nakamura K, Hayashi E, Kanno T, Sasaki K, Niwano

Y: In Vitro Bactericidal Activity of Photo-Irradiated Oxydol Products via

Hydroxyl Radical Generation. *Biocontrol Sci*, 18: 83-88, 2013.

22. Ikai H, Odashima Y, Kanno T, Nakamura K, Shirato M, Sasaki K, Niwano Y: In Vitro Evaluation of the Risk of Inducing Bacterial Resistance to Disinfection Treatment With Photolysis of Hydrogen Peroxide. PLoS One, 25, 8: e81316, 2013.
23. Sato H, Niwano Y, Nakamura K, Mokudai T, Ikai H, Kanno T, Egusa H: Efficacy and Safety of a Therapeutic Apparatus Using Hydrogen Peroxide Photolysis to Treat Dental and Periodontal Infectious Diseases. J Toxicol Sci, 41: 793-799, 2016.
24. Aydan K, Figen D, Yasemin S: Oral Candidosis, Denture Cleanliness and Hygiene Habits in an Elderly Population. Aging Clin Exp Res, 17: 502-507, 2005.
25. Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A: Oral hygiene habits, denture

- cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. J Oral Rehabil, 29: 300-304, 2002.
26. Jagger DC, Harrison A: Denture Cleansing--The Best Approach. Br Dent J, 178: 413-417, 1995.
27. Kuroki K, Hayashi T, Sato K, Asai T, Okano M, Kominami Y, Okano M, Takahashi Y, Kawai T: Effect of self-cured acrylic resin added with an inorganic antibacterial agent on *Streptococcus mutans*. Dent Mater J, 29: 277-285, 2010.
28. Regis RR, Zanini AP, Della Vecchia MP, Silva-Lovato CH, Oliveira Paranhos HF, de Souza RF : Physical properties of an acrylic resin after incorporation of an antimicrobial monomer. J Prosthodont, 20: 372-379, 2011.

29. 澤田 智史：光触媒技術を応用したセルフクリーニングデンチャーの開発、日補綴会誌、5：130-134、2013.
30. 吉川敏一：酸化ストレスフリーラジカル医学生物学の最前線、第1章酸化ストレスの基礎、黒瀬等編集、29-32、医歯薬出版株式会社、東京、2001.
31. Mizutani H, Oikawa S, Hiraku Y, Murata M, Kojima M, Kawanishi S :
Distinct Mechanisms of Site-Specific Oxidative DNA Damage by
Doxorubicin in the Presence of copper(II) and NADPH-cytochrome P450
Reductase. *Cancer sci*, 94: 686-691, 2003.
32. 坂元仁・土戸哲明：細菌の酸化ストレス防御システムと酸化系抗菌剤の作用メカニズム、*Jpn. J. Food Microbiol.*, 23 (2), 41-52, 2006.
33. Juven BJ, Pierdon MD: Antibacterial effects of hydrogen peroxide and

methods for its detection and quantitation. J. Food Prot, 59 (11), 1233-1241, 1996.

34. Baldry MGC: The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. J Appl Bacteriol , 54: 417-423, 1983.

35. 今田伊助、佐藤英介、井上正康：生体における活性酸素・フリーラジカルの産生と消去：化学と生物、37：411-419、1999.

図の説明

図 1a : $\cdot\text{OH}$ 補促剤 DMPO と adduct 形成反応

図 1b : 各濃度 TEMPOL から得たスタンダード曲線

図 2: 405 nm + H_2O_2 群から生じた照射時間経時的な DMPO-OH の ESR

スペクトル

(a) 0 秒 (b) 60 秒照射 (c) 120 秒照射 (d) 180 秒照射 (e) 240

秒照射 (f) 300 秒照射

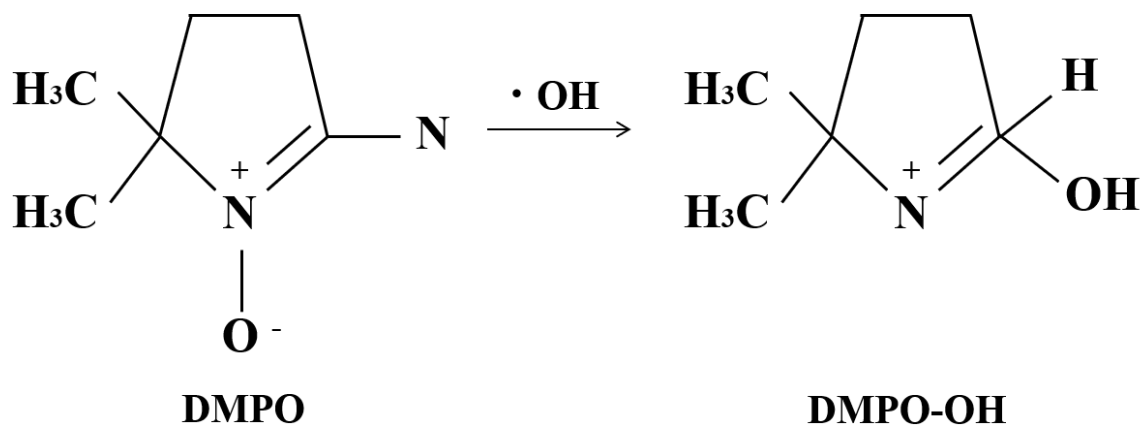
● は Mn マーカー、○ は DMPO-OH の spin adduct を示す

図 3 : 照射時間の条件下における 4 群間の $\cdot\text{OH}$ 発生量

図 4 : 照射時間の条件下における 4 群間の *C. albicans* 生存率

☒

☒ 1a



☒ 1b

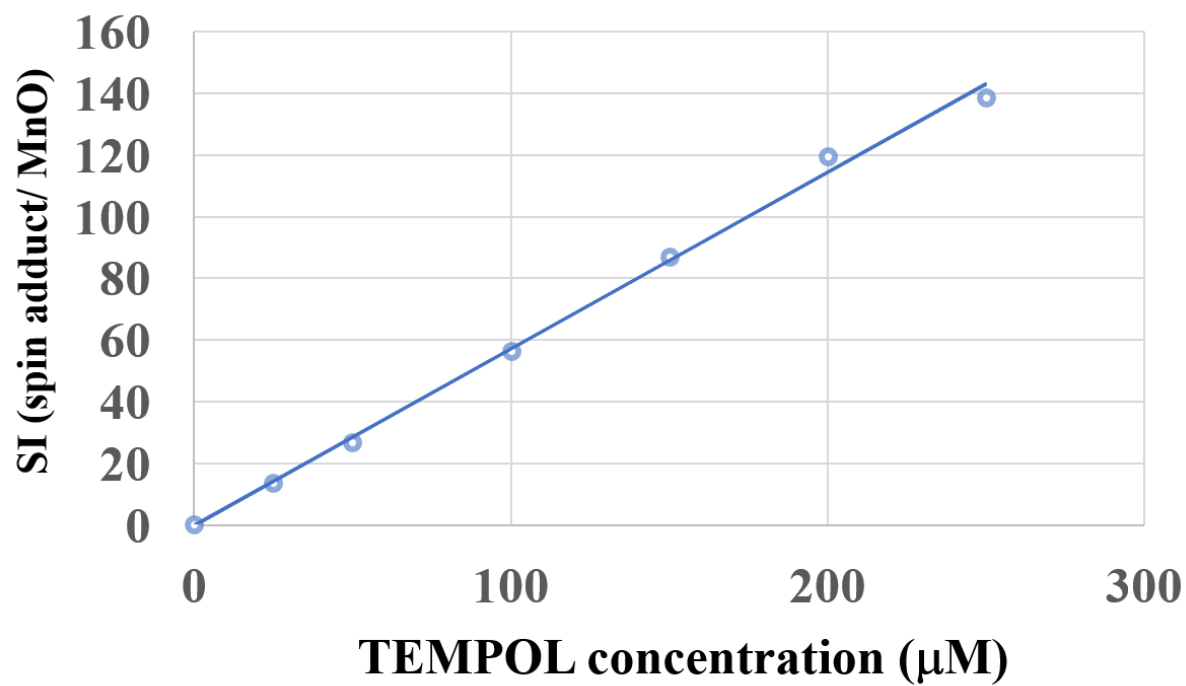


图 2

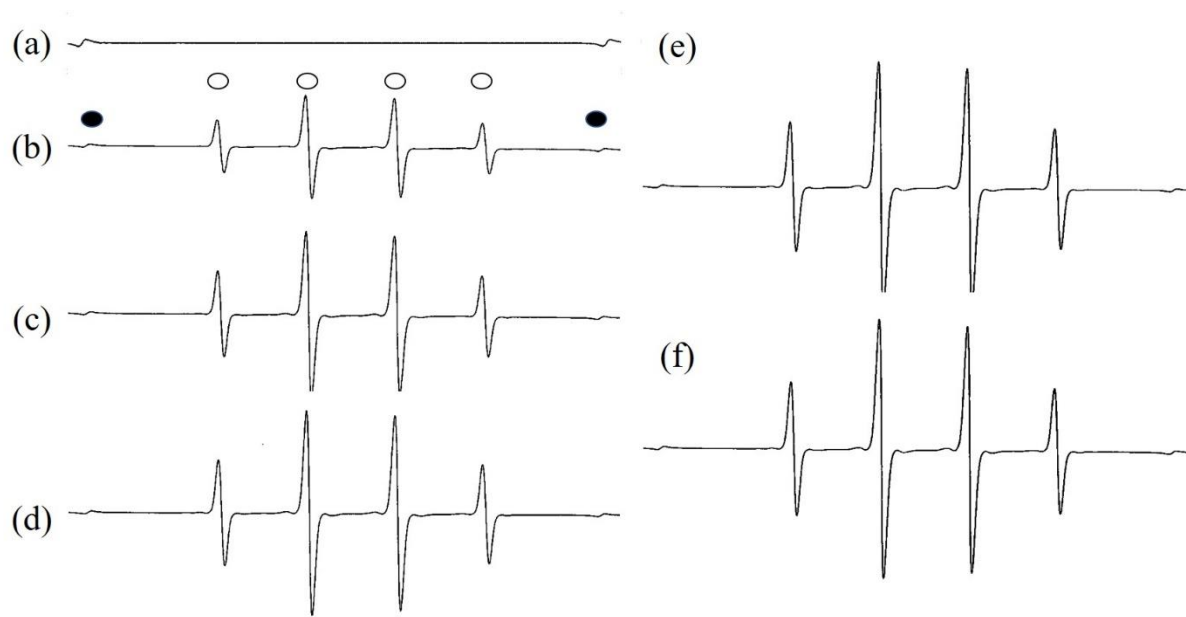


图 3

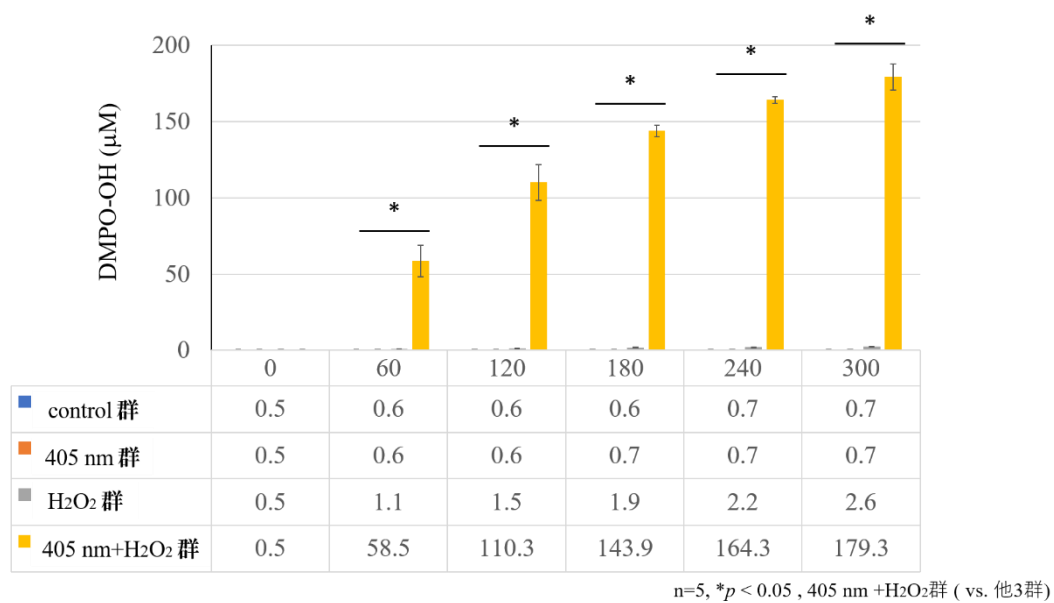
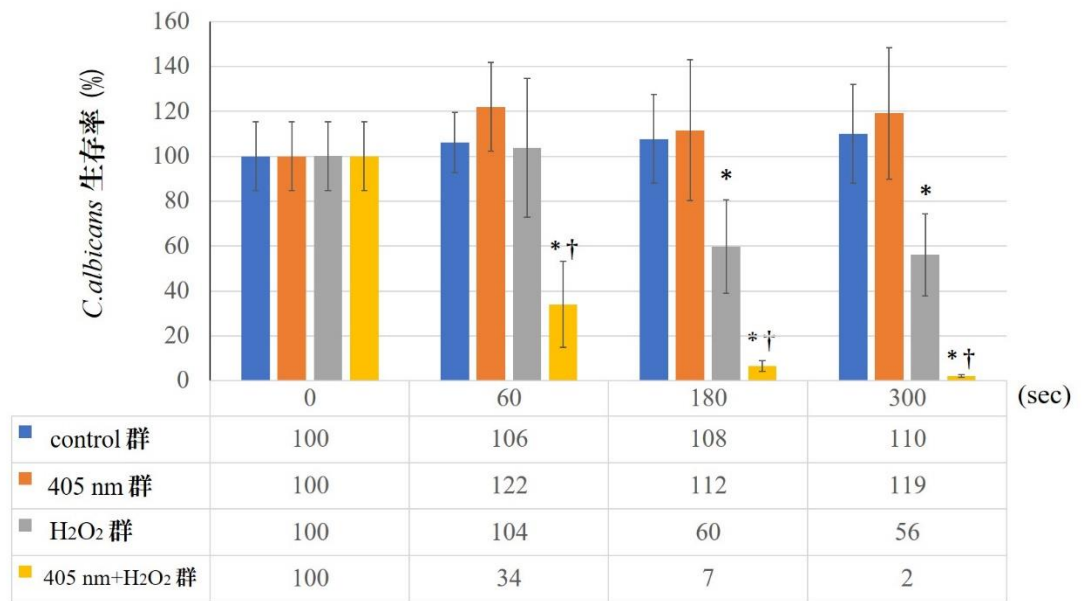


図 4



* $p < 0.05$ (vs. control, 405 nm)

† $p < 0.05$ (vs. H₂O₂)