

## 重曹を添加した電解次亜塩素酸水の *Streptococcus mutans* に対する殺菌効果およびバイオフィーム除去効果

井上 吉 登      佐藤 武 則\*      藤田 茉衣子  
大久保 孝一郎      熊田 秀 文\*\*      浜田 信 城\*  
木 本 茂 成

神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔機能成育歯科学講座

\* 神奈川歯科大学大学院歯学研究科微生物感染学講座

\*\* 神奈川歯科大学大学院歯学研究科歯科教育学講座

(受付: 2014年8月29日)

Antibacterial activity and biofilm removal of electrolyzed dilute sodium hypochlorite solution mixed with a sodium hydrogen carbonate against *Streptococcus mutans*

Yoshinori INOUE, Takenori SATO\*, Maiko FUJITA, Koichiro OOKUBO, Hidefumi KUMADA\*\*, Nobushiro HAMADA\* and Shigenari KIMOTO

Department of Dentistry for growth and Development of Oral function, Graduate School, Kanagawa Dental University

\* Department of Microbiology, Graduate School, Kanagawa Dental University

\*\* Department of Dental Education, Graduate School, Kanagawa Dental University

82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa, 238-8580, Japan

### Abstract

Oral biofilms, more commonly known as dental plaque, have been shown to trigger dental caries and periodontitis. *Streptococcus mutans* is an early colonizer and plays an important role in dental plaque formation. This study evaluated the bactericidal effect against *S. mutans* cells and the removal of *S. mutans* biofilm of a 0.05% electrolyzed dilute sodium hypochlorite solution mixed with 6% sodium hydrogen carbonate (SHC + HClO). Distilled water was used as the negative control. To evaluate the bactericidal effect of SHC + HClO, a 20- $\mu$ L quantity of bacterial suspension ( $6.9 \times 10^9$  CFU/mL) was exposed for 5 min and 30 min to 4 mL SHC + HClO at 20°C or 35°C. After incubation, the bactericidal effect was determined by a viable count of the number of *S. mutans* cells. *S. mutans* biofilm was allowed to grow anaerobically on 12-well polystyrene plates with sterilized coverslips at 37°C. After incubation, the biofilm was treated with SHC + HClO for 5 min, 15 min, and 30 min, after which the coverslips were washed with PBS, and the biofilm was removed with 1N-NaOH. Biofilm removal assay was used to evaluate the absorbance of the inoculum containing removed biofilm at an optical density of 550 nm. The bactericidal effect indicated that SHC + HClO reduced the number of *S. mutans* cells in a time-dependent manner. The bactericidal rate of SHC + HClO at 35°C exposed for 5 min was 100%, and the biofilm removal rate was 92.6% for 15 min, which was significantly higher than that of both distilled water and 6% sodium hydrogen carbonate ( $p < 0.01$ ). These findings suggest that electrolyzed dilute sodium hypochlorite mixed with sodium hydrogen carbonate solution contributes to the reduction in bacterial cells and biofilms at 35°C for 15 min, which may be an effective functional water for oral biofilms.

## 緒 言

歯科の2大疾患であるう蝕および歯周疾患は、700種類以上の口腔細菌が共凝集などの機構を介して形成されるプラークが、歯面や歯肉溝に定着することが発端である<sup>1-3)</sup>。そのため、歯面や歯肉溝におけるプラークの増殖抑制および除去が、これら2つの疾患を予防する上で重要となる。歯面に定着したプラークを除去するためには、プラークコントロールが必要不可欠である。プラークコントロールは歯ブラシや歯間ブラシ、デンタルフロスなどによる機械的清掃と歯磨剤や洗口剤などを用いた化学的清掃に大別され、一般的には前者が主体となっており行われている。また、プラークコントロール指導は、対象とする年齢によって方法が異なり、中でも発達過程にある小児や障害者、および手指機能不全がある高齢者を対象とする場合では、器具の到達性や動機づけが難しく、患者自身が行う機械的清掃のみでは不十分になりやすいことから、家族などの介助者による介助磨きが必要である<sup>4-6)</sup>。しかしながら、介助歯磨きは本人や介助者の負担となるだけでなく口腔清掃を十分に行えないことから、機械的清掃に化学的清掃を併用することが推奨されている<sup>5,6)</sup>。

近年、機能水を用いた研究が進み、バイオフィームに対する有効性が報告されている<sup>7-17)</sup>。機能水は「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、pHや有効塩素濃度などにより分類されている<sup>11,12)</sup>。中でも食塩水を電気分解して得られる電解次亜塩素酸水（以下電解次亜水）は、細胞障害性が低く<sup>13,14)</sup>、殺菌効果<sup>15-17)</sup>とバイオフィーム除去効果<sup>15-17)</sup>のあることが報告されているが、診療室や患者のセルフケアに使用するためには、短時間で効率のよい殺菌効果とバイオフィーム除去効果が期待できる臨床的有用性の高い機能水の開発が急がれている。一方、重曹はアルカリ製剤として医療用輸液療法剤や食品添加物として利用されるほど安全性が高く、歯科領域においても抗菌作用や洗浄作用を期待した歯磨剤や洗口剤などに応用されているが<sup>18-20)</sup>、重曹を添加した機能水による口腔内常在菌に対する殺菌効果やバイオフィーム除去効果に関する報告はない。また、重曹は弱アルカリ性領域で緩衝作用があり、液体のpH安定性を維持することで機能水の効果の安定性や改善に寄与するものと考えられる。そこで、本研究では重曹を添加した電解次亜水を用いて、*Streptococcus mutans* に対する殺菌効果と本菌が形成するバイオフィーム除去効果について検討した。

## 材料および方法

## 1. 供試菌株およびバイオフィームの調整

実験には、神奈川歯科大学微生物感染学講座保存の *Streptococcus mutans* Ingbritt 株（以下 *S. mutans*）を供試した。*S. mutans* は、ブレインハートインフュージョン（以下BHI: Becton Dickinson, Sparks, MD）に1% スクロース（和光純薬、大阪）と0.5% イーストエキストラクトを添加した液体培地（以下BHI液体培地）で37°C、18時間、嫌気条件下（N<sub>2</sub>: 80%, H<sub>2</sub>: 10%, CO<sub>2</sub>: 10%）で培養し実験に供試した。バイオフィームの形成はKubotaらの方法<sup>21)</sup>を参考に12ウェルのセルカルチャープレート（Corning Incorporated, USA）に丸型滅菌カバーガラス（直径18 mm、厚さ0.3 mm、松浪硝子、大阪）を入れ、1 mlのBHI液体培地を分注後、培養菌液20 μlを接種した後に、37°C、12時間の条件下で嫌気培養を行うことにより、バイオフィームを形成させた。このカバーガラスを正リン酸緩衝液（以下PBS: pH 7.5）の中で30秒間洗浄後、ウェル内に静置して実験に供試した。

## 2. 試験液の調整

実験には重曹（和光純薬、大阪、以下SHC）、電解次亜水（エピオスケア<sup>®</sup>、株式会社エピオス、東京、以下HCIO）、ならびにSHCとHCIOの混合液（以下SHC+HCIO）を供試した。SHCは6%濃度、HCIOは0.05%濃度になるように調整し、SHC+HCIOは、これら2種類の混合液を使用した。なお、対照には滅菌蒸留水（以下DW）を用いた。

3. *S. mutans* に対する殺菌効果

各試験液4 mlに菌液20 μl（6.9 × 10<sup>9</sup> CFU/ml）を各々添加後、20°Cと35°Cの温度条件で30分間作用させた。その後、各混合液100 μlを菌液添加5分後と30分後に回収し、生菌数測定を行った。生菌数測定は、PBSを用いて10倍階段希釈後にBHI寒天培地に各100 μlを塗抹し、37°C、48時間の条件下で嫌気培養後の発育コロニー数により評価した。また、経時的な殺菌効果と試験液のpHとの関連性を解析するため、各生菌数測定時にpHメーター（PH-201, SAGA Electric Enterprise, Taiwan）にてpH測定を行った。

4. *S. mutans* バイオフィームの除去効果

*S. mutans* バイオフィームの除去効果の測定は、図1に示す実験装置を用いて行った。実験装置にバイオフィーム付着のカバーガラスを入れた12ウェルプレートを装着後、ウェル内に静置したカバーガラスに、20°Cまたは35°Cに温度調整したDW、SHC、HCIOおよびSHC+HCIOを各々5分間、15分間、30分間、一定速度（10 ml/分）で作用させた。その後、

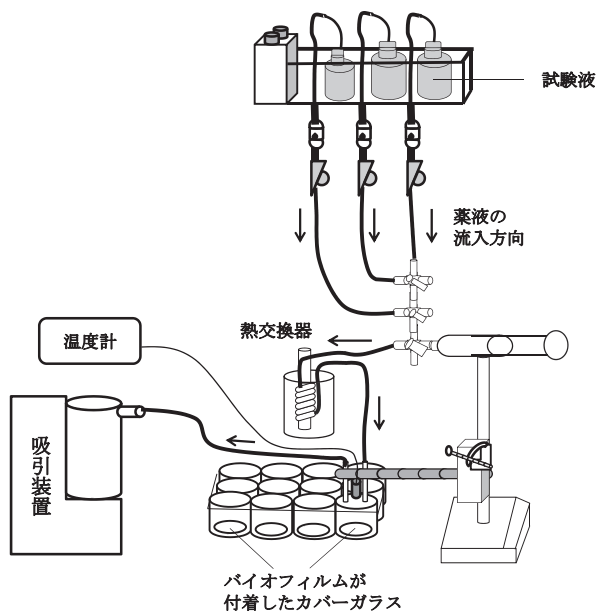


図1 バイオフィーム除去効果に用いた実験装置

試験液は図中の矢印に示す通り、温度調整用の熱交換器を通じて各温度に一定に保温し、カバーガラスに付着した *S. mutans* バイオフィームに一定流量速度 (10 ml/分) で作用させた。

PBSで1分間ガラス表面を洗浄し各試験液を除去後、1N-NaOH (和光純薬, 大阪) で30秒間残留バイオフィームを剥離、溶解させた。この溶解液の濁度を吸光度計 (DU800, BECKMAN COULTER, Inc, USA) で波長550 nmにて計測し、これを残留バイオフィーム量とした。対照として何も作用させない *S. mutans* バイオフィームの濁度を用い、これを基準に各試験液を作用させた場合のバイオフィーム除去率 (%) を下記の計算式にて算出した。

$$\text{バイオフィーム除去率 (\%)} = \frac{[(\text{対照のバイオフィーム量}) - (\text{残留バイオフィーム量})]}{(\text{対照のバイオフィーム量})} \times 100$$

## 5. 統計処理

各試験液の *S. mutans* に対する殺菌効果は、20℃と35℃においてそれぞれ5分間および30分間DWで作用させたものを対照として比較検定を行った。また、バイオフィーム除去効果は、20℃と35℃においてそれぞれ5分間、15分間、30分間のDWで作用させた場合のバイオフィーム除去率 (%) を対照として比較検定を行った。また、各試験液で同じ温度で異なる作用時間で行った場合のバイオフィーム除去率の違い、および同じ作用時間で異なる温度で行った場合の比較検定を行った。さらにHClOとSHC+HClOの効果の違いを各温度と各作用時間で比較検定した。いずれも

Bonferroni検定にて1%および5%を有意水準とした。

## 結果

### 1. *S. mutans* に対する殺菌効果

各試験液を20℃または35℃で *S. mutans* に作用させた時の経時的な生菌数の変化を、それぞれ図2と図3に示す。DWは、20℃にて5分後の生菌数が  $7.6 \times 10^6$  CFU/ml、30分後が  $7.8 \times 10^6$  CFU/mlであり、35℃においては5分後が  $7.8 \times 10^6$  CFU/ml、30分後が  $7.0 \times 10^6$  CFU/mlと、大きな変化は認められなかった。また、SHCにおいても、20℃にて5分後の生菌数が  $8.6 \times 10^6$  CFU/ml、30分後が  $7.6 \times 10^6$  CFU/mlであり、35℃においては5分後が  $8.1 \times 10^6$  CFU/ml、30分後が  $8.0 \times 10^6$  CFU/mlと、*S. mutans* はわずかに減少したものの、DWと比較して有意な殺菌効果は認められなかった。しかしながら、HClOとSHC+HClOでは20℃および35℃のいずれの条件下においてもDWやSHCに比べて強い殺菌効果が認められ、5分後において、*S. mutans* の完全な殺菌が認められた ( $p < 0.01$ )。各試験液の経時的なpH値の変化は図4に示した。20℃と35℃のいずれの条件下においてもDWとHClOに菌液を添加5分後に軽度の低下が認められ30分後まで続いたが、その他において大きな変化は認められずSHC、HClOおよびSHC+HClOはpH7.5から8.5で弱アルカリ性を示し、DWに比べてやや高いpH値を示した。

### 2. *S. mutans* バイオフィームの除去効果

20℃の条件下で各試験液を経時的に作用させた後の *S. mutans* バイオフィームの除去率を図5に、35℃の条件下の除去率を図6に、HClOとSHC+HClOの除去率の比較を図7に示した。また、カバーガラス表面に残留した *S. mutans* バイオフィームの写真を図8に示した。20℃の条件下では、5分後ではDWが8.4%、SHCが9.5%、15分後ではDWが10.4%、SHCが10.8%、30分後ではDWが11.0%、SHCが11.3%のバイオフィーム除去率を示し、多量の *S. mutans* バイオフィームがカバーガラス表面に残留していた (図5,8)。これらに対し、HClOの除去率は5分後に15.0%、15分後に30.2%、30分後に64.6%で、30分間作用後でバイオフィーム除去効果が最も高い値を示し、15分後および30分後のHClOの除去率はDWに比べ有意に高かった ( $p < 0.01$ )。また、HClOでの作用時間の違いによる除去率の比較では、同群内で有意なバイオフィーム除去効果が認められた ( $p < 0.01$ )。SHC+HClOの除去率は5分後では22.0%、15分後は56.1%、30分後は84.3%であり、いずれの作用時間でもDWに比べ有意にバイオフィーム除去率が高かつ

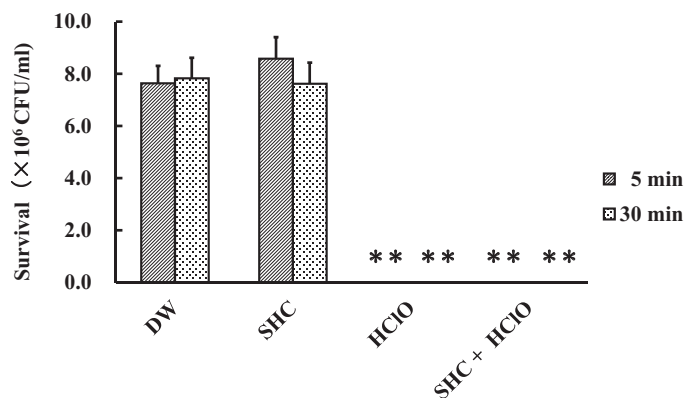


図2 20°Cにおける各試験液の*S. mutans*に対する殺菌効果  
DWとSHCでは殺菌効果が認められなかった。HClOとSHC+HClOは実験開始から5分後で、*S. mutans*の完全な殺菌が認められた ( $p<0.01$ )。

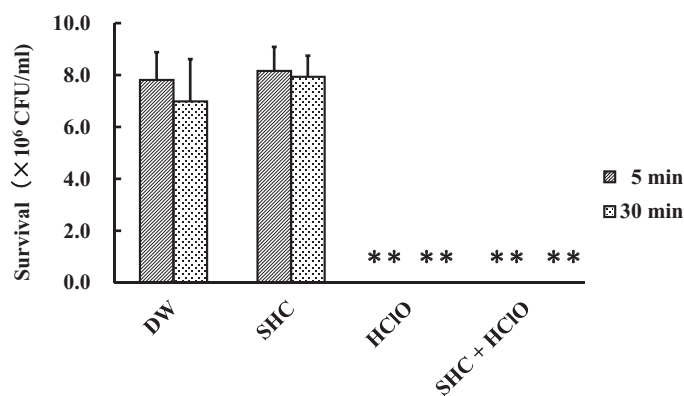


図3 35°Cにおける各試験液の*S. mutans*に対する殺菌効果  
DWとSHCでは殺菌効果が認められなかった。HClOとSHC+HClOは実験開始から5分後で、*S. mutans*の完全な殺菌が認められた ( $p<0.01$ )。

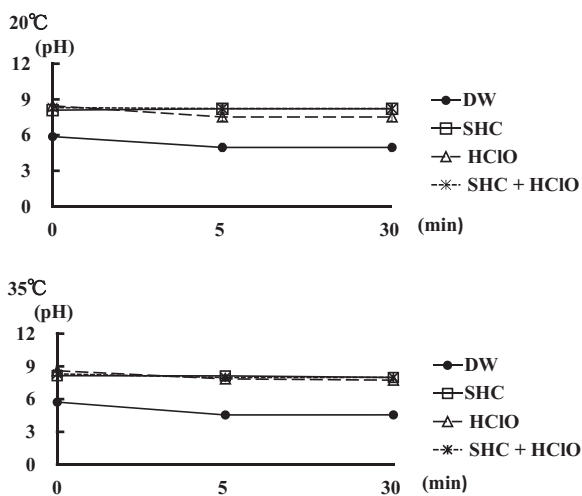


図4 各試験液に菌液を添加したときのpH変化  
20°Cにおける各試験液のpHはDWとHClOでは菌液添加5分後に軽度低下したが、その後30分間は大きな変化が認められなかった ( $n=3$ )。35°Cにおける各試験液のpHはDWとHClOでは菌液添加5分後に軽度低下したが、30分後においては大きな変化が認められなかった ( $n=3$ )。



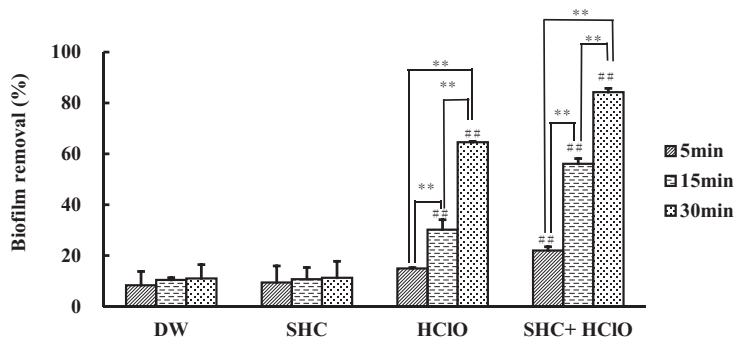


図5 20°Cにおける各試験液の*S. mutans* バイオフィーム除去効果

HClOとSHC+HClOは実験開始から15分後に強力なバイオフィーム除去効果を示し、SHC+HClOではSHCの添加による持続的なバイオフィーム除去効果が認められた (n=3, ##: 作用時間の同じDWとの比較 (p<0.01), \*\*: 各群内の作用時間の異なる場合での比較 (p<0.01))。

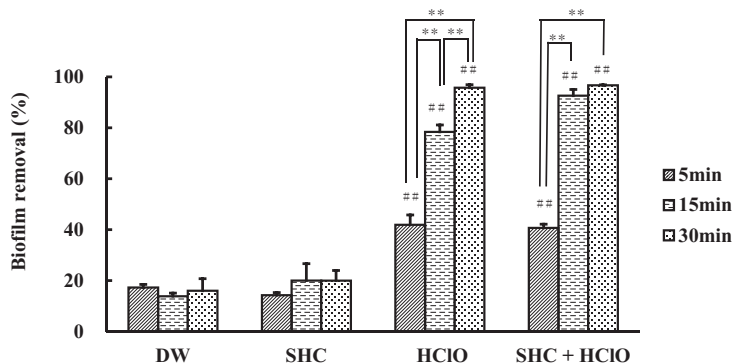


図6 35°Cにおける各試験液の*S. mutans* バイオフィーム除去効果

35°Cに温度を上昇させることよりHClOとSHC+HClOは実験開始から5分で強力なバイオフィーム除去効果を示し、SHC+HClOはSHCの添加による持続的なバイオフィーム除去効果が認められた (n=3, ##: 作用時間の同じDWとの比較 (p<0.01), \*\*: 各群内の作用時間の異なる場合での比較 (p<0.01))。

た (p<0.01)。また、作用時間の違いによる除去率の比較では、同群内で有意なバイオフィーム除去効果が認められた (p<0.01, 図5)。35°C条件下では、DWおよびSHCは、20°Cに比べてややバイオフィーム除去効果は増加する傾向は示したが有意差はなく、5分後ではDWが13.9%、SHCが14.3%、15分後はDWが13.9%、SHCが20.0%であり30分後はDWが16.0%、SHCが20.0%の除去率であった (図6)。一方、HClOは5分後では41.9%、と15分後は78.4%、30分後は95.5%といずれもDWに比べ有意に高い除去率を示し (p<0.01)、また、HClOでの5分後の除去率に比べ、15分後および30分後においてそれぞれ作用時間が増加するとバイオフィーム除去率も有意に高い値を示した (p<0.01)。HClOの温度上昇によるバイオフィーム除去効果の増加も5分、15分、30分の各作用時間

において有意に認められた (p<0.01)。SHC+HClOの35°Cにおいての除去率は、5分後は44.7%、15分後は92.6%、30分後は96.7%でさらに除去率が増加し、いずれの作用時間でもDWに比べ有意に高い除去率を示した (p<0.01)。また、SHC+HClOでの5分後の除去率に比べ、15分後と30分後において有意にバイオフィーム除去率が高い値を示した (p<0.01)。なお、HClO単独とSHC+HClOのバイオフィーム除去率を比較した場合 (図7)、20°Cでは5分後、15分後および30分後においてSHC+HClOの方が有意に高いバイオフィーム除去率を示し (p<0.01)、35°Cでは15分後にSHC+HClOの方が有意に高いバイオフィーム除去率を示した (p<0.01)。また、35°Cで30分後には両者の有意差はなく、いずれもほぼ100%のバイオフィーム除去率であった。

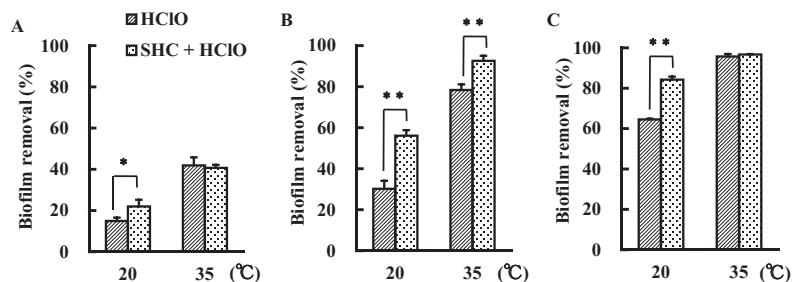


図7 HClO と SHC+HClO のバイオフィーム除去効果の比較

A: 5分作用後のバイオフィーム除去率, B: 15分作用後のバイオフィーム除去率, C: 30分作用後のバイオフィーム除去率 (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ) 図5, 6より一部再掲。

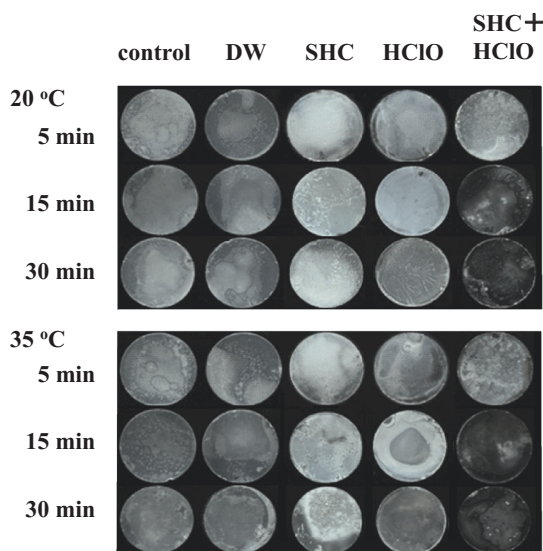


図8 20°Cおよび35°Cの各試験液作用後に残留した*S. mutans* ガラス付着バイオフィーム像較 DWとSHCでは多量の残留バイオフィームが認められたが, HClOとSHC+HClOでは, バイオフィームの経時的な減少が認められるとともに, 加温による効果的なバイオフィームの減少が認められた。

## 考 察

洗口剤には口腔内の殺菌やバイオフィーム形成抑制および歯面への付着抑制を目的として, さまざまな薬物が使用されている<sup>20,22,23</sup>). これらの薬物の中には, 歯面清掃後に患者の歯列に合わせて作製したマウスピース内面に塗布し, 一定時間装着させることによって, 持続的なう蝕および歯周疾患予防効果を期待する目的で使用されているものがある。この方法の場合, 薬物浸透による殺菌効果は期待できるが, 菌体およびバイオフィーム除去を期待するものではない<sup>24-27</sup>).

このような背景から, ことに障害を有する患者の口腔内にマウスピース型灌流装置を装着して, 機能水を用いて短時間で簡便かつ安全に, 効果的な口腔内

細菌の除去が行えることを最終目的として, 本研究は, 新規機能水として重曹を添加した電解次亜水を開発し, *S. mutans* に対する殺菌効果と本菌が形成するバイオフィーム除去効果について検討した。今回使用したHClOは, 弱アルカリ性に調整された機能水で, *S. mutans* に対して強力な殺菌効果やバイオフィーム除去効果を示した。HClOは次亜塩素酸ナトリウムの希釈液と同等の作用があるといわれており, 本研究において使用したpH領域では主たる構成イオンである次亜塩素酸イオン(以下 $OCI^-$ )の細菌の細胞壁への酸化作用によるものであると考えられる<sup>28-30</sup>). さらにHClOは, 温度を35°Cに上昇させることで $OCI^-$ の作用による付着有機物の離脱速度が増加することから<sup>29,30</sup>), 本研究においても優れたバイオフィーム除去

効果が得られたものと考えられた。一方、水酸基（以下OH<sup>-</sup>）濃度の高い溶液を作用させた場合は、バイオフィーム中の水素イオンが脱着し、バイオフィームの構成物質の分子鎖や細菌表層が負の電荷を帯びることで、バイオフィーム内部で水和反応や膨潤反応が起こり、バイオフィームの溶解ならびに分散が促進すると考えられている<sup>28-30)</sup>。SHCは水溶液で弱アルカリ性を示し、口腔内常在菌に対して殺菌効果が認められるとの報告があるが<sup>31,32)</sup>、特に*S. mutans* に対しては8.4%濃度の溶液で殺菌効果を示すのに4時間以上の時間を要すると報告され、短時間での殺菌は困難であることが示唆されている<sup>32)</sup>。このようなことから、SHC単独で殺菌効果やバイオフィーム除去効果が得られなかったのは、OH<sup>-</sup>イオン濃度が低く作用時間が短いことによるイオン浸透作用の減弱が原因であると考えられた。以上のことから、SHC+HClOを使用することによりバイオフィーム除去率が増加したのは、重曹水中のOH<sup>-</sup>がバイオフィームに吸着することで、バイオフィームに負荷電量が増加し、バイオフィーム内部で水和および膨潤反応が促進し、さらに強力な酸化作用を有するOCI<sup>-</sup>のバイオフィーム内部への侵入を補助したことによるものと考えられた。

*S. mutans*は歯肉縁上プラークの60%~90%を占める口腔レンサ球菌の1つで、小児や高齢者など年齢に関わらず多く分布することが報告されている<sup>33,34)</sup>。歯面に付着する*S. mutans*はバイオフィームを形成し、その中で産生される酸がエナメル質を脱灰し、う蝕を誘発する。本研究において*S. mutans*に各試験液を作用させた時の経時的なpHの変化では、対照のDWに比べてSHC、HClOおよびSHC+HClOが、30分経過後においてもpHが7.5~8.5以内を示し、エナメル質脱灰の臨界pHであるpH 5.5よりも高値を示した。このことからSHC+HClOを歯面に作用させることにより、小児や障害者、および高齢者を対象とした口腔ケアにおいて、特に酸性飲料摂取後における歯質脱灰抑制効果が期待できる可能性が示唆された。しかし、当初期待したSHC添加によるpH維持の効果はHClO単独のものとはほとんど差異がみられず、今後SHC+HClOのpHにおけるSHCの影響についても検討する予定である。

以上のことから、本研究で供試したSHC+HClOは35°Cに加熱して15分から30分間作用させることにより、優れた殺菌効果と強力なバイオフィーム除去効果が得られ、う蝕予防および歯周疾患予防を目的とした臨床的有用性が期待できる機能水であることが示唆された。

## 結 論

6%重曹を添加した0.05%電解次亜水を用い、*S. mutans*に対する殺菌効果と*S. mutans*バイオフィーム除去効果の検討を行ったところ、0.05%電解次亜水を単独で使用した時と同等の殺菌効果と単独使用よりも優れたバイオフィーム除去効果が認められた。特にバイオフィーム除去効果は混合して使用することで、15分間作用させた場合には20°Cおよび35°Cのいずれの温度でも有意に効果が増加することが認められ、30分間作用させた場合でも20°Cにおいて有意に認められた。

以上の結果から、本研究で供試した重曹添加電解次亜水は、35°C、15分から30分間使用により、口腔内常在菌に対する強力な殺菌効果とバイオフィーム除去効果が期待できることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、多くのご指導と御高閲を賜りました神奈川歯科大学口腔衛生学講座荒川浩久教授、神奈川歯科大学口腔科学講座歯周病学分野三辺正人教授ならびに口腔科学講座環境病理学・口腔診断学分野槻木恵一教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究にご理解とご支援をいただきました微生物感染症学講座および口腔機能成育歯科学講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

1. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 **28**: 12-55, 2002.
2. Kolenbrander PE, Palmer Jr RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000 **42**: 47-79, 2006.
3. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 **5**: 66-77, 1994.
4. 小笠原 正, 笠原 浩, 小山隆男, 穂坂一夫, 渡辺達夫. 寝かせ磨きに対する幼児の適応性. *小児歯誌* **28**: 899-906, 1990.
5. 千綿かおる, 武田 文. 知的障害者施設入所者の歯科保健医療の課題は何か. *九州歯会誌* **64**: 45-51, 2010.
6. 千綿かおる, 武田 文. 知的障害者施設職員における歯磨き介助負担感の関連要因. *日歯学誌* **1**: 52-56, 2007.
7. 齋藤正規, 續橋 治, 川島義章, 尾関由倫, 高田和子. オゾンナノバブル水の含漱剤としての可能性—第1報 抗菌作用に対する物理・化学的因子の影響— *日大口腔科学* **35**: 103-108, 2009.
8. 石井信之, 浜田信城, 渡辺清子. 弱酸性次亜塩素酸水溶液（カンファ水）の歯内療法領域への応用に関する基礎的研究. *日歯周誌* **29**: 26-29, 2008.
9. 荻原和孝, 小川智久, 浅木信安, 沼部幸博, 鴨井久一.

- 強アルカリ電解水の殺菌効果について. 歯薬療法 **15**: 130-136, 1996.
10. 大川公子, 石川恵里子, 平嶺浩子, 熊田秀文. 中性電解水の抗菌効果および歯科臨床への応用. 神奈川歯学 **46**: 27-36, 2011.
  11. 小澤寿子. 機能水の現状と歯科臨床応用への注意点. 歯科理工 **30**: 1-4, 2011.
  12. 小澤寿子, 新井 高. 歯科領域における電解機能水ガイドライン, 東京都歯科医師会雑誌 **57**: 4-10, 2009.
  13. 中村裕子, 関根 慧, 高橋哲哉. 電解機能水の歯内療法への応用. 歯科理工 **30**: 8-12, 2011.
  14. 中村裕子, 橋本 研, 小此木 雄, 牛込瑛子, 橋島弓子, 高橋哲哉, 小林健二, 小谷依子, 鈴木玲爾, 坂上宏, 申基喆. 次亜塩素酸電解水の細胞障害性およびアルカリフォスファターゼ活性に及ぼす影響. 日歯保存誌 **54**: 331-340, 2011.
  15. 中村裕子, 杉山 僚, 小此木 雄, 関根 慧, 牛込瑛子, 高橋慶壮, 小谷依子, 中村幸生. *Enterococcus faecalis* が形成するバイオフィームに対する中性電解機能水パーフェクトペリオの抗菌効果に関する基礎的研究. 日歯内療誌 **31**: 29-35, 2010.
  16. Ozaki M, Ohshima T, Mukumoto M, Konishi H, Hirashita A, Maeda N, Nakamura Y. A study for biofilm removing and antimicrobial effects by microbubbled tap water and other functional water, electrolyzed hypochlorite water and ozonated water. Dent Mater **31**: 662-668, 2012.
  17. マティンカイルール, 岡田彩子, 暁 万里子, 田上順次. 電解機能水のう蝕病原菌およびバイオフィームに対する効果. 臨床応用の可能性. 歯科理工 **30**: 17-20, 2011.
  18. Drake DR, Vargas K, Cardenzana A, Srikantha R. Enhanced bactericidal activity of arm and hammer dental care. Am J Dent **8**: 308-312, 1995.
  19. 藤本篤士, 川上知子, 大畑 昇, 高道 理. 口腔ケアにより発熱が改善した1例. 北海道歯医師会誌 **58**: 169-171, 2003.
  20. 武田 進, 山崎 正, 峰村俊一, 倉科憲治, 川上由行, 沖村幸枝. 各種含嗽剤の口腔内消毒効果について. 臨床と微生物 **12**: 185-189, 1985.
  21. Kubota H, Senda S, Nomura N, Tokuda H, Uchiyama H. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. J Bacteriol **106**: 381-386, 2008.
  22. 新井宗高, 岡田鈴人, 平嶺浩子, 浜田信城, 谷 昇, 隼瀬純次, 竹中一直, 渡辺秀司, 梅本俊夫. 齲蝕原性及び歯周病原性細菌に対する市販洗口液の抗菌効果. 神奈川歯学 **35**: 124-129, 2000.
  23. 浜田信城, 中嶋 仰, 竹中一直, 渡辺秀司, 富樫敏夫, 梅本俊夫. 口腔細菌に対するグレープフルーツ種子抽出液の抗菌効果. 神奈川歯学 **38**: 41-46, 2003.
  24. 花田信弘, 今井 奨, 西沢俊樹, 福島和雄, 武笠英彦. ミュータンス連鎖球菌の臨床生物学—臨床家のためのマニュアル—: 第一版, クインテッセンス出版, 東京, 166-174, 2003.
  25. 武内博朗, 野村義明, 泉福英信, 花田信弘. 口腔病原性バイオフィームの除菌療法 (3DS) 前後における菌叢変化のFISHによる試験的観察. 日口腔感染症会誌 **19**: 11-19, 2012.
  26. Tamaki Y, Nomura Y, Takeuchi H, Ida H, Arakawa H, Tsurumoto A, Kumagai T, Hanada N. Study of the clinical usefulness of a dental drug system for selective reduction of mutans streptococci using a case series. J Oral Sci **48**: 111-116, 2006.
  27. Katsumura S, Nishikawara F, Tamaki Y, Nakamura Y, Sato K, Nomura Y, Hanada N. A randomized controlled trial by the 3DS for dental caries. Pediatr Dent J **17**: 1-7, 2007.
  28. 浦野博水. バイオフィームの形成とその制御・応用・対策10, 洗浄によるバイオフィーム成分の洗浄除去特性. 防菌防黴 **37**: 139-147, 2009.
  29. 福崎智司, 兼松秀行, 伊藤日出生. 化学洗浄の理論と実際: 米田出版, 千葉, 54-55, 59, 87-88, 90-91, 122-124, 2011.
  30. 福崎智司. 次亜塩素酸の科学—基礎と応用—: 米田出版, 千葉, 41-61, 63-76, 2012.
  31. Miyasaki KT, Genco RJ, Wilson ME. Antimicrobial properties of hydrogen peroxide and sodium bicarbonate individually and in combination against selected oral, gram-negative, facultative bacteria. J Dent Res **65**: 1142-1148, 1986.
  32. Newbrun E, Hoover CI, Rydert MI. Bactericidal action of bicarbonate ion on selected periodontal pathogenic microorganisms. J Periodontol **55**: 658-667, 1984.
  33. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev **44**: 331-384, 1980.
  34. Whiley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol **3**: 195-216, 1998.