

MTA セメントと納豆菌混和材料の齲蝕治療応用と相乗効果： 基礎的実験の意義と今後

Synergistic effect of MTA cement and *Bacillus subtilis* admixture for caries treatment: significance of previous experiments and future developments

新潟生命歯学部 岡 俊 哉

Shunya OKA¹

¹Department of Biology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Niigata,
1 - 8 Hamaura-cho, Chuo-ku, Niigata 951-8580, Japan

Abstract: *Bacillus subtilis* produces a number of useful substances and is nonpathogenic in humans; therefore, this bacterium is used in probiotic therapy. Indirect pulp capping with a mixture of *B. subtilis* spore powder and mineral trioxide aggregate (MTA) cement is effective for avoiding pulpectomy or tooth extraction (personal communication). Based on reports of the clinical utility of this mixture, we conducted a study to establish the scientific basic of this effect. A paper describing this work (Oka, 2018) included two major results: (1) *B. subtilis* can proliferate in an admixture with MTA cement, which has an extremely high pH, at which it was thought that neutral bacteria such as *B. subtilis* cannot survive; and (2) the admixture has synergistic effects with respect to antimicrobial activities. These results support the hypothesis that a combination of *B. subtilis* and MTA cement is likely to be clinically useful for treatment of dental caries. However, we did not fully describe the background and significance of the experiments in the previous paper (Oka, 2018). Here, we describe the details of the experiments, including presentation of unpublished data, and add a discussion of further development of this research.

Key words: *Bacillus subtilis*, MTA cement, caries treatment, probiotics, synergistic effect

(2020年3月2日 受理)

1. はじめに

納豆は日本の伝統的な発酵食品の一つであり、多くの日本人に親しまれてきた。納豆の製造には *Bacillus* 属菌の一種である *Bacillus subtilis* var. *natto* が使用されている。納豆の製造に用いられる *B. subtilis* には宮城野株、朝日株、高橋株、医薬用に用いられる日東株、目黒株、中国雲南省の納豆から分離した雲南株、金沢株など主に7種類の菌株が存在する (Koizumi et al. 2004)。 *B. subtilis*

の特徴は芽胞を形成する事によって熱や強アルカリ環境等に強い抵抗性を持ち、極めて厳しい環境でも生き延びることが出来る芽胞形成菌であることである (Setlow, 2006)。芽胞の状態では増殖出来ないが再び周囲の環境が増殖に適した環境に戻るか、特定の刺激を受けると芽胞は発芽して通常の菌体 (栄養型) となり増殖を再開する (Setlow, 2003)。 *B. subtilis* 芽胞の活性化には煮沸処理が一般的である (Hosoi & Kiuchi, 2003)。 *B. subtilis* は1997年に全ゲノム配列が決定されるなど学術的

にも重要視されている微生物である(Kunst et al. 1997)。さらに、一般的にヒトに対する病原性を持たない極めて安全な菌として認知されている。*B. subtilis*は多数の有用物質を産生することが知られており、様々な菌株から既に20種類以上の抗生物質が報告されている(Stein, 2005)。さらに*B. subtilis*の産生するビタミンK2は骨組織に対して直接的に骨形成を促進し、骨の破壊を抑える効果がある(Kaneki et al. 2001; Yamaguchi & Weitzmann, 2011)。ナットウキナーゼは血栓の主成分であるフィブリンを溶解する(Sumi et al. 1987)。 γ -ポリグルタミン酸(PGA)は*Bacillus*属細菌とその近縁種によって生産される。PGAは化粧品、医薬品、食品の他に、水質浄化剤、コンクリートのひび割れ防止剤など幅広い用途が提案されている(Oppermann-Sanio & Steinbüchel, 2002)。*B. subtilis*の有用性はprobiotics分野でも応用が盛んである(Cutting, 2011)。歯科医療分野では*B. subtilis*培養液の上清(Tsubura et al. 2009)や芽胞粉末が歯周病治療に応用されている。本菌由来生成物の適切な投与は歯周病菌を静菌的に減少させる効果が有り、歯周病管理に貢献可能であることも報告されている(Tsubura et al. 2012)。

Mineral trioxide aggregate (MTA)セメントは1993年に米国に登場した強アルカリ性歯内治療用材料である(Lee et al. 1993)。本邦では直接覆髄への適応が薬事承認され、2007年より発売されている。練和時にpH 10、硬化初期ではpH 12の非常に高いアルカリ性を示し(Fridland & Rosado, 2005)、水酸化カルシウム徐放材料として新生硬組織形成能や抗菌作用の一端が説明されている(Al-Hezaimi et al. 2006; Tanomaru-Filho et al. 2007)。MTAセメント使用による直接覆髄(Bogen et al. 2008)、穿孔治療(Mente et al. 2009)への高い効果は、近年多くの報告が認められる。しかしながら、本セメントの適応は完全に齶蝕象牙質を除去した症例であり、また露髄部が大きな症例においては、その効果は期待できない(Parirokh & Torabinejad, 2010a, 2010b; Torabinejad & Parirokh, 2010)。MTAセメントによる直接覆髄治療の高い効果が報告されつつも、その限定された適応範囲や取り扱いの難しさは改良の必要性が認められる。

一方、*B. subtilis*が産生する γ -ポリグルタミン酸の高い浄化作用と保水力、*B. subtilis*自体の確立された安全性、*B. subtilis*芽胞粉末と多孔質セメント材料との混和物が製品化されて水源の汚泥処理などに使用された実績(Matsunaga et al. 2006)に着目し歯科治療への応用が模索されてきた。

齶蝕象牙質を完全に除去すると抜髄の適応症となる進行した齶蝕に対して、抜髄処置を回避することを目的とした間接覆髄治療を行う際、MTAセメントと*B. subtilis*芽胞粉末の混和物を充填すると齶蝕象牙質が清浄化されるとともにdentin bridge形成が加速されるという発見を知るに至り(personal communication)、本研究に取り掛かった。本稿では原著論文、Oka S, Odontology, 106:46-55, 2018を振り返りつつ、未発表データを加え、厳しい条件の中で検証した事項と、納豆菌が増殖可能であることの証明、相乗効果、今後の研究に向けた考察を論じてみたい。

2. 研究に課された3つのハードル

筆者はMTAセメントと*B. Subtilis*芽胞粉末の混和物が間接覆髄治療に極めて有効であるという臨床的有用性の報告に基づき、これを基礎科学的見地から証明することで歯科医学に貢献したいと考え、当該研究を期限付きで引き受けた。納豆菌は、栄養型が増殖する際に20種以上の抗菌物質・有用物質を産生すること(Stein, 2005)、また臨床所見は「納豆菌が示す有用性と符合する点が多い」ことから、両者の混合物からの有用物質生成を確認することで比較的容易に結果が出せると考えていた。*B. subtilis*が様々な有用物質を生成するためには栄養型が増殖しなくてはならない。しかしながらMTAセメントの特性を知ること、この研究のハードルの高さに眩暈がした。有用性の確認どころか、納豆菌栄養型は生存さえも厳しいと考えられる条件が3つ立ちはだかったのである。①MTAセメントはpH 12にも達する超高pHを示す。このセメントと納豆菌の混和は中性細菌である納豆菌には絶望的な超高pH環境であり、しかも長期に渡って持続する(Duarte et al. 2003)。加えて、②MTAセメント自体が抗菌作用を持っており、納豆菌栄養型の増殖が阻害されれば一巻の終わりである。さらにはセメントと納豆菌の混和物は歯内に充填される。③偏性好気性菌である納豆菌は無酸素では増殖出来ない。栄養型が増殖しなければ何も起きない納豆菌であるにもかかわらず、その増殖には非常に厳しい、もはや極限とも言える3つのハードルが課せられたのである。基礎科学的観点から臨床的な効能を証明する以前に、納豆菌が生存・増殖可能であることを証明できなければこの研究課題そのものが成立しないという窮地からのスタートとなった。まずはやってみるしかない。使用する納豆菌として臨床的有用性の発見時に用いられた高橋菌株*B. subtilis* var. natto

Takahashi strain を入手して実験に取り掛かった。

3. 芽胞は溶解しないが、栄養型は死滅

最初に検討した可能性は、超高pH環境によって納豆菌芽胞が溶解し、中に含まれる抗菌物質ジピコリン酸が放出されて作用を発揮している可能性である。そこで、超高pH条件に納豆菌芽胞を暴露して確認した。0.05 Mの水酸化カルシウム水溶液を準備し(無調整でpH 13)、そこに納豆菌芽胞を浸漬した。芽胞は24時間浸漬しても溶解せず、通常の条件で再度培養するとほぼすべての芽胞が栄養型へと発芽して増殖可能であることがわかった。一方、この溶液内では納豆菌栄養型は1時間以内に死滅することが判明した(いずれも未発表データ)。つまり、最初に懸念された芽胞溶解の可能性は否定されたものの、肝心の納豆菌栄養型は増殖できないことがあらためて確認されたのである。続いて、納豆菌栄養型はどの程度のpHまで増殖可能かをリアルタイム培養モニタ装置を使用し、液体培地のpHを変えて検証した。その結果、pHの上昇とともに増殖速度は低下するものの、pH 9.6の液体培地ではなんとか増殖可能であった。しかしpH 10以上では増殖曲線が全く上昇しなかった(論文掲載データ)(Oka, 2018)。このpH 10培養液を顕微鏡観察したところ、栄養型は死滅していたことが判明した。この時、予備実験として、強アルカリ培地内での同属菌の増殖試験を実施し、実験に使用する菌株の検討をしている。*B. amyloliquefaciens* 5株、納豆菌*B. subtilis* var. *natto* は高橋株、宮城野株、成瀬株の3株を比較した。いずれも結果は同様でpH 10以上では増殖がみられなかったが、唯一宮城野株はpH 10でも若干の増殖を示し、使用した菌株の中では最も強いアルカリ耐性を示した(未発表データ)。藁にもすがる思いから宮城野株に変更して実験を進めることも検討したが、芽胞粉末での供給が無いこと、臨床的有用性の発見時に用いられた高橋菌株で直接証明すべきであることなど考慮し、高橋菌株で実験を続行することとした。

*B. subtilis*の属する中性細菌はアルカリ環境におかれると有機酸生成によって細胞質を中性に保とうとするがpH 10以上では細胞内pHを維持できないとされている(Padan et al. 2005)。好アルカリ性細菌の場合は細胞質内のpH維持のために特殊な膜輸送機構を備えている(Krulwich et al. 2001)。*B. subtilis*の液体培地内での増殖上限がpH 10付近であったことは中性細菌にみられる一般的現象と考えられた。その一方で、*B. subtilis*のpH

ホメオスタシス機構には様々なイオン対向輸送体が関わっており、未知の部分も残されている(Ito et al. 1999; Padan et al. 2005)。*B. subtilis*増殖上限がpH 10付近であったことは今回用いた条件で得られた一例に過ぎず、更に高いpHで増殖可能な培養条件も存在し得るとも考えた。そこで、微生物学や納豆菌に関わる専門家たちに次々とコンタクトを取り、納豆菌栄養型がpH 10以上の強アルカリ環境でも増殖可能な条件や経験について聞いて回った。しかしながら返ってきた助言は全て期待に反し、「やるだけ無駄」「小保方(晴子)さんのようにはなるなよ」などと、散々な反応ばかりであり、pH 10以上での増殖など検討することさえナンセンスであるとの一致した意見だけであった。超高pH問題は先送りとして、MTAセメントの抗菌性と低酸素環境に関して検証を始めた。

4. MTAセメントの持つ抗菌性と納豆菌

MTAセメントの持つ抗菌性が納豆菌に及ぼす影響に関して、ディスク拡散法を応用した手法で確認した。寒天プレート培地に納豆菌栄養型の菌液、もしくは活性化した芽胞粉末液を播種したのち、中央にMTAセメントの懸濁液を滴下する。37℃での培養後、増殖した菌のコロニーが滴下したセメントに密着して現れるならば抗菌性の影響無しであり、逆にセメントの周囲に菌が生えずに増殖抑制を示す阻止円が形成されれば増殖の抑制とその強度が阻止円の大きさとして観察可能な手法である。滴下したセメントの周囲には明確な阻止円は形成されなかった。高濃度のMTAセメントを滴下した場合、MTAセメント硬化体周囲には菌が生育しない部分ができたが、いずれかのコロニーはMTAセメントに接しながら増殖しており、完全な阻止円は形成されなかった。したがって、納豆菌はMTAセメントの抗菌性の影響を受けるものの、完全には抑制されないことがわかった。この事実はこの後、超高pH環境から納豆菌栄養型が増殖可能であるかどうかの検証においては大きく希望を持たせるものとなった(公開済)(Oka, 2018)。

5. 低酸素条件での納豆菌の増殖

MTAセメントと*B. subtilis*芽胞粉末混和物の菌内への充填は偏性好気性菌に分類される*B. subtilis*にとっては酸素不足となり厳しい増殖条件と推察された。そこで低酸素条件で*B. subtilis*の増殖性を確認するため、好気条件と微好気条件で比較をした。無酸素、および低酸素環境での

培養には三菱ガス化学製の脱酸素剤を使用した。嫌気条件(無酸素)、および微好気条件(酸素濃度 6-12%、二酸化炭素濃度 5-8%)で *B. subtilis* を培養し、好気条件の対照群と増殖性を比較した。すると、納豆菌の増殖は低酸素条件でもほとんど影響を受けず、芽胞の発芽と栄養型の増殖ともに有意差は見られなかった。さらに培養容器内が無酸素であっても増殖が見られた。つまり、嫌気条件では周囲の環境だけではなく、あらかじめ寒天培地からも徹底した脱酸素を行わない限りは納豆菌栄養型が増殖してきたのである。これは菌内に充填される低酸素環境であっても、徹底した無酸素状態でない限りは栄養型が増殖可能であるということであり、本研究にとっては非常に好ましい結果であった(公開済)(Oka, 2018)。

Bacillus 属菌の芽胞は嫌気条件においても発芽可能であり酸素の影響は殆ど無いと考えられている(Roth et al. 1955; Zenitani, 1958)。一般には好気性菌として認識されている *B. subtilis* は代謝経路の切り替えによって嫌気条件下でも増殖可能な状況が存在するという報告がある(Marino et al. 2000; Nakano et al. 1997; Ramos et al. 1995; Rick et al. 2000)。今後詳細を調べていく必要があるものの、いずれにしても菌内充填という低酸素条件下でも増殖可能であることが示された。

6. 納豆菌とMTAセメント混和物からの増殖

最後に立ちはだかった大きな壁が、pH 12にも達する超高pHを示すMTAセメントとの混和物であった。この混和物から納豆菌栄養型が増殖しなければ有用性は発揮できない。納豆菌栄養型を液体培地で培養したときの上限pHは10であった。これはすでに一般に認知された事実であり、培地の変更などの培養条件の検討などでは動かしようのない事実であると考えられた。一方、他の側面からこの研究の出発点となった臨床的有用性に関して様々な検証を進めていくにつれて、MTAセメントとともに菌内に充填された納豆菌は増殖しているはずであるとの確信が徐々に高まってきた。そこで菌内の充填環境を模して、納豆菌とMTAセメントとの混和物を寒天培地に載せて培養する実験に一縷の望みを託し、毎日ひたすら繰り返した。通常であれば一晩で密集したコロニーが得られる納豆菌であるが、納豆菌とMTAセメントとの混和物からの増殖はみられない。ところが37℃での培養を延々と継続していると数日後には納豆菌栄養型のコロニーが出てくる試料が存在した。一方で長く培養しても変化の起きない試

料もあり、全ての試料から増殖した納豆菌が出てくるわけではなかった。逆に全ての試料から増殖する条件が突き止められたなら、この大きな障壁を乗り越えて最大の問題点が一挙に解決可能であるとの希望が持てた。芽胞の活性化方法など細かな条件検討の積み重ねで数値は10倍以上に上昇したが、全ての試料で増殖とはいかなかった。それでも増殖は可能であると言える一歩手前まで前進できた手応えもあった。試行錯誤と検証、実験条件の検討と続けているうち、培養器に長期間入れていても菌が増殖しない寒天培地には極端な乾燥・硬化が起きており通常の菌増殖にも適さない状態となっていることが判明した。そこで作成して間もない水分を多く含んだ寒天プレート培地を使用して実験してみたところ、増殖開始までの期間が全体的に短くなったばかりか、全ての試料で発芽・増殖した。勝負となる確認実験では2種類の混和比の材料30検体について3回ずつ実施し、時間のばらつきは非常に大きいものの、180個すべての材料が5日以内に発芽・増殖した。ついに超高pHを示すMTAセメントと混和しても納豆菌が増殖可能であることを実験で証明できたのである(公開済)(Oka, 2018)。MTAセメントと *B. subtilis* 活性化芽胞溶液を一对一で混和した懸濁液のpHは約11、MTA：芽胞 = 2 : 1 の懸濁液ではpH 12と、pHメーターが壊れるほどに高い値を示したにもかかわらず *B. subtilis* 芽胞が発芽して菌体の増殖が認められた。

B. subtilis 芽胞に関し、放射線、熱、圧力、化学物質への耐性は微細構造や分子生物学レベルで詳細な報告が多数なされている(Setlow, 2006)。その一方でpH変化、特に高pH環境と芽胞の発芽に言及している文献は殆ど見当たらない。*B. subtilis* ではpH 8を超えると発芽率は低下すること(Zenitani, 1958)、*B. terminalis* の芽胞ではpH 11.3でも発芽が見られたとされる報告(Church et al. 1954)以外にはみつけれなかった。MTAセメントの経時的pH変化に関する実験環境での報告も限られており(Duarte et al. 2003)、MTAセメントのpHの経時変化と *B. subtilis* 芽胞が発芽可能なpHの両方向からこの現象の詳細を明らかにしていく必要がある。筆者はこの間、硬化したMTAセメントと納豆菌の混和物、および納豆菌栄養型が増殖してきた寒天培地を様々な形で再培養してなぜ増殖が可能なのかを検証した。そこから得られた結果からの推察としては、①多孔質であるMTAセメントに培地の水分が入り出している間にミクロレベルで部分的な中和が起こり、一部の

菌が増殖して混和物から出てくる、もしくは、② MTAセメントの硬化時の水和反応により混和されている芽胞塊が集積し、さらに硬化の進行により芽胞塊が表層部に押し出され発芽する、との二つの可能性を推察している（未発表）。

7. 相乗効果

超高pHを示すMTAセメントと納豆菌芽胞の混和物から納豆菌栄養型が増殖可能であることは証明できた。しかしながらここまでの検証事項は、過酷な条件で納豆菌が増殖可能であることを示しただけであり、言うなれば、「ただの観察記録」にすぎない。学術的な原著論文とするには混和による相乗効果を証明しなくてはならなかった。「間接覆髄治療を行う際、MTAセメントと*B. subtilis*芽胞粉末の混和物の充填により、齲蝕象牙質の清浄化とdentin bridge形成が加速される現象」という臨床的有用性を証明するための動物実験や細胞を用いた実験に関するアイデアは既に持っていたものの、研究期限も迫っており、この時点でそこまでの資金を投入して大規模な実験に挑むことは極めてリスクが高いと考えた。大きな実験に至る前に、相乗効果に関してもっと単純な観点から短期間で実証できないだろうかと思案を悩ませた。そこで再び抗菌性に着目した。納豆菌とMTAセメントのそれぞれの抗菌性に違いがあり、相乗効果が期待できる結果が得られたならば、ひとまとまりの論文ストーリーとなり得ると考えた。ディスク拡散法と同様の原理を用いたパンチアウト法、カップ法、滴下法の手法を実施したところ、抗菌性試験では、*B. subtilis*による、*Staphylococcus aureus subsp. aureus* (*S. aureus*) および、*Lactobacillus casei* (*L. casei*) に対する抗菌性が示された。しかし、*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) に対する抗菌性については、不明瞭であった。

MTAセメントの示す抗菌性では、*B. subtilis* 同様に*S. aureus*に抗菌性を示しただけでなく、*B. subtilis*では明確な抗菌性がみられなかった*S. mutans*への抗菌性が示された。*L. casei*への抗菌性は*B. subtilis*のみでみられたことを考え合わせると、MTAセメントと*B. subtilis*は抗菌性において納豆菌とMTAセメントの相乗効果を発揮可能であることが示されたのである。(論文発表)(Oka, 2018)。

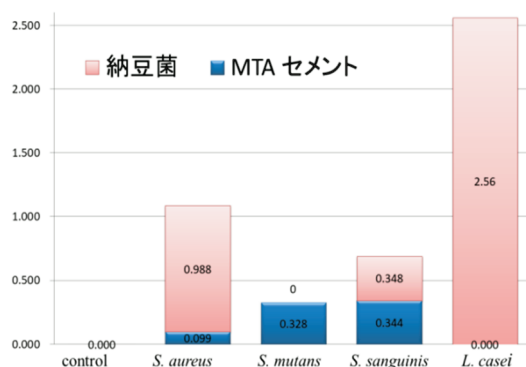


Fig. 1 抗菌性の相乗効果。菌種により抗菌効果が異なり、結果的に納豆菌とMTAセメントが相乗効果をもたらす。数値は阻止円の直径の平均値であり、大きな数値は抗菌性が強いことを示す。

この結果を踏まえ、2018年の国際歯科研究学会(IADR)では、*S. sanguinis*に対する抗菌性の相乗効果のデータを加えて発表した(Fig. 1)。さらに*B. subtilis*が生成するナットウキナーゼが*S. mutans*のバイオフィルム形成を抑制したという報告(Narisawa et al. 2014)をもとに*B. subtilis*による牛歯、セラミックに対する*S. mutans*の付着阻害の可能性を予測し、検証実験を試みた。直接の抗菌性を示さなかった納豆菌が*S. mutans*の付着を阻害することを示す結果も得られ、納豆菌は齲蝕の治療のみならず予防にも役立つ可能性が示唆された(国際歯科研究学会)(Fig. 2)。

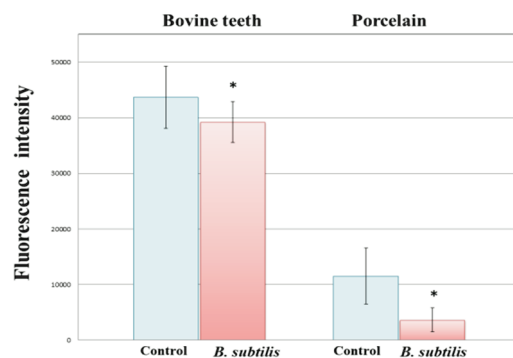


Fig. 2 納豆菌培養液による*S. mutans*の付着阻害。牛歯およびセラミックに対する付着をアラマーブルーによる生物学的代謝量の数値で表した。付着阻害は有意であった *：P<0.05

8. 考察と今後

岡論文(Oka, 2018)では、MTAセメントと*B. subtilis*芽胞粉末混和物の相乗効果の可能性について、*B. subtilis*を用い、基礎研究の方向から検討した。

ここまで触れていなかったが、歯内に充填された納豆菌の栄養源についてはどうだろうか。筆者は間接覆髄治療時に残された齲蝕象牙質が*B. subtilis*の栄養源になり得ると推察し、予備実験までを完了している。齲蝕象牙質をPBSに懸濁してフィルター滅菌した溶液に納豆菌を入れて培養したところ、菌数が24時間で100倍に増大したのである（未発表データ）。臨床で発見された現象である齲蝕象牙質の清浄化は納豆菌による齲蝕象牙質の分解によると推察している。また、MTAセメントと納豆菌芽胞粉末の混和物による効能で、dentin bridge形成が加速される現象も非常に興味深い研究課題であり、続報に向けて準備中である。予想される可能性の一つは納豆菌が何らかの有用物質を分泌し、歯髄幹細胞や象牙芽細胞が影響を受けた結果である可能性、もう一つは納豆菌が異物として認識されたことによる免疫応答由来の可能性を考えている。後者は3 Mixの適用が樹状細胞の損傷部位への移動および幹細胞/前駆細胞の活性化により骨芽細胞の分化を抑制し、象牙芽細胞様細胞の分化を促進するという報告(Quispe-Salcedo et al. 2014)と同様の現象が起こっている場合を意味する。現在、歯髄幹細胞や象牙芽細胞を用いた検証を計画しており、ここで何らかの遺伝子発現誘導など更に興味深い事実が明らかになるはずである。ところがこの実験も実施までには困難を極める。*B. subtilis*は非常に強い増殖性と芽胞の持つ耐性の高さ故に一旦細胞培養系へのコンタミネーションが起これば培養設備は壊滅的な打撃を受けることになるため、細胞培養に関わる施設への*B. subtilis*の持ち込みなど論外であり、まずは*B. subtilis*の存在を許容できる細胞培養環境を構築しなければならないのである。

*B. subtilis*は歯科医療分野でも既に活用例が存在する。*B. subtilis* DB9011菌株が歯周病菌へ示す抗菌性を歯周病治療に応用されたもので、芽胞粉末を含んだタブレットがVITALREXとして製品化されている(Tsubura et al. 2012)。また、*B. subtilis*芽胞粉末と高アルカリ性多孔質セメント材料との混和物にも実用化の例が存在する。*B. subtilis* natto groupを封入した高アルカリ性ポーラスコンクリートブロック、EcoBio-Blockである(Kawada et al. 2006)。菌体の封入により有機物の分解速度や硝化速度などの環境浄化能力が大幅に向上したことが実験的にも報告されている(Matsunaga et al. 2006)。さらにEcoBio-Blockは疾病媒介蚊の成長抑制のためpyriproxyfenの徐放材料への応用が検討されている(Kawada et al. 2006)。

また、筆者は生物由来で安全性の高い有用物質を歯科医療分野に適用するための研究を続けており、現在は海藻に含まれる硫酸化多糖類フコイダンに着目し、オーラルヘルスケアに有用な生化学的特性について報告している(Oka et al. 2020)。これらの有用物質とMTAセメントの併用についても注目される研究課題であり、筆者自身も検討していくべきであると考えている。

9. 結論

原著論文、Oka S, *Odontology*, 106:46-55, 2018ではMTAセメントと*B. subtilis*芽胞粉末混和物の相乗効果の可能性について、*B. subtilis*芽胞はMTAセメントと混和された高pH条件下でも増殖可能であり、*B. subtilis*の有用性を発揮できる可能性を示唆した。当該論文は現在まで1100件を超えるダウンロードがあり、注目を集めている。また、高アルカリ性多孔質セメント材料と*B. subtilis*群の混和物という共通点を持つ実用化製品も存在しており、我々の検証結果の有望性を後押しするものとする。

謝 辞

MTAセメントと*B. Subtilis*芽胞粉末の混和物による臨床的有用性の第一発見者であり、かつ本研究に携わる機会を頂いたのみならず、使用機器および試薬類のご寄付など多大なご支援を頂いた本学臨床教授 三枝尚登先生に衷心より感謝致します。

引用文献（参考文献，参照文献等）

- Al-Hezaimi, K., Naghshbandi, J., Oglesby, S., Simon, J. H., & Rotstein, I. (2006). Comparison of antifungal activity of white-colored and gray-colored mineral trioxide aggregate (MTA) at similar concentrations against *Candida albicans*. *Journal of Endodontics*, 32(4), 365-367.
- Bogen, G., Kim, J. S., & Bakland, L. K. (2008). Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. *The Journal of the American Dental Association*, 139(3), 305-315.
- Church, B. D., Halvorson, H., & Halvorson, H. O. (1954). Studies on spore germination: its independence from alanine racemase activity. *Journal of Bacteriology*, 68(4), 393.
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28(2), 214-220.
- Duarte, M. A. H., de Oliveira Demarchi, A. C. C.,

- Yamashita, J. C., Kuga, M. C., & de Campos Fraga, S. (2003). pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 95(3), 345-347.
- Fridland, M., & Rosado, R. (2005). MTA solubility: a long term study. *Journal of Endodontics*, 31(5), 376-379.
- Hosoi, T., & Kiuchi, K. (2003). Natto—A food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto). *Handbook of fermented functional foods*, 227-250.
- Ito, M., Guffanti, A. A., Oudega, B., & Krulwich, T. A. (1999). mrp, a multigene, multifunctional locus in *Bacillus subtilis* with roles in resistance to cholate and to Na⁺ and in pH homeostasis. *Journal of Bacteriology*, 181(8), 2394-2402.
- Kaneki, M., Hedges, S. J., Hosoi, T., Fujiwara, S., Lyons, A., Ishida, N., Mizuno, Y. (2001). Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K 2 : possible implications for hip-fracture risk. *Nutrition*, 17(4), 315-321.
- Kawada, H., Saita, S., Shimabukuro, K., Hirano, M., Koga, M., Iwashita, T., & Takagi, M. (2006). Effectiveness in controlling mosquitoes with EcoBio-Block S-a novel integrated water purifying concrete block formulation combined with the insect growth regulator pyriproxyfen. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(3), 451-456.
- Koizumi, T., Yatagai, C., Naitou, S., Yanagisawa, Y., & Sumi, H. (2004). VitaminK 2 (menaquinone- 7) in the fermented soybean natto and natto *bacillus*. *Abstracts of Annual Congress of The Japan Society of Home Economics*, 56, 44-44.
- Krulwich, T. A., Ito, M., & Guffanti, A. A. (2001). The Na⁺-dependence of alkaliphily in *Bacillus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1505(1), 158-168.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A., Alloni, G., Azevedo, V., Borchert, S. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249-256.
- Lee, S.-J., Monsef, M., & Torabinejad, M. (1993). Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of Endodontics*, 19(11), 541-544.
- Marino, M., Hoffmann, T., Schmid, R., Möbitz, H., & Jahn, D. (2000). Changes in protein synthesis during the adaptation of *Bacillus subtilis* to anaerobic growth conditions. *Microbiology*, 146(1), 97-105.
- Matsunaga, N., Tokunaga, T., Masuda, S., Yan, S., Oshikawa, H., Fujita, K., Harada, A. (2006). A fundamental study on water quality purification by EcoBio-Block. *Ann J Hydra Eng Japan Society of Civil Engineers*, 50, 1081-1086.
- Mente, J., Hage, N., Pfefferle, T., Koch, M. J., Dreyhaupt, J., Staehle, H. J., & Friedman, S. (2009). Mineral trioxide aggregate apical plugs in teeth with open apical foramina: a retrospective analysis of treatment outcome. *Journal of Endodontics*, 35(10), 1354-1358.
- Nakano, M. M., Dailly, Y. P., Zuber, P., & Clark, D. P. (1997). Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *Journal of Bacteriology*, 179(21), 6749-6755.
- Narisawa, N., Kawasaki, Y., & Keisuke, N. (2014). Interference Effects of Proteolytic Nattokinase on Biofilm Formation of Cariogenic Streptococci. *Food preservation science*, 40(6), 273-278.
- Oka, S. (2018). Potential synergistic effects of a mixture of mineral trioxide aggregate (MTA) cement and *Bacillus subtilis* in dental caries treatment. *Odontology*, 106(1), 46-55. <https://doi.org/10.1007/s10266-017-0305-6>
- Oka, S., Okabe, M., Tsubura, S., Mikami, M., & Imai, A. (2020). Properties of fucoidans beneficial to oral healthcare. *Odontology*, 108(1), 34-42 <https://doi.org/10.1007/s10266-019-00437-3>
- Oppermann-Sanio, F., & Steinbüchel, A. (2002). Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. *Naturwissenschaften*, 89(1), 11-22.
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., & Krulwich, T. A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes*, 1717(2), 67-88.
- Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010a). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part I: chemical, physical, and

- antibacterial properties. *Journal of Endodontics*, 36(1), 16-27.
- Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010b). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part III: clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *Journal of Endodontics*, 36(3), 400-413.
- Quispe-Salcedo, A., Ida-Yonemochi, H., & Ohshima, H. (2014). Effects of a triple antibiotic solution on pulpal dynamics after intentionally delayed tooth replantation in mice. *Journal of Endodontics*, 40(10), 1566-1572.
- Ramos, H. C., Boursier, L., Moszer, I., Kunst, F., Danchin, A., & Glaser, P. (1995). Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and-independent regulatory mechanisms. *The EMBO journal*, 14(23), 5984.
- Rick, W. Y., Tao, W., Bedzyk, L., Young, T., Chen, M., & Li, L. (2000). Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. *Journal of Bacteriology*, 182(16), 4458-4465.
- Roth, N. G., Lively, D. H., & Hodge, H. M. (1955). Influence of oxygen uptake and age of culture on sporulation of *Bacillus anthracis* and *Bacillus globigii*. *Journal of Bacteriology*, 69(4), 455.
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current opinion in microbiology*, 6 (6), 550-556.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of applied microbiology*, 101(3), 514-525.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4), 845-857.
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., & Muraki, H. (1987). A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, 43(10), 1110-1111.
- Tanomaru-Filho, M., Tanomaru, J. M., Barros, D. B., Watanabe, E., & Ito, I. Y. (2007). In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *Journal of oral science*, 49(1), 41-45.
- Torabinejad, M., & Parirokh, M. (2010). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part II: leakage and biocompatibility investigations. *Journal of Endodontics*, 36(2), 190-202.
- Tsubura, S., Mizunuma, H., Ishikawa, S., Oyake, I., Okabayashi, M., Katoh, K., Toda, T. (2009). The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28(11), 1353-1356.
- Tsubura, S., Waki, Y., & Tsubura, T. (2012). Probiotic effect of *Bacillus subtilis* tablets on periodontopathic oral bacteria. *Microbiology Research*, 3 (e23), e23.
- Yamaguchi, M., & Weitzmann, M. N. (2011). Vitamin K 2 stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B activation. *International journal of molecular medicine*, 27(1), 3 -14.
- Zenitani, B. (1958). On Some Environmental Factors which Affect the Spore Germination of *Bacillus subtilis*. *Nagasaki University's Academic Output SITE*, 7 , 61-64.