

可安全食用的乳酸菌抗菌肽的效果与临床应用

角田爱美 永利浩平 善藤威史

1. 序言

虽然通过先辈们的努力,近年来龋齿和牙周病(图1)的发病率出现了降低的倾向¹⁾,但依然是人类患病率最高的感染症。引发口腔感染症的细菌并非各自单独存在而对宿主产生抵抗。这些细菌和其他常驻菌群集并定着于齿面、牙周组织、舌头等口腔黏膜及义齿、种植牙表面等处的同时,形成被称为“生物膜”的蘑菇状壁垒并成长为致病性菌丛。近年来的研究结果逐步表明,源自此类生物膜的细菌可对全身性疾病(关节风湿病及糖尿病等)造成影响²⁾³⁾。另外,高龄、疾病、治疗等因素导致宿主方发生变化并造成免疫缺陷时,会发生机会性感染,导致通常情况下处于无致病性水平的常驻菌或弱毒性微生物发病。口腔常驻菌所致黏膜损伤会带来疼痛及不适感并影响日常饮食(营养摄取)。在高龄者中常见的吸入性肺炎,具有反复发作、导致耐药菌产生而对抗菌药物治疗具有抵抗性等特征⁴⁾⁵⁾。除了咳嗽反射减弱之外,这一疾病的发生还和口腔内常驻菌有关⁶⁾。日本正在迎来超高龄化社会,随着连漱口都无法自理的需护理者的增加,可以预见口腔常驻菌所致全身性感染症的发病率将出现升高。



图1. 需护理的高龄者的龋齿与牙周病

牙周病与龋齿的结果并不仅限于丧失牙齿。随着牙周病的进展,暴露出牙骨质的牙齿易于形成根面龋齿,然后引发破损折断。发生破损折断的牙根长期残留于颌骨,成为生物膜的形成场所及细菌进入体内的感染途径。

另一方面,米山等人报告,口腔护理可降低需要护理的高龄者的吸入性肺炎的发病率,显示口腔护理可能是针对全身性疾病的预防治疗的方法之一。阿久津等人报告,在食道癌手术病例中,齿垢中检测出致病性细菌的病例术后肺炎的发病率较高⁸⁾,特别是在实施头颈部手术时,通过导入口腔护理可减少术后并发症⁹⁾。为了避免口腔常驻菌产生致病性并维持全身性疾病的预防与共生,口腔护理是极为重要的,这一点再次得到了大量证实^{10)~12)}。另外也有报告表明,口腔护理还具有医疗经济学方面的优势¹³⁾。

那么,各种口腔护理用品必须具备的必要条件是什么呢?特别是对免疫力低下的人、需要护理的人(例如卧床不起者、刷牙无法自理者、无法呕吐者等)来说,不仅仅是当事者,从护理提供者的角度来看,口腔护理用品也必须具备“亲和人体、易于使用”之特点。

在日本,人们在日常饮食生活中经常使用味噌、酱油等发酵食品,这些食品巧妙地利用了乳酸菌的特点,可改善风味及提高保存性。在世界各地,以乳制品为主的发酵食品也已根植于不同饮食文化中,乳酸菌为人类所摄取,与人类共生。这些事实已经证明了乳酸菌的高度安全性及有用性。本文对自古以来就在食用及健康增进方面得到利用的乳酸菌是否可以作为口腔护理剂加以利用作一探讨。

2. 乳酸菌杆菌素在医疗用途上的有效性

杆菌素是由各种细菌在核糖体上合成的抗菌肽或蛋白质的总称。就乳酸菌来说,通过生成以乳酸为主的有机酸、酒精及杆菌素等抗菌物质来排除其他细菌或抑制其他细菌的生长发育,从而在生存竞争中取得优势。以乳酸链球菌素 A 为代表的乳酸菌杆菌素(表 1)对近缘革兰氏阳性菌显示出抗菌作用,和一般抗菌物质相比,瞬时作用于细胞膜且在低浓度下即可表现出较高的活性,同时具有对人体无不良影响、被人或动物的肠道消化酶分解、对环境造成的负荷极小、出现耐药菌的可能性极低等特点¹⁴⁻¹⁶。乳酸菌杆菌素属于天然的安全抗菌物质,作为食品防腐剂的研究和利用已取得进展,在医疗领域的应用可能性也受到极大期待¹⁷。

表 1 乳酸链球菌素 A 在医疗用途上的有效性

- 1 由 34 个氨基酸构成的多肽,会被消化道内的酶分解,在环境中也易于分解而无残留。
- 2 对类缘菌即革兰氏阳性菌[多重耐药菌即 MRSA 及 VRE(也包括耐万古霉素肠球菌在内)]具有广谱抗菌作用。
- 3 瞬时显示抗菌活性。
- 4 和抗生物物质相比,一般在低浓度下即可发挥作用。
- 5 以细胞壁前驱物质为靶靶,在细胞膜上形成孔洞,因此对人类及动物的细胞无影响。
- 6 具有耐酸性和耐热性,尤其是在低 pH 下显示出较高的稳定性。
- 7 单独使用时,对真菌及革兰氏阴性菌无抗菌活性。
- 8 在实用水准下,迄今为止尚无耐药菌相关报告。
- 9 无臭无味。

3. 乳酸菌杆菌素的代表性物质-乳酸链球菌素

3-1. 乳酸链球菌素 A

乳酸菌杆菌素的代表性物质即乳酸链球菌素是乳酸菌的乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis subsp. lactis*)的部分菌株生成的由 34 个氨基酸构成的多肽,存在有乳酸链球菌素 A、Q、Z 等氨基酸序列不同的类缘体(图 2),其生成、合成及作用机理正在得到深入研究¹⁶。令人感兴趣的是,在最早的抗生物物质即青霉素被发现的同一时代,乳酸链球菌素 A 于 1928 年在一户英国奶农家出产的奶酪中被发现。它对革兰氏阳性菌具有广谱抗菌活性¹⁸⁾¹⁹,对引发食品污染及食物中毒的芽孢杆菌属(*Bacillus*)、梭菌属(*Clostridium*)细菌具有特别高的抗菌活性,对控制营养细胞和抑制芽孢发芽非常有效。它对李斯特菌属(*Listeria*)细菌及葡萄球菌属(*Staphylococcus*)细菌也有作用,因此乳酸链球菌素 A 特别在食品保存方面已经得到活用¹⁶。在得到 WHO(世界卫生组织)和 FAO(联合国粮食及农业组织)的认可之后,在美国 FDA(美国食品药品监督管理局)获得 GRAS(Generally Recognized As Safe: 公认安全)认证²⁰。在日本,也于 2009 年被指定为食品添加剂(防腐剂)²¹,已经作为罐装食品及奶酪等食品的防腐剂在全球 50 余个国家得到使用²²。

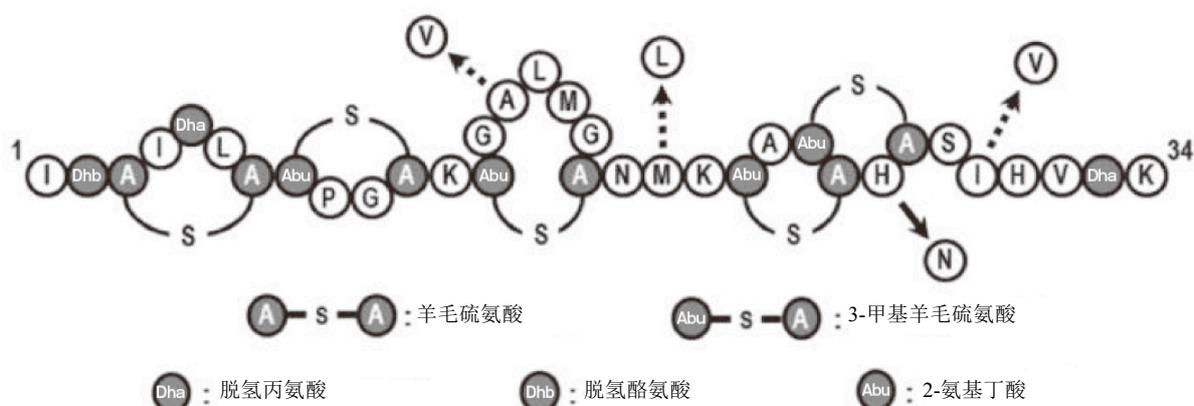


图 2 乳酸链球菌素 A 的结构

灰色所示氨基酸残基表示经转录后修饰而生成的特殊氨基酸(一般蛋白质中不含有的氨基酸)。实线箭头表示用乳酸链球菌素 Z 和 Q 所置换的氨基酸,虚线箭头表示仅用乳酸链球菌素 Q 所置换的氨基酸。(引用石桥等(2014)³⁰的图)

3-2. 乳酸链球菌素 A 的杀菌机制

乳酸链球菌素通过在细菌细胞膜上形成孔洞使细胞内的离子及 ATP 等较大的分子漏出而产生杀菌作用¹⁶⁾²³⁾ (图 3)。详细来说,首先以存在于细菌细胞膜上的细胞壁前驱体即 lipid II 作为靶分子,乳酸链球菌素的 N 末端以包裹 lipid II 的焦磷酸的方式发生结合并侵入细胞膜²⁴⁾。通过 8 个乳酸链球菌素分子和 4 个 lipid II 分子形成复合体而在细胞膜上形成直径为 2.5nm 的孔洞,使细胞内物质漏出而产生杀菌作用²⁵⁾ (图 4)。和这一基本骨架

的前驱体即 lipid II 的亲合性是乳酸链球菌素在 nM 级别的低浓度下就能显示抗菌活性的原因 (表 2)。lipid II 广泛存在于革兰氏阳性菌的表面,因此乳酸链球菌素对 MRSA (耐甲氧西林金黄色葡萄球菌)及 VRE (耐万古霉素肠球菌)等也可显示杀菌作用²⁶⁾⁻²⁸⁾。另一方面,乳酸链球菌素对不存在 lipid II 的人类细胞不产生杀菌作用。另外,近年来也有报告称其对生物膜可能有抗菌作用²⁹⁾³⁰⁾。



图3 乳酸链球菌素 A 使枯草杆菌细胞膜表面形成孔洞 (箭头表示形成的孔洞)
(引用并修改自 S. M. Asaduzzaman 等(2009)²³⁾)

表 2 乳酸链球菌素 A 对主要革兰氏阳性菌的最低生长抑制浓度(MIC)
(引用自 Fujita 等 (2007)¹⁸⁾)

菌种	菌株名	MIC (ng/mL)
<i>Bacillus cereus</i>	JCM 2152 ^T	84.9
<i>Bacillus coagulans</i>	JCM 2257 ^T	30.2
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090 ^T	231
<i>Lactococcus lactis</i>	ATCC 19435 ^T	265
<i>Streptococcus salivarius</i>	JCM 5707 ^T	2520
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600 ^T	158
<i>Enterococcus faecalis</i>	JCM 5803 ^T	295

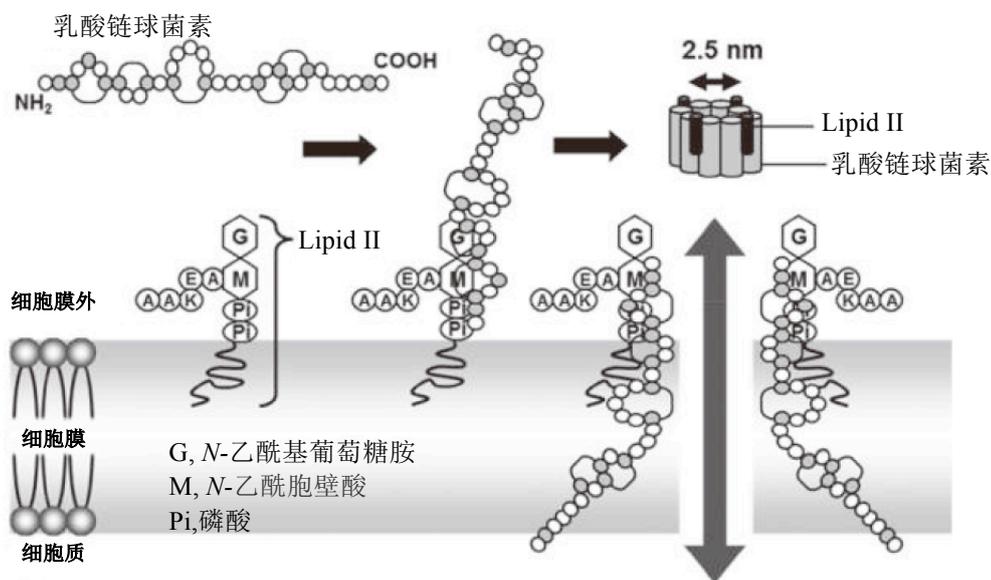


图 4 乳酸链球菌素的作用机制
(修改自 Breukink and de Kruijff (2006)²⁵⁾的图)

4. NeoNisin®

4-1. 由高度精制乳酸链球菌素 A 和梅子提取物制成的合剂

市售的乳酸链球菌素制剂是利用大量的盐采用盐析法制成的，混有盐分及培养基成分，纯度很低，仅为 2.5% (w/w)，不做加工的话，难以用于食品防腐剂之外的用途。在此背景下，我们和九州大学大学院农学研究院的园元等人合作，利用自福岡县产“Okara（一种豆腐渣）”分离而得的乳酸菌的乳酸乳球菌 QU53 (*Lactococcus lactis* QU 53) 菌株着手开发乳酸链球菌素 A 的高度精制技术，最终成功构筑纯度高达 90% (w/w) 以上的高度精制乳酸链球菌素 A 的工业性生产体制³¹⁾。和常规乳酸链球菌素制剂相比，我们开发的高度精制乳酸链球菌素 A 具有更为出色的品质（纯度）及保存稳定性（图 5）。

革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌不同，细胞壁外侧具有由脂多糖构成的“外膜”，即使是高纯度乳酸链球菌素 A 也无法通过这层外膜，单独使用并无效果³²⁾。但是我们知道，通过联合使用可破坏并去除外膜的螯合剂等物质，乳酸链球菌素 A 对革兰氏阴性菌也可产生杀菌效果³³⁾。另一方面，梅子提取物在一定浓度下可显示抗菌活性，但因伴有强烈酸味而不适合用于口腔。永利对高度精制乳酸链球菌素 A 和各种自植物中提取的成分进行了组合试验，结果发现了乳酸链球菌素和梅子提取物的独特配合比，既和乳酸链球菌素 A 有相乘效果且可对革兰氏阴性菌发挥抗菌活性，又不会影响其口味，从而改善了用于革兰氏阴性菌时的这一弱点³⁴⁾。将 10uL 属于革兰氏阴性菌的大肠杆菌（JCM649 菌株： $10^3 - 10^4$ CFU/mL）添加至乳酸链球菌素 A 或 NeoNisin® 试验液（10mL）中，使其接触 24 小时后测定活菌数，结果确认 NeoNisin® 几乎可以完全杀灭大肠杆菌（图 6）。

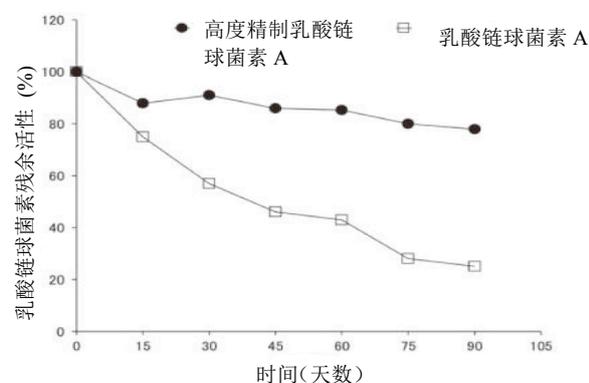


图 5 高度精制乳酸链球菌素 A 和常规乳酸链球菌素 A 的保存稳定性(40°C)

4-2. NeoNisin® 对口腔细菌的有效性

为了确认新开发的 NeoNisin® 的有效性，首先对 1) 龋齿的致病菌即变形链球菌 (*S. mutans*, 革兰氏阳性菌)；2) 肺炎、食物中毒、表皮感染症等的致病菌即金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*, 革兰氏阳性菌)；3) 牙周病关联细菌即伴放线聚生杆菌 (*A.a. bacteria*, 革兰氏阴性菌) 进行了试验。将上述三种受试菌 (10^5 CFU/mL) 添加至 NeoNisin® 试验液 (200 μ L) 中，在 37°C 下使其接触 10 分钟后，置于琼脂培养基中进行培养并测定活菌数，算出生存率。结果表明，变形链球菌和伴放线聚生杆菌几乎全部被杀灭，对金黄色葡萄球菌也显示了显著的杀菌效果（图 7）。

其次，就其对属于牙周病致病菌中被称为“红色复合体”³⁵⁾ 的致病性最高组别的牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*, 革兰氏阴性菌) 的杀菌效果进行了试验。将牙龈卟啉单胞菌接种于 NeoNisin® 试验液中，培养 48 小时后，测定培养液的浊度 (600nm) 并算出增殖抑制效果。NeoNisin® 在非常低的浓度下即显示出出色的效果（图 8）。

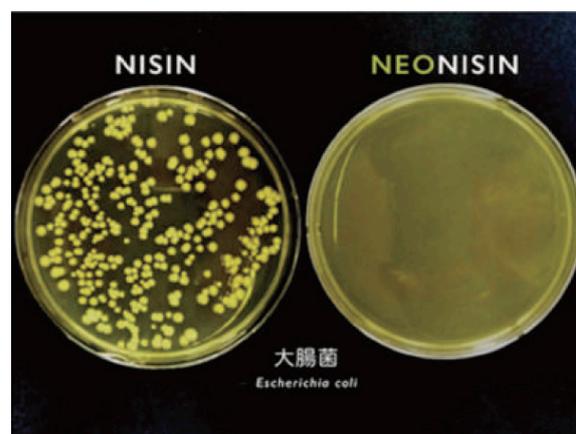


图 6 NeoNisin® 对大肠杆菌的效果

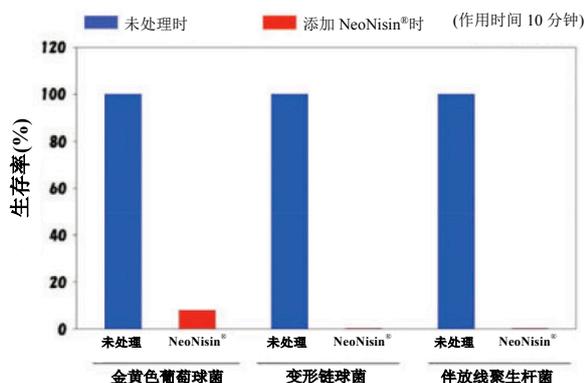


图 7 NeoNisin® 对金黄色葡萄球菌、变形链球菌及伴放线聚生杆菌的效果

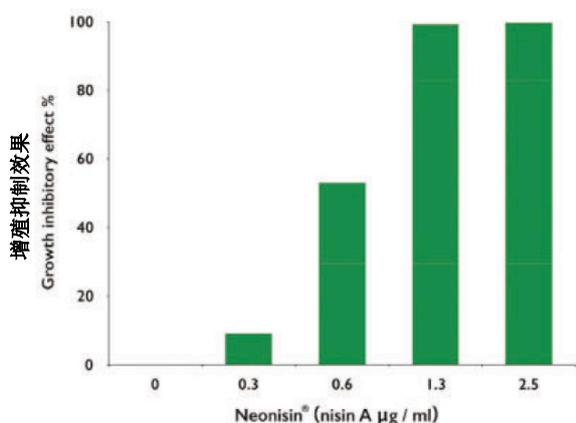


图 8 NeoNisin® 对牙龈卟啉单胞菌的增殖抑制效果

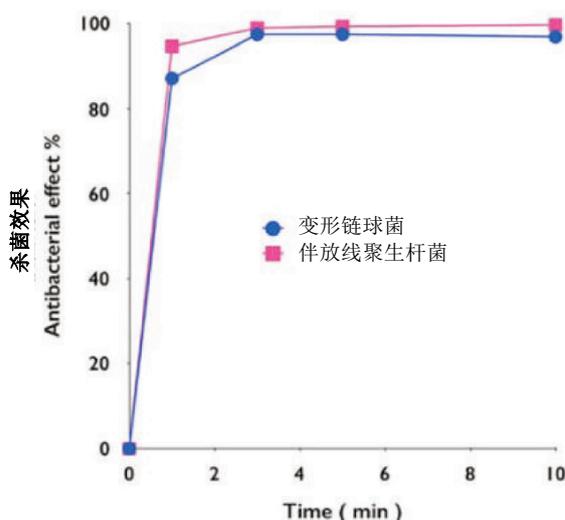


图 9 NeoNisin® 对变形链球菌及伴放线聚生杆菌的杀菌率和杀菌速度



图 10 凝胶剂型和喷剂型 Oralpeace®

进一步使变形链球菌及伴放线聚生杆菌和 NeoNisin® 接触一定时间后，置于琼脂培养基进行培养并测定活菌数，算出杀菌率。结果表明，两种细菌在 1 分钟这样一个非常短的作用时间内几乎全被杀灭，NeoNisin® 显示出瞬时杀菌作用（图 9）。

这些证据表明，对于可能成为口腔内生物膜构成细菌的革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌，NeoNisin® 都可能具有瞬时且强大的杀菌作用。特别是对变形链球菌及牙龈卟啉单胞菌、伴放线聚生杆菌所显示的显著杀菌效果表明其很有可能成为牙科两大疾病即龋齿和牙周病的预防剂。

5. Oralpeace® 的创新性及临床应用

株式会社 Trife 开发的 Oralpeace® 是含有 NeoNisin® 的口腔护理产品，分为凝胶剂型和喷剂型。NeoNisin® 之外的组成成分也都是可食用成分，因此即使吞下也无害处，可用于需要护理者及残障人士等存在呕吐功能障碍的

患者。涂布于假牙内侧时，不仅可预防感染，还可通过湿润作用达到保护粘膜的目的。这款口腔护理产品是一种前所未有的创新产品，具有以下特点：对细菌具有杀菌效果；不影响人体细胞；在肠道被分解且不扰乱肠内菌丛；包括手术后及创伤治愈期间可多次连续使用；即使吞下也非常安全。这款产品有三种口味，分为凝胶剂型和喷剂型（图 10）。尤其就喷剂型来说，直接喷雾至口腔内后吞下即可，方便在办公室或移动时（例如在飞机或列车内）以及处于卧床等状态而无法漱口时进行口腔护理。在用于日常刷牙的同时，随时随地使用 Oralpeace® 进行口腔护理并养成习惯的话，可进一步有效抑制口腔常驻菌形成生物膜。

另外，作为宠物用口腔护理产品，“Oralpeace for Pet”也已推出。从其作用机理来看，可以期待 NeoNisin® 在动物口腔内也可发挥和人类同样的效果。这样即使对于无法漱口及呕吐的宠物来说，也可通过舔或吞下的方式养成每天安全地进行口腔护理的习惯。不仅

如此,通过和人用同款产品打包,可进一步感受人和宠物的一体感,这也是非常有趣的。

6. 结语

关于杆菌素在医疗用途上的可能性,我们认为不仅仅是口腔,还可扩展至直接喷雾即可触及的部位,例如鼻腔、咽喉、皮肤等处。在充分考虑杆菌素的特性及其作用机理等特征的同时,今后打算以人和动物两者为对象,就这些可能性及临床有用性逐步开展验证。

谢辞 本文写作过程中,鹿儿岛大学大学院医齿学综合研究科发生发达育成学讲座口腔微生物学领域的小松泽均教授、松尾美树医师对试验等给予了全力支持,在此谨致诚挚的谢意。另外,九州大学大学院农学研究生院生命机能科学部门系统生物工程学讲座微生物工学领域的园元谦二教授在杆菌素相关知识方面对我们提供了大量指导,一并致以衷心感谢。

参考文献

- 厚生劳动省,关于 2011 年牙科疾病实态调查结果的概要,(2011)
- 奥田克尔,日本口腔外科学会杂志, **56**(4), 231-239 (2010)
- 广畑直子、相泽聪一、相泽志保子,日大医学杂志, **73**(5), 211-218 (2014)
- 医疗及介护相关肺炎(NHCAP)诊疗指南制定委员会,日本呼吸器学会 (2011)
- 若杉叶子等,日本呼吸护理及康复学会志, **24**(1), 46-50 (2014)
- Japanese Respiratory, *Respirology*, **14**, Suppl 2, S59-64 (2009)
- 米山武义等,日本牙科医学会志, **20**, 58-68 (2001)
- 阿久津泰典等,日本消化器外科学会杂志, **42**(6), 617-621 (2009)
- 松浦一登,头颈部外科, **22**(1), 33-39 (2012)
- 足立三枝子等,老年齿科医学, **22**(2), 83-89 (2007)
- 堀良子等,日本环境感染学会志, **25**(2), 85-90 (2010)
- 五十嵐幸广等,日本呼吸护理及康复学会志, **25**(2), 286-290 (2015)
- 道胁幸博等,老年齿科医学, **17**(3), 275-280 (2003)
- 益田时光、善藤威史、园元谦二, *Milk Science*, **59**(1), 59-65 (2010)
- 善藤威史、石桥直树、园元谦二,日本乳酸菌学会志, **25**(1), 24-33 (2014)
- 善藤威史、泽稔彦、米山史纪,乳业技术, **59**, 77-86 (2009)
- P.D. Cotter, R.P. Ross, C. Hill, *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**(2), 95-105 (2013)
- K. Fujita et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**(9), 2871-2877 (2007)
- F. Yoneyama et al., *J. Appl. Microbiol.*, **105**(6), 1982-1990 (2008)
- FDA, Code of Federal Regulations Title 21 Food and Drugs, 21CFR184.1538 (1998)
- 厚生劳动省行政信息,关于食品卫生法施行规则部分修订的省令及食品、添加剂等的规格标准的部分修订(2009)
- J. Cleveland et al., *Int. J. Food Microbiol.*, **71**(1), 1-20 (2001)
- S.M. Asaduzzaman et al., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **53**(8), 3595-3598 (2009)
- M.R. Islam et al., *Biochem. Soc. Trans.*, **40**(6), 1528-1533 (2012)
- E. Breukink, B. de Kruijff, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**(4), 321-323 (2006)
- W. Brumfitt, *J. Antimicrob. Chemother.*, **50**(5), 731-734 (2002)
- C. Piper et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, **64**(3), 546-551 (2009)
- E. Severina, A. Severin, A. Tomasz, *J. Antimicrob. Chemother.*, **41**(3), 341-347 (1998)
- K. Okuda et al., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **57**(11), 5572-5579 (2013)
- J.M. Shin et al., *Front. Microbiol.*, **6**, 617 (2015)
- 2011 年度战略性基础技术深化支援事业,利用新的二阶段乳酸菌发酵及精制法开发微生物调控剂等, (2012)
- J. Delves-Broughton, L.V. Thomas, M.R. Clarkson, Nisin, "Natural Food Antimicrobial Systems," CRC Press (2000)
- K.A. Stevens et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(12), 3613-3615 (1991)
- 永利浩平,“专利第 5750552 号 抗菌成分”
- S.S. Socransky, A.D. Haffajee, *Periodontol.* **2000**, **28**, 12-55 (2002)
- 石桥直树等, *FRAGRANCE JOURNAL*, **42**(5), 35-40 (2014)

Effectiveness and clinical applications of a safe edible antimicrobial peptide produced by lactic acid bacteria

Abstract: Recently many cases have been reported that biofilms created by oral resident microbiota trigger not only dental caries and periodontitis but also various systemic illnesses. Nisin A, a bacteriocin peptide produced by lactic acid bacteria, has properties to instantly sterilize Gram-positive bacteria. In addition, it is harmless to human cells and degradable by digestive enzymes, and has neither taste nor smell. Nisin A is widely used in over 50 countries as a food preservative, and at the practical level no acquired resistant bacteria against nisin A have been reported. Neonisin[®], a newly developed antimicrobial agent based on plum extracts and nisin A, sterilizes Gram-negative bacteria also, which are tolerant to nisin A alone, as a result of chelating action caused by the plum extracts. Utilizing Neonisin[®], Trife Inc. further developed a product for oral care, named Oralpeace[®]. Trife succeeded in production of highly purified nisin A, with very low levels of impurities and salts, which is applied to produce Neonisin[®] and Oralpeace[®]. Since Oralpeace[®] consists only of edible ingredients, patients that have difficulties in gargling and spitting can use it safely. Bacteriocins from lactic acid bacteria are being found to have great potential for medical purposes such as prevention of bacterial infections in body parts with possible skin contact as well as food preservation.

Key words: nisin, antimicrobial peptide, food preservative, lactic acid bacteria, oral care, opportunistic infection, oral diseases, antibiotic-resistant bacteria



Emi Sumida^{*1}



Kohei Nagatoshi^{*2}



Takeshi Zendo^{*3}

^{*1} Sakamoto Dental Clinic

阪本齿科医院

136-0072 东京都江东区大岛7-3-1 Yayoi大楼2-D

^{*2} Ecofriendly institute Ltd.

株式会社环保研究所

818-0013 福冈县筑紫野市冈田1-7-14

^{*3} Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University

九州大学大学院农学研究院生命机能科学部门

邮编: 812-8581 福冈县福冈市东区箱崎 6-10-1

- ^{*1} 1995年 东京医科齿科大学齿学部 毕业
1997年 东京医科齿科大学齿学部附属医院医务人员(实习医师) 修满
2005年 东京医科齿科大学大学院医齿学综合研究科博士课程 修满
2005年 供职于川崎社会保险医院齿科口腔外科(合同医务人员)
2009年 供职于阪本齿科医院(东京都江东区), 至今。牙科医师(牙科学博士)
- ^{*2} 1995年 北海道大学农学部农艺化学科 毕业
同年 Adeka Clean Aid 株式会社 Tsukuba 研究所
2000年 关西酵素株式会社基础研究室
2002年 Omu 乳业株式会社开发部
2007年 设立 Quark Bio LLP
2012年 设立株式会社环保研究所, 至今
- ^{*3} 2004年 九州大学大学院生物资源环境科学府博士课程 修满
同年 九州大学大学院农学研究院学术研究员
2006年 九州大学大学院农学研究院助手
2007年 九州大学大学院农学研究院助教, 至今