

飲み込んで安全な乳酸菌抗菌ペプチド の効果と臨床応用

角田愛美 永利浩平 善藤威史

1. はじめに

う蝕と歯周病（図1）は、先人たちの努力により近年減少の傾向を示しているが¹⁾、依然として、人類が最も多くかかる感染症である。口腔感染症を引き起こす細菌は、それぞれ単独に存在し宿主に抵抗しているわけでない。歯面、歯周組織、舌などの口腔粘膜、入れ歯、インプラント上などに、ほかの常在菌とコミュニティを持ちつつ定着し、キノコ状にバイオフィームという要塞を形成し病原性を持つ生物叢に成熟していく。近年の研究で、このバイオフィームからの細菌による全身疾患（関節リウマチや糖尿病など）への影響が解明されてきている²⁾³⁾。また高齢、疾患、治療などによる宿主側の変化で免疫不全になると、通常では病原性を発揮しないレベルの常在菌や弱毒微生物を発病させる日和見感染症が起きる。口腔常在菌による粘膜トラブルは痛みや違和感を引き起こし、食事（栄養摂取）に影響する。高齢者に多い誤嚥性肺炎は、再発を繰り返し、それにより耐性菌が発生し抗菌薬治療に抵抗性を持つなどの特



図1 要介護高齢者のう蝕と歯周病

歯周病とう蝕の結末は歯の喪失とは限らない。歯周病の進行によりセメント質の露出した歯は根面う蝕になりやすく、その後破折を引き起こす。破折した根は長く顎骨に残り、バイオフィームの形成の場となり細菌の体内への感染ルートとなる。

徴があるが⁴⁾⁵⁾、この疾患の成立には咳反射の低下に加えて口腔内常在菌が関与する⁶⁾。超高齢化社会を迎えている我が国においては、含嗽すら困難な要介護者の増加により、口腔常在菌を原因とする全身への感染症が増加すると予想される。

一方で、米山らは、要介護高齢者において口腔ケアが誤嚥性肺炎の発症を低下させたと報告し⁷⁾、口腔ケアが全身疾患に対する予防治療の一手段である可能性を示した。阿久津らは食道がん手術症例において歯垢の中に病原性の細菌が検出された症例で術後肺炎の発症が高いことを報告した⁸⁾が、特に頭頸部の手術時において口腔ケアの導入で術後合併症が減少する⁹⁾。口腔常在菌を病原化させずに全身疾患の予防と共生を続けていくためには、口腔ケアが重要であることが改めて数多く示されている^{10)~12)}。加えて口腔ケアには、医療経済的な優位性もあるとの報告もある¹³⁾。

それでは、広く口腔ケア用品を具備する要件とは何であろうか。特に免疫の低下した人、介護を必要とする人の場合（例えば寝たきり、自力で歯ブラシできない、吐き出せない人など）、当事者だけでなく、その人を支える介護者たち両者にとって「優しく使いやすい」ものでなくてはならない。

我が国において毎日の食生活では味噌や醤油といった発酵食品に親しんでいるが、これらは乳酸菌の特徴を風味や保存性の向上に巧みに利用したものである。世界各地においても乳製品をはじめとする発酵食品は食文化として根付いており、乳酸菌は人々に摂取され、共生してきた。こういった事実は乳酸菌の安全性の高さや有用性を証明している。本稿では、古来、食や健康増進に利用されてきた乳酸菌を、口腔ケア剤として利用する可能性を探った。

2. 乳酸菌バクテリオシンの医療用途への有効性

バクテリオシンとは、様々な細菌によってリボソーム上で合成される抗菌性ペプチド、あるいはタンパク質の総称である。乳酸菌においては、乳酸酸をはじめとする有機酸やアルコール、バクテリオシンなどの抗菌性物質を生産することにより、ほかの細菌を排除、発育抑制し生存競争を優位にしている。ナイシン A を代表とする乳酸菌バクテリオシン（表 1）は、近縁のグラム陽性菌に抗菌作用を示し、細胞膜に瞬時に作用して一般的な抗菌物質と比べて低濃度で高い活性を示す一方、ヒトに対する悪影響がなく、人や動物の腸管の消

表 1 ナイシン A の医療用途への有効性

1	34 個のアミノ酸でできたペプチドであり、消化管内の酵素で分解され、環境中でも容易に分解し、残存しない。
2	類縁菌であるグラム陽性菌 [多剤耐性菌である MRSA や VRE (バンコマイシン耐性腸球菌も含む)] に幅広い抗菌スペクトルを持つ。
3	瞬時に抗菌活性を示す。
4	一般的に抗生物質と比べ低濃度で作用する。
5	細胞壁前駆物質が標的となり細胞膜に孔形成をするため、ヒトや動物の細胞には影響しない。
6	耐酸性と耐熱性を持ち、特に低 pH で高い安定性を示す。
7	真菌やグラム陰性菌には単独では抗菌活性がない。
8	いままです実用レベルでは耐性菌の報告がない。
9	無味無臭である。

化酵素で分解され、環境への負荷が極めて小さく、耐性菌が出現する可能性が極めて低いという特徴を有する¹⁴⁻¹⁶。乳酸菌バクテリオシンは天然の安全な抗菌物質として食品保存料としての利用・研究が進められてきたが、医療分野への応用の可能性も大いに期待される¹⁷。

3. 乳酸菌バクテリオシンの代表、ナイシン

3-1. ナイシン A

乳酸菌バクテリオシンの代表であるナイシンは、乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の一部の菌株から産生される 34 個のアミノ酸からなるペプチドで、アミノ酸配列の異なる類縁体、ナイシン A, Q, Z などが存在し（図 2）、その生合成や作用機構に関して詳細に研究がなされている¹⁶。興味深いことにナイシン A は、最初の抗生物質であるペニシリンと同時代の 1928 年に、イギリスの酪農家によりチーズの中から発見された。広くグラム陽性菌に抗菌活性があり^{18) 19)}、食品汚染や食中毒をもたらす *Bacillus* 属、*Clostridium* 属細菌に特に高い抗菌活性を持ち、栄養細胞の制御と芽胞の発芽抑制に有効である。*Listeria* 属や *Staphylococcus* 属細菌にも作用するため、ナイシン A は特に食品保存に活用されてきた¹⁶。WHO（世界保健機構）と FAO（国際連合食糧農業機関）にて承認後、米国 FDA（食品医薬品局）では GRAS（Generally Recognized As Safe）として認められている²⁰。日本でも 2009 年に食品添加物（保存料）として指定され²¹、すでに缶詰やチーズなどへの食品保存料として世界 50 以上の国で

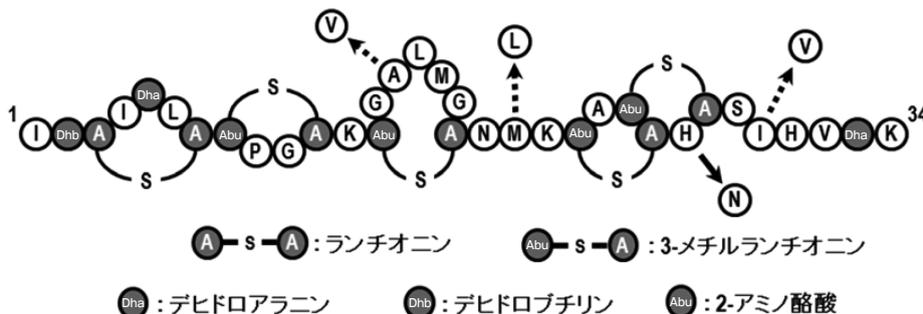


図 2 ナイシン A の構造

灰色のアミノ酸残基は、翻訳後修飾で生じる異常アミノ酸（一般のタンパク質には含まれていないアミノ酸）を示す。実線矢印は、ナイシン Z と Q で置換されているアミノ酸、破線矢印はナイシン Q のみで置換されているアミノ酸を示す。（石橋ら（2014）³⁰ の図を引用）

使用されている²²⁾。

3-2. ナイシン A の殺菌機構

ナイシン A による殺菌作用は、細菌細胞膜に孔を形成し、細胞内のイオンや ATP などの比較的大きな分子までも漏出させることで起こる^{16) 23)} (図 3)。詳細を述べると、まず細菌の細胞膜上に存在する細胞壁前駆体である lipid II 標的分子として、ナイシンの N 末端が lipid II のピロリン酸を包み込むように結合し細胞膜に侵入する²⁴⁾。8



図 3 ナイシン A の枯草菌への孔形成(矢印は孔を示す)
(S. M. Asaduzzaman ら (2009)²³⁾ より改変引用)

つのナイシン分子と 4 つの lipid II 分子が複合体を形成することで細胞膜に直径 2.5 nm の孔を形成し、細胞内物質を漏出させることで殺菌作用を示す²⁵⁾ (図 4)。この基本骨格の前駆体である lipid II への親和性が nM レベルという低濃度でナイシンが抗菌活性を示す理由である (表 2)。lipid II はグラム陽性菌の表面に広く存在しており、MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) や VRE (バンコマイシン耐性腸球菌) などに対してもナイシンは殺菌作用を示す^{26) ~28)}。一方、lipid II が存在しないヒトの細胞には、ナイシンは殺菌作用を示さない。また近年、バイオフィルムに対する抗菌作用の可能性も報告されている^{29) 30)}。

表 2 ナイシン A の主なグラム陽性菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC)
(Fujita ら (2007)¹⁸⁾ より引用)

菌種	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

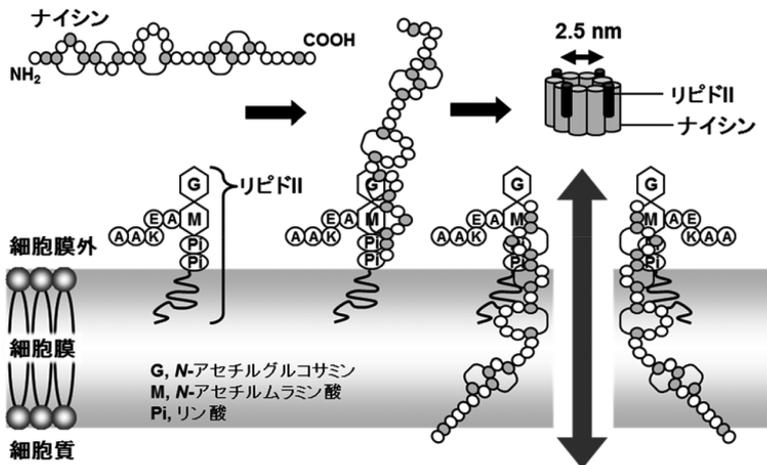


図 4 ナイシンの作用機構
(Breukink and de Kruijff (2006)²⁵⁾ の図を改変)

4. ネオナisin®

4-1. 高精製ナイシン A と梅エキスの合剤

市販のナイシン製剤は、大量の塩を利用した塩析法で生産されるため、塩や培地成分が混じり、純度が2.5% (w/w) と低く、そのままでは食品保存料用途以外への利用は困難であった。このような中、九州大学大学院農学研究院、園元らとともに、福岡県産のおからから分離された乳酸菌 *Lactococcus lactis* QU 53 株を用いてナイシン A の高度精製技術の開発に着手し、最終的には、純度90% (w/w) 以上の高精製ナイシン A の工業的生産体制を構築することができた³¹⁾。開発した高精製ナイシン A は、従来のナイシン製剤に比べて、品質(純度)、保存安定性に優れていた(図5)。

ナイシン A は高純度であっても、グラム陽性菌と異なり、細胞壁の外側にリポ多糖からなる「外膜」を持つグラム陰性菌に対しては、外膜を通過できず、単独では効果を示さない³²⁾。しかし外膜を破壊除去するキレート剤などと併用することにより、グラム陰性菌に対してもナイシン A が殺菌効果を得ることが知られている³³⁾。一方、梅エキスは、一定の濃度で抗菌活性を示すが、強い酸味を伴い、口腔用途には不適であった。永利は、高精製ナイシン A と様々な植物由来の成分との組み合わせ試験を行った結果、ナイシン A との相乗効果を有しグラム陰性細菌に対して抗菌活性を示し、かつ味にほとんど影響しない、独自のナイシ

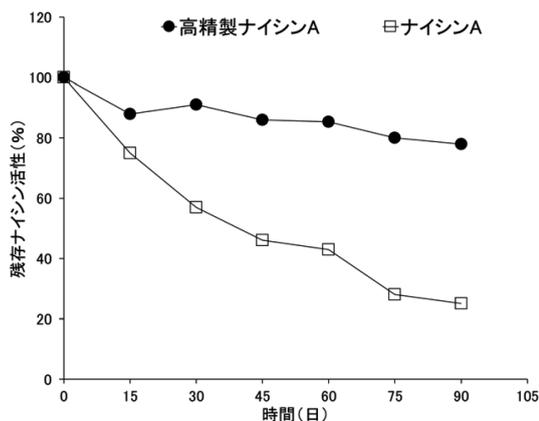


図5 高精製ナイシン A と従来ナイシン A の保存安定性 (40℃)

ン A と梅エキスの配合比を見だし、グラム陰性菌に対するこの弱点を改善した³⁴⁾。グラム陰性菌である大腸菌 (JCM 1649 株: $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL) 10 μ L をナイシン A あるいはネオナisin® 試験液 (10 mL) に添加して 24 時間接触させた後、生菌数を測定したところ、ネオナisin® で、大腸菌をほぼ完全に殺菌できることが確認された(図6)。

4-2. ネオナisin® の口腔の細菌への有効性

新規に開発したネオナisin® の有効性を確認するため、まず 1) う蝕の原因菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*, グラム陽性菌), 2) 肺炎, 食中毒, 表皮の感染症などの原因菌でもある *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌, グラム陽性菌), 3) 歯周病関連菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.* 菌, グラム陰性菌) に対し試験した。上述 3 種の供試菌 (10^5 CFU/mL) を、ネオナisin® 試験液 (200 μ L) に添加して 37℃ で 10 分間接触させた後、寒天培地にて培養し生菌数を測定、生存率を算出した。結果は、*S. mutans* と *A.a.* 菌はほぼすべて殺菌され、黄色ブドウ球菌に対しても顕著な殺菌効果を示した(図7)。

次に、歯周病原菌の中でレッドコンプレックス³⁵⁾と言われる最も病原性の高いグループに属する *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*, グラム陰性菌) に対する殺菌効果を試験した。ネオナisin® 試験液に *P. gingivalis* を接種して 48 時間培養した後、培養液の濁度 (600 nm) を測定し、増殖抑制効果を算出した。ネオナisin® は、非常に低濃度ながら優れた効果を示した(図8)。

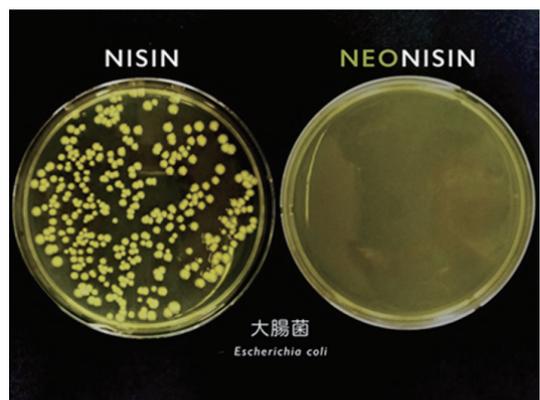


図6 ネオナisin® の大腸菌への効果

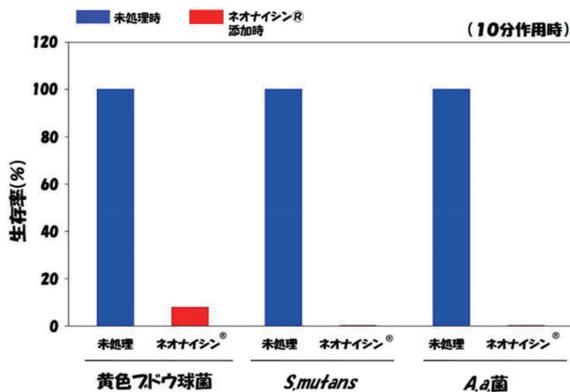


図7 ネオナイシン®の黄色ブドウ球菌, *S. mutans* と *A.a.* 菌への効果

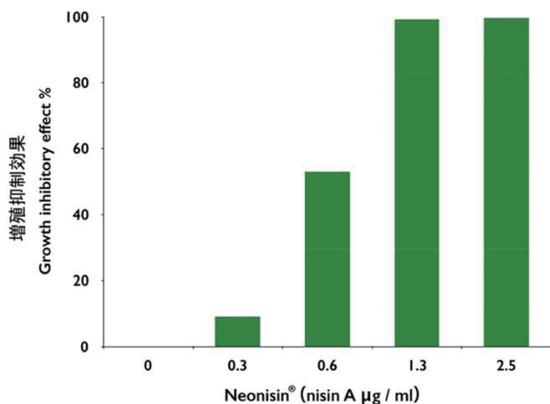


図8 ネオナイシン®の *P. gingivalis* に対する増殖抑制効果

さらに, *S. mutans* と *A.a.* 菌をネオナイシン®に一定時間接触させた後, 寒天培地にて培養して生菌数を測定し, 殺菌率を算出した。その結果, それぞれの細菌は1分以内という短い作用時間でほぼ死滅し, ネオナイシン®は瞬時に殺菌作用を示した(図9)。

これらのことからネオナイシン®は, 口腔内のバイオフィルムの構成細菌となりうるグラム陽性菌とグラム陰性菌のどちらに対しても, 瞬時に, かつ強力な殺菌作用を持つ可能性を示した。特に, *S. mutans* と *P. gingivalis*, *A.a.* 菌に対する顕著な殺菌効果は, 歯科の二大疾患であるう蝕と歯周病の予防剤として大きな可能性を示している。

5. オーラルピース®の新規性と臨床応用

(株)トライフが開発したオーラルピース®は, ネ

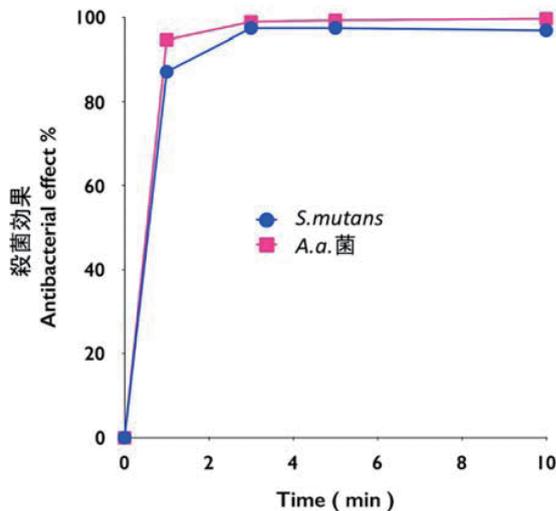


図9 ネオナイシン®の *S. mutans* と *A.a.* 菌への殺菌率と殺菌スピード



図10 オーラルピース®ジェルタイプとスプレータイプ

オナイシン®を含有したジェルタイプとスプレータイプの口腔ケア製品である。ネオナイシン®以外の成分もすべて可食成分でできているため, 飲み込んでも無害であり, 要介護者や障害者など, 吐き出しのできない患者さんに使用できる。入れ歯の裏に塗布すれば, 感染予防だけでなく湿潤などによる粘膜保護も可能である。細菌に対して殺菌効果があり, ヒト細胞に対しては影響しない上に, 腸管で分解され腸内細菌叢も乱さず, 手術後や創傷治癒期間だけでなく何度でも連続使用可能, かつ飲み込んでも安全である口腔ケア製品は, 今まで存在しなかった。3種類のフレーバのジェルタイプとスプレータイプがあるが(図10), 特にスプレータイプを口内に直接噴霧した後に飲み込んでしまえばよいという特徴から, オフィス

や移動時（例えば航空機や列車内）、そしてベッドや布団上などのうがいができない場所でも口腔ケアが可能となった。日々の歯ブラシなどでの使用とともに、オーラルピース®でいつでもどこでも口腔ケア、という習慣が追加されることで、口腔常在菌によるバイオフィーム形成をさらに効果的に抑制できると思われる。

また、ペット用の口腔ケア製品として「オーラルピース フォーペット」も展開された。ネオナイシン®はその作用機序から動物の口腔内においてもヒトと同様に効果が期待できる。これにより、うがいや吐き出しのできないペットに対しても、なめても飲み込んで安全に行える毎日の口腔ケア習慣を提案できるだけでなく、ヒト用と同じラインナップのパッケージでペットとより一体感を感じられることも興味深い。

6. おわりに

バクテリオシンの医療用途としての可能性は、口腔だけでなく、直接噴霧接触のできる分野、例えば、鼻腔、咽頭、皮膚などにも拡がると考えられる。バクテリオシンの特性や作用機序などの特徴を十分考慮しながら、今後、これらの可能性と臨床での有用性についてヒトと動物の両方において検証していきたいと考えている。

謝辞 本稿作成にあたり、実験などでご尽力を頂きました鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科発生発達学講座口腔微生物学分野 小松澤均教授、松尾美樹先生に感謝の意を表します。また、バクテリオシンについて九州大学大学院 農学研究院生命機能科学部門システム生物学講座微生物学学分野 園元謙二教授には多大なご指導を賜りました。心より感謝いたします。

参 考 文 献

- 厚生労働省, 平成 23 年歯科疾患実態調査結果の概要について, (2011)
- 奥田克爾, 日本口腔外科学会雑誌, **56** (4), 231~239 (2010)
- 廣畑直子, 相澤聡一, 相澤志保子, 日大医学雑誌, **73** (5), 211~218 (2014)
- 医療・介護関連肺炎 (NHCAP) 診療ガイドライン作成委員会, 日本呼吸器学会 (2011)
- 若杉葉子 他, 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, **24** (1), 46~50 (2014)
- Japanese Respiratory, *Respirology*, **14**, Suppl 2, S59~64 (2009)
- 米山武義 他, 日本歯科医学会誌, **20**, 58~68 (2001)
- 阿久津泰典 他, 日本消化器外科学会雑誌, **42** (6), 617~621 (2009)
- 松浦一登, 頭頸部外科, **22** (1), 33~39 (2012)
- 足立三枝子 他, 老年歯科医学, **22**(2), 83~89 (2007)
- 堀 良子 他, 日本環境感染学会誌, **25** (2), 85 ~ 90 (2010)
- 五十嵐幸広 他, 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, **25** (2), 286~290 (2015)
- 道脇幸博 他, 老年歯科医学, **17**(3), 275~280 (2003)
- 益田時光, 善藤威史, 園元謙二, ミルクサイエンス, **59** (1), 59~65 (2010)
- 善藤威史, 石橋直樹, 園元謙二, 日本乳酸菌学会誌, **25** (1), 24~33 (2014)
- 善藤威史, 澤 稔彦, 米山史紀, 乳業技術, **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)
- 厚生労働省行政情報, 食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件について, (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)
- 平成 23年度戦略的基盤技術高度化支援事業, 新規二段階乳酸菌発酵・精製法を利用した微生物制御剤等の開発, (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, "特許第 5750552 号 抗菌用組成物"
- S.S. Socransky, A.D. Haffajee, *Periodontol.* 2000, **28**, 12~55 (2002)
- 石橋直樹 他, *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

阪本歯科医院
〒136-0072 江東区大島 7-3-1 ヤヨイビル 2-D

*² Ecofriendly institute Ltd.

株式会社優しい研究所
〒818-0013 福岡県筑紫野市岡田 1-7-14

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

九州大学大学院 農学研究院生命機能科学部門
〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

*¹ 1995年東京医科歯科大学 歯学部卒業,

1997年東京医科歯科大学 歯学部付属病院医員(研修医)修了,
2005年東京医科歯科大学大学院 歯医学総合研究科博士課程修了,

2005年川崎社会保険病院 歯科口腔外科勤務(嘱託医員),

2009年阪本歯科医院(東京都江東区)勤務,現在に至る。歯科医師(歯学博士)。

*² 1995年北海道大学 農学部農芸化学科卒業,

同年, アデカクリーンエイド(株)つくば研究所,

2000年関西酵素(株)基礎研究室,

2002年オーム乳業(株)開発部,

2007年クォーク・バイオ LLP 設立,

2012年(株)優しい研究所 設立,現在に至る。

*³ 2004年九州大学大学院 生物資源環境科学府博士課程修了,

同年,九州大学大学院 農学研究院学術研究員,

2006年九州大学大学院 農学研究院助手,

2007年九州大学大学院 農学研究院助教,現在に至る。