

乳酸菌由来抗菌ペプチドを用いた 口腔ケア用製剤「ネオナイシン®」

永利浩平^{*1}, 手島大輔^{*2}

*1 (株)優しい研究所 代表取締役

*2 (株)トライフ 代表取締役

『天然系抗菌・防カビ剤の開発と応用』

2019年4月 シーエムシー出版刊 拡刷

第3章 乳酸菌由来抗菌ペプチドを用いた 口腔ケア用製剤「ネオナイシン[®]」

永利浩平^{*1}, 手島大輔^{*2}

1 はじめに

乳酸菌は、古来、人の生活に深く関与してきた細菌の一つで、糖を発酵し、多量の乳酸をつくる細菌の総称である。乳酸菌は、自然界に広く分布し、ヨーグルト、チーズ、漬物、みそ、しょう油などの伝統的発酵・醸造食品の風味や嗜好性の向上、その保存性の向上に大きく寄与している。とくに、乳酸菌による食品保存性の向上には、乳酸やさまざまな抗菌性物質が関与し、その中の一つに、バクテリオシンと呼ばれる抗菌ペプチドが存在する。本抗菌ペプチドは、グラム陽性菌に対して強い抗菌活性を示し、体内で消化・分解される安全性の高いものであるため、天然の抗菌素材として注目されている。

一方、日本人のうち虫歯を患っている人は全人口の90%、歯周病は70%と言われており、近年、歯周病と生活習慣病（糖尿病、心臓病、脳梗塞など）との関連性や、歯の本数とアルツハイマー病の相関が明らかにされている。従来の化学合成殺菌剤などを含有する口腔ケア剤は、誤飲すれば体内の常在菌までも殺菌し、人体への悪影響が危惧されている。吐き出しやうがいが難しく、誤嚥の恐れのある高齢者や障がい者などの口腔ケアは水のみで行われ、十分な効果が得られない場合が多く、その対策が急務である。

このような背景の中、我々は乳酸菌由来の抗菌ペプチド（バクテリオシン）を利用した、誤って飲み込んでも安全な口腔ケア剤に関する技術開発を行った。本稿では、乳酸菌由来抗菌ペプチドの特性、および本抗菌ペプチドを利用した口腔用天然抗菌剤についての取り組みを紹介する。

2 乳酸菌由来抗菌ペプチド

2.1 ナイシン

乳酸菌由来抗菌ペプチドであるバクテリオシンの中で最も代表的なものは、34個のアミノ酸からなるナイシンAである（図1）。1928年にイギリスの酪農家により発見され、国際機関WHO/FAO、米国FDAにより、その安全性が認められ、日本を含む世界50か国以上で食品保存料として利用されている¹⁾。ナイシンAは、細菌細胞膜表面に存在するペプチドグリカンの前

* 1 Kohei Nagatoshi (株)優しい研究所 代表取締役

* 2 Daisuke Teshima (株)トライフ 代表取締役

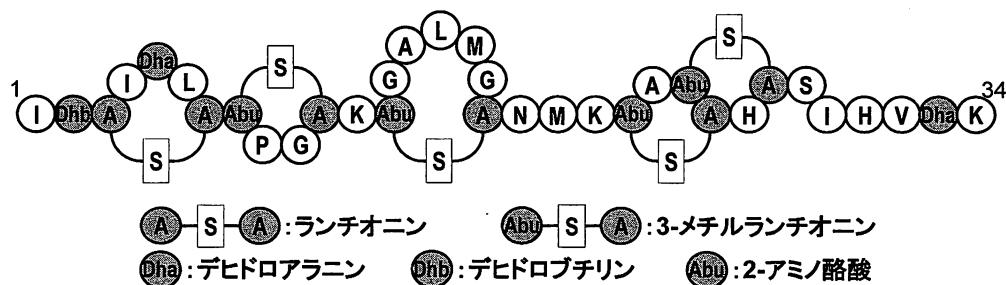


図1 ナイシンAの構造

駆体 lipid II に結合して細胞壁合成を阻害すると同時に、lipid II と複合体を形成して細胞膜に孔を形成して細胞質内から ATP やイオンを漏出させる。このような作用機構により、ナイシン A は一般の抗菌剤と比較してきわめて低い nM レベルで瞬時の殺菌効果を示し、いまだに耐性菌の報告はない。また、ナイシン A は MRSA や VRE など多剤耐性菌をはじめとした産業界に多大な被害を及ぼす種々の有害微生物に有効であることから、天然の安全な抗菌剤として注目されている。ナイシン A をはじめとする乳酸菌バクテリオシンについての詳細は、第Ⅱ編第7章も参照されたい。

しかし、市販のナイシン A は生産に塩析法を用いるため、純度が 2.5% と低く、応用範囲が食品保存などに限られている。このような背景の中、我々はナイシン A の応用範囲を医療分野まで拡大するための高精製技術の開発を行った。

2. 2 高精製ナイシン

ナイシン A の従来の生産方法は、発酵培地に未利用の基質が残存し、精製に塩析法を用いるために、ナイシン A の純度が低いという問題点があった。そこで、1回の仕込みで連続2回の発酵・精製を行う「新規二段階乳酸菌発酵・精製法」を構築した²⁾。本発酵・精製法により、従来の塩析法と比較して、ナイシン A の生産効率の改善および高純度化を実現することができた。得られた高精製ナイシン A は、食塩フリーかつ純度 90% (w/w) 以上を達成し、保存安定性も大きく改善され（図2）、医療分野への可能性が拓かれた。

3 口腔用天然抗菌剤「ネオナイシン[®]」

高精製ナイシン A は、グラム陽性菌に対して強い抗菌活性を示す一方で、グラム陰性菌に対しては単独では活性が低いという弱点がある。そこで、さまざまな天然由来の植物エキスの中から、相性の良い成分をスクリーニングしたところ、梅エキスに相乗効果があることを見出した（図3）。以前より、梅エキスは一定の濃度で抗菌活性を示すことが明らかとなっていたが、強い酸味を伴うため、口腔用途としては不適で用途が限定されていた。そこで、我々は梅エキスの酸

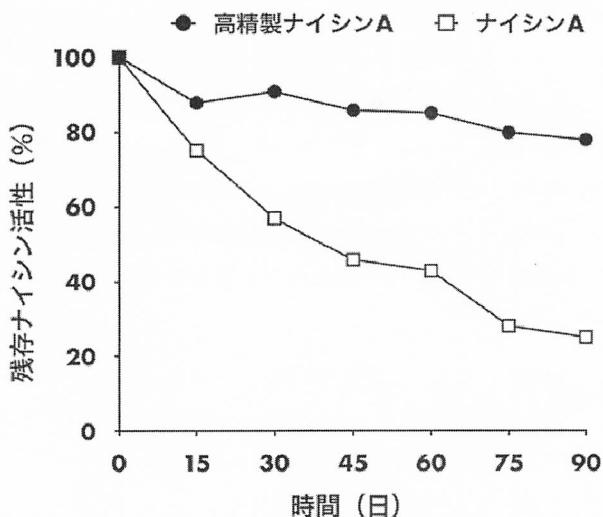


図2 高精製ナイシンAと従来のナイシンAの保存安定性試験
40°Cにおける同ナイシン濃度(20,000 U/mL = 500 µg/mL)での残存活性を比較した。

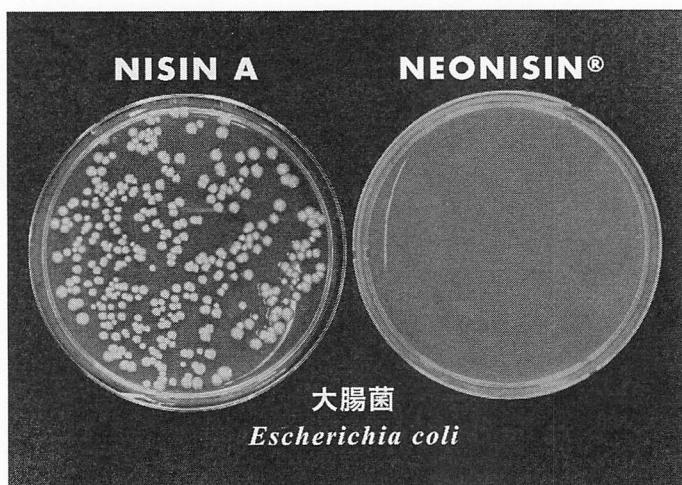


図3 ネオナイシン[®]の大腸菌に対する抗菌作用

味を伴わない濃度（単独では、抗菌活性を示さないレベルの低い濃度）において、抗菌活性試験を重ねた。その結果、グラム陰性菌に対して強力な相乗的抗菌活性を示し、かつ酸味を伴わないナイシンAとの最適な配合比を見出し、口腔用途に適した梅エキス含有天然抗菌剤「ネオナイシン[®]」を開発することができた³⁾。

つぎに、口腔内で問題を引き起こすさまざまな原因菌に対するネオナイシン[®]の抗菌活性を調べた。検定菌として、歯科領域の二大疾患である虫歯原因菌 (*Streptococcus mutans*, グラム陽

性菌), 歯周病原因菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, グラム陰性菌) を用い, それぞれネオナイシン®と1~10分間接触させた後, 寒天培地にて培養を行い, 生菌数を測定し, 殺菌率を算出した。その結果, 1分間で優れた殺菌効果が認められた(図4)。また, 別の検定菌として歯周病原因菌 (*Porphyromonas gingivalis*, グラム陰性菌) を用い, マイクロプレート上でネオナイシン®に接種し48時間培養した後, 培地濁度(600 nm)を測定し, 菌の増殖抑制効果を算出した。その結果, ナイシン換算 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のレベルで優れた効果が見られた(図5)。

これらの結果より, 高精製ナイシンAと梅エキスを組み合せた天然抗菌剤「ネオナイシン®」

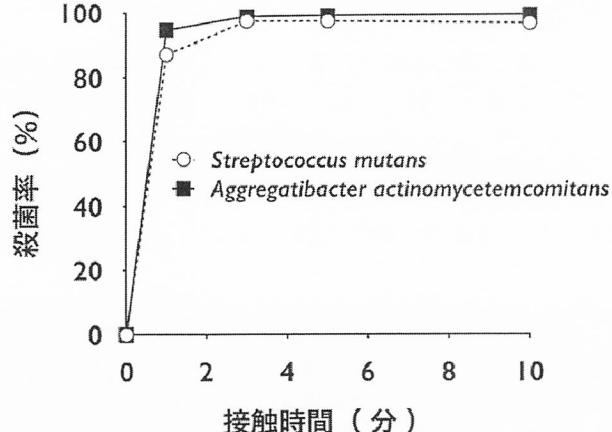


図4 ネオナイシン®の *Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*に対する抗菌作用

ネオナイシン®に10分間接触後の生菌数を計測し, 殺菌率を算出した。

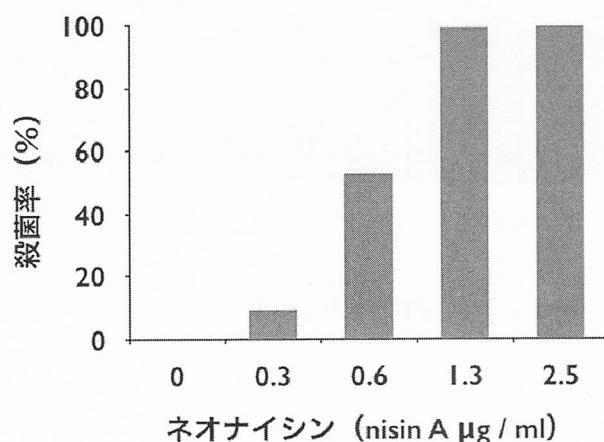


図5 ネオナイシン®の *Porphyromonas gingivalis*に対する増殖抑制作用
ネオナイシン®を添加して48時間培養後の濁度を計測し, 増殖抑制効果を算出した。

は、歯科領域の二大疾患である虫歯と歯周病の原因菌に対して有効であり、従来のナイシンAに比べてグラム陽性菌からグラム陰性菌にまで抗菌スペクトルを拡大したことが確認された。この天然抗菌剤は、抗菌活性の増強が図られる一方で、消化管および環境中では速やかに分解されるなどの優れた特徴を持っている。

4 乳酸菌由来抗菌ペプチド製剤「ネオナイシン®」の応用

天然抗菌剤「ネオナイシン®」の良さを最大限に活かすには、合成殺菌剤や防腐剤を全く使わない自然化粧品への利用が最適ではないかと考え、その中でも商品化へのハードルの最も高い口腔ケア剤を商品化の対象として選択した。一般の口腔ケア剤には、石油由来成分、合成殺菌剤、合成界面活性剤、合成保存料、合成香料、合成着色料、研磨剤、アルコールなどが含まれている。これらの化学成分は健常者にとっては、直接悪影響を及ぼすことが少ないため、とくに気にすることもなく普通に使用している。しかしながら、吐き出しやうがいが難しく、誤嚥の恐れのある高齢者や障がい者、誤飲の恐れのある乳幼児、体調に不安を抱えている妊婦、アレルギー発症の恐れのある化学物質過敏症の方などには、健康に悪影響を及ぼすことがあるため、これらの化学成分についてはとくに注意を払う必要がある。そこで、これらの化学成分を含まない商品を探してみると、さまざまな課題に気付かされる。これらの化学成分を使用していない商品として、天然由来や無添加の商品などが販売されているが、こうした商品では虫歯・歯周病などの原因菌を瞬時に殺菌するような強い効果はほとんど期待できない。殺菌効果を期待するためには、従来の合成殺菌剤などの強力な化学成分を含む商品を選ばなければならないというのが現状である。それゆえ、誤嚥・誤飲の恐れがある場合には、口腔ケア剤を使用できずに水のみで行い、十分な効果が得られていないことも多く、虫歯・歯周病菌に十分な効果を示し、かつ飲み込んでも安全な口腔ケア剤の開発が強く望まれている。

このような背景の中、我々は、天然抗菌剤「ネオナイシン®」を利用した「抗菌」と「安全」を天然成分で両立した、飲み込んでも安全な口腔ケア剤の開発を行った。従来の天然由来の商品の弱点であった虫歯・歯周病の原因菌への効果については、天然抗菌剤「ネオナイシン®」を採用することで解決し、その他成分も全て天然由来成分のみで構成し、化学合成成分を一切使用しないこととした。その結果、口腔ケア剤「オーラルピース®」⁴⁾を開発、商品化（ジェル、スプレー）し、2013年に発売した（2017年度グッドデザイン賞受賞：図6）。オーラルピース®と従来の口腔ケア剤との最大の違いは、製品中の成分である。上述のように従来品では化学合成殺菌剤などの非可食成分が多く使用されているが、本製品は天然抗菌剤「ネオナイシン®」をはじめとして全て可食成分から作られている。「オーラルピース®」は、とくに高齢者、障がい者、乳幼児、妊婦、化学物質過敏症の方などに安心して選択し使用してもらえる貴重な口腔ケア剤として、重要な役割も期待されている。


**GOOD DESIGN
AWARD 2017**


図6 オーラルピース[®] クリーン&モイスチャー
ジェルタイプ（左）とスプレータイプ（右）

5 乳酸菌由来抗菌ペプチド製剤「ネオナイシン-e[®]」への進化

超高齢化社会を迎えた日本では、高齢者による口腔カンジダ症という真菌感染症が問題となっている。その原因菌であるカンジダ (*Candida*) は、人の皮膚・粘膜に生息する真菌（酵母）で常在菌として生息している。しかし、抵抗力の弱い高齢者、乳幼児などでは、感染症を引き起こすことがある。とくに、高齢者の口腔カンジダ症 (*Candida albicans*, 原因菌) は近年増えしており、治療法として長期にわたり抗真菌剤が多用されている。その結果、副作用や耐性菌出現の問題が指摘されており、副作用の少ない安全な抗真菌剤の開発が望まれている。

天然抗菌剤「ネオナイシン[®]」は、虫歯・歯周病などの細菌に対する抗菌効果については認められているが、カビやカンジダのような真菌・酵母に対する抗菌活性は弱く、さらなる改良が必要であった。「ネオナイシン[®]」の改良を行うにあたり、現行の梅エキスに加え、相乗効果の高い植物成分の再選定を行うことから始めた。さまざまな天然由来の植物成分を用いて、高精製ナイシンAとの相乗効果を確認するスクリーニング試験を繰り返し行った結果、いくつかの植物成分で真菌（酵母）に対して相乗的抗菌活性が確認された。その中で、バラの花から抽出した精油（ローズ油）が最も高い相乗効果が認められた。以前より、ローズ油は一定の濃度で抗菌活性を示すことが明らかとなっていたが、一方では天然精油の中でもきわめて高価な原料としても知られており、単独で抗菌活性を示す一定の濃度で製品に配合することは実際のところ困難であった。そこで、我々は製品に配合可能なローズ油の濃度、すなわち単独では抗菌活性を示さないレベルの低濃度での相乗効果についてさまざまに抗菌活性試験を行った結果、真菌に対して強力な相乗的抗菌活性を示す最適な配合比を見出した。これらにより、従来の「ネオナイシン[®]」では

効果が弱かった真菌類に対しても抗菌活性を示すローズ油含有天然抗菌剤「ネオナイシン-e®」⁵⁾を開発することができた。

次に、実際に口腔内で問題を引き起こすカンジダを含む、さまざまな口腔内原因菌に対する「ネオナイシン-e®」の抗菌活性試験を行った。検定菌として、口腔疾患細菌である虫歯原因菌 (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, グラム陽性菌), 歯周病原因菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, グラム陰性菌), カンジダ症原因菌 (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, 真菌・酵母) を用い、それぞれ「ネオナイシン-e®」に1分間接触させた後、寒天培地にて培養を行い、生菌数を測定し、殺菌率を算出した。その結果、1分間で優れた殺菌効果が認められた（表1）。

以上より、高精製ナイシンAとローズ油を組み合せた天然抗菌剤「ネオナイシン-e®」は、従来の「ネオナイシン®」の進化型で、虫歯・歯周病から口腔カンジダ症の原因菌にまで有効であることが認められ、2018年には「オーラルピース®」シリーズの全製品（6種類）に「ネオナイシン-e®」を採用し、リニューアルを行った。現在、オーラルピース®は、ペット用にまで拡充している。

表1 ネオナイシン-e®の口腔疾患細菌に対する抗菌作用

ネオナイシン-e® [ナイシンA濃度換算（30 µg/mL）] に1分間接触後の生菌数を計測し、殺菌率を算出した。

抗細菌活性試験（1分間の殺菌率%）		ナイシンA	ネオナイシン-e
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans IDH 781</i>	グラム陰性 歯周病	57	100
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans Y 4</i>	グラム陰性 歯周病	10	100
<i>Streptococcus sobrinus</i>	グラム陽性 虫歯	55	99
<i>Streptococcus mutans UA 159</i>	グラム陽性 虫歯	56	100
<i>Candida albicans</i>	カンジダ酵母	9	85
<i>Candida glabrata</i>	カンジダ酵母	17	100
<i>Candida tropicalis</i>	カンジダ酵母	45	100

鹿児島大学大学院医学総合研究科 小松澤研究室より

6 今後の展望

我々の開発した、乳酸菌由来抗菌ペプチドを用いた口腔ケア用製剤「ネオナイシン®」は、誤って飲み込んでも安全な天然抗菌剤として、また口腔ケア剤「オーラルピース®」として応用することができた。最近では全国の高齢者、認知症、障がい者の家族、施設職員、医師から「歯みがきの負担が減った」という喜びの声も増え、反響の大きさを感じている。また、口腔内手術後や創傷治癒期間の患者、特定集中治療室の新生児への抗生物質の代替としての臨床応用についても検討を始めており⁶⁾、「ネオナイシン-e®」をはじめとする乳酸菌由来抗菌ペプチドの医療分野への発展的な利用可能性は高い。また、中国など4か国で販売も開始し国際展開も進めている。この「ネオナイシン-e®」の新しい取り組みは、まだ始まったばかりであるが、「平成31年(2019年)8月 日本農芸化学会 2019年度農芸化学技術賞(乳酸菌バクテリオシン、ナイシンを利用した安全な口腔ケア剤に関する技術開発)」をいただくことができ、その期待と社会的責任を強く感じている。

今後、「ネオナイシン-e®」は天然抗菌素材として、ますます“抗菌性”に注目されると思われる。しかし、従来の合成殺菌剤や抗生物質にはないもう一つの優れた特徴である“生分解性”にも大いに注目していただきたい。“生分解性”に優れるという特徴は、今後の応用に大きく関わっていくと思われる。例えば、「ネオナイシン-e®」の分解物はアミノ酸や小さなペプチド(アミノ酸が結合したもの)という自然界に存在する物質であるため、自然界の生態系で速やかに代謝・再利用され、環境への影響や汚染のリスクもきわめて低い。まさに環境調和型の天然抗菌剤と言える。一方、合成殺菌剤や抗生物質などの多くは分解しにくい“難分解性”という特徴を持っており、分解したとしてもその分解物が“毒性”を示したりすることもある。その“毒性”作用は強く長く続くため、自然界の生態系、とくに微生物生態系に対して悪影響を及ぼすことが懸念されている。昨今、“難分解性”的プラスチックごみが海洋生態系に悪影響を及ぼしているといった問題が話題になっている。生分解性の良いプラスチックへの切り替えや環境汚染リスクの少ない容器への代替など、環境に調和した“生分解性”に優れた原料への関心が世界的に大いに高まっている。このような背景の中、まさに「ネオナイシン-e®」は、環境調和型の新しい天然抗菌剤として、さまざまな分野での応用が期待される。今後は、口腔ケアから分野を広げ、フェイスケア、ボディケア、ヘアケア、デオドラントケア、ベビーケアなど、新しい分野での展開を目指していきたい。

謝辞

本稿作成にあたり、ご助言、ご指導を賜りました九州大学大学院農学研究院・園元謙二教授、善藤威史助教、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・小松澤均教授、松尾美樹講師、阪本歯科医院・角田愛美先生に深く感謝申し上げます。ナイシンAの量産化技術・高度精製技術の研究でご協力いただきましたオーム乳業株式会社、熊本製粉株式会社の技術者の皆様に深く感謝申し上げます。また、本事業の推進につきまして、株

第3章 乳酸菌由来抗菌ペプチドを用いた口腔ケア用製剤「ネオナイシン®」

式会社トライフの加吉良二氏、植田グナセカラ貴子氏ほか、関係の皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 善藤威史ほか、日本乳酸菌学会誌、25, 24 (2014)
- 2) 新規二段階乳酸菌発酵・精製法の開発、九州経済産業局 戰略的基盤技術高度化支援事業研究開発成果等報告書 (2009)
- 3) 永利浩平、特許第 5750552 号、抗菌用組成物 (2015)
- 4) オーラルピース、<http://oralpeace.com/> (2019/1/15)
- 5) 永利浩平、特開 2015-209065、バクテリオシンを含むヘルスケア組成物 (2015)
- 6) 角田愛美ほか、フレグラنسジャーナル、44, 24 (2016)