

ナットウキナーゼの経口投与による血漿中の繊維素溶解活性の増強

須見洋行 a, 浜田博喜 b, 中西幸一郎 c, 平谷一 c

a 宮崎医科大学 生理学部 宮崎 日本

b オクラホマ州立大学 生物化学部 オクラホマ 米国

c J C R 製薬 生物化学研究所 神戸 日本

キーワード： ナットウキナーゼ・経口繊維素溶解療法(経口線溶療法)・血栓溶解・組織プラスミノゲン活性化因子

【 要旨 】

以前われわれによって'納豆'という伝統的な発酵食品に強力な線溶酵素(ナットウキナーゼ, NK)の存在が示された。線溶パラメータや、組織プラスミノゲン活性化因子の生成に示されるように、NK(あるいは納豆)の経口投与によって血漿中の線溶活性が穏やかに増強されることが確認された。また、実験的に血栓を起こさせた犬にNKカプセルを経口投与し、血栓が溶解されることを血管造影によって示した。NKの安全性は実証済みであり、大量生産も可能であることから、これらの結果は、NKが塞栓症の治療ばかりでなく疾病の予防薬としても利用可能であることを示している。

【 緒言 】

経口投与による線溶療法は、10年前に須見とその協力者 [1,2] により、ウロキナーゼ(UK)のカプセルを正常な犬と伏在静脈に血栓のある実験用の犬に投与するという動物実験によって研究された。以前われわれは静脈注射では明らかな血栓溶解の効果が認められないことを示したが、経口投与では穏やかではあるが持続的な線溶活性の増強が認められることを示した。

このような経口投与による線溶療法のメカニズムは、基礎的な研究によって、投与されたUKが腸管から吸収され、肝臓および/あるいは内皮細胞由来の2次的なプラスミノゲン活性化因子 [3-6] の血液中への放出によるということが確かめられた。大脳血栓 [7,8] に対してもUKカプセル(7日間 60,000 単位/日)は有効であった。さらに、7日間 120,000 単位/日の投与という2重盲検査法でもより効果的な結果が確認できた [9]。

それでもまだ経口投与による線溶療法に関してはいくつかの問題が残っていた。最重要課題は血栓溶解酵素のコストと腸管内での安定性の低さであった。そのため、経口投与用の線溶療法薬を検索して、UK以外に使えるような血栓溶解酵素の評価が必要となった。腸管出血が認められたため、ストレプトキナーゼ(SK) [10] やミミズのランブリカスラベラス(LBP) [11] では好結果は得られなかった。

一連の実験で、われわれは酒類を含む173品目以上の天然物食品についての循環系への影響を調査する過程に、日本の伝統的な発酵食品である'納豆'に他の食品には見られない強力な酵素を発見した。分離した血栓溶解酵素はプラスミンに似ていた。それは高い血栓溶解活性を示し、ナットウキナーゼ(NK) [12] と命名された。

微生物であるバチルスナットウからNKは大量生産できる。それはきわめて安価で温度や酸アルカリにも比較的安定である。純化が容易である。薬用の見地から最も重要なことは納豆が日本で広く1000年以上も日常的に食されてきたという事実で、経口薬としての安全性は十分に証明されている。この研究で納豆とNKの経口投与によって長期間血漿中の線溶活性が高められること、およびこの現象が生体内のプラスミノゲン活性化因子(TPA)の活性化と関係があることを明らかにした。

【 素材と方法 】

ナットウキナーゼの製法

ナットウキナーゼは以下の方法によって抽出された [1,2]。日本納豆組合連合会から入手した5Kgの納豆に4?の蒸留水を加え、室温で1時間攪拌する。25volume%のエタノールで抽出する。上澄みの浮遊物を除去した後、ガーゼで濾過し、3000rpmで10分間遠心分離する。次に上記の手続きによって得られた上澄み液を凍結乾燥する(この段階で人間の血漿プラスミンを標準に

して約2.13cu/mgの活性を含む)。分子量は約20,000ダルトンで、Ouchterlony法あるいはELISA法では、UKあるいはTPA抗体とは反応しなかった。NKの被包カプセルは前報と同様の方法で製造した [2]。250mgと650mgのNKを含有する2種類のカプセルを製造した。同時に有効成分を含まないブラシボカプセルも製造した。

犬の血栓実験モデル

前報 [2,13] 同様に雑種犬(♂, 体重 10.1~10.6Kg)を使って行った。実験的な血栓は牛の繊維素と牛のトロンビンを犬の外部伏在静脈に注射することによって発生させた。4つのカプセル(1カプセル当たり250mgNK)とブラシボカプセルが犬に経口投与され、十二指腸に達したところで血漿中の線溶活性が測定された。

血栓溶解は大腿動脈にカテーテルを挿入し、2秒間4m³の造影剤を注射して血管造影法 [13] によって評価した。血管造影の写真は血栓を起こす前と血栓症になってから、2.5, 5, 12, 18, 24時間後に撮影された。

人への経口投与と血栓溶解活性の評価

12人の健康な日本人のボランティア(男6人女6人, 年齢21才から55才まで)に200gの納豆または大豆の煮物(コントロールグループ)が朝食前に1回与えられるか、またはNKの入った2つのカプセル(1カプセル当たり650mgNK)を日に3回食後与えられた。

抗凝結剤として1/10量の3.8%のクエン酸ナトリウムを加えて、定期的に血液が採取された。NK投与グループの血液採取は常に朝10:00に行われた。血漿中の酵素活性はChohanらの方法 [14] を採用して全凝血の分解時間(WBCLT)から決定した。

血漿は0.12Mの酢酸ナトリウムバッファを用いて10倍に希釈した。真性グロブリンの分解時間(ELT)は、凝血の分解時間レコーダ(リコー商事, 日本)を使ってMilestone法 [15] によって決定した。真性グロブリン線溶活性(EFA)は、Kluftらの方法 [17] によって真性グロブリンから得られた分画を用いて、AstrupとMullertz [16] の標準血栓プレート法によって決定した。活性度は0.03m³の真性グロブリン溶液で37°C18時間処理して得られた分解面積で表した。

牛の繊維素はArmour社から購入し、牛のトロンビンは持田製薬より購入した。血清中のfibrin/fibrinogen(FDP)の分解生成物は帝国ラボラトリから購入したFDPLのキットを使ってラテックス凝集塊法 [18] で検査した。血漿中のTPA抗体は、スタンダードとしてメラノーマTPA(単鎖型)を含んだBiopoolラボラトリのELISAキットを用いて、Bergsdrolfらの方法 [19] によって評価した。

【 結果 】

NKの効果の調査の前に予備実験を行った。日本で市販されている200gの納豆を12人の健康なボランティアに与え、血漿中の線溶活性を定期的に計測した。コントロールとしては、2週間後に同じ被験者に同量の煮豆大豆を与えた。

表1に示すように、コントロールではデータ(P>0.1)の変化はわずかであったけれども、1回目の納豆投与の後、明らかなELTの短縮とEFAの上昇が確認された。血漿中の線溶活性の増強効果は長時間(P<0.005, 2~8時間)持続した。

1.3gのNKを含有するカプセルが毎日3回食後に投与された。血液は毎朝10時に採取され、線溶パラメータが血清と血漿について計測された。いくつかの血漿阻害因子を含んだ反応系(WBCLT)によって得られた結果は、NK(851±1,032min)投与前の数値と投与後8日目の数値との顕著な差は無かった。

注目すべき変化は2日目(623±766min)に観察されたが、顕著な差というほどのものではなかった。図1に示すように、EFAはNKを投与後1日目から8日目にかけて徐々に増加した。また血清中のFDPのレベルは、NK投与後1日目の時点で予備投与(図2)に比べて統計的に明らかに高(P<0.001)かった。長時間経過した後では、血液中の線溶活性に関係する因子として知られているTPA抗体の量にも有意差(P<0.05)が認められた(図3)。

犬のNKの効果は数匹の動物でしか認められなかったが、実験的な血栓の溶解は観察できた。比較としてブラシボを与えられた6匹の犬のグループには、ELT値は投与後2.5~12時間に60±10min以上の差はなかったが、NKを経口投与された3匹の犬のグループではELT値の短縮傾向(繊維素溶解能の増強)が観察された(30±18, 41±13, 54±11, 55±9min, それぞれ投与後30分, 1, 3, 6時間後)。

血栓溶解に関して、血管造影法によって比較のコントロールグループでは投与後18時間経過しても溶解の証拠は確認できなかったが、納豆投与のグループでは投与後5時間以内に完全な開通することが確認できた。血栓溶解に対するNKの効果を確認できた。

【 討 論 】

SKやUKよりも血栓に対する作用の強いTPAとpro-UKが塞栓症の治療薬として開発され、これらが現在静脈注射で臨床的に用いられている。また、遺伝子操作によって長い半減期を持った血栓溶解酵素、あるいはAPSAC(プラスミノゲン・ストレプトキナーゼ活性複合体)のような化学的に改良した血栓溶解酵素が開発されている [20, 21]。

しかしながら、これらの酵素は期待した程度の血栓溶解のレベルには達していない。これらの酵素で血栓溶解するためには大量に長期間投与する必要がある。その理由の1つとして、これらの酵素の半減期が短く(20分以下)、投与後すぐに肝臓と腎臓で分解されて消えてしまうという事実が上げられる。もし酵素が化学的に改良されたり、遺伝子操作を受けていても、SKや他の分子と同じく免疫学的には非自己タンパクとなってしまう。

また、UKが投与されたときには投与の終了後直ちにリバウンド現象が起こり、一時的にELTが延長する [6] ことも知られている。このように体外から投与された酵素には限界がある。

一方、体内由来の線溶酵素で血栓の溶解を促進するという方法がある。経口投与されたNKは経口投与されたUKと同様に、人体は外来の酵素の補助効果よりもプラスミノゲン活性因子に対して有効に利用できるが、これは効果的な生物学的治療法であると考えられる。さらにこれは病気の予防にも使用できる。

表1と図1-3のデータは納豆とNKともに比較的長時間繊維素溶解能を増強することを示している。以前 Fearnleyら [22] は、血の固まりの溶解時間テストによって繊維素溶解には日周期のリズムがあることを示した。われわれの場合には、血漿の線溶活性は午後6時に最低になるけれども24時間毎の差はそれほど大きく(P>0.1)なかった。対照的に納豆とNKの活性はずっと高い値(P<0.005, 2~8時間で)を示した。

図2のデータは血清FDPの一時的効果を示している。健康人では、FDPの増加はプラスミノゲン活性因子による血栓の溶解の減少を意味しているように思われる。

血漿の線溶活性の増強は経口投与されたUKと同様に腸管からのNKの吸収によるものと考えられる。われわれの研究では納豆にNK以外の別の線溶酵素は見つからなかったが、Ohkuroら [23] は納豆菌を与えられたマウスやラットはムコ多糖分解リゾチームが吸収され、血液中に運ばれることを報告している。

線溶酵素の経口投与の効果測定するときには、血漿中のTPA抗体の量が非常に重要である。図3に示すようにTPAのレベルも明らかに長時間にわたって増加し、持続している。NKはTPA抗原性を示さないから、これらの結果はおそらく少量のNKが血漿あるいはリンパ液から吸収され、肝臓または血管の内皮細胞でTPA型のプラスミノゲン活性因子を合成することを示している。

経口投与のUK, SK, LRPは10年間ほど用いられているが、NKの歴史よりは遙かに短いものである。なぜなら納豆は日本では1000年以上の間、日々の食材の一部となっており、その安全性は十分に確かめられている。伝統的に納豆の心臓と血管の病気に対する効果も知られている [24] が、これらはNKの存在によるものと推測される。

このようにNKはそれ自身線溶療法におけるもっとも優れた天然薬であることを示している。前報 [25] で示したように、UKはミトマイシンCの活性を促進する。また、最近の中国の研究グループ [26] によれば、繊維素溶解薬'912'を含んだLRPの研究で、ある種のガンの療法に非常によい結果が示されている。抗ガン剤としてのNKの有効性に関する研究とその特性に関する研究は現在進行中である。

Wdech#1# leulqro|wlf#lfwly|w| #q#kch#solv d#lwhu#qjhwlrq#i#qdwrr
納豆摂取後の血漿における線溶活性

HOW/k

HID/p m²

3k	64.18±9.15	3
5k	49.17±; 19 *	; 17±8.14 *
7k	49.1±; 9.19 *	48.15±6.13 *
;k	4<16±45.13 *	81;±7.14 *
45k	5: 17±43.16 *	4.1<±8.15 *
57k	64.1<±; 1< *	31;±3.19 *
Wlp h#liwuh#qjhwlrq#ri#erldg#r ehdqv		
3k	65.15±9.16	3
5k	66.17±<.13	3
7k	68.15±7.1;	3
;k	69.14±8.18	3
45k	67.19±: 16	3
57k	67.19±: 1:	3.17±3.15

K h d o k | # d c h # y r o x q w h u v # z h u h # j l y h q # 5 3 3 # j # n d f k # r i # j # d w r # c u # e r l d g # r | e h d q v | # s a d v p d # z d v # f r o n f w h g d q g # k h # I O W # l q g # I D # z h u h # p h d v x u h g | H d f k # y d o x h # u h s u h v h q w # k h # p h d q ± V G + q @ 4 5 , 1 * s < 3 1 3 3 8 = v l j q l i l f d q w | # j l i i h u h q w # u r p # k h # f r q w u r d

健康な男性ボランティアに200gの納豆または大豆の煮豆を与えた。血漿が採取されE L T と E F A が測定された。測定値は平均±標準偏差(n=12)であった。* p<0.005; コントロールから顕著な差。

図1)

真性グロブリンの線溶活性に及ぼす経口NKの影響。健康なボランティア(男6名と女1名)が日に3回食後に1.3gのNK入りのカプセルを飲んだ。定期的に採血し、E F A が標準フィブリンプレート法によって計られた。活性度は37°C18時間後の分解面積(mm²)で表現した。各値は平均±標準偏差(n=7)。

図2)

血清中のF D P の量に関するNKの影響

血清中のF D P の量はNKの経口投与後定期的に測定された。各値は平均±標準偏差(n=7)。

図3)

血漿中のT P A の量に関するNKの影響

NKの経口投与後T P A の量は定期的に測定された。各値は平均±標準偏差(n=7)。