

精製ナットウ菌培養物(NKCP)の血液に対する影響について

大村和伸，一杉正仁（獨協医科大学 法医学教室）

掛谷和俊（半蔵門胃腸クリニック）

朱 霞，前田浩明（大和薬品株式会社）

はじめに

古来より日本には大豆のみを原料とする醗酵食品がある。食塩添加した煮大豆を麹菌で醗酵させる大徳寺納豆や浜納豆と呼ばれる種類と、無塩の煮大豆を納豆菌で醗酵させる糸引き納豆に、大きく二分される。麹菌醗酵の納豆は、秦の時代には中国で普及していた調味料様食品で、伝来して奈良時代には日本でも普及した。一方、糸引き納豆は、戦で軍馬の糧としていた煮大豆の、運搬用ワラ豆俵の中で生まれたという説がある。ワラの表面に芽胞として付着する納豆菌は、大豆を煮た余熱で発芽し、条件次第で繁殖して納豆へと発酵させる。当初は大豆が「腐った」と思われたが、食べられると判明すると兵糧として採用された。こうして、平安時代後期の武将が軍行した東山道や奥州路の古道筋沿いの街で、納豆が特産品となったと言われている。

糸引き納豆(以下納豆)は食物繊維やカリウムなどのミネラル、各種ビタミンが含まれる機能性食品である。昭和初頭まで、納豆菌の抗菌活性を期待してチフス菌や赤痢菌などによる胃腸障害の治療に用いた。また納豆に含まれるビタミンB群は眼精疲労、疲労回復に、ビタミンKは骨粗しょう症予防に効果がある。もともと高タンパク低脂肪な大豆は、納豆菌が分泌した各種酵素で分解されるため、人間にも消化吸收し易い。これらの酵素のうち、ナットウキナーゼは血栓も溶解する酵素として数々の報告がなされてきた。

血液は、血管の損傷部位からの流出を防ぎ脈管

内で循環し続けるため、多くの制御因子が絡み合い、血液の凝固と線溶活性は平衡状態を形成して流動性を保っている。しかし、ひとたび血流の変化、血液成分の変化、もしくは血管壁の性状変化が生じると、平衡状態が破綻して局所で血栓の形成傾向に傾く。長時間の坐位保持、病院での長期安静臥位、手術後、糖尿病、肥満、高脂血症、下肢静脈瘤、および経口避妊薬や女性ホルモンの使用などはその危険因子である。発生した血栓塞栓子は、深部静脈血栓症ばかりではなく突然死の可能性のある肺動脈血栓塞栓症も誘発し、生活の質や寿命に多大なる影響を与える。血栓症対策は、これら危険因子を考慮した予防が第一となる。

納豆には血液凝固の活性化因子のビタミンKが含まれており、抗凝固作用を期待する薬剤と相互作用が生じる。また、特有の臭気や粘性は必ずしも万人に好まれない。大和薬品株式会社は、納豆の血栓を溶解しうる効果に着目し、納豆菌培養物から菌体および納豆特有の臭気や粘性、さらにはビタミンKを除去した精製ナットウ菌培養物(NKCP)を開発した。

今回は、血栓予防効果が期待できるNKCPについて基礎的・臨床的な検討を行った。

試験方法

NKCPは、通常の納豆から得た一般的な納豆菌を、大豆培地で発酵させ、ろ過や遠心分離等の手法で精製した製品を用いた。

ヒトを対象とした臨床試験は、ヘルシンキ宣言

に則って実施した。納豆としての豊かな食経験はあるものの、臨床試験に先立ち、NKCPの動物での急性毒性試験、亜急性毒性試験、抗原性試験、変異原性試験を実施し、摂取安全性に問題がないことを確認した。

所定の医療機関で検査および診察が可能であり、本試験参加へのインフォームド・コンセントが得られた成人を対象とした。被験者は、1錠中にNKCPを125mg含有している錠型食品「エヌケイシーピー」を1日1回夕食後に2錠(NKCP換算で250mg)毎日摂取させた。最初にヒトの亜急性摂取の影響を確認する目的で、2週間の連続摂取試験を行い、試験前後に検査・診察した。血液学的検査は赤血球数(RBC)、ヘモグロビン(Hb)、ヘマトクリット(Ht)、白血球数(WBC)、血小板(Plt)、線維素溶解現象(ELT)、組織プラスミノゲンアクチベータ(t-PA)、フィブリノーゲン(Fbn)、フィブリン分解産物(FDP)、D-dimer、活性部分トロンボプラスチン時間(APTT)を実施した。次にヒトの慢性摂取の影響を確認する目的で、長期摂取時の摂取開始前、摂取後1ヶ月、2ヶ月目に検査・診察した。さらに、2週間の連続摂取試験で、頭痛や肩こりが改善した被験者をふまえ、自覚症状(頭痛、肩こり、めまい)を調査した。

結 果

NKCPの主要な活性物質は、各種機器分析より納豆菌が分泌するBacillopeptidase Fという酵素の一部断片であることが判明した。NKCPの活性は、生理食塩水溶液中での人工血栓溶解能と、生体内繊維素の溶解酵素であるプラスミンの発色合成基質S2251に対しNKCPの100mg/mL試料溶液で 1.80×10^{-4} mol/min/Lの加水分解能があった。

臨床試験では、2週間の連続摂取試験で年齢 59.1 ± 12.1 歳の28例(男性11名、女性17名)

を対象とした。血栓溶解能を示すELTは摂取前に 9.8 ± 2.0 hrであったが、摂取後に 8.4 ± 1.7 hrと平均で10.1%有意に減少していた($p < 0.01$)。その他の検査結果などの臨床所見に有害と判断される事象はなかった。長期摂取試験は、対象は、年齢 51.7 ± 12.4 歳の23例(男性14名、女性9名)を対象とした。ELTは摂取前に 9.0 ± 1.3 hrであったが、摂取1ヶ月目には 8.1 ± 1.5 hrと平均で8.5%、摂取2ヶ月目には 8.0 ± 1.5 hrへと平均で8.9%それぞれ有意に減少した($p < 0.01$)。プラスミン活性化因子 t-PA は摂取前に 5.4 ± 2.6 ng/mLであったが、摂取1ヶ月目に 5.8 ± 2.8 ng/mL、摂取2ヶ月目に 6.4 ± 2.2 ng/mLと平均で31.0%有意に上昇した($p < 0.05$)。血栓を形成するフィブリン分解産物FDPは摂取1ヶ月目で有意に減少したが($p < 0.05$)、2ヶ月目にはほぼ前値に復していた。そのほかの項目に有意な変化はみられなかった。自覚症状の変化は、3つの症状のうち、肩こりで摂取後の変化が統計学的に有意であった。

考 察

納豆菌はBERGEY分類法によると、自然界に広く分布し、塵埃、土壌、牛乳、枯草などから検出される枯草菌(*Bacillus subtilis*)に帰属される。枯草菌は非病原性で、過酷な状況で孢子を形成して熱や湿度、化学物質から身を守るが、普段は増殖力が極めて旺盛な栄養細胞(活動菌)として存在する。しかし、煮大豆を納豆に発酵しえるのは納豆菌群(*Bacillus subtilis natto*)のみで、枯草菌の中でも特別な性質を持つ一群である。

枯草菌は栄養細胞として指数関数的に増殖すると、その最終相に数種類の酵素を細胞外へ放出する。NKCPの主要な活性物質は、その中の一つBacillopeptidase F(*bpr*)の断片であり、従来の主要な外分泌酵素のナットウキナーゼ(*apr*)とは異

なる物質であった。しかし、両者のアミノ酸1次配列を比較すると活性部位の構造相同性が認められ、同じ種類の酵素活性が確認されている。NKCPの基質特異性や各種酵素活性の強さなどについては追加検討中である。

今回の臨床試験では、1日250mgのNKCPを摂取した時の影響を検討した。ELTでは測定値の短縮化が認められ、線溶活性の亢進が示された。対象とした被験者はいずれも血栓の存在が疑われなかったため、FDPやD-dimerの上昇を伴わなかった。また、t-PAが摂取期間によって異なる動きをしていたが、この結果だけではプラスミンが関与する反応かは結論付けられない。これらの

現象は、今後さらなる検討が必要である。

自覚症状では、摂取前に半分以上の人で症状を認めた「肩こり」が、摂取後改善しており、症状の分布に統計的有意差が認められた。これは、線溶活性亢進にともなう血液流動性の増加し、筋肉と周囲組織における局所循環の改善による効果だと考えられた。

今後、さらなる基礎的および臨床的な検討が必要であるが、NKCPの経口摂取で得られた所見は、血栓症の予防や局所循環の改善に有用であると考えた。

Table Change in conditions compared to baseline over time in volunteers treated with NKCP

Symptoms	Condition	Baseline	Month 1	Month 2
Headache	Severe	1	1	1
	Intermediate	7	3	4
	No significant (partially improved)	15	16	16
	Remarkable improved	-	3	2
	Shirley-Williams multiple test	-	Not significant	Not significant
Stiffness of shoulder	Severe	5	1	1
	Intermediate	10	9	10
	No significant (partially improved)	8	9	11
	Remarkable improved	-	4	1
	Shirley-Williams multiple test	-	P < 0.05	P < 0.05
Struggle	Severe	0	0	0
	Intermediate	6	4	4
	No significant (partially improved)	17	18	18
	Remarkable improved	-	1	1
	Shirley-Williams multiple test	-	Not significant	Not significant

Data are numbers of the patients.