

# ナットウキナーゼの機能性研究の動向について

倉敷芸術科学大学生命科学部生命科学科 教授 <sup>す み ひろゆき</sup> 須見洋行

## はじめに

ナットウキナーゼを話す前に同じ血栓溶解剤(線溶療法剤)であるウロキナーゼ(UK)の話をしておこう。ウロキナーゼが経口化してよく効くことは、1978年、パリで開催された第17回国際血栓学会で発表したのだが、私は当時シカゴ在住で許可が出ず出席できなかった。そこで私の代わりにK.C.Robbinsが発表してくれた<sup>1)</sup>。翌年の第5回血栓止血学会では2人揃って初めて国際学会に躍り出た。このあたりのいきさつはすさまじいものがある。従来の静注投与ではみられないマイルドであるが、大変持続的な血中線溶亢進を起し血栓を溶解する療法である。その機序として投与された酵素の腸管からの吸収に加えて肝あるいは血管内皮細胞から由来するendogenousな“UK-like plasminogen activator”の血中への放出を伴うことが証明された(図1)<sup>2~5)</sup>。また、臨床的にも腸溶カプセル化したUK(6万国際単位/日、1日および7日間)の脳血栓に対する有効性が認められ、また24病院での二重盲検試験(12万国際単位/日、7日間)

においても良好な投与成績が確認されている。

しかし、こうした経口線溶療法にもいくつかの課題があった。用いられる線溶酵素の価格が高いこと、そして血液中での安定性の極めて低いことである。

## 1. ナットウキナーゼの精製と性質

1980年秋、シカゴ・マイケルリース研究所で私は偶然、日本の伝統的発酵食品である“納豆”中にこれまでにない非常に強力な線溶活性を認めた。そして分離された線溶酵素がプラスミンに似た非常に強いフィブリン分解活性を示すことからナットウキナーゼ(Nattokinase; NK)と命名した(図2)。その後、日常摂取される種々の食品、酒類を含めた173種の検索から最も優れたものであると検証を得た。ナットウキナーゼは微生物(納豆菌)由来であるため大量生産が可能であり、極めて安価である。また熱および酸-塩基にも比較的安定、かつ分離精製も容易であることが分かった。そして何よりも優れた特徴としては納豆そのものがわが国で1,000年以上も一般庶民に食されてきたものであり、経口化にあたりその安全性が十分に保証されていることである。

ナットウキナーゼはアセトン、メタノール、エタノー

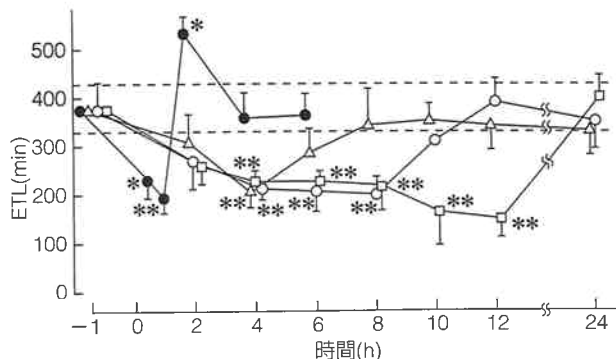


図1 経口線溶療法(ヒトに対するウロキナーゼの経口投与)<sup>5)</sup>

血漿ユーグロブリン溶解時間(ELT)、すなわちこれが低いほど線溶活性は高値であることを示す  
 △: 15,000 IU 経口投与グループ  
 ○: 30,000 IU 経口投与グループ  
 □: 60,000 IU 経口投与グループ  
 ●: 30,000 IU 静脈内投与グループ  
 破線は正常値を示す、< \* p ≤ 0.05, \*\* p ≤ 0.01, n = 40

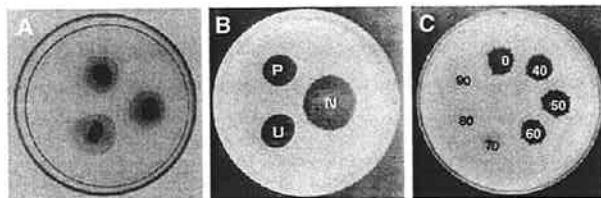


図2 納豆の血栓溶解能

A: 人工血栓(フィブリン)の上に直接のせた場合  
 B: N, 300gの納豆から生食220mlで抽出; P, プラスミン4CU/ml; U, ウロキナーゼ100IU/mlと比較  
 C: 各抽出液を各温度で、10分間処理した場合。37℃、18時間目の溶解現象を示す

**カコミ1** 納豆売りは京都が元祖のようで、元禄3年(1690年)に発刊された「人倫訓蒙図彙」には、売る時期や納豆屋の所在地まで明記されている。ところが、その後、納豆は豆腐人気に押されて下火になってしまうが、京都に代わって納豆人気を支えたのが江戸である。「鳥の啼かぬ日は有れど、納豆売の来ぬ日はなし」とは有名。

**カコミ2** 納豆の血栓溶解効果を述べる際に、必ず注意書きしているのが、心臓の弁置換術の後などによく使われるワーファリン服用の問題である。この件については詳細を日本医事新報(3361, 132, 1988)に書いているので参照願いたい。重要なのは決してビタミンK<sub>2</sub>が直接血栓症を引き起こすというわけではないということ。

ル等の有機溶媒、あるいはpH6~12の塩基性の水溶液中で、また60℃までの加熱条件でも安定なことから、納豆あるいは納豆菌の培養液から、従来一般の酵素で行われている精製方法、すなわち、塩析、イオン交換樹脂、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過等を用いて容易に精製できる。1987年の論文<sup>9)</sup>で説明しよう。

まず人工的な血栓を作り、その上に納豆を直接のせ、37℃、18時間インキュベーションした後にみたものであるが、強く納豆の周りが溶けているのが分かる。このナットウキナーゼの血栓溶解活性は、例えば最も一般的な線溶酵素であるプラスミンの活性では約40CU(カゼイン単位)/g wet weight、またウロキナーゼでは約16,000IU(国際単位)/g wet weightに相当する(図2中)。

ナットウキナーゼの一次構造<sup>7, 8)</sup>を図3に示す。ナットウキナーゼは分子内に8個のLysを持つため、リジルエンドペプチダーゼで消化後、逆相HPLCを用いて分離した9個のペプチドを解析し決定されたものであるが、275個のアミノ酸よりなる一本鎖構造の単純たんぱくであった(分子量27,724)。特徴的なのは分子内に“Kringle”と呼ばれる特殊なアミノ酸配列を持たない一本鎖構造のポリペプチド(S-S結合を全く持たない)であることである。その分子量はプラスミン(約8万)よりはるかに小さく、セリン酵素としての活性部位はAsp<sub>32</sub>、His<sub>64</sub>およびSer<sub>221</sub>に、また基質との結合部位はSer<sub>125</sub>Leu<sub>126</sub>Gly<sub>127</sub>と想定された。ナットウキナーゼはCarlsberg、BPN'、mesen-

tericus、amylosacchariticusあるいはstrain I 168などとの相同性からこれまですでに構造決定されているズブチリシン属のプロテアーゼであると考えられたが、互いに抗原性も異なる。またアミノ酸配列に加えて最も大きな違いは、その高いフィブリン溶解活性である。例えば、ナットウキナーゼはpNAでなくMCA基質で調べた場合キモトリプシン系であるSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCAも分解するが、それらに比較したフィブリン溶解活性は、例えば市販のCarlsberg標品が0.30に対して34.87(116倍)と大きな差があった。

## 2. ナットウキナーゼの経口投与

腸溶カプセルにしたナットウキナーゼの投与はヒト血液内の線溶活性の亢進(ELT短縮あるいはEFA増加)効果を持つ<sup>9)</sup>。また一過性であるが血栓の分解産物(FDP)を増加させる。さらに、その作用のうち臨床で最も注目されているのは、投与後血中に生じるプラスミノゲンアクチベータの抗原性が現在第二世代の血栓溶解剤として開発されつつあるTPAと一致することである。つまり、腸内に入った納豆中のナットウキナーゼが直接血栓に働くというより間接的に生体自らが持つ(おそらく血管の内皮細胞由来の)プラスミノゲンアクチベータの産生を促して血中の線溶亢進を引き起こすと考えられるのである(図4)。

ナットウキナーゼの効果は、実験的な血栓症の動物モデルでも確認されている。ビーグルに粗標品ながら腸溶



図3 ナットウキナーゼの分子構造

\*活性部位。1本鎖、275残基で計算分子量は27,724

**カコミ3** ナットウキナーゼはその全一次構造が決定され(図3)、日本ケミカルリサーチ(株)がナットウキナーゼの特許(特許番号2119017)を取得、その後、(株)ホンダトレーディングが専用実施権を取得している。

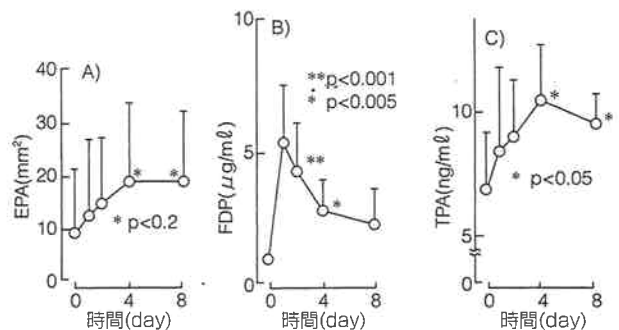


図4 ナットウキナーゼ投与後の血中線溶活性の変化

A) 血漿ユグロブリン溶解面積(EPA)、B) フィブリン溶解産物(FDP)、C) 組織プラスミノゲンアクチベーター(TPA)

**カコミ4** 医食同源などと叫ばれ、国民の関心が強いわりに、こうした分野のわが国での研究体制は整っていないように思われる。ちなみにナットウキナーゼを始めた時の売上高は年間1,000億円、それが現在2,000億円に達すると聞く。これまでわが国で使われてきた代表的な血栓溶解剤(ウロキナーゼ)の総売上が最高約100億円であるから、食がいかに大きく健康と係ってくるかということである。

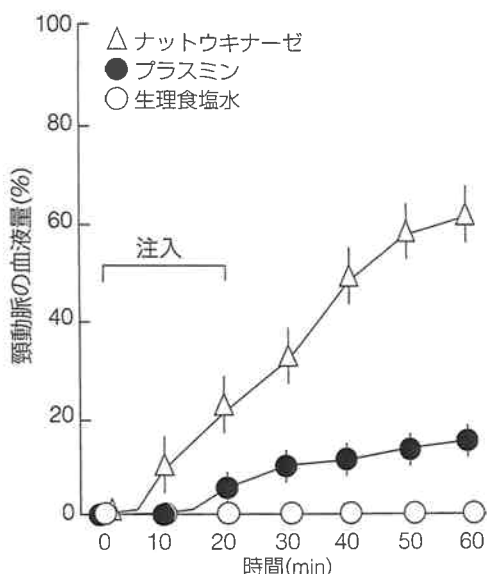


図5 ナットウキナーゼの血栓溶解能

血栓症モデルのラット頸動脈中の血流回復状態を連続測定。生理的食塩水を対照として、ナットウキナーゼ(3.3mg/kg)、およびプラスミン(1.0mg/kg)の静注効果を比較した場合の血流量を示す

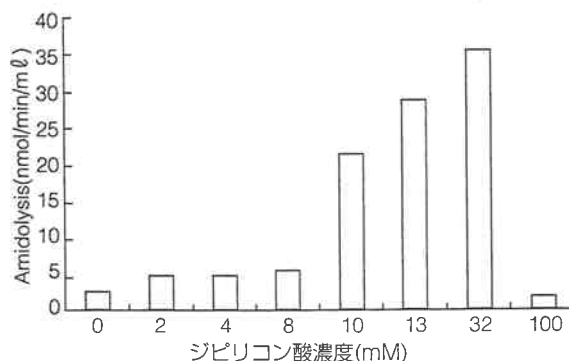
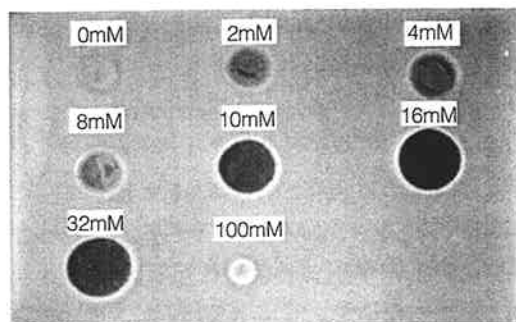


図6 ナットウキナーゼに対するジピコリン酸の添加効果

フィブリン平板法とアミド基質分解能で調べる。共にジピコリン酸10~32mMの添加で活性は著しく増加しているのが分かる

カプセルにしたナットウキナーゼを1回経口投与した場合、対照群が血栓作製後18時間目まで血管造影(macro-angiography)されなかったのに対して、投与群では5時間目には完全な再開通が確認された<sup>9)</sup>。

また、各種血栓溶解剤を右大腿静脈から一定速度(23.5  $\mu$ l/min)で20分間かけて注入、投与開始から60分後までの血流回復状態を連続測定した<sup>10)</sup>。高純度に精製したナットウキナーゼは、投与開始5分から血流の回復が認められ、60分後には安静状態の60%まで回復した。しかし、プラスミン投与群での血流は60分の観察時間内で安静状態の約20%しか回復せず、エラスターゼにいたっては血流の回復はまったく認められなかった。観察終了後、直ちに各投与群の血栓形成部位の切片を作成して検鏡したところ、ナットウキナーゼ投与群の血栓はプラスミン投与群と比較して顕著に溶解されていた(図5)。

### 3. ジピコリン酸によるナットウキナーゼの調整

ナットウキナーゼはこれまでの研究でpro-UKを活性化<sup>11)</sup>、C1-INaを抑制する<sup>12)</sup>、動脈内膜肥厚による血栓

**カコミ5** 血中の線溶活性を外部からの点滴等ではなく、生体自らの酵素活性を強化することによって高めようという考えは、何も今に始まったことではなく、すでに1940年代にvon Kaulla はflufenamic acid, niflumic acid等の投与で血中の線溶亢進が起こることを明らかにしている。しかし、そうした合成薬剤は効果のわりに副作用が強く、臨床応用できなかったこともあり、以後の研究が途絶えてしまったように思う。

症を予防する<sup>13)</sup>、血小板の凝集を抑制する<sup>14)</sup>等種々の重要な反応と係わってくる可能性がある。その生産量は培地によっても変わってくる<sup>15)</sup>。以下、ジピコリン酸との関係について述べる。放射能除去物質ともいわれるものであるが、ジピコリン酸はわが国の有働が世界に先駆けて(1936年)開発した抗菌剤の1つである。その抗菌性は幅広いものでO-157まで効くことは有名。また、アスピリン的な効果を持ち、非常に強い抗血小板凝集活性、つまり血栓を作るところを抑えてくれるわけである<sup>16, 17)</sup>。

さて、納豆菌培養液の中にジピコリン酸を共存させた場合、ナットウキナーゼ生産量が変わってくるが、宮城野、成瀬、高橋、目黒など“株”で大きく異なる<sup>18)</sup>。図6は実際の納豆製造に当たって蒸煮大豆に納豆菌を培養したものであるが、その際ジピコリン酸(DPA)を0~100mM添加してみた。ナットウキナーゼ活性は大きく変化し10~32mMで10倍以上に増えることが分かる。も

**カコミ6** 1990年に行われた第1回納豆シンポジウム(神奈川県)で財団法人大豆供給安定協会の木村榮一氏より、第二次大戦時にナチスドイツ軍が完全食品である納豆に注目し、当時の満州から30万tもの大豆を輸入、燻製納豆とし、ギリシャ戦線で自軍の兵士の食糧としたという記録のあることを聞いた。その情報、技術はその後ソ連で宇宙食に生かされている。あるいはチェルノブイリ原発事故で問題となった放射能の生体からの除去に納豆がよいといった話も聞くが、共に出典は定かでない(ご存知の方がおられましたらご一報願いたい)。

もちろん、これは基質にSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNAを用いても同様であった。

酵素としてますます発展することを期待している<sup>19-21)</sup>(図7)。

### おわりに

血栓症というのは現在わが国の統計上、がんに次いで2番目に多い病気とされるが、脳梗塞、心筋梗塞といった太い血管に血栓が詰まり急激に症状の出るもの以外にも、実は慢性的な血栓による循環不全による細胞阻害を原因とするものまで含めるとその裾野は非常に広い。現在、社会的に大きな問題となっている老人性認知症もわが国ではその約60%が血栓性のものとされる。

*Bacillus natto*という学名は、アメリカで発行されている世界的に著名なバーギーの細菌分類便覧「Bergey's Manual of Determinative Bacteriology」第6版(1948年)*Bacillus subtilis*(枯草菌)に含められ、納豆菌は国際的には独立した菌種として認められていない。ただし、わが国の納豆関係者の間では、今も納豆菌の名が親しく用いられているのは周知の通りである。真の意味での“納豆”から作られたナットウキナーゼが、世界に誇れる血栓溶解

### 《 《 《 《 参考文献 》 》 》 》 》

- 1) Sumi H., Sasaki K.: 17<sup>th</sup> Int.Cong. Hematol., Paris, Abst. p.327 (1978)
- 2) Sumi H., Sasaki K., Toki N., Robbins K.C.: *Thromb. Res.*, 20, 711 (1980)
- 3) Toki N., Sumi H., Sasaki K., Robbins K.C.: Progress in Fibrinolysis, Vol.V, eds. by Davidson J.F., Nilsson I.M., Åstedt B., Churchill Livingstone, London, p.439 (1983)
- 4) Sasaki K., Moriyama S., Tanaka Y., Sumi H., Toki N., Robbins K.C.: *Blood.*, 66(1), 69 (1985)
- 5) Toki N., Sumi H., Sasaki K., Boreisha I., Robbins K.C.: *J Clin Invest.*, 75, 1212 (1985)
- 6) Sumi H., Hamada H., Tsushima H., Mihara H., Muraki H.: *Experientia*, 43, 1110 (1987)

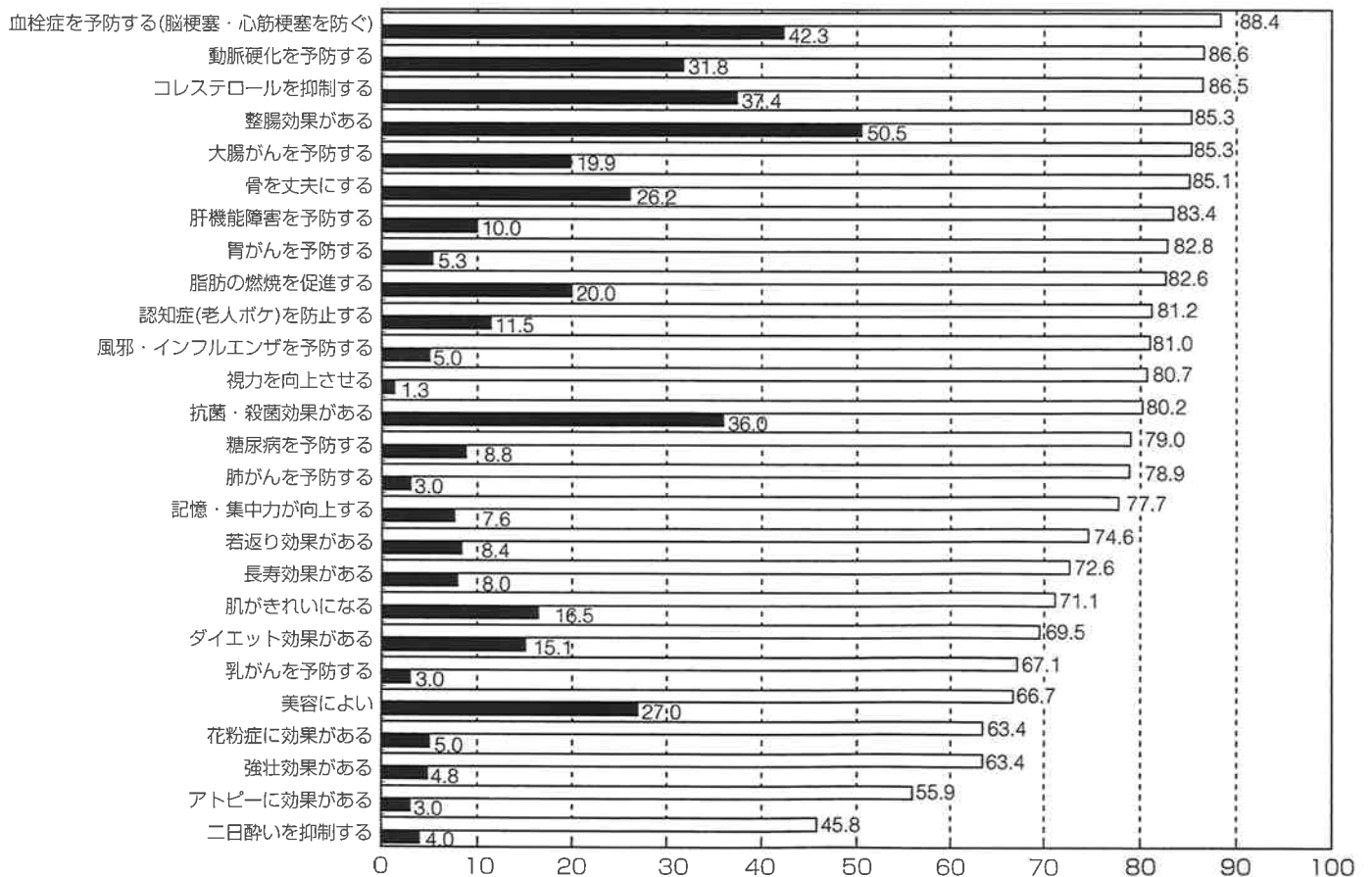


図7 納豆の薬効・効果の魅力度・認知度

ナットウキナーゼの認知度、魅力度が一番多いことが分かる  
 □ 魅力度、■ 認知度  
 WEB リサーチ、全国(2005年3月6日~22日) n=2,010のデータ

- 7) Sumi H., Taya N., Nakajima N., Hiratani H.: *Fibrinolysis*, 6, 86 (1992)
- 8) Fujita M., Ito Y., Hong K., Nishimoto S.: *Fibrinolysis*, 9, 157 (1995)
- 9) Sumi H., Hamada H., Nakanishi H., Hiratani H.: *Acta Haematol.*, 84,139 (1990)
- 10) Fujita M., Hong K., Ito Y., Misawa S., Takeuchi N., Kariya K., Nishimuro S.: *Biol. Pharm. Bull.*, 18(10), 1387 (1995)
- 11) Sumi H.: Basic and Clinical Aspects of Japanese Traditional Food Natto 1, JTTAS, Tokyo, p.49 (1994)
- 12) Urano T., Ihara H., Umemura K., Suzuki Y., Oike M., Akita S., Tsukamoto Y., Suzuki I., Takada A.: *J. Biol. Chem.*, 276, 24690 (2001)
- 13) Suzuki Y., Kondo K., Matsumoto Y., Zhao B.Q., Otsuguro K., Maeda T., Tsukamoto Y., Urano T., Umemura K., *Life Sci.*, 73, 1289 (2003)
- 14) 須見洋行：食品工業, 7, 49 (1998)
- 15) 須見洋行, 池田志織, 今井雅敏, 矢田貝智恵子：日本醸造学会誌, 99, 867 (2004)
- 16) Ohsugi T., Ikeda S., Sumi H.: *Food Sci. Technol. Res.*, 11, 308 (2005)
- 17) 須見洋行, 矢田貝智恵子, 池田志織, 大杉忠則, 丸山真杉：薬理と臨床, 16, 261(2006)
- 18) Ikeda S., Ohsugi T., Sumi H.: *Food Sci. Technol. Res.*, 印刷中
- 19) Zheng Z., Zuo Z., Lu Z., Tsai K., Liu A., Zou G.: *J. Mol. Graph. Model*, 23, 373 (2005)
- 20) Fujita M., Hong K., Ito Y., Misawa S., Takeuchi N., Kariya K., Nishimuro S.: *Biol Pharm Bull.*, 18, 1194 (1995)
- 21) Sumi H., Yatagai C.: Soy in health and disease prevention, Soy in Health and Disease Prevention, Taylor & Francis, London, p.251 (2005)



すみ・ひろゆき / Hiroyuki Sumi

1974年 徳島大学医学部大学院修了、同年 浜松医科大学生理学助手、1978年 シカゴ・マイケルリース研究所文部省在外研究員、1982年 宮崎医科大学生理学助教授、1993年 岡山県立大学栄養学科助教授、通産省外郭団体 JTTAS「天然物・生理機能素材研究委員会」会長、1997年 倉敷芸術科学大学機能物質化学科教授、2001年 同学部学部長、2003～2004年 同大学生命科学部学部長、現在に至る。医学博士  
 専門：血液生理学、食品機能学  
 研究テーマ：発酵食品が持つ機能性、特に血の巡りに関する成分の研究  
 最近の主な研究や活動：バイオアクティブおかやま、岡山テンペ研究会などの会長  
 著書：Soy in Health and Disease Prevention, Taylor&Francis (2006)、知識ゼロからの芋焼酎入門, 幻冬社(2005)、The Mediterranean League against Thromboembolic Diseases, Medimond (2004)、機能性食品ガイド, 講談社(2004)など  
 論文：代替医療としてのナットウキナーゼの機能性, *New Food Industry*, 48(7), 1-7 (2006)、無蒸煮麦類の納豆菌処理による栄養価及び生理活性の付加, 日本醸造学会誌, 100(6), 449-453 (2005)、Natto bacillus contains a large amount of water-soluble vitamin K (menaquinone-7), *J. Food Biochem.*, 29(3), 267-277 (2005)、Natto bacillus as an oral fibrinolytic agent: Nattokinase activity and the ingestion effect of *Bacillus subtilis natto*, *Food Sci. Technol. Res.*, 10(1), 17-20 (2004) など