

機能性食品としての海洋生物：無脊椎動物および藻類中に見出された血栓溶解関連物質

須見洋行・矢田貝智恵子・中島伸佳

要 旨

約20種類の無脊椎動物および藻類の生食抽出液 (dry weight 0.05-0.1g/ml) を用い、その Tosyl-L-Arg-MeOH 水解およびフィブリン平板溶解に対する反応をみた結果、無脊椎動物であるナマコ (*Stichopus japonicus*)、マガキ (*Crassostrea gigas*)、アサリ (*Tapes japonica*)、キンタイ貝、そして藻類ではミル (*Codiales codium*) に両者の活性が認められた。

酵素活性はいずれも熱に不安定であり (65℃, 1時間)、ナマコ抽出液以外はプラスミノゲン rich および free のフィブリン平板で溶解活性に大きな差はなかった。ナマコ抽出液にはプラスミノゲン活性化能が認められ、またそれと異なるウロキナーゼ (UK) に対する活性増強因子の存在も認められた。一方、藻類であるヒジキ (*Hijikia tusiformis*) の抽出液には強い UK 阻害活性が認められた。

Celite を用いたナマコ抽出液の線溶酵素のアフィニティクロマトグラフィーで吸着される画分を家兎に連日経口投与 (40mg/kg) した結果、その血漿 euglobulin 分画のフィブリン分解能は投与前に比べて4週間目で約2倍 ($p>0.01$)、8週間目では約3倍 ($p<0.005$) に高まること、また8週間目の投与家兎の腎から2MKClで抽出した組織プラスミノゲンアクチベーター (free type TPA) 活性も有意 ($p<0.001$) に高まっていることが判かった。Zymography で確認した血中に増加する線溶酵素は、主に分子量5.3万のUKタイプのプラスミノゲンアクチベーターであった。

緒 言

今日、血栓症は脳梗塞、狭心症から老人性のボケに至るまで、幅広い症状を引き起こすことが判かってきたが、その治療薬はあっても血栓を溶かすための予防薬は未だない。

我々は過去約10年にわたり、それまでの点滴静注法と違う生体自らが持つ血栓を溶かす線溶系酵素の賦活化、あるいは生体自らの細胞 (内皮) での線溶酵素の合成を高めうる新しい「経口線溶療法」について^(1,2)、また、並行して口から飲み、血中線溶亢進に働く物質の検索を

約200種類の食品を用いて行ない、特に納豆に含まれる nattokinase (NK) を発見し、その性質を報告してきた^(8,11)。今回は、海洋生物の検索で得られた結果と、一部、部分精製した標品の家兎への投与成績について報告する。

材 料 と 方 法

海洋生物の検体として約20種類の無脊椎動物および海藻類 (宮崎あるいは岡山近海で得られたもの、および岡山市内 (店頭) で購入したものを水洗、凍結乾燥後、0.05g-0.1g dry weight/ml になるよう生食中でホモジナイズし、3000rpm10分遠心して得られた上清を用いた。

図1は、そのうちで代表的な線溶活性の強かったニセクロナマコ (*Holothuria leucospilota*) とミル (*Codiales cosium*) の写真である。

TAMe 分解活性は Radial diffusion assay plate 法 (反応系は 0.05M Tris. 緩衝液, pH7.4 中に合成基質 TAMe が final 1mM, Agar 0.75%, BTB 1mg/ml) で、試料10 μ l を apply, 反応時間 37℃, 18時間で測定した。

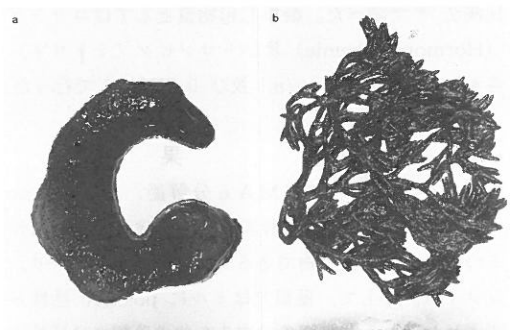


Fig. 1 線溶活性を示した海洋生物

a) ニセクロナマコ (*Holothuria leucospilota*), b) ミル (*Codiales codium*). いずれも1989年8月に宮崎日南海岸で採取したものである。

線溶活性の測定は、フィブリン平板法を Astrp & Mülletz 法⁽¹²⁾で行った。すなわち、0.4 % 牛フィブリノーゲンをトロンビンでかため人工血栓をシャーレ内に作り、それを溶解する能力で調べた。なお、平板用のフィブリノーゲンとしては、市販品（プラスミノゲンrich）をそのまま用いた場合と、同フィブリノーゲンを Deutzh & Mertg 法⁽¹³⁾による Lys-Sepharose カラムに通しプラスミノゲンを除いたもの（プラスミノゲンfree）の両方を用いた。血漿のユーグロブリン画分は Milstone の方法⁽¹⁴⁾で調整、apply試料は 30 μ l、反応時間は37℃、18時間とした。

T P Aは Mihara らの方法⁽¹⁵⁾で、腎組織を生食（0.9%NaCl）で洗った後、小細カットし、10%量の 0.15MKClでホモジナイズし、4℃60分放置後、3000g、10分間遠心し、得られた上清をそのまま用いて線溶活性を測ったものを free from の活性、また、得られた沈殿を同量の 2 M KClで再度ホモジナイズ、遠心し、得られた上清で測ったものを bound form の活性として表示した（T P Aの標準品としては BioPool 社のメラノーマ T P Aを使用）。

Celite による線溶酵素のアフィニティクロマトグラフィーは既報⁽¹⁶⁾に従い、4 NHClで活性化した2.0×4.8cmのカラムを用い、吸着した線溶酵素の溶出には 0.1% アンモニア液を用いた。

Zymography による血漿中のプラスミノゲンアクチベーターの分子量測定は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動力とフィブリン平板を組合わせた Tissot らの方法⁽¹⁷⁾で行った。

血小板の凝集はエバンス社製アグリゴメーターを用い、比濁法⁽¹⁸⁾で調べた。凝集惹起物質としてはコラーゲン（Hormone Chemie）及びトロンビン（ミドリ字）を各々、終濃度 55.5 μ g/ml 及び 0.25U/ml で行った。

結 果

各種生食抽出物の T M A e 分解能、つまり、non specific な Trypsin 様酵素の活性を検討した結果は表 I の如く、無脊椎動物であるナマコ、カキ、アサリ、キンタイ貝、そして、藻類ではミルに positive 活性が確認された。しかし、同条件でその他の藻類では活性は検出できなかった。

フィブリン平板法による線溶活性の測定結果（表II）は、T M A e 活性の強かったナマコ、カキに活性があったものの、アサリにはなく、キンタイ貝、モ貝（測定値は正確ではないが positive）も弱かった。また、藻類ではミルのみが positive であった。なお、平板中にブ

Table I TAME分解活性

和 名	学 名	TAME活性(mm ² /10 μ l)
モガイ	<i>Anadara subcrenata</i>	—
キンタイ貝		
Lot.1		44
Lot.2		18
イガイ	<i>Mytilus edulis</i>	4
トコブシ	<i>H. diversicolor aquatilis</i>	—
サザエ	<i>Butillus comatus</i>	9
マガキ	<i>Crassostrea gigas</i>	30
アサリ	<i>Tapes japonica</i>	11
シジミ	<i>Corbiculina leana</i>	6
クラゲ		—
ニセクロナマコ	<i>Holothuria leuospilota</i>	37
ナマコ	<i>Stichopus japonicus</i>	106
ベガイカ	<i>Loligo pealici</i>	3
コンブ		
Lot.1		—
Lot.2		—
ホンダワラ	<i>Sargassum</i>	—
アラメ	<i>Eisenia bicyclis</i>	—
ワカメ	<i>Undaria pinnatifida</i>	8
ヒジキ	<i>Hizikia fusiformis</i>	—
Lot.1		—
Lot.2		—
カジメ	<i>Ecklonia cava</i>	—
ミル	<i>Codiales codium</i>	49
アサクサノリ	<i>Prophyra yezoensis</i>	—

各試料（10 μ l）のTAME分解能を37℃18時間後の平板溶解面積（mm²）で表示した。

ラスミノゲンのあるなしでナマコ以外で結果に大きな違いはなく、即ち今回調べた海洋生物の活性のほとんどはプラスミン様のフィブリンに対して直接分解活性を示す酵素によることがわかった（つまり、プラスミノゲンアクチベータ活性はなかった）。いずれの線溶酵素も65℃、1時間の熱処理することで失活したが、その処理物を等量のUK（201U/ml）と混合し平板で測定した場合の結果が表IIIである。測定値は変化に富み、ナマコ抽出液のようにUKによるフィブリン溶解能を増強する効果を増すものもあったが、一般に藻類はUKによる溶解に対して阻害活性を示し、特にヒジキ、コンブ、ワカメでそれが強かった。同阻害物質は水に対して非透析性、且つ熱安定（65℃、1時間）性であり、また、ブレインキュベーションを要しない即時性の阻害反応を示した。その他、血小板凝集能への影響も調べてみた結果、少なくともナマコ抽出物（加熱物）は、血小板のコラーゲンによる凝集に対して完全阻害することはなかったものの 0.4mg/ml（乾燥重量）以上の濃度では凝集までの lag time を延長すること、またトロンビンによる凝集の場合には 2 mg/ml以上で完全阻害することがわかった。

Table II 線溶活性

和名	学名	+Plasminogen (mm ² /30μl)	-Plasminogen (mm ² /30μl)
モガイ	<i>Anadara subcrenata</i>	±	±
キンタイ貝			
Lot.1		±	±
Lot.2		±	±
イガイ	<i>Mytilus edulis</i>	—	—
トコブシ	<i>H. diversioolor aquatilis</i>	—	±
サザエ	<i>Batillus comutus</i>	4	5
マガキ	<i>Crassostrea gigas</i>	6	4
アサリ	<i>Tapes japonica</i>	—	—
シジミ	<i>Corbiculina leana</i>	—	—
クラゲ		—	—
ニセクロナマコ	<i>Holothuria leuospilota</i>	15	15
マナマコ	<i>Stichopus japonicus</i>	8	4
ベガイカ	<i>Loligo pealici</i>	4	—
コンブ			
Lot.1		—	—
Lot.2		—	—
ホンダワラ	<i>Sargassum</i>	—	—
アラメ	<i>Eisenia bicyclis</i>	—	—
ワカメ	<i>Undaria pinnatifida</i>	—	±
ヒジキ	<i>Hizikia fusiformis</i>	—	—
Lot.1		—	—
Lot.2		—	—
カジメ	<i>Ecklonia cava</i>	—	—
ミル	<i>Codium codium</i>	85	60
アサクサノリ	<i>Prophyra yezoensis</i>	—	—

各試料 (30μl) の線溶活性を標準フィブリン平板 (プラスミノゲン rich) 及びプラスミノゲン free 平板の溶解面積 (mm²) で示した。

Table III 線溶阻害活性

和名	学名	%溶解率 (10IU UK対照)
モガイ	<i>Anadara subcrenata</i>	86
キンタイ貝		
Lot.1		76
Lot.2		88
イガイ	<i>Mytilus edulis</i>	91
トコブシ	<i>H. diversioolor aquatilis</i>	102
サザエ	<i>Batillus comutus</i>	87
マガキ	<i>Crassostrea gigas</i>	80
アサリ	<i>Tapes japonica</i>	89
シジミ	<i>Corbiculina leana</i>	84
クラゲ		87
ニセクロナマコ	<i>Holothuria leuospilota</i>	100
マナマコ	<i>Stichopus japonicus</i>	112
ベガイカ	<i>Loligo pealici</i>	98
コンブ		
Lot.1		63
Lot.2		77
ホンダワラ	<i>Sargassum</i>	103
アラメ	<i>Eisenia bicyclis</i>	86
ワカメ	<i>Undaria pinnatifida</i>	73
ヒジキ	<i>Hizikia fusiformis</i>	15
Lot.1		6
Lot.2		80
カジメ	<i>Ecklonia cava</i>	71
ミル	<i>Codium codium</i>	80
アサクサノリ	<i>Prophyra yezoensis</i>	70

65℃ 1時間熱処理した各試料を当量のUK (20IU/ml) と混合し、室温 1時間ブレインキュベーション後に標準フィブリン平板法で測定した。活性は無添加のUK (終濃度10IU/ml) によるフィブリン溶解面積を100として表示した。

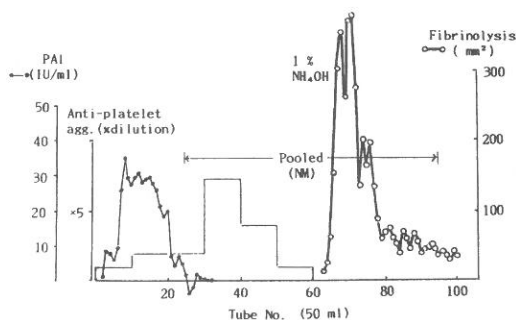


Fig. 2 マナマコ (*Stichopus japonicus*) 抽出液の
Celiteカラムクロマトグラフィー

Celiteカラム (2.0×4.8cm) に50mlの蒸留水に溶解した0.63gのNM標品を添加、水洗後、線溶酵素を1%アンモニアで溶出した。PAIはウロキナーゼ阻害 (IU) で、またコラーゲンによる血小板の凝集に対する阻害能は溶出液の希釈率で表示した。

なお、水平矢印部分を集め、凍結乾燥し、NMとして経口投与実験に供した。

図2はマナマコ生食抽出液 (200ml) を Celiteによるマフィニティクロマトグラフィーにかけた場合の成績である。吸着され 0.1% アンモニアで溶出される画分に線溶活性が、また、非吸着画分にはUKに対する線溶阻害活性が、そして、血小板凝集に対する抑制がその中間に活性 peak を示すことがわかった。

凍結乾燥NMの経口投与実験

次に、試みにナマコの線溶活性画分、即ちUK阻害活性部分を除いたNo25-95部分 (NM-003) を集め凍結乾燥し、家兎に経口投与してみた。40mg/kg body 量を10ml生食に溶かして経口用ゾンデで8週間の間毎日2回ずつ投与した結果、血漿ユーグロビン画分の線溶活性は投与前 (13.3±5.21IU/ml plow) に比べ、4週間で約2.2倍 (28.7±8.51IU/ml), そして8週間で約2.9倍 (38.8±17.0 IU/ml) に増加することがわかった 図3は、投与8週間目の家兎の腎臓組織中のTPAを測定してみた結果である。2M KClで溶出される“bound form”のプラスミノゲンアクチベーターに活性の違

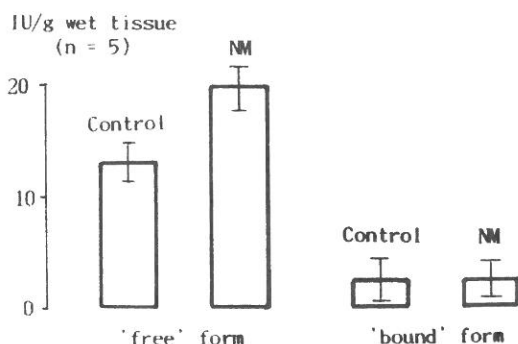


Fig. 3 家兎へのNM経口投与後の腎臓組織中のTPA活性

NM (40mg/kg) 1日2回, 8週間にわたって家兎に経口投与した後の腎臓組織抽出液中の“free”及び“bound”タイプTAPの活性(美原法)を測定した。活性はメラノーマTPAを標準として組織(wet weight)当りの国際単位(IU)で表示した。

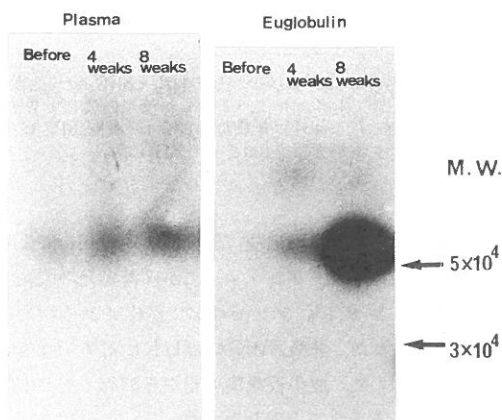


Fig. 4 家兎血漿のZymography

NM投与前及び投与後の血漿(20μl)及び血漿のユーグロブリン画分の線溶活性(プラスミノゲンアクチベーター)を示す。右側の数字はUKを標準とした場合の分子量を示す。

いはなかったが, 0.15M KClで抽出される“free from”のプラスミノゲンアクチベーターの活性増加が認められた。

最後に, 血漿中に増加するプラスミノゲンアクチベーターの分子形態を Zymography で調べた結果を図4に示す。試料に血漿をそのまま用いても血漿のユーグロブリン画分を用いても, いずれの場合も分子量約5.4万のUK位置にフィブリン溶解窓が認められ, しかもNM投与でその活性の増加することがわかった。

考 察

経口線溶療法に使用できる線溶酵素の検索を目的に約20種類の海洋生物を用いたが, 無脊椎動物および藻類のいずれにも直接のフィブリン分解能を有するものが認められた。また, 藻類, 特にヒジキの中には耐熱性(65℃, 1時間)で水に対して非透析性のUKによる線溶活性を阻害する物質も確認された。ヒジキは日本で古くから食べられている健康食品であり, 日本のある地方では「歯をみがく時に使うと歯槽膿漏の予防効果がある」といった伝承もあり興味深いものである。また, 今回例数は少ないが家兎への投与実験でナマコの線溶画分が長期間の経口投与で血中のみならず腎臓組織内のプラスミノゲンアクチベーター活性を高めることが確認された(図3)。それが Zymography の結果(図4)が示すように分子量約5.4万のUKタイプであったことは, これまでの我々が行ってきたUKとかNKを用いた経口線溶療法の実験成績⁽¹⁻¹¹⁾とも一致する。ナマコは日本では酒の肴として生で食べられている食品でもあり, これまでのUK⁽¹⁻⁷⁾とかNK⁽⁸⁻¹¹⁾, あるいは飲酒⁽¹⁹⁾による血中線溶亢進の成績とも考えあわせ, それらの食べ合わせによる相乗効果もありえよう。今後さらに多くの試料での検索と, 得られた各作用物質の性質について検討するつもりである。

本研究は文部省科学研究費(試験研究B)によるもので, 内容の一部は第23回国際血液学会(ボストン)に発表, 及び要旨は Blood 76: 552a, 7077, 1990に掲載された。

文 献

- Sumi, H., Toki, N., Sasaki, K. and Robbins, K.C.: Oral administration of urokinase. Thrombos Res 20: 711-714, 1980
- Robbins, K.C., Sumi, H., Sasaki, K. and Toki, N.: The transport of high molecular weight urokinase across

- the intestinal tract of dogs and human subjects. 2nd Int. Symposium on Urokinase, Geneva, Switzerland (Abstract p.12) 1981
- Urokinase : Basic & Clinical Aspects, Academic Press (London) p.63-73, 1982
3. Sumi, H., Maruyama, M., Yoneta, T., Toki, N. and Mihara, H. : Activation of plasma fibrinolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative. *Acta Haematol.* 70 : 289-295, 1983
 4. Sasaki, K., Moriyama, S., Sumi, H., Toki, N. and Robbins, K.C. : Intestinal transport of human ¹²⁵I-high molecular weight urokinase in a dog model with a sapherous vein thrombus. *Progress in Fibrinolysis* VI, Churchill Livingstone. London p.245-248, 1983
 5. Sumi, H., Seiki, M., Morimoto, N., Tsusima, H., Maruyama, M. and Mirara, H. : Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme* 33 : 121-127, 1985
 6. Sasaki, K., Moriyama, S., Tanaka, Y., Sumi, S., Toki, N. and Robbins, K.C. : Transport of ¹²⁵I-labeled human high molecular weight urokinase across the intestinal tract in a dog model with stimulation of synthesis and/or release of plasminogen activators. *Blood* 66 : 69 - 75, 1985
 7. Toki, N., Sumi, H., Sasaki, K., Boreisha, I. and Robbins, K.C. : Transport of urokinase across the intestinal tract of normal human subjects with stimulation of synthesis and/or release of urokinase-type proteins. *J Clin Invest* 75 : 1212 - 1220, 1985
 8. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H. : A novel fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a typical and popular soybean food of the Japanese diet. *Experientia* 43 : 1110-1111, 1987
 9. Sumi, H., Hamada, H., Mihara, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H. : Fibrinolytic effect of the Japanese traditional food "Natto" (Nattokinase). *Thromb Haemostas* 62 : 549, 1989
 10. 須見洋行 : 血栓溶解酵素 : ナットウキナーゼの性質とその経口線治療法への応用 (機能性食品素材. 食品由来の生理活性物質等における研究と開発) 工業技術会, 東京 p.88~96, 1989
 11. 須見洋行 : 機能性食品素材マニュアル 第6章 納豆カイネース p.287~289. CMC東京 1990
 12. Astrup, T. and Müllertz, S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biophys.* 40, 346-351, 1952
 13. Deutsch, D.G. and Mertz, E.T. Plasminogen : Purification from human plasma by affinity chromatography. *Science* 170, 1095-1096, 1970
 14. Milstone, H. A factor in normal human blood which participates in streptococcal fibrinolysis. *J. Immunol.* 42, 109-116, 1941
 15. Mihara, H., Fujii, T. and Okamoto, S. : Fibrinolytic activity of cerebro-spinal fluid and the development of artificial cerebral haematomes in dogs. *Thromb Diath Haemorrh* 21, 294-303, 1969
 16. Sumi, H., Toki, N., Takada, Y. and Takada, T. : Studies on human urinary enzymes and inhibitors. Concentration method and characterization. *J Biochem* 83, 141-147, 1978
 17. Tissot, J.D., Schneider, P., Hauert, J., Ruegg, M., Kruithof, E.K.O. and Bachmann, F. : Isolation from human plasma of a plasminogen activator identical to urinary high molecular weight urokinase. *J Clin Invest* 70, 1320-1323, 1982
 18. O'Brien, J.R. : Platelet aggregation. Part II. Some results from a new method of study. *J Clin Path* 15 : 452-473, 1962
 19. Sumi, H., Hamada, H., Morimoto, N. and Mihara, H. : Urokinase-like plasminogen activator increased in plasma after alcohol drinking. *Alcohol Alcoholism* 23 : 33-44, 1988

平成 3 年 6 月 13 日受付

平成 3 年 6 月 20 日受理