

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650412

研究課題名(和文)血栓症および血管系疾患予防の可能性を探る：運動およびナットウキナーゼ摂取の効果

研究課題名(英文)A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profiles

研究代表者

浜岡 隆文(Hamaoka, Takafumi)

立命館大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：70266518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】血栓症予防効果を有すると期待されるナットウキナーゼをヒトが経口摂取した場合の基礎的効果を検証することを目的に、本研究を実施した。【結果】ナットウキナーゼ2,000F.U.の単回摂取により、凝固系因子のもっとも重要なものの1つである凝固系第8因子の有意な低下、および体内における重要な凝固阻止因子の1つであるアンチトロンビン濃度も、有意な増加を認めた(=凝固抑制効果)。さらに、血栓溶解作用も認めた。【意義】本研究の実施により、ヒトにおいてナットウキナーゼの単回摂取により、主要な血液凝固系因子を抑制し、線溶系を活性化させることにより、血栓症予防効果を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to determine the quantitative effects of a single-dose of Nattokinase (NK) administration on coagulation/fibrinolysis parameters comprehensively in healthy male subjects. A double-blind, placebo-controlled cross-over NK intervention study was carried out in 15 healthy young males. Following the baseline blood draw, each subject was randomized to receive either a single-dose of 2,000 FU NK or placebo with subsequent cross-over of the groups. Subjects donated blood samples at 2, 4, 6 and 8 hours following administration. As a result, D-dimer concentrations and blood fibrin/fibrinogen degradation products after NK administration elevated significantly. Factor VIII activity declined, blood antithrombin concentration was higher, and the activated partial thromboplastin time prolonged significantly following NK administration. In conclusion, thus, a single-dose of NK administration appears enhancing fibrinolysis and anti-coagulation via several different pathways simultaneously.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：ナットウキナーゼ 血液凝固系因子 血液線溶系因子 血栓

1. 研究開始当初の背景

血液凝固系により作られた線維素(フィブリン)は、線維素溶解(線溶)系により分解され、フィブリン・フィブリノーゲン分解産物(FDP)として血中に放出される。この過程で働く組織性プラスミノゲン・アクチベーター(tPA)およびタイプ1プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター(PAI-1)のバランスにより、線溶能は決まる。納豆の粘性成分に含まれる酵素である「ナットウキナーゼ(NK)」は、血栓(線維素=フィブリン)を直接溶解する作用(線溶)のほか、線溶系促進因子であるtPAの活性化や、線溶系抑制因子であるPAI-1の分解を介した、間接的な血栓溶解促進作用を有している[1-3]。NKは、その強力な血栓溶解作用と、血液線溶系の複数経路に同時に作用するユニークな特徴から、次世代の血栓溶解薬/血栓症予防サブリエメントとして期待されている。しかしながら、血栓症発症リスク因子に及ぼすNKの単回摂取の効果をヒトで検証した先行研究はみられない。また、血栓症発症リスクの高まる、脱水を伴う高強度運動時の、NKの事前摂取の効果も不明である。

2. 研究の目的

~実験1~

単回のNK摂取(2,000FU)がヒト血液凝固系および線溶系の各因子に及ぼす影響を網羅的に検討すること。

~実験2~

単回のNK事前摂取(2,000FU)が、脱水を伴う高強度運動時のヒト血栓症リスク因子(血液凝固・線溶系)に及ぼす影響を網羅的に検討すること。

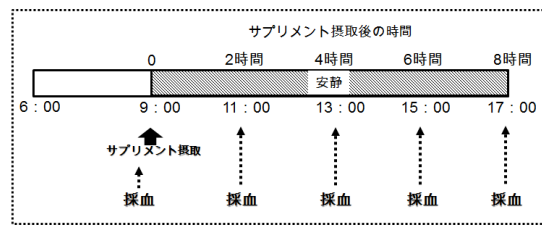
3. 研究の方法

実験開始に先立ち、立命館大学BKC生命倫理審査委員会の審査による承認を得て、すべての実験を実施した(承認番号: BKC-IRB-2011-030)。なお、被験者には、実験プロトコル、実験参加により起こりうる不利益、個人情報の取り扱い等についての説明を口頭および文書で行い、文書による同意を得た。

~実験1~

対象: 健康成人男性 10名(22.3±0.6歳、平均±標準偏差)

実験プロトコル: 納豆2パック含有量分に相当する2,000FU(フィブリン分解単位)のNK(NSK-SD、(株)日本生物科学研究所製)もしくはプラセボを経口投与し、投与前および投与後2時間毎に8時間まで肘静脈より採血を行い、各種血液凝固・線溶系因子を測定した。

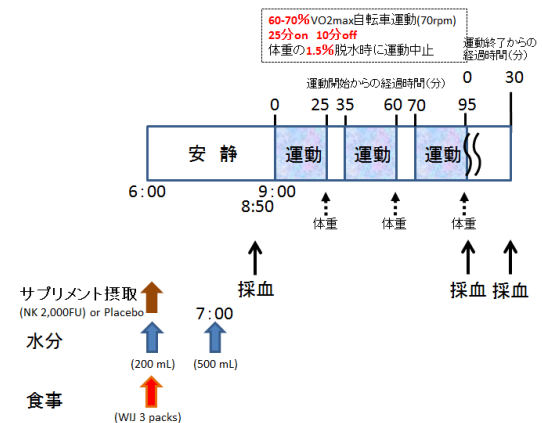


測定項目: 研究成果参照のこと。

~実験2~

対象: 健康成人男性 5名(23.0±1.4歳)

実験プロトコル: 納豆2パック含有量分に相当する2,000FU(フィブリン分解単位)のNK(NSK-SD、(株)日本生物科学研究所製)もしくはプラセボを運動開始3時間前に経口投与し、室温36℃、相対湿度40%に設定された室内で、最大酸素摂取量(VO₂max)の60-70%強度(70回転/分)の自転車エルゴメータ運動を行った。運動は、25分間行ったあと10分間の休息を入れ、その都度体重測定を行い、汗による脱水量が初期体重の1.5%に達するまで繰り返した。脱水負荷中は鼓膜温をモニターし、暑熱下作業の中止基準(熱中症予防対策の基本、中央労働災害防止協会刊)である38.5℃を超えた場合には、脱水負荷をただちに中止した(実際には1例も認めなかった)。また、Borg Scaleによる自覚的運動強度を10分毎に測定し、運動中の心拍数と相関が高い自覚的運動強度がその時点での心拍数と大きく乖離した場合には、運動負荷を中止した(実際には1例も認められなかった)。運動終了直後、30分後、2時間後に採血して血液凝固・線溶系の各因子を測定し、ナットウキナーゼ事前摂取による効果を検討した。



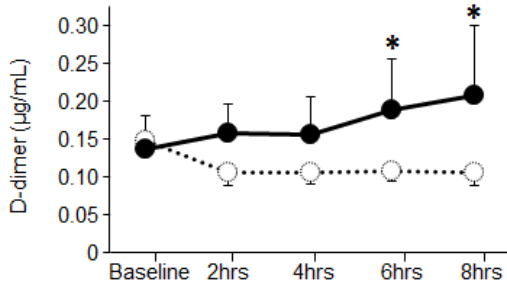
データはすべて平均値±標準偏差で示した。統計解析ソフトは、SPSS日本語版 version 20.0 (IBM SPSS Japan) を使用し、対応のある二元配置分散分析およびBonferroni法多重比較解析を、必要に応じて行った。危険率5%未満を有意水準とした。

4. 研究成果

~実験1~

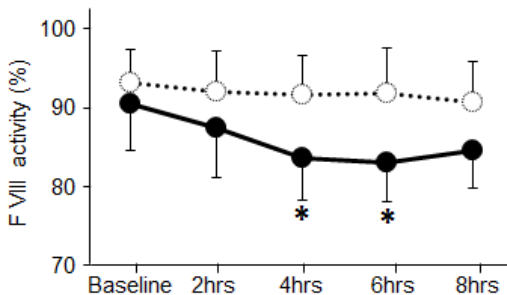
NK2,000FUの経口摂取により、血液凝固・線溶系因子は以下の影響を受けた。

(1) D-ダイマー濃度：NK 摂取 6 時間後、および 8 時間後に有意な増加を示した ($P < 0.05$, 線溶系亢進)。

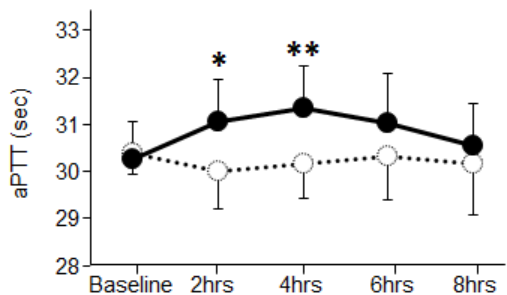


(2) フィブリン/フィブリノーゲン分解産物 (FDP) 濃度：NK 摂取 4 時間後に、有意な増加を示した ($p < 0.05$, 線溶系亢進を示す)。

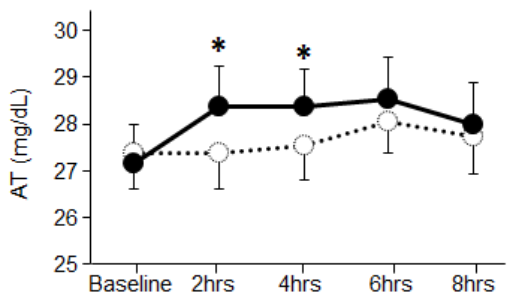
(3) 血液凝固第 8 因子活性：NK 摂取 4 時間後および 6 時間後に、有意な低下を示した ($p < 0.05$, 凝固系の抑制を示す)。



(4) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT): NK 摂取 2 時間後および 4 時間後に、有意な延長を示した ($p < 0.05$ および $p < 0.01$, 血液凝固系の抑制)。



(5) アンチトロンビン濃度：NK 摂取 2 時間後および 4 時間後に、有意な増加を示した (各 $P < 0.05$, 血液凝固系の抑制作用)。

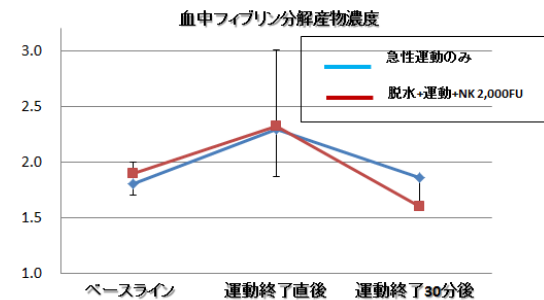


実験 1 総括

ヒトに NK2,000FU を単回投与した本研究の結果から、NK 摂取は、ヒトにおいても、複数の血液線溶系と凝固系を同時に刺激することにより、血栓形成を抑制する方向に傾かせることが明らかとなった。これらの事実は、血栓症予防サプリメントとしての NK の有用性の可能性を示唆すると同時に、血栓溶解薬としての可能性も示している。今後さらなる検討が必要である。

~ 実験 2 ~

脱水を伴う高強度運動開始 3 時間前の NK2,000FU 経口摂取により、本研究にて測定した血液凝固・線溶系の各因子は、有意な影響を受けなかった。



測定を行った項目：

赤血球数、白血球数、血小板数、フィブリン/フィブリノーゲン分解産物濃度、D-ダイマー濃度、プラスミノーゲン濃度、フィブリノーゲン濃度、血液凝固第 8 因子活性、血液凝固第 7 因子活性、アンチトロンビン濃度、活性化部分トロンボプラスチン時間、プロトロンビン時間、血中蛋タンパク質濃度、血中グルコース濃度

実験 2 総括

脱水を伴う高強度自転車運動を負荷し、その開始 3 時間前に NK2,000FU を経口摂取させた本研究では、運動直後および運動終了 30 分後における主要な血液凝固系因子/線溶系因子は、有意な変化を示さなかった。その理由として考えられることは、2,000FU の NK 摂取が生体に与えるインパクトよりも、体重の 1.5% におよぶ脱水の影響、もしくは高強度自転車運動実施の影響のほうがより大きく、たとえば NK 摂取が血栓形成を抑制する効果を有していたとしても、その効果がマスクされた可能性が考えられる。NK 摂取効果を正確かつ客観的に評価するためには、今後、異なる運動プロトコルの選択、特性の異なる被験者の動員、異なる NK 摂取量/摂取期間等を用いた、詳細な検討が必要と考える。

< 引用論文 >

[1] Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. & Muraki, H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a

typical and popular soybean food in the Japanese diet., *Experientia*. **43**, 1110-1111 (1987)

[2] Urano, T. et al. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type 1. *J Biol Chem*. **276**, 24690-24696 (2001)

[3] Fujita, M., Ito, Y., Hong, K. & Nishimuro, S. Characterization of nattokinase-degraded products from human fibrinogen or cross-linked fibrin. *Fibrinolysis*. **9**, 157-164 (1995)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yuko Kurosawa, Shinsuke Nirengi,
Toshiyuki Homma, Kazuki Esaki, Mitsuhiro
Ohta, Joseph F. Clark & Takafumi Hamaoka.
A single-dose of oral nattokinase potentiates
thrombolysis and anti-coagulation profiles.
Sci. Rep. **5**, 11601; DOI: 10.1038/srep11601
(2015).査読有 (in press)

〔図書〕(計 1 件)

Takafumi Hamaoka. *In-vivo* NIRS and
muscle oxidative metabolism. In:
Handbook of Modern Biophysics 4.,
Springer Science, 2013, 総ページ数：
17.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浜岡 隆文 (HAMAOKA Takafumi)
立命館大学・スポーツ健康科学部・教授
研究者番号：70266518