

バチルスズブチリス AK 株および乳酸菌の代謝産物抽出液、エンザミンの線溶活性亢進効果

Profibrinolytic effect of Enzamin, an extract of metabolic products

from *Bacillus subtilis* AK and *Lactobacillus*田村 行識¹、岡田 清孝¹、河尾 直之¹、矢野 昌人¹、上嶋 繁^{1,2}、永井 信夫^{1,3}、松尾 理¹Yukinori Tamura¹, Kiyotaka Okada¹, Naoyuki Kawao¹, Masato Yano¹, Shigeru Ueshima^{1,2},Nobuo Nagai^{1,3}, Osamu Matsuo¹**要約**

線溶系の破綻は心血管疾患や脳梗塞などの血栓性疾患の発症進展に関与している。したがって、線溶活性を亢進させる物質は、これらの疾患の予防に有用であると考えられる。本研究において、我々は、新たな線溶活性亢進物質の探索を目的として、バチルスズブチリス AK 株と乳酸菌の代謝産物の抽出液である、エンザミンの線溶活性に対する効果を生体外と生体内で検討した。

合成基質法 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251)) とフィブリンプレート法を用いた生体外での検討において、エンザミンは組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) によるプラスミン産生を亢進させた。しかし、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (u-PA) によるプラスミン産生への影響は認められなかった。また、フィブリンザイモグラフィ法での検討において、培養血管内皮細胞の細胞溶出液および培養上清中の t-PA によるプラスミン産生の亢進も認められた。さらに、1%濃度のエンザミン溶液をマウスに経口投与した結果、血漿ユーグロブリン分画における t-PA によるプラスミン産生が 1.7 倍に増加した。

結論として、エンザミンは、血管内皮細胞から放出される t-PA を介したプラスミン産生を亢進させる効果を有しており、血栓性イベント発症を予防するための有用なサプリメントとなる可能性がある。

Key words 線維素溶解系、組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA)、バチルスズブチリス AK (*Bacillus subtilis* AK)、乳酸菌 (*Lactobacillus*)、血管内皮細胞

1. 近畿大学医学部第二生理学教室 [〒590-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2]

Department of Physiology, Kinki University school of Medicine, 377-2 Ohno-higashi, Osakasayama, Osaka 589-8511, Japan

2. 近畿大学農学部食品栄養学科生体機能学研究室 [〒631-8505 奈良県奈良市中町 3327-204]

Department of Food Science and Nutrition, Kinki University School of Agriculture, 3327-204, Nakamachi, Nara 631-8505, Japan

3. 長浜バイオサイエンス大学アニマルバイオサイエンス学科 [〒526-0829 滋賀県長浜市田村町 1266]

Department of Animal Bio-science, Nagahama Institute of Bio-science and Technology, 1266 Tamura-cho, Nagahama, Shiga, 526-0829, Japan

1. 緒言

線溶系はフィブリンの分解により血液循環の恒常性の維持に関与している。線溶系の主要な因子であるプラスミノゲンは、組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) やウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (u-PA) などのプラスミノゲンアクチベーターによって、活性化体のプラスミンに変換される[1]。t-PA は血管内線溶における主要なプラスミノゲンアクチベーターであり、u-PA は細胞外のタンパク質分解に関与している。線溶活性は、プラスミノゲンの活性化の阻害 (阻害剤: PAI-1) とプラスミンの阻害 (α_2 アンチプラスミン) により調節されている[2]。生理的条件下においては、凝固と線溶のバランスが、循環血中における恒常性を維持している。しかし、心血管疾患や脳梗塞などの病態生理的条件下では、このバランスは変化する。つまり、線溶系の破綻は、これらの疾患の進展に関与している[3,4]。したがって、線溶活性を亢進する物質はこれらの疾患の予防あるいは治療に有用であると考えられる。

これまで、ストレプトコッカス属やバチルス属など、さまざまな微生物から線溶活性亢進物質が発見されてきた[5]。ストレプトキナーゼなどの微生物由来の線溶酵素は臨床に用いられている。さらに、微生物由来の線溶亢進物質は、食品に添加するなどして摂取することにより、線溶活性を亢進し、血栓症を予防できる可能性がある。

エンザミンは、熱処理や X 線処理および酸処理などの厳しい条件下で選択された、活性酵素の分泌がさかんなバチルスズブチリス AK 株と、乳酸菌の代謝産物の抽出物である[6]。さらに、エンザミンは長期熟成と自己消化によって作り出された、たくさんの活性酵素を含む、分子量 500 以下の低分子タンパク質を豊富に含んでいる[6,7]。これまで動物実験において、心血管疾患に深く関連がある高血圧や糖尿病に対して、エンザミンによる改善効果が示されているが[6,8,9]、線溶活性に対する効果は明らかではない。

そこで、本研究において、エンザミンの線溶活性に対する効果を生体外と生体内において検討した。

2. 試薬と方法

1) 試薬

以下の試薬は、次に示すそれぞれの会社から購入した。H-D-Valyl-L-leucyl-L-lysine-pnitroanilide (S-2251) (Chromogenix; Milan, Italy)、ヒトウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (u-PA)、ヒト組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA)、ヒトトロンビン (Cosmo Bio; Tokyo, Japan)。エンザミン 20 倍濃縮液は株式会社エンザミン研究所 (Osaka, Japan) より提供された。

2) 合成基質を用いたプラスミン産生の測定

t-PA と u-PA による Glu プラスミノゲンの活性化に対するエンザミンの効果を合成基質法で評価した[10]。エンザミン (生理食塩水で 0.04~100% に希釈したもの) の存在下および非存在下において、Glu プラスミノゲン (100 μ M) と S-2251 (0.5 mM) を、t-PA (10 IU/ml) あるいは u-PA (2 IU/ml) とともに、96 ウェルプレートにて 37°C で 2 時間インキュベーションした。S-2251 の加水分解による発色をプラスミン活性として、マイクロプレートリーダー (Thermomax TM, Molecular Devices; Sunnyvale, CA, USA) にて検出した。

3) フィブリンプレートを用いた線溶活性の測定

エンザミンの線溶活性に対する効果をフィブリンプレート法にて測定した。すなわち、2 ml の生理食塩水に溶解したトロンビン (10 NIH U/ml) と、25 mM バルビタール酸ナトリウム、50 mM NaCl、25 mM CaCl_2 を含むウシ由来プラスミノゲン含有フィブリン溶液 (1.5 mg/ml, Organon Teknika; Dublin, Ireland) を直径 9 cm のプレート中で混和した。プレートは室温で 2 時間放置し、線溶活性測定に用いた。25 IU/ml の t-PA と 30 mM の NaCl にエンザミン (0.04~100% に生理食塩水で希釈したもの) を添加するものと添加しないコントロールを作成

し、プレートに滴下した。室温で 18 時間インキュベーションした後、溶解面積を測定した。

4) ザイモグラフィーを用いた線溶活性の測定

u-PA と t-PA の活性を以前報告されている方法で測定した[11]。すなわちウシ由来プラスミノゲンリッチフィブリノゲンと 0.056 NIH U/ml のトロンビンを含んだ 10%のポリアクリルアミドゲルを用い、タンパク質試料を泳動し、その後、2.5%のトリトン X 溶液中に 60 分間浸漬した。そして反応液 (0.5 M Glycine-HCl, pH 8.4) にて 37°C で 18 時間インキュベートした。ゲルをクマシーブルー R250 液で 1 時間染色し、青い背景に白いバンドが検出されるまで、脱色液で数回洗浄した。

5) 細胞培養

マウス由来脳血管内皮細胞 bEnd.3 細胞を 10% ウシ血清 (Fetal bovine serum (FBS), American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA) 含有の DMEM (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 中で 37°C、5%CO₂ 条件下で培養、維持した。bEnd.3 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、10%FBS 含有 DMEM で培養した。コンフルエントに達してから 3 日後にエンザミン (0.001~0.1%に生理食塩水で希釈したもの) を添加した血清を含まない DMEM 中で 6~12 時間培養した。それぞれの時間において、細胞溶解液と培養上清を回収した。

6) エンザミンのプラスミノゲンアクチベーターに対する結合能の解析

エンザミンの t-PA と u-PA に対する結合能を生体分子相互作用解析システム IA sys (Affinity Sensors; Saxon Hill, Cambridge, UK) を用いて測定した。10 mM の酢酸ナトリウム (pH 5.0) に混和した t-PA と u-PA (100 µg/ml) をカルボキシメチルデキストランでコーティングしたバイオセンサーキュベットに結合させた。エンザミン (生理食塩水で 1~20%に希釈したもの) の t-PA と u-PA に対する結合は、少なくとも 5 分間、

50 ml の 25 mM リン酸バッファー (pH 7.4) 中においてリアルタイムで測定した。結合の指標は会合相 と解離相の結合反応を FastFit ソフトウェア (Affinity Sensors) を用いて計算した。

7) 動物実験

雄性 C57BL6/J マウス (11 週齢) は日本クレア (Tokyo, Japan) から購入した。150 µl の生理食塩水あるいは生理食塩水で希釈したエンザミン (0.008~25%) を、マウスの胃内に投与した。同濃度同量のエンザミンあるいは生理食塩水を、投与 1 回目から 30 分後に、もう一度投与した。そして、2 回目の投与から 90 分後にマウスを麻酔し、血液を採取した。血漿のユーグロブリン分画の分離は以前報告されている方法で行った[12]。この分画の t-PA と u-PA によるプラスミンの産生は、上記に記載したフィブリンザイモグラフィーを用いて測定した。すべての実験は、National Institute of Health (NIH) のガイドラインおよび近畿大学動物実験施設の定めた規定に従った。

8) 統計解析

統計解析は、スチューデントの t 検定を用いて行い、P<0.05 を有意差ありとした。

3. 結果

1) 生体外における t-PA および u-PA によるプラスミン産生に対するエンザミンの効果

まず、t-PA および u-PA によるプラスミン産生に対するエンザミンの直接の効果を、合成基質 S-2251 を用いて検討した。その結果、エンザミン処理によって t-PA によるプラスミン産生の亢進が認められた (Fig. 1A)。しかし、u-PA によるプラスミン産生への影響は認められなかった (Fig. 1B)。また、エンザミンはフィブリンプレートにおいて t-PA による線溶活性を亢進した (Fig. 2)。これらのデータから、エンザミンが t-PA によるプラスミン産生を亢進することが示唆された。

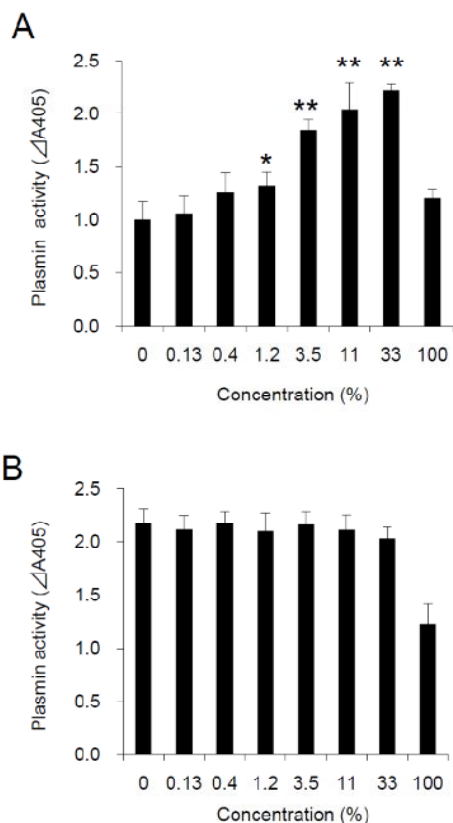


Fig. 1 合成基質 S-2251 を用いた、エンザミンの存在下および非存在下における t-PA (A) あるいは u-PA (B) によるプラスミン産生の検討。結果は平均値±標準偏差で示している。* P<0.05; ** P<0.01; vs. エンザミン非投与群 (各群 n=5)

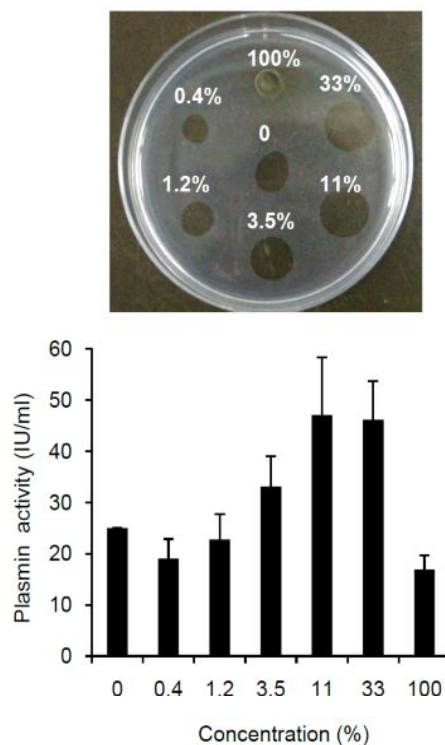


Fig. 2 フィブリンプレート法を用いた、エンザミンの t-PA を介した線溶活性に与える効果の検討。結果は平均値±標準偏差で示している (各群 n=5)。

2) 血管内皮細胞に対するエンザミンの効果

細胞レベルでプラスミン産生に対するエンザミンの効果の評価するために、エンザミンとともにインキュベーションした bEnd.3 細胞の細胞溶解液と培養上清における t-PA と u-PA によるプラスミン産生を、ザイモグラフィを用いて測定した。6 時間と 12 時間のエンザミン処理の両方で、bEnd.3 細胞の細胞溶解液において、t-PA によるプラスミン産生が亢進された (Fig. 3A)。さらに、培養上清においても同様にエンザミン処理により t-PA によるプラスミン産生が亢進された (Fig. 3B)。しかしながら、エンザミンは、bEnd.3 細胞の細胞溶解液および培養上清における、u-PA によるプラスミン産生には影響を与えなかった (データ未発表)。これらのデータから、エンザミンが血管内皮細胞における t-PA の産生と放出を亢進することが示唆された。

3) t-PA あるいは u-PA に対するエンザミンの結合

エンザミンの t-PA あるいは u-PA に対する結合能を、生体分子相互作用解析システム IAsys を用いて測定した。この解析によりエンザミンが濃度依存的に t-PA と結合することが明らかとなった (Fig. 4)。エンザミンの u-PA に対する結合も検出されたが、その結合能は、t-PA のそれと比較し、著しく小さいものであった (データ未発表)。

4) マウス血漿のユーグロブリン分画における t-PA および u-PA によるプラスミン産生に対するエンザミンの効果

エンザミンの効果を生体内で評価するために、エンザミンをマウスに経口投与し、血漿中のユーグロブリン分画における t-PA および u-PA によるプラスミン産生に対する効果を検討した。その結

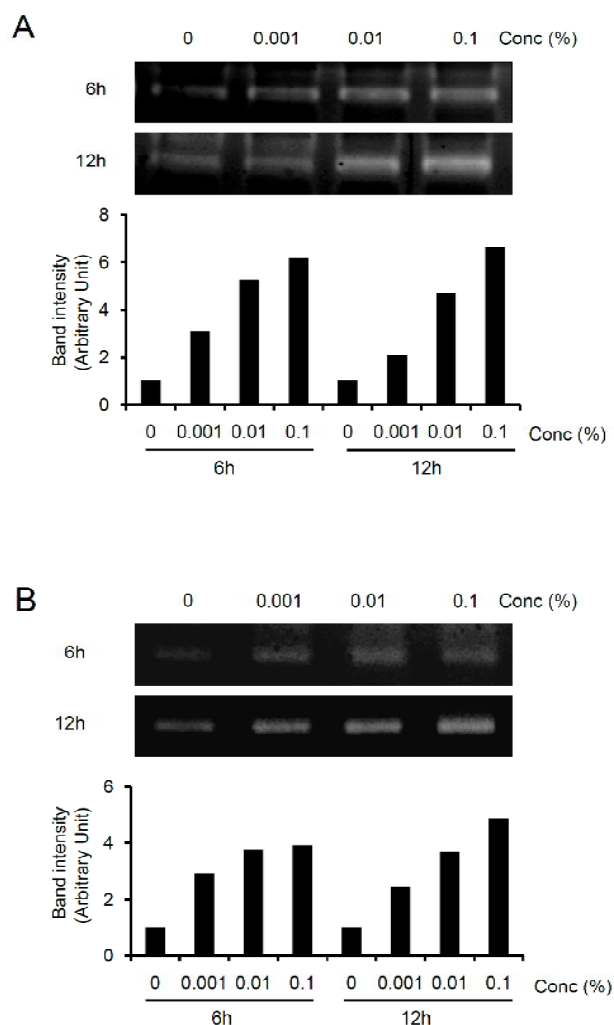


Fig. 3 6時間および12時間のエンザミン処理がbEnd.3細胞の細胞溶解液 (A) と培養上清 (B) におけるt-PAによるプラスミン産生に与える効果の検討。

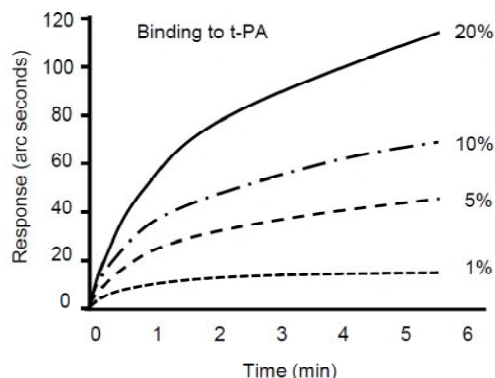


Fig. 4 生体分子相互作用解析システム IAsys を用いたエンザミンのt-PAに対する結合能の検討

果、0.2%と1%濃度のエンザミンの経口投与はt-PAによるプラスミン産生をおよそ1.7倍に増加させた (Fig. 5)。しかし、生体外の検討同様に、u-PAによるプラスミン産生には影響を与えなかった (Fig. 5)。

さらに、エンザミンの効果の持続時間についても検討を行った。1%濃度のエンザミン投与による線溶活性の亢進は経口投与2時間後に認められ、その亢進効果は4時間後においても認められた (Fig. 6)。

4. 考察

本研究において、我々はバチルスズブチリス AK株と乳酸菌の代謝産物の抽出液であるエンザミンが、血管内皮細胞におけるt-PAの産生・放出を増加させることにより、プラスミン産生を亢進することを生体外と生体内の両方で証明した。

血管内における線溶活性はt-PAとその阻害物質であるPAI-1とのバランスによって決定される [13]。肥満や脂質異常症および高血圧などの心血管疾患や虚血性脳梗塞のリスクファクターをもつ患者は、血中PAI-1濃度が増加しており、結果としてt-PA活性が抑制される [14-16]。さらに、t-PA活性の減少は、深部静脈血栓症 (Deep vein thrombosis (DVT)) の発症とも関連がある [17]。ゆえに、t-PA活性の亢進はこれらの血栓性疾患の発症進展の予防に有用である可能性がある。これまで、血栓疾患を臨床で治療する目的で、血管内皮細胞におけるt-PA産生・放出を亢進する化学物質の開発が試みられてきた [18-20]。しかしながら、これらの開発は、予期せぬ副作用により失敗してきた。ゆえに、安全性の高い微生物由来の線溶亢進物質に注目が集まっている。

本研究において、我々は、微生物由来産物であるエンザミンが濃度依存的に血管内皮細胞の細胞溶解液と培養上清においてt-PAによるプラスミン産生を濃度依存的に亢進させることを示した (Fig. 3)。これらのデータからエンザミンが血管内皮細胞からのt-PAの産生と放出の促進による線溶活性亢進効果を有することが示唆された。

この効果を生体内で確認するために、エンザミンをマウスに経口投与し、t-PAによるプラスミン

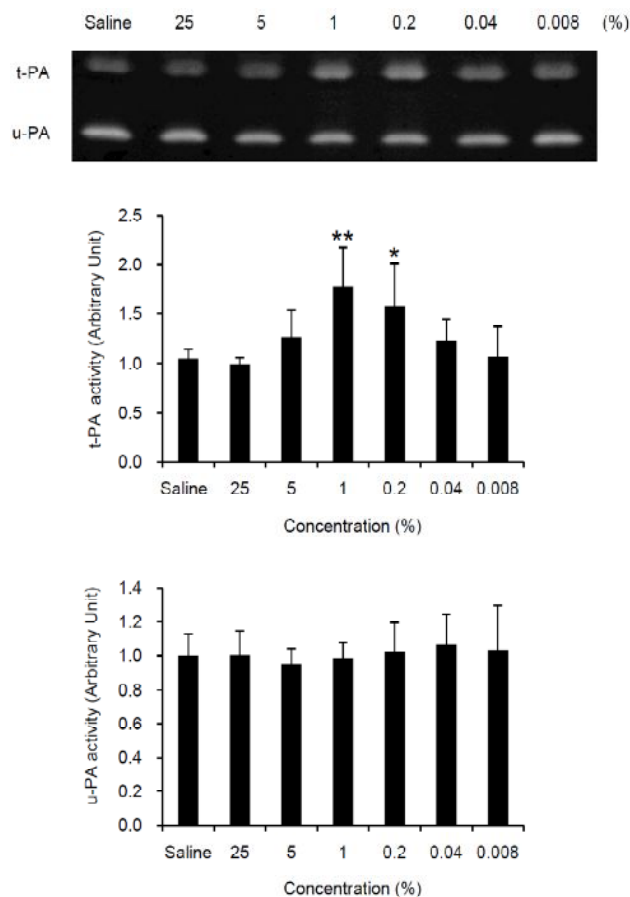


Fig. 5 エンザミン (投与 2 時間後) のマウス血漿ユーグロブリン分画における t-PA (上グラフ) および u-PA (下グラフ) によるプラスミン産生に対する効果の検討。結果は平均値±標準偏差で示している。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; vs. エンザミン非投与群 (各群 $n = 5$)

産生に与える効果を検討した結果、マウス血漿中のユーグロブリン分画において t-PA によるプラスミン産生を 1.7 倍に増強させた (Fig. 5)

エンザミンはバチルスズブチリス AK 株と乳酸菌の代謝産物を長期熟成・自己消化させることによって作られる。この熟成と自己消化が分子量 500 以下の物質を主要な構成成分とするエンザミンを作り出す[6,7]。もしかすると、この低分子化が消化管からの吸収を容易にし、血中において線溶活性を示したのかもしれない。

また、本研究において合成基質 S-2251 (Fig. 1) とフィブリンプレート (Fig. 2) を用いた生体外での検討において、高濃度のエンザミンは t-PA によるプラスミン産生を亢進することが認められた。高濃度のエンザミンは t-PA によるプラス

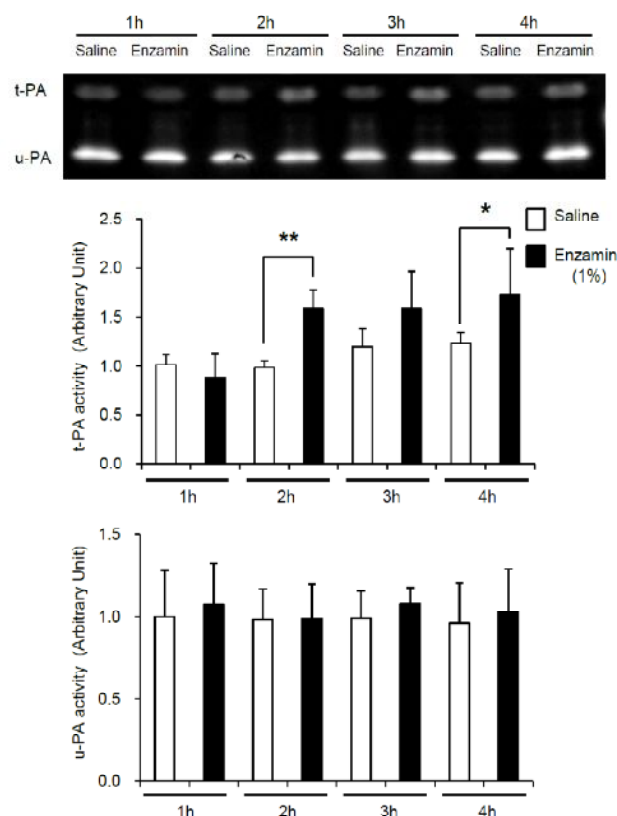


Fig. 6 エンザミンのマウス血漿ユーグロブリン分画における t-PA (上グラフ) および u-PA (下グラフ) によるプラスミン産生に対する時間依存的効果の検討。結果は平均値±標準偏差で示している。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; vs. エンザミン非投与群 (各群 $n = 5$)

ミン活性を直接亢進させるのかもしれない。

エンザミンのような内因性の t-PA 活性を促進する線溶活性亢進物質は、脳梗塞の治療に有用かもしれない。精製されたヒト t-PA は、急性脳梗塞発症後 3 時間以内に限り、その治療に有効である[21]。しかし、3 時間を超えた大量の t-PA の投与は、出血や、t-PA-Lipoprotein-related protein (LRP) の経路を介したマトリックスメタロプロテアーゼの活性化による神経毒性が増加する[22]。エンザミン投与により t-PA の投与濃度を減少させることができれば、t-PA による副作用を軽減できるかもしれない。すなわち、t-PA とエンザミンの同時投与は、これらの問題を解決してくれるかもしれない。

また、生体分子相互作用解析システム IAsys に

よる解析により、エンザミンには t-PA に強く結合する物質が含まれることが明らかとなった (Fig. 4)。ゆえに、エンザミンは t-PA と直接反応し、その活性を亢進しているのかもしれない。さらに、エンザミンはその製造過程で 85°C 以上の熱で処理されるため、エンザミンに含まれる線溶活性亢進物質は、熱耐性がある分子量 500 以下の低分子物質である可能性がある。これらの物質の同定と、その物質の効果の検討が今後必要である。さらに、エンザミンが血栓性疾患の発症を予防で

きるかどうかを明らかにするために、臨床試験が必要であると考えられる。

本研究は、エンザミンが生体外と生体内において、t-PA によるプラスミン産生を亢進させるといった線溶活性亢進効果を有することを証明した。エンザミンは、健康維持のためにすでに広く使われており、さらに副作用は報告されていないため、血栓性疾患予防のための有用なサプリメントとなるかもしれない。

引用文献

1. Collen D, Lijnen HR (1991) Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78 (12):3114-3124
2. Collen D, Lijnen HR (1995) Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb Haemost* 74 (1):167-171
3. Marin F, Roldan V, Lip GY (2003) Fibrinolytic function and atrial fibrillation. *Thromb Res* 109 (5-6):233-240. doi:S0049384803002597
4. Saraf S, Christopoulos C, Salha IB, Stott DJ, Gorog DA (2010) Impaired endogenous thrombolysis in acute coronary syndrome patients predicts cardiovascular death and nonfatal myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 55 (19):2107-2115. doi:S0735-1097(10)00867-3
5. Peng Y, Yang X, Zhang Y (2005) Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol* 69 (2):126-132. doi:10.1007/s00253-005-0159-7
6. Enzamin Research Institute (2007) Method for producing health nutritive food. Issued by Japan Patent Office, P3902015 (in Japanese)
7. The features of Enzamin (ENM). <http://www.enzamin.com/product04a.html> (in Japanese). Accessed 7 Oct 2010
8. Effect of Enzamin (ENM) treatment in spontaneously hypertensive (SHR) rats. <http://www.enzamin.com/enm09.html> (in Japanese). Accessed 7 Oct 2010
9. Effect of Enzamin (ENM) treatment in experimental diabetic rats (in Japanese). <http://www.enzamin.com/enm07.html> (in Japanese). Accessed 7 Oct 2010.
10. Okada K, Ueshima S, Takaishi T, Yuasa H, Fukao H, Matsuo O (1996) Effects of fibrin and alpha2-antiplasmin on plasminogen activation by staphylokinase. *Am J Hematol* 53(3):151-157. doi:10.1002/(SICI)1096-8652(199611)53:3<151::AID-AJH1>3.0.CO;2-Y
11. Matsuo O, Sakai T, Bando H, Okada K, Nakajima S, Takagi O, Izaki S (1986) Plasminogen activator in bronchoalveolar fluid. *Haemostasis* 16 (1):43-50
12. Ohkura N, Oishi K, Fukushima N, Kasamatsu M, Atsumi GI, Ishida N, Horie S, Matsuda J (2006) Circadian clock molecules CLOCK and CRYs modulate fibrinolytic activity by regulating the PAI-1 gene expression. *J Thromb Haemost* 4 (11):2478-2485. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02210.x
13. Urano T, Sakakibara K, Rydzewski A, Urano S, Takada Y, Takada A (1990) Relationships between euglobulin clot lysis time and the plasma levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1. *Thromb Haemost* 63 (1):82-86
14. Skurk T, Hauner H (2004) Obesity and impaired fibrinolysis: role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 (11):1357-1364. doi:10.1038/sj.ijo.0802778
15. Jansson JH, Johansson B, Boman K, Nilsson TK (1991) Hypo-fibrinolysis in patients with hypertension and elevated cholesterol. *J Intern Med* 229 (4):309-316
16. Poli KA, Tofler GH, Larson MG, Evans JC, Sutherland PA, Lipinska I, Mittleman MA, Muller JE, D'Agostino RB, Wilson PW, Levy D (2000) Association of blood pressure with fibrinolytic potential in the Framingham offspring population. *Circulation* 101 (3):264-269
17. Lisman T, de Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR (2005) Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood* 105 (3):1102-1105. doi:2004-08-3253
18. Okayama T, Nakano M, Odake S, Hagiwara M, Morikawa T, Ueshima S, Okada K, Fukao H, Matsuo O (1994) Synthetic dipeptide, N-stearoyl-D-Ser-L-Pro-OEt, induces release of tissue-type plasminogen activator in cultured cells and in experimental animals. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 42 (9):1854-1858

19. Wall U, Jern S, Tengborn L, Jern C (1998) Evidence of a local mechanism for desmopressin-induced tissue-type plasminogen activator release in human forearm. *Blood* 91 (2):529-537
20. Ueshima S, Matsuno H, Hayashi M, Horibuchi K, Okada K, Fukao H, Uematsu T, Matsuo O (2002) Function of tissue-type plasminogen activator releaser on vascular endothelial cells and thrombolysis in vivo. *Thromb Haemost* 87 (6):1069-1074
21. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995). *N Engl J Med* 333 (24):1581-1587. doi:10.1056/NEJM199512143332401
22. Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D (2009) Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci* 32 (1):48-55. doi:S0166-2236(08)00227-0