

NKCP[®]

NKCP 精制纳豆菌培养物

<<序言>>

精制纳豆菌培养物 < NKCP > 是我们着眼于日本传统发酵食品纳豆的健康增进作用所研发的一款功能性食品素材。通过对纳豆菌培养物进行精制，基本去除了纳豆特有的气味及维生素 K₂，使其成为一种食用方便、且具有高度通用性的功能性食品素材。

NKCP 中含有可发挥功效的纳豆菌所分泌的蛋白质（纳豆菌生成蛋白质）。

动物及人体试验结果均表明，持续摄取 NKCP 可有效维持健康的血液状态。同时，其安全性也已得到验证。

开发背景

在日本人的死亡原因中，因心脏病及脑血管疾患而死亡的比率约占30%，所以预防心脏病与脑血管疾患就显得非常重要，这对实现壮年期死亡减少也不例外。此外，一旦患上此类疾患，即使最终能够免于死亡，也依然可能留下严重的后遗症，从而导致健康寿命缩短、生活质量极度下降。研究表明，此类缺血性心脏病及脑血管疾患多起因于现代日本人生活方式所导致的血栓形成。近年来的研究进一步发现长时间乘坐飞机后发病的、被称为“经济舱综合症”的“旅客血栓症”是由静脉血管产生的血栓堵塞了肺动脉而造成的“肺动脉血栓栓塞症”所致，且该病症除了乘坐飞机以外，还会在长时间驾车等行为后发病。

此外，就日常生活事例而言，肩部酸痛、脚部浮肿等可能也是因血液粘度上升而造成的末梢循环不良所致。因此，若能保持血液凝固与纤溶的平衡、预防血栓形成，将会有助于延长健康寿命。

开发过程

NKCP 是我们着眼于日本传统食品“纳豆”所开发的食品。据报告表明，纳豆中含有可作用于血液纤溶系统，发挥溶解血栓作用的物质，这些物质是纳豆菌 (*B. subtilis natto*) 所产生的、具有蛋白分解效能的蛋白质。在另一方面，在最近的研究中发现，纳豆菌除了产生作用于纤溶系统的物质，还产生抑制血液凝固的物质。这一发现表明，经常食用纳豆就有可能降低血栓形成的风险。但是，由于纳豆具有独特的风味、摄取量也会因个人嗜好而异，且因与凝血相关的维生素 K₂ 的含量高，对血液抗凝剂有拮抗作用，加上市场上出售的纳豆产品中所含的人体有益物质的量也是大相径庭，要长期保持适当的摄取量存在着相当大的难度。

我们扬长避短，在提高纳豆实用性的基础上开发了食品素材、精制纳豆菌培养物 < NKCP >。NKCP 采用含有大豆成分的液体培养基，通过自行开发的方法对纳豆菌进行培养和精制加工，在浓缩有效成分的同时不但彻底去除了纳豆菌，还将纳豆特有的气味及维生素 K₂ 含量去除至可正常摄取的范围。此外，将 NKCP 中作用于抗凝及纤溶系统的成分的含量调配在一定范围内。

NKCP 的特征

- 纳豆菌被去除，已无纳豆菌特有的气味及粘性。
- 几乎完全去除了维生素K₂，因此不会对华法林等药物功效产生影响。
- 纳豆菌分泌的功能性蛋白质含量被调配在一定范围内。
- 功能性蛋白质（蛋白酶活性）在pH6.0~10.0、60°C以下的温度条件下呈稳定状态。
- 具有①抗凝作用、②降低血液粘度作用、③溶解血栓作用这3大功能。
- 其安全性已通过动物及人体试验等得到验证。
- 本精制纳豆菌培养物的制造方法已作为第3532503号专利注册登记。

作用机制

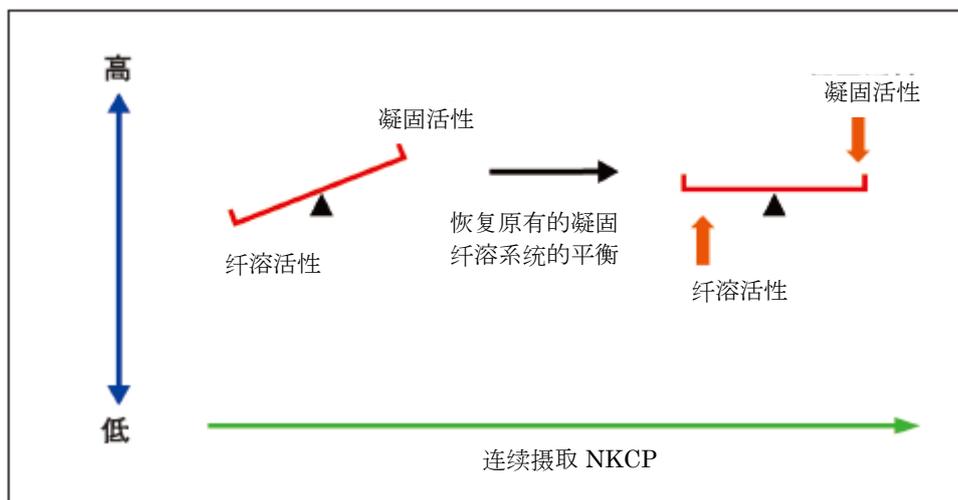
血液凝固、纤溶系统由复杂的生化反应构成，具有即使活化一个因子也不会导致系统失衡的结构。这表示血液凝固、纤溶系统不易发生异常，但反之，若一旦失衡则易于形成血栓，再要将失衡的系统恢复至平衡状态则极其困难。换言之，这意味着一旦形成血栓就非常难以溶解。由此可见，有效预防血栓形成较溶解血栓更为重要。

NKCP具有以下目前已知的作用。

- ① 已确认NKCP在体外及体内均具有抑制血栓形成的作用。
- ② 已确认NKCP在体外及体内均具有降低血液粘度的作用。
- ③ 已确认NKCP在体外具有溶解血栓的作用。

NKCP通过抑制血栓形成及血液粘度上升，将易于凝固的血液维持在正常状态，帮助血液在体内各个部位畅通无阻地循环流通。同时，口服NKCP可为血栓创造一个易于溶解的体内环境。

连续摄取 NKCP 的效果



作为功能性食品的科学依据

(1) 关于 NKCP 所具有的功能

要降低血栓形成的风险，以下几点至关重要。1) 使血液不易凝固、2) 保持正常的血液粘度、3) 溶解已凝固的血液（血栓）。

我们在纳豆菌 (*B. subtilis natto*) 所分泌产生的物质 NKCP 中发现了具有以上 3 大功能的物质。

(2) 功能性相关学术数据

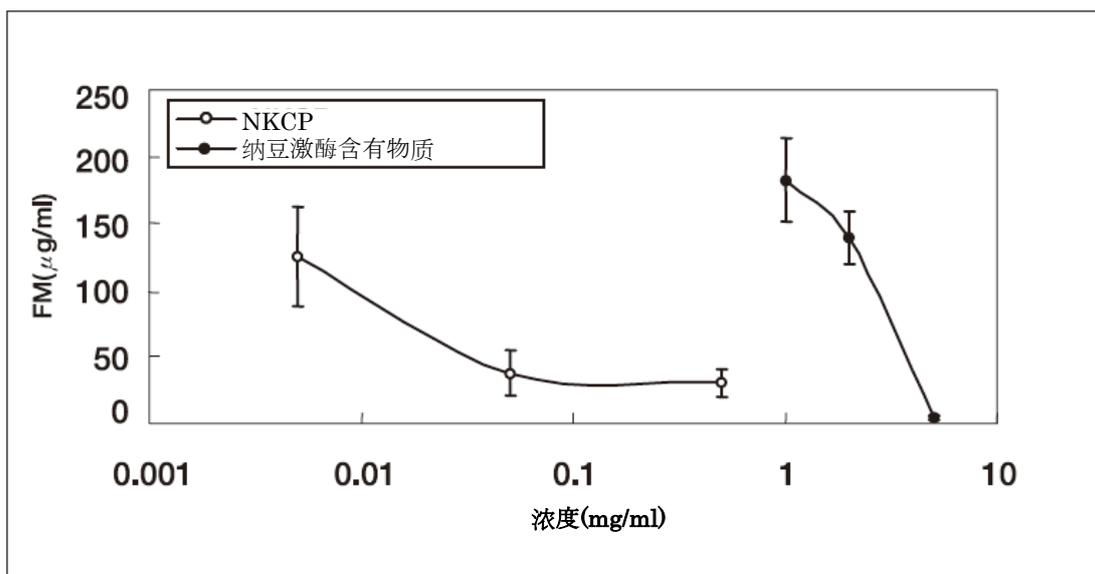
1) 使血液不易凝固的作用

① NKCP 对人体血液的抗凝作用

在从签署了知情同意书的健康志愿者身上抽取的 3ml 静脉血中添加 30 μ L 的对象物质并翻转混合，然后在 37 $^{\circ}$ C 的温度条件下加热 250 秒钟，使用乳胶免疫测定装置，对其离心上清中表示血栓形成程度的纤维蛋白单体 (FM) 进行了测定。

结果表明，添加用于对照的生理盐水时的 FM 值为 160 \pm 29.3 μ g/mL，添加肝素钠 (0.5IU/mL) 时的 FM 值为 6.0 \pm 1.1 μ g/mL。NKCP 自最终浓度 0.005mg/mL 起出现剂量依赖性 FM 减少的现象，FM 值在浓度为 0.05mg/mL 时显示较低数值，之后未发现 FM 随 NKCP 的浓度增加而减少的倾向。

NKCP 与纳豆激酶含有物质的抗凝作用



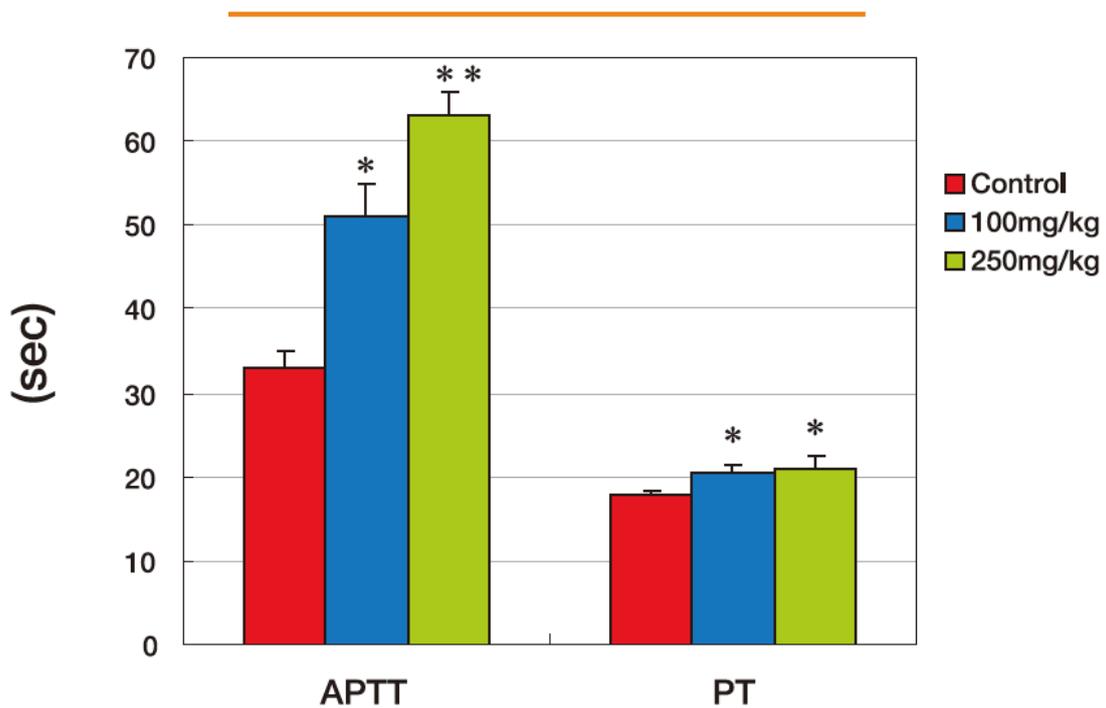
②NKCP 对大鼠血栓形成模型的抗凝作用

我们通过血栓形成模型对 NKCP 的抗凝作用进行了研讨。

通过损伤大鼠腹部降主动脉血管内皮细胞引发血小板凝集，由此诱发血栓形成。采用 *in situ loop* 法制成血栓模型 2 小时后，将 NKCP 注入十二指肠内，在注入 6 小时后抽取腹主动脉血液，然后分别测定活化部分凝血活酶时间 (APTT) 及凝血酶原时间 (PT) 以作为内因性和外因性凝血功能的指标。

测定结果是，注入生理盐水的 Control 组的 APTT 为 33.5 ± 2.4 秒，而 NKCP100mg/kg 组为 52.0 ± 4.5 秒、250mg/kg 组为 63.3 ± 2.9 秒，结果表明，NKCP 的注入显著地延迟了凝血时间。PT 的测定结果是，Control 组为 16.7 ± 0.5 秒、NKCP100mg/kg 组为 20.6 ± 0.9 秒、250mg/kg 组为 21.3 ± 1.7 秒，与 APTT 相似，通过 PT 的结果也同样观察到了凝血时间的显著延迟。由此可见，NKCP 具有抑制血栓形成的作用。

NKCP 对大鼠血栓形成的抑制效果



*p < 0.05、**p < 0.01

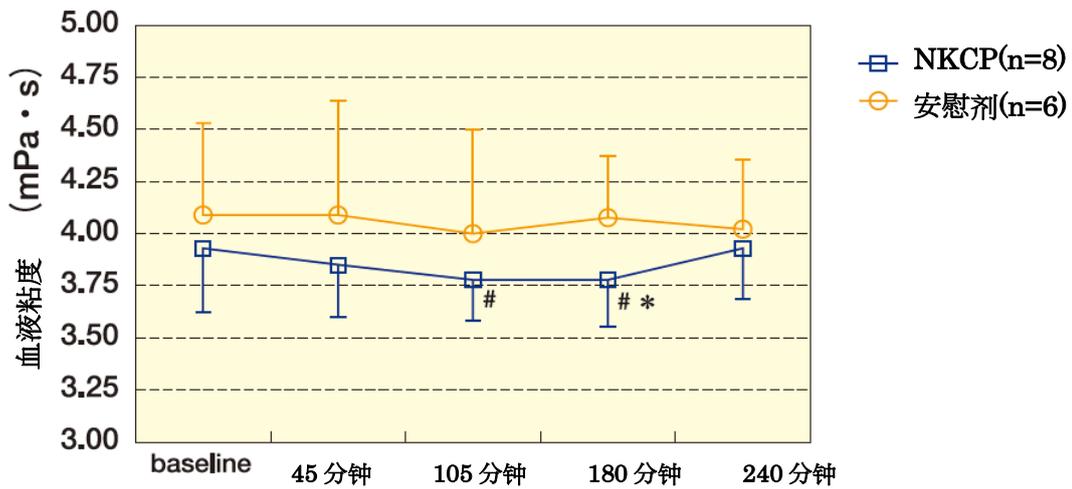
2) 防止血液粘度上升的作用

关于NKCP对人体血液粘度相关作用的研讨

我们将已签署知情同意书的8名健康成人男子作为试验对象，让其单次服用1250mg的安慰剂及NKCP，然后在摄取后的240分钟内按时间推移进行采血，由此测定血液粘度的变化。血液粘度是采用一杉等人的方式，通过振动式粘度计进行测定的。

结果表明，NKCP组在摄取105及180分钟后的血液粘度较摄取前均呈现出显著下降的变化。此外，与安慰剂组相比，NKCP组的血液粘度在摄取180分钟后也呈现出显著下降的变化。

摄取 NKCP 时血液粘度的时间推移变化



: 采用邓肯多重比较法得出的与基准线间的差异， $p < 0.05$

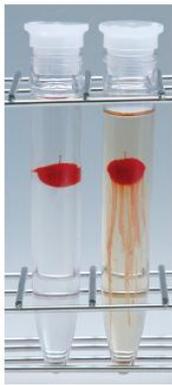
* : 采用配对 t 检验得出的 NKCP 与安慰剂间的差异， $p < 0.05$

3) 溶解血栓的作用

①NKCP 对人工血栓的溶解作用

在含有人工血栓的生理盐水中加入少量NKCP，几分钟后血栓即开始溶解，3小时后血栓几乎完全被溶解。

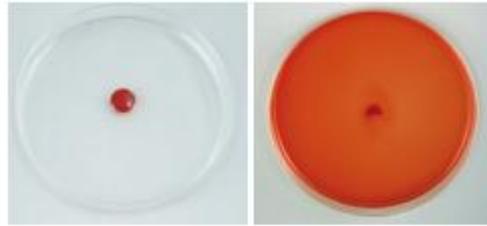
(各枚照片的左侧为作为对照的生理盐水，右侧为加入了NKCP的生理盐水)



10分钟后



1小时后



3小时后

(取出至培养皿中的状态)

J.Pharmacol Sci 99, 247-251(2005)

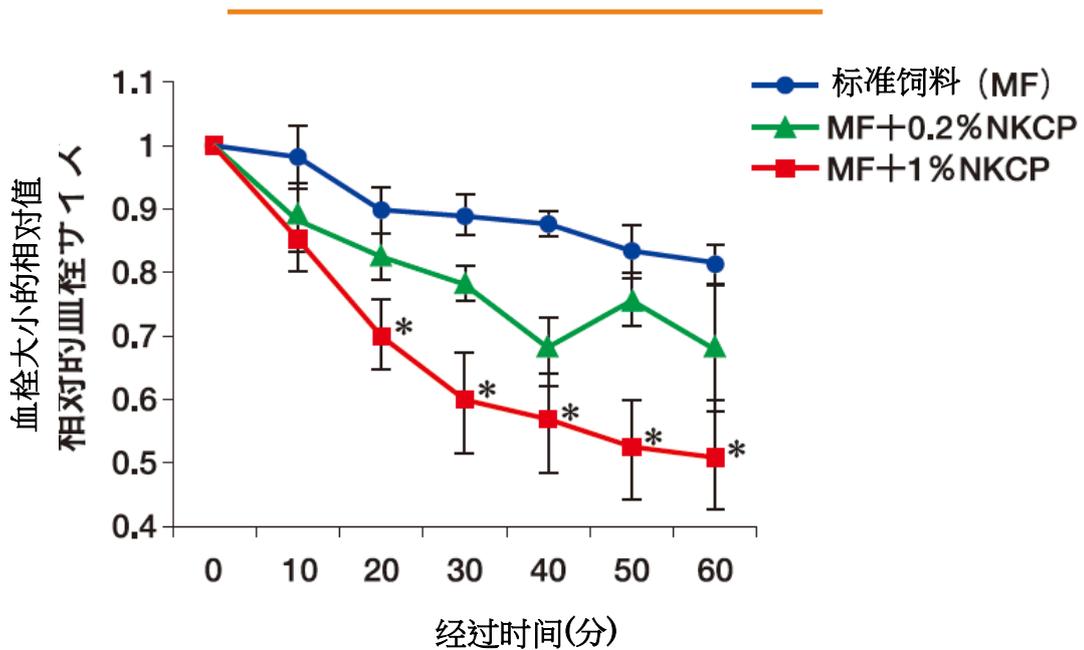
②口服NKCP 对体内血栓溶解模型的作用

在食饵中分别加入0.2%及1%的NKCP，然后使用激光照射大鼠肠系膜微血管使其形成人工血栓以建立实验性动脉血栓模型，用此模型研究摄取14周后的血栓溶解作用。从形成人工血栓起，随着时间的推移测定血栓的大小，对血栓溶解作用进行了评估。

结果表明，与非投与组相比，NKCP经口投与组对内在性血栓溶解活性具有显著的剂量依赖性促进作用。该作用相当于0.2mg/kg的组织型纤溶酶原激活剂（t-PA）的功效。

根据用于试验的大鼠体重及摄取量，摄取含有0.2%及1%NKCP的饲料分别被推算为相当于约160mg/kg/天及800mg/kg/天的剂量。

NKCP 的血栓溶解作用



*p<0.05

Pathophysiol Haemost Tromb 2003;33 : 138-143

③血栓溶解相关的源自纳豆菌的蛋白酶

我们认为，NKCP对血栓的溶解作用主要源自纳豆菌所产生的蛋白质（Bacillopeptidase F）。Bacillopeptidase F由与纳豆菌同属一个种的枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）产生，并已被确定为分泌于菌体外的5种蛋白酶之一（表1）。

表 1 *Bacillus subtilis* 向细胞外分泌的酶

种类	基因	性质
Bacillopeptidase F	<i>bpr</i>	分子量：在47kDa ¹ 、48kDa ² （SDS-PAGE）92kDa时被分泌，并逐渐被转换为80kDa或48kDa ² 。同时具有蛋白分解活性及较高的酯水解活性 ³ 。
Subtilisin(alkaline) protease	<i>apr</i>	分子量：20kDa ⁴ 、28kDa ⁵ （SDS-PAGE）具有与纳豆激酶极其相似的结构。
Neutral protease	<i>npr</i>	与apr相同的主要蛋白酶
Extracellular protease	<i>epr</i>	分子量：40-34kDa ⁶ （SDS-PAGE）
Metallo protease	<i>mpr</i>	分子量：28kDa ¹ （SDS-PAGE）表现活性时需要金属原子

1) Journal of Bacteriology, Vol. 172, pp. 1019-1023, 1990.

2) The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, pp. 6845-6850, 1990.

3) Journal of Bacteriology, Vol. 172, pp. 1470-1477, 1990.

4) Experientia, Vol. 43, 1110-1111, 1987.

5) The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, pp. 24690-24696, 2001.

6) Mol Gen Genet 1990 May; 221(3) : 486-90

(3) 临床试验实绩

①关于纳豆菌由来蛋白质对人体血液凝固纤溶系统的影响

我们请23名包括存在血栓症危险的代谢性疾病患者在内的普通成人连续2个月摄取NKCP250mg，然后分别对第1个月及第2个月的凝血、纤溶系统参数进行了测定，同时也对试验对象的自觉症状进行了调查。

结果表明，ELT在第1个月及第2个月较摄取前显著减少，同时，t-PA在摄取2个月后的测定时显著上升，虽然纤溶系统出现了亢进，但ELT及t-PA的测定值均在正常范围内。此外，尽管FDP在开始摄取的1个月后出现了显著减少，但在2个月后的测定时又回到了摄取前的相同数值。

在自觉症状方面，与摄取前相比，肩部酸痛症状在第1个月及第2个月均得到显著改善。

摄取 NKCP 后的纤溶·凝固参数的变化 (23 名)

参数	正常值	摄取前	1 个月后	2 个月后
ELT	6-12hrs	9.0±1.3	8.1±1.5**	8.0±1.5**
t-PA	≤10ng/mL	5.4±2.6	5.8±2.8	6.4±2.2*
FDP	≤4ug/mL	3.0±0.7	2.0±0.6*	3.0±0.7

数据表示的是平均值±标准偏差

采用邓肯多重比较法对显著性差异进行检验：*p<0.05，**p<0.01

摄取 NKCP 后的自觉症状的变化

症状	状态	摄取前	1 个月后	2 个月后
肩部酸痛	重度	5	1	1
	中度	10	9	10
	无症状(包括轻度)	8	9	11
	显著改善	-	4	1
	Shirley-Williams multiple test	-	P<0.05	<0.05

数值表示的是患者数。采用多重比较法对显著性差异进行检验

品质信息

关于安全性

1. 单次服用毒性(大鼠)	LD ₅₀ >5,000mg/kg
2. 反复服用毒性(大鼠) 90 天	NOAEL 雄>1,325mg/kg 体重/天 雌>1,541mg/kg 体重/天
3. 致突变性	阴性(±代谢活化)
4. 抗原性(豚鼠)	全身主动过敏反应(ASA)以及 被动皮肤过敏反应(PCA)呈阴性
5. 对止血时间的影响(大鼠)	让大鼠口服 NKCP ,然后在 1 小时后切开尾端 0.5mm ,并对此时的止血时间进行了测定。结果表明, 300mg/kg 的 NKCP 剂量并未延长止血时间。
6. 与华法林间的相互作用 (大鼠)	采用 <i>in situ loop</i> 法, 将 250mg/kg 的 NKCP 注入已通过投与华法林延迟其血液凝固的大鼠的十二指肠内, 然后在 6 小时后采血并对凝血功能进行了测定。结果表明, 虽然投与华法林使凝固时间较对照组有显著延长, 但是华法林和 NKCP 联用组的凝固时间并未长于华法林组。
7. 人体长期摄取	请 23 名健康成人连续 12 周、每天摄取 250mg 的 NKCP , 其结果并未发现临床上的有害现象。 在血液学检查值以及血液生化检查值中也未发现统计学上的显著变化。
	请 5 名健康成人连续 6 周、每天摄取 750mg 的 NKCP , 然后对其临床检查值(血液学检查、血液生化检查、血液凝固/纤溶参数)的变化、有害现象等进行了调查和观察。 结果表明, 虽然出现了 ELT 缩短、t-PA 减少、TAT 增加等情况, 但是所有的变化均属于正常范围内。此外, 从未观察到有害现象这一结果可见, NKCP 具有高度的安全性。
8. 人体过度摄取	请 8 名健康成人连续 7 周、每天摄取 1,250mg 的 NKCP , 然后观察其临床症状并实施临床检查, 对其安全性进行了分析和研究。其结果并未发现临床上的有害现象。在血液学检查值以及血液生化检查值中也未发现异常变动。

推荐摄入量

125 ~ 500mg/天

定量法

① 肽酶活性测定法 (合成基质法)

将发色合成基质S-2251(H-D-缬氨酰-L-亮氨酰-L-赖氨酰-对-硝基苯胺二盐酸盐)作为基质 ,在37°C的温度条件下反应后 ,测定405nm的吸光度。将1分钟游离出对硝基苯胺1nmol时的酵素活性定义为1unit。

② 纳豆菌生成蛋白质测定法 (ELISA 法)

采用 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法对具有肽酶活性的纳豆菌生成蛋白质进行定量测定。此法使用兔抗纳豆菌生成蛋白质特异性抗体来测定与该特异性抗体发生反应的抗原量。

用于测定纳豆菌生成蛋白质的ELISA试剂盒

