

NKCP[®]

NKCP 정제낫토균 배양물

《머릿말》

정제낫토균 배양물 <NKCP> 은 일본의 전통적인 발효식품인 낫토의 건강증진 작용에 착안하여 태어난 가공식품 소재입니다. 낫토균 배양물을 정제하여 낫토 특유의 냄새와 비타민 K₂ 를 대부분 제거함으로써 먹기 쉽고 범용성이 높은 기능성 식품소재로 가공했습니다.

NKCP 에는 기능이 발휘되는 낫토균이 분비하는 단백질 (낫토균생성 단백질) 이 함유되어 있습니다.

동물 및 사람을 대상으로 한 시험 결과 NKCP 의 지속적인 섭취로 건강한 혈액상태가 유지되는 것을 알았습니다. 그리고 안전성도 확인되었습니다.

개발 배경

2000 년도부터 21 세기의 국민건강증진운동 (건강일본 21) 이 시작되었습니다. 본운동의 목적은 장년기 사망의 감소, 건강수명의 연장 및 생활의 질 향상입니다. 쉬운 말로 표현하면 「건강하게 장수한다」라고 하는 것입니다. 일본인의 사망원인 중 심장질환과 뇌혈관질환이 약 30%를 차지하고 있어 장년기 사망의 감소라고 하는 목적을 달성하는데 있어서도 심장질환과 뇌혈관질환을 예방하는 것은 대단히 중요합니다. 그리고 이들 질환에 걸려 다행히 사망을 피했다고 해도 때로는 심각한 후유증이 남기 때문에 건강수명은 단축되고 생활의 질은 극도로 저하됩니다.

이러한 허혈성 심장질환과 뇌혈관질환은 현대 일본인의 생활 스타일에서 기인하는 혈전형성이 큰 비율을 차지하는 것에서도 밝혀졌습니다. 또한 최근 장시간 항공기에 의한 이동 후에 발증하는 이른바 「이코노미 클래스 증후군」이라고 하는 「여행자 혈전증」의 원인은 정맥에 생긴 혈전이 폐동맥에 쌓이는 「폐동맥 혈전 색전증」이라는 것이 밝혀졌으며 항공기로 이동한 후 뿐만 아니라 장시간의 자동차 운전후 등에도 발증하는 것을 알았습니다.

그리고 가까운 예로는 어깨결림이나 발의 부종 등도 혈액의 점도 상승에 의한 말초 순환부전이 원인의 하나라고 생각되고 있습니다. 따라서 혈액의 응고·선용의 균형을 안정시키고 혈전 형성을 예방할 수 있으면 건강수명의 연장에 기여할 수 있다고 생각됩니다.

개발 경위

NKCP 는 일본의 전통적인 식품인 낫토에 착안하여 개발된 식품입니다. 낫토에는 혈액 선용계에 작용하여 혈전을 용해하는 물질이 존재하는 것이 알려져 있으며 그것은 낫토균 (*B. subtilis natto*) 이 생성하는 단백분해능을 가지는 단백질이라는 것이 보고되어 있습니다. 그러나 최근의 연구에서는 낫토균은 선용계에 작용하는 물질 이외에 혈액의 응고를 억제하는 물질도 만들고 있다는 것을 알았습니다. 이것은 낫토를 상식함으로써 혈전형성의 리스크를 경감시킬 수 있는 가능성을 시사하는 것입니다. 그러나 낫토에는 독특한 풍미가 있는 점을 비롯하여 섭취량이 개인의 기호에 좌우되는 점, 그리고 혈액의 응고에 관여하는 비타민 K₂ 의 함유량이 높아 혈액응고억제제에 대해 길항적으로 작용하는 점 및 시판 낫토제품에서는 몸에 좋다고 여겨지는 물질의 함유량에 상당한 편중이 있어 항상적으로 적절한 양을 섭취하는 것은 어렵다고 생각합니다.

그래서 낫토의 단점을 제거하여 실용성을 높인 식품소재로서 낫토균 배양물<NKCP> 개발을 실시했습니다. NKCP 는 대두성분을 포함하는 액체배지를 이용하여 독자적인 방법으로 낫토균을 배양하여 정제를 함으로써 유용성분을 농축함과 동시에 낫토균을 완전히 제거하여 낫토 냄새 및 비타민 K₂ 량에 대해서도 통상의 섭취로 문제가 없는 정도까지 제거했습니다. 또한 NKCP 에는 항응고 및 선용계에 작용하는 물질이 항상 일정량 함유되도록 조제되어 있습니다.

NKCP 의 특징

- 낫토균이 제거되어 낫토균 특유의 냄새와 점성이 없습니다.
- 비타민 K₂ 를 대부분 제거했기 때문에 와파린 등의 약제에 대한 영향이 없습니다.
- 낫토균이 분비하는 기능성 단백질이 일정량 함유되도록 조제되었습니다.
- 기능성 단백질 (프로테아제 활성) 은 pH 6.0~10.0 에서 안정하며 60℃ 이하의 열에 안정합니다.
- ①항응고작용, ②혈액점도 저하작용, ③혈전용해 작용의 3 가지 기능을 가지고 있습니다.
- 동물시험 및 사람시험 등에 의해 안전성이 확인되었습니다.
- 본 정제낫토균 배양물 제조법은 특허 제 3532503 호로 등록되어 있습니다.

작용기전에 대하여

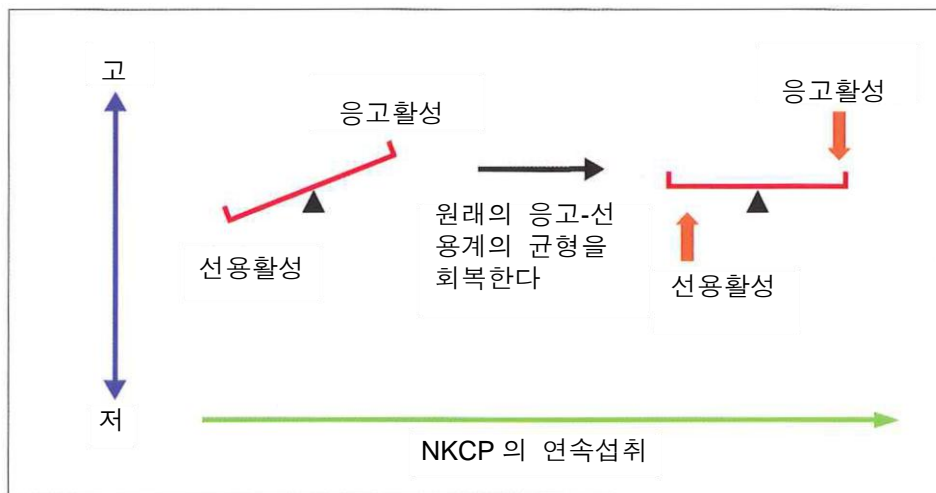
응고·선용계는 복잡한 반응으로 구성되어 있어 하나의 인자를 활성화해도 응고·선용계의 균형이 깨지지 않는 구조가 갖추어져 있습니다. 이것은 혈액의 응고·선용계는 이상을 일으키기 어렵다는 것을 나타내고 있지만 그 반면에 일단 균형이 깨져서 혈전이 생기기 쉬워지면 깨진 균형을 원래로 되돌리기가 매우 어렵습니다. 즉 한번 생긴 혈전은 대단히 녹기 어렵다는 것을 나타내고 있습니다. 따라서 혈전을 녹이는 것 보다도 혈전을 만들지 않는 것이 중요하게 됩니다.

NKCP 는 다음의 작용이 있다는 것을 알았습니다.

- ① NKCP 는 *in vitro* 및 *in vivo* 에 있어서 혈전형성을 억제하는 작용을 가지는 것이 확인되었습니다.
- ② NKCP 는 *in vitro* 및 *in vivo* 에 있어서 혈액의 점도를 저하시키는 작용이 인정되었습니다.
- ③ NKCP 는 *in vitro* 에 있어서 혈전용해 작용을 가지는 것이 밝혀졌습니다.

NKCP 는 혈전형성을 억제하여 혈액점도 상승을 억제함으로써 굳어지기 쉬워진 혈액을 정상 상태로 유지하고 혈액이 몸 구석구석까지 흐르도록 도와줍니다. 그리고 NKCP 는 경구섭취에 의해 혈전이 녹기 쉬운 환경을 만듭니다.

NKCP 의 지속섭취에 의한 효과



기능성 식품으로서의 과학적 근거

(1) NKCP 가 가지는 기능에 대하여

혈전형성의 리스크 경감에는 1) 혈액을 잘 굳어지지 않게 하는 것, 2) 혈액의 점도를 정상으로 유지하는 것, 3) 굳어진 혈액 (혈전) 을 녹이는 것이 중요하게 됩니다.

낫토균 (*B. subtilis natto*) 이 분비 생성하는 물질인 NKCP 에는 이들 3 가지 기능을 발현하는 물질이 함유되어 있습니다.

(2) 기능성에 관한 학술 데이터

1) 혈액을 잘 굳어지지 않게 하는 작용

① 사람 혈액을 사용한 NKCP 의 항응고작용

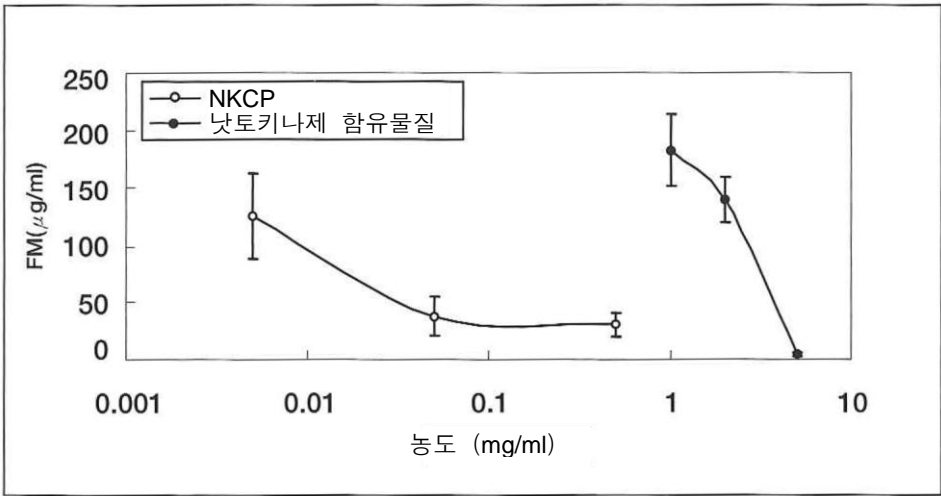
제 54 회 리올로지 검토회 2006

도쿄의과대학 법의학고실

동의를 얻은 건강한 자원봉사자에게서 채혈한 정맥혈 3mL 에 대상물질 30 μ L 를 첨가하여 전도 혼화후 37 $^{\circ}$ C에서 250 초간 가온하여 그 원심상청에 대해 라텍스 면역측정장치로 혈전형성 정도를 나타내는 피브리린 모노머 (FM) 를 측정했습니다.

그 결과 대조로 한 생리식염수 첨가시의 FM 치는 160 \pm 29.3 μ g/mL, 헤파린 나트륨 첨가 (0.5IU/mL) 에서는 6.0 \pm 1.1 μ g/mL 이었습니다. NKCP 는 최종농도 0.005mg/mL 에서부터 용량의존적인 FM 의 감소를 보였으며 0.05mg/mL 에서 FM 치는 낮은 값을 나타내었고 그 후 NKCP 의 농도 증가에 따른 FM 의 감소는 보이지 않았습니다.

NKCP 와 낫토키나제 함유물질의 항응고작용



② 래트 혈전형성 모델을 사용한 NKCP의 항응고작용

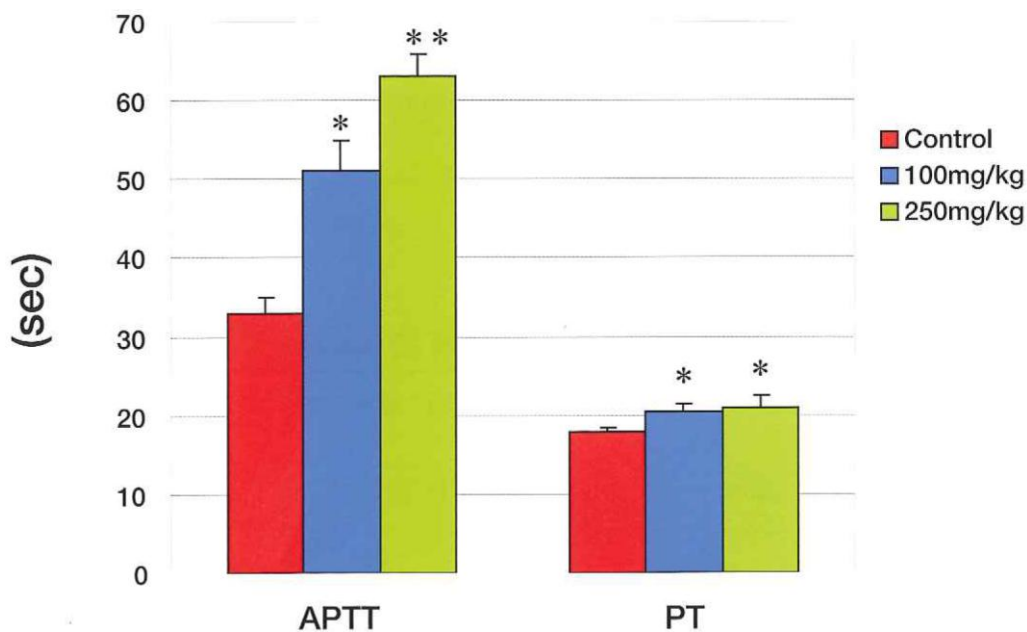
다이나약품주식회사 연구개발부

NKCP의 항응고작용에 대하여 혈전형성 모델을 사용하여 검토했습니다.

래트의 복부하행 대동맥의 혈관내피세포를 손상시켜 혈소판응집을 야기시킴으로써 혈전형성을 유발했습니다. NKCP는 *in situ* loop 법을 사용하여 혈전모델 작성 2시간후에 십이지장내에 투여하고 투여 6시간후에 복부대동맥에서 채혈하여 내인성 및 외인성 혈액응고능 지표로서 각각 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 (APTT) 및 프로트롬빈 시간 (PT) 을 측정했습니다.

그 결과 생리식염수를 투여한 Control 군의 APTT 가 33.5 ± 2.4 초였는데 비해 NKCP 100mg/kg 군에서는 52.0 ± 4.5 초, 250mg/kg 군에서 63.3 ± 2.9 초로 NKCP의 투여에 의해 유의한 응고지연이 관찰되었습니다. PT에 대해서도 Control 군이 16.7 ± 0.5 초, NKCP 100mg/kg 군이 20.6 ± 0.9 초, 250mg/kg 군이 21.3 ± 1.7 초로 APTT와 마찬가지로 유의한 응고지연이 관찰되었습니다. 따라서 NKCP는 혈전형성을 억제하는 작용을 가지는 것이 시사되었습니다.

NKCP 투여에 의한 래트의 혈전형성 억제효과



*p < 0.05, **p < 0.01

2) 혈액의 점도 상승을 방지하는 작용

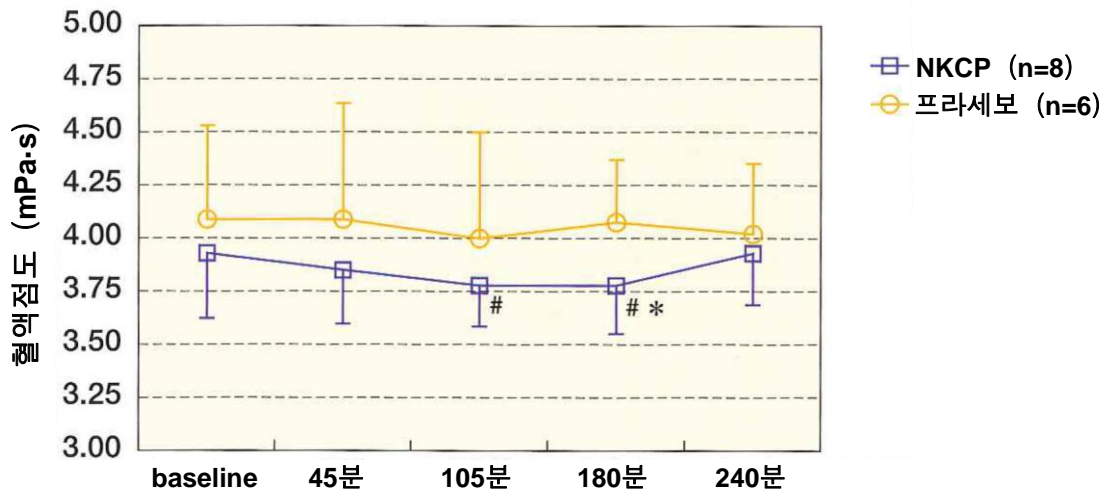
사람 혈액을 사용한 NKCP의 혈액점도에 대한 작용의 검토

도쿄의과대학 법의학교실

동의를 얻은 건강한 성인남성 8명의 피시험자에게 프라세보 및 NKCP 1250mg을 단회섭취시키고 섭취후 240분까지 경시적으로 채혈하여 혈액점도 변화를 측정했습니다. 그리고 혈액점도는 一杉 등의 방법으로 오실로 점도계를 사용하여 측정했습니다.

그 결과 NKCP군은 섭취 105 및 180분후에 섭취전에 비해 유의한 혈액점도 저하가 인정되었습니다. 그리고 프라세보군과의 비교에 있어서도 NKCP군은 섭취 180분후에 유의한 혈액점도 저하가 인정되었습니다.

NKCP 섭취시 혈액점도의 경시적 변화



: 던컨의 다중비교법에 의한 베이스 라인과의 차, p<0.05
* : 대응이 있는 t검정에 의한 NKCP와 프라세보의 차, p<0.05

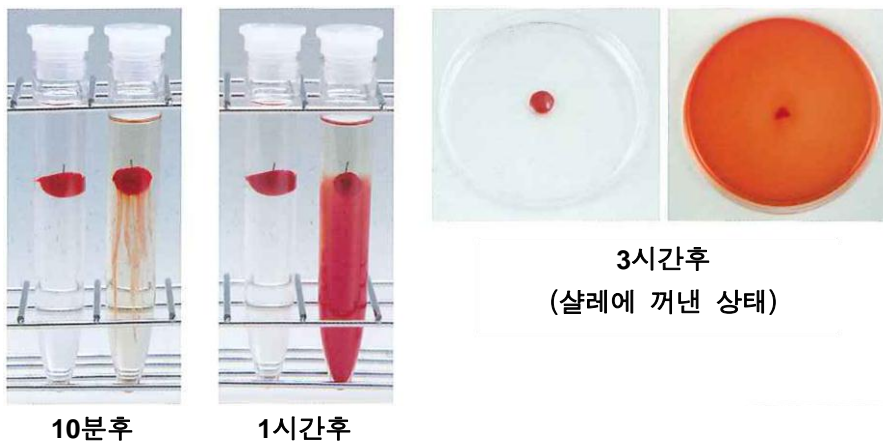
3) 혈전을 녹이는 작용

① NKCP의 인공혈전 용해작용

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

생리식염수중의 인공혈전에 NKCP를 소량 첨가하였던 바, 수분후에서 혈전이 용해되기 시작하여 3시간후에는 혈전이 대부분 용해되었습니다.

(각 사진 왼쪽이 컨트롤로서 생리식염수만, 오른쪽이 생리식염수에 NKCP를 첨가한 것)



② 경구투여에 있어서 NKCP 의 인비보실험적 혈전용해 모델에 있어서의 작용

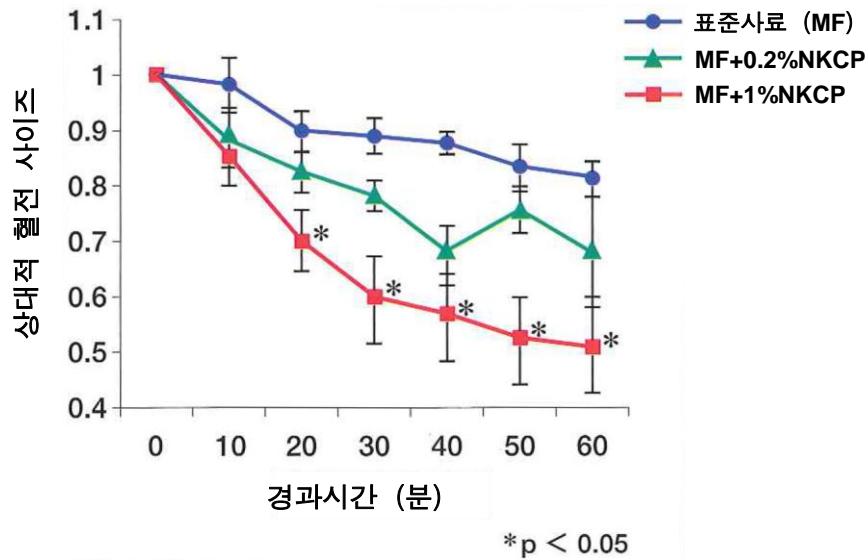
Pathophysiol Haemost Tromb 2003;33 : 138-143

먹이에 0.2% 및 1% NKCP 를 첨가하여 14 주간 섭취시킨 후의 혈전용해작용을 래트 장간막 미소혈관에 레이저광을 조사하여 인공혈전을 작성하는 실험적 동맥혈전 모델로 검토했습니다. 인공혈전 작성시부터 경시적으로 혈전의 크기를 측정하여 혈전용해작용의 평가를 실시했습니다.

NKCP 경구투여군은 비투여군과 비교하여 분명히 내재성 혈전용해 활성을 용량의존적으로 촉진했습니다. 그 작용은 조직 프라스미노겐 액티베이터 (t-PA) 0.2mg/kg 에 상당했습니다.

시험에 사용한 래트의 체중 및 섭취량으로부터 0.2% 및 1%의 NKCP 를 함유하는 먹이의 섭취는 각각 약 160mg/kg/일 및 800mg/kg/일의 용량에 상당하는 것으로 추정되었습니다.

NKCP 의 혈전용해작용



혈전용해에 관여하는 낫토균 유래 프로테아제에 대하여

NKCP 의 혈전을 녹이는 작용은 낫토균이 생성하는 단백질 (Bacillopeptidase F) 에 의한 것이라고 생각됩니다. Bacillopeptidase F 는 낫토균과 동일한 종에 속하는 고초균 (*Bacillus subtilis*) 이 생성하여 균체밖으로 분비하는 5 종류의 프로테아제 중의 하나라는 것이 밝혀졌습니다 (표 1) .

표 1 *Bacillus subtilis* 가 세포밖으로 분비하는 효소

| 종류 | 유전자 | 성질 |
|--------------------------------|------------|---|
| Bacillopeptidase F | <i>bpr</i> | 분자량 : 47kDa ¹⁾ , 48kDa ²⁾ (SDS-PAGE) 92kDa 로 분비되어 80kDa 와 48kDa 로 변환되어 간다 ²⁾ . 단백분해 활성과 동시에 높은 에스테르가수분해 활성을 가진다 ³⁾ . |
| Subtilisin (alkaline) protease | <i>apr</i> | 분자량 : 20kDa ⁴⁾ , 28kDa ⁵⁾ (SDS-PAGE) 낫토키나제와 유사한 구조를 가지며 카제인분해 활성과 직접적인 피브린용해 활성이 확인되었으며 세탁세제 등의 단백질 분해효소로도 사용된다. Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) 의 분해불활화 활성도 보고되고 있다 ⁵⁾ . |
| Neutral protease | <i>npr</i> | <i>apr</i> 와 마찬가지로 주요한 프로테아제 |
| Extracellular protease | <i>epr</i> | 분자량 : 40-34kDa ⁶⁾ (SDS-PAGE) |
| Metallo protease | <i>mpr</i> | 분자량 : 28kDa ¹⁾ (SDS-PAGE) 활성 발현에 금속원자가 필요 |

- 1) Journal of Bacteriology, Vo1.172, 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) 임상시험 성적

낫토균 유래 단백질의 사람 혈액 응고 선용계에 미치는 영향에 대하여

일본 바이올로지 학회지 18 권 (1) 2004

혈전증 리스크가 있는 대사성 질환을 가지는 환자를 포함한 일반성인 23 명에게 NKCP 250mg 을 2 개월간 연속섭취하게 하고 섭취후 1 개월째 및 2 개월째의 응고·선용계 파라미터 측정 및 피시험자의 자각증상을 조사했습니다.

그 결과 ELT 는 1 개월째와 2 개월째에 섭취전과 비교하여 유의하게 감소하였으며 또한 t-PA 는 섭취 2 개월후 측정시에 유의하게 상승하여 선용계의 향진이 인정되었으나 ELT 및 t-PA 측정치는 모두 정상범위내였습니다. 그리고 섭취개시 1 개월후에 FDP 의 유의한 감소가 보였으나 2 개월후 측정시에는 섭취전과 동일한 측정치였습니다.

자각증상에서는 어깨결림이 섭취전과 비교하여 1 개월째와 2 개월째에 유의하게 개선되었습니다.

NKCP 섭취에 의한 선용·응고 파라미터의 변화 (23 명)

| 파라미터 | 정상치 | 섭취전 | 1 개월후 | 2 개월후 |
|------|----------|---------|-----------|-----------|
| 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 | ≤4μg/mL | 3.0±0.7 | 2.0±0.6* | 3.0±0.7 |

데이터는 평균치±표준편차를 나타낸다

던컨의 다중비교법에 의한 유의차 검정 : *p<0.05, **p<0.01

NKCP 섭취에 의한 자각증상의 변화

| 증상 | 상태 | 섭취전 | 1 개월후 | 2 개월후 |
|------|--------------------------------|-----|--------|--------|
| 어깨결림 | 중도 | 5 | 1 | 1 |
| | 중등도 | 10 | 9 | 10 |
| | 증상 없음 (경도 포함) | 8 | 9 | 11 |
| | 현저히 개선 | — | 4 | 1 |
| | Shirley-Williams multiple test | — | P<0.05 | P<0.05 |

수치는 환자수를 나타낸다. 다중비교법에 의한 유의차 검정

안전성에 대하여

| | |
|-------------------------|--|
| ① 단회투여 독성 (랫트) | LD ₅₀ >5,000mg/kg |
| ② 반복투여 독성 (랫트) 90 일간 | NOAEL 수컷>1,325mg/kg 체중/일 암컷>1,541mg/kg 체중/일 |
| ③ 변이원성 | 음성 (±대사활성화) |
| ④ 항원성 (모르모트) | 능동적 전신성 아나필락시 반응 (ASA) 및 수동적 피부 아나필락시 반응 (PCA) 에 대해 음성 |
| ⑤ 지혈시간에 대한 영향 (랫트) | 랫트에 NKCP 를 경구투여하고 그 1 시간후에 꼬리 끝 0.5 mm 를 절개했을 때의 지혈시간을 측정했다. 그 결과 300mg/kg 의 NKCP 투여에 의한 지혈시간의 연장은 인정되지 않았다. |
| ⑥ 와파린과의 상호작용 (랫트) | 와파린을 투여한 혈액응고 지연 랫트에 <i>in situ</i> loop 법에 의해 십이지장내에 250mg/kg 을 투여하고 6 시간후에 채혈하여 응고능 측정을 실시했다. 그 결과 와파린의 투여에 의해 응고시간은 대조군에 비해 유의하게 연장되었지만 와파린과 NKCP 투여군에서는 와파린 투여군과 비교하여 더 한층의 응고연장은 보이지 않았다. |
| ⑦ 사람 장기섭취 | 건강한 성인 23 명에게 NKCP 를 1 일 250mg, 12 주간 섭취시켰지만 임상상 문제가 되는 유해현상은 보이지 않았다. 혈액학적 검사치 및 혈액생화학 검사치에 대해서도 통계학적으로 유의한 변동은 보이지 않았다. |
| | 건강한 성인 5 명에게 NKCP 를 1 일 750mg, 6 주간 계속섭취시켜 임상검사치 (혈액학적 검사, 혈액생화학 검사, 혈액응고·선용 파라미터) 의 변동, 유해현상 등을 조사·관찰했다. 그 결과 ELT 의 단축, t-PA 의 감소, TAT 의 증가가 보였지만 변동은 모두 정상범위내였다. 그리고 유해현상도 관찰되지 않았다는 점에서 NKCP 의 안전성은 높은 것으로 생각되었다. |
| ⑧ 사람 과잉섭취 | 건강한 성인 8 명에게 NKCP 를 1 일 1250mg, 7 일간 계속섭취시켜 임상증상 및 임상검사를 실시하여 안전성에 대해 검토했다. 그 결과 임상상 문제가 되는 유해현상은 보이지 않았다. 그리고 혈액학적 검사치 및 혈액생화학 검사치에 있어서도 이상변동은 보이지 않았다. |
| 섭취량 기준 | 125~500mg |

정량법

① 펩티다아제 활성 측정법 (합성기질법)

발색합성기질 S-2251 (H-D-바릴-L-로이실-L-리달-p-니트로아닐리드·2 염산염) 을 기질로 사용하여 37℃에서 가온하고 405nm 에 있어서의 흡광도를 측정합니다. 1 분간에 1nmol 의 p-니트로아닐린이 유리할 때의 효소활성을 1unit 으로 합니다.

② 낫토균생성 단백질 측정법 (ELISA 법)

펩티다아제 활성을 가지는 낫토균생성 단백질에 대한 토끼 특이항체를 사용한 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 법에 의해 특이항체에 반응하는 항원량으로서 측정합니다.

낫토 균 생산 단백질 측정 용 ELISA 키트

