

きのこ線溶酵素のマウスへの経口投与

後藤いずみ, 堀江 登, 岡村 徳光, 清原 利文, 大杉 匡弘
(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

Oral administration of a mushroom's fibrinolytic enzyme to mice

Izumi Goto, Noboru Horie, Tokumitsu Okamura,
Toshibumi Kiyohara and Masahiro Osugi

Department of Food Science and Nutrition
School of Human Environmental Science,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan

Mycelial cultivation of Basidiomycetes of commercial products (11 strains) and Isolants (43 strains) from nature was carried out. Of Basidiomycetes tested, *Tricholoma* sp. W510, which was isolated from nature, showed a strong fibrinolytic activity in culture broth. The culture broth of this organism was orally administered to mice. Fibrinolytic activities of thrombin time (TT), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and diluted blood clot lysis (DBCL) in the blood were determined. No change of PT and APTT was observed. Both TT and DBCL were decreased.

緒言

血栓溶解剤としてわが国で開発されたウロキナーゼは、ヒト尿中から分離し、製剤化されているものである。臨床的には静脈注射によっているが、ウロキナーゼ活性の血中での持続時間はあまり永くない上に、一回の治療に20万単位(約20万円)も必要とされるそうである。それに対して、須見ら¹⁾によって発見された納豆キナーゼは、約200種類の食品の中から検索の結果で、しかも静脈注射によらないで経口投与によって数時間もその線溶活性が持続することが動物実験の結果から確かめられている。さらに、納豆キナーゼの線溶活性は強力で単純計算をすると、市販の納豆1パック(約100g)が普通臨床で血栓症治療に使われている1回分に相当するので極めて経済的である。

納豆のような伝統発酵食品中に線溶活性が見いだされたことから、日常の食品の中でガン予防などで注目されている“きのこ”の線溶酵素の効果についてマウスを用いる実験を行った。

試料および実験方法

1. 供試菌株

滋賀県の朽木村より分離の、線溶活性を示すキンメジ科に属する *Tricholoma* sp. W510 菌株を本実験に供試した。

2. 試料

自然界から分離のきのこ W510 菌株は、2% モルツエキス培地(ナカライテスク社製)150ml(300ml 容三角フラスコ中)にて、28℃、12日間旋回培養(80rpm)を行った。培養後、遠心分離を行って得られた上澄液をマウスへの経口投与の試料とした。試料の urokinase 活性は、1056~2584IU/ml であった。

3. マウス血漿

雌性マウス(Jcl-ICR, 日本クレア社, 東京)に上記試料 1ml(1匹当り, 平均体重 38.2g)を毎夕経口投与を1週間継続した。1週間後の午前11時に同試料 1ml を経口投与し、午後1時にエーテル麻酔によって屠殺した後、腹部後大静脈より採血した。

4. 測定方法

血液については、毛細管法によって赤血球数と白血球数を求めた。アクチン液(Dade社)を使った活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)²⁾、トロンボプラスチンC溶液を使ったプロトロンビン時間(PT)³⁾ならびにフィブリノゲン濃度を求めるためのトロンビン時間(TT)⁴⁾は血液凝固自動測定装置KCIAを使用して測定した。また、希釈血液塊溶解時間(DBCL)の測定は、Gallimoreら⁵⁾の方法に従った。

結果および考察

Table 1に、血液検査および線溶活性の結果を示す。表中下段が、線溶活性をもつきのこの培養液

を経口投与したマウスの場合の結果で、上段はきのこの培養液を与えないマウスの場合の結果である。

血液検査の結果、きのこの培養液の経口投与によってヘマトクリット値すなわち赤血球の増加がみられた。赤血球の増加はショックなどで観察される場合があるが、採血割合の結果にみられるように採血量は減少していないのでそれは原因ではない。また、きのこの培養液の投与によって白血球も増加する傾向がみられた。

生体内における血液凝固には、内因性凝固系と外因性凝固系があってトロンビンを形成していくが、実験結果に示されるようにきのこの培養液を投与しても影響がなく、外因性凝固系の指標であるプロト

Table 1. Summary of fibrinolytic activities in mice after oral administration of a mushroom's culture broth

| Mice No. | Blood (ml/g) | Hematocrit (%) | Leucocyte (/cmm) | DBSL (mg) | TT (sec) | PT (sec) | APTT (sec) |
|----------|--------------|----------------|------------------|-----------|----------|----------|------------|
| M-1 | 0.028 | 38.3 | 5913 | 84.4 | 4.5 | 11.2 | 31.5 |
| M-2 | 0.030 | 33.2 | 4731 | 36.1 | 4.9 | 11.2 | 25.9 |
| M-3 | 0.030 | 39.6 | 2090 | 30.7 | 5.8 | 12.3 | 31.5 |
| M-4 | 0.035 | 35.5 | 4343 | 17.3 | 7.5 | 12.7 | 26.6 |
| Mean | 0.031 | 36.5 | 4269 | 42.1 | 5.7 | 11.9 | 28.8 |
| SD | 0.003 | 2.9 | 1599 | 29.3 | 1.3 | 0.8 | 3.0 |

| Mice No. | Blood (ml/g) | Hematocrit (%) | Leucocyte (/cmm) | DBSL (mg) | TT (sec) | PT (sec) | APTT (sec) |
|----------|--------------|----------------|------------------|-----------|----------|----------|------------|
| C-1 | 0.024 | 41.4 | 5115 | 50.8 | 4.6 | 12.1 | 29.8 |
| C-2 | 0.030 | 44.0 | 483 | 12.6 | 8.0 | 11.7 | 25.5 |
| C-3 | 0.033 | 36.3 | 5803 | 15.2 | 8.6 | 11.1 | 24.2 |
| C-4 | 0.030 | 35.4 | 4923 | 19.3 | 7.3 | 12.1 | 31.7 |
| Mean | 0.029 | 39.3 | 5081 | 24.5 | 7.1 | 11.8 | 27.8 |
| SD | 0.004 | 4.1 | 549 | 17.8 | 1.8 | 0.5 | 3.5 |

Mice No.s of M-1 to M-4 (the upper table) and C-1 to C-4 (the lower table) show control's four mice (no administration) and four mice orally administrated of culture broth, respectively. Items in table mean as follows; Blood (blood collection ratio, blood volume (ml) per weight (g)), Hematocrit (hematocrit value), Leucocyte (leucocyte count), DBSL (diluted blood clot lysis), TT (thrombin time), PT (prothrombin time), APTT (activated partial thromboplastin time), SD (standard deviation). Cultivation conditions and preparation of culture broth of a mushroom (Isolant W510) were described in Materials and Methods. Urokinase activity (IU) of culture broth (ml) used was 1056~2584 IU/ml. Oral administration of culture broth was 1ml per day per mice for 1 week.

ロンビン時間(PT)と内因性凝固系を表す部分トロンボプラスチン時間(APTT)はともに正常であった。しかしながら、トロンビン時間(TT)はきのこの培養液の投与による影響がみられ、減少する傾向がみられた。このことは、フィブリノーゲン量の減少傾向ということであるので、きのこの培養液の投与によってフィブリノーゲンをつくる機能が衰えたか、またはプラスミン様のものが働いたためとも考えられる。このTTの減少傾向は、DBCLにもみられた。DBCL値すなわち血液をトロンビンに作用させて2時間後の血塊の残りの重量を比較したものであるが、きのこ培養液の投与によってDBCLを減少させる傾向がみられた。

このDBCLの減少は、一つにはフィブリノーゲン量が減少したために早く溶解したための結果を示している場合と、もう一つにはきのこの培養液中に含まれている酵素(線溶酵素)がフィブリノーゲンを分解(溶解)した結果を示している場合とが考えられる。ここにはデータを示していないが、本実験に使用したきのこW510菌株は、プラスミノーゲンアクチベータータイプのものではなく、プラスミンタイプのものである結果を得ている。

以上の結果、PTとAPTTは正常であって、TTとDBCLが減少したことから、*Trichoroma* sp. W510菌株の菌糸培養液は内因性や外因性の凝固系を亢進するのではなく、プラスミン様のものが作用したためであると考えられる。須見ら^{6)~9)}が発見した納豆キナーゼは、ズブチリン様セリン酵素であるがプラスミンタイプではなくプラスミノーゲンアクチベーターの産生を促進して血中の線溶亢進を引き起こすものとされている。本実験に用いた自然界から分離のきのこW510菌株の線溶酵素について、その酵素の精製を行って諸性質を明らかにしていく予定である。

要 約

自然界から分離の *Trichoroma* sp. W510 菌株に見いだされた線溶活性は、マウスを用いる実験結果から内因性および外因性凝固系を亢進するのではなくプラスミン様の線溶を亢進するものであることがわかった。

文 献

1) Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H. : *Experientia*,

- 43, 1110-1111(1987)
 2) Hattersley, P. G. and Hayse, D. : *Am. J. Clin. Pathol.*, 66, 295-310(1976)
 3) Quick, A. J., Stanly, B. M. and Baneroft, F. W. : *Am. J. Med. Sci.*, 190, 501-511(1935)
 4) Quick, A. J. : In "Hemorrhagic disease", ed. by Lea and Febiger, Philadelphia, 1957, pp. 436-439
 5) Gallimore, M. J., Tyler, H. M. and Show, J. T. B. : *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 26, 295-310(1971)
 6) Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H. and Mihara, H. : *Fibrinolysis*, 2(Supl. 1), 67(1988)
 7) Sumi, H., Hamada, H., Mihara, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H. : *Thromb. Haemostas.*, 62, 549(1989)
 8) 須見洋行: "機能的食品素材マニュアル", CMC, 1990, pp.287
 9) Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H. : *Acta Haematol.*, 84, 139-143(1990)