

# ビーポーレン，ローヤルゼリーの *Bacillus subtilis natto* による発酵

## —循環改善，骨疾患予防剤の開発—

須見 洋行 (SUMI Hiroyuki) \*1 今井 雅敏 (IMAI Masatoshi) \*2 内藤 佐和 (NAITO Sawa) \*1  
矢田貝 智恵子 (YATAGAI Chieko) \*3 大杉 忠則 (OHSUGI Tadanori) \*1 柳澤 泰任 (YANAGISAWA  
Yasuhide) \*4 吉田 悦男 (YOSHIDA Etsuo) \*5 丸山 眞杉 (MARUYAMA Masugi) \*2

\*1 倉敷芸術科学大学生命科学部生命科学科，\*2 宮崎大学医学部機能制御学，\*3 倉敷芸術科学大学生命科学部健康科学科，  
\*4 千葉科学大学薬学部薬学科，\*5 倉敷芸術科学大学生命科学部健康医療学科

Key Words：ビーポーレン・ローヤルゼリー・ナットウキナーゼ・骨粗鬆症・抗血栓・機能性食品

### はじめに

*Bacillus subtilis natto* は日本の伝統発酵食品である「納豆」製造用に用いられている微生物であるが，その中に強力な血栓溶解酵素（ナットウキナーゼ）を持つこと<sup>1,2)</sup>，ナットウキナーゼは経口化でも効くことから血栓症予防食品として開発されている<sup>3-5)</sup>。また，パンや各種発酵食品<sup>6,7)</sup>への応用も試みられている。ビーポーレンやローヤルゼリーはミツバチが介在して作り出される天然物質であり，ビーポーレンは各種の動物実験で花粉食品の摂取による発育促進・体力増強などが確認されている。また，花粉の生理活性としては，造血作用があり赤血球を増加させる，整腸作用，食欲増進，疲労回復，精力増進，更年期障害の改善，前立腺肥大の予防と炎症抑制など種々報告されている。また，ドイツの連邦保健省ではビーポーレンを使用した医薬品を公式に認めている<sup>8)</sup>。花粉症に対する効果について「奇跡の食品」<sup>9)</sup>には，アメリカでも花粉症人口は全体の約5分の1に達しており，今のところ，アレルギーを治してくれる唯一のものが，ビーポーレンだとも記されている。

一方，ローヤルゼリーは王乳と呼ばれ女王蜂育成におけるメカニズムや驚異的な生命力を思わせる現象があり，古くから滋養強壯的な面で知られており，研究発表も多い<sup>10,11)</sup>。

酵素処理ローヤルゼリーについては，カルシウム吸収促進作用<sup>12)</sup>，抗腫瘍効果<sup>13)</sup>，血管血流量増加作用<sup>12)</sup>，血糖値低下作用<sup>15)</sup>，抗疲労活性<sup>16)</sup>といった報告がある。

今回，*Bacillus subtilis natto* による発酵処理に，ビーポーレンあるいはローヤルゼリーを添加することで，新たな機能性価値を付与することが可能であることを明らかにした。

### 1. 材料及び方法

牛血漿フィブリノーゲンはSigma社(U.S.A.)，トロンピンは持田製薬，合成アミド基質であるH-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251)，pyro-Glu-Gly-Arg-pNA (S-2444) はChromogenix AB社(Sweden)，Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNAおよびBz-Arg-pNAはSigma社のもの，その他用いた試薬類は全て特級品である。

1-1. *Bacillus subtilis natto* による発酵処理

*Bacillus subtilis natto* は各々フラスコ培養したものを使用した。滅菌した 20 ml 容量の透明のバイアル瓶に 2% Polypeptone S と各濃度のビーポーレン, ローヤルゼリーを添加後 (5 ml), 納豆菌を各々 40  $\mu$ l ずつ接種し, シリコ栓をして 37°C, 7 日間インキュベーションした (表 1, 図 1)。

1-2. フィブリン平板法

*Bacillus subtilis natto* による発酵はナットウキナーゼ活性を指標として測定した<sup>1,3)</sup>。活性は既に報告した人工血栓 (フィブリン平板) 溶解法で測定した。フィブリン平板の調製に用いたフィブリノーゲンは終濃度 0.6%, トロンビン

は 2.5 U/ml で, 原液あるいは遠心分離 (4000 rpm, 10 分, 4°C) 後の上清 30  $\mu$ l を試料とし, 人工血栓上のにせ 37°C, 4 ~ 18 時間インキュベーション後に生じるフィブリン溶解窓の面積 (長径 $\times$ 短径, mm<sup>2</sup>) から換算した。

1-3. 合成基質分解法

合成基質分解能を Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251), pyro-Glu-Gly-Arg-pNA (S-2444) あるいは Bz-Arg-pNA を基質として反応後に生じるパラニトロアニリン (pNA) の吸光度 405nm で測定した<sup>1,9)</sup>。各基質は DMSO に溶解して  $5 \times 10^{-3}$ M とし, これを反応系 1.0 ml に対して 0.1 ml 使用した。測定は試験管内にまず試料 0.1 ml および 0.1M リン酸緩衝液 - 生理的食塩水, pH7.4 を加えた後, 基質を加えて 37°C インキュベーションし, 生じる 1 分間当りの吸光度の変化により pNA 量 (nmole) を算出した。

1-4. ビタミン K の分析

ビタミン K が白金 - アルミナ触媒でヒドロキノン体に還元され, 蛍光化することを利用して, 既に報告した HPLC 法で行った<sup>6)</sup>。

発酵物の抽出は試料 1g に対して 100 ml のメタノールを用いてソックスレーの抽出装置で行った。この抽出液 0.1 ml を遠心乾固し, イソ

表 1 培地組成

培地 : 2% Polypeptone S	
1. ビーポーレン	60% (3.0g/5ml)
2. ビーポーレン	30% (1.5g/5ml)
3. ビーポーレン	20% (1.0g/5ml)
4. ビーポーレン	10% (0.5g/5ml)
5. ビーポーレン	5% (0.25g/5ml)
培地 : 2% Polypeptone S	
6. ローヤルゼリー	4% (0.2g/5ml)
7. ローヤルゼリー	2% (0.1g/5ml)
8. ローヤルゼリー	1% (0.05g/5ml)
9. ローヤルゼリー	0.4% (0.02g/5ml)
10. ローヤルゼリー	0.2% (0.01g/5ml)
11. ローヤルゼリー	0.1% (0.005g/5ml)
12. Control	0%

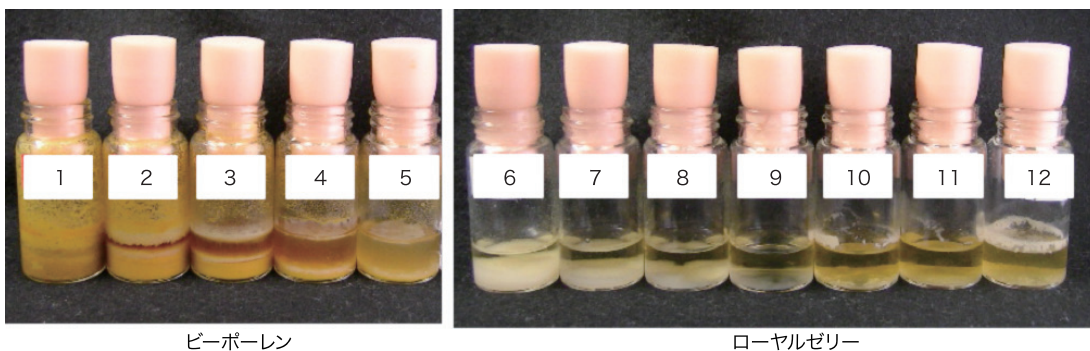


図 1 ビーポーレン, ローヤルゼリーの発酵試験  
共に, 37°C, 7 日間発酵後の写真を示した。

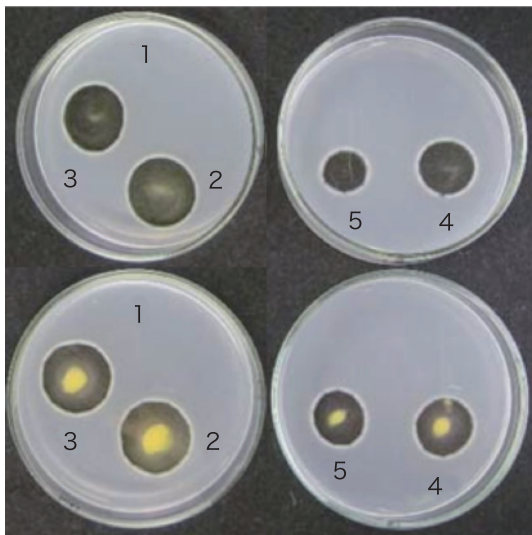
プロパノール 1.5 ml で溶解後、蒸留水 1 ml およびヘキサン 5 ml を加え攪拌後遠心分離(1,710 × g, 10 分, 室温) した。上清のヘキサン分画 4ml をエバポレーターで濃縮し、100 μl のエタノールで溶解したものを HPLC で分析した。

## 2. 実験結果

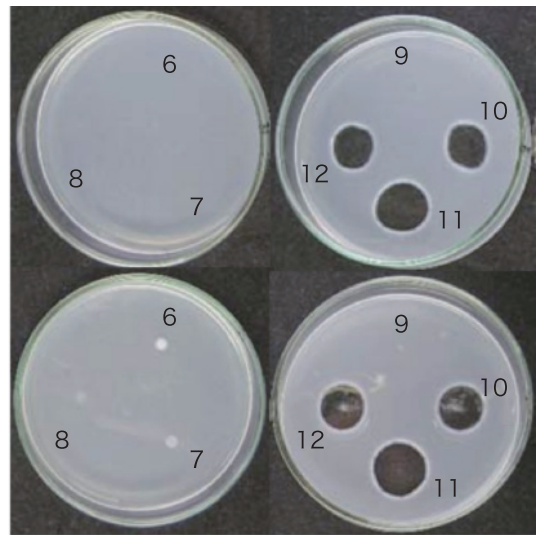
ビーポーレンは Polypeptone S に対し 5.0 ~

30% の添加で強い血栓溶解活性を示すことが分かった (図 2)。一方、ローヤルゼリーは Polypeptone S に対して 0.1 ~ 0.2% を加えた場合のみ血栓を溶解することが分かったが、0.4% 以上では全く溶解しなかった。

次に合成基質に対する分解活性を調べてみた。すなわち、ビーポーレン No.2 は 200 倍希釈、またローヤルゼリー No.11 は 50 倍希釈の場合において Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA を強く



ビーポーレン4時間(上: 上清, 下: 原液)



ローヤルゼリー4時間(上: 上清, 下: 原液)

図 2 発酵物中の血栓溶解活性

ビーポーレンの 1 については遠心分離不可能で、未測定である。  
一方、ローヤルゼリーは 10 ~ 12 のみ強いフィブリン分解能が見られた。

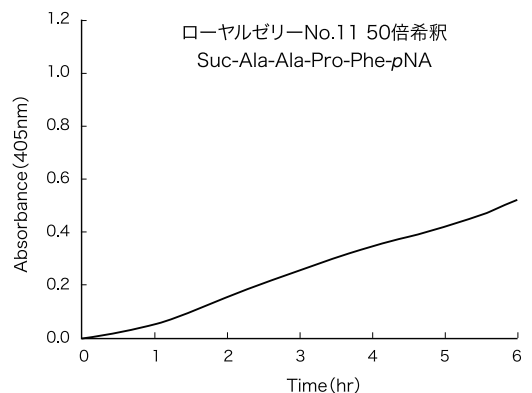
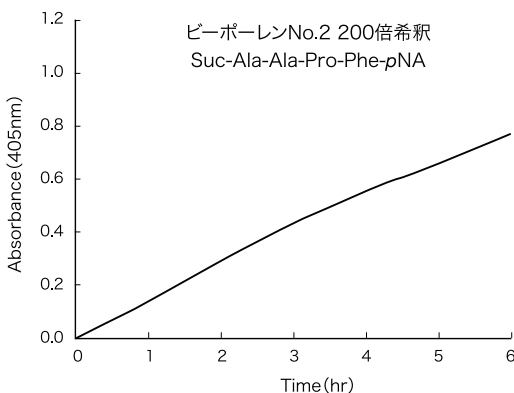


図 3 ビーポーレン, ローヤルゼリー発酵物の Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 分解能

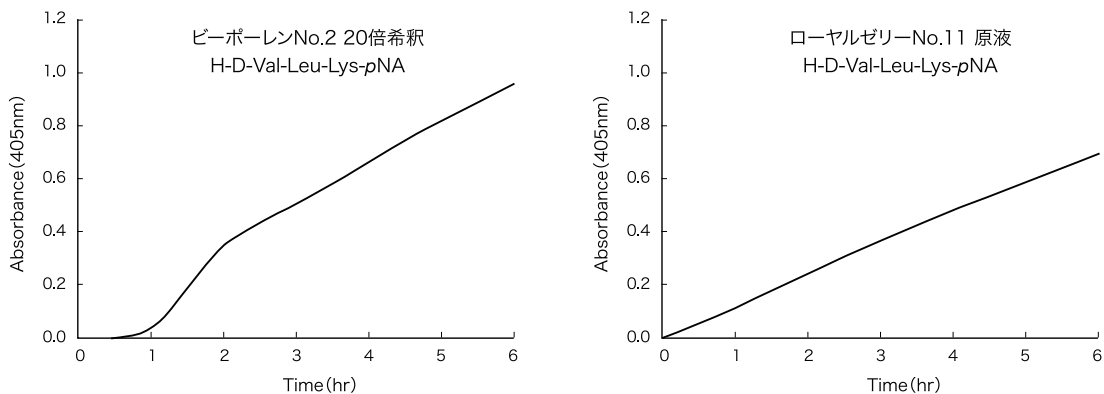


図4 ビーポーレン、ローヤルゼリー発酵物の H-D-Val-Leu-Lys-pNA 分解能

表2 各酵素が持つ基質特異性

	基質	(単位)	酵素活性	
			ビーポーレン No.2	ローヤルゼリー No.11
Thrombosis*	Fibrin	(mm <sup>2</sup> /4h)	806	42
Amidolysis**	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	(nmol/min)	29.40	4.90
	H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251)	(nmol/min)	10.58	0.13
	pyro-Glu-Gly-Arg-pNA (S-2444)	(nmol/min)	0.00	0.00
	Bz-Arg-pNA	(nmol/min)	0.00	0.00

\*30 μl of the extract was put on a standard fibrin plate and the area of thrombosis was determined.

\*\*The amount of paranitroaniline released from the reaction mixture with 5 × 10<sup>-4</sup>M substrate was shown above.

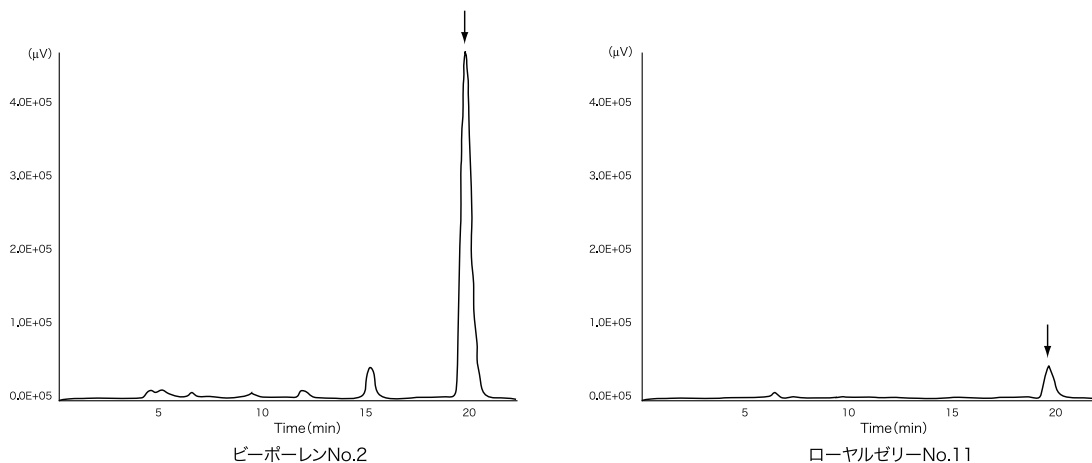


図5 発酵物中のビタミン K<sub>2</sub>  
矢印はビタミン K<sub>2</sub> のピークを示す。

分解した (図3)。また、ビーポーレンは20倍希釈、ローヤルゼリー原液で、プラスミンの基質である H-D-Val-Leu-Lys-pNA を分解することが分かった (図4)。しかしながら、両者は pyro-

Glu-Gly-Arg-pNA および Bz-Arg-pNA に対しては反応性は低かった (表2)。

次に、発酵物中のビタミン K の分析を行った。発酵前では全く検出されなかったが、発酵後の

上清中には HPLC で Rt= 約 20 分のところに著しく高いメナキノン-7 のピークを示した。換算値はビーポーレンでは 5.49  $\mu\text{g/ml}$ 、ローヤルゼリー 0.52  $\mu\text{g/ml}$  であった (図 5)。また、ビーポーレンでは Rt= 約 12 分のところに小さいがビタミン K<sub>1</sub> のピークを確認した。

### 3. 考察

ナットウキナーゼは、その線溶亢進効果による血栓形成の減少、また、生体内で血漿キニノーゲンに働き、キニンを生産することから循環改善薬として働く可能性があり<sup>17,18)</sup>、今後、発酵物中に含まれる蛋白バンドの変化や血小板凝集阻害能<sup>19)</sup>を調べる予定である。

また、骨粗鬆症予防剤であるビタミン K<sub>2</sub> についても、ビーポーレン 30% 添加において 5.49  $\mu\text{g/ml}$  と納豆と同程度含有することが分かったが、沈殿分画にはさらに多くの納豆菌が存在す

ることから<sup>20)</sup>、ビタミン K<sub>2</sub> 量はさらに多いと見込まれる。

以上より、今回、2% Polypeptone S を培地とした *Bacillus subtilis natto* の発酵処理において、高付加価値食品開発の可能性が示唆された。特にビーポーレンの場合、30% 濃度の添加によって、ナットウキナーゼ活性の増加やビタミン K<sub>2</sub> 産生が認められた。

本研究の一部は第 22 回国際血栓止血学会 (ボストン) において発表済みである (H. Sumi *et al.*, Fermentation of royal jelly and bee pollen : Nattokinase fibrinolysis and vitamin K<sub>2</sub> content, XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, PP-WE-149, USA (Boston), 2009)。また、一部内容は株式会社山田養蜂場との共同研究によるものであることを付記しておく。

### ..... 参考文献 .....

- 1) H. Sumi, H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara and H. Muraki, 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) H. Sumi, H. Hamada, H. Nakanishi and H. Hiratani, Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase, *Acta Haematol.*, **84**, 139-143, 1990.
- 3) H. Sumi and C. Yatagai, Fermented soybean components and disease prevention, *Soy in Health and Disease Prevention*, p.251-278, ed. M. Sugano, Taylor&Francis, 2005.
- 4) 木内 幹, 永井 利郎, 木村 啓太郎編, 納豆の科学—最新情報による総合的考察—, 建帛社 (東京), 2008.
- 5) Y. Yanagisawa, T. Chatake, S. Naito, T. Ohsugi, C. Yatagai, H. Sumi, A. Kawaguchi, K. Chiba, M. Ogawa, T. Adachi and Y. Morimoto, X-ray structure determination and deuteration of Nattokinase, *J. Synchrotron Rad.*, **20**, 875-879, 2013.
- 6) H. Sumi, Accumulation of vitamin K (menaquinone-7) in plasma after ingestion of natto and natto bacillus (*B. subtilis natto*). *Food Sci. Technol. Res.*, **5**, 48-50, 1999.
- 7) 須見 洋行, 池田 志織, 今井 雅敏, 矢田貝 智恵子, 酒粕類, 特に焼酎蒸留粕を原料としたナットウキナーゼ及びビタミン K<sub>2</sub> (メナキノン-7) の発酵生産, 醸協, **99**, 867-872, 2004.
- 8) M. Campos, K. R. Markham, K. A. Mitchell and A. P. da Chunha, An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles, *Phytochem. Anal.*, **8**, 181-185, 1997.
- 9) J. Carper, *Food-Your Miracle Medicine*, Harper Collins Publishers, Washington, 1993.
- 10) 玉川大学ミツバチ科学研究所編, ローヤルゼリーの日本文献, ミツバチ科学, **13**, 1, 1982.
- 11) 藤井 彰, ローヤルゼリーの薬理作用, ミツバチ科学, **16**, 97-104, 1995.
- 12) 仲佐 輝子, プロテアーゼ処理とローヤルゼリーのカルシウム吸収促進効果, 食品と開発, **34**, 42-44, 1999.
- 13) F. Townsend, F. Morgan, B. Hazlett, Activity of 10-hydroxydesenoic acid from royal jelly against experimental

leukemia and ascitic tumours. *Nature*, **183**, 1270-1271, 1959.

- 14) 篠田 雅人, 中陳 静男, 及川 隆幸, 佐藤 和憲, 鴨川 旭, 秋山 義郎, ローヤルゼリー中の血流増加因子について, 薬誌, **98**, 139-145, 1978.
- 15) 上田 修一郎, 自然発症糖尿病モデルマウスに対するプロテアーゼシヨリ投与の影響, *Food Style* **21**, **6**, 5-8, 2002.
- 16) 鎌倉 昌樹, ローヤルゼリー中に見出された品質指標となるタンパク質:ロイヤラクチン, ミツバチ科学, **23**, 17-22, 2002.
- 17) S. Ikeda, S. Naito, T. Ohsugi, H. Sumi, Substrate specificity and kinin-producing activity of nattokinase, 2<sup>nd</sup> International Symposium on Kallikreins & Kallikrein-related Peptidases, Santorini island, Greece, p.63, 2007.
- 18) 須見 洋行, 内藤 佐和, 矢田貝 智恵子, 大杉 忠則, 吉田 悦男, 柳澤 泰任, 丸山 真杉, ナットウキナーゼによる血流改善作用と冷え性への可能性, *Food Style* **21**, **16**, 62-64, 2012.
- 19) H. Sumi, S. Naito, C. Yatagai, L. Zhang, J. Saito, M. Maruyama, Anti-platelet aggregation activity of highly purified nattokinase, 21<sup>st</sup> International Congress on Fibrinolysis & Proteolysis, Brighton, 2012.
- 20) 須見 洋行, 内藤 佐和, 矢田貝 智恵子, 大杉 忠則, 柳澤 泰任, 納豆菌 (*Bacillus subtilis natto*, SL-001) が培養液中に生産する水溶性ビタミン K, 薬理と臨床, **18**, 297-305, 2008.