

みみずの線溶活性物質とその有用性

美 原 恒
(宮崎医科大学生理学第二講座)

Fibrinolytic enzymes extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*; A possible thrombolytic agent. Hisashi MIHARA (Miyazaki Medical College, Dept. of Physiology)

I. はじめに

Charles Darwin の二大名著のうち、日本では「種の起源」はよく知られているが、もう一つの「Vegetable mould and earthworms」(1881)³⁾については殆んど知られていない。Darwin はこの著書の中で、地球上の豊饒な沃土を作っているのはみみずのお蔭であることを強調しており、その故か、ヨーロッパではもっぱらみみずについてはその土壤形成の効用が注目されてきた。一方これに対し、中国を中心とする極東諸国では、みみずは薬として注目されてきた。中国最古の医薬書と言われている「神農本草経」の中に、既にみみずが医薬品として記載されており、その後の中国の多くの古典的医薬書から現在の「中薬大辞典」⁶⁾に至るまで種々の疾患にみみずが有効であると記載されている。その結果、極東では民間療法も含めて、みみずに対する関心は医療と結びついている。しかし、これらの医薬品として多くの記載があるにもかかわらず、みみずについて、近代科学的手法により、有効物質を抽出した研究は知る限りでは殆んどなく、大正年間、田中伴吉と額田晋によって解熱作用物質としての Lumbrofebrine が報告²³⁾されているに過ぎない。

筆者は、偶々宮崎医科大学創設時、赴任とともに実験動物施設の責任者となり、そこから排泄される実験動物の糞の処理は焼却処分しなければならないことを知った。当時、第一次石油ショックの直後で、高騰した重油で排泄物の処理をすると、その処理費だけで動物実験施設の予算が全てなくなってしまうという問題に直面した。そこで宮崎という地の利もあり、これら

排泄物をみみずによって処理することを考え、実行した。用いたみみずは従来日本にはいなかった、ヨーロッパやアメリカに棲息していた *Lumbricus rubellus* という種類であり、従来日本にいたみみず類と異なり、冬も冬眠せず、年間を通じて活動するため、廃棄物処理に適しているみみずである。その結果、年間約 300 万円の重油代の節約が可能となるとともに、みみずによって産生される糞土は園芸用の肥料として利用され、一石二鳥の効果があつた。その間、みみずの糞土が悪臭除去効果があること¹¹⁾、種々の畜産排棄物のみみずによる摂食の状態等の観察を行ない報告した¹⁰⁾。しかし、1 年間に数 100 倍以上に増殖するみみずは魚釣りの餌として利用するぐらいで、他に特別な利用方法がなかった。そこで、このみみずを用いて、それまで筆者の研究テーマであつた線溶系の研究、ひいてはその究極の目的である血栓溶解剤への利用を考え、研究を進めることとなった。その結果、かなり興味ある成績が得られ、その一部については JJP にも投稿してあるが¹⁴⁾、全体をここにまとめて以下述べることにする。

II. 線溶系の概要

みみずの線溶活性物質について触れる前に、線溶系と血栓溶解療法について概括的な解説をする。線溶系(線維素溶解酵素系)の生理学的意義については、図 1 に示す如く血管が破綻し出血がおこると、そこに血小板が粘着・凝集し、血小板血栓ができ、止血がおこなわれる。これだけでは止血は不十分であり、つづいて、その局所で凝固過程が進行し、この結果作成されたフィブリンを足場にして血管壁細胞の増殖がお

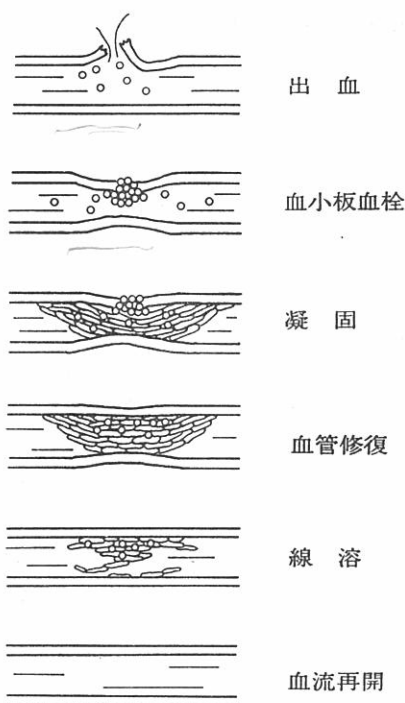


図1. 血管破綻より血流再開に至るまでの血小板、凝固、線溶の役割りを図示したものである。

こり、血管の修復が行なわれ、止血が完了する。しかし、このままではフィブリン塊による阻血状態がつづくわけであるが、それを溶解する機構として線溶系が存在する。すなわち、線溶系の活性化によりこのフィブリン塊が溶解され血流の再開がおこる。このように線溶系は主として生体内に形成されたフィブリン除去機構として機能している。その他にも生理学的機能として知られているのは、排卵時に卵胞壁に働き、排卵を助ける機能等もあるが¹⁾、線溶系の主たる役割は生体内フィブリン除去機構と考えてよい。

この線溶活性化機構は、図2に示すように血中に存在する前駆物質であるプラスミノゲンが組織より放出されるプラスミノゲン・アクチベーター (PA) によって活性酵素であるプラスミンに変換され、フィブリンを分解して、フィブリン分解産物、FDP (Fibrin Degradation Products) を産生する。この PA には現在2種類が知られている。一つは組織性プラスミノ

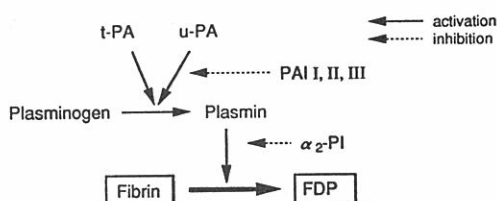


図2. 線溶系カスケード

ゲン・アクチベーター (tissue plasminogen activator) として、従来より知られていた t-PA であり、もう一つは、最初、尿中の線溶活性物質として発見され、ウロキナーゼ (urokinase, UK) と命名されていたが、後にその抗原性を同じくするものが組織中にも存在することが判明し、現在では urokinase type の PA として u-PA と呼ばれている。この線溶は、主として固相上で起こり、液相では起こりにくいことが知られている。従って、線溶活性はフィブリンが形成された局所でのみ働き、それ以外の場所では血中に存在する inhibitor によって抑制される。この inhibitor としてはプラスミンに対しては、 α_2 -Plasmin Inhibitor (α_2 -PI), PA に対しては、3種類の PA inhibitor (PAI-I, II, III) が知られている。生体内でこれらの inhibitor の低下や、線溶活性の異常亢進がおこると出血傾向となる。

しかし、ここで問題となるのは、生体の防御機構として機能している血小板・凝固系は血管内皮の損傷時にも止血の際と全く同様の過程が進行し、線溶系の活性低下と相俟って、血栓症を惹起することである。

岡本彰祐らにより合成線溶抑制物質であるイブシロン・アミノカプロン酸¹⁵⁾やトラネキサム酸の発見¹⁶⁾があった故か、本邦においては初期には、線溶系による出血傾向の研究が盛んに行なわれた。しかし、近年、脳血管障害においても脳出血が減少する反面、脳血栓症が増加傾向にあることや、欧米型の食習慣とも関連してか、心筋梗塞が増加してきたということもあって、線溶系研究者の関心は線溶活性化による血栓溶解療法の研究へと移っていった。

既に欧米ではストレプトコッカスの培養上清

から得られるストレプトキナーゼによる線溶活性治療法が普及していた。これに対し日本では、1970年代より尿から得られるUKが線溶活性物質として用いられてきた¹²⁾。しかし、これらの血栓溶解剤は、まず、ストレプトキナーゼについては、細菌から得られるものであるため抗原性が問題であり、繰り返しおこる血栓症には再々にわたり使用するの難しい。またUKについては尿より僅かに抽出される物質であるため薬価が高く、十分な血栓溶解を行なうためにはかなりの量のUKが必要であり、医療経済の側面より問題がおこった。筆者も再々にわたり医療基金より呼び出され、もっと安価な血栓溶解療法の開発が要望された。最近になり、UKと並んでもう一つのPAであるt-PAがUKよりもフィブリンに対する親和性が高いという報告⁷⁾もあり、遺伝子操作によるt-PAの開発が行なわれ、本邦でも医薬品としての認可が最近行なわれた。しかし、これも決して安価ではなく、アメリカでは、その効果についてはストレプトキナーゼと同等であり、100倍以上の薬価であるt-PAを敢えて使う必要があるのか、という疑問も出されており、必ずしも満足すべき血栓溶解療法とは言えない。さらに、これらの血栓溶解剤は何れも静注による投与を必要とし、前述の如く、液相でのフィブリン分解は難しいこともあり、かなり大量のPAが必要であり、出血の危険性もある。これらの現状をふまえみみずについての研究が開始された。

Ⅲ. みみずの線溶活性物質

先づ、実験の手始めとして、線溶系の研究で最も簡単でよく利用されている、フィブリン平板の上にみみず(*Lumbricus rubellus*)を切断して置いてみた。その結果、図3に示すように、約19~50番目のsegmentの位置に一致して線溶活性が認められた。みみずの種々の解剖学的位置を表現する際、頭から尾まで節(segment)があり、これを頭から数えて何番目のsegmentと表現する(みみずの種類の判別にもそれぞれが持つ固有のsegment数によって判定される)。

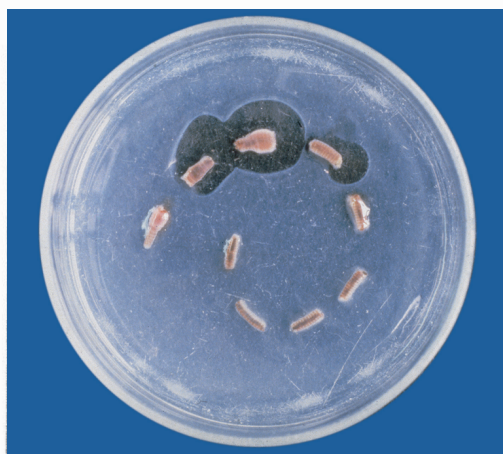


図3. みみずを切断し、フィブリン平板に置いた際の溶解部分を示す。図の左側が頭部、中心部に向かって尾部になる。

このsegmentの位置からこの線溶活性を示す部分は、嚥嚥、砂嚥、腸管の前1/3くらいの部分であると判定された。みみず類が蛋白分解酵素を腸管内へ分泌していることは既に報告があり(Keilin, D. 1920⁵⁾, Bahl, K. N. and Lal, M. B. 1933²⁾)、胃に相当する嚥嚥で蛋白分解が行なわれていることも知られていた。そこで、みみずを皮、体腔液、消化管に分けて、線溶活性を測定すると、体腔液、消化管には活性があり、皮にはinhibitorが存在することもわかった。何れにせよ、そのinhibitor量に比較し、活性が強いことから、みみずをそのままhomogenizeし、皮の部分を出るだけ除去して、実験に供することとした。

みみずはその消化管中に大量の糞土を持っているので、それを全部吐き出させるため、蒲焼き屋がうなぎから泥を排出させるのを真似て、体についている泥を洗った後、みみずを12時間蒸留水中に放置、糞土を十分に排出させ、そのきれいになったみみずをhomogenize後凍結乾燥し、これを出発材料として以下の実験に供した。

このみみず乾燥粉末に10倍の生理的食塩水を加え、37℃にてincubateすると、10日目まで活性が急激に上昇し、信じられないようなことだが、その後も程度は緩いが、50日後まで活性

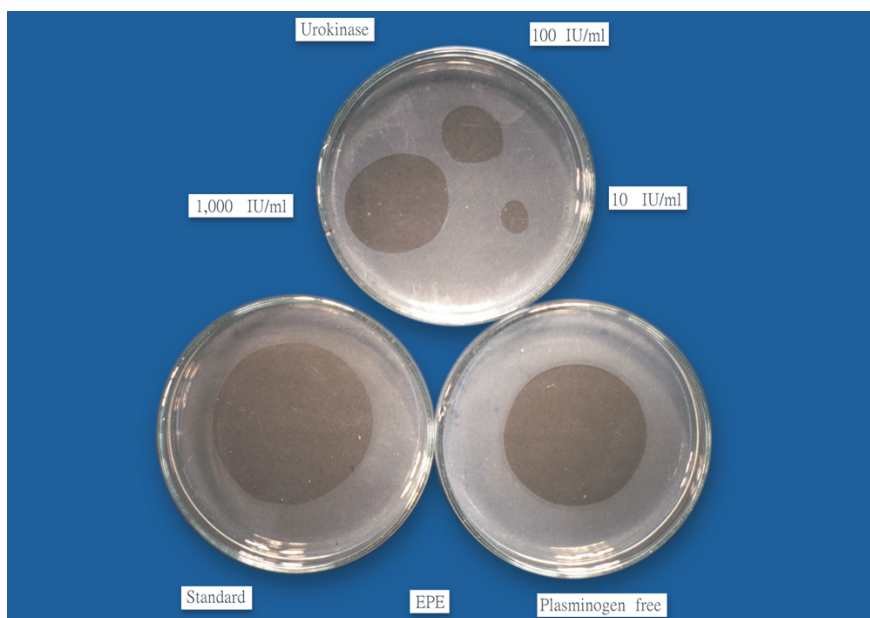


図4. みみず乾燥粉末に10倍量の生理的食塩水を加え, incubation 50日目の上清のフィブリン平板溶解を示す。上段のシャーレは, UK による 1000, 100, 10 IU/ml の溶解を示す。

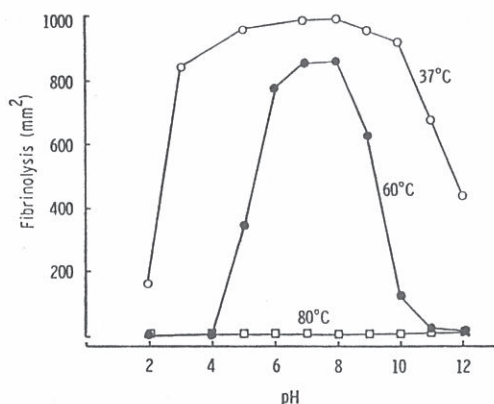


図5. みみずより抽出された線溶酵素の pH 並びに熱安定性。

の上昇が認められた。この結果は, 前駆物質がかなり大量にあり, autocatalytic に活性が出現するものと解釈された。この50日目の上清の活性を市販の UK と比較してみると, 図4に示すように, plasminogen を含む平板, 並びに plasminogen free のフィブリン平板の何れも溶解し, その活性は UK の単位に換算すると約 8,700 IU/ml に相当すると計算された。

さらに, この酵素の面白いことは, 37℃でそ

の pH 安定性を測定すると, 図5のように pH 3 から pH 10 まで30分間でも安定であった。さらに, 60℃で30分間放置しても, 約 pH 6 から pH 8 まで安定であった。しかし, さすがに80℃, 30分では全く活性が失われた。このように, この酵素は今まで経験したことのないような非常に幅広い pH range を持つとともに, 熱にも強い酵素であることが判明した。Optimum pH については, フィブリン平板法で測定した結果では測定限界を過ぎるため, pH 7.4~9 の間で plateau になり, 決定出来なかった。

つぎに, この酵素の種々の inhibitor による反応をフィブリン平板でみた。活性が強いので, 通常の18時間の incubation ではフィブリンが全部溶解してしまうため, 2時間の incubation で定性的に観察した。セリンプロテアーゼの inhibitor である SBTI (10 mg/ml), Aprotinin (100 KIU/ml), DFP (1 mM) を用い, 何れもカッコ内に示したかなりの高濃度で活性阻害が認められた。さらにプラスミンの特異的 inhibitor であるトラネキサム酸では僅かに抑制がみられるのみであり, PCMB, TLCK では全く阻害活

性は認められなかった。この結果、このみみずの酵素はセリンプロテアーゼに属するものと考えられた。

そこで、Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) にかけてみると、どこにも活性が認められず、不思議に思ってマーカーとして一緒に流した Brom Phenol Blue(BPB)の所を測定したら、この BPB に一致して活性が認められた。聞くと、非常に酸性な蛋白は BPB と結合する性質があるとのこと、事実、等電点電気泳動を行なうと、活性部分は pH 3.4 の所で溶出され、非常に酸性の酵素であることが明らかとなった。

Sephadex G-200 によるゲル濾過では、線溶活性のピークが2つあり、何れもカゼイン分解活性と一致したが、線溶活性の主ピークのカゼイン分解活性は低く、逆に、低い線溶活性のピークのカゼイン分解活性は高かった。このゲル濾過の結果から、この線溶酵素の分子量は20,000~30,000 と計算された。

そこで、この線溶酵素の精製に移った。精製過程の詳細は原著にゆずるが¹⁴⁾、凍結乾燥標品から出発し、大きく分けて3つの分画が得られた(F-I, II, III)。さらにそれぞれの分画を精製した結果、F-I 分画では3つ、F-II 分画ではそれ以上の線溶活性をもつ分画は得られず、F-III 分画では2つの分画に分かれた。この6つの分画は SDS-PAGE で何れも単一のバンドを示した。これら6分画、それぞれの SDS-PAGE、等電点電気泳動による化学的性質は表1に示す。分子量は23,500 から 34,200 まであり、等電点も pI 4.12 から pI 3.52 の範囲にあった。各分画の inhibitor に対する反応は表2に示すように、Lima bean trypsin inhibitor (LBTI) と DFP は何れの分画も完全に抑制した。Soy bean trypsin inhibitor(SBTI)はII分画、並びに III 1, III-2 の分画は抑制するが、I 分画に対しては何れも抑制が弱かった。この結果、粗画分で予想したように、何れの分画もセリンプロテアーゼと考えられた。

表1. みみず線溶酵素精製分画の物理化学的性質

	I-0	I-1	I-2	II	III-1	III-2
分子量*	23,500	27,400	27,000	28,500	34,000	34,200
等電点**	4.12	4.00	3.90	3.80	3.70	3.52
E1%(280 nm)	12.5	14.2	12.8	16.6	13.1	12.7

* SDS-polyacrylamide gel electrophoresis による。

** 等電点電気泳動による。

表2. みみず線溶酵素精製分画への各種阻害物質の影響

阻 害 物 質	残 存 活 性 % *					
	I-0	I-1	I-2	II	III-1	III-2
対 照	100	100	100	100	100	100
LBTI	0	0	0	0	0	0
DFP	0	0	0	0	0	0
SBTI	0	16	89	0	0	0
N-Ethylmaleimide	74	0	0	0	100	100
t-AMCHA	30	83	66	23	49	47
ε-ACA	38	100	80	50	68	70

* 各残存活性はフィブリン平板法にて測定した。

表3. みみず線溶酵素精製分画の基質特異性

基 質	I-0	I-1	I-2	II	III-1	III-2
Fibrin(IU)	66.8	102.0	97.0	234.0	87.0	95.0
Casein(CU)	251.2	285.8	266.6	183.2	173.4	146.6
S-2444 (A/min)	0.102	0.268	0.496	0.748	1,236.0	2,675.0
S-2251 (A/min)	1.225	0.370	0.360	0.120	240.0	63.5
TAMe(U)	1.180	7.390	6.600	0.120	151.0	50.7
BAMe(U)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TLMe(U)	ND	0.016	0.014	0.012	61.3	25.6
BTMe(U)	2.430	3.350	2.630	ND	ND	ND
p-NPGB	60.3	62.4	58.6	ND	82.7	72.9

ND, not detected

さらに、表3に示すように種々の基質を用いて、それぞれの分画の基質特異性について測定した結果、何れも線溶活性とともにカゼイン分解活性があり、特にI分画は何れもチロシン残基のカルボキシル基を切ることから、キモトリプシン様の酵素であり、III分画は何れもアルギニンやリジンのエステル結合を切ることからトリプシン様の酵素と考えられた。II分画はトリプシン様でも、キモトリプシン様でもなく、さらにエラスターゼ様の酵素かと思ったが、これとも異なり、現在知られている何れのセリンプロテアーゼとも異なる新しいセリンプロテアーゼと思われた。

ここで精製された各分画のアミノ酸組成を調べると、表4に示すように、何れも非常に類似した組成をもち、何れもアスパラギンあるいはアスパラギン酸を多く含有していた。このアスパラギン、アスパラギン酸を大量に含んでいることが、pH、熱に安定な理由であると考えられた。これとは逆に、プロリンやリジンが非常に

少ないということは今まで知られている他の線溶系酵素と全く異なっていた。これらの結果は、これらみみずから抽出された線溶酵素はプラスミンとは異なり、所謂 non-plasminic enzyme であると結論された。そこで、*Lumbricus rubellus* から抽出された新しい蛋白分解酵素として、Lumbrokinase と命名することにした。

IV. みみずの血小板凝集抑制と血管拡張作用

前述の如く、みみずの乾燥粉末が線溶酵素を持っていることを確認し、血栓症治療薬として利用可能か否かを検討していた時、みみずは血小板凝集促進作用があるという不確かな噂が耳に入った。もし、みみずの乾燥粉末が血小板凝集を促進する物質を含んでいたら、たとえ血栓を溶解しても、その部位は血管内皮が損傷されている可能性が高く、再度、血小板が粘着、凝集をおこし、血栓をつくる危険性が考えられた。

そこで、みみず乾燥粉末について血小板凝集に対する影響を調べてみた。初期の段階でみみず乾燥粉末の抽出液は、血小板凝集促進よりも、むしろ、凝集抑制をする成績が得られた。これに力を得て、凝集抑制作用をもつ分画を同定することにした。その分離過程の詳細は省くが²⁴⁾、ADP 及びコラーゲンによる血小板凝集に対し、その抑制作用を示す物質が2種類発見された。何れも分子量は小さく、蛋白ではないと判明したので、この化学的組成について追究した結果、一つは既に血小板凝集抑制作用も報告されているアデノシンであることが判明した。しかし、一方については分子量260の未知の物質であると考えられた。そこで NMR、マスペクトル及び UV 吸収スペクトル等を用い、その構造を追究した結果、全く新規なフラン化合物であることが明らかとなった²⁴⁾。さらに興味あることは、この物質は *in vitro* の実験でイヌの伏在静脈のプロスタグランディン F₂ による収縮に対し、それを抑制する作用をも持つことがわかった。

このようにみみずには線溶活性物質の他、血小板凝集抑制、血管収縮に対する抑制作用と、

表4. みみず線溶酵素精製分画のアミノ酸組成

アミノ酸残基	I-0	I-1	I-2	II	III-1	III-2
Asx	12.26	15.65	16.06	14.81	15.25	14.99
Thr	12.22	8.25	8.46	8.40	6.09	6.24
Ser	9.38	11.30	10.85	12.05	10.08	10.39
Glx	3.97	6.05	6.13	6.04	7.04	7.63
Pro	0.40	0.37	0.41	0.44	0.55	0.57
Gly	13.48	15.39	15.41	14.48	12.66	12.89
Ala	12.95	9.49	9.45	10.27	6.90	6.57
Half-Cys	1.44	1.09	1.67	0.80	1.36	1.40
Val	7.03	5.46	5.51	7.77	10.33	10.67
Met	0.55	0.97	0.82	0.98	1.36	1.34
Ile	5.38	6.54	6.64	5.96	7.89	7.62
Leu	7.47	7.95	8.01	7.46	3.73	3.41
Tyr	3.91	3.69	3.79	3.24	4.63	4.83
Phe	2.00	1.11	1.11	0.58	3.09	2.67
Trp	0.64	0.98	ND	1.63	0.83	1.09
Lys	0.04	0.50	0.53	0.45	1.65	1.67
His	2.45	2.75	2.73	2.30	2.37	2.12
Arg	3.98	2.46	2.42	2.34	4.19	3.90

値は分子量当たりのアミノ酸残基の%で示した。
ND, not detected.

何れも血栓症治療に効果的な薬理作用を持つことが明らかとなった。

V. みみず凍結乾燥粉末の経口投与実験

そこで、これらの薬理作用をもつみみずの凍結乾燥粉末の経口投与実験を企画した。まず、動物実験として、9匹のビーグル犬の伏在静脈に Sasaki らの方法²⁰⁾に従って、実験的血栓を作成した。この9匹のビーグル犬を3群に分け、第一群の3匹にはみみずの粉末1gを5mlの生理的食塩水に溶解し、1ヶ月間37℃に放置した後、遠心した上清を麻醉下にゾンデを用いて十二指腸内に経口投与した。第二群の3匹は市販の高分子 UK 200,000 単位を5mlの生理的食塩水に溶解して静脈投与した。さらに対照として、第三群の3匹には5mlの生理的食塩水を静脈投与した。その後、経時的に血管造影を行ない、血栓溶解の程度を定性的に判定した。その結果、表5に示すように、みみずを投与した群では、明らかにUKを投与した群より血栓溶解の程度が高く、みみずの経口投与により血栓溶解がおこる可能性が強く示唆された。

そこでヒトへの経口投与を企画したが、まず、その安全性を確認する必要があった。種々の民間療法としてみみずを煎じて飲むことや、外用薬として利用していることは知っていたが、みみずのもつ酵素活性を温存して投与するために

は、前述したように、高温抽出は不可能であり、種々調査した。すると、ニュージーランドのマオリ島人はみみずを食用にしている報告や⁴⁾、日本にもみみず料理屋があるというニュース、さらには韓国でみみずが死んで溶解をはじめているものを土龍魂と言う名で健康飲料として市販されており、かなり多くの人愛用していることも知った。そこで、著者自身及び関係した数人でみみずの凍結乾燥粉末を150mgカプセルにつめ、毎日2～3カプセルを3年間にわたり服用してみた。その結果、特別に副作用らしい症状も出ず、安全であろうと思われた。これらのことを教室員に説明し、教室員6人(28才～39才)及び著者自身を使って、経口投与実験を開始することにした。みみず凍結乾燥粉末200mgをカプセルに封入し、毎日食後1カプセルを3回、17日間にわたって経口投与した。投与前、投与後1, 2, 4, 8, 11, 17日目に採血し、線溶系諸因子の測定を行った¹³⁾。

その結果、3年にわたって服用していた著者自身の測定結果を除いた、他の6人の投与後の線溶活性の変化をみると、図6の如く、全血溶解時間(WBCLT)は投与後1日、2日目まで溶解時間が短縮するが、4日目に投与前の値に戻り、その後次第に短縮を続け、17日目にはかなり線溶活性の亢進があることが観察された。さらに、血漿中の inhibitor を除去した測定法と

表5. 実験的血栓に対するみみず抽出液及び高分子ウロキナーゼの血栓溶解効果

投与物質及び方法	投与後経過時間							
	No.	0	4	8	12	16	20	24
みみず抽出物の経口投与	1	—	+	+	+	+	+	+
	2	—	—	+	+	+	+	+
	3	—	—	±	±	±	±	+
高分子ウロキナーゼの静脈内投与	1	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	+	+	+	+	+
	3	—	—	—	—	—	+	+
生理的食塩水の静脈内投与	1	—	—	—	—	—	—	+
	2	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	+

—；再開通なし，+；再開通，±；部分的再開通

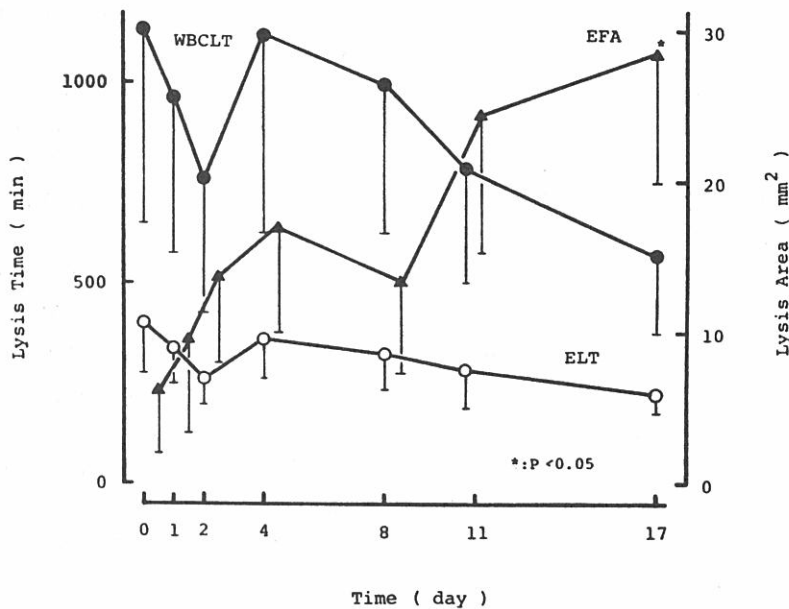


図6. みみず乾燥粉末経口投与時の血液線溶活性の変動. 横軸0:投与前, 1:投与24時間後, 縦軸 WBCLT:全血溶解時間, ELT:ユーグロブリン溶解時間, EFA:ユーグロブリン分画の plasminogen rich フィブリン平板の溶解面積を示す.

して知られているユーグロブリン溶解時間 (ELT) でみると, 全血溶解時間と同様の傾向を示した(図6). さらに, このユーグロブリン分画を前述の plasminogen rich のフィブリン平板(EFA)で測定すると, 投与翌日から溶解面積が大きくなり, 8日目一度小さくなるが, その後実験最終日の17日目まで溶解面積は大きくなった.

以上の結果は, 少なくとも, みみず乾燥粉末をヒトに経口投与することによって, その詳細な機構はわからないにしても, 血中の線溶活性が上昇することは事実であると確認できた.

さらに, t-PA 抗原量を測定するキットを使い, 経口投与後の t-PA 抗原量の変化を測定した. その結果, 図7に示すように, 投与後明らかに t-PA 抗原量は上昇し, その上昇は実験最終日まで続いた. これもその放出機構についてはさらに研究を行う必要があるが, みみずの乾燥粉末の経口投与により, 生体内の t-PA が遊離されることを示唆しているものと考えられた. さらに, この結果をよく考えてみると, 大

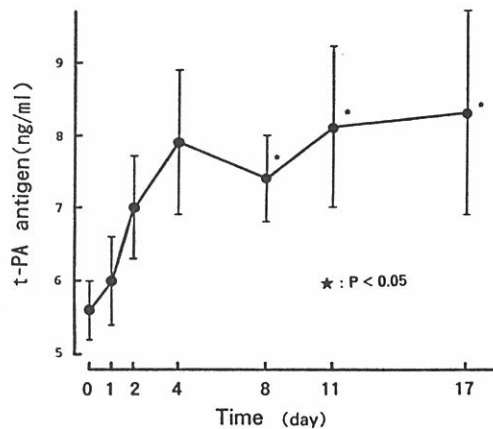


図7. みみず乾燥粉末経口投与後の血中 t-PA 抗原量の変動.

変重要な意味を持っているものと思われた. その理由は, 従来, 血栓症の治療については, 前述したストレプトキナーゼや UK, さらには t-PA による治療はすべて外因的に線溶活性物質を投与して治療しようとする方法である. しかし, 実際に, 脳血栓症の発作をおこした時点で, 血中線溶活性が低下している症例でも, 死

後剖検時、採取した血管壁の t-PA を抽出すると充分抽出される。従って、血栓症がおこる原因として、生体が本来持つ t-PA の放出が障害されているのではないかと考えられる。従って、この生体のもつ内因性の PA を放出する治療法が最も効果的な血栓溶解療法になると云えよう。しかし、現在まで、このような内因性の PA を充分放出させる薬剤は知られていない。著者も既にいくつかの薬剤について、その線溶活性を亢進させることを報告してきたが^{8,9)}、このみみずのように顕著な線溶活性の亢進や、t-PA の抗原量の上昇を示した薬剤はなかった。

この実験を通じて最も興味のある結果は、図 8 に示す投与後の FDP の変化であった。投与前に比較し、24 時間後何れの例においても FDP の急激な上昇が観察された。翌日から FDP 量は減少し始め、17 日目には殆ど投与前

の値に戻った。この事実、経口投与により線溶活性の亢進とともに線溶がおこり、その分解産物が血中出现したことを意味している。た

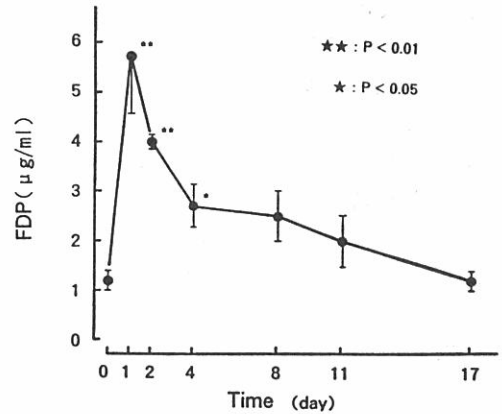


図 8. みみず乾燥粉末経口投与後の血中フィブリン分解産物 (FDP) 量の変動。

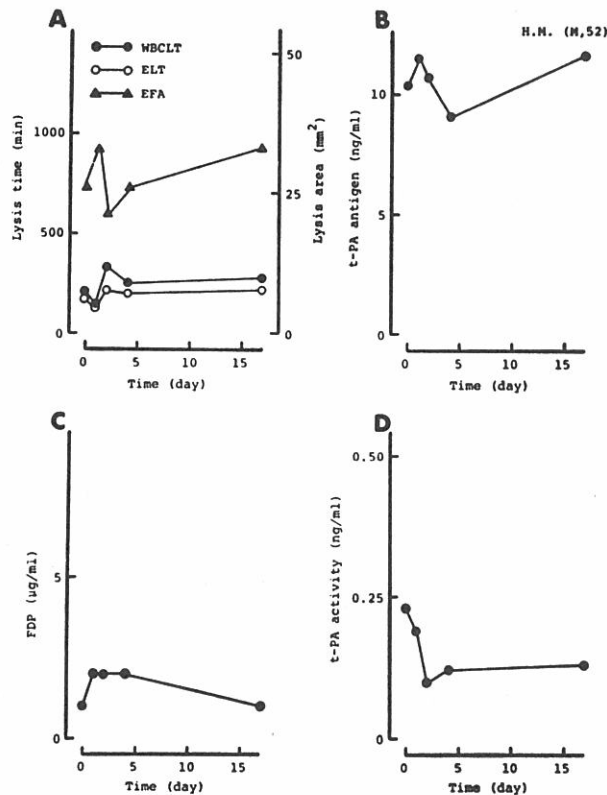


図 9. みみず乾燥粉末を実験前 3 年間服用していた場合の線溶系因子の変動。A: 図 6 と同じ, B: 図 7 と同じ, C: 図 8 と同じ, D: t-PA 活性を示す。(本文参照)

だ、この FDP の測定法では Fibrinogen の分解産物も測定にかかるという欠点があるため、その後開発されたフィブリンの分解産物のみを測定できる、D-dimer の測定を、数人のボランティアについて行ない、D-dimer も FDP と同様、24時間後に上昇することから、この FDP の上昇はフィブリン分解がおきていた証拠と考えている。この結果をさらに考察してみると、実験に協力し、みみずを服用した教室員は、時々偏頭痛があると云っていた一人を除き、全く健康であり、普通に研究を行っていた者達である。しかし、みみずの経口投与により、フィブリン分解産物が血中に増加したことは、全く健康にみえても、循環系の何処かにフィブリンが存在していたことを物語るものと思われた。その後、どの程度の年齢まで、この FDP 上昇がおこるのか調査した結果、20才前後の健康なヒトでは、FDP の上昇はみられなかった。「25才を過ぎたら血管の老化は既に始まっているのだ」という古くから云われている言葉があるが、25才位になると循環系の中でフィブリンの沈着が大なり小なり、存在しているのではないかと思われた。

さらに、面白いデータは図9に示した著者自身の結果である。前述した如く、この実験で用いた量より少ないが、既に3年前より毎日みみずの乾燥粉末を服用していた故か、図9Aに示す如く全血溶解時間、ユーグロブリン溶解時間、フィブリン平板の溶解面積とも、この実験の投与前から既に線溶活性が高かった。さらに、図9Bに示す如く、t-PA 抗原量も最初から高く、図9Dのようにt-PA 活性も充分にあった。また、この実験に参加した者の中で、最も高齢であり、循環系に存在するフィブリン塊は、一番多い筈と考えられるにもかかわらず、実験開始後、他の若い者の結果と異なり、図9Cに示す如く、FDP の上昇は殆んどみられなかった。この事実は実験開始前より服用していたみみず乾燥粉末により、t-PA が血中に充分あり、線溶活性も高く、循環系のフィブリンは、殆ど除去されていたと考えざるを得なかった。以上の

結果から、みみずの凍結乾燥粉末を経口投与することにより、血栓症の治療及び血栓症予防が可能であることを確信するに至った。

Ⅵ. 臨床応用への展望

この我々のみみずが血栓症治療に有効の可能性があるという研究結果が新聞に出て、暫くの後、中国から沢山の手紙が来た。それらによると、著者のみみずの記事が人民日報に掲載され、大変興味があるので詳細を知らせて欲しいというものであった。その中に、ハルビン師範大学の刘庆春と曲竞南という研究者から連絡があり、その一人の家に代々伝承されている、自然乾燥によるみみずの粉末作成法があり、その方法に従って作成したみみずの粉末を500人の脳血栓症の患者に経口投与した結果、70%以上に効果が認められたと報告してきた。その後、暫くして、また同じ人から、さらに2000人の脳血栓症患者に投与した結果でも70%以上が有効であったと連絡があった。中国の人間を使った研究の早いのに驚くとともに、この知らせは我々を大いに鼓舞するものであった。

このみみずの効用につき、日本のあちこちで話をすると、興味をもつ者もいるが、頭から馬鹿にして「変なことを始めましたね」と言う学者も多かった。ただ不思議なことに生理学者はみんな興味をもってくれた。しかし、臨床医の多くは、「漢方ですか」と殆どは相手にしてくれなかった。これでは日本国内での臨床研究を開始するのは無理かと思っていた時、偶々、同じ研究分野で知り合いだったソウル大学内科の李文鎬教授と話をしているうち、大変興味を示し、韓国において共同で臨床研究をしようということになった。韓国では、前述したように土龍魂という健康飲料があったが、余程それを信奉している人でもない限り、とても飲める代物ではないが、カプセルにしたものなら一般人にも抵抗なく服用できること、また、みみずについては古くから民間で種々の疾病に使っていることもあり、患者に投与することには問題がないとのことであった。そこで前述の線溶活性

物質の研究や、その後の研究成績をソウル大学で講演をした。その話を聞いた研究者達は皆興味を示したのを見て、韓国ではみみずに対する偏見は医学者にも少ないように思われた。その中でアメリカより帰国早々の朴 宣陽助教授が、東洋にもこんな素晴らしい血栓溶解療法の研究があったのかと、特に興味を示し、その後の韓国でのこのみみずによる臨床研究の中心になって成果をあげつつある¹⁷⁻¹⁹⁾。そのお蔭で韓国政府から医薬品としての許可も出て、龍心という商品名で医師が自由に処方できるようになった。

しかし、韓国では許可されているが、日本では医薬品としての認可がないので、著者の周辺で特に要望された方にサンプルとして差し上げ、その結果から将来への臨床応用の可能性を探ることにした。その中で、いくつか興味あるエピソードがあるので、それを紹介してみる。

前述の韓国での臨床研究の過程で糖尿病の患者に投与すると血糖値が下る傾向があるようだと聞いた。この話をある席でしていたら、その話を聞いていた医学部の某教授がその後、「私も糖尿病で食事制限をしているので、先生の薬を戴けませんか」と要望があった。こちらも糖尿病に関しては専門でもなく、半信半疑であったが、それまでの経験で特に副作用もみられないし、相手が医者でもあるしと思ってカプセルをお渡しした。半年位経った頃、血糖値の低下を示すデータとともに、「お蔭で食事制限はかなり前よりしなくても大丈夫になりました」と御礼に見えられた。その後、知り合いの一人に軽い糖尿病があるというので飲ませてみたところ、暫くして、その主治医が「貴方の血糖値が下がってきたけれど、なにか特別のことをしているのか」と言われ、著者の薬を服用していることを話したら、その主治医も糖尿病なので是非、それを飲みたいと申し出てきたというエピソードもあった。

しかし、この糖尿病に対する効果については、今後、さらに多くの医師の協力による厳重なコントロールの下で症例を重ねて追究しなけ

ればならないと思っているが、何れにしろ、現在、糖尿病については食事療法か、インスリン投与による対症療法だけであり、糖尿病そのものに対する有効な治療法はなく、もし、それが確立されたならば画期的なことになると期待している。

このみみずによる糖尿病の効果について、現在考えている機作は、膵の微少循環系にフィブリン沈着が起き、その微少循環障害によりインシュリン産生が障害され、成人性糖尿病がおきるが、その微少循環障害が線溶活性によって改善し、インシュリンの産生が復活するためではないかと考えている。事実、数人の若年性糖尿病の患者に投与してみたが全く効果はなかった。このみみずの投与による内分泌臓器の微少循環改善と思われる、もう一つのエピソードとして、60才を少し過ぎた著者の姉に投与したところ、暫くして「あれはホルモンか」という問い合わせがあった。聞いてみると、数年前前に閉経と思っていたのに、みみずを飲み出してから、また月経があるようになったとのこと。これらのことは、今まで余り考えられていなかったが、年齢とともにホルモン分泌が低下する原因として、内分泌臓器の微少循環障害は充分考えられることであり、血栓溶解療法により、それらを改善し得るのではないかと考えている。この他にも、他の治療法では全く効果がなかった肝機能障害がみみずの投与で改善したという症例等もあり、今後とも、この研究を理解してくれる共同研究者を見つけて、さらに症例を増やして報告したいと思っている。しかし、日本での医薬品の開発はなんと困難なものかと痛感しているのが今日此頃である。

Ⅶ. お わ り に

以上、述べてきたように、実験動物施設の排棄物処理から始まり、経口血栓溶解剤開発の可能性があるというところまでに至った。その間、多くの曲折はあったが、考えてみると、近代的医療と言われる治療法が行なわれるようになってまだ100年にも満たない。欧米で高度に発達

していたと考えられる外科療法ですら虫垂炎の手術が確立したのは今世紀になってからである。しかし、医療というのは恐らく人類始まって以来行なわれており、多くの人達の経験を積み重ね、それを伝承しながら疾病に対処してきた筈である。それらの中には全く無意味な治療法もあったであろうが、少なくとも、その住民に信頼を寄せられていた医師がおり、その医者による治療の中には、効果のある治療方法もあったにちがいない。事実、このみみずの仕事を初めて、前述の「神農本草経」をはじめ中国の古典医学書を繙いてみると宋時代に編纂された「重修政和証類本草」という本の中に、既に、この世から失なわれてしまった「日華子」という医学書の中に、みみずが中風に効果があったと書かれていたことが記載されている。既に、その詳細については調べる術もないが、現在の知識で考えると、中風というのは、恐らく現在の脳血管障害を意味していると考えられ、脳血管障害のうち、その半数は脳血栓症であったと思われる。従って、中風に対してみみずが効果があったことは、我々の結果から充分納得できるものである。最近、近代の医療では、仲々治療効果のあがらない疾病に対して、伝統的医療による治療法にも目が向けられ、鍼灸や気功に関心を持つ生理学者も出てきたが、漢方についても近代科学的視点から見直す必要もあるのではないかと考えている。

さらに、中国には「医食同源」とか「薬食同源」という言葉があり、病気に対する治療ばかりではなく、日常の食生活の中で健康や長寿に必要なものを摂ることを薦めている。我々の教室でも、既に、線溶活性をおこす食品関係についての研究を行ない、一つは焼酎の適当量を飲むことにより、血中に u-PA が増加することや²²⁾、納豆中から強い線溶活性を持つ Nattokinase を抽出し、報告している²¹⁾。これからも、いろいろの食品について研究を続け、面白いことが発見出来ればと期待している。

謝 辞

本文中にも述べた如く、この一連の研究を推進するに当って、種々の挫折を経験した。その時、常に励ましの言葉や御援助を頂戴した宮崎医科大学初代学長、勝本司馬之助先生、元神戸大学長、須田 勇先生、前富山医科薬科大学長、佐々 学先生、元名古屋市立大学長、故高木健太郎先生に心から感謝を申し上げます。

また、中国古典医学書について御指導、御助言を頂戴した九州大学文学部中国哲学科、町田三郎教授に感謝申し上げます。この研究は文部省、科研費 No. 01570047 による所が大きかったことを感謝する。

文 献

- 1) Akazawa, K., Matsuo, O., Kosugi, T., Mihara, H. & Mori, N. (1983) The role of plasminogen activator in ovulation. *Acta Physiol. Lat. Am.* **33**, 105-110
- 2) Bahl, K. N. & Lal, M. B. (1933) On the occurrence of Hepatopancreatic glands in the Indian earthworms of the genus *Eutyphoeus* Mich. *Quart. J. micr. Sci.* **76**, 107-177
- 3) Darwin, C. (1881) Vegetable mould and earthworms. John Murray, London.
- 4) 畑井新喜司(1930)復刻みみず。(1980年版)サイエンス社。東京、158-160
- 5) Keilin, D. (1920) On the pharyngeal or salivary gland of the earthworm. *Quart. J. micr. Sci.* **65**, 33-61
- 6) 江蘇新医学院(1980)中葯大辞典下巻、蚯蚓。上海科学技術院、上海、2111-2114
- 7) Matsuo, O., Rijken, D. C. & Collen, D. (1981) Comparison of the relative fibrinolytic and thrombolytic properties of tissue plasminogen activator and urokinase in vitro. *Thromb. Haemost.* **45**, 225-229
- 8) 美原 恒, 小杉忠誠, 松尾 理, 大木康雄, 松尾武文(1980)トラビジル経口投与による線溶亢進作用。新薬と臨床, **29**, 1599-1602
- 9) 美原 恒, 佐々木千佳子, 西松輝高, 善田国穂(1984)脳梗塞患者への塩酸ニカルジピン投与における線溶活性および血小板凝集能の変動について。薬理と治療, **12**, 1749-1756
- 10) 美原 恒(1981)みみずによる家畜糞処理に関する基礎的研究。「環境科学」研究報告集。B 108-R 33-10畜産廃棄物の有効利用に関する研究, 5-12
- 11) 美原 恒(1985)水産産廃棄物のミミズによる脱臭及び有効利用に関する基礎的研究。文部省環境科学特別研究 R-30。環境改善技術領域, 第2冊シンポジウム, R 37-4, 107

- 12) 美原 恒(1987)血栓溶解療法. 「治療学」**19**, 114-117
- 13) Mihara, H., Sumi, H., Mizumoto, H., Yoneta, T., Ikeda, R. & Maruyama, M. (1991) Oral administration of earthworm powder as a possible thrombolytic therapy. Recent Advances in Thrombosis and Fibrinolysis. Edited by Tanaka, K. Academic press, 東京, 287-298
- 14) Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M. & Maruyama, M. (1981) A Novel Fibrinolytic Enzymes extracted from the Earthworm *Lumbricus rubellus*. Jpn. J. Physiol. **41**.
- 15) Okamoto, S. (1959) Plasmin and antiplasmin. Their pathologic Physiology. Keio J. Med. **8**, 211-217
- 16) Okamoto, S. & Okamoto, U. (1962) Aminomethyl-cyclohexane-carboxylic acid : AMCHA. A new potent inhibitor of the fibrinolysis. Keio J. Med. **11**, 105-115
- 17) Park, S., Key, K. C. & Lee, M. (1989) Fibrinolytic activity of the earthworm powder in normal subjects and patients with thrombotic diseases. Korean J. Hematol **24**, 296
- 18) Park, S., Key, K. C., Lee, M., Sumi, H. & Mihara, H. (1989) A study on a new fibrinolytic protein extracted from *Lumbricus rubellus*; development of an oral fibrinolytic agent with fibrin selectivity. Korean J. Intern. Med. **37**(Suppl), 218
- 19) Park, S. & Lee, M. (1991) Antithrombotic effect of intravenous lumbrokinase administration on thrombin-induced thromboembolism in mice. Inter. J. Hematol. **64** (Suppl 1), 299
- 20) Sasaki, K., Matsuoka, N., Toki, N., Sumi, H. & Makita, T. (1980) Fibrinolytic and coagulation activity level during formation of experimental thrombus in dog's saphena vein. Life Sci. **29**, 1659-1665
- 21) Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. & Muraki, H. (1987) A novel fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese natto : a typical and popular soybean food in the Japanese diet. Experientia. **47**, 1110-1111
- 22) Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H. & Mihara, H. (1988) Urokinase-like plasminogen activator increased in plasma after alcohol drinking. Alc. Alc. **23**, 33-43
- 23) 田中伴吉, 額田 晋(1915)蚯蚓・解熱作用及び其有効成分ニツキテ. 東京医学会雑誌, **29**, 221-251
- 24) 米田智幸, 添田美津雄, 鈴木康高, 森山 茂, 須見洋行, 美原 恒(1988)新規なフラン化合物及びその製造法. 日本国特許庁・公開特許広報, 昭63-5088, 745-750

