

# 동물 및 인체시험을 통한 Nattokinase의 항응고 작용 및 섬유소 용해능 평가

김제범<sup>1</sup>, 유철배<sup>1</sup>, 신현만<sup>1</sup>, 정준기<sup>2</sup>, 장형욱<sup>1\*</sup>

## Evaluation of Nattokinase for Antithrombotic Effect and Pharmacological Efficacy by a Biological Test and Clinical Trial

Jae-Bum Kim<sup>1</sup>, Chul-Bae Yoo<sup>1</sup>, Hyun-Man Shin<sup>1</sup>, Joon-Ki Jung<sup>2</sup>, and Hyung-Wook Jang<sup>1\*</sup>

접수: 2011년 7월 21일 / 게재승인: 2011년 10월 21일  
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** *Bacillus subtilis natto* producing high level of a fibrinolytic enzyme was selected and Ultra Nattokinase<sup>®</sup> was manufactured by fermentation and purification. It was performed the evaluation of the antithrombotic effect of Ultra Nattokinase<sup>®</sup> (20,000 FU/g) with rat blood plasma. The maximum aggregation (inhibition ratio) was 71% (0%), 69% (2.8%), 62% (12.7%), 16% (77.5%) and 9% (87.3%), respectively, in the order of 0, 5, 10, 50 and 100 mg/mL of Ultra Nattokinase<sup>®</sup> solutions. Ultra Nattokinase<sup>®</sup> had antithrombotic effect, which was associated with the suppression of collagen-induced platelet aggregation. Ultra Nattokinase<sup>®</sup> in the topic of the FDP (fibrinogen degradation products) in blood coagulation tests showed a significant increasing trend. And based on the daily record of meal 39 people of ITT (what ?) group consisted with 19 people of NP (what ?) group and 20 people of PN (what ?) group except four people, two people who took vitamin K affecting the experiment and two people who took alcohol, finding to be taken Ultra Nattokinase<sup>®</sup> showed an increase in the FDP value after four weeks. In addition, FDP value of 41 people of ITT group

except two people having metabolic syndrome was increased by Ultra Nattokinase<sup>®</sup>.

**Keywords:** *Bacillus subtilis natto*, Ultra Nattokinase<sup>®</sup>, Antithrombotic effect, Pharmacological efficacy, FDP

### 1. 서론

산업 사회의 발전과 더불어 신체적 활동량의 감소와 식생활 형태의 점진적인 서구화로 인한 음식물 섭취량과 소비량의 불균형, 인구 구조의 고령화로 인하여 각종 성인병이 증가하는 추세이다. 그 중 순환기계 질환에 의한 사망률은 10만 명당 약 115명으로 보고되어 있으며 그 비율은 더욱 증가될 것으로 예상된다 (2006년 통계청). 이러한 만성적인 질병의 치료를 위하여 합성 의약품이 널리 사용되고 있으나 독성 및 안전성이 문제시 되면서 안전하고 효능이 있는 기능성 식품의 개발이 활발히 이루어지고 있다.

최근 일본의 natto, 발효우유, 한국의 김치, 청국장이나 식용 표고버섯 등 아시아의 전통음식에서 항응고 및 혈전 용해에 도움이 되는 효소들이 많이 발견되고 있다 [1]. 이러한 기능성 식품에서 추출 가능한 효소는 간편하고 효율적으로 대량 생산이 가능하며 장기간의 지속적인 섭취가 부작용이 없을 것으로 예상되는데 오늘날 문제가 되는 순환기계 질환 특히 혈전성 질환의 효과적인 예방에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다 [2].

Natto는 일본의 전통적인 콩 음식으로 외견상 치즈와 같으며 끈적끈적하고 냄새가 지독하다. Natto는 *Bacillus subtilis*

<sup>1</sup>케이피엑스바이오텍(주)

<sup>1</sup>KPX Bio-Tech Co., LTD., #201 Bio-Venture Center, KRIBB, Yuseong, Daejeon 305-806, Korea  
Tel: +82-42-864-4305, Fax: +82-42-864-4306  
e-mail: hwjang@kpxbiotech.com

<sup>2</sup>한국생명공학연구원

<sup>2</sup>Division of Biotechnology R&D, KRIBB, Yuseong, Daejeon 305-806, Korea

natto라는 미생물로 발효를 시킨 콩 음식으로 김치나 청국장 등의 발효음식을 즐기는 한국인에게는 낯설지 않은 음식이다 [3]. 하지만 natto는 고유의 냄새로 인해 이를 섭취하는데 어려움을 느끼는 사람들 또한 적지 않다. 따라서 natto에서 혈전용해 및 항응고 작용을 가지는 특이 성분을 추출하여 복용한다면 보다 많은 사람들이 도움이 될 수 있을 것으로 생각한다. 여러 연구를 통하여 nattokinase로 불리는 혈전용해 기능을 가진 효소가 natto로부터 추출되었고 일본과 미국 등지에서 NKCP Natto Tabs (이하 NKCP)이란 제품명으로 유통되고 있다 [4,5].

최근 증가된 혈액응고경향 (hypercoagulability) 및 동맥경화의 원인으로 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 증가가 보고되고 있는데 PAI-1의 증가는 노화, 비만, 스트레스, 인슐린 저항성 등과 연관이 있다고 알려져 있다. 이러한 PAI-1의 증가에 관계되는 인자들은 현대인들의 생활 습관의 변화로부터 기인하는 것들이다. Nattokinase의 항혈전 (섬유소용해) 작용의 기전으로는 이러한 PAI-1의 불활성화 및 억제 등이 제시되고 있으며 또한 plasmin처럼 직접 섬유소 응괴 (fibrin clots)에 작용하여 용해를 야기하는 기전이 함께 존재하는 것으로 보고되고 있다 [6,7].

Nattokinase의 항응고 효과에 대한 동물시험 결과를 보면 이 항응고 효과는 용량 의존성을 나타내었다. 건강 지원자를 대상으로 시행된 경구 투여 인체 시험에서 nattokinase 장기 복용에 따른 부작용은 보고되지 않았으며 섬유소 용해 지표 (ELT: Euglobulin Lysis Time)의 변화를 확인할 수 있었다 [8-10].

현재까지 혈전 용해제는 급성 폐쇄성 혈관질환에서 폐쇄된 혈관의 재관류를 위하여 t-PA나 Urokinase를 전신 정맥혈이나 폐쇄된 혈관에 직접 주입하는 비경구적 요법의 형태로 사용되고 있다. 이런 급성 상황에서의 혈전 용해제의 투여는 혈전에 의한 혈관 폐쇄로부터 자극된 인체의 항상성 기전에 의한 섬유소 용해 작용을 강화시킴으로써 재관류와 더불어 출혈성 부작용을 나타낼 수 있다. 또한 혈관 폐쇄 환자들은 비정상적 혈관 신생이 촉진되는바 이는 출혈성 부작용의 가능성을 더욱 높일 수 있으므로 혈관의 폐쇄가 진행되어 사용하는 혈전 용해제의 사용은 제한적일 수밖에 없다 [11-13]. 따라서 현대 생활습관으로부터 야기되는 증가된 혈액 응고경향 (hypercoagulability) 및 저하된 섬유소 용해 (hypofibrinolysis) 상태를 혈관 폐쇄가 진행되기 전에 적절히 회복시킬 수 있다면 많은 질병의 예방에 큰 도움이 될 것이다.

이러한 배경하에서 nattokinase는 인체의 혈전 억제의 항상성 기전을 강화시키는 하나의 후보 물질이 될 수 있을 것으로 기대된다. 동물 실험에서 확인된 용량 의존성에 근거하여 과도한 혈액 응고 저해 및 섬유소 용해를 나타내지 않는 적정 용량의 nattokinase가 투여되었을 때 체내의 지혈 및 섬유소 용해 항상성 기전을 자극하는데 도움이 될 것이다. 그러나 인체의 지혈 및 섬유소 용해 항상성 기전은 아주 미세하게 조절되어 우리 몸의 혈액 응고 지표는 항상 일정 수준을 유지하게 된다. 따라서 환자의 치료를 위한 목적이 아니라면 이 혈액 응고 지표를 인위적으로 정상 범위 이상 혹은 이하로 유지하는 것은 부작용 (과응고, 출혈)만을 초래하게 되어 정당

성이 없을 것으로 보인다. 또한 다른 생화학적 지표와 다르게 혈액응고 지표만을 보고 임상적으로 의미있는 혈전 질환의 위험군을 분류하기도 어렵다. 이에 본 연구에서는 비록 그 측정치가 정상 범위 내에 존재한다고 하더라도 nattokinase 투여 후 각 개인에서의 혈액 응고 지표의 변화를 nattokinase의 약리학적 활성으로 보고 이러한 변화가 위약군에 비해 유의하게 존재하는지를 확인하고자 하였다.

대사 증후군이란 고혈압, 당뇨병, 이상지질혈증, 비만, 고인슐린혈증 등 여러가지 심혈관계 위험 인자가 군집해서 나타나는 경우를 말하며, 1933년에 X syndrome이라 명명하며 인식되기 시작하였고 1980년대 후반에 Reaven에 의해 정립되었다. 대사 증후군의 진단 기준은 WHO와 National Cholesterol Education Panel (NCEP)의 Adult Treatment Panel (ATP) III 보고서에서 제시한 기준을 사용하고 있다 (Table 1). 대사성 증후군이 갖는 임상적 의미는 이런 증후군을 가진 환자는 관상 동맥 질환, 심근 경색증, 뇌졸중의 위험이 3배로 증가하며 결과적으로 생존율이 감소한다는 데 있다. 내당능 장애나 공복혈당 장애를 가진 환자가 대사성 증후군을 갖는 경우 심혈관계 사망률 증가로 인해 생존율이 감소한다는 사실에서 대사성 증후군을 갖는 공복 혈당 장애 환자를 고위험군으로 생각하고 약물 치료를 시작해야 할 필요성이 제기된다.

**Table 1.** Definitions of the metabolic syndrome

	<b>Diabetes or impaired glucose tolerance or insulin resistance and 2 of the following</b>
	1. Dyslipidemia Triglycerides $\geq$ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) and/or HDL $<$ 35 mg/dL ( $<$ 0.9 mmol/L) for men, $<$ 39 mg/dL ( $<$ 1.0 mmol/L) for women
WHO (1999)	2. Hypertension Blood pressure $\geq$ 140/90 mmHg and/or Medication
	3. Obesity Waist to hip ratio: $>$ 0.9 (men), $>$ 0.85 (women) or BMI $>$ 30 kg/m <sup>2</sup>
	4. Microalbuminuria urinary albumin to creatinine ratio: 30 mg/g or albumin excretion rate: 20 $\mu$ g/min
	<b>3 of the following</b>
	1. Fasting (what ?) plasma glucose $\geq$ 110 mg/dL (6.1 mmol/L)
	2. Hypertriglyceridaemia Triglycerides $\geq$ 150 mg/dL (1.7 mmol/L)
NCEP ATP III (2001)	3. Low HDL cholesterol HDL $<$ 40 mg/dL for men, $<$ 50 mg/dL for women
	4. Hypertension Blood pressure $\geq$ 130/85 mmHg and/or Medication
	5. Central obesity Waist circumference: $>$ 102 cm (40 in) in men, $>$ 88 cm (35 in) in women

Nattokinase는 식품으로서 일본과 미국 등지에서 복용되고 있으나 국내에서 보다 안전하고 효과적인 사용을 위하여 제품을 개발하고 정상인과 대사 증후군을 대상으로 제품의 안전성과 유효성에 대한 결과를 평가하고자 위약대조, 단일 기관, 무작위배정, 이중맹검 교차설계 하에 인체 시험을 계획하게 되었다.

본 연구에서는 *Bacillus subtilis natto* 균을 혈전 용해 효능이 높은 균을 선별하고 이를 발효 배양 후 여과 농축하여 동결 건조한 다음 동물 실험 및 인체 시험을 통해 혈전 용해 효과를 연구하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료

*Bacillus subtilis natto* (KCCM 12027) 균주는 Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM)으로 부터 구입하였다. 균주 분리에 사용한 LB 배지의 yeast extract, tryptone은 Difco사의 제품을 사용하였고, skim milk는 Fluka사의 제품을 사용하였다. Fibrinogen, thrombin은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

### 2.2. 균주 선별

혈전용해효소에 대한 생산성이 높은 균주는 LB plate (1% bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar)에 1.5% skim milk가 포함된 고체 평판 배지에 도말하여 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주를 LB broth에 37°C에서 18시간 시험관 배양 후 원심 분리하여 상등액으로 fibrin plate에서 혈전용해 활성을 확인하여 2차 선별하였다 [14].

### 2.3. 발효 및 제품제조

선별한 혈전 용해 활성이 높은 균주를 이용하여 배지 조성 (2% dextrin, 2% soybean meal, 0.5% yeast extract, 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.02%  $CaCl_2$ , 0.2%  $K_2HPO_4$ , 0.02%  $Na_2HPO_4$ )를 활용하여 배양 온도 및 pH는 각각 37°C, 7.0으로 10시간 발효 배양 후 여과 농축하여 동결건조 한 다음 Anson법으로 측정하여 혈전 용해 활성이 20,000 FU/g인 Ultra Nattokinase® (KPX Bio-Tech Co., LTD.)를 제조하였다 [15].

### 2.4. 동물 시험 방법

제조한 Ultra Nattokinase®가 혈액 응고에 미치는 영향을 알아보기 위해 랫드의 혈액에서 분리한 혈장을 사용하여 검정하였다. 시험은 시험물질을 처리하지 않은 음성 대조군 (control)과 5, 10, 50, 100, 500 mg/mL로 농도를 설정하였다.

검체로 사용된 동물은 10주령 수컷 SD 랫드 5마리를 사용하여 랫드의 혈액을 3.2-3.8%의 sodium citrate가 함유된 15 mL 튜브에 넣고, 채혈한 혈액을 1000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 적혈구를 침강시키고, 혈소판의 농도를  $3 \times 10^8$  cells/mL로 맞춰서 PRP (Platelet Rich Plasma)로 사용하였다. 혈액응고 측정은 3시간 내에 실시하였고, 검체는 실온에서 보관하였다.

혈액응고 측정은 aggregometer의 튜브에 혈장 450  $\mu$ L를 넣고 3분간 안정화시킨 후, 튜브에 시험물질을 10  $\mu$ L를 넣고 30초 동안 교반침과 같이 교반하였다. 콜라겐 (최종농도 1  $\mu$ g/mL) 20  $\mu$ L를 튜브에 넣은 후 aggregometer로 항응고 활성을 측정하였다 [16].

### 2.5. 인체 시험 방법

인체 시험은 정상인 또는 대사 증후군에게 기능성 식품인

Ultra Nattokinase®를 경구 투여하였을 때 혈액 응고계에 미치는 영향을 평가하기 위해 치료 집단 배정은 NP그룹 (1기 : nattokinase, 2기 : placebo) 혹은 PN그룹 (1기 : placebo, 2기 : nattokinase)에 1 : 1의 비율로 한 군에 무작위로 배정되었다. 임상 시험에 참여한 남성 피험자는 NP군에서 10명 (45.5%), PN군에서 4명 (19.0%)이었으며, 여성 피험자는 NP군에서 12명 (54.5%), PN군에서 17명 (81.0%)이었다.

유효성 평가 분석의 주 분석 대상은 ITT (Intent to treat) set으로 하고 PP (Per Protocol) set을 보조분석대상으로 한다. ITT 분석 대상자 수는 43명 (NP군 22명, PN군 21명), PP 분석 대상자 수는 36명 (NP군 20명, PN군 16명)로 위약대조, 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 교차설계 인체시험을 실시하였다.

투여 용량과 투여 방법은 Ultra Nattokinase® 혹은 Ultra Nattokinase® 위약으로서 1일 3회 (1회 1 capsule) 경구 투여하고, 투여 기간은 유효성을 보기 위한 용량으로서 600 mg/day을 시험용량으로 설정하고 총 8주의 시험 기간 중 4주의 투약 및 1주의 휴약기를 두는 교차 시험 및 중간 방문을 실시하여 안전성을 확보하고자 하였다.

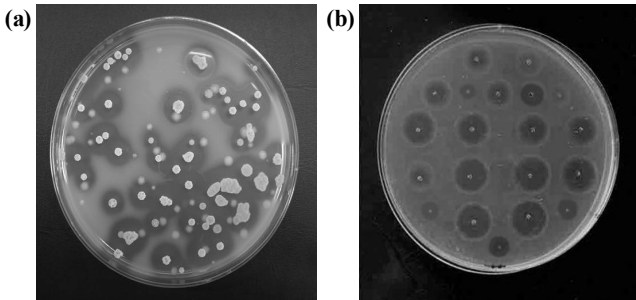
유효성 평가는 Ultra Nattokinase® 또는 위약의 복용 시점을 각각의 기저 시점으로 정의하고, 기저 시점 대비 복용 후 4주에서의 평균 변화량에 대하여 복용효과 (직접효과), 시기효과, 잔류효과 (이월효과)에 대하여 ANOVA를 시행한다. Ultra Nattokinase® 또는 위약에서의 잔류 효과가 있는 경우에는 두 시기의 자료를 모두 사용하는 교차 계획법의 장점이 없어지게 되므로 일차적으로 두 군간의 잔류 효과가 다른지 검정하며, 두 군간의 잔류 효과는 같다 (차이가 없다)는 결론 하에, 두 군간의 복용효과 (직접 효과)에 대한 차이 검정을 시행하였다. 또한 두 군간의 잔류 효과가 없다는 결론 하에, 시기 효과에 대한 차이 검정을 시행하였다.

안전성 분석의 대상은 safety set으로 하고 대상이 되는 자료는 임상 시험 의약품 투여 후 새로이 발생한 이상 반응과 각 방문 시 실시한 활력 징후 및 임상 병리로 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 균주 선별 및 제품 제조

혈전 용해능이 높은 균주를 선별하기 위해 LB배지에 1.5% skim milk가 포함된 고체 평판배지에 도말하여 37°C에서 12시간 배양한 후 분해환이 생기는 single colony를 1차 선별하였다 (Fig. 1(a)). 1차 선별한 균주의 혈전 용해능을 확인하기 위해 상기에서 선별한 균주를 LB broth를 이용 시험관에 37°C에서 18시간 배양하여 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상등액을 혈전 용해 효소액으로 사용하였다. 혈전 용해 효소를 fibrin plate위에 각각 10  $\mu$ L씩 점적하여 37°C에서 4시간 반응 후 분해환의 크기를 비교하여 투명한 크기가 큰 균주를 2차 선별하였다 (Fig. 1(b)). 선별한 균주를 이용하여 5 L 발효조로 배양하여 배양액을 여과해 균체를 제거하고 여과액을 농축한 후 동결 건조하여 20,000 FU/g의 Ultra Nattokinase®를 제조하였다.



(a) Formation of clear zone on the LB agar plate containing 1.5% skim milk for 12 h at 37°C. (b) Fibrinolytic activity on the 0.5% fibrin plate with the culture supernatants of strains. The culture supernatants were loaded on the fibrin plate and incubated for 4 h at 37°C. Fibrin plate contains 0.5% fibrinogen treated with thrombin.

**Fig. 1.** Clear zone on LB plate containing 1.5% skim milk (a) and 0.5% fibrin plate (b).

**3.2. 랫드를 이용한 Ultra Nattokinase®의 혈액 응고에 미치는 영향 검증**

제조한 Ultra Nattokinase®로 혈액 응고에 미치는 영향을 랫드의 혈액에서 분리한 혈장을 사용하여 검증하였다. 시험물질인 Ultra Nattokinase®가 높은 농도인 500 mg/mL에서는 100% 용해되지않아 이를 제외한 나머지의 농도에서 항응고 영향을 측정할 수 있었다. 음성대조군의 경우 응고 비율 (Maximum Aggregation (%), MA)이 71%였으나, Ultra Nattokinase® 5 mg/mL (100 FU/mL)에서는 69%로 2.8% 억제, 10 mg/mL (200 FU/mL)에서는 62%로 12.7% 억제, 50 mg/mL (1,000 FU/mL)에서는 16%로 77.5% 억제, 100 mg/mL (2,000 FU/mL)에서 9%로 87.3% 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 위의 결과는 간단하게 콜라겐을 이용한 혈액 응고에 미치는 영향을 측정한 것으로 시험물질 Ultra Nattokinase®는 항응고 작용이 있는 것으로 판단되었다.

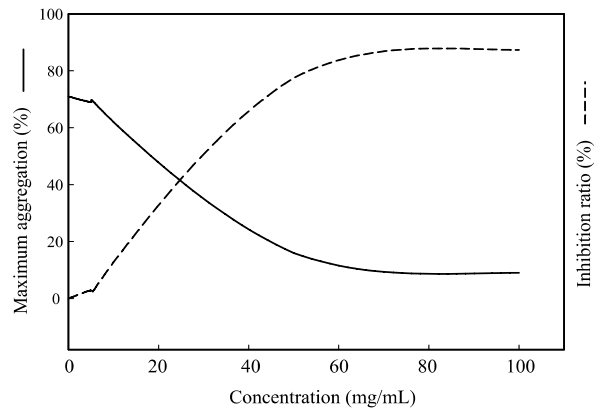
**3.3. 정상인 또는 대사 증후군에게 Ultra Nattokinase®를 경구 투여하였을 때 혈액 응고계에 미치는 영향 평가**

정상인 또는 대사 증후군에게 Ultra Nattokinase®를 경구 투여하였을 때 혈액 응고계에 미치는 영향 평가를 위해 검사 집단은 NP그룹 혹은 PN그룹에 1 : 1의 비율로 한 군에 무작위 배정하고, 유효성 평가 분석의 주 분석 대상은 ITT (Intent to treat) set 으로 하고 PP (Per Protocol) set을 보조

분석대상으로 분석하였다. ITT군중 NP군 22명, PN군 21명 총 43명의 ITT군을 대상으로 기저 시점과 비교하여 복용 후 4주에서의 혈액 응고 검사 항목별 중 FDP의 평균 변화량을 알아보았다.

**3.4. 기저 시점 대비 복용 후 4주에서의 혈액 응고 검사 항목별 변화량, ITT군**

FDP에서 NP군은 시험약을 복용한 1차 복용 후에는  $0.1 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ 이 감소하는 결과가 나타났다. PN군은 대조약을 복용한 1차 복용 후 변화가 없었으며, 시험약을 복용한 2차 복용 후에는  $0.2 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ 이 증가하는 결과가 나타났다. 이러한 시험약과 대조약의 잔류효과는 p-value = 0.9058으로 잔류효과가 없음을 알 수 있으며, 시험약과 대조약의 개선효과 차이 (복용효과)를 살펴보면 p-value = 0.0583이었다 (Table 2).



**Fig. 2.** Collagen induced platelet aggregation and inhibition ratio in plasma of rats treated with Ultra Nattokinase®.

**3.5. 기저 시점 대비 복용 후 4주에서의 혈액 응고 검사 항목별 변화량, PP군**

PP군은 NP군 20명, PN군 16명 총 36명의 PP군을 대상으로 기저 시점과 비교하여 복용 후 4주에서의 혈액 응고 검사 항목 중 중 FDP의 평균 변화량을 알아보았다. FDP에서 NP군은 시험약을 복용한 1차 복용 후  $0.2 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ 이 증가하였으며, 대조약을 복용한 2차 복용 후에는  $0.1 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ 이 증가하는 결과가 나타났다. PN군은 대조약을 복용한 1차 복용 후  $0.1 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ 이 증가하였으며, 시험약을 복용한

**Table 2.** Change in FDP ( $\mu\text{g/mL}$ ) compared to patients with nattokinase or placebo-ITT (Intent-to-treat) treatment Group, One-tail test

항목	NP군		PN군		effect	F	p-value
	Period 1 Nattokinase (N = 22) (Mean $\pm$ SD)	Period 2 Placebo (N = 22) (Mean $\pm$ SD)	Period 1 Placebo (N = 21) (Mean $\pm$ SD)	Period 2 Nattokinase (N = 21) (Mean $\pm$ SD)			
FDP ( $\mu\text{g/mL}$ )							
기저 시점	$0.7 \pm 0.3$	$0.9 \pm 0.5$	$0.6 \pm 0.3$	$0.6 \pm 0.3$	시기효과	1.35	0.2513
복용 후 4주	$0.9 \pm 0.4$	$1.0 \pm 0.5$	$0.6 \pm 0.3$	$0.9 \pm 0.4$	복용효과	3.79	0.0583
Difference	$-0.2 \pm 0.4$	$-0.1 \pm 0.4$	$0.0 \pm 0.3$	$-0.2 \pm 0.4$	잔류효과	0.01	0.9058

• Difference: 기저시점에서의 평균 검사치 - 복용 후 4주 평균 검사치

**Table 3.** Change in FDP (µg/mL) compared to patients with nattokinase or placebo-PP (Per-protocol) treatment Group, One-tail test

항목	NP군		PN군		effect	F	p-value
	Period 1	Period 2	Period 1	Period 2			
	Nattokinase (N = 20) (Mean ± SD)	Placebo (N = 0) (Mean ± SD)	Placebo (N = 16) (Mean ± SD)	Nattokinase (N = 16) (Mean ± SD)			
FDP (µg/mL)							
기저 시점	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.5	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.3	시기효과	0.76	0.3888
복용 후 4주	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.5	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.4	복용효과	2.62	0.1150
Difference	-0.2 ± 0.4	-0.1 ± 0.4	-0.1 ± 0.3	-0.3 ± 0.4	잔류효과	0.01	0.9107

• Difference: 기저시점에서의 평균 검사치 - 복용 후 4주 평균 검사치

**Table 4.** Change in FDP (µg/mL) compared to patients according to food intake with nattokinase or placebo-ITT (Intent-to-treat) treatment Group, One-tail test

항목	NP군		PN군		effect	F	p-value
	Period 1	Period 2	Period 1	Period 2			
	Nattokinase (N = 19) (Mean ± SD)	Placebo (N = 19) (Mean ± SD)	Placebo (N = 20) (Mean ± SD)	Nattokinase (N = 20) (Mean ± SD)			
FDP (µg/mL)							
기저 시점	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.5	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.3	시기효과	0.78	0.3833
복용 후 4주	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.5	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.4	복용효과	4.75	0.0358*
Difference	-0.2 ± 0.4	-0.1 ± 0.4	0.0 ± 0.3	-0.2 ± 0.4	잔류효과	0.01	0.9045

• Difference: 기저시점에서의 평균 검사치 - 복용 후 4주 평균 검사치.

\* 통계적으로 유의한 차이가 있음을 나타냄.

**Table 5.** Change in FDP (µg/mL) compared to patients except metabolic syndrome with nattokinase or Placebo-ITT (Intent-to-treat) treatment Group, One-tail test

항목	NP군		PN군		effect	F	p-value
	Period 1	Period 2	Period 1	Period 2			
	Nattokinase (N = 21) (Mean ± SD)	Placebo (N = 21) (Mean ± SD)	Placebo (N = 20) (Mean ± SD)	Nattokinase (N = 20) (Mean ± SD)			
FDP (µg/mL)							
기저 시점	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.5	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.3	시기효과	1.49	0.2303
복용 후 4주	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.5	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.4	복용효과	3.82	0.0579
Difference	-0.2 ± 0.4	-0.1 ± 0.4	0.0 ± 0.3	-0.2 ± 0.4	잔류효과	0.10	0.7558

• Difference: 기저시점에서의 평균 검사치 - 복용 후 4주 평균 검사치.

2차 복용 후에는 0.3 ± 0.4 µg/mL이 증가하는 결과가 나타났다. 이러한 시험약과 대조약의 잔류 효과는 p-value = 0.9107으로 잔류효과가 없음을 알 수 있으며, 시험약과 대조약의 개선 효과 차이 (복용효과)를 살펴보면 p-value = 0.1150로 나타났다 (Table 3).

**3.6. 식이섭취에 따른 유효성 분석**

식사 일지를 근거로 한 추가 분석으로 각 방문별 3일 간의 식사 기록지에서 혈액 용해능에 영향을 미치는 비타민K를 섭취한 피험자 2명, 알코올 섭취 피험자 2명으로 총 4명의 피험자를 ITT군에서 제외한 NP군 19명, PN군 20명 총 39명을 대상으로 기저 시점과 비교하여 복용 후 4주에서의 FDP의 평균 변화량은 NP군의 경우 시험약을 복용한 1차 복용 후 0.2 ± 0.4 µg/mL이 증가하였으며, 대조약을 복용한 2차 복용 후에는 0.1 ± 0.4 µg/mL이 증가하는 결과가 나타났다. PN군은

대조약을 복용한 1차 복용 후 변화가 없었으며, 시험약을 복용한 2차 복용 후에는 0.2 ± 0.4 µg/ml이 증가하는 결과가 나타났다. 이러한 시험약과 대조약의 잔류효과는 p-value = 0.9494으로 잔류효과가 없음을 알 수 있으며, 시험약과 대조약의 개선효과 차이 (복용효과)를 살펴보면 p-value = 0.0468으로 통계적으로 유의한 차이가 있음을 보였다 (Table 4).

**3.7. 대사 증후군 피험자 제외 유효성 분석**

ITT군에서 대사 증후군 피험자 2명을 제외한 NP군 21명, PN군 20명 총 41명의 정상인을 대상으로 기저 시점과 비교하여 복용 후 4주에서의 FDP의 평균 변화량은 NP군의 경우 시험약을 복용한 1차 복용 후 0.2 ± 0.4 µg/mL이 증가하였으며, 대조약을 복용한 2차 복용 후에는 0.1 ± 0.4 µg/mL이 증가하는 결과가 나타났다. PN군은 대조약을 복용한 1차 복용 후 변화가 없었으며, 시험약을 복용한 2차 복용 후에는

Table 6. Safety evaluation-adverse events

발생여부	NP군		PN군		전체		p-value
	명	%	명	%	명	%	
유	6	27.3	6	28.6	12	27.9	0.9244
무	16	72.7	15	71.4	31	72.1	
증상명	건수	%	건수	%	건수	%	
Chronic tonsillitis	2	22.2	0	0.0	2	10.5	
Headache	0	0.0	2	20.0	2	10.5	
Necrosis of pulp	2	22.2	0	0.0	2	10.5	
ALT 상승	1	11.1	0	0.0	1	5.3	
Acute bronchitis	1	11.1	0	0.0	1	5.3	
Acute nasopharyngitis	0	0.0	1	10.0	1	5.3	
Allergic rhinitis	1	11.1	0	0.0	1	5.3	
Cheilitis	1	11.1	0	0.0	1	5.3	
Conjunctivitis	0	0.0	1	10.0	1	5.3	
Dysmenorrhea	0	0.0	1	10.0	1	5.3	
Foreignbody sensation	0	0.0	1	10.0	1	5.3	
Indigestion	0	0.0	1	10.0	1	5.3	
Irritable bowel syndrome	0	0.0	1	10.0	1	5.3	
Thyroid nodule	0	0.0	1	10.0	1	5.3	
Tinea pedis (Rtfoot)	1	11.1	0	0.0	1	5.3	
Tubular adenoma with moderate atypism colonic muco	0	0.0	1	10.0	1	5.3	
합계	9	100.0	10	100.0	19	100.0	

0.2 ± 0.4 µg/mL이 증가하는 결과가 나타났다. 이러한 시험약과 대조약의 잔류 효과는 p-value = 0.7558으로 잔류 효과가 없음을 알 수 있으며, 시험약과 대조약의 개선 효과 차이 (복용 효과)를 살펴보면 p-value = 0.0579로 나타났다 (Table 5).

### 3.8. 이상 반응 발현률

안정성 분석은 선정/제외 기준을 만족하여 임상 시험에 참여하기에 적합한 총 43명의 피험자가 안전성 평가에 대한 분석 대상이 되었다. 전체 피험자 43명 중 이상 반응이 발생한 경우는 NP군에서 6명 (27.3%), PN군에서 6명 (28.6%)으로 총 12명의 피험자에게서 이상 반응이 발생하였다. 이에 대하여 분석한 결과 두 군에서 이상 반응 발현률에 대해서는 유의하게 나타나지 않았다. 본 임상시험 과정 중 12명의 피험자에게서 이상 반응이 발생하였지만 본제와는 관련이 없는 것으로 나타났으며, 이상 반응으로 인한 중도 탈락은 없었고, 임상 시험을 진행하면서 중대한 이상 반응이 나타난 피험자는 없었다 (Table 6).

## 4. 결론

본 연구는 *Bacillus subtilis natto*를 이용하여 혈전 용해능이 높은 균주를 선별하고 선별한 균주를 발효, 정제하여 Ultra Nattokinase<sup>®</sup> (20,000 FU/g)를 제조하였다. 제조한 Ultra Nattokinase<sup>®</sup>를 랫드의 혈액에서 분리한 혈장을 사용한 항응고 효력을 검정한 결과 음성 대조군의 비율이 71%, Ultra Nattokinase<sup>®</sup> 5 mg/mL에서는 69%로 2.8% 억제, 10 mg/mL에서는 62%로 12.7% 억제, 50 mg/mL에서는 16%로 77.5% 억제, 100 mg/mL에서 9%로 87.3% 억제하는 것으로 나타났다. 콜라겐을 이용한 혈액 응고에 미치는 영향을 검정

하여 시험물질 Ultra Nattokinase<sup>®</sup>가 항응고 활성이 있음을 확인하였다.

인체시험 결과에서는 시험약과 대조약 간의 혈액 응고 검사 중 FDP 항목에서 유의한 증가 경향을 보였으며, 식사 일지를 근거로 한 추가분석으로 각 방문별 3일 간의 식사 기록지에서 혈액 용해능에 영향을 미치는 비타민K를 섭취한 피험자 2명, 알코올 섭취 피험자 2명, 총 4명의 피험자를 ITT군에서 제외한 NP군 19명, PN군 20명 총 39명을 대상으로 기저 시점과 비교하여 복용 후 4주에서의 FDP의 평균 변화량은 NP군의 경우 시험약을 복용한 1차 복용 후 0.2 ± 0.4 µg/mL이 증가하였으며, 대조약을 복용한 2차 복용 후에는 0.1 ± 0.4 µg/mL이 증가하는 결과가 나타났다. PN군은 대조약을 복용한 1차 복용 후 변화가 없었으며, 시험약을 복용한 2차 복용 후에는 0.2 ± 0.4 µg/mL이 증가하는 결과가 나타났다.

또한 ITT군에서 대사 증후군 피험자 2명을 제외한 NP군 21명, PN군 20명 총 41명의 정상인을 대상으로 기저 시점과 비교하여 복용 후 4주에서의 FDP의 평균 변화량은 NP군의 경우 시험약을 복용한 1차 복용 후 0.2 ± 0.4 µg/mL이 증가하였으며, 대조약을 복용한 2차 복용 후에는 0.1 ± 0.4 µg/mL이 증가하는 결과가 나타났다. PN군은 대조약을 복용한 1차 복용 후 변화가 없었으며, 시험약을 복용한 2차 복용 후에는 0.2 ± 0.4 µg/mL이 증가하는 결과가 나타났다.

다음으로 소그룹 (subgroup)으로 분류하여 성별에 따라 NP군 21명, PN군 20명 총 43명을 ITT군 대상으로 기저 시점과 비교하여 복용 후 4주에서의 fibrinogen의 평균 변화량의 시험약과 대조약이 차이가 있는지 알아보았다. 남자의 경우 NP군은 시험약을 복용한 1차 복용 후 10.3 ± 25.7 mg/dL이 감소하였으며, 대조약을 복용한 2차 복용 후에는 6.1 ±

30.8 mg/dL이 감소하는 결과가 나타났다. PN군은 대조약을 복용한 1차 복용 후  $1.25 \pm 12.9$  mg/dL이 감소하였으며, 시험약을 복용한 2차 복용 후에는  $35.0 \pm 33.5$  mg/dL이 증가하는 결과가 나타났다. 이러한 시험약과 대조약의 잔류 효과는  $p\text{-value} = 0.0931$ 으로 잔류효과가 없었으며, 시험약과 대조약의 개선효과 차이 (복용효과)를 살펴보면  $p\text{-value} = 0.0931$ 으로 나타났다. 하지만 ITT군에서 모든 피험자를 대상으로 분석한 fibrinogen의 시험약과 대조약의 개선 효과 차이 ( $p\text{-value} = 0.4326$ )보다  $p\text{-value}$ 가 감소됨을 알 수 있다.

이상의 결과로 Ultra Nattokinase<sup>®</sup>는 랫드 실험에서 항응고 활성을 보였으며, 인체 시험에서는 ITT군에서 식사 일지를 근거로 한 추가 분석 및 대사 증후군 피험자 2명을 제외한 분석에서 NP, PN군 모두에서 FDP가 증가하는 양상을 보여 인체의 혈전 억제에의 향상성 기전을 강화시키는데 유익하게 작용할 것으로 판단된다.

## 감사

본 연구는 바이오 푸드 네트워크 사업단의 기능성 평가 인체 적용 시험과제로 수행되었습니다.

## References

1. Fujita, M., K. Nomura, K. Hong, Y. Ito, A. Asada, and S. Nishimuro (1993) Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 1340-1347.
2. Al Dieri R., S. Alban, S. Béguin, and H. C. Hemker (2004) Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. *J. Thromb. Haemost.* 2: 1395-1401.
3. Chang, Y. Y., J. S. Liu, S. L. Lai, H. S. Wu, and M. Y. Lan (2008) Cerebellar hemorrhage provoked by combined use of nattokinase and aspirin in a patient with cerebral microbleeds. *Intern. Med.* 47: 467-469.
4. Omura, K., M. Hitosugi, X. Zhu, M. Ikeda, H. Maeda, and S. Tokudome (2005) A newly derived protein from *Bacillus subtilis natto* with both antithrombotic and fibrinolytic effects. *J. Pharmacol. Sci.* 99: 247-251.
5. Omura, K., M. Hitosugi, K. Kaketani, X. Zhu, H. Maeda, and S. Tokudome (2004) Fibrinolytic and anti-thrombotic effect of NKCP, the protein layer from *Bacillus subtilis natto*. *Biofactors* 22: 185-187.
6. Maat, M. P., A. C. de Bart, B. C. Hennis, P. Meijer, A. C. Havelaar, P. G. Mulder, and C. Kluft (1996) Interindividual and intraindividual variability in plasma fibrinogen, TPA antigen, PAI activity, and CRP in healthy, young volunteers and patients with angina pectoris. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 1156-1162.
7. Yamamoto, K., K. Takeshita, T. Kojima, J. Takamatsu, and H. Saito (2005) Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. *Cardiovasc. Res.* 66: 276-285.
8. Borawski, J. and M. Myśliwiec (2001) Plasma fibrinogen level is an important determinant of prolonged euglobulin clot lysis time in hemodialysis patients. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 7: 296-299.
9. Kowalski, E., M. Kopec, and Niewiarowski (1959) An evaluation of the euglobulin method for the determination of fibrinolysis. *J. Clin. Pathol.* 12: 215-218.
10. Sumi, H., H. Hamada, K. Nakanishi, and H. Hiratani (1990) Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematologica* 84: 139-143.
11. Sasaki, K., S. Moriyama, Y. Tanaka, H. Sumi, N. Toki, and K. C. Robbins (1985) The transport of 125I-labeled human high molecular weight urokinase across the intestinal tract in a dog model with stimulation of synthesis and/or release of plasminogen activators. *Blood* 66: 69-75.
12. Hirofumi O., T. Iwakoshi, M. Niwa, Y. Kida, T. Tanaka, R. Kitamura, S. Maezawa, and T. Kobayashi (1996) Coagulation and fibrinolysis study after local thrombolysis of a cerebral artery with urokinase. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 36: 300-304.
13. Yoo, C. K., W. S. Seo, C. S. Lee, and S. M. Kang (1998) Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from Chung Guk Jang. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 507-514.
14. Astrup, T. and S. Mullertz (1952) The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.* 40: 346-347.
15. Anson, M. L. (1939) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 78-89.
16. Kimura, S., M. T. Chiang, and H. Fujimoto (1990) Effects of eicosapentanoic acid a soybean protein on plasma cholesterol, blood pressure and platelet aggregation in stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Monogr. Atheroscler.* 16: 26-35.