

《原著論文》

アスパラガス水抽出液の血栓溶解作用

Thrombolytic Property of an Aqueous Extract of Asparagus

村上 恵 南 埜 幸* 宮崎 智子*
(Megumi MURAKAMI) (Miyuki MINAMINO) (Tomoko MIYAZAKI)

鈴木 久美子* 加藤 杏奈** 溝口 静菜**
(Kumiko SUZUKI) (Anna KATO) (Shizuna MIZOGUCHI)

篤田 知佳**
(Chika ATSUTA)

Abstract: The thrombolytic properties contained in an aqueous of asparagus were investigated using the fibrin plate method, measurement of plasmin-like activity, and enzymogram. Raw and boiled asparagus samples were prepared by freeze-drying and then water extraction. The result showed that all the samples dissolved the fibrin plate, and its action was the highest value in the upper half of a raw asparagus. It is suggested that thrombolytic substances in the raw sample had remarkably plasmin-like activity and not on PA-like activity for its mechanism of action. On the other hand, slight increase in absorbance was confirmed in the boiled sample. As a result of the molecular weight of this substance, a dissolved band was confirmed in all the samples with a molecular weight of less than 6,500. This suggests that thrombolytic substances in asparagus are low molecular weight less than 6,500. More detailed molecular weight estimation needs to be considered after purification.

Key words: Asparagus, Thrombolytic property, Fibrin plate method, Measurement of plasmin-like activity, Enzymogram

緒 言

平成 28 年の人口動態統計によると、わが国の死亡原因の第 1 位は悪性新生物、第 2 位は心疾患、第 3 位が肺炎、第 4 位が脳血管疾患である¹⁾。さらに心疾患、脳血管疾患の内訳をみると急性心筋梗塞 (28.7%)、脳梗塞 (49.8%) と血栓症によるものが多くを占めている²⁾。血栓症は生体内の血液凝固系と生じた線維素を溶解する線溶系とのバランスが崩れることによっておこる。心筋梗

塞や脳梗塞に罹患する人が増加していることから、いかに血栓の形成を抑制、血栓溶解を促すかについて医療・食品の面から注目されている³⁾。

現在、血栓症に関する治療にはプラスミノゲンアクチベーター (PA) の一種である u-PA (ウロキナーゼ) や t-PA (組織 PA) が用いられている。しかし副作用の発現率が高く、血中での半減期が 3 分~20 分と非常に短い⁴⁾ため持続的に静注する必要がある⁴⁾。

一方、食品では発酵食品である納豆やきのこ、テンペ、カツオ塩辛など多くの食品に強力な血栓溶解作用が見出されている^{5)~13)}。特に納豆中のナットウキナーゼは PA の産生を促して血中の線溶亢進を引き起こす作用

同志社女子大学生生活科学部

*同志社女子大学生生活科学部 2015 年度卒業生

**同志社女子大学生生活科学部 2016 年度卒業生

があると報告されている¹⁴⁾。

本研究室ではこれまでにアスパラガスに含まれる葉酸に着目し、研究をおこなってきた。葉酸の機能の一つとして動脈硬化予防効果が増えられることからアスパラガスの葉酸抽出液の血栓溶解作用について検討をおこなった。その結果、葉酸抽出液の血栓溶解作用は微弱であったが、アスパラガス水抽出液には、高い血栓溶解作用が認められた¹⁵⁾。

そこで本研究では、アスパラガスに含まれる血栓溶解作用物質について、アスパラガス水抽出液および調理後のアスパラガスを想定した茹でアスパラガス水抽出液を調製し、それらの血栓溶解作用とその作用機序を明らかにすることを目的とした。さらに血栓溶解作用物質の分子量についても検討を試みた。

実験試料および方法

1. 実験試料

アスパラガス(福岡県産)は、京都市内のスーパーマーケットで購入した。

2. 実験方法

(1) 凍結乾燥粉末の調製

アスパラガスを蒸留水で洗浄し、先端から24 cmを可食部として上下12 cmずつに切り分けた。茹で試料の場合は鍋で蒸留水1 Lを沸騰させ、沸騰水中でアスパラガスを3分間茹でた後、1分間放冷した。

生および茹で試料を1 cmの輪切りにし、フードプロセッサーで3分間粉碎し、ピューレ状にした。これをナス型フラスコに移し、凍結乾燥させた。粉末になったものを、さらにふるい(1 m/m mesh)にかけた。これを試料粉末とし、使用するまで-20℃で保存した。

このアスパラガス試料粉末0.1 gに蒸留水4 mlを加え、1時間振とう後、3,000 rpm、10分間、遠心分離し、ろ過後ろ液を5 ml(プラスミン様活性測定用は10 ml)にメスアップした。この抽出液を測定用の試料とし、使用するまで1.5 ml黒色マイクロチューブに分注し、-20℃で保存した。

(2) フィブリン平板法¹⁶⁾

血栓溶解作用の測定に用いたフィブリン平板法は、フィブリノーゲン溶液をシャーレに入れトロンピンで凝固させたフィブリン平板を基質とし、この平板に試料を滴下して、フィブリンの溶解面積を測定する方法である。

シャーレ(10×10 cm)に50 mM Tris-HCl緩衝液

(pH 7.75)-50 mM CaCl₂溶液(1:1)に溶解した0.15% フィブリンノーゲン(plasminogenを含む)を9 ml入れ、そこに10 U/mlトロンピン溶液を200μl添加した。添加後素早く均等に混合し、室温で2時間静置してフィブリン平板を作成した。フィブリン平板に、標準溶液(u-PA溶液)または試料を20μl添加した。37℃インキュベーターで18時間静置した。静置後、溶解部分の縦と横の径をノギスで測定し、溶解面積を算出した。

u-PA溶液の各濃度における溶解面積の平均を算出したのち、u-PA濃度(U/ml)と溶解面積(cm²)を用いて検量線を作成した。検量線を用いて、試料の溶解面積からu-PA当量(U/100 g)を算出した。

(3) プラスミン様活性測定^{17), 18)}

96穴マイクロプレートに試料または標準溶液(u-PA溶液)100μlを入れ、0.3 mM S-2251(プラスミンに対する合成基質)100 μl, 10 μg/ml Glu-プラスミンノーゲン溶液20 μlを加えた。マイクロプレートミキサーで攪拌後、37℃インキュベーターで加温し、1時間ごとにマイクロプレートリーダーを用いて405 nmの吸光度を測定した。

吸光度を経時的に測定し、プラトーになった時点の吸光度を記録した。u-PA濃度と吸光度を用いて検量線を作成し、試料の吸光度からu-PA当量(生100 g当たり)を算出した。

(4) エンザイモグラフィー¹⁹⁾

エンザイモグラフィーはタンパク質加水分解酵素(プロテアーゼ)の分離と分析を同時に行う手段として広く用いられている。今回、血栓溶解作用物質の存在は、CBB染色による青色ゲルにプロテアーゼが作用してフィブリンを分解・溶解することによって生じた青白色のバンド(以下、溶解バンド)を検出することで判定した。

①電気泳動ゲルの作成

20%分離ゲルを次のように作成した。50 ml容三角フラスコに30%アクリルアミド溶液を6 ml, 1.5 M Tris-HCl緩衝液(pH 8.8)を2.25 ml, 10%過硫酸アンモニウムを30μl, 蒸留水750μl, 1.5 mg/mlフィブリノーゲン150μl, 10 U/mlトロンピン15μlを加え攪拌した。脱気後、TEMEDを5μl加え攪拌し、ゲル板にゲル溶液を流した。蒸留水を分離ゲル溶液の上に静かに重層し、約40分~60分静置し重層させた。重層した蒸留水は濃縮ゲルを流す前に除去した。

次に濃縮ゲルを作成した。30% アクリルアミド溶液 450 μ l, 0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) を 750 μ l, 10% 過硫酸アンモニウムを 10 μ l, 蒸留水 1.8 ml を加えた。分離ゲルと同様に脱気し, TEMED を 5 μ l 加え攪拌し, 分離ゲルの上に溶液を流した。コウムを差し込み, 30 分間重合した。コウムを抜き取り, これを泳動ゲルとした。

②電気泳動

試料 50 μ l と同量のサンプルバッファーを 1.5 ml マイクロチューブに入れ混合した。これを沸騰水中で 3 分間加熱し, 冷却したものを泳動試料とした。泳動プレートを設置し, 試料および分子量マーカーをシリンジで 15 μ l ずつ添加後, 電圧 250 V, 20 mA で電気泳動を開始した。色素マーカーがゲル下端より上約 5 mm に達した時点で電気泳動を終了した。

泳動槽からゲルを取り出し, 上下左右の余分なゲルを切除した。2.5% Triton X-100 に 40 分間浸漬し, SDS を除去した。0.1 M グリシンバッファー (pH 8.3) に浸漬し, 37 $^{\circ}$ C インキュベーターで 1 時間静置した。

固定液で 10 分間浸漬した後, CBB 染色液で浸漬し 1 時間振とうした。その後, CBB 脱色液に浸漬させ一晩脱色を行った。脱色後, ゲルを取り出しバンドを確認し, ガラス板上に置いた。ラップで覆い, スキャンおよびデジタルカメラで撮影した。

(5) 統計処理

統計処理はエクセル統計を用い, 平均値間の有意差検定は一元配置分散分析, 多重比較は Tukey, 相関係数はピアソンの積率相関係数を行った。

結果および考察

1. 凍結乾燥粉末試料の重量変化

生, 茹で, ピューレ, 凍結乾燥粉末の重量を測定し, それぞれの重量を表 1 に示した。茹で試料と生試料では重量はほとんど変化しなかった。

2. フィブリン平板法

標準物質 u-PA 溶液の各濃度とその溶解面積から検量線を作成し (図 1), 検量線からアスパラガス生 100 g 当たりの u-PA 当量 (U/100 g) を算出し, 図 2 に示した。

アスパラガス上部では生試料 (以下, 生上) が茹で試料 (以下, 茹で上) よりも有意に高い血栓溶解作用を示した (p<0.01)。また, 生試料間では生上がアスパラガス下部 (以下, 生下) よりも有意に高い血栓溶解作用を

表 1 凍結乾燥粉末試料の重量変化

試料名	生重量 (g)	茹で後重量 (g)	重量変化率 (%)	ピューレ (g)	凍結乾燥 (g)
生上	338.1	—	—	321.2	23.0
生下	524.5	—	—	483.2	28.4
茹で上	362.9	359.1	97.3	337.4	23.6
茹で下	562.4	549.6	97.7	531.9	32.3

生上: アスパラガス上部・生試料, 生下: アスパラガス下部・生試料
茹で上: アスパラガス上部・茹で試料, 茹で下: アスパラガス下部・茹で試料

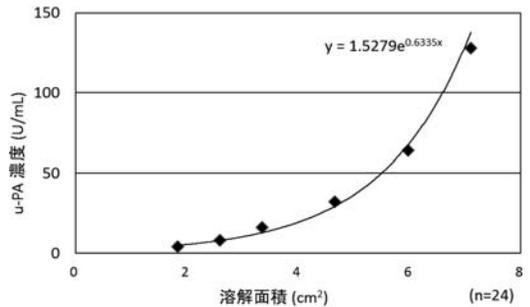


図 1 検量線

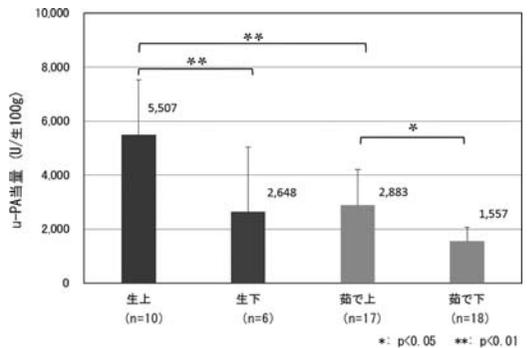


図 2 フィブリン平板法

示し (p<0.01), 茹で試料間でも同様に茹で上が下部 (以下, 茹で下) よりも高い血栓溶解作用を示した (p<0.05)。

凍結乾燥粉末試料中に存在した血栓溶解作用物質の u-PA 当量はアスパラガス生 100 g 当たり約 2,600~5,500 U, 茹で試料で約 1,500~3,000 U を示した。血栓溶解作用をもつことで知られるナットウキナーゼは納豆 100 g 当たり 160,000 国際単位 (IU) の活性を持つことが報告されている⁵⁾。u-PA 当量が最も高かった生試料中の血栓溶解作用物質と比較すると, その活性はナットウキナーゼの約 1/30 であった。

アスパラガスの上部は下部よりも高い血栓溶解作用を示した。これは、部位によって物質の含有量が異なるためであると考えられる。これまでにアスパラガス中のビタミン C は先端部に最も多く含まれ、下部に向かうにつれて減少することが報告されている²⁰⁾。また、アスパラガスの生長にかかせない成分であるアスパラガス酸は先端部にのみ含まれ、茎部分には含まれていないことがわかっている²¹⁾。アスパラガス上部は下部よりも高い血栓溶解作用を示したことから、血栓溶解作用物質も同様に上部に多く含まれている可能性が考えられた。

また、茹でることによって血栓溶解作用が低くなる傾向を示した。野菜を調理すると、野菜中の水溶性ビタミンは大量の水と加熱により失われる^{22), 23)}。アスパラガス中に含まれる血栓溶解作用物質でも同様に、茹で水への流出や加熱による損失のため血栓溶解作用が低下したと考えられた。

3. プラスミン様活性測定

アスパラガスの血栓溶解作用についてプラスミン様活性測定によりその作用機序を検討した。

図3はu-PA溶液(5U/ml)の吸光度を経時的に示した。プラスミノージェン添加時は、3時間後まで吸光度が上昇し、その後はプラトーとなった。プラスミノージェン無添加時は吸光度の上昇が認められなかった。これはu-PAはプラスミノージェンを活性化しプラスミンを産生することで血栓溶解作用を示すが、プラスミン様活性は示さないことを表している。

生試料はプラスミノージェン添加、無添加ともに経時的に吸光度が上昇した。生試料では、生下よりも生上の吸光度が高くなった(図4)。

一方、茹で試料では、茹で上、茹で下ともにプラスミノージェンの添加時のみ吸光度がわずかに上昇した。プラスミノージェン無添加時で吸光度は上昇しなかった(図

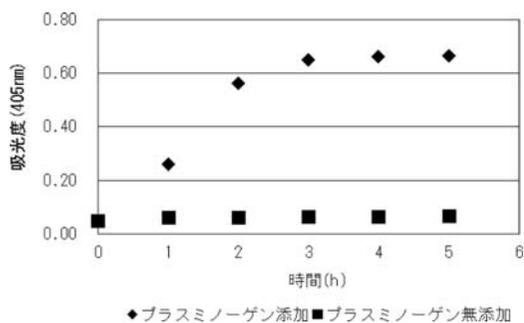


図3 吸光度の経時的変化 (u-PA)

5)。

表2に試料のu-PA当量(U/生100g)を示した。各試料のu-PA当量を比較した結果、プラスミノージェン添加と無添加で有意な差は認められなかった。上部と下部のいずれも、生試料の方が茹で試料よりも有意に高くなった。また生試料でも茹で試料でも、上部の方が下部よりも有意に高い値を示した。

生試料の結果ではプラスミノージェン添加と無添加でほとんど吸光度に差が認められなかったことから、生試料はプラスミノージェンアクチベーター様活性(以下、PA様活性)には依存せず、プラスミン様活性を有することがわかった。

一方、茹で試料はプラスミノージェン添加時で吸光度がわずかに上昇した。しかし生試料と比べると、吸光度の上昇はわずかであった。アスパラガス中の血栓溶解作用物質は茹でることによりプラスミン様活性が弱くなり、PA様活性がわずかに確認された。

血栓溶解作用物質は、プラスミンのような直接フィブ

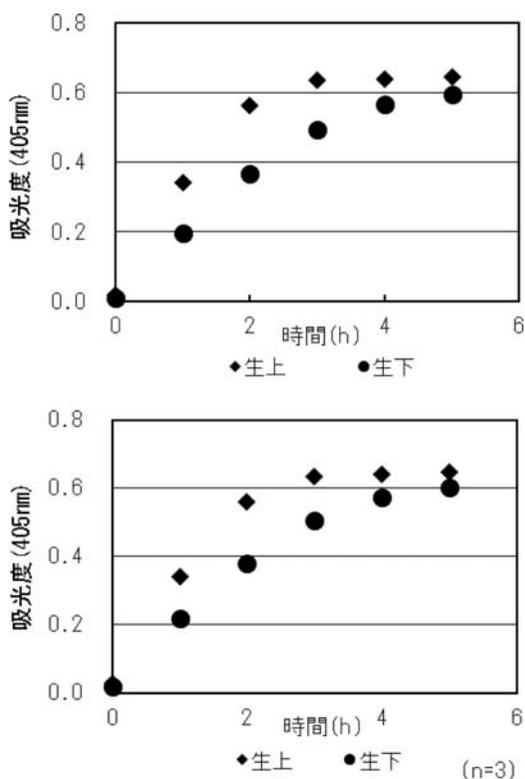


図4 吸光度の経時的変化 (生試料)

A: プラスミノージェン添加
B: プラスミノージェン無添加

アスパラガス水抽出液の血栓溶解作用

リンに働く酵素とウロキナーゼのような PA 作用をもつ酵素がある。これまでに食品では納豆中に含まれるナットウキナーゼが間接的に PA の産生を促す¹⁴⁾ことや、テンペの水抽出液が PA 様活性、プラスミン様活性⁷⁾を示すこと、さらにわかめ⁹⁾、紅麹¹³⁾はプラスミン様活性、ナマコ⁸⁾は PA 様活性を示すことが報告されている。今回、アスパラガス中の血栓溶解作用物質は、わかめ、紅麹と同様にプラスミン様活性を有すると考えられる。

茹でることによりプラスミン様活性は低くなる傾向を示した。これはフィブリン平板法の結果と一致する。食品を加熱すると、水溶性ビタミンである B 群²¹⁾、ビタ

ミン C²³⁾、抗酸化物質²⁴⁾などの食品中の成分が調理加工により損失する。このことから、アスパラガス中に含まれるプラスミン様活性物質も同様に茹でることにより損失し、血栓溶解作用が低下したと考えられた。

また、茹でることにより PA 様活性がわずかに確認された。ナットウキナーゼは PA 様活性ではなく PA の産生を促すプロウロキナーゼアクチベーター²⁵⁾という間接的な血栓溶解作用物質を有することが報告されている。アスパラガスを茹でることにより PA 産生が促された可能性が考えられるが、反応はわずかであり、今後更なる検討が必要である。

アスパラガスの部位別では上部の方が、下部よりも高いプラスミン様活性を示した。これもフィブリン平板法の結果と一致したことから、アスパラガス中のビタミン C やアスパラガス酸が先端部に多く含まれることと同様に、プラスミン様活性を示す物質も上部の方が下部よりも多く含む可能性が考えられた。

プラスミン様活性の u-PA 当量は、フィブリン平板法の結果よりも小さい傾向を示した。プラスミン様活性は、プラスミンに特異的な合成基質が分解を受けることにより遊離するパラニトロアニリン (pNA) を比色により測定する¹⁴⁾方法である。今回、結果は u-PA 換算を行ったが、u-PA に依存しないプラスミン様活性である可能性があり、フィブリン平板法とは一概に比較できないと考えられた。

4. エンザイモグラフィ

アスパラガス中に含まれる血栓溶解作用物質は、プラスミン様活性を有するが、茹でることによりプラスミン様活性は減弱することがわかった。その物質の分子量についてエンザイモグラフィを用いて検討した。

その結果を図 6 に示した。生上、生下、茹で上、茹で下の全試料について、分子量 6,500 以下に溶解バンドが見られ、血栓溶解作用が確認された。生、茹で試料ともに単一の溶解バンドが確認されたが、茹で試料の方が不鮮明に広がった溶解バンドであった。この結果はフィブリン平板法の結果と一致した。またプラスミン様活性の

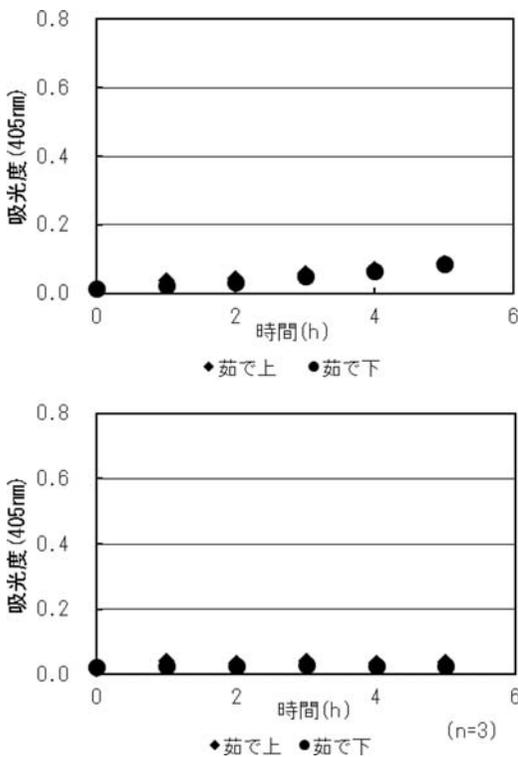


図 5 吸光度の経時変化 (茹で試料)

A: プラスミノゲン添加
B: プラスミノゲン無添加

表 2 プラスミン様活性

プラスミノゲン	生上	生下	茹で上	茹で下
添加	3,344 ± 65 ^a	2,071 ± 10 ^b	296 ± 31 ^c	217 ± 23 ^{cd}
無添加	3,348 ± 11 ^a	2,112 ± 51 ^b	206 ± 15 ^{cd}	129 ± 39 ^d

平均 ± 標準偏差 (u-PA 当量 U/100 g)
異なるアルファベットは有意差 (p < 0.01) を示す (n = 3)

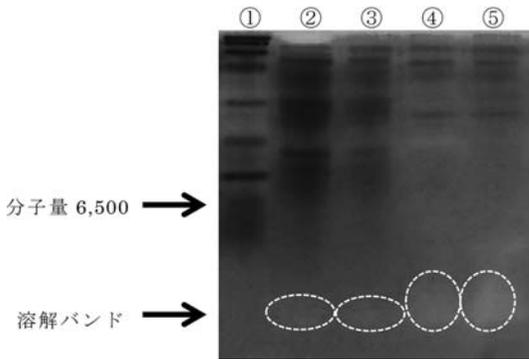


図6 エンザイモグラフィー

①分子量マーカー ②生上 ③生下 ④茹で上
⑤茹で下

結果では、茹で試料は生試料の1/10の活性にまで低下していたことから溶解バンドが不鮮明に広がったと考えられた。さらにプラスミン様活性の結果から、生・茹で試料はプラスミン様活性を有することが分かった。したがって、電離されたプラスミン様物質がフィブリンを溶解したと考えられる。

また溶解バンドの位置から、アスパラガス中のこれら血栓溶解作用物質は分子量6,500以下であると示唆された。血栓溶解作用物質の分子量が報告されている食品にナマコの抽出液がある。しかし、その分子量は5.4万⁸⁾であり、アスパラガスより8倍以上も大きかった。さらにテンペでは分子量約3.0万⁷⁾、納豆のナットウキナーゼでは分子量約2.7万²⁶⁾の物質であると報告されている。したがって、これまでに確認されている食品中の血栓溶解作用物質は巨大なタンパク質であることが多く、それらと比較して、アスパラガスは低分子であった。今回の結果から考えると、アスパラガス中の血栓溶解作用物質はかなり低分子である可能性が示唆された。しかしながら、これまで報告されているテンペやナットウキナーゼの血栓溶解作用物質の分子量測定については、物質の精製をおこなっている。今回の試料はアスパラガスの粗抽出液であることから、今後詳細な検討のためには、精製が必要である。

以上の結果より、アスパラガスには血栓溶解作用物質の存在が確認され、その物質は顕著なプラスミン様活性を有し、PA様活性に依存しないことが明らかとなった。しかし、茹でるとその作用は減弱することがわかった。さらに血栓溶解作用物質の分子量をエンザイモグラフィーで検討した結果、分子量6,500以下で溶解バンドが確認され、アスパラガス中の血栓溶解作用物質が分子

量6,500以下の低分子の物質であることが示唆されたが、今後詳細な分析には精製が必要であると考えられた。

要 約

アスパラガス中に含まれる血栓溶解作用について、フィブリン平板法、プラスミン様活性の測定、エンザイモグラフィーを用いて検討を行った。検討に用いたアスパラガスは、凍結乾燥後、水抽出を行い調製した。

フィブリン平板法の結果、アスパラガス試料の生上下・茹で上下はフィブリン平板を溶解し、血栓溶解作用物質の存在が確認された。また、その物質のu-PA当量を検討した結果、1,500~5,500 (U/100 g)を示し、生上で最も高い値であった。その活性は血栓溶解作用を有するナットウキナーゼの約1/30であった。

アスパラガス試料に血栓溶解作用物質の存在が示唆されたため、その作用機序についてプラスミン様活性を測定した。その結果、生試料ではプラスミノーゲンの添加・無添加ともに吸光度が上昇し、プラスミンの生成が確認された。すなわち、生試料中の血栓溶解作用物質は顕著にプラスミン様活性を有し、PA様活性に依存しないことが明らかとなった。一方、茹で試料では僅かな吸光度上昇が確認されただけであった。

アスパラガス中にはプラスミン様活性を有する物質の存在が示唆されたことから、この物質の分子量をエンザイモグラフィーで検討した。その結果、生上下・茹で上下の全試料において分子量6,500以下で溶解バンドが確認された。このことから、アスパラガス中の血栓溶解作用物質は分子量6,500以下の低分子の物質であることが示唆された。しかし、より詳細な分子量推定には、精製後、検討する必要がある。

謝 辞

フィブリン平板法、プラスミン様活性の測定法(合成基質法)、エンザイモグラフィーについては、近畿大学農学部食品栄養学科上嶋繁先生に御指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。

なお、この研究は2016年度同志社女子大学研究助成金(個人研究)の補助を受けて実施した。

引用文献

1) 厚生労働省：平成28年(2016)人口動態統計(確定数)の概況、第6表 性別にみた死因順位

- (第10位まで) 別死亡数・死亡率(人口10万対)
・構成割合
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei16/index.html> [2017年10月26日閲覧]
- 2) 厚生労働省:平成28年(2016)人口動態統計(確定数)の概況,第7表 死因简单分類別にみた性別死亡数・死亡率(人口10万対)
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei16/index.html> [2017年10月26日閲覧]
 - 3) 野田裕子:発酵食品における血液関連生理活性物質について,一宮女子短期大学紀要第44号,11-17(2005)
 - 4) 医療情報科学研究所(2015),病気がみえる vol.5 血液,株式会社メディックメディア,東京, p.156
 - 5) 須見洋行:納豆キナーゼと線溶系,化学と生物,29,119-123(1991)
 - 6) 平澤玲子,後藤いずみ,岡村徳光,堀江登,清原利文,大杉匡弘:担子菌のつくる線溶酵素の検索,日本応用きのこ学会誌,5,13-17(1997)
 - 7) 須見洋行,岡本猛:テンペ水抽出液の血栓溶解作用,日本家政学会誌,54,337-342(2003)
 - 8) 須見洋行,矢田貝智恵子,中島伸佳:機能食品としての海洋生物無脊椎動物および海藻類に見出された血栓溶解関連物質,岡山県立短期大学紀要第36号,17-21(2003)
 - 9) CHOI Jun-Hui, SAPKOTO Kumar, KIM Sung-Jun, KIM Myung-Kon and KIM Seung:Undariase, a Direct-Acting Fibrin (ogen) olytic Enzyme from *Undaria pinnatifida*, Inhibits Thrombosis In Vivo and Exhibits In Vitro Thrombolytic propertize, *Appl. Biochem. Biotechnol Part A*, 173, 1985-2004 (2014)
 - 10) 中島伸佳,須見洋行,田谷直俊:カツオ(*Katsuwonus pelamis*)の塩辛由来の強力な線溶酵素の精製と性質, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 1604-1605 (1993)
 - 11) 野田裕子:うるかの線溶酵素,一宮女子短期大学研究報告,38,177-180(1990)
 - 12) 加藤隆夫,斎藤久美子:マイタケ(*Grifola frondosa*)に含まれる血栓溶解酵素活性,仁愛女子短期大学研究紀要第32号,65-71(2000)
 - 13) 須見洋行,内藤佐和,矢田貝智恵美,大杉忠則,柳澤泰任,岡田幸子,今井雅敏,丸山真杉:紅麴が有する強力な血栓溶解作用-新しい基質特異性とその応用面について-, *New Food Ind*, 55, 21-24 (2003)
 - 14) 須見洋行:納豆の歴史と機能成分,日本味と匂学会誌,14,129-136(2007)
 - 15) 村上恵,南埜幸,宮崎智子,鈴木久美子:アスパラガス中に含まれる葉酸の血栓溶解作用の検討,(一社)日本家政学会第68回大会研究発表会要旨集,68,15(2016)
 - 16) Tage Astrup, Sten Millertz: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity, *Arch. Biochem. Biophys.*, 40, 346-351 (1952)
 - 17) 古沢新平,磯部淳一(1987),臨床血液学,株式会社医学書院,東京, p.245
 - 18) Takada, A., Urano, T. and Takada, Y.: Influence of coagulation on the activation of plasminogen by streptokinase and urokinase. *Thrombos. Haemostas.* 42, 901-908 (1979)
 - 19) 里吉正徳,寺中敏夫,岩本次男,今井喜良,川瀬俊夫,斎藤滋:エンザイモグラムにおけるProteaseの挙動,菌基礎誌,35,186-196(1993)
 - 20) 農文協(1983),野菜の全書 ネギ・ニンニク・タマネギ・アスパラガス-基礎生理と応用技術-,農文協,東京, p.873
 - 21) 柳川弘志,加藤忠弘,北原喜男:アスパラガスの成分-アスパラガス酸の化学構造と生理作用-,植物の化学調節,8(1),31-19(1973)
 - 22) 田口博国,原功一,長谷川敏男:食品中の葉酸含量に関する研究(II)食品中の葉酸の加熱調理による損失,ビタミン,47,21-25(1973)
 - 23) 吉田企世子(1994),野菜と健康の科学,日本施設園芸協会編,養賢堂,東京, p.61
 - 24) 池羽智子,鹿島恭子:県産野菜の抗酸化性の評価と加熱調理による変化,茨城県農業総合センター園芸研究所研究報告,14,27-33(2006)
 - 25) 須見洋行,佐々木智広,矢田貝智恵美,小崎泰宣:納豆中に含まれる線溶賦活物質とその性質, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 74, 1259-1264 (2000)
 - 26) 須見洋行,馬場健史,岸本憲明:納豆中のプロウロキナーゼ活性酵素と血栓溶解能,日本食品科学工学会誌,43,46-49(1996)

(2017年11月1日受理)
(2017年12月8日採択)