

マカ粉末のヒアルロン酸産生に対する効果

窪田 洋子^{1)*}, 平手 正男²⁾, 上倉 完之²⁾, 伏見 建二³⁾, 堀 祐輔³⁾, 八並 一寿⁴⁾

¹⁾〒362-0806 埼玉県北足立郡伊奈町小室 10281 日本薬科大学薬学部

²⁾〒485-0084 愛知県小牧市入鹿新田 563-6 株式会社サンシントレーディング

³⁾〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学アントレプレナープラザ 6 階
株式会社 TES ホールディングス臨床研究事業部

⁴⁾〒194-8610 東京都町田市玉川学園 6-1-1 玉川大学農学部

Effects of Maca powder on hyaluronic acid production using *in vitro* study

Yoko Kubota^{1)*}, Masao Hirate²⁾, Sadayuki Kamikura²⁾, Kenji Fushimi³⁾, Yusuke Hori³⁾ and Kazuhisa Yatsunami⁴⁾

¹⁾ Faculty of Pharmaceutical sciences, Nihon Pharmaceutical University, 10281 Komura, Ina-machi, Kita-Adachi-Gun, Saitama 362-0806, Japan

²⁾ Sanshin Trading Co., Ltd., 563-6 Irukashinden Komaki, Aichi 485-0084, Japan

³⁾ TES Holding Co. Ltd., 6F University of Tokyo Entrepreneur Plaza, 7-3-1 Hongo Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

⁴⁾ Faculty of Agriculture, Tamagawa University, 6-1-1 Tamagawagakuen Machida, Tokyo 194-8610, Japan

We studied the effect of Maca (*Lepidium meyenii*) powder on the function of dermal fibroblast using Maca solution which was dissolved in the culture medium. Various concentrations of Maca solutions added into the fibroblast cells and were cultured for 48 hrs. Then we investigated the amount of hyaluronic acid (HA) production in culture medium by ELISA assay and the ability of cell proliferation by MTT assay in order to evaluate the availability of Maca powder in the realm of cosmetic. As a result, 0.05-5 mg/mL Maca solution increased the HA production, dose-dependently, and a 5 mg/mL Maca solution increased 1.8 times more than that of control, significantly. In the bioavailability of fibroblast cells, a 5 mg/mL Maca solution potentiated the cell proliferation, significantly. Furthermore the ratio of HA production/cell was risen by between 0.05 and 5 mg/mL of Maca solution, dose-dependently, and 0.5 and 5 mg/mL Maca solutions significantly increased this ratio. These results suggest that Maca powder improves not only skin fitness and texture but skin condition due to the improvement of skin turn over and skin viscoelasticity by internal or external use.

Keywords: Maca (*Lepidium meyenii*) solution/ cell proliferation/ hyaluronic acid /human fibroblast cells

緒言

マカ (*Lepidium meyenii*) は、標高 4000m ほどのアンデス高地で栽培されているアブラナ科の宿根性植物であり、インカ帝国の時代から栽培されてきた。アンデス地方の人々にとって、マカは、毎日の食生活における主食の一つであり、保存食としても利用されており、日常生活には欠かせない植物である (Johns, 1981)。マカは、主として炭水化物 (59%)、タンパク質 (10.2%)、繊維 (8.5%) および脂肪 (2.2%) から構成されており (Quiros et al., 1996)、その他にアルカロイドやタンニンおよび鉄、カルシウム

などのミネラル分も豊富に含んでいる (Dini et al., 1994; Zhao, 2005)。タンパク質やアミノ酸も多く含まれているため、疲労回復や健康増進が期待されると同時に、細胞単位での活性化にも効果が有ると考えられ (Piacente et al., 2002; Barbul et al., 1990)、活力再生、強壮効果により、不感症や不妊症の治療にも有効であるとの報告がある (Dini et al., 1994; Piacente et al., 2002; Barbul et al., 1990)。また、マカには、成長ホルモンの分泌を促進するアルギニンが多く含まれていることが明らかになっており、その結果、身体や細胞の新陳代謝が活発となり (Gonzales et al., 2009)、肌のターンオーバーが改善すると同時に、肌のハリやシミ、粘弾性が改善することが考えられている。更に、各種の植物ステロールが含まれ (Wang, 2007)、高脂血症患者の全身性炎症を軽減する効果 (Micallef et al., 2009)、およびステロール骨格を有する植

*Corresponding author 窪田 洋子

〒362-0806 埼玉県北足立郡伊奈町小室 10281

日本薬科大学

Tel: 048-721-1155 Fax: 048-721-7056

E-mail: ykubota@nichiyaku.ac.jp

物由来の β -シトステロールがヒアルロン酸産生を促進すること(板野, 2009)も報告されている。

ヒアルロン酸は、水分を保持する能力が非常に高い高分子多糖で、皮膚に多量に存在しており、肌のみずみずしさ、ハリ、弾力性に深く関わっていることが明らかとなっている。一般に生体成分は合成と分解により、その量がコントロールされており、ヒアルロン酸も皮膚内部で合成と分解が行われている。その周期は、皮膚中では1~2日程度であり、新たに合成されたヒアルロン酸の半分が1日で分解されていると考えられている(酒井ら, 1996)。また、皮膚中のヒアルロン酸量は加齢とともに減少していくことが知られており、特に50代以降では大きく減少することが知られている。このためヒアルロン酸量の減少を防止し、維持・増加させることは肌の状態を維持する上で重要であると考えられる(Longas et al., 1987)。

本研究は、マカ粉末を培養液に溶解した溶液(マカ溶液)を検体として、線維芽細胞に及ぼす影響について検討した。すなわち、各種濃度の検体を線維芽細胞に添加して培養し細胞増殖能を検討すると同時に、培地中のヒアルロン酸量を測定することで、マカ粉末のヒアルロン酸産生能に対する効果を検討し、美容分野での有用性について明らかとすることを主目的とした。

方法

実験材料

(1) 検体, 試薬

試料であるマカ粉末は、株式会社サンシントレーディングより提供された全粒マカ粉末を用いた。試料は、水分を除去するために、あらかじめ使用する前に室温でシリカゲルを入れたデシケーター中で一晩、減圧乾燥して用いた。検体は、マカ粉末500 mgを正確に秤量し、10 mlの5%牛胎児血清(FBS; HyClone, Logan, Utah)含有D-MEM培地(Invitrogen社, 米国)に溶解した溶液(マカ溶液)を、終濃度が0.05, 0.5および5 mg/mLとなるように、0.5% FBS含有D-MEM培地で希釈したものを検体として用いた。その他の薬品は試薬特級(株式会社和光純薬工業, 東京)を使用した。線維芽細胞は、正常ヒト線維芽細胞(Lonza社, スイス)、細胞活性の測定には、Cell Counting Kit-8(株式会社同仁化学研究所, 東京)、ヒアルロン酸定量にはQnE Hyaluronic Acid ELISA Assay (Biotech Trading Partners, アメリカ)を用いて行った。

(2) 線維芽細胞

ヒト線維芽細胞は、事前に10% FBS含有D-MEM培地中で37°C, CO₂濃度5%, 湿度100%の環境下で必要量の細胞数まで培養して試験に用いた。なお、培養期間中は適宜顕微鏡下で観察し、細胞が対数増殖期であること、および形態が正常であることを確認し、試験に適した細胞を用いた。

1. 分析方法

(1) 培養液中のヒアルロン酸定量

75cm²のフラスコディッシュに、コンフルエントになるまで培養した正常ヒト線維芽細胞に20% TrypLE Select溶液を加え、イ

ンキュベーター内で5分間静置し、ディッシュ内の細胞を全て回収した。回収された細胞数は血球計算板を用いて計測し、10% FBS含有D-MEM培地に2×10⁴個/mLとなるように懸濁させた。その後、96穴プレートに1ウェル当たり2×10³ cellsになるように播種し、37°CでCO₂濃度5%, 湿度100%の環境下で48時間前培養を行った。その後、各ウェルの培養上清を全て取り除き、所定の濃度に調整した各検体を100 μ L添加した。同条件で48時間培養後、培養上清を検体として、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)によりヒアルロン酸の定量を行った。すなわち、ヒアルロン酸固相化マイクロプレートの各ウェルに各濃度のヒアルロン酸標準溶液(0, 50, 100, 200, 500, 800 ng/mL)及び検体(1 mM N-アセチルグルコサミン, 各濃度のマカ溶液, コントロールとしてマカ不含有溶液)をそれぞれのウェルに100 μ Lずつ添加し、プレートミキサーを用い、1分間混和後、37°Cで60分間静置した。全てのウェル内の溶液を除去した後、各ウェルあたり300 μ Lずつの洗浄液で4回洗浄し続いて、全てのウェルにHRP標識ストレプトアビジン溶液を100 μ Lずつ添加した後、37°Cで30分間静置した。全てのウェル内の溶液を除去した後、各ウェルあたり300 μ Lずつの洗浄液で4回洗浄し、ウェルに酵素基質溶液を100 μ Lずつ添加した後、常温(15~25°C)で30分間静置した。その後、全てのウェルに反応停止溶液を100 μ Lずつ添加し、混和後、直ちにプレートリーダー(測定波長; 450nm, 対照波長; 650nm)で各ウェルの吸光度を測定し、ヒアルロン酸を定量した。

(2) MTTアッセイによる培養線維芽細胞生存率の測定

ヒアルロン酸定量を行った96穴プレートをpH7.4 10mMリン酸緩衝液を用いて洗浄した後、新鮮な10% FBS含有D-MEM培地を各ウェルに100 μ L添加し、線維芽細胞生存率の指標となるMTTアッセイを行った。すなわち、Cell Counting Kit溶液を、各ウェルに10 μ Lずつ添加し、インキュベーター内に戻し、2時間呈色反応し、マイクロプレートリーダーで450 nmの吸光度を測定し線維芽細胞生存率を求めた。結果は、コントロール(マカ不含有溶液)を1とした相対値として算出した。更に、ELISA法により定量されたヒアルロン酸量とMTTアッセイでの細胞生存率から、コントロールを1とした相対値として、ヒアルロン酸産生率を算出した。

3. 統計解析

データは全て6例の平均値と標準偏差で示した。群間の有意差検定には対応のないt検定を用い、有意差検定の結果、危険率5%未満のものを有意差ありと判断した。

結果

1. ヒアルロン酸産生に対する検討

EALSA法を用いて、ヒアルロン酸標準品の定量を行った。ヒアルロン酸濃度として、50~800 ng/mLの間で定量性が確認されたので、培養液中のヒアルロン酸濃度の定量を行った。細胞のヒアルロン酸産生の促進が認められているN-アセチルグルコサミンの1 mM添加では、コントロールと比較して1.5倍以上のヒ

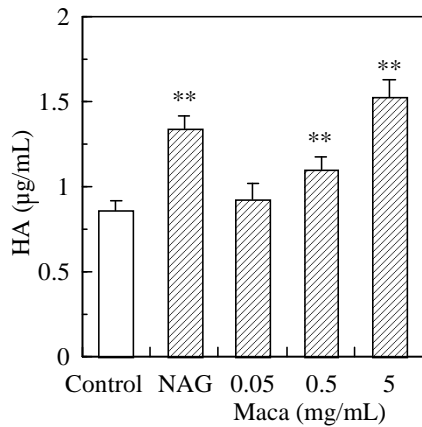


Fig. 1 Amounts of hyaluronic acid (HA).

Y axis shows the amounts ($\mu\text{g/mL}$) of HA production from fibroblast cells. Data are shown as the mean \pm S.D. ($n=6$). Control; 0 mg/mL of Maca, NAG; 1mM N-acetyl glucosamine. ** $p<0.01$ from control.

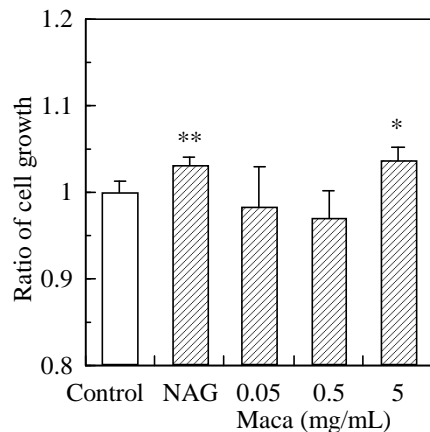


Fig. 2 Ratio of cell growth.

Y axis shows the ratio of cell growth compared to control as "1". Data are shown as the mean \pm S.D. ($n=6$). Control; 0 mg/mL of Maca, NAG; 1mM N-acetyl glucosamine. *** $p<0.05$, 0.01 from control.

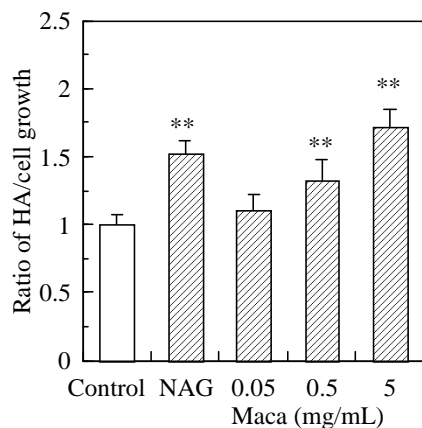


Fig. 3 Ratio of HA/cell growth.

Y axis shows the ratio of HA production from each fibroblast cells compared to control as "1". Data are shown as the mean \pm S.D. ($n=6$). Control; 0 mg/mL of Maca, NAG; 1mM N-acetyl glucosamine. ** $p<0.01$ from control.

アルロン酸産生量の亢進が認められた。マカ溶液では、最終濃度として 0.05~5 mg/mL で、濃度に依存的なヒアルロン酸産生量の亢進が認められ、特に 5 mg/mL のマカ溶液では、コントロールと比較して、約 1.8 倍のヒアルロン酸産生量の有意な亢進が認められた(Fig. 1)

2. 線維芽細胞生存率に対する検討

N-アセチルグルコサミンの添加は、有意な線維芽細胞生存率の促進効果が認められた。マカ溶液では、0.05, 0.5 mg/mL においては、コントロールと比較して線維芽細胞生存率の減少傾向が認められたものの有意な差は認められなかった。一方、マカ溶液 5 mg/mL の濃度においては、有意な線維芽細胞生存率促進効果が認められた(Fig. 2).

3. ヒアルロン酸産生率に対する検討

マカ溶液の各濃度での細胞生存率当たりのヒアルロン酸産生率を比較した。その結果、マカ溶液 0.05~5 mg/mL において、濃度依存的なヒアルロン酸産生率の亢進が認められ、特に 0.5, 5 mg/mL のマカ溶液では、有意な亢進が認められた(Fig. 3).

考 察

これまでの研究では、マカにはタンパク質やアミノ酸が多く含まれているため、疲労回復や健康増進効果と同時に、細胞単位での活性化にも効果が有ると考えられている(Barbul et al., 1990; Dini et al., 1994)。一方、最近では、マカ製品には、天日乾燥させたマカを粉末化したものと、温熱水で抽出し、グルコシノレートが多く含んだエキス末としたものの 2 種類がある。しかし、グルコシノレートの効果は、いまだ解明されていないため、粉末とエキス末の効果の違いは不明である。しかし、これまでの研究の多くはマカの単体あるいは粉末での効果であるため、マカ本来の効果を発揮するためには、粉末での検討が重要と考えられる。

今回我々は、マカ粉末を培養液に溶解したマカ溶液を検体として、線維芽細胞の培養液に添加することで、ヒアルロン酸産生能への効果を検討した。マカ溶液の 0.5 mg/mL では約 1.3 倍、5 mg/mL では約 1.8 倍のヒアルロン酸産生の有意な亢進が認められた。次に、線維芽細胞生存率の検討を行った結果、マカ溶液では 5 mg/mL の濃度において、有意な細胞増殖能促進効果が認められた。更に、線維芽細胞生存率当たりのヒアルロン酸産生率を比較した。その結果、マカ溶液は、線維芽細胞生存率を考慮した場合においてもヒアルロン酸の産生を 0.05~5 mg/mL の濃度範囲で濃度依存的に亢進し、その示適濃度は 0.5~5 mg/mL であった。

これまでに、植物由来の β -シトステロールが、ヒアルロン酸産生を促進することが明らかとなっている(板野, 2009)。マカの構成成分には β -シトステロールと同様にステロール構造を有した成分もあることから、同様の効果を示している可能性も考えられる。組織内のヒアルロン酸は、組織の水分量や形態を維持する上で重要な機能を有しており(Falcone et al., 2006)、特に肌においては、水分量、ハリ、キメおよび粘弾性を維持している

ことが明らかとなっている。このため、マカ溶液は肌の機能を維持する上で有用である可能性が示唆された。これまでの研究で、 β -カロテンおよびN-アセチルグルコサミンは、ヒアルロン酸合成酵素 (HAS) の一つである HAS3 遺伝子を発現させ(Sakai et al., 1999), ヒアルロン酸の材料となる細胞内基質を増やすことで、表皮細胞のヒアルロン酸合成を高める作用があることが見出されている(Sayo et al, 2004)。一方、真皮においては(-)ムスコンやN-メチル-L-セリンおよびローヤルゼリーは、HAS2 遺伝子の発現を促進し、ヒアルロン酸合成を高める作用があることが明らかとなっている。すなわち、表皮細胞のヒアルロン酸合成では HAS3, 真皮線維芽細胞では HAS2 が主に働いていることが明らかとなっている(Sugiyama et al., 1998; Sayo et al., 2002; Sakai et al., 1999; Sayo, 2004)。今回の結果では、線維芽細胞からのヒアルロン酸産生を亢進していることから、マカ溶液は HAS2 を発現させ、ヒアルロン酸産生を亢進しているものと考えられた。

これまでの試験結果を総括すると、マカ粉末を溶解したマカ溶液は、線維芽細胞の増殖促進効果およびヒアルロン酸産生亢進効果を有する可能性が示唆された。また、細胞毒性を示した濃度 (線維芽細胞死を示した濃度 50 mg/mL, データ未掲載) の約 1/100 の濃度 (0.5 mg/mL) でも、ヒアルロン酸産生亢進効果があることから、効毒比が大きく安全性の高い可能性が示唆された。すなわちマカ粉末は、内用あるいは外用で使用することで、肌のターンオーバーを改善し、ハリやキメと同時に肌水分や粘弾性などの肌状態を改善する機能を有している可能性が示唆された。今後は、安全性を確認すると同時に、遺伝子レベルでの解析を通して、作用機序を解明する予定である。

謝辞

本論文を最終稿とするに際して、日本薬科大学 医療薬学科長 医学博士 渡邊泰雄教授に適切なる御助言ならびに御指導を受けた事に対して深甚なる御礼を申し上げます。

文献

- Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G (1990): Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery.*, 108, 331-337.
- Dini A, Migliuolo G, Rastrelli L, Saturnino P, Schettino O (1994): Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chem.*, 49, 347-349.
- Falcone SJ, Palmeri D, Berg RA (2006): Biomedical applications of hyaluronic acid. In "Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications", ed. by Marchessault RH, Ravenelle F, Zhu X, pp. 155-174 Oxford University Press, New York.
- Gonzales GF, Gonzales C, Gonzales-Castañeda C (2009): *Lepidium meyenii* (Maca): a plant from the highlands of Peru-from tradition to science. *Forsch Komplementmed.* 16, 373-380.
- 板野直樹 (2009): ヒアルロン酸産生促進剤, 特許公開第 2009-57290 号 (公開日 2009.3.19).
- Johns T (1981): The anu and the maca. *J. Ethnobiol.*, 1, 208-212.
- Micallef MA, Garga ML (2009): Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. *Atherosclerosis.* 204, 476-482.
- Piacente S, Carbone V, Plaza A, Zampelli A, Pizza C (2002): Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5621-5625.
- Quiros CF, Epperson A, Holle M (1996): Physiological studies and determination of chromosome number in Maca. *Lepidium meyenii*. *Economic Botany*, 50, 216-223.
- 酒井進吾, 佐用哲也, 神尾美智子, 井上紳太郎 (1996): ヒト皮膚線維芽細胞のヒアルロン酸分解機構の性質, 第 19 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, p.495, 札幌.
- Sakai S, Sayo T, Kodama S, Inoue S (1999) N-Methyl-L-Serine Stimulates Hyaluronan Production in Human Skin Fibroblasts. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 12, 276-83.
- Sayo T, Sugiyama Y, Takahashi Y, Ozawa N, Sakai S, Ishikawa O, Tamura M, Inoue S (2002): Hyaluronan Synthase 3 Regulates Hyaluronan Synthesis in Cultured Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 118, 43-48.
- Sayo T, Sakai S, Inoue S (2004): Synergistic effect of N-acetylglucosamine and retinoids on hyaluronan production in human keratinocytes. *Skin Pharmacol. Physiol.* 17, 77-83.
- Sugiyama Y, Shimada A, Sayo T, Sakai S, Inoue S (1998): Putative hyaluronan synthase mRNA are expressed in mouse skin and TGF-beta upregulates their expression in cultured human skin cells. *J. Invest. Dermatol.*, 110, 116-121.
- Wang Y, Wang Y, McNeil B, Harvey LM (2007): MACA: An Andean crop with multi-pharmacological functions (Review). *Food Res. Intern.* 40, 783-792.
- Zhao J, Muhammad I, Dunbar DC, Mustafa J, Khanj IA (2005): New alkaloids from maca (*Lepidium meyenii*). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 690-693.