

マゴジャクシ及び霊芝の培養ヒト皮膚線維芽細胞における
コラーゲン及びグリコサミノグリカン生成に及ぼす影響田中 浩,*^{a)}永瀬 憲一,^{a)}岡田 富雄,^{a)}小西 宏明,^{a)}辻 卓夫^{b)}^{a)}日本メナード化粧品 (株) 生化学研究所, ^{b)}名古屋市立大学医学部皮膚科学教室Effects of Magojakushi and Reishi on the production of
collagen and glycosaminoglycans in cultured human dermal fibroblastsHiroshi TANAKA,*^{a)} Ken-ichi NAGASE,^{a)} Tomio OKADA,^{a)} Hiroaki KONISHI,^{a)} Takuo TSUJI^{b)}^{a)}Biochemical Research Institute, Nippon Menard Cosmetic Co., Ltd.^{b)}Department of Dermatology, Nagoya City University Medical School

(Received April 14, 1992. Accepted November 26, 1992.)

Abstract

Magojakushi (the fruit body of *Ganoderma neojaponicum*) and Reishi (the fruit body of *Ganoderma lucidum*) were studied for their effects on the production of collagen and glycosaminoglycans (GAGs) in cultured human dermal fibroblasts. Collagen and GAGs production were assessed by measuring ³H-proline incorporation into pepsin-resistant, salt-precipitated extracellular collagen and ³H-glucosamine incorporation into cetylpyridinium chloride precipitated GAGs.

Collagen and GAGs production were increased by the addition of the hot-water extract of Magojakushi and these augmentations were observed only in non-polysaccharide fraction. Similar data were also observed in Reishi. There was however, no significant difference in the results of collagen and GAGs production between Magojakushi and Reishi. Moreover high molecular non-polysaccharide (>10,000 M.W.) and low molecular non-polysaccharide fraction (<10,000 M.W.) of Magojakushi were studied. The augmentations of collagen and GAGs production were observed only in low molecular non-polysaccharide fraction.

Key words Magojakushi, Reishi, collagen, glycosaminoglycans, fibroblasts.**Abbreviations** dpm, disintegration per minute; FCS, fetal calf serum; GAGs, glycosaminoglycans; MEM, minimal essential medium; ³H, tritium.

緒 言

マゴジャクシ *Ganoderma neojaponicum* IMAZEKI はサルノコシカケ科 Polyporaceae に属する担子菌である。マゴジャクシはマンネンタケ *Ganoderma lucidum* (Fr.) KARST. とその姿がよく類似しているため長年混同されていたが、マンネンタケが広葉樹の切株に発生する根株腐朽菌であるのに対し、マゴジャクシは針葉樹の根株腐朽菌であり、今関により別種としてその名が与えられた¹⁾。マゴジャクシにつ

いての報告はあまりないが、マンネンタケの子実体(霊芝)は古くから和漢薬、生薬の上薬(神薬、仙薬)にランクされ、強壮、鎮静、血圧降下、強心などの薬効を有するとして珍重されてきた。近年、霊芝の栽培生産の成功によって大量供給が可能となり、その薬理作用に関しても数多くの報告がなされるようになった。それらの中に細胞における好氣的代謝を改善させる作用、すなわち抗老化作用やタンパク合成促進作用についての報告がある²⁾。

一方、皮膚の加齢変化のひとつとしてシワやタルミの発生があるが、その原因として真皮細胞外マト

*〒503 岐阜県大垣市浅草4-66
4-66 Asakusa, Ogaki, Gifu 503, Japn

リックス成分の減少や構造変化が考えられている。^{3,4)} 真皮細胞外マトリックスは真皮線維芽細胞によって生成され、それらの減少はすなわち、真皮線維芽細胞の機能低下を意味するものである。そこで今回、マゴジャクシ及び霊芝の皮膚に対する抗老化作用について真皮結合組織の重要な構成成分であるコラーゲン及びグリコサミノグリカン (GAGs) を指標とし、培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるこれらの生成に及ぼす影響を検討した。

材料と方法

(1) 試料：平成3年、当研究所（日本メナード化粧品(株)生化学研究所）において、人工槽木栽培されたマゴジャクシ及びマンネンタケの子実体（マゴジャクシ及び霊芝）の乾燥品を実験に供した。これらを細切後、30倍量の蒸留水を加え、100℃で3時間、2回抽出した。濾液は合わせて減圧下で濃縮後、凍結乾燥してマゴジャクシ及び霊芝熱水抽出物を得た。収率はそれぞれ10.3%、7.1%であった。

マゴジャクシ及び霊芝熱水抽出物を10倍量の蒸留水に溶解後、攪拌しつつ6倍量のエタノールを徐々に加え（エタノール最終濃度85%）多糖類を析出させた後、3,000 rpm、10分間遠心して上清と沈澱物に分離した。沈澱物に対して同様の操作を反復し、上清を合わせて減圧下でエタノールを留去後、凍結乾燥して非多糖分画を得た。また、沈澱物を少量の蒸留水に溶解後、凍結乾燥して粗多糖分画を得た。熱水抽出物からの非多糖分画及び粗多糖分画の収率はマゴジャクシではそれぞれ42.0%、24.8%であった。また、霊芝ではそれぞれ43.4%、34.0%であった。

マゴジャクシ熱水抽出物の非多糖分画を100倍量の蒸留水に溶解後、分子量10,000のフィルター (ADVANTEC Toyo UK-10) を用いて限外濾過し、20分の1量まで濃縮した後、凍結乾燥して非多糖高分子分画を得た。また、濾液を減圧下で濃縮した後、凍結乾燥して非多糖低分子分画を得た。非多糖分画からの収率は非多糖高分子分画13.3%、非多糖低分子分画28.6%であった。

(2) コラーゲン生成量の測定：定常期のコンフルエントな状態のヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン生成量の測定はWebsterらの方法⁵⁾に従い、生成されるコラーゲン中への³H-prolineの取り込みを指標として行った。すなわち、ヒト皮膚線維芽細胞(6歳男子由来、継代数6~8)を96wellプレートに各wellあたり25,000個ずつ播種し、10% FCSを

含むEagle's MEM 0.2 mlにて5% CO₂, 37℃条件下で4日間培養した。この間に細胞はコンフルエントな状態となった。次にマゴジャクシ及び霊芝の熱水抽出物、粗多糖分画及び非多糖分画、マゴジャクシの非多糖高分子分画及び非多糖低分子分画をそれぞれ最終濃度0.1~10 µg/mlとなるように調整したFCS無添加のEagle's MEM (50 µg/ml L-ascorbic acid, 50 µg/ml β-aminopropionitrile, 92.5 KBq/ml ³H-proline 含有) 0.2 mlに交換し、24時間培養した。なお、これらの試料濃度ではコンフルエントな状態にある細胞の数に影響を及ぼさないことを確認している。その後、1 mg/ml ペプシン溶液を各wellに0.1 ml加え、³H-proline ラベルされたコラーゲンを抽出し、酸性及び中性下において塩析により精製した。最終的な沈澱物を0.5 M 酢酸に溶解後、液体シンチレーションカウンター (Beckman LS5801) にてコラーゲンに取り込まれた³H活性を測定した。結果は細胞10⁴個あたりの放射活性で表した。細胞数は³H-prolineを除き同様な条件で培養した細胞より求めた。試料無添加のものをコントロールとし、測定はすべてn=4にて行った。

(3) GAGs 生成量の測定：定常期のコンフルエントな状態のヒト皮膚線維芽細胞におけるGAGs生成量の測定はBuckinghamらの方法⁶⁾に従い、生成されるGAGs中への³H-glucosamineの取り込みを指標として行った。すなわち、ヒト皮膚線維芽細胞をコラーゲン生成量の測定の場合と同様に培養した。ただし、β-aminopropionitrileと³H-prolineを加えず、92.5 KBq/ml ³H-glucosamineでラベルした。その後、細胞内及び上清中のタンパクを分解する目的で44 U/ml プロテアーゼを各wellに0.1 ml加え、55℃、4時間処理し、遠心後上清にキャリアーGAGs 0.1 mgと0.5% cetylpyridinium chloride 3 mlを加え、析出したGAGsをガラス繊維濾紙上に集めた。このGAGsを洗浄後、取り込まれた³H活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。結果は細胞10⁴個あたりの放射活性で表した。測定はすべてn=4にて行った。

(4) 統計学的解析：得られた値は平均値±標準偏差で表した。統計学的解析はStudent's *t*-検定法を用いて有意差の有無を判定した。

結 果

マゴジャクシ及び霊芝熱水抽出物の培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン及びGAGs生成に及ぼす影響を検討した結果をTable Iに示した。マ

Table I Effects of Magojakushi, the fruit bodies of *Ganoderma neojaponicum*, and Reishi, the fruit bodies of *Ganoderma lucidum*, extract with hot water on the production of collagen and glycosaminoglycans in human dermal fibroblasts.

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Magojakushi		Reishi	
	^3H -collagen (dpm/ 10^4 cells)	^3H -glycosaminoglycans (dpm/ 10^4 cells)	^3H -collagen (dpm/ 10^4 cells)	^3H -glycosaminoglycans (dpm/ 10^4 cells)
Control	1108.6 $\pm$ 156.0	896.9 $\pm$ 170.1	1101.8 $\pm$ 82.7	1087.0 $\pm$ 307.8
0.1	1187.2 $\pm$ 244.2	1025.3 $\pm$ 233.6	1231.6 $\pm$ 195.6	1247.2 $\pm$ 426.8
1	1149.8 $\pm$ 114.3	908.1 $\pm$ 201.8	1423.5 $\pm$ 124.8***	1215.8 $\pm$ 250.8
10	1474.4 $\pm$ 88.1**	1508.8 $\pm$ 293.0*	1289.4 $\pm$ 134.4*	1737.5 $\pm$ 240.2*

dpm : disintegrations per minute

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 4 wells.***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, significantly different from control (Student's t -test).

Table II Effects of polysaccharide and non-polysaccharide fraction from Magojakushi and Reishi extract with hot water on the production of collagen and glycosaminoglycans in human dermal fibroblasts.

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Magojakushi		Reishi	
	^3H -collagen (dpm/ 10^4 cells)	^3H -glycosaminoglycans (dpm/ 10^4 cells)	^3H -collagen (dpm/ 10^4 cells)	^3H -glycosaminoglycans (dpm/ 10^4 cells)
Control	932.6 $\pm$ 139.5	1370.3 $\pm$ 145.7	1131.7 $\pm$ 157.1	969.1 $\pm$ 39.6
poly-saccharide	0.1	972.5 $\pm$ 168.7	1370.3 $\pm$ 153.2	N.D.
	1	914.5 $\pm$ 120.2	1369.3 $\pm$ 237.1	966.9 $\pm$ 91.5
	10	N.D.	1399.4 $\pm$ 78.9	1010.3 $\pm$ 71.9
Non-poly-saccharide	0.1	1122.6 $\pm$ 65.6*	1430.7 $\pm$ 78.4	N.D.
	1	1238.5 $\pm$ 131.5*	1634.3 $\pm$ 206.2	1068.4 $\pm$ 94.8
	10	N.D.	2002.3 $\pm$ 251.6**	1222.3 $\pm$ 103.2**

dpm : disintegrations per minute, N.D. : not done

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 4 wells.** : $p < 0.005$, * : $p < 0.05$, significantly different from control (Student's t -test).

ゴジャクシ熱水抽出物は 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においてコラーゲン及び GAGs 生成を有意に促進した。また、霊芝熱水抽出物は 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においてコラーゲン生成を、10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において GAGs 生成を有意に促進した。

次に、マゴジャクシ及び霊芝熱水抽出物の分画を行い、粗多糖分画及び非多糖分画の培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン及び GAGs 生成に及ぼす影響を検討した。その結果、マゴジャクシ、霊芝共に非多糖分画は 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においてコラーゲン生成を有意に促進した。また、10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において GAGs 生成を有意に促進した。一方、

粗多糖分画は全ての濃度においてコラーゲン及び GAGs 生成に影響を及ぼさなかった。(Table II)

さらに、マゴジャクシ熱水抽出物の非多糖成分の分画を行い、非多糖高分子分画及び非多糖低分子分画の培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン及び GAGs 生成に及ぼす影響を検討した。その結果、非多糖低分子分画は 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においてコラーゲン生成を有意に促進した。また、10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において GAGs 生成を有意に促進した。一方、非多糖高分子分画は全ての濃度においてコラーゲン及び GAGs 生成に影響を及ぼさなかった。(Table III)

Table III Effects of high and low molecular non-polysaccharide fraction from Magojakushi extract with hot water on the production of collagen and glycosaminoglycans in human dermal fibroblasts.

	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	^3H -collagen (dpm/ 10^4 cells)	^3H -glycosaminoglycans (dpm/ 10^4 cells)
Control		915.5 $\pm$ 104.3	1208.5 $\pm$ 64.4
High molecular	0.1	986.8 $\pm$ 209.3	1186.5 $\pm$ 85.8
non-polysaccharide	1	920.8 $\pm$ 72.0	1183.2 $\pm$ 58.7
	10	N.D.	1100.0 $\pm$ 127.9
Low molecular	0.1	1132.6 $\pm$ 113.8*	1200.0 $\pm$ 15.2
non-polysaccharide	1	1295.4 $\pm$ 194.1*	1298.6 $\pm$ 78.3
	10	N.D.	1470.2 $\pm$ 74.7**

dpm: disintegrations per minute, N.D.: not done

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 4 wells.

** : $p < 0.005$, * : $p < 0.05$, significantly different from control (Student's t -test).

High molecular mean above 10,000 M.W. and low molecular mean below 10,000 M.W..

考 察

今回の結果、マゴジャクシ及び霊芝熱水抽出物が培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン及びGAGs生成促進効果を有し、その効果は非多糖分画に由来することが明らかとなった。マゴジャクシとマンネンタケはその姿がよく類似しているが発生する切株が異なっており、別種として分類されている¹⁾。そこでそれらの成分や薬理活性に違いがある可能性が考えられた。しかし、培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン及びGAGs生成促進効果についてはほとんど差がみられなかった。

マゴジャクシ熱水抽出物の非多糖成分を分子量により分画し、そのコラーゲン及びGAGs生成に及ぼす影響を検討した結果、分子量 10,000 以下の分画にコラーゲン及びGAGs生成促進効果がみられた。マゴジャクシの薬理作用に関する報告はほとんどないが、霊芝については多数報告されている。それらのうち血圧降下作用⁷⁾、抗炎症作用⁸⁾、抗腫瘍作用⁹⁾など多くの作用については成分研究の結果、その多糖成分によることが明らかにされている。従って、今回マゴジャクシ及び霊芝の非多糖分画に培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン及びGAGs生成促進効果がみられたことは興味深い。霊芝の非多糖低分子成分としては単糖、アミノ酸、脂質などのほかラノスタン型トリテルペノイド類¹⁰⁾が知られているが、これらの薬理作用については ganoderic acid F,H,K などのアンジオテンシン-I変換酵素阻害活性¹¹⁾や ganoderic acid C,D のラット肥満細胞から

のヒスタミン放出抑制作用¹²⁾が報告されているにすぎない。今回みられたマゴジャクシ及び霊芝のコラーゲン及びGAGs生成促進作用における有効成分については明らかではないが、今後検索を進めて単離したい。

コラーゲン及びGAGsは皮膚においては真皮結合組織の細胞外マトリックスの構成成分として皮膚のレオロジー的性質に重要な役割を果たしている。また、ヒト真皮コラーゲン及びGAGsは加齢にともない減少することが知られている^{3,4)}。従って、皮膚の抗老化の手段のひとつとして真皮線維芽細胞を賦活して細胞外マトリックスの構成成分の生成を促す方法が考えられる。事実、Kligman らが加齢皮膚に対して臨床的に効果があると報告している all-trans retinoic acid の作用機構として真皮コラーゲンの生成促進が考えられている¹³⁾。今回の実験においてマゴジャクシ及び霊芝熱水抽出物に培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン及びGAGs生成促進効果がみられたことから、マゴジャクシ及び霊芝は真皮コラーゲン及びGAGsの減少にともなう皮膚の形態的、機能的变化を緩慢にさせる、もしくは回復させる可能性を有することが示唆された。

文 献

- 1) 今関六也, 本郷次雄編著: “原色日本新菌類図鑑(II)”, 保育社, 大阪, p. 176, 1989.
- 2) ヒキノヒロシ: 霊芝の薬理. 漢方医学 10, 26-32, 1986.
- 3) Shuster, S., Black, M.M. and Mcvitie, E.: The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen

- and density. *Br. J. Dermatol.* **93**, 639-643, 1975.
- 4) Breen, M., Weinstein, H.G., Jonson, R.L., Veis, A. and Marshall, R.T.: Acidic glycosaminoglycans in human skin during fetal development and adult life. *Biochem. Biophys. Acta.* **20**, 54-60, 1970.
- 5) Webster, D.F. and Harvey, W.: A quantitative assay for collagen synthesis in microwell fibroblast cultures. *Anal. Biochem.* **96**, 220-224, 1979.
- 6) Buckingham, R.B., Prince, R.K. and Rodnan, G.P.: Progressive systemic sclerosis (PSS, scleroderma) dermal fibroblasts synthesize increased amounts of glycosaminoglycan. *J. Lab. Clin. Med.* **101**, 659-669, 1983.
- 7) 有地 滋, 谿 忠人, 久保道徳, 松田秀秋, 吉村成年, 桐ヶ谷紀昌: 霊芝 (*Ganoderma lucidum*, 子実体) の研究 (第1報), 基礎と臨床 **13**, 4239-4244, 1979.
- 8) Ueki, S., Kiho, T., Hara, C., Kuruma, I. and Tanaka, Y.: Polysaccharides in fungi. XIV. anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. *J. Pharm. Dyn.* **6**, 983-990, 1983.
- 9) 水野 卓, 加藤尚美, 戸塚篤史, 竹中一秀, 新海健吉, 清水雅子: マンネンタケ (霊芝) の水溶性多糖類の分画, 構造, 抗腫瘍活性について. 日本農芸科学会誌 **58**, 871-880, 1984.
- 10) Nishitoba, T., Sato, H., Kasai, T., Kawagishi, H. and Sakamura, S.: New bitter C₂₇ and C₃₀ terpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi). *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1793-1798, 1985.
- 11) Morigiwa, A., Kitabatake, K., Fujimoto, Y. and Ikekawa, N.: Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 3025-3028, 1986.
- 12) Kohda, H., Tokumoto, W., Sakamoto, K., Fujii, M., Hirai, Y., Yamasaki, K., Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S. and Uchida, M.: The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. histamin release-inhibitory triterpenes. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 1367-1374, 1985.
- 13) 高瀬吉雄, 石原 勝, 戸田 浄, 森川藤鳳編集: “加齢と皮膚”, 清至書院, 東京, pp. 257-266, 1986.