

アップルペクチン由来オリゴ糖の活性酸素抑制効果に関する研究

半明敬子¹, 並川宏英², 齊藤智宏³, 大上英夫³, 田澤賢次^{1,2}

¹富山医科薬科大学大学院医学系研究科成人看護学Ⅱ（急性期）講座

²富山医科薬科大学医学部成人看護学Ⅱ（急性期）

³富山医科薬科大学医学部第2外科講座

要 旨

大腸癌発癌抑制作用が明らかとなっているアップルペクチンの作用機序の解明を目的に、アップルペクチン由来のオリゴ糖を用いて活性酸素に対する効果を分析し、市販されている他のオリゴ糖やその関連物質とも比較した。アップルペクチン由来のオリゴ糖は平均重合度により、pos-S, pos-M, pos-L, pos-LLに分け、さらにpos-Sを121℃30分加熱し、pos-Hとした。活性酸素に対する効果はESRスピントラッピング法を行い、その抑制率から検討した。その結果、アップルペクチン由来のオリゴ糖は活性酸素抑制効果を持ち、 $\cdot O_2^-$ に対してはpos-H (82.3%), pos-S (48.9%), $\cdot OH$ ではペクチンオリゴ糖 (88.6%), pos-H (87.2%) であり、加熱すると更に強いSOD様活性 (26.7unit/ml) を示した。以上から、アップルペクチンの発癌抑制作用の一端に活性酸素抑制があることが示唆された。

キーワード

アップルペクチン, ペクチンオリゴ糖, フリーラジカル,
スーパーオキシドアニオンラジカル, ヒドロキシルラジカル

はじめに

欧米での大腸癌発生率は日本に比べて高く、疫学調査から人種的因子ではなく、環境因子の関与が明らかになっている^{1,2)}。日本におけるその後の大腸癌発生率の増加は食生活の欧米化と重なり、環境因子としての食生活の関与が重要視されている^{3,4)}。さらに疫学的研究および化学発癌モデルを用いた研究により、高脂肪食・低繊維食が危険因子であることが示された^{5~8)}。

看護の中には疾病を持った患者だけを対象とするのではなく、一次予防の観点から、疾病予防を目指した健康増進につながる食生活を指導することも重要な一つとして存在する⁹⁾。そのため、大腸発癌との関連が高い食生活についての知識を身につけること、さらには発癌を抑制する食品の機

能への深い理解が求められていることは当然である。

今回の研究対象であるアップルペクチンの大腸癌発生との関わりについては、排便量を増加させ、有害物質の腸内滞留時間を減少させることから大腸癌の予防効果は水不溶性食物繊維にあるとされているが、水溶性食物繊維であるアップルペクチンの経口投与を行うことで、アゾキシメタン投与ラットにおいて大腸癌の発生が抑制されることを田澤らのグループによって報告されている¹⁰⁾。

また、腫瘍の増殖に必要とされるOrnithine decarboxylase (ODC) の活性化や血管新生因子 (TAF) の活性化を引き起こし、腫瘍細胞やマクロファージから分泌されるProstaglandinE₂ (PGE₂) の門脈血中の含有量がアップルペクチンを経口投与することで低下することや、ラット

肝転移モデルにおけるアップルペクチン経口投与による転移形成率と転移結節数の高い抑制効果、腸内細菌叢の変動を介したβ-グルクロニダーゼ活性と総胆汁酸量の減少が田澤らにより示されている^{11~14)}。

このように、大腸癌の発癌、転移を抑制する効果がアップルペクチンにあることが明らかとなっているが、その作用機序についての報告は田澤らのグループ研究だけと少なく、まだ解明されていない点が多い。

発癌過程は、イニシエーション、プロモーション、プログレッションの多段階説が有力となっているが、活性酸素はプロモーションとプロクレッションの両方の過程に関わっており¹⁵⁾、発癌抑制を検討するメカニズムの一つとして活性酸素に対する作用を考慮する必要がある。

そのため著者らは、アップルペクチンの活性酸素発生系に対する効果について解析を行った。

アップルペクチンの作用機序の解明のため、アップルペクチンのbioreactorによる分解産物であるペクチンオリゴ糖を用い、活性酸素として特にスーパーオキシドアニオンラジカル($\cdot O_2^-$)とヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)に対する抑制効果の解析を行い、また、比較検討のため現在機能性食品として市販されているオリゴ糖やその関連物質についても比較解析を行ったので報告する。

研究方法

1. 実験材料

1) ペクチンオリゴ糖の調整

ペクチンオリゴ糖は*Setereum perpureum* ASP-4 Bの培養上清より抽出された固定化エンド-ポリガラクトナーゼによってポリガラクトロン酸より調製したものをを用いた。

また、Genu社製のアップルペクチンをPectinase-Godo endo-PG (合同酒精) によってペクチンオリゴ糖 (pos) とし、分画は中空糸限外ろ過モジュールを用いて行った。分子分画量30,000を透過しないものをLL, 分子分画量30,000は透過するが、10,000を透過しないものをL, 10,000を透過し3,000を透過しないものをM, 3,000を透過したものをSとした。4画分についてゲルろ過クロ

マトグラフィーを行い、分子量分布を測定した。平均重合度はpos-LL (26.6), pos-L (19.9), pos-M (14.6), pos-S (4.1)となった。

さらにpos-Sを121℃, 30分間オートクレーブにかけたものをpos-Hとした (本ペクチンオリゴ糖の分画調整には青森県産業技術開発センターの協力のもとに実施された) (表1, 図1)。

表1 アップルペクチンからのオリゴ糖の調整分画

	Pectin (Genu)				
	↓ Pectinase - GODO endo PG				
	Pectin Oligosaccharide				
	↓ ultrafiltration				
	LL	L	M	S	→ pos-H
ウロン酸含有率 (%)	72.4	90.7	100.3	99.5	97.8
平均重合度	26.6	19.9	14.6	4.1	5.4

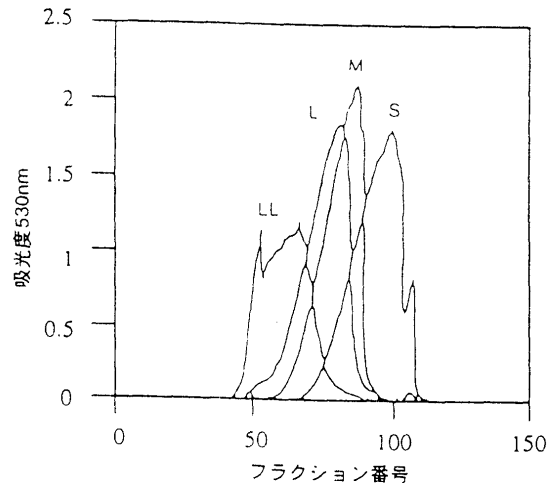


図1 pos-LL, L, M, Sのゲルクロマトグラフィー

溶出条件: pH0.4の0.05MCH₃COONa溶液で平衡化したSephacryl S-200カラムクロマトグラフィ (内径2.6×長さ100cm, Pharmacia) を用い、流速1 ml/minで溶出し、試験管1本あたり4.5mlずつ取った。

2) その他のオリゴ糖とその関連物質

キトサンオリゴ糖 (山口化研, 東京, 甲陽ケミカル株式会社, 東京), キトサンオリゴ糖混合物 (焼津水産化学, 静岡), キトサンダイマー (焼津水産化学, 静岡), キトサンテトラマー (焼津

水産化学. 静岡), キトサン原末(富士バイオ. 静岡), 低分子キトサンSK-2(甲陽ケミカル株式会社. 東京), キトサンFM200(甲陽ケミカル株式会社. 東京), キチンオリゴ糖(甲陽ケミカル株式会社. 東京), キチンオリゴ糖混合物(焼津水産化学. 静岡), キシロオリゴ糖95P(サントリー株式会社. 東京), オリゴミックス(富士バイオ. 静岡), グルコサミンHCl(焼津水産化学. 静岡, 甲陽ケミカル株式会社. 東京), Nアセチルグルコサミン(焼津水産化学. 静岡)を用いた.

3) サンプルの調製

サンプルは蒸留水に溶解させ, 20.0mg/mlの濃度の水溶液を作成し, 3000回転, 5分間の遠心分離をかけ, 上清及びそれを希釈しながら, 2.0mg/ml, 0.2mg/mlの濃度に調整し, 測定に使用した. 濃度調製には寶城らの報告をもとにした¹⁶⁾.

4) スーパーオキシドアニオンラジカル($\cdot O_2^-$)及びヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)生成に用いた試薬

スピントラップ剤には, 5,5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)(同仁化学研究所, 熊本)を用い, $\cdot OH$ の二次的生成を防ぐ目的で使用した金属キレート剤には, Diethylene triamine-N, N, N', N'', N'''-pentaacetic acid (DETAPAC; $C_{14}H_{23}N_5O_{10}$)(同仁化学研究所, 熊本)を用いた.

$\cdot O_2^-$ の生成系には, Hypoxanthine (HPX; $C_5H_4N_4O$)(Sigma Chemical Co., St Louis, USA)とXanthine oxidase (XOD)(Boehringer Mannheim, GmbH, Germany), リン酸緩衝液(PB)(Iatron Laboratories, INC. Tokyo)を用いた.

SODの検量線の作成には, SOD標準検量線溶液セット(同仁化学研究所, 熊本)を用いた.

$\cdot OH$ の生成にはフェントン反応を用いるために, 過酸化水素(H_2O_2)(Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka), 硫酸第一鉄($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)(Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka)を使用した.

試薬の調整には, 超純粋で作成したヤトロン社

製リン酸緩衝液に, 2.0Nの水酸化ナトリウムを少しずつ加えて, pHが7.8になるようにしたものを使用した.

5) 測定機器

日本電子製ESR装置(JES-FR30)と石英扁平水溶液セル(JEOL LLC-04A ESR cuvette)を使用した.

2. 実験方法

1) $\cdot O_2^-$ 抑制率の測定

$\cdot O_2^-$ はヒポキサンチン—キサンチンオキシダーゼ反応(HPX-XOD)を発生系とした^{15, 17~19)}.

試験管に2mMのHPXを50 μ l, 5.5mMのDETAPACを35 μ l, 9.2MのDMPOを15 μ l, サンプルを50 μ lとり, 攪拌し, 0.4U/mlのXODを50 μ l加え, 再び攪拌した後, 石英扁平セルに吸い上げ, ESRスペクトロメーターのキャビティに装着した. XODを添加してから80秒後に測定を開始し, $\cdot O_2^-$ のスピンアダクト(DMPO- O_2^-)を分析した.

DMPO- O_2^- の信号強度は, 内部標準であるMnO(manganese oxide)の信号強度に対する相対強度として算出し, リン酸緩衝液をコントロールとした.

サンプルのスピンアダクトの強度をコントロールの信号強度と比較し, サンプルの $\cdot O_2^-$ 抑制率を計算した(式2).

活性酸素抑制率

$$= \{1 - RI(\text{sample}) / RI(\text{control})\} \times 100 \dots (\text{式} 2)$$

control: リン酸緩衝液, RI: スピンアダクトの信号強度

なお, ESRスペクトロメーターの測定条件は次のとおりである.

磁場掃引幅: 335.6mT

マイクロ波出力: 4mW

応答時間: 0.1秒

磁場変調: 0.1mT

測定温度: 室温

増幅率: 79

掃引時間: 2分

2) SOD様活性の測定

0.167, 0.5, 1.5, 4.5, 13.5, 40.5U/mlの濃度

のSOD標準キットの信号強度を上記と同様の手順で測定し、MnOの信号強度との比をSOD濃度に対してプロットすることにより検量線の作成を行い、相当するSOD濃度をサンプルのSOD様活性とした。

3) $\cdot\text{OH}$ 抑制率の測定

$\cdot\text{OH}$ の発生系にはフェントン反応を用いた¹⁸⁾。

試験管に1mMの FeSO_4 -DETAPAC溶液を75 μl 、サンプル50 μl 、0.92MのDMPO20 μl をとり、0.1mMの H_2O_2 75 μl を加え、攪拌し、石英扁平セルにうつし、 H_2O_2 添加後60秒後より、 $\cdot\text{O}_2^-$ の測定と同様の測定条件で、ESRスペクトロメーターを用いて $\cdot\text{OH}$ のスピニアダクト (DMPO-OH) を分析した。

$\cdot\text{OH}$ 抑制率も $\cdot\text{O}_2^-$ 抑制率と同様の計算式で求めた。

4) 統計学的処理

重合度による活性酸素抑制率の違いや、濃度による違いにはそれぞれ分散分析 (多重比較検定にはScheffes F法を用いた) を行い、アップルペクチン由来オリゴ糖と、その他のサンプルとの違いでは対応のないt検定を行った。また、pos-Sとpos-Hの比較では、 $\cdot\text{OH}$ 抑制率においては対応のないt検定を用い、 $\cdot\text{O}_2^-$ 抑制率とSOD様活性においてはWelchの検定を行った。

結果

DMPOをスピントラップ剤としたESRスピントラッピング法を行った結果、 $\cdot\text{O}_2^-$ をトラップしたシグナルであるDMPO- O_2^- と、 $\cdot\text{OH}$ をトラップしたDMPO-OHは図2-a, bのようになった。



図2-a ESRスピントラッピング法で測定されたDMPO- O_2^-

a) pos-H 20.0mg/mlのスペクトル
b) pos-H 0.2mg/mlのスペクトル

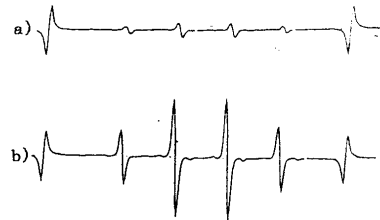


図2-b ESRスピントラッピング法で測定されたDMPO-OH

a) pos-H 20.0mg/mlのスペクトル
b) pos-H 0.2mg/mlのスペクトル

1. アップルペクチン由来のオリゴ糖の活性酸素に対する効果

1) $\cdot\text{O}_2^-$ 抑制率

20.0mg/mlの濃度において、作用の大きいものから順にpos-H (82.28%)、pos-S (48.93%)、ペクチンオリゴ糖 (30.38%) であった (図3)。

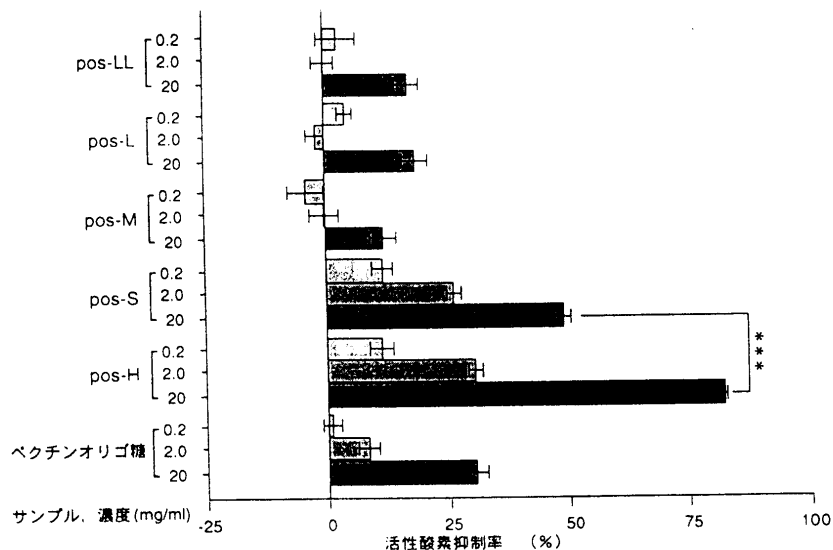


図3 アップルペクチン由来オリゴ糖の $\cdot\text{O}_2^-$ 抑制率 ***p<0.001 (Welch test)

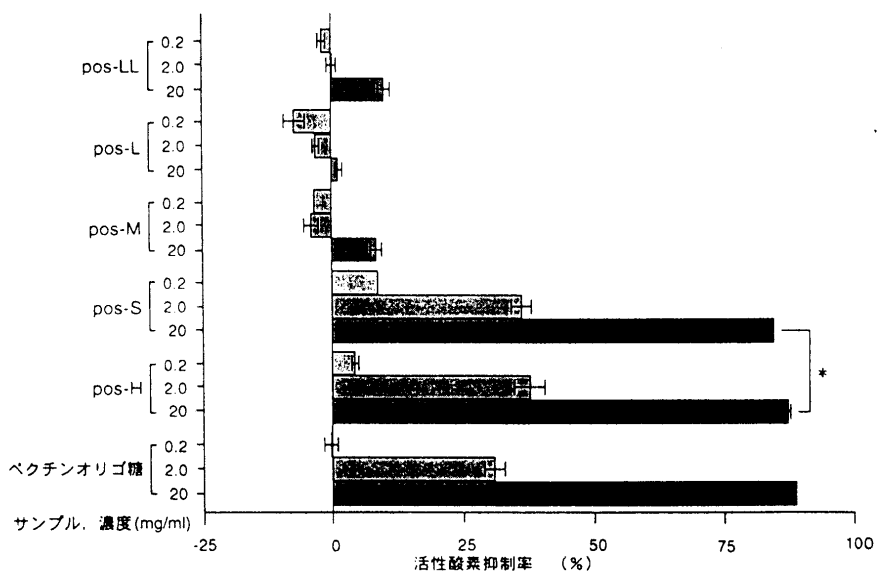


図4 アップルペクチン由来オリゴ糖の・OH抑制率 * $p < 0.05$ (Unpaired t-test)

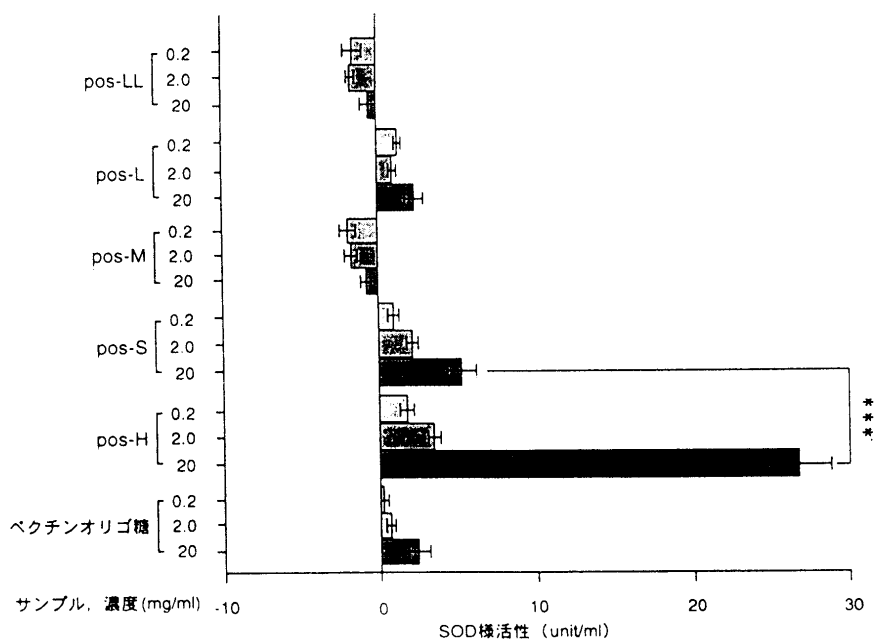


図5 アップルペクチン由来オリゴ糖のSOD様活性 *** $p < 0.001$ (Welch test)

2) ・OH抑制率

20.0mg/mlの濃度において、ペクチンオリゴ糖 (88.57%)、pos-H (87.20%)、pos-S (84.32%)の順であった (図4)。

3) SOD様活性

20.0mg/mlの濃度で比較すると、pos-H (26.72 unit/ml)、pos-S (5.27 unit/ml)、ペクチンオリゴ糖 (2.467 unit/ml) である (図5)。

2. アップルペクチン由来のオリゴ糖と、その他のサンプルの活性酸素に対する効果

表2に示すように、20.0mg/mlの濃度において、コントロールとしたリン酸緩衝液と比較して、キトサンFM200 (甲陽)、オリゴミックス (富士バイオ) とNアセチルグルコサミン (YSK) を除いたものは・O₂⁻に対して抑制作用を持ち、キトサン原末 (富士バイオ) を除いたものは・OH抑制作用をもつことが確認された。

1) $\cdot O_2^-$ 抑制率

pos-H (82.28%), pos-S (48.93%), キチンオリゴ糖 (甲陽) (43.57%), キトサンオリゴ糖 (甲陽) (40.08%)の順に高くなった。

2) $\cdot OH$ 抑制率

キトサンオリゴ糖混合物 (焼津水産化学) (93.00%), 低分子キトサンSK-2 (甲陽) (90.05%), ペクチンオリゴ糖 (88.50%), pos-H (87.20%)の順であった。

3. ペクチンオリゴ糖を平均重合度でわけたpos-S, pos-H, pos-M, pos-L, pos-LLにおける比較

1) $\cdot O_2^-$ 抑制率

pos-S, pos-H, pos-M, pos-L, pos-LLそれぞれの活性酸素抑制率を測定し、その後pos-Sの抑制率とpos-Hの抑制率の平均値をとり重合度の小さいpos-Sとpos-Hのグループとし、同様にして平均値を求めた重合度の大きいpos-M, pos-L, pos-LLのグループを比べると、pos-Sとpos-Hのグループの方が抑制率が有意に高くなった ($p < 0.001$) (表3)。

2) $\cdot OH$ 抑制率

重合度の小さいもののほうが抑制率が有意に高くなることが示された ($p < 0.001$) (表3)。

4. アップルペクチン由来オリゴ糖とその他のサンプルとの比較

1) $\cdot O_2^-$ 抑制率

pos-S, pos-H, pos-M, pos-L, pos-LLのそれぞれの抑制率の平均を求め、アップルペクチン由来オリゴ糖のグループ抑制率とし、同様に平均値を出したその他のサンプルとを比較すると、アップルペクチン由来オリゴ糖の方が、抑制率が有意に高く ($p < 0.001$)、また、重合度の小さいpos-Sとpos-Hとその他のサンプルでも、前者の抑制率

が有意に高くなった ($p < 0.001$) (表4)。

2) $\cdot OH$ 抑制率

pos-S, pos-H, pos-M, pos-L, pos-LLのグループと、その他のサンプルとを比較すると、有意な差は得られなかったが、重合度の小さいpos-Sとpos-Hとその他のサンプルでは、前者の抑制率が高くなった ($p < 0.001$) (表4)。

5. pos-Sとpos-Sを加熱したpos-Hとの比較

20.0mg/mlの濃度において、pos-Hが、 $\cdot O_2^-$ に対して有意に高く ($p < 0.001$)、 $\cdot OH$ に対して ($p < 0.05$)、SOD様活性においても ($p < 0.001$)有意に高い値を示した (図3, 4, 5)。

6. アップルペクチン由来でないオリゴ糖とその関連物質における比較

低分子キトサンSK-2 (甲陽) とキトサンオリゴ糖混合物 (焼津水産化学) は、 $\cdot O_2^-$ 抑制率においては、その他と有意な差はないが、 $\cdot OH$ に対してはその他と比較して有意に抑制率が強かった ($p < 0.001$)。

表2 アップルペクチン由来オリゴ糖とその他のサンプルの20.0mg/mlにおける活性酸素抑制率

サンプル(20.0mg/ml)	O_2^- 抑制率(%)	$\cdot OH$ 抑制率(%)
ペクチンオリゴ糖	30.38	88.57
pos-H	82.28	87.20
pos-S	48.93	84.32
pos-M	11.94	8.56
pos-L	18.72	1.49
pos-LL	17.16	10.06
キトサンオリゴ糖 (山口化研)	15.94	14.14
キトサンオリゴ糖混合物 (YSK)	16.71	93.00
キトサンオリゴ糖 (甲陽)	40.08	47.43
キトサンダイマー (YSK)	22.85	5.86
キトサンテトラマー (YSK)	15.37	7.91
キトサン原末 (富士バイオ)	0.65	-0.07
低分子キトサンSK-2 (甲陽)	34.59	90.05
キトサンFM200 (甲陽)	-0.73	5.70
キチンオリゴ糖 (甲陽)	43.57	47.71
キチンオリゴ糖混合物 (YSK)	1.70	10.65
キノロオリゴ糖95P (サントリー)	11.58	11.32
オリゴミックス (富士バイオ)	0.0	5.08
グルコサミンHCl (YSK)	11.78	4.67
グルコサミンHCl (甲陽)	14.53	8.46
Nアセチルグルコサミン (YSK)	-0.5	9.45

リン酸緩衝液の値をコントロールとした。各データは $\cdot O_2^-$ 抑制率におけるペクチンオリゴ糖, pos-H, S, M, L, LLは5回測定, それ以外は3回測定の平均値を示している。

表3 アップルペクチン由来オリゴ糖の重合度と濃度による活性酸素抑制率の違い

サンプル	濃度					
	0.2mg/ml		2.0mg/ml		20.0mg/ml	
	$\cdot O_2^-$ 抑制率 (%)	$\cdot OH$ 抑制率 (%)	$\cdot O_2^-$ 抑制率 (%)	$\cdot OH$ 抑制率 (%)	$\cdot O_2^-$ 抑制率 (%)	$\cdot OH$ 抑制率 (%)
pos-S, pos-H	11.47	6.63	28.40	36.68	65.60	85.76
pos-M, pos-L, pos-LL	1.06	-4.19	-0.69	-2.33	17.13	6.71

** $p < 0.01$
*** $p < 0.001$

一元配置分散分析 (Scheffes F法)

表4 アップルペクチン由来オリゴ糖と
その他のサンプル比較

サンプル	・O ₂ ⁻ 抑制率 (%)	・OH抑制率 (%)
pos-S, H, M, L, LL	38.20***	38.34
pos-S, H	65.60***	85.76***
その他のサンプル	15.24	24.10

サンプルの濃度は20.0mg/mlであり、その他のサンプルとはアップルペクチン由来のオリゴ糖以外のサンプルを指す。

***p<0.001 Unpaired t-test

考 察

以上の研究によりアップルペクチン由来のオリゴ糖が活性酸素である・O₂⁻と・OHを抑制する効果があり、その効果は低重合度においてより高いことが初めて明らかにされた。

活性酸素が発癌、転移、増殖の全ての過程に強く関わっていることはよく知られており、活性酸素の中でも・OHがDNA損傷に及ぼす影響が強いとされている²⁰⁾。

従って、活性酸素を消去又は生成することを抑制すれば発癌を抑えられることが可能と考えられている。このことについては、化学発癌マウスにおいてビタミンEを投与することで肺癌の発癌が抑制されるという報告²¹⁾や、犬にアスコルビン酸を投与すると、SOD活性が上昇し、CPKやGOT等の逸脱酵素が抑制され、発癌が抑制されるという研究²²⁾がある。また、アゾキシメタン誘発結腸癌ラットに緑茶抽出物を与えると発癌が抑制されたという発表²³⁾、抗酸化剤の投与により発癌を防ぐことができると報告されている²⁴⁾。活性酸素によって起こる発癌につながるDNAの損傷が、SODやグルタチオン等の抗酸化剤で軽減されること等が明らかになりつつある^{25,26)}。

既に化学発癌モデルラットにおいて大腸癌の発癌抑制と転移抑制が報告されているアップルペクチンから作られたオリゴ糖は、今回の研究で・O₂⁻と・OHという活性酸素の発生を抑える効果をもつことが示された。よって、アップルペクチン由来のオリゴ糖の発癌抑制作用の作用機序の一端を活性酸素抑制作用をもつことで役割を果たしていると考えられることができる。

また、平均重合度で分けたpos-S, pos-M, pos-L, pos-LLやpos-Sを加熱したpos-Hの中においては、重合度の低いものほど、・O₂⁻に対しても・OHに対しても抑制率が高くなることが示された。オリゴ糖は胃では消化されずそのまま腸まで届き、腸内細菌の栄養源として利用されるものであるが、腸内細菌が最も利用しやすいのが分子分量によって異なるとすれば、どちらなのかを研究する必要がある。

・OH抑制作用においては統計的な有意差は認められなかったが、・O₂⁻抑制作用において、アップルペクチン由来オリゴ糖は、比較した他のサンプルよりも活性酸素抑制率が高く、強い抗酸化作用が存在していることが示唆された。

他のサンプルとの活性酸素抑制率の違いは重合度の違いから導かれたのか、オリゴ糖そのものの違いから生じたものかは、今回の研究だけでは結論を述べることはできない。しかし、前述の田澤らのグループ研究では、アップルペクチンは他のペクチンよりも発癌抑制効果が高く現われていることと、今回の研究でアップルペクチン由来オリゴ糖が他のオリゴ糖より活性酸素抑制効果が高いこと、アップルペクチン由来ではないその他のサンプルのうち、低重合度のものが・OHに対して抑制率が強かったこととあわせて考えれば、アップルペクチン由来オリゴ糖は優れた抗酸化剤であり、活性酸素の抑制作用を通じて、発癌抑制効果を発揮していると考えられる¹¹⁻¹⁴⁾。

発癌と関わりがある活性酸素には数種あるうち、今回の研究では安定して測定が行える方法を用いて、・O₂⁻と・OHのみを測定の対象としたが、サンプルによっては・O₂⁻と・OHの抑制率がかなり異なることから、UV照射等による活性酸素抑制についても測定する必要がある。

さらに、pos-Hのように加熱したものが、統計的に有意に他のアップルペクチン由来オリゴ糖より活性酸素抑制率が高かったことについては、野菜抽出物の抗DNA切断作用を調査し、冷水抽出物より、熱水抽出物または加熱したもののほうが抗DNA切断作用が強い可能性があるという研究や²⁷⁾、加熱したものはDNAのダメージの指標である8-OHdGの量が少ないという報告²⁸⁾と矛盾

しない。pos-Hはpos-Sを加熱した物質であるが、他のサンプルについても加熱を行い、分析すべきであり、今後も研究を継続したい。

看護への応用としては、アップルペクチンの機能が明らかになれば、よりよい健康を求めめるためだけではなく、癌予防や老化対策をも目的とした食事指導に、アップルペクチンの含まれるりんごを食物繊維の供給源として、すすめることができる可能性がある。

なお、今回の研究は、in vitroでの実験研究であり、経口投与での使用が予測されるアップルペクチンの発癌抑制の作用機序の解明には、より多くのin vitroでの基礎研究と、生体を用いたin vivoにおける研究が今後必要である。

結 論

今回の研究では、既に化学発癌モデルラットにおいて大腸癌発癌抑制作用が明らかとなっているアップルペクチンから得られたオリゴ糖の作用機序の解明を目的とし、発癌との相関がある活性酸素に対する影響を分析した。

その結果、アップルペクチン由来のオリゴ糖は活性酸素抑制作用をもち、他のオリゴ糖やその関連物質よりも、活性酸素抑制作用が高く、アップルペクチン由来のオリゴ糖の中では、重合度の低いものが抑制作用を強くもつことが明らかとなった。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、データの収集・整理にご協力くださいました老田尚子氏を始めとする創傷治癒実験室の方々、ペクチンオリゴ糖の分画調整にご協力頂きました松江 一氏、市田淳治氏、風晴浩一氏を始めとする青森県産業技術開発センターの皆様へ深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Haenszel W, Berg JW, Segi M et al. : Large-bowel cancer in Hawaiian Japanese. J. Natl. Cancer. Inst. 51(6) : 1765-1779, 1973.
- 2) 広畑富雄 : 人種別に見たハワイ住民の死亡経験. 日本公衛誌 21(1) : 17-26, 1974.
- 3) 深尾彰他 : 大腸疾患の疫学. Medicina 28(9) : 1494-1496, 1991.
- 4) 中路重之, 棟方昭博, 吉田豊 : 大腸疾患の発生状況ならびに大腸疾患と食物繊維. 消化器科 10 : 86-94, 1989.
- 5) Armstrong B, Doll R : Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. Int. J. Cancer 15 : 617-631, 1975.
- 6) Graham S, Mettlin C : Diet and colon cancer. Am. J. Epidemiol. 109(1) : 1-20, 1979.
- 7) Reddy BS, Hedges AR, Laakso K et al : Fecal bulk and constituents of high-risk North American and low-risk Finish population. Cancer 42 : 2832-2838, 1978.
- 8) Graf E, Eaton JW : Dietary suppression of colonic cancer. Cancer 56 : 717-718, 1985.
- 9) 尾岸恵三子, 正木治恵編著 : 看護栄養学. 122-132, 医歯薬出版, 東京, 1996.
- 10) Tazawa K, Ohkami H, Yamashita I et al : Effect of apple pectin on Azoxymethane-induced colon carcinogenesis-fecal enzyme activities and prostaglandin E₂ level in colonic mucosa. In "Recent Advantage in Management of Digestive Cancers Vol. 1" Takahashi T, pp 471-473, Springer-Verlag, Tokyo, 1993.
- 11) Tazawa K, Ohkami H, Yamashita I et al : Anticarcinogenic and/or antimetastatic action of apple pectin in experimental rat colon carcinogenesis and on hepatic metastasis rat model. In "Functional Foods" Shibamoto T, pp 96-103, ACS Books, Washington DC, 1998.
- 12) Tazawa K, Ohkami H, Yamashita I et al : Anticarcinogenic action of apple pectin on fecal enzyme activities and mucosal

- or portal prostaglandin E₂ levels in experimental rat colon carcinogenesis. *J. Exp. Clin. Res.* 16(1): 33-38, 1997.
- 13) Tazawa K, Ohkami H, Yamashita I et al: Effects of apple pectin on fecal enzyme activities and prostaglandin E₂ levels in Azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. In "International Conference on Food Factors: Chemistry and Cancer Prevention" Ohigashi H, Osawa T, pp178-181, Springer-Verlag, Tokyo, 1997.
- 14) Ohkami H, Tazawa K, Yamashita I et al: Effects of apple pectin on fecal bacterial enzymes in Azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 86(6): 523-529, 1995.
- 15) 平松 緑, 河野雅弘: ESRによるSuperoxide Dismutase活性測定法の開発. *日本電子ニュース* 26(6): 106-109, 1986.
- 16) 寶城俊成, 高木紀子, 平松緑他: 霊芝103のフリーラジカル消去作用について. 平成6年度生物ラジカル研究所研究発表会要旨集 72-75, 1995.
- 17) 河野雅弘: ESR法によるスーパーオキシドの分析. *Lab. Clin. Pract.* 7(2): 65-71, 1989.
- 18) 吉川敏一, 内藤裕二: ESRの臨床応用. *J. Act. Oxyg. Free Rad.* 4(2): 212-225, 1993.
- 19) 上野郁子, 金ヶ崎士郎: ESRスピントラップ法によるフリーラジカル測定法の原理と実際. *日本細菌学雑誌* 45(3): 653-663, 1990.
- 20) 越智崇文: 発癌プロモーターとフリーラジカル. *組織培養* 14(4): 137-142, 1988.
- 21) 市川富夫, 矢野友啓, 石川学: 活性酸素により促進されるマウス肺発癌に対するビタミンEの防御効果. *ビタミン* 67(3): 133, 1993.
- 22) 渡井健男: MNMSに対するOxygen Radical Scavengerの効果に関する研究. *日本心臓血管外科学会雑誌* 20(1): 5-10, 1990.
- 23) Inagake M, Yamane T, Kitao Y et al: Inhibitory effect of green tea extract against Azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rat. In "Recent Advantage in Management of Digestive Cancers vol. 1" Takahashi T, pp 474-476, Springer-Verlag, Tokyo, 1993.
- 24) 宇和川 賢: 化学物質の発癌性検索のための多臓器中期発癌性試験法の検討. *名古屋市立大学医学会雑誌* 44(1): 61-86, 1993.
- 25) Yanagisawa T, Urade M, Takahashi Y et al: Levels of superoxide dismutase, glutathione and poly (ADP-ribose) polymerase in radioresistant human KB carcinoma cell L1ne, *Jpn. J. Cancer Res.* 88: 1070-1077, 1997.
- 26) Takehara Y, Yamaoka K, Sato EF et al: DNA damage by various forms of active oxygens and its inhibition by different scavengers using plasmid DNA. *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR* 26: 38-50, 1994.
- 27) 前田 浩: 野菜抽出物および食用油の抗脂質ラジカル活性と抗DNA切断作用. *Environ. Mutagen Res.* 18: 53-61, 1996.
- 28) Deng XS, Tuo J, Poulsen HE et al: Prevention of oxidative DNA damage in rats by Brussels sprouts. *Free Rad. Res.* 28: 323-333, 1998.

The radical scavenging activity of pectic oligosaccharide from apple pectin evaluated by electron spin resonance (ESR)

Keiko HANMYOU¹, Hirohide NAMIKAWA¹, Tomohiro SAITOU²,
Hideo OHKAMI² and Kenji TAZAWA¹

¹School of Nursing, and ² Second Department of Surgery,
Toyama Medical and Pharmaceutical University

Abstract

We investigated the action of apple pectin on anticarcinogenesis focusing on the antioxidant activity evaluated by an electron spin trapping technique in which the superoxide anion and hydroxyl radicals were generated by HPX-XOD and Fenton reaction systems, respectively. In the apple pectic oligosaccharide-containing assay system, trapping-signals for both radicals became significantly lower compared with phosphate buffered saline-containing one, indicating that apple pectic oligosaccharide actually exhibited scavenging activity. When apple pectic oligosaccharide was divided into five fractions based on the degree of polymerization, a fraction with a lower polymerization (pos-S) showed a stronger scavenging activity than those with a higher one. Moreover, this activity was enhanced after heating of pos-S (121°C for 30min). These findings strongly suggest that antioxidant activity of apple pectic oligosaccharide might contribute at least in part to anticarcinogenic action of apple pectin.

Key words

apple pectin, pectic oligosaccharide, free radical,
superoxide anion radical, hydroxyl radical