

野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量への咀嚼の影響および口腔内細菌との関連

Effect of Mastication on the Contents of Nitrate and Nitrite in Vegetables and Its Relation to Oral Bacteria

角田 香澄 梅田 祐実 小塚 諭

KASUMI Tsunoda YUMI Umeda and SATOSHI Kozuka

【要約】

発色剤として加工食肉製品等で使用される亜硝酸塩は、アミン類と反応することで発がん性を持つ N-ニトロソ化合物を生成することが知られている。しかし、亜硝酸塩は、口腔内細菌の働きにより野菜中の硝酸塩からも生成される。そこで、本研究では、小松菜を用いて野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量への咀嚼の影響および咀嚼後の野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量と口腔内細菌の関連を検討した。その結果、野菜中の亜硝酸塩含量は咀嚼後に増加することが明かになった。さらに咀嚼後の亜硝酸塩含量と口腔内細菌数が関連する可能性が示唆された。

キーワード 硝酸塩 亜硝酸塩 咀嚼 口腔内細菌

1. はじめに

わが国で使用されている食品添加物は、食品衛生法に基づき、指定添加物、既存添加物、天然香料および一般飲食物添加物の 4 種類に分けられ、食品の長期保存や嗜好性および外観の向上等の目的で使用されている。しかし、食品添加物は毒性についても報告されており、特定のタール色素は、動物実験で発がん性が確認されているだけでなく¹⁾、子どもの多動性と関連する可能性があることも報告されている²⁾。

N-ニトロソ化合物は、加工食肉製品等の発色剤として使用されている亜硝酸塩がアミン類と反応することで生成される化合物で、強い発がん性を示し、胃がんや食道がん等の発症リスクを高めることが確認されている³⁾。その為、現在、亜硝酸塩を使用しない無塩せきの加工食肉製品も販売されている。しかし、亜硝酸塩は野菜に多く含まれる硝酸塩からも生成される為、加工食肉製品の摂取だけが問題ではない。

硝酸塩は、それ自身には毒性がなく、食品の保存料としても使用されている。しかし、実際にヒトが摂取する硝酸塩の 60~80% が野菜摂取によるものであり⁴⁾、葉菜類の硝酸塩含量が特に高いことが明らかになっている⁵⁾。食品中の硝酸塩は、口腔内や胃内に存在する硝酸塩還元能を持つ細菌により亜硝酸塩に還元されるが、胃内に存在する常在細菌数は、口腔内と比較して少なく、優勢菌であるストレプトコッカス科⁶⁾は硝酸塩還元能を欠く菌種が多い

ことから、食品から摂取した硝酸塩の還元（亜硝酸塩の生成）には口腔内細菌が大きく関与していることは明かである。

そこで、本研究では、健康な食生活には欠かせない野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量への咀嚼の影響および咀嚼後の野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量と口腔内細菌の関連を検討した。

2. 方法

2-1. 野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量への咀嚼の影響

(a) 被験者

本研究では、ヘルシンキ宣言に則り、実験の趣旨および方法に関する十分な説明を行った上で同意書を提出した 8 名（22 歳女性）を被験者とした。

(b) 試料

試料には、硝酸塩含量が高いことが既に明かとなっている小松菜を用いた⁸⁾。実験には全て同一県産の市販品を用いた。事前に食用に供せられる限度で茹でた小松菜を咀嚼前とした。朝食摂取から 3~4 時間後（昼食を食べる前）に、咀嚼前同様に茹でた小松菜を 1 秒に 1 回のペースで 1 分間被験者に咀嚼してもらい、飲み込まずはき出してもらった小松菜を咀嚼後とした。なお、朝食から試料を咀嚼するまでの間の飲食は水のみとした。

(c) 硝酸塩含量の測定

試料中の硝酸塩含量は、2,6-キシレノール比色法⁹⁾を用いて測定した。実際には、細切りにし均一に混ぜ合わせた小松菜を正確に 10g 秤量し、80℃の温湯 50mL を加え、さらに 0.5N 水酸化ナトリウム溶液 10mL、12%硫酸亜鉛溶液 10mL を加えて攪拌し、80℃で 20 分間加温した。その後、室温で冷却し、10%酢酸アンモニウム溶液 10mL を加え、蒸留水で 100mL に定容後、ろ過したろ液を試料溶液とした。

試料溶液 1mL を試験管にとり、蒸留水 4mL、2%スルファミン酸溶液 0.2mL を加え、室温で 10 分間放置した。その後、15%硫酸銀溶液 2mL を滴下し、室温で 20 分間放置した。次に、濃硫酸 5mL を冷却しながら滴下し、さらに 10% 2,6-キシレノール溶液を 0.2mL 加え、40℃の水浴中で 30 分間放置した後、433nm の吸光度を測定した。吸光度より次式を用いて硝酸塩含量を算出した。

$$\text{硝酸塩(mg/kg)} = \text{硝酸イオン態窒素含量} \times 4.428 \times 10.$$

測定の際には、全て市販品特級の試薬を用いた。

(d) 亜硝酸塩含量の測定

試料中の亜硝酸塩含量は、ナフチルエチレンジアミン吸光光度法¹⁰⁾を用いて測定した。実際には、細切りにし均一に混ぜ合わせた小松菜を約 5g 秤量し、乳鉢と乳棒ですりつぶしながら 80℃の温湯 80mL を加え、ビーカーに移した。その後 0.5N 水酸化ナトリウム溶液 20mL、12%硫酸亜鉛溶液 20mL を加えて混和し、80℃で 20 分間加温した。室温で冷却後、pH9.5 に調整し、ろ過したろ液を 200mL に定容したものを試料溶液とした。

試料溶液 10mL を試験管にとり、スルファニルアミド溶液とナフチルエチレンジアミン溶液をそれぞれ 1mL 加え、室温で 15 分間反応させた後、540nm の吸光度を測定し、次式を用いて亜硝酸塩含量を算出した。

$$\text{亜硝酸塩 (g/kg)} = C / (50 \times W).$$

C : 試料溶液中の亜硝酸塩含量(μg/10mL)

W : 試料採取量(g)

測定の際には、全て市販品特級の試薬を用いた。

2-2. 咀嚼後の野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量と口腔内細菌の関連

(a) 被験者

前節同様、ヘルシンキ宣言に則り、実験の趣旨および方法に関する十分な説明を行った上で同意書を提出した 8 名 (22 歳女性) を被験者とした。

(b) 咀嚼後の野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量

野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量への咀嚼の影響 (前節) を検討した際に測定した咀嚼後のデータを用いた。

(c) 口腔内細菌数の測定

口腔内細菌は、朝食摂取から 3~4 時間後 (昼食を食べる前) に、綿棒を用いて採取し、採取後の綿棒を 5mL 滅菌済生理食塩水に懸濁したものを試料原液とした。試料原液を滅菌済生理食塩水で段階希釈し、ブレインハートインフュージョン寒天培地 (BD) (以下 BHI 寒天培地) で 37℃、48 時間好気培養した。培養の際には、通性嫌気性菌も培養するために重層した。培養後、唾液 1mL あたりの細菌数を算出し口腔内細菌数とした¹¹⁾。なお、朝食から試料を咀嚼するまでの間の飲食は水のみとした。

(d) 口腔内細菌の硝酸塩還元能の測定

口腔内細菌を培養後、シャーレを 3 分画し、1 区画からコロニーを 15 個鈎菌し、ダーラム管入硝酸塩ブロス (BD) を用いて 37℃で 48 時間培養した。培養後、スルファニル酸溶

液および α -ナフチルアミン溶液をそれぞれ 0.5mL ずつ添加し、1~2 分で赤変した場合、硝酸塩還元能陽性とした。赤変が認められない場合、さらに亜鉛末を微量加え、色の変化が認められなければ硝酸塩還元能陽性とした。

2-3. 統計解析

結果は、平均値±標準偏差で示した。解析には EZR¹²⁾を使用し、有意水準を 5%とした。

3. 結果

3-1. 野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量への咀嚼の影響

表 1 に生、咀嚼前および咀嚼後の小松菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量を示した。生の小松菜中の硝酸塩含量は 191.1 ± 29.6 mg/100g であり、亜硝酸塩含量は 0.054 ± 0.013 mg/100g であった。咀嚼前の小松菜中の硝酸塩含量は 231.2 ± 31.6 mg/100g であり、亜硝酸塩含量は 0.076 ± 0.016 mg/100g であった。8 名の被験者の咀嚼後の小松菜中の硝酸塩含量は 262.2 ± 53.2 mg/100g であり、亜硝酸塩含量は 0.404 ± 0.139 mg/100g であった。

表 1 小松菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量

	生	咀嚼前 ^{*1}	咀嚼後 ^{*2}
硝酸塩 (mg/100g)	191.1 ± 29.6	231.2 ± 31.6	262.2 ± 53.2
亜硝酸塩 (mg/100g)	0.054 ± 0.013	0.076 ± 0.016	0.404 ± 0.139

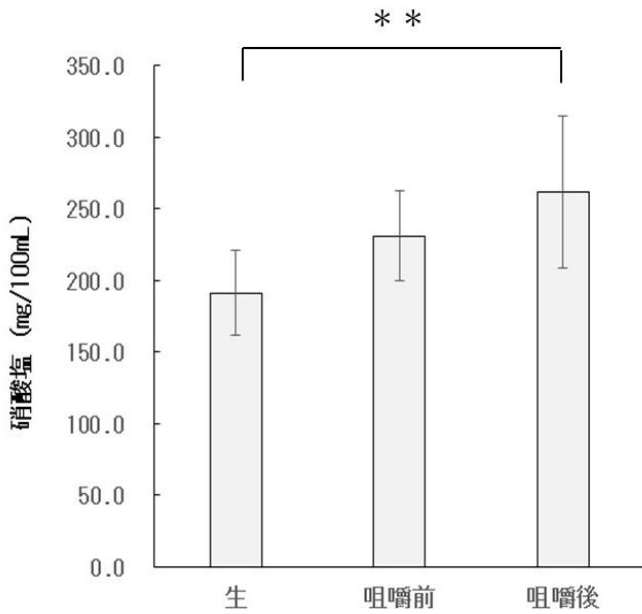
n=8 結果は平均値±標準偏差で示した。

*1 食用に供せられる限度で茹でた小松菜を咀嚼前とした。

*2 食用に供せられる限度で茹で、被験者が咀嚼した小松菜を咀嚼後とした。

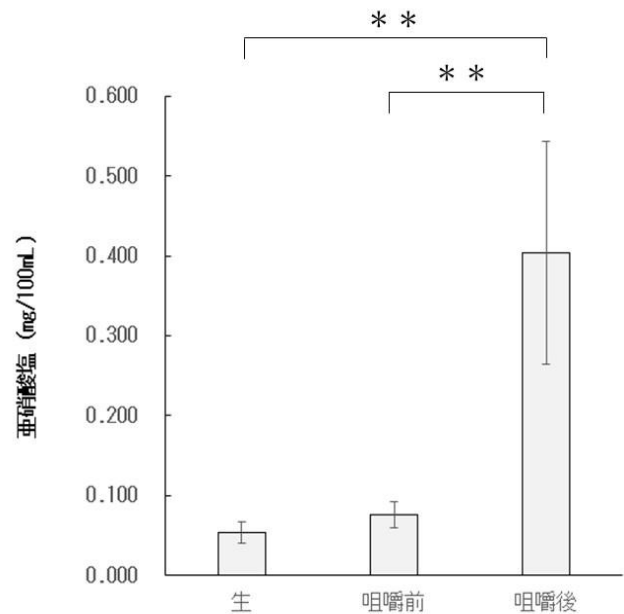
生、咀嚼前および咀嚼後の小松菜中の硝酸塩含量を Turkey 検定により比較したところ、生と咀嚼後の間に有意な差が認められた ($p=0.008$)。一方、生と咀嚼前および咀嚼前と咀嚼後の硝酸塩含量には有意な差は認められなかった (生・咀嚼前： $p=0.165$ 、咀嚼前・咀嚼後： $p=0.327$) (図 1)。

さらに、生、咀嚼前および咀嚼後の小松菜中の亜硝酸塩含量を Turkey 検定により比較したところ、生と咀嚼後および咀嚼前と咀嚼後の小松菜中の亜硝酸塩含量に有意な差が認められた (生・咀嚼後： $p<0.01$ 、咀嚼前・咀嚼後： $p<0.01$)。一方、生と咀嚼前の小松菜中の亜硝酸塩含量には有意な差は認められなかった ($p=0.869$) (図 2)。



P<0.01 : ** (Turky検定による)

図1 小松菜中の硝酸塩含量への咀嚼の影響 (n=8)



P<0.01 : ** (Turky検定による)

図2 小松菜中の亜硝酸塩含量への咀嚼の影響 (n=8)

3-2. 咀嚼後の野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量と口腔内細菌の関連

8名の被験者に小松菜を咀嚼してもらった所、咀嚼後の小松菜中の硝酸塩含量は $262.2 \pm 53.2 \text{mg}/100\text{g}$ であり、亜硝酸塩含量は $0.404 \pm 0.139 \text{mg}/100\text{g}$ であった (表 1)。

表 2 に被験者の口腔内細菌数を測定した結果を示した。被験者の口腔内細菌数は、 $9.30 \pm 0.671 \text{ log CFU/ml}$ であった。さらに被験者の口腔内細菌の硝酸塩還元能陽性率を算出したところ、 $52.8 \pm 18.6\%$ であった (表 3)。

表2 被験者の口腔内細菌数

被験者 (n=8)	口腔内細菌数 (log CFU/ml)
A	8.69
B	9.13
C	9.59
D	LA ^{*1}
E	10.1
F	9.78
G	8.18
H	9.60
平均値±標準偏差 ^{*2}	9.30±0.671

*1 LA : Laboratory Accident

*2 7名の被験者の結果を平均値±標準偏差で示した。

表3 被験者の口腔内細菌の硝酸塩還元能陽性率

被験者 (n=8)	硝酸塩還元能陽性率 (%)
A	73.3
B	13.5
C	53.3
D	LA ^{*1}
E	60.0
F	54.2
G	56.9
H	58.7
平均値±標準偏差 ^{*2}	52.8±18.6

*1 LA : Laboratory Accident

*2 7名の被験者の結果を平均値±標準偏差で示した。

咀嚼後の小松菜中の硝酸塩含量と、口腔内細菌数および硝酸塩還元能陽性率との関連性を Pearson の相関係数を用いて検討したところ、咀嚼後の小松菜中の硝酸塩含量と口腔内細菌数および硝酸塩還元能陽性率の間に相関は認められなかった（口腔内細菌数： $r=-0.0449$ $p=0.924$ 、硝酸塩還元能陽性率： $r=0.0636$ $p=0.919$ ）（図 3、図 4）。

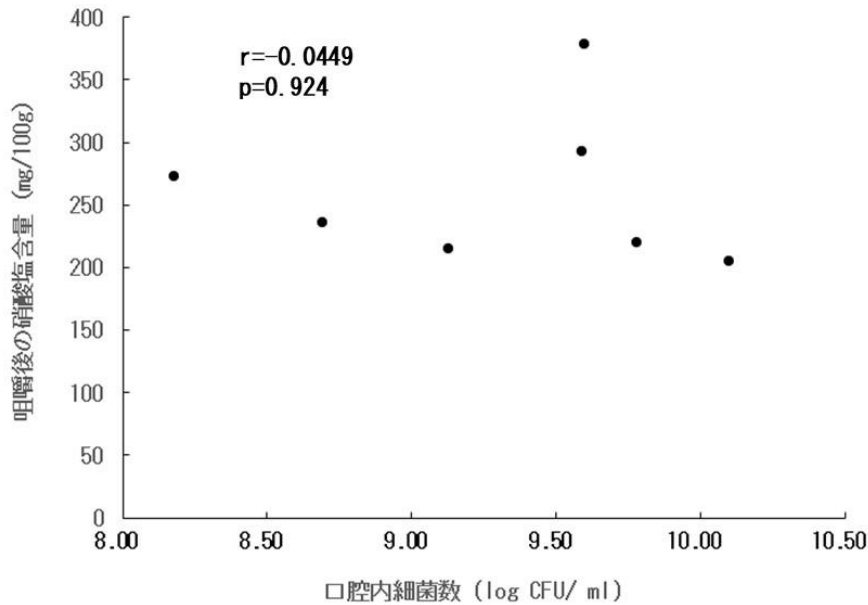


図3 咀嚼後の硝酸塩含量と口腔内細菌数の関係
 $n=7$ r =Pearsonの相関係数

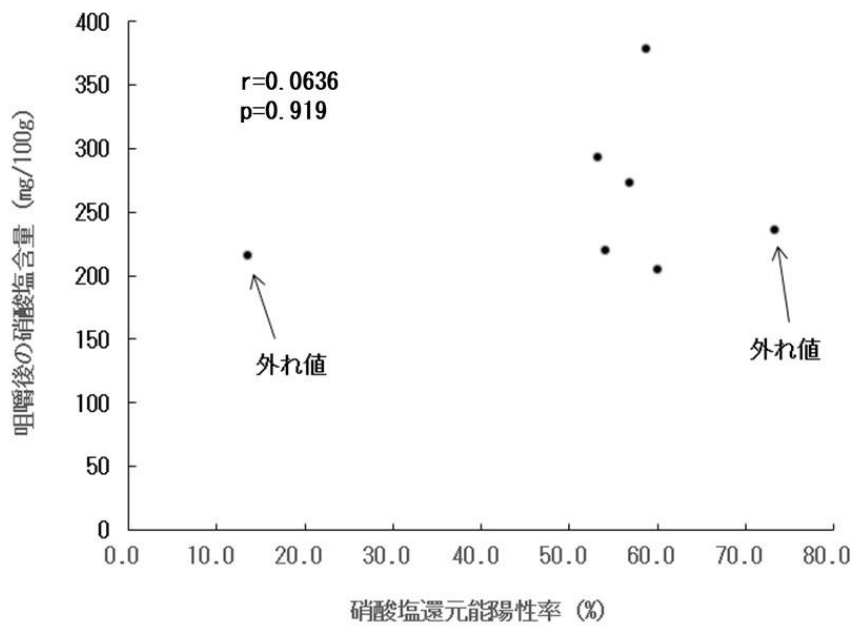


図4 咀嚼後の硝酸塩含量と硝酸塩還元能陽性率の関係
 $n=5$ r =Pearsonの相関係数
 外れ値の検出はSmirnov-Grubbs検定を実施した。

咀嚼後の小松菜中の亜硝酸塩含量と、口腔内細菌数および硝酸塩還元能陽性率との関連性を Pearson の相関係数を用いて検討したところ、咀嚼後の小松菜中の亜硝酸塩含量と口腔内細菌数の間には、有意ではなかったが弱い負の相関が認められた ($r=-0.532$ $p=0.219$) (図 5)。一方、咀嚼後の小松菜中の亜硝酸塩含量と硝酸塩還元能陽性率との間に相関は認められなかった ($r=-0.0959$ $p=0.878$) (図 6)。

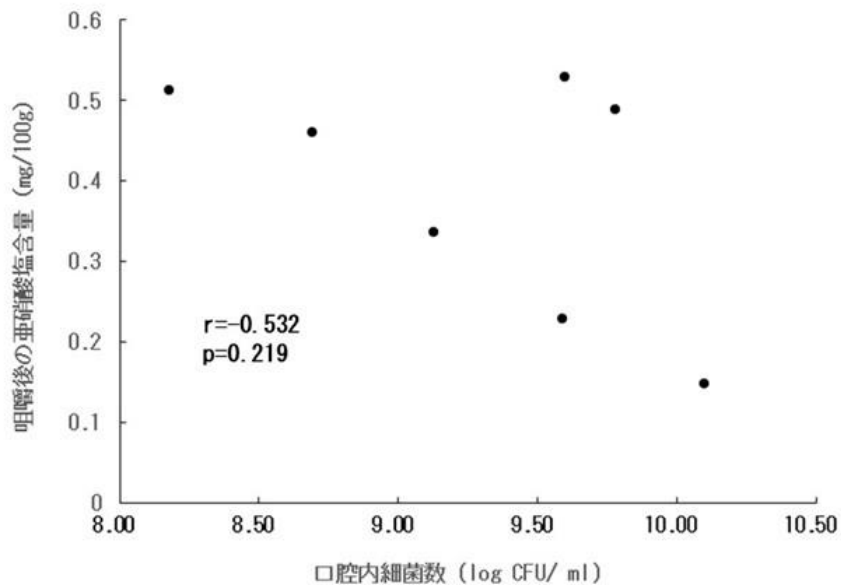


図5 咀嚼後の亜硝酸塩含量と口腔内細菌数の関係
n=7 r=pearsonの相関係数

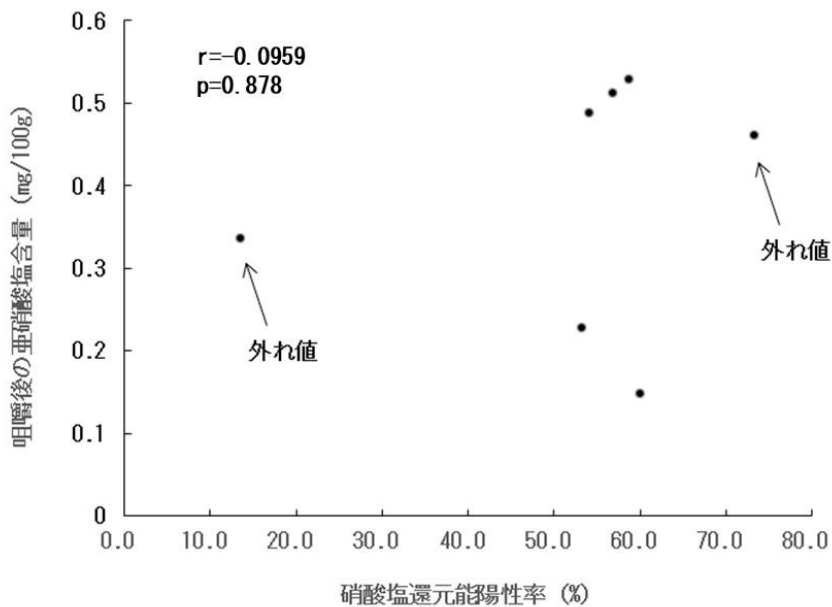


図6 咀嚼後の亜硝酸塩含量と硝酸塩還元能陽性率の関係
n=5 r=Pearsonの相関係数
外れ値の検出はSmirnov-Grubbs検定を実施した。

4. 考察

本研究において、野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量への咀嚼の影響および咀嚼後の野菜中の硝酸塩および亜硝酸塩含量と口腔内細菌との関連性を、小松菜を用いて検討したところ、小松菜中の亜硝酸塩含量は咀嚼により有意に増加することが明らかになった。さらに、咀嚼後の亜硝酸塩含量と口腔内細菌数の間に関連性がある可能性が示唆された。

生の小松菜中の硝酸塩含量は、先行研究に準じた値であった¹³⁾。また、生の状態と咀嚼後の小松菜中の硝酸塩含量には有意な差が認められたが、生と咀嚼前および咀嚼前と咀嚼後では有意な差は認められなかった。日本食品標準成分表 2015 年版（七訂）¹⁴⁾には、茹でることによって小松菜中の硝酸塩含量が減少することが示されているが、本研究では減少は認められなかった。これは、茹で調理後軽く水気をきるのみで実験を行った為、試料溶液中に硝酸塩が溶出した茹で汁が混入したことによると考えられる。

生の小松菜中の亜硝酸塩含量は硝酸塩含量同様に先行研究に準じた値であり¹³⁾、咀嚼により有意に増加した。硝酸塩含量の高い食品は貯蔵中に亜硝酸塩含量が変化することが知られており、新鮮なほうれん草を 20℃で保存した場合、保存日数が増えるに従って亜硝酸塩含量が増加する可能性があることが報告されているが¹⁵⁾本研究では、小松菜を実験当日に購入し、冷蔵保存の上、当日中に全て実験に使用した為、保存の過程で生じる亜硝酸塩が実験結果に影響しなかったと推察される。本研究で確認された小松菜中の亜硝酸塩含量の有意な増加は、咀嚼することで口腔内細菌により硝酸塩が速やかに亜硝酸塩に還元された結果であると考えられる。

咀嚼後の小松菜中の亜硝酸塩含量は、口腔内細菌数との間には弱い負の相関が認められた。これは、細菌数の多かった被験者では、BHI 寒天培地上に成育した細菌に占める硝酸塩還元能を持つ細菌の占める割合が少なかった可能性が考えられる。しかし、硝酸塩還元能陽性率との間には相関関係が認められなかった為さらなる検討が必要である。

本研究において、野菜中の亜硝酸塩含量には咀嚼および口腔内細菌が関与する可能性があることが明らかになった。しかし、本研究ではさらに検討すべき点がある。1 点目に本研究では BHI 寒天培地上に成育した好気性菌および通性嫌気性菌を口腔内細菌としたが、唾液中の総硝酸塩還元菌に占める嫌気性菌の割合は、好気性菌と比較して高い傾向にあることが報告されており¹⁶⁾嫌気性菌にも着目して実験を行う必要があると考えられる。2 点目に本研究では被験者数が少なかったことで有意な相関関係が認められなかった可能性がある。そのため、適切な被験者数で再実験を行う必要がある。3 点目に、小松菜だけではなく他の野菜でも検討することが望ましい。

野菜に含まれる硝酸塩は、口腔内細菌により亜硝酸塩に還元されアミン類との反応により発がん性を持つニトロソ化合物を生成するが、近年、亜硝酸塩からシグナル伝達物質である一酸化窒素が産生されることが報告されている¹⁷⁾。一酸化窒素は血管の柔軟性に関与することが報告されているが、半減期が短く、生体内に貯蔵することができない為、野菜の摂取が一酸化窒素の安定した供給経路の 1 つとなる可能性がある。その為、野菜中の硝酸塩の還

元に関与する要因を更に詳細に検討することが望ましいと考えられる。

5. 参考文献

- 1) Kobylewski S, et al. Toxicology of food dyes. *Int J Occup Environ Health*, 2012; 18(3):pp.220-246.
- 2) McCann D, et al. Food additives and hypersensitive behaviour in 3 year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2007; 370(9598):p.1542.
- 3) Jakszyn P, et al. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol*, 2006; 12(27):pp.4296-4303.
- 4) Weitzberg E, et al. Novel aspects of dietary nitrate and human health. *Annu Rev Nutr*, 2013; 33:pp.129-159.
- 5) 藤沼賢治他. 野菜類等の硝酸根,亜硝酸根含有量調査. 東京都健康安全研究センター研究年報, 2007; 第 58 号.
- 6) 松本昂他. 胃内細菌叢と *Helicobacter pylori* 感染. *Helicobacter Research*, 2017; 21(3):pp.235-239.
- 7) 尾関茂彦他. 細菌尿診断における亜硝酸試験の検討. 京都大学泌尿器科紀要, 1997; 43(12):pp.861-865.
- 8) 下橋淳子他. 市販野菜に含まれる硝酸塩量. 駒沢女子短期大学研究紀要, 1994; 27:pp.73-75.
- 9) 宮本文夫他. 2・6-キシレノール比色法による食品中の硝酸イオンの定量. 千葉衛研報告, 1982; 6:pp.16-20.
- 10) 公益社団法人日本薬学学会. 衛生試験法・注解 2015, pp.358-360.
- 11) 釜屋洋子. 高齢者における口腔内細菌数とケア間隔に関する研究. 国際医療福祉大学大学院医療福祉学研究科博士課程博士論文, 2014.
- 12) *EZR. Bone Marrow Transplantation*, 2013; 48:pp.452-458.
- 13) 村田美穂子他. フローインジェクション法による野菜類の硝酸および亜硝酸の分析. 日本調理科学会誌, 2000; 33(2):pp.244-248.
- 14) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会編. 日本食品標準成分表 2015 年版(七訂).
- 15) 畑明美他. 園芸食品の硝酸・亜硝酸塩に関する研究(第 1 報) 栄養と食糧, 1969; 22(9):pp.644-648.
- 16) 村松紘一他. ヒト唾液中の硝酸塩還元菌叢とその硝酸塩還元能について. 食品衛生学雑誌, 1979; 20(2):pp.106-114.
- 17) Lundberg JO, et al. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and

therapeutics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25:pp.915-922.