調査・資料

国内産野菜からのニトロソアミン生成効率

(平成 16 年 9 月 13 日受理)

大槻理美子* 菊川 清 見*†

Nitrosamine Formation from Vegetables Produced in Japan

Rimiko OHTSUKI and Kiyomi KIKUGAWA†

(School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science: 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan; † Corresponding author)

Many vegetables produced in Japan contain large amounts of nitrate that may be converted into nitrite in the oral cavity and afford carcinogenic nitrosamines in the stomach. On the other hand, vegetables contain ascorbate and other components that may affect the formation of nitrosamines. In this study, nitrosamine formation from vegetables with high nitrate content produced in Japan was examined under simulated oral cavity and stomach conditions. Extracts of *chingensai*, *komatsuna* and *itomitsuba* were digested with nitrate reductase and subsequently treated with an excess of morpholine at pH 3.0. The amount of *N*-nitrosomorpholine produced from each of the vegetable extracts was not affected by the vegetable components in the extracts. Addition of a large amount of ascorbate was required to decrease nitrosamine formation from the extract. The results indicated that nitrosamine formation from these vegetables could not be prevented by other components in the vegetables.

(Received September 13, 2004)

Key words: 野菜 vegetable; 硝酸塩 nitrate; ニトロソモルホリン *N*-nitrosomorpholine; アスコルビン酸塩 ascorbate

緒 言

硝酸塩それ自身に毒性はないが、魚肉に含まれる 2 級アミンとともに摂取すると、胃内で発がん性をもつニトロソアミンを生成する可能性がある。硝酸塩を経口的に摂取すると、口腔内細菌の nitrate reductase によって還元されて亜硝酸塩を生じ、胃内の酸性条件下で 2 級アミンと反応してニトロソアミンを生成する^{1), 2)}。硝酸塩の摂取量と胃がんによる死亡率には正の相関があるとする疫学調査結果もある³⁾。経口的に摂取される硝酸塩は野菜によるものが最も多いとされている。わが国で生産される野菜は、生育効果を上げるために硝酸塩を多量に使用する農法がとられており、そのため西欧諸国に比べて硝酸塩の含有量が高い野菜が多い⁴⁾。1999 年の五訂日本食品標準成分表には最近のわが国の野菜の硝酸塩含量が示されているが、硝酸塩含量が 0.1 g/100 g を超える野菜が少なくないし、0.6 g/100 g を超えるものもある。

一方、食物にはアスコルビン酸塩⁵⁾やポリフェノール類⁶⁾など、胃内の条件下で亜硝酸塩を消費してニトロソアミン生成を抑制する多数の成分が存在することも知られて

いる。野菜にもアスコルビン酸塩やポリフェノール類などニトロソアミン生成を阻害する成分が含まれている。これらのことから、野菜の硝酸塩からのニトロソアミン生成量は予想されるより少ないであろうとの考え方もある。

本研究では、五訂日本食品標準成分表記載の硝酸塩含量の多い国内産の野菜を選び、口腔から胃に至る条件を設定し、これら野菜抽出液に含まれるアスコルビン酸塩などの野菜成分存在下におけるニトロソアミンの生成効率を検討した。野菜は、チンゲンサイ (硝酸塩 0.5 g/100 g 以上)、コマツナ (0.5 g/100 g)、イトミツバ (0.3 g/100 g) を用い、nitrate reductase による還元を行ったのち、morpholine からの *N*-nitrosomorpholine の生成効率を検討した。

実験方法

1. 野菜

チンゲンサイ、コマツナ、イトミツバは国産品をマーケットから購入し用いた。

亜硝酸塩の生成およびニトロソアミン生成のための試験溶液は、チンゲンサイ (可食部: 芯)、コマツナ (可食部)、イトミツバ (可食部) の湿重量 10 g をすりつぶし、水で 100 mL にメスアップした抽出液をろ紙ろ過して用いた。硝酸塩 (NaNO₃) 標準溶液は 20.0, 13.5, 10.0, 5.0,

† 連絡先

* 東京薬科大学薬学部: 〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1

3.0, 1.0 mmol/L の濃度に設定したものを用いた。

アスコルビン酸塩定量のための試験溶液は、野菜（上記と同様の部分）の湿重量 10 g をすりつぶし、5 vol% メタリン酸溶液で 100 mL にメスアップした抽出液を 3,000 rpm, 10 分間遠心分離し、その上清を用いた。

2. 試 薬

Nitrate reductase (*Aspergillus* species, EC: 1.6.6.2), flavin adenine dinucleotide (FAD), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) tetrasodium salt, L-lactate dehydrogenase (LDH, EC: 1.1.1.27), sodium pyruvate, morpholine および *N*-nitrosomorpholine は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) から購入し用いた。

3. HPLC

HPLC は Hitachi 655-11 高速液体クロマトグラフを用い、検出器には Hitachi L-7420 UV-VIS を用いた。

4. 口腔内を想定した nitrate reductase による硝酸塩の亜硝酸塩への還元

還元反応はコウジ菌の nitrate reductase を用いて Gri-sham らの方法⁷⁾によって行った。還元反応は反応液中の硝酸塩濃度が 10 mmol/L 以下になるように設定して行った。試験溶液または硝酸塩標準溶液 700 μ L, 試験溶液または硝酸塩標準溶液の終濃度が 0~200 mmol/L になるようにアスコルビン酸塩を加えた水 380 μ L, 1.0 mmol/L FAD 溶液 168 μ L, 10 mmol/L NADPH 溶液 336 μ L および 6 units/mL nitrate reductase 溶液 20 μ L を順に加えて全量 1,604 μ L とし、37°C, 1.5 時間インキュベートした。NADPH を分解するために反応液に 3,125 units/mL LDH 溶液 30 μ L, 1.0 mol/L sodium pyruvate 溶液 336 μ L を加え全量 1,970 μ L として 37°C, 0.5 時間インキュベートした。

5. 亜硝酸塩の測定

4 の試験溶液および硝酸塩の標準溶液から得た反応液 100 μ L を水で 20 倍に希釈した液および 2.0 mmol/L 亜硝酸塩 (NaNO_2) 標準溶液の 136 μ L を Saltzman 溶液で 5.0 mL とし、545 nm における吸光度を測定した。Saltzman 溶液は 50 mL の氷酢酸、50 mg の *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine および 5 g の sulfanilic acid を水に溶かして 1.0 L としたものを用いた⁸⁾。

6. 胃内を想定した *N*-nitrosomorpholine の生成

反応は 4 mmol/L 以下の亜硝酸塩濃度に対し大過剰の 125 mmol/L morpholine を反応させた。4 の試験溶液または硝酸塩の標準溶液から得た反応液 1,750 μ L, 1.0 mol/L morpholine 溶液 500 μ L, 1.0 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 3.0) 1,800 μ L を加えて全量 4,050 μ L とし、37°C, 5 時間インキュベートした。反応後、10 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 160 μ L を加えて全量 4,210 μ L とし反応を停止した。反応液を 3 倍量の酢酸エチルで抽出した後、*N*-nitrosomorpholine を HPLC により定量した。標準液には 0.1 mmol/L *N*-nitrosomorpholine 溶液を用いた。

HPLC はカラム Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm) (YMC Company, Kyoto, Japan) に移動相: 0.5 vol% アセトニトリル-27 mmol/L 酢酸緩衝液-30 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 3.2) を用いて行った⁹⁾。流速 1.0 mL/min, 検出は 254 nm で行った。*N*-nitrosomorpholine の保持時間は 13.1 分であった。*N*-nitrosomorpholine の定量は、その都度、*N*-nitrosomorpholine 標準液のクロマトグラフィーによって溶出位置を確認した後、そのピーク面積を標準液から得られるピーク面積との比較によって行った。

7. アスコルビン酸塩の定量

野菜中のアスコルビン酸塩の定量は HPLC により行った。アスコルビン酸塩標準液は 0.22 mmol/L L-ascorbic acid sodium salt の 5 vol% メタリン酸溶液を用いた。HPLC は Silica gel SIL-NH₂ カラム (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm) (Merck, Darmstadt, Germany), 移動相: 0.05 mol/L リン酸二水素カリウム-アセトニトリル (1:1, v/v), 流速 1.0 mL/min, 検出波長 254 nm で行った¹⁰⁾。アスコルビン酸塩の保持時間は 7.8 分であった。定量は標準液から得られるピーク面積との比較によって行った。

結 果

硝酸塩標準溶液 (20 mmol/L 以下) に、口腔内細菌による還元を想定し、nitrate reductase および補酵素類を添加し、37°C, 1.5 時間インキュベートした後、亜硝酸塩の定量を行った (Fig. 1)。設定した条件下ではいずれの硝酸塩濃度においても 50% の亜硝酸塩を生成した。チンゲンサイ、コマツナ、イトミツバの 10 (w/v)% 水抽出液を同様に酵素処理して亜硝酸塩を定量した結果、Table 1 に示すように、4.0~6.2 mmol/L の範囲にあった。一方、野菜中のアスコルビン酸塩は、抽出液の濃度 0.06~0.13 mmol/L およびそれから計算した野菜中のアスコルビン酸ナトリウム換算の含量は 1.5~23.7 mg/100 g であった。

Fig. 1. Conversion of nitrite into nitrite by nitrate reductase

Nitrate standard solution at the indicated concentration was digested with nitrate reductase at 37°C for 1.5 hr as described in Materials and Methods. Average values of 4 experiments ($\pm$ S.D.) are shown.

Table 1. Amounts of Nitrite Produced on Treatment of Vegetable Extracts with Nitrate Reductase and Ascorbate

	Nitrite (mmol/L) in the extract after treatment with nitrate reductase	Calculated NaNO ₃ (mg)/100 g vegetable	Ascorbate (mmol/L) in the extract	Na ascorbate (mg)/100 g vegetable
NaNO ₃ standard solution (13.5 mmol/L)	6.7±0			
<i>Chingensai</i> 10 (w/v)% extract	6.2±0.8	1,050	0.13	23.7
<i>Komatsuna</i> 10 (w/v)% extract	5.0±0.5	880	0.09	16.0
<i>Itomitsuba</i> 10 (w/v)% extract	4.0±0.5	340	0.006	1.5

Each of nitrate standard solution (13.5 mmol/L) and 10 (w/v)% vegetable extract was digested with nitrate reductase at 37°C for 1.5 hr, and nitrite concentration was determined. Calculated NaNO₃ amount (mg)/100 g vegetable was obtained on the basis of the nitrite concentration in the extract and 50% conversion of nitrate into nitrite. Ascorbate concentration in the extract was determined by HPLC. The data are the average of 4 experiments (±SD).

Table 2. Effect of Ascorbate Added to Vegetable Extract on *N*-Nitrosomorpholine Formation

	Ascorbate added to the (mmol/L)						
	0	0.3	1	5	10	100	200
NaNO ₃ standard solution (13.5 mmol/L)							
Ascorbate (mmol/L)	0	0.3	1	5	10	100	200
<i>N</i> -Nitrosomorpholine (%)*	11.0	10.0	9.5	6.0	2.8	2.1	1.8
<i>Chingensai</i> 10 (w/v)% extract							
Ascorbate (mmol/L)	0.13	0.43	1.13	5.13	10.13	100.13	200.13
<i>N</i> -Nitrosomorpholine (%)*	10.0	10.0	9.0	6.5	2.3	1.9	1.5
<i>Komatsuna</i> 10 (w/v)% extract							
Ascorbate (mmol/L)	0.09	0.39	1.09	5.09	10.09	100.09	
<i>N</i> -Nitrosomorpholine (%)*	14.0	12.0	9.4	7.2	2.1	1.8	
<i>Itomitsuba</i> 10 (w/v)% extract							
Ascorbate (mmol/L)	0.006	0.306	1	5	10	100	
<i>N</i> -Nitrosomorpholine (%)*	14.0	11.4	9.7	5.2	4.6	1.4	

Each of nitrate standard solution (13.5 mmol/L) and 10 (w/v)% vegetable extract with and without added ascorbate was digested with nitrate reductase at 37°C for 1.5 hr, and subsequently treated with an excess of morpholine at pH 3.0 and 37°C for 5 hr. *N*-Nitrosomorpholine was determined by HPLC. **N*-Nitrosomorpholine yield was calculated based on nitrite.

胃内を想定した条件すなわち pH 3.0 で、過剰の morpholine を加えて 37°C, 5 時間インキュベートし、生成する *N*-nitrosomorpholine を HPLC で定量した。硝酸塩標準溶液 (13.5 mmol/L) から生成した亜硝酸塩からの *N*-nitrosomorpholine の生成率は亜硝酸塩の 11% であった。硝酸塩標準液にアスコルビン酸塩を添加して *N*-nitrosomorpholine 生成に及ぼす影響を検討したところ、*N*-nitrosomorpholine の生成率を半分以下に減じるには 5 mmol/L 以上のアスコルビン酸塩を必要とした (Table 2)。

チンゲンサイ、コマツナ、イトミツバから生成した亜硝酸塩からの *N*-nitrosomorpholine の生成率は 10.0 ~ 14.0% であり、硝酸塩標準液からの生成率と同等であった (Table 2)。これら野菜自身に含まれるアスコルビン酸塩をはじめとする野菜成分は *N*-nitrosomorpholine の生成に影響を及ぼしてはいないと考えられた。野菜抽出液にアスコルビン酸塩を添加して *N*-nitrosomorpholine 生成に与える影響を検討したが、いずれの野菜抽出液においても *N*-nitrosomorpholine の生成率を半分以下に減じるには 5 mmol/L 以上のアスコルビン酸塩 (100 g の野菜中の含量に換算すると 1 g 以上) の添加が必要であった

Fig. 2. Effect of added ascorbate on the HPLC profile of *N*-nitrosomorpholine formation from *chingensai* extract

Chingensai 10 (w/v)% extract with added ascorbate was digested with nitrate reductase at 37°C for 1.5 hr, and subsequently treated with an excess of morpholine at pH 3.0 and 37°C for 5 hr. *N*-Nitrosomorpholine was determined by HPLC. The numbers shown in the figure indicate the concentration (mmol/L) of added ascorbate. The peaks corresponding to *N*-nitrosomorpholine are indicated by arrows.

(Table 2). Fig. 2 にチンゲンサイ抽出液にアスコルビン酸塩を添加した際の *N*-nitrosomorpholine 生成の HPLC の例を示す。野菜抽出液に対するアスコルビン酸塩の添加

効果は、硝酸塩標準溶液に対するアスコルビン酸塩の添加効果と同等であり、野菜抽出液中のアスコルビン酸塩およびその他の成分は *N*-nitrosomorpholine の生成にほとんど影響していないことを示している。

考 察

経口的に摂取される硝酸塩は、口腔内細菌の nitrate reductase の作用によって亜硝酸塩になり、胃内の弱酸性条件下で、さまざまな食物中の成分との反応によって、ニトロソアミンをはじめとする変異・発がん物質を生成すると推測されている^{1), 2), 11)}。胃内を想定した亜硝酸塩からのニトロソアミン生成系に食物成分を添加することによって、その生成に影響を及ぼす成分の検索がなされている⁶⁾。食物の常成分であるアスコルビン酸塩⁵⁾、高度不飽和脂肪酸¹²⁾、タンパク質消化物¹³⁾はおおむねニトロソアミン生成を阻害し、なかでもアスコルビン酸塩は代表的な阻害剤として知られている。これに対し、ポリフェノール類、モノフェノール類は種類や条件によってニトロソアミン生成を阻害したり、促進したり、また別の種類の変異・発がん物質を生成したりするなど極めて複雑な反応をする⁶⁾。野菜や果物ジュースのニトロソアミン生成に及ぼす効果も検討されているが、収穫時期や産地によって左右され、阻害効果があったり、なかったりする^{14)~16)}。また、だ液中のチオシアン酸塩¹⁷⁾、アルコール飲料¹⁸⁾などはニトロソアミン生成を促進することが示されている。

本研究では、硝酸塩含量の高い野菜 (100 g 中の含量 0.3 g 以上) からのニトロソアミン生成が、その野菜中に含まれるアスコルビン酸塩をはじめとする成分の影響をどの程度受けるかの検討を行った。その結果、これら硝酸塩含量の高い野菜からのニトロソアミン生成は、純硝酸塩からの生成とほとんど差がなく、これら野菜に含まれる量のアスコルビン酸塩などによる影響は極めて少ないことが分かった。ニトロソアミン生成に影響を持つアスコルビン酸塩の量は、硝酸塩標準液、野菜抽出液とも差がなく、硝酸塩 1 mol に対し 2 mol 以上必要であった。

わが国の野菜の硝酸塩は 100 g 中 0.1 g を超えるものが多い。その理由は肥料として硝酸塩を多量に投入する野菜の生育の農法にある⁴⁾。WHO では硝酸塩の一日摂取許容量は 3.7 mg/kg (体重 50 kg 換算では 185 mg) としており、西欧諸国の野菜の硝酸塩含量はわが国の野菜の硝酸塩含量よりもはるかに低い。野菜由来の硝酸塩によるニトロソアミンの生成をコントロールするのは困難であり、野菜の硝酸塩を西欧諸国なみに低減するよう、わが国の野菜の農法の改善が強く望まれる。

文 献

1) Takeda, Y., Yamada, T., "Seitai Noushuku (Biological enrichment)", Fujita, M., Imura, N., Hayatsu, H., Takeda, Y., Yamada, T., Watabe T. (eds.), Tokyo, Kodansha, 1975, p. 112-141.

2) Takeda, Y., Yamada, T., "Seitai To Yuugai Hatsugan Busshitsu (Living body and harmful carcinogenic compounds)", Hayatsu, H. (ed.), Tokyo, Kodansha, 1982, p. 106-128.

3) Tanimura, A., Recent research on nitrite and related compounds. Food Sanit. Res., **33**, 1,105-1,111 (1983).

4) Yamashita, I., Nitrate in vegetables. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **43**, J-12-J-15 (2002).

5) Mirvish, S. S., Wallcave, L., Ascorbate-nitrite reaction: Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. Science, **177**, 65-68 (1972).

6) Kikugawa, K., Kato, T., "Mutagens in Foods: Detection and Prevention", Hayatsu, H. (ed.), Boca Raton, CRC Press, 1991, p. 205-218.

7) Grisham, M. B., Johnson, G. G., Lancaster, J. R., Jr., "Methods in Enzymology", Vol. 268, Packer, L. (ed.), San Diego, Academic Press, 1996, p. 237-246.

8) Ohkawa, T., Hiramoto, K., Kikugawa, K., Standardization of nitric oxide aqueous solution by modified Saltzman method. Nitric Oxide: Biol. Chem., **5**, 515-524 (2001).

9) Kikugawa, K., Hiramoto, K., Ohkawa, T., Effects of oxygen on the reactivity of nitrogen oxide species including peroxynitrite. Biol. Pharm. Bull., **27**, 17-23 (2004).

10) The Pharmaceutical Society of Japan (ed.), "Methods of Analysis in Health Science 2000", Tokyo, Kanehara, 2000, p. 219-223.

11) Kikugawa, K., Nagao, M., "Mutagens in Foods: Detection and Prevention", Hayatsu, H. (ed.), Boca Raton, CRC Press, 1991, p. 67-86.

12) Kurechi, T., Kikugawa, K., Nitrite-lipid reactions in aqueous system: Inhibitory effect on *N*-nitrosamine formation. J. Food Sci., **44**, 1,263-1,266 (1979).

13) Kato, T., Kikugawa, K., Proteins and amino acids as scavenger of nitrite: Inhibitory effect on the formation of nitrosodimethylamine and diazoquinone. Food Chem. Toxicol., **30**, 617-626 (1992).

14) Nakamura, M., Kawabata, T., Effect of Japanese green tea on nitrosamine formation *in vitro*. J. Food Sci., **46**, 306-307 (1981).

15) Kurechi, T., Kikugawa, K., Fukuda, S., Nitrite-reacting substances in Japanese radish juice and their inhibition of nitrosamine formation. J. Agric. Food Chem., **28**, 1,265-1,269 (1980).

16) Sato, K., Yamada, T., Yoshihira, K., Tanimura, A., The effects of vegetable or fruit juice on nitrosodiethylamine formation. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **27**, 619-623 (1986).

17) Boyland, E., Nice, E., Williams, K., Catalysis of nitrosation by thiocyanate from saliva. Food Cosmet. Toxicol., **9**, 639-643 (1971).

18) Kurechi, T., Kikugawa, K., Kato, T., Effect of alcohols on nitrosamine formation. Food Cosmet. Toxicol., **18**, 591-595 (1980).