

硝酸塩由来一酸化窒素補給を期待した 市販野菜果物ジュース中の硝酸塩含有量と抗酸化能の比較

Comparison of nitrate content and antioxidant capacity in vegetable and fruit juice expected to be supplemented with nitrate-derived nitric oxide on the market.

河野有華¹

Yuka KONO

清水彩子¹

Ayako SHIMIZU

加園恵三²

Keizo KASONO

藺田邦博¹

Kunihiro SONODA

齋藤百花²

Momoka SAITO

小林順³

Jun KOBAYASHI

大竹一男²

Kazuo OHTAKE

柴祥子²

Sachiko SHIBA

【はじめに】

生体内の一酸化窒素 (Nitric Oxide : NO) は、血管内皮細胞や神経細胞でL-arginineを基質としてNO合成酵素 (Nitric Oxide Synthase : NOS) によって恒常的に産生されている。NOは、血管拡張作用、抗酸化作用、抗炎症作用、血小板凝集抑制作用、インスリン抵抗性改善作用など様々な生理作用を示すことが明らかになっている。しかし、血管内皮障害を伴うような疾患 (高血圧、脂質代謝異常症、糖尿病など) では、L-arginineからのNO合成量が低下することで病態の更なる悪化を引き起こす。このNOSを介したNO合成は加齢に伴い減少することが分かっており、20歳までのNO合成量を100%とすると40~50歳で約50%に減少し、さらに70~80歳では約75%減少することが報告されている¹⁾。

生体内でのNO産生にはL-arginineを介した経路の他に、硝酸塩が腸唾液循環系を介してNOを産生する硝酸塩-亜硝酸塩-NO経路がある。食事から摂取された硝酸塩は、生体内に吸収されたのち唾液腺で濃縮され唾液として口腔内に分泌される。口腔内に分泌された硝酸塩は、口腔内のレダクターゼ活性を有するバクテリアにより亜硝酸塩に還元され、胃内酸性条件下や生体内に吸収された後、酵素的・化学的にNOを産生することが分かっている。硝酸塩は自然界に広く分布しており、人間が摂取する硝酸塩の約85%は食事由来 (主に野菜や果物) である²⁾。これらのことから、食事由来の硝酸塩は内因性NO産生が低下した際のバックアップシステムやオンデマンドのNOドナーとしての役割が期待されている。英国では、硝酸塩を豊富に含んだ赤カブ (Beetroot) から作られたビートルートジュースが販売されており、人に対して血圧降下作用³⁾ や運動パフォーマンスを向上⁴⁾

¹金城学院大学生活環境学部食環境栄養学科

²城西大学薬学部薬学科

³城西大学薬学部医療栄養学科

させることが報告されている。

一方で、硝酸塩はこれまで硝酸塩から生成される亜硝酸塩と2級アミンが反応することで発がん性物質のN-ニトロソアミンを形成することから有害物質であると考えられてきた^{5, 6)}。しかし、野菜や果物から摂取している硝酸塩とがんの関係については有力なエビデンスがなく、むしろ野菜や果物の摂取は多くのがんの予防に有効である。小林らは、食事から摂取する植物由来(野菜や果物)の硝酸塩はポリフェノールなどの抗酸化物質と一緒に摂取することで発がん性物質の生成を抑制するだけでなく、亜硝酸塩からの直接的なNO産生増加やニトロソチオールを形成することから有益性が高まることを示唆している⁷⁾。

本邦における平成30年「国民健康・栄養調査」の結果によると1日1人当たりの野菜摂取量(g/day)は男女平均で281 g/dayであり、厚生労働省が推奨する1日の野菜摂取量350 g/dayには約70 g不足している⁸⁾。

この野菜不足を補う方法の一つとして、野菜ジュースが利用されている^{9, 10)}。市場における野菜果物ジュースの需要は、今後も拡大していくことが予想されており、多様な種類の野菜果物ジュースが上市されている。しかしながら、市販の野菜果物ジュースにおける硝酸塩と抗酸化能を評価した報告は少ない。

そこで本実験では、英国で販売され硝酸塩やポリフェノールを多く含むことが知られているビートルートジュースを基準として、日本国内で販売されている野菜果物ジュースの硝酸塩含有量と抗酸化能を比較したので報告する。

【方法】

1. サンプル調製

野菜果物ジュース18種類は、A：英国のビートルートジュース(70 mL)、B：緑色野菜ジュース(200 mL)、C：紫色野菜ジュース

(200 mL)、D：黄色野菜ジュース1(200 mL)、E：緑色野菜スムージー(330 mL)、F：黄色野菜・果実スムージー(330 mL)、G：赤色野菜・果実スムージー(330 mL)、H：紫色野菜・果実スムージー(330 mL)、I：青汁1(330 mL)、J：トマトジュース(190 mL)、K：トマトジュース(他野菜含む、190 mL)、L：350 g野菜ジュース(200 mL)、M：黄色系野菜ジュース2(200 mL)、N：緑色系野菜ジュース(190 mL)、O：350 g野菜ジュース(200 mL)、P：350 g野菜ジュース(栄養強化型、125 mL)、Q：青汁2(200 mL)、R：トマトジュース(200 mL)を用いた。()内の数値は製品内容量を示しており、以下の2)～5)の測定項目について100 mLあたり、および、製品間で容量が大きく異なるため、1製品当たりの値をそれぞれ算出した。

2. 硝酸塩と亜硝酸塩の測定

ジュースサンプル(50 μ L)を超純水で50倍希釈した後、同量のHPLC用メタノールを加え、タンパクと不純物を除去するために遠心分離(15,000 rpm, 室温, 5分間)した。最終的に100倍希釈した上清を測定試料として用いた。ジュースサンプルの硝酸イオン濃度は、グリース法をもとにしたHPLCシステム(ENO-20, Eicom, Kyoto, Japan)を用いて行った¹¹⁾。なお本法はジュース中の亜硝酸塩の含量も同時に測定できるが、全てのサンプルにおいて硝酸塩含量の0.1～0.3%程度であったためデータには示していない。

3. 総ポリフェノールの測定

各試験溶液に50%メタノール溶液を等倍容添加し、不溶物を除去するために遠心分離(10,000 rpm, 室温, 1分間)した。フォーリン・チオカルト法¹³⁾に準じ、前述の溶液500 μ Lにフェノール試薬200 μ L、飽和炭酸ナ

トリウム溶液500 μ Lおよび蒸留水4.3 mLを加えて混和し、室温で1時間放置後、分光光度計にて765 nmの吸光度を測定した。フェノール試薬を加えないものをブランクとし、吸光度を測定してデータの補正を行った。これとは別に、没食子酸を標準物質として検量線を作成し、検量線に基づいてポリフェノール量（没食子酸相当量）を算出した。

4. DPPHラジカル消去活性（ORAC値：Oxygen Radical Absorbance Capacity）の測定

50%メタノール溶液（900 μ L）を1.5 mLマイクロチューブに分注しておき、そこに各サンプル溶液を100 μ L加え、不溶物を除去するために遠心分離（10,000 rpm、室温、1分間）した。DPPH溶液900 μ Lに対して各サンプル溶液100 μ Lを加え混和した後、室温で10分反応させた。分光光度計にて517 nmの吸光度を測定した¹²⁾。Torolox（水溶性ビタミンE誘導体）量で検量線を作成し、そこから各ジュースサンプルのORAC値を算出した。

5. 還元型アスコルビン酸の測定

還元型アスコルビン酸をインドフェノール法（中和滴定）により測定した^{14, 15)}。各試料溶液を5%メタリン酸で2~5倍に希釈し、5 mLのインドフェノール溶液を中和するのに必要な試料溶液の量からアスコルビン酸量を算出した。なお、本実験では滴定において0.765 mg/100 mL未満になったものを測定限界とした。

【結果】

1) ジュースに含まれる硝酸塩含有量の比較

Figure 1 にジュース中の硝酸塩含有量を示した。ビートルートジュース100 mLに含まれる硝酸塩含有量は、他のジュースに比べ高

値を示した。ジュース1本製品あたりの硝酸塩含有量に換算するとビートルートジュースよりも含有量が多い製品が17製品中3製品（E, G, Hの製品）あった。

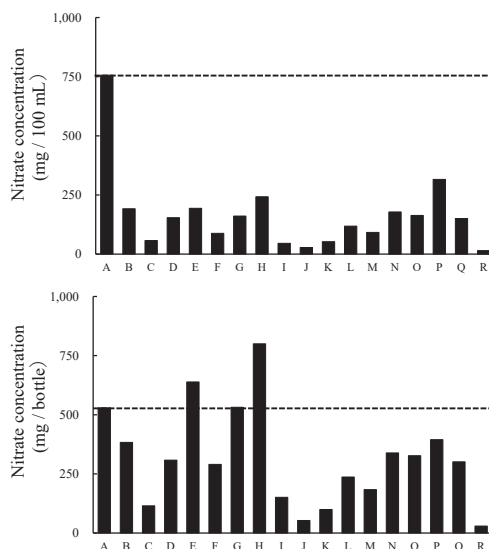


Figure 1. Nitrate concentration in vegetable and fruit juices.

2) ジュースに含まれる総ポリフェノール量の比較

Figure 2 にジュース中のポリフェノール含有量を示した。ビートルートジュース100 mLに含まれるポリフェノール含有量は、他のジュースに比べ高値を示した。ジュース1本製品あたりのポリフェノール含有量に換算するとビートルートジュースよりも含有量が多い製品が3製品（C, G, Hの製品）あった。

3) ジュースのDPPHラジカル消去活性（ORAC値）の比較

Figure 3 にジュースのDPPHラジカル消去活性（ORAC値）を示した。100 mL当たりのORAC値は、ビートルートジュースに比べ高値を示したジュースが2製品（D, P）あった。ジュース1本製品あたりのポリフェノール含有量に換算するとビートルートジュースより

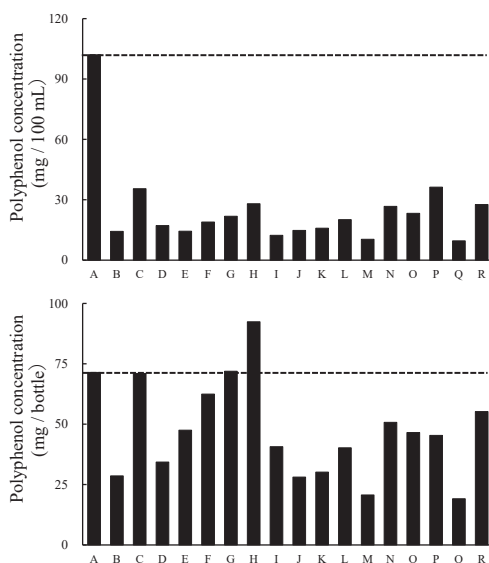


Figure 2. Polyphenol concentration in vegetable and fruit juices.

も含有量が多い製品が17製品中10製品 (B, C, D, F, G, H, I, O, P, R) あった。

4) ジュースのアスコルビン酸含有量の比較

Figure 4 にジュースのアスコルビン酸含有量を示した。100 mL 当たりのアスコルビン酸含有量は、ビートルートジュースに比べて高い値を示したジュースが7製品あった。ジュース1本製品あたりのアスコルビン酸含有量に換算するとビートルートジュースよりも含有量が多い製品が8製品 (B, D, E, F, I, O, P, Rの製品) あった。

【考察】

ビートルートには、硝酸塩、ポリフェノール、カリウム、葉酸などの栄養素が含まれていることから硝酸塩摂取による有益性を評価するために多くの臨床研究で検証が行われている。本実験では18製品の野菜果物ジュース中の硝酸塩含有量、抗酸化能 (ORAC値)、アスコルビン酸含有量、ポリフェノール含有

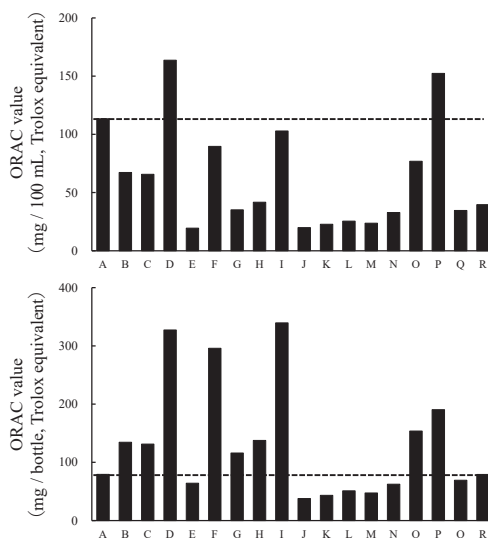


Figure 3. DPPH radical scavenging activity (ORAC value) in vegetable and fruit juices. ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

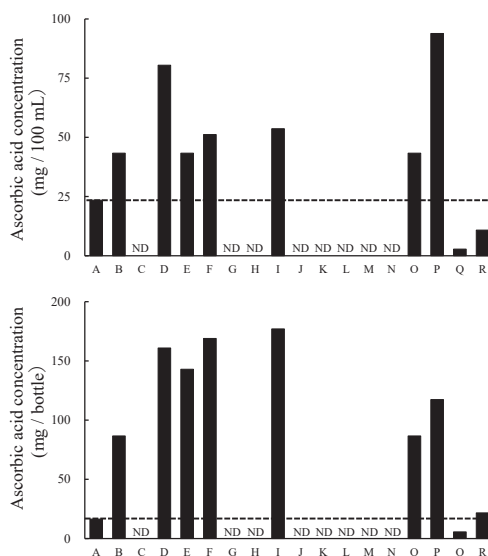


Figure 4. Ascorbic acid concentration in vegetable and fruit juices.

量について測定を行い、国内で販売されている野菜果物ジュースと英国で販売されているビートルートジュース (製品A) との比較を行った。本調査では、ビートルートジュースを除く他の野菜果物ジュース100 mLに含ま

れる硝酸塩含有量は平均20.4 mg/100 mL、ポリフェノールは平均132.2 mg/100 mLであったのに対して、ビートルートジュースは硝酸塩756.5 mg/100 mL、ポリフェノール102.0 mg/100 mLと、国内で販売されている野菜果物ジュースに比べ含有量が多いことがわかった (Fig.1, Fig.2)。しかしながら、製品あたりの硝酸塩やポリフェノール含有量を算出すると国内で販売されている野菜果物ジュースにおいてもビートルートジュースと同等または、それを上回る量を含む製品があることが確認できた (Fig.1, Fig.2)。特に、製品G：赤色野菜・果実スムージー (330 mL) と製品H：紫色野菜・果実スムージー (330 mL) は、食品成分表示をみると、どちらも製品Aの主成分であるビートルートが一部含まれていたことから、硝酸塩含有量が他の製品よりも比較的高くなったと推察された (Fig.1)。一方で、トマトジュースを主原料としている製品J、製品K、製品Rの硝酸塩含有量は、他の製品に比べ少なかった (Fig.1)。この結果は、村田らの報告と一致しており、製品中の硝酸塩含有量が少なかった要因として原料であるトマトに硝酸塩がほとんど含まれていない⁹⁾ ためだと考えられた。抗酸化能については、ビートルートジュースに比べ野菜果物ジュースで高い値を示した製品が多かった (Fig.3)。アスコルビン酸についても抗酸化能と同様にビートルートジュースに比べ野菜果物ジュースに多い傾向（一部、含有量が少なくインドフェノール法では測定できない製品もあった）があった (Fig.4)。このことから、ビートルートジュースに比べ野菜果物ジュースの抗酸化能が高くなった理由の1つとしてアスコルビン酸含有量の多さが関係していると考えられた。今回使用した野菜果物ジュースは、スーパーやコンビニエンスストア、ドラッグストアにて購入可能で

輸入品であるビートルートジュースの価格よりも70～80%安く販売されている。従って、様々な野菜果物ジュースを毎日の食事の際に、バランス良く摂取することで、手軽に硝酸塩のみならず抗酸化能を示すアスコルビン酸、ポリフェノールを効率的に摂取することができると思われる。

硝酸塩の1日摂取許容量 (Acceptable Daily Intake : ADI) は、3.7 mg/kg/dayであり、亜硝酸塩は0.06 mg/kg/dayとなっている。体重60 kgの成人1日当たりの摂取量としてのADIは、硝酸塩222 mg/day、亜硝酸塩3.6 mg/dayである。本調査においても100 mLあたりの硝酸塩量でADIを超えた国内市販製品は3製品あったが、製品あたりでは11製品となった (成人60 kgの対ADI比で最大360.3%) (Fig.1)。厚生省から報告された食品添加物一日摂取量総点検調査報告書 (2001) にはマーケットバスケット方式による硝酸塩摂取量の調査結果が記載されており、硝酸塩摂取量はいずれの年齢 (1～6歳, 7～14歳, 15～19歳, 20～64歳, 65歳以上) においてもADIを超えていた (対ADI比: 114.7～219.3%)¹⁶⁾。その摂取した硝酸塩の96%以上が果実・野菜・海藻類から摂取したものであり食品添加物からの摂取量はごく僅かであると報告している¹⁶⁾。HordらはDietary Approach Stop Hypertension (DASH) 食のパターンから食事内容を組み合わせると硝酸塩量が約174 mg/day～1,222 mg/dayになるとしている¹⁷⁾。最大値の1,222 mg/dayで成人60 kgの対ADI比を計算すると約550%になるが、硝酸塩摂取による発がん性リスクより野菜や果物の摂取による有益性が上回ると考えられている¹⁷⁾。FAO/WHO合同食品添加物専門家会議 (JECFA) においても硝酸塩は主に野菜由来であるが、野菜摂取の利点は知られており、野菜から摂取する硝酸塩量を一日摂取許容量と直接比較

することや野菜中の硝酸塩量を限定することは適切でないと報告している¹⁸⁾。

NOは、フリーラジカルの一種であることから酸化反応を受けやすく、半減期も数秒程度とされている。さらに、生体内で産生される活性酸素種の増加によりNOの生物学的利用率が低下することが知られている。このことからNOの生物学的利用率を上げるためには活性酸素種を減らす抗酸化成分の摂取が重要である⁷⁾。また、抗酸化物質の摂取は発がん性物質であるニトロソアミンの形成を抑制することから硝酸塩のリスクを低減することができる⁷⁾。したがって、硝酸塩のリスクを低減させ、有益性を高めるためには抗酸化物質（ポリフェノールなど）と摂取することが望ましいと考えられる。本調査においても硝酸塩含有量が多く（Fig.1）抗酸化能も高い（Fig.3）製品があったことから硝酸塩の有益性を求める場合には硝酸塩含量が高いだけでなく抗酸化成分を多く含む製品を選択する必要がある。

NOは血管内皮細胞で産生され、平滑筋細胞の可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）の活性化、次いで環状グアノシンーリン酸（cGMP）を上昇させプロテインキナーゼGを活性化することで細胞内へのカルシウムの流入を抑制し、血管を拡張させる。しかしながら、血管内皮細胞からのNO産生は加齢や生活習慣病などによって血管内皮細胞障害を引き起こすと低下し、血圧の上昇が起こる。前向き研究によるメタアナリシスによると収縮期血圧が2 mmHg上昇するごとに虚血性心疾患および脳卒中による死亡率がそれぞれ7%および10%増加することが報告されている¹⁹⁾。一方、ビートルート摂取による血圧降下作用は、摂取量依存的な作用を示す²⁰⁾ことが報告されており、人を対象としたビートルートジュース摂取による血圧に対する影響

を調査した研究では、1日あたりビートルートジュースを250 mL~500 mL摂取（摂取した硝酸塩量は、341~1,395 mg/日であり、対ADI比で154~630%）すると収縮期血圧5~12 mmHg、拡張期血圧が最大で10 mmHg低下したことが報告されている²¹⁾。しかし、高齢者は若者に比べ硝酸塩摂取による血圧降下作用が減弱するという報告もある²²⁾。その理由として、加齢に伴う口腔内細菌叢（硝酸塩還元酵素を含む）の変化や胃酸分泌の低下が関係している可能性が考えられている²³⁾。そのため、高齢者が硝酸塩由来のNO産生や生物学的利用率を上げるためには、硝酸塩からのNO産生を高める抗酸化物質の摂取が重要になると考える。

硝酸塩の適正な摂取量については現在も不明であるが、デンマークのコホート調査によると毎日少なくとも60 mg以上の植物由来の硝酸塩を摂取することで虚血性心疾患、心不全、虚血性脳卒中、末梢動脈疾患による入院リスクを、それぞれ12%、15%、17%、26%低下させる可能性があることが報告されている²⁴⁾。以上のことから、日本国内で販売されている野菜果物ジュースには疾患予防に有効な量の硝酸塩を含むジュースが多く存在すると考えられる。一方で、乳幼児は成人よりも硝酸塩摂取によって重症メトヘモグロビン血症を発症しやすいことから硝酸塩を多く含む野菜果物ジュースを摂取する際は摂取量に注意するか、あるいは回避するべきであると考ええる。また、硝酸塩の人に対する影響は調査されているものの適正な硝酸塩摂取量、長期的な人体への効果や有害作用については明らかになっていない部分も多いことから今後の調査研究に期待したい。本研究の限界点として、野菜果物ジュースに用いられる野菜や果物の成分量は食材の旬、産地（土壌）、加工方法による影響を大きく受ける。本研究で

は、1検体のみの分析であったことから、さらに多くの試料を測定して評価する必要がある。

【結語】

ビートルートジュースは、100 mLあたりの硝酸塩やポリフェノールを非常に多く含んでいることが分かった。しかしながら、製品あたりの含有量に換算すると、国内で販売されている野菜果物ジュースにおいてもビートルートジュースと同等または、それを上回る硝酸塩や抗酸化能を有する製品があることが明らかになった。硝酸塩が豊富な野菜の摂取は、費用対効果が高く、手頃な価格で、高血圧に対する公衆衛生アプローチに有益であることが示唆されている²⁵⁾。しかし、硝酸塩は比較的価格の高い緑黄色野菜に多く含まれていることから手頃な価格で購入できる野菜果物ジュースに置き換えて摂取することにより、さらに費用対効果が高くなる可能性があると考えられる。

【参考文献】

- 1) Torregrossa AC, Aranke M, Bryan NS. Nitric oxide and geriatrics: Implications in diagnostics and treatment of the elderly. *J Geriatr Cardiol*. 2011, 8 (4): 230-242.
- 2) Gangolli SD, van den Brandt PA, Feron VJ, Janzowsky C, Koeman JH, Speijers GJ, Spiegelhalder B, Walker R, Wisnok JS. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *Eur J Pharmacol*. 1994, 1; 292(1): 1-38.
- 3) Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, Ekblom B. Dietary nitrate reduces maximal oxygen consumption while maintaining work performance in maximal exercise. *Free Radic Biol Med*. 2010, 48: 342-347
- 4) Hlinský T, Kumstát M, Vajda P. Effects of Dietary Nitrates on Time Trial Performance in Athletes with Different Training Status: Systematic Review. *Nutrients*. 2020, 12(9), 2734
- 5) Tannenbaum SR, Correa P. Nitrate and gastric cancer risks. *Nature*. 1985, 317: 675-6
- 6) Mirvish SS. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett*. 1995, 93: 17-48
- 7) Kobayashi J. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of N-nitroso compounds: A review. *Nitric Oxide*. 2018, 28; 73: 66-73.
- 8) 厚生労働省.平成30年国民健康・栄養調査結果の概要. 2020年.
- 9) 村田 美穂子, 石永 正隆. 市販飲料中の硝酸塩および亜硝酸塩の含有量調査. *食衛誌*. 2005, 46; 4: 165-168
- 10) 松浦 紀美恵, 山本 隆子, 藤原 富子. 野菜の摂取状況に関する研究, 神戸女子大学健康福祉学部紀要. 2018, 10: 111-117
- 11) Ohtake K, Koga M, Uchida H, Sonoda K, Ito J, Uchida M, Natsume H, Kobayashi J. Oral nitrite ameliorates dextran sulfate sodium-induced acute experimental colitis in mice. *Nitric Oxide*. 2010, 23, 65-73.
- 12) Kim MJ, Kim JI, Kang MJ, Kwon B, Jun JG, Choi JH, Kim MJ. Quality evaluation of fresh tomato juices prepared using high-speed centrifugal and low speed masticating household juicers. *Food Sci Biotechnol*. 2015, 24; 1: 61-66
- 13) 倉田忠男. 新・食品分析法 [II]. 光琳, 2006
- 14) 菅原龍幸, 前川昭男. 新食品分析ハンドブック, 建帛社, 2000, 240
- 15) 青柳康夫, 有田政信. Nブックス実験シリーズ 食品学実験, 建帛社, 2014, P56-58
- 16) 食品添加物一日摂取量総点検調査報告書2001年, 厚生労働省
- 17) Hord NG, Tang Y, Bryan NS. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am J Clin Nutr*. 2009, 90 (1): 1-10.
- 18) JECFA. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. *WHO Technical Report Series* 1995, 859, 32-33.
- 19) Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Prospective Studies Collaboration. Age-

- specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 200, 14; 360(9349): 1903-13.
- 20) Hobbs DA, Kaffa N, George TW, Methven L, Lovegrove JA. Blood pressure-lowering effects of beetroot juice and novel beetroot-enriched bread products in normotensive male subjects. *Br J Nutr*. 2012, 108(11): 2066-74.
- 21) Habermeyer M, Roth A, Guth S, Diel P, Engel KH, Epe B, Fürst P, Heinz V, Humpf HU, Joost HG, Knorr D, de Kok T, Kulling S, Lampen A, Marko D, Rechkemmer G, Rietjens I, Stadler RH, Vieths S, Vogel R, Steinberg P, Eisenbrand G. Nitrate and nitrite in the diet: how to assess their benefit and risk for human health. *Mol Nutr Food Res*. 2015, 59(1): 106-28.
- 22) Bonilla Ocampo DA, Paipilla AF, Marín E, Vargas-Molina S, Petro JL, Pérez-Idárraga A. Dietary Nitrate from Beetroot Juice for Hypertension: A Systematic Review. *Biomolecules*. 2018, 8(4): 134.
- 23) Milton-Laskibar I, Martínez JA, Portillo MP. Current Knowledge on Beetroot Bioactive Compounds: Role of Nitrate and Betalains in Health and Disease. *Foods*. 2021, 10(6): 1314.
- 24) Bondonno CP, Dalgaard F, Blekkenhorst LC, Murray K, Lewis JR, Croft KD, Kyrø C, Torp-Pedersen C, Gislason G, Tjønneland A, Overvad K, Bondonno NP, Hodgson JM. Hodgson. Vegetable nitrate intake, blood pressure and incident cardiovascular disease: Danish Diet, Cancer, and Health Study. *Eur J Epidemiol*. 2021, 36(8): 813-825.
- 25) Kapil V, Khambata RS, Robertson A, Caulfield MJ, Ahluwalia A. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. *Hypertension*. 2015, 65(2): 320-327.