

The Mukogawa Journal of Nutrition Science Research

Mukogawa
Women's University

Research Institute for Nutrition Sciences
Mukogawa Women's University
**The Mukogawa Journal of
Nutrition Science Research**
Vol.2 2013

栄養科学研究

Research Institute for
Nutrition Sciences
Vol.2 2013



武庫川女子大学栄養科学研究所

武庫川女子大学栄養科学研究所



目 次

【ORIGINAL ARTICLE】

Soymilk Fermented with Lactic Acid Bacteria Reduces Plasma TNF- α and Visceral Fat Mass in Rats Fed a High Fat and High Cholesterol Diet

Mitsuru Fukuda, Maki Kobayashi 1

【総説】

世界の栄養問題と食品科学的取り組み

有井 康博 9

野菜冷凍時の細胞傷害とドリップ生成 冷凍野菜の細胞傷害とドリップ

福田 満 21

投稿規定

ORIGINAL ARTICLE

Soymilk Fermented with Lactic Acid Bacteria Reduces Plasma TNF- α and Visceral Fat Mass in Rats Fed a High Fat and High Cholesterol Diet

Mitsuru Fukuda^{1,*} and Maki Kobayashi²

Key Words: lactic fermented soymilk, lipid metabolism, high fat and high cholesterol diet, rat, adipose tissue

¹Department Food Science and Nutrition, School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University, 6-46, Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo, 663-8558, Japan

²Department of Nutritional Management, School of Health Sciences, Hyogo University, 2301, Hiraoka-cho Shinzaike, Kakogawa, Hyogo, 675-0195, Japan

*To whom correspondence should be addressed.

Phone : 0798-45-9879 Fax : 0798-45-9879

E-mail : senjuoka@mukogawa-u.ac.jp

Received : January 20, 2014; Accepted : April 26, 2014

ORIGINAL ARTICLE

Soymilk Fermented with Lactic Acid Bacteria Reduces Plasma TNF- α and Visceral Fat Mass in Rats Fed a High Fat and High Cholesterol Diet

Mitsuru Fukuda^{1,*} and Maki Kobayashi²

Abstract

As the administration of lactic acid-fermented soymilk (LFS) tends to reduce the adipose tissue mass of rats, LFS is assumed to suppress the inflammation in overweight rats. Thus, we investigated the effects of LFS on anti-inflammation and related gene expression in adipose tissues using male Sprague-Dawley rats fed a high fat and high cholesterol diet (HFC diet). HFC diet included 30% fat and 0.5% cholesterol, and 25% of the HFC diet was replaced with dried LFS for HFCL diet. Rats were fed the AIN-93G, HFC and HFCL diets for 5 weeks, respectively. Plasma TNF- α of rats in the HFCL group was significantly decreased compared with that of rats in the HFC group. The mass of visceral fat in the HFCL group tends to be lower than that in the HFC group. Although the expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) was not significantly repressed in mesenteric adipose tissue of the HFCL group, the expression of TNF- α of the HFCL group was significantly reduced compared with that of the HFC group. The change in TNF- α expression seems to be higher than that in MCP-1 expression, because MCP-1 contributes to macrophage infiltration in adipose tissue, where macrophage secretes TNF- α . These results suggested that the ingestion of LFS induced to suppress the inflammation of visceral fat tissues in rats fed a high fat and high cholesterol diet.

Key Words: lactic fermented soymilk, lipid metabolism, high fat and high cholesterol diet, rat, adipose tissue

Introduction

Obesity has increased in worldwide and is associated with adverse metabolic consequences, such as diabetes and cardiovascular disease¹⁾. The adipose tissue is an important endocrine organ that secretes biologically active substances, such as leptin, adiponectin, tumor necrosis factor α (TNF- α)²⁾ and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)³⁾.

Since some of functional foods have been used for the prevention of obesity, the mechanism of functional components that regulate the increase of visceral obesity have studied⁴⁾⁵⁾. Bioactive substances in soy foods, soy protein and isoflavone, have effects regulating plasma lipid level and hepatic lipid content by suppressing lipogenic enzymes⁶⁾⁷⁾. The physiological effects of dietary soy

¹Department Food Science and Nutrition, School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University, 6-46, Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo, 663-8558, Japan

²Department of Nutritional Management, School of Health Sciences, Hyogo University, 2301, Hiraoka-cho Shinzaike, Kakogawa, Hyogo, 675-0195, Japan

*To whom correspondence should be addressed.

Phone : 0798-45-9879 Fax : 0798-45-9879

E-mail : senjuoka@mukogawa-u.ac.jp

Received : January 20, 2014; Accepted : April 26, 2014

isoflavones that reduce the obesity, cardiovascular disease and diabetes have been known⁸⁾. Isoflavones seems to improve insulin sensitivity by increasing adiponectin and decreasing TNF- α ⁹⁾. Additionally, anti-obesity effects of fermented soy foods have been known¹⁰⁾¹¹⁾. In previous studies, we demonstrated the effects of lactic acid-fermented soymilk (LFS) on the plasma and hepatic lipid profiles in rats¹²⁾ and the regulation of hepatic lipid metabolism-related genes in rats by LFS administration¹³⁾. As isoflavones seem to suppress adipose mass¹⁴⁾¹⁵⁾, the anti-obesity effect of LFS would be expected, because LFS includes not only isoflavones but also several functional substances other than isoflavones. In the present study, we investigated the changes in plasma TNF- α and visceral fat mass, and lipid metabolism-related gene expression of mesenteric adipose to clarify the effects of LFS on suppression of visceral fat tissue and anti-inflammation in rats fed a high fat and high cholesterol diet.

Materials and Methods

Animals. All animal experiments were performed according to the guidelines of the Animal Use Committee of Mukogawa Women's University. Male Sprague-Dawley rats (n=21) aged 7-weeks, weighing 200-220g (Nihon SLC, Hamamatsu, Japan) were housed individually in raised stainless steel cages with wire-mesh floors and fronts under controlled conditions of light time (12h light and dark cycle), humidity (55 $\pm$ 7%), and temperature (23 $\pm$ 1°C). Food and water were consumed *ad libitum*.

Diets. LFS was prepared from soymilk by lactic acid fermentation using the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA-4408L at 42.5°C for 15h and then immediately freeze-dried for the animal feed. LFS included 0.07% lactic acid and the pH was 4.3. The LFS was gifted by Marusan-ai Co. Ltd. (Okazaki, Japan). The LFS contained 40.1% protein, 40.7% fat, 2.8% sugar and 7.9% dietary fiber as shown in Table 1. One hundred grams of

Table 1 Composition of freeze-dried fermented soymilk

Composition	Fermented soymilk
Water (%)	2.3
Protein (%)	40.1
Fat (%)	40.7
Sugar (%)	2.8
Dietary Fiber (%)	7.9
Ash (%)	6.2
Energy (kcal/100g)	553.5

Table 2 Composition of experimental diets (weight%)

Ingredient	Diet group		
	CO	HFC	HFCL
Casein ¹	20.0	20.0	8.4
Cornstarch ¹	39.8	17.9	14.6
Dextrinized cornstarch ¹	13.2	6.0	4.9
Sucrose ¹	10.0	10.0	10.0
Purified soybean oil ¹	7.0	7.0	0.0
Cellulose ¹	5.0	5.0	2.9
Mineral mix (ALN-93G-MX) ¹	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix (AIN-93 VX) ¹	1.0	1.0	1.0
L-Cystine ²	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate ³	0.25	0.25	0.25
tert-Butylhydroquinone ²	0.0014	0.0014	0.0014
Cholesterol ²	0	0.5	0.5
Beef tallow ¹	0	28.5	28.5
Sodium cholate ²	0	0.0125	0.0125
Fermented Soymilk ⁴	0	0	25.0

¹Japan Clea, Osaka, ²Wako pure chemicals industries, Osaka, ³Nacalai tesque, Kyoto, ⁴Marusan-ai, Okazaki.

CO: ALN-93G, basic diet; HFC: high fat and highcholesterol diet; HFCL: high fat and high cholesterol diet containing lactic acid-fermented soymilk.

LFS included 132mg isoflavone (as isoflavone aglycon). The other feed materials were purchased from Clea Japan (Tokyo, Japan), Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) and Nakarai tesque (Kyoto, Japan). The diet was based on the AIN-93G diet formula¹⁶⁾. Rats were fed AIN-93G on pre-feeding for 1 week and then divided in each group. Twenty one rats were assigned to three groups which did not exhibit any significant difference in the body mass and plasma total cholesterol concentration from each other as shown in a previous paper¹⁷⁾. Composition of experimental diets

was shown in Table 2. The control group (n=7, CO) was fed with the AIN-93G diet. The high fat and high cholesterol diet group (n=7, HFC) was fed with diet substituted by 30% fat (55% of total energy), 0.5% cholesterol and 0.125% cholic acid in the CO diet, and HFCL group (n=7, HFCL) was fed a diet where 25.0% of the HFC diet was replaced with LFS. The nutrients and energy of the HFCL diets were modified to be equivalent to those of the HFC diet, respectively. Rats were fed with the CO, HFC and HFCL diets for 5 weeks, respectively.

Plasma analysis. On the final day of the feeding period, blood was collected from rats under anesthesia using Forane (Abbot Japan, Tokyo, Japan). The plasma after centrifugation (3,000rpm, 15min) was stored at -80°C until analysis. Plasma TNF- α was measured by using commercial ELISA Kit. (TNF- α ELISA Kit. Thermo scientific, Rockford USA).

Body Fat Composition Analysis. For computed tomography (CT) analysis of body fat composition, rats were anesthetized with Forane and then scanned using a LaTheta experimental animal CT system (LCT-200) (Hitachi-Aloka Medical, Mitaka, Japan) on initial and final weeks. Contiguous 3mm slice images between the twelfth sternum and the testicular root were used for quantitative assessment using LaTheta software. Visceral and subcutaneous fats were distinguished and evaluated quantitatively.

Analysis of mRNA expression. On the final day of the experiments, mesenteric adipose tissues (100mg) of rats were frozen with liquid nitrogen and kept at -80°C until needed. The expression of mRNA was quantitatively measured by real-time RT-PCR, using the model 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and related reagent kits according to the manufacturer's protocol. Total RNA was extracted from mesenteric adipose tissue with the RNeasy lipid tissue mini kit (Qiagen, USA). The concentration and quality of the purified total RNA were determined spectrophotometrically.

Total RNA prepared from mesenteric adipose tissue was reverse-transcribed into cDNA using a PrimeScript RT reagent kit with gDNA eraser (Takarabio, Shiga, Japan). The genomic DNA in total RNA was digested and complementary DNA (cDNA) was synthesized by using Prime Script RT reagent kit with gDNA eraser (Takarabio, Shiga, Japan). The following Taqman gene expression assays were conducted by using the PCR primer sets for real-time PCR. GAPDH was used as an endogenous control. Real time PCR was performed with the Taqman Universal PCR master mix (Applied Biosystems). Data were normalized to GAPDH RNA expression and presented as a ratio to CO value respectively.

Statistical analysis The results are presented as the mean $\pm$ standard error, and were analyzed by Tukey's multiple-comparison test or Student's t-test at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with SPSS 12.0J for windows.

Results and Discussion

Food intake and body weight. No significant difference in the food intake and final body weight was found among three groups (Table 3).

Adipose tissue mass and plasma TNF- α concentration. Feeding efficiencies in the CO, HFC and HFCL groups were 0.24 ± 0.00 , 0.31 ± 0.01 and 0.30 ± 0.01 , respectively. There was no significant difference between the feed efficiencies in the HFC and HFCL groups. Any significant difference in final body weight of rats was not found among the all group. The increased amounts of visceral fat tissues in the HFCL group were slightly reduced compared to those in the HFC group (Fig. 1). On the other hand, plasma TNF- α concentration was significantly decreased in the HFCL group compared to that of the HFC group (Fig.2). As positive correlations between TNF- α level and visceral fat mass was observed¹⁸⁾, the increase of plasma TNF- α concentration in rats was assumed to associate with the increase of visceral fat mass. Effects lowering epididymal and perirenal adipose tissue

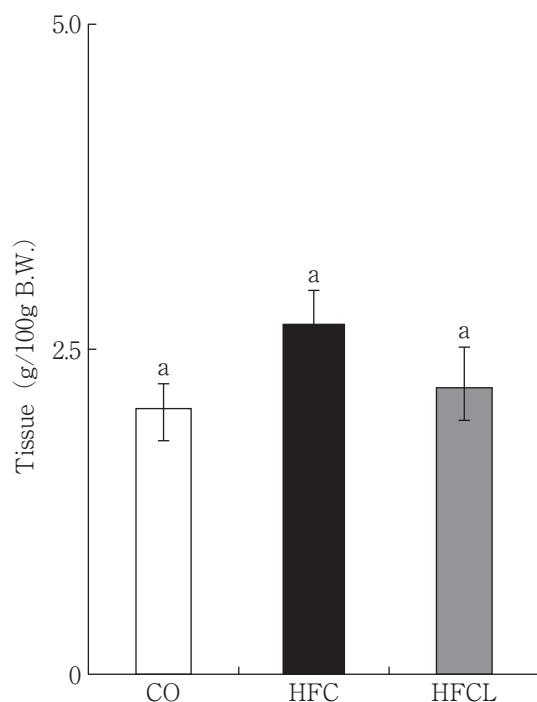


Fig.1 Increased mass of visceral fat tissues in rats fed the experimental diets for 5 weeks

CO, control diet; HFC, high fat and high cholesterol diet; HFCL, high fat and high cholesterol diet containing fermented soymilk. Each value is the mean $\pm$ SE for 7 rats. a, b Means not sharing a common superscript differ significantly by Tukey's multiple-comparison test ($p < 0.05$).

mass by ingestion of dietary soy proteins and isoflavones were reported in rats¹⁹. Additionally, soy protein and isoflavones are known to prevent obesity⁷⁾²⁰. Therefore, it was expected that the ingestion of LFS would reduce adipose tissues in rats fed a high fat and high cholesterol diet. Although we predicted the anti-obesity effects by soy protein and isoflavones included in LFS, the significant difference in increased amounts of visceral fat mass was not observed between those in the HFC and HFCL groups (Fig. 2). The enlarged adipose tissue released more FFA and thereby FFA clearance might be reduced²¹. However, there was no significant change in plasma FFA levels of rats in the HFCL group fed a high fat and high cholesterol diet including LFS (data not shown). It was assumed that visceral obesity was not drastically increased in rats fed a high fat and high cholesterol diet. However, as slight reduction of adipose tissue was observed, changes of inflammatory cytokine was investigated to confirm the relationship be-

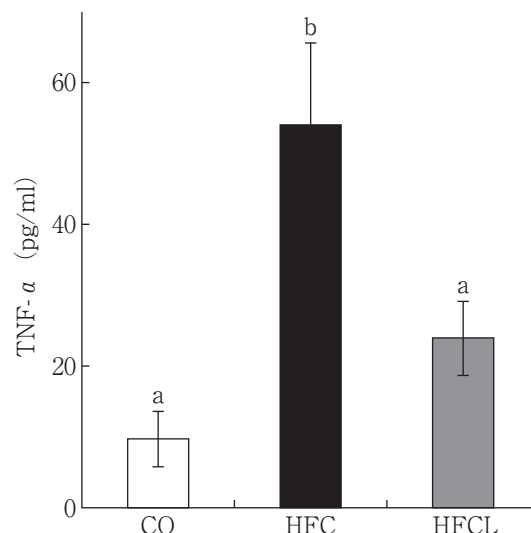


Fig. 2 Plasma TNF- α concentration. of rats fed the experimental diets for 5 weeks

CO, control diet; HFC, high fat and high cholesterol diet; HFCL, high fat and high cholesterol diet containing fermented soymilk. Each value is the mean $\pm$ SE for 7 rats. a, b Means not sharing a common superscript differ significantly by Tukey's multiple-comparison test ($p < 0.05$).

tween the level of plasma TNF- α and gene expression of TNF- α in adipose tissue.

Gene expression of visceral adipose tissues. Gene expression of the lipid metabolism-related and inflammatory proteins in adipose tissue were compared between the HFC and HFCL groups. As shown in Fig.3, the expression of TNF- α was significantly down-regulated in the HFCL group compared to the HFC group, whereas the expression of MCP-1 was not significantly down-regulated in the HFCL group. There was no significant change in other gene expression between both groups. The change in TNF- α expression seems to be higher than that in MCP-1 expression, because MCP-1 contributes to macrophage infiltration in adipose tissue, where macrophage secretes TNF- α ²². Obesity is associated with elevation of proinflammatory cytokine and chemokine levels in the circulation and tissues²³⁾²⁴. It was suggested that plasma TNF- α concentration in the HFCL group was markedly reduced by the down-regulation of TNF- α expression in the mesenteric adipose tissue.

Genistein decreased adipose deposition in mice¹⁵. Some factors existing in the ethanol extract of soy protein, mainly isoflavones, are sug-

Table 3 Food Intake and Body Weights of Rats Fed Experimental Diet for 5 Weeks

	CO	HFC	HFCL
Food intake (g/d)	20.3 $\pm$ 0.3 ^a	20.1 $\pm$ 0.3 ^a	20.1 $\pm$ 0.2 ^a
Initial body weight (g)	261.4 $\pm$ 3.5 ^a	259.1 $\pm$ 3.9 ^a	258.3 $\pm$ 1.9 ^a
Final body weight (g)	420.8 $\pm$ 1.7 ^a	419.3 $\pm$ 12.1 ^a	410.9 $\pm$ 5.3 ^a

CO, control diet; HFC, high fat and high cholesterol diet; HFCL, high fat and high cholesterol diet containing lactic acid-fermented soymilk. Each value is the mean $\pm$ SE for 7 rats.

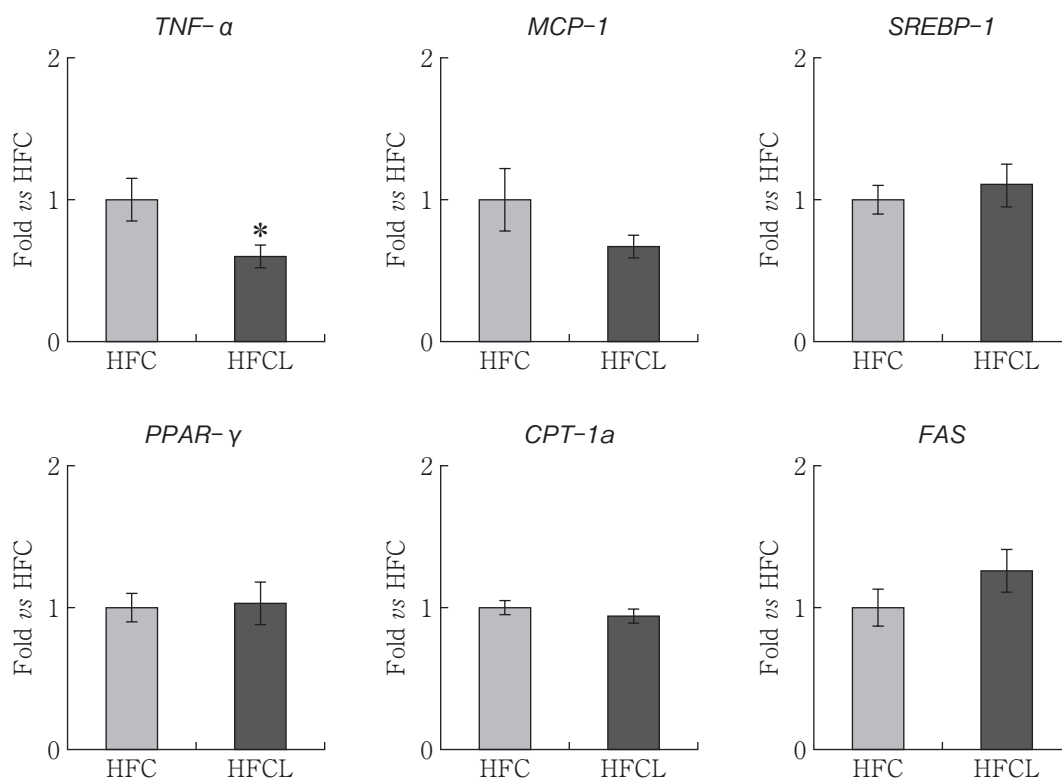


Fig. 3 Expression of genes in adipose tissues of rats fed the experimental diets for 5 weeks

HFC, high fat and high cholesterol diet; HFCL, high fat and high cholesterol diet containing fermented soymilk. Each value is the mean $\pm$ SE for 7 rats. *Mean shows significant difference by Student's t-test ($p < 0.05$).

gested to be involved in suppressing TNF- α productivity by macrophages in rats²⁵). Soy isoflavone reduced TNF- α and increased adiponectin in rats⁹). These reports predicted that the ingestion of LFS effectively suppressed the inflammation of adipose tissues in rats fed a very high fat and high cholesterol diet. It is assumed that isoflavone-rich LFS reduced plasma TNF- α level by suppressing the inflammation of visceral fat tissues in rats fed a high fat and high cholesterol diet.

Acknowledgment

The production of LFS was performed by Marusan-ai Co. Ltd. at Okazaki. We appreciate very much the support from Marusan-ai Co. Ltd.

References

- 1) Grundy SM: Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89, 2595-2600, 2004.
- 2) Kern PA, Ranganathan S, Li C *et al.*: Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Endocrinol. Metab.*, 280, E745-751, 2001.
- 3) Kanda H, Tateya S, Tamori Y *et al.*: MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.*, 116, 1494-1505, 2006.
- 4) Naowaboot J, Chung CH, Pannangpetch P *et al.*: Mulberry leaf extract increases adiponectin in murine 3T3-L1 adipocytes. *Nutr. Res.*, 32, 39-44, 2012.
- 5) Arai T, Kim HJ, Chiba H *et al.*: Anti-obesity effect of

- fish oil and fish oil-fenofibrate combination in female KK mice. *J. Atheroscler Thromb.*, 16, 674-683, 2009.
- 6) Torre-Villalvazo I, Tovar AR, Ramos-Barragan VE *et al.*: Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J. Nutr.*, 138, 462-468, 2008.
 - 7) Orgaard A, Jensen L: The effect of soy isoflavones on obesity, *Exp. Biol. Med.*, 223, 1066-1080, 2008.
 - 8) Bhathena SJ, Velasquez MT: Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes, *Am. J. Clin. Nutr.*, 76, 1191-1201, 2002.
 - 9) Zhang HM, Chen SW, Zhang LS, Feng XF: The effect of soy isoflavone on insulin sensitivity and adipocytokines in insulin resistant rats administered with high fat diet. *Natural Product Res.*, 22, 1637-1649 2008.
 - 10) Kojima M, Ochi T, Akeo K, Tauch Y, Otani H: Anti-obesity effect of a non-salty soybean paste fermented with rice yeast on mice fed a high-fat diet. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 62, 171-178, 2009.
 - 11) Motonaga C, Kondoh M, Hayashi A *et al.*: Effect of *Enterococcus faecalis* TN-9 fermented soymilk on anti-obesity in ovariectomized rats. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaisi*, 56, 350-355. 2009.
 - 12) Kitawaki R, Nishimura Y, Takagi N *et al.*: Effects of lactobacillus fermented soymilk and soy yogurt on hepatic lipid accumulation in rats fed a cholesterol-free diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1484-1488, 2009.
 - 13) Kobayashi M, Harada T, Takagi N *et al.*: Effects of lactic acid-fermented soymilk on lipid metabolism-related gene expression in rat liver, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 19-24, 2012.
 - 14) Wu J, Oka J, Higuchi M *et al.*: Effects of isoflavone and exercise on BMD and fat mass in postmenopausal Japanese women: a 1-year randomized placebo-controlled trial. *J. Bone Miner. Res.*, 21, 780-789 2006.
 - 15) Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA *et al.*: The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology*, 144, 3315-3320, 2003.
 - 16) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, 123, 1939-195, 1993.
 - 17) Hirahata R, Kobayashi M, Egusa S *et al.*: Lactic Fermented soymilk improves hepatic lipid metabolism in rats fed a high fat and high cholesterol diet, *Japan Soc. Food Sci. Technol.* 60, 72-79, 2013.
 - 18) Lira FS, Rosa JC, Dos Santos RV *et al.*: Visceral fat decreased by long-term interdisciplinary lifestyle therapy correlated positively with interleukin-6 and tumor necrosis factor- α and negatively with adiponectin levels in obese adolescents. *Metabolism*. 60, 359-365, 2011.
 - 19) Takahashi Y, Ide T, Effects of soy protein and isoflavone on hepatic fatty acid synthesis and oxidation and mRNA expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipose tissues of rats, *J. Nutr. Biochem.*, 19, 682-693, 2008.
 - 20) Velasquez MT, Bhathena SJ, Role of dietary soy protein in obesity, *Int. J. Med. Sci.*, 4, 72-82, 2007.
 - 21) Boden G, She P, Mozzoli, M *et al.*: Free fatty acid produce insulin resistance and activate the et al/ro-inflammatory nuclear factor- κ B pathway in rat liver. *Diabetes*, 54, 3458-3465, 2005.
 - 22) Kanda H, Tateya S, Tamori Y *et al.*: MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis obesity, *J. Clin. Invest.*, 116, 1494-1505, 2006.
 - 23) Ashima, RS: Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*, 14, 242s-249s, 2006.
 - 24) Suganami T, Nishida J, Ogawa Y: A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes role of free fatty acids and tumor necrosis factor α . *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 25, 2062-2068, 2005.
 - 25) Komatsu W, Nagata J, Kaneko M *et al.*: Effect of soy protein tumor necrosis factor productivity in macrophages from nephritic and hepatoma-bearing rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 54, 435-439, 2008.

総説

世界の栄養不足の現状とその対策： 食品科学的取り組みについて

世界の栄養問題と食品科学的取り組み

有井 康博^{1, 2, 3}

Key Words：隠れた飢餓，経済状況，鉄欠乏症，豆腐様鉄強化食品，微量栄養素不足

責任著者：有井康博

¹ 武庫川女子大学栄養科学研究所

² 武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科

³ 武庫川女子大学短期大学部食生活学科

〒663-8558 兵庫県西宮市池開町6-46

Tel. & Fax: +81-798-45-3713

E-mail: arii@mukogawa-u.ac.jp

受付 2014年1月27日 受理 2014年4月23日

総説

世界の栄養不足の現状とその対策： 食品科学的取り組みについて

世界の栄養問題と食品科学的取り組み

有井 康博^{1, 2, 3}

要旨

現代の日本において生活習慣病といえ、主に糖尿病、脳卒中、心臓病、脂質異常症、高血圧、肥満が挙げられる。これらの疾患は過剰な栄養素摂取によるところが多い。一方で、生活習慣病には栄養不足が引き起こすものもある。所謂、‘隠れた飢餓’である。栄養不足が引き起こす問題は、日本のような先進国においては特殊な健康状態にある人以外ではあまり重要視されない傾向にあるが、高齢化社会に突入した日本においては取り組むべき課題の一つである。本稿では世界を救うことが日本を救うという観点から、世界における飢餓状況、経済状況と栄養不足がもたらす問題、食事内容が栄養に及ぼす問題、‘隠れた飢餓’と社会問題について述べる。また、‘隠れた飢餓’の一つであり、著者が現在取り組んでいる、鉄欠乏症について紹介する。さらに、食品科学研究の分野で研究を行っている著者が取り組んでいる研究活動の一つを簡単に紹介する。

Key Words：隠れた飢餓，経済状況，鉄欠乏症，豆腐様鉄強化食品，微量栄養素不足

1. 緒言

現代の日本において生活習慣病といえ、主に糖尿病、脳卒中、心臓病、脂質異常症、高血圧、肥満が挙げられる¹⁾。所謂、栄養素の過剰摂取による疾患である。一方で、ミネラルやビタミンが不足することで発症するような疾患も生活習慣病である。しかしながら、飽食の時代を過ごしている日本人においては、特殊な健康状態においてのみ栄養不足が引

き起こされるので、栄養不足によって引き起こされる疾患は忘れられやすい傾向にある。ところが、世界に目を向けてみると、飢餓状態、栄養不足である国々が数多くある（図1）²⁾。そして、その原因が食生活習慣にあることは否めない。また、これらの国々では栄養不足による経済の損失が大きく、その経済状況が原因で食の供給が安定しないという悪循環が繰り返されている。このように述べると、栄養

責任著者：有井康博

¹⁾ 武庫川女子大学栄養科学研究所

²⁾ 武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科

³⁾ 武庫川女子大学短期大学部食生活学科

〒663-8558 兵庫県西宮市池開町6-46

Tel. & Fax: +81-798-45-3713

E-mail: arii@mukogawa-u.ac.jp

受付 2014年1月27日 受理 2014年4月23日

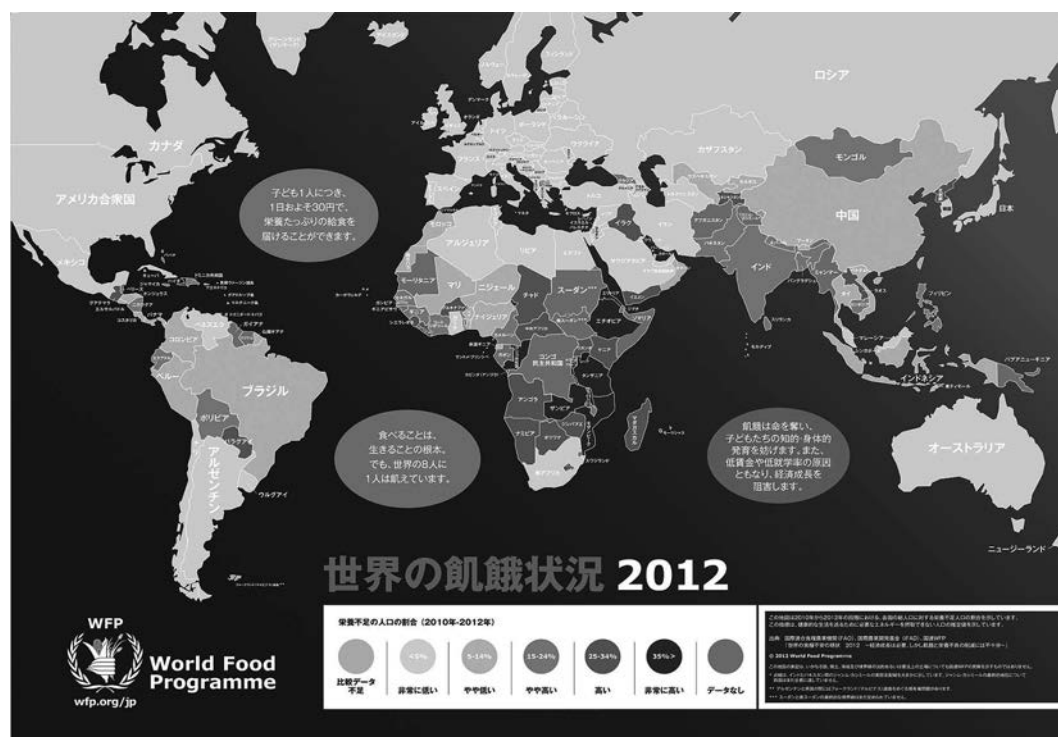


図1 ハンガーマップ
文献2)より引用し、一部改変。

不足が引き起こす疾患は発展途上国における健康問題に聞こえる。しかしながら、本当に開発途上国だけの問題であるとは言えない。世界三大微量栄養素欠乏症である、ビタミンA欠乏症、ヨウ素欠乏症、鉄欠乏症のうち、鉄欠乏症はHidden Hunger（隠れた飢餓）と呼ばれ、日本のような先進国においても取り組む必要がある健康問題である。先述のビタミンA欠乏症や、ヨウ素欠乏症においては、国際機関や各国の政府が共同した普及活動により、有病率の改善について世界的な規模で一定の成果が現れている。しかしながら、鉄欠乏に関しては、様々な努力が重ねられてきたが、良い結果が得られていない³⁾。近年、注目されている対策法の一つに栄養強化食品による鉄欠乏性貧血の改善・予防がある。著者は、鉄欠乏性貧血を改善・予防する方法に、鉄強化した豆腐様食品を用いたいと考え、その開発を行っている。本稿では、世界の飢餓状態とその状態が及ぼす経済的影響、食生活の変化が引き起こす栄養不足、世界における鉄欠乏症の状況、鉄欠乏症の対策と問題点、著者の取り組みについて紹介する。日本は高齢化社会に突入し、特殊な健康状態の人が増加して行くであろう。栄養不足が引き起こす社会問題は開発途上国の問題ではなく、世界共通の問題であり、日本においても取り組むべき課題の一つで

ある。

2. 世界の飢餓状況

日本のような先進国においては、飢餓と聞いてもあまり実感が湧かない人が多いだろう。しかしながら、世界を見渡すと、様々な国や地域において飢餓は大きな問題として立ちはだかっている。国際連合食糧農業機関（FAO）、国際農業開発基金、国連世界食糧計画協会は合同で、「世界の食糧不安の現状2012」という報告をまとめた⁴⁾。その報告書の表紙には、“経済成長は必要、しかし飢餓と栄養不良の削減には不十分である”とメッセージが打たれた。このメッセージの詳細は後述に任せるとして、その報告書の中にはハンガーマップと名付けられた、世界の飢餓状況を示した世界地図が掲載されている(図1)²⁾ので、まずはハンガーマップについて紹介する。この地図は2010年から2012年に行われた調査をもとに、各国の総人口に対する栄養不足人口の割合を示している。実物はカラーなので、より分かりやすい。興味のある人はインターネットでダウンロードすることができるので、ダウンロードしてじっくりと眺めてもらいたい。ハンガーマップを描く際の指標としては、健康的な生活を送るために必要なエネルギーを摂取できない人口の推定値を用い

ている。図1を見て分かるように中南米に位置する、グアテマラ、ニカラグア、エクアドル、ドミニカ共和国、ボリビア、パラグアイなど、東アジアに位置する、モンゴル、北朝鮮、中央アジアのタジキスタン、東南アジアのラオス、カンボジア、フィリピン、南アジアに位置するインド、パキスタン、ネパール、バングラデシュ、スリランカなど、西アジアに位置する、イラク、グルジア、イエメン、アフリカのサハラ砂漠以南の多くの国々において、栄養不足の人口の割合が高くなっている。また、ハンガーマップには、“子ども1人につき1日およそ30円で栄養たっぷりの給食を届けることができます。”、“食べることは、生きることの根本。でも、世界の8人に1人は飢えています。”、“飢餓は命を奪い、子どもたちの知的・身体的発育を妨げます。また、低賃金や低就学率の原因ともなり、経済成長を阻害します。”というメッセージが記されている。

FAOでは、栄養不足人口に関する調査を、1990年、1999年、2004年、2007年、2010年から各3年間実施し、世界における栄養不足人口の推移と開発途上国における栄養不足人口率の変遷を調べている(図2)⁴⁾。一方で、世界食料サミットは1990年の調査開始時に約9億8千万人であった栄養不足人口を2015年までに半減させると目標を立てた。また、ミレニアム開発目標では1990年の調査開始時に約23.2%であった栄養不足人口率を半減させると目標を立てた。様々な取り組みによって、栄養不足人口は2012年には約8億5千万人に微減したが、2015年に目標を達することは叶わないだろうと推察される。また、ミレニアム開発目標の開発途上国にお

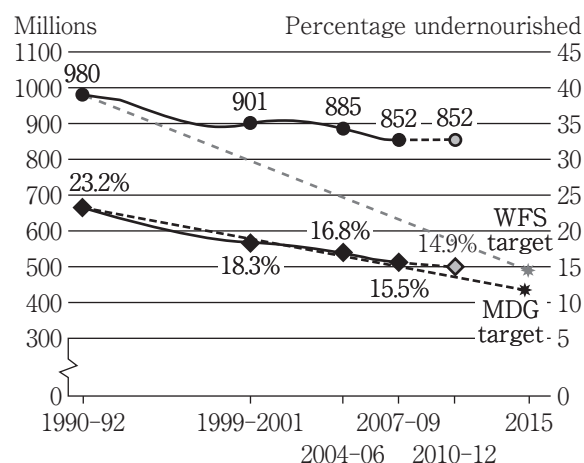


図2 開発途上国における栄養不足
●, 世界における栄養不足人口の推移。◆, 開発途上国における栄養不足人口率の推移。WFS target, 世界食料サミットの目標値。MDG target, ミレニアム開発目標の目標値。文献4)より引用し、一部改変。

る栄養不足人口率の目標値に関しては、2012年に14.9%まで減少し、2015年までの目標値に近づいている。しかしながら、近年は減少率に低下が観られ、目標の未達成の可能性が懸念されている。現状を簡潔にまとめると、栄養不足の改善については、世界レベルでは遅々として改善が進まない一方で、開発途上国においては重点的に努力をしてきた結果、改善されつつあるということになる。しかしながら、2015年までの目標値は栄養不足の皆無にはほど遠く、さらなる努力の継続が必要であることが分かる。そして、改善の実行はより困難な状態へと突入すると予測される。

さて、世界における栄養不足については上述のようであるが、地域ごとの状態は如何なるものか。そ

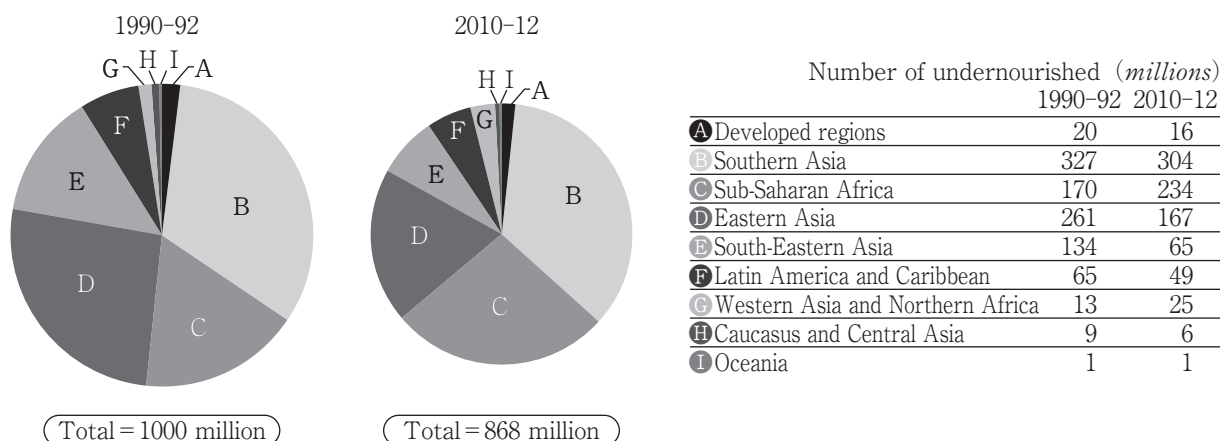


図3 世界における地域ごとの栄養不足人口の変化
1990年から1992年の調査と2010年から2012年の調査を比較している。文献4)より引用し、一部改変。

れについて、世界を、先進国、南アジア、サブサハラフリカ（サハラ砂漠以南のアフリカ）、東アジア、東南アジア、ラテンアメリカとカリブ、西アジアと北アフリカ、コーカサスと中央アジア、オセアニアの9地域に分けて調べたデータがある（図3）⁴⁾。データによると、1990年から1992年の調査時に比べ、2010年から2012年の調査で栄養不足の人口が大幅に減少した地域は東アジアと東南アジアであることが分かる。一方で、増加した地域もある。サハラ砂漠以南のアフリカおよび西アジアと北アフリカである。とくにサハラ砂漠以南のアフリカにおいては、大幅に増加していることが示されている。これらの地域に立ちはだかる栄養問題の原因は経済的な困窮が一因であることは容易に推察できる。

3. 経済状況と栄養不足の関係性

購買力平価（PPP）を勘案した国内総生産（GDP）と食事エネルギー供給量を6つの地域で比較したデータがある（図4）⁴⁾。ちなみにPPPを勘案することで、各地域の物価の違いを修正し、より実質的な比較が可能であると言われている。データは、1990年と2010年を比較しているが、いずれの地域においても、この20年で食事エネルギー供給量、PPP GDP共に増加していることがわかる。しかしながら、各地域によって勾配が大きく異なる。このデータの性質上、勾配が大きいということは、食事エネルギー供給量が増加しているにもかかわらず、PPP

GDPは増加していないということになる。すなわち、平易な言葉で表現すると、食べる量は増えているにもかかわらず、それに見合うだけの収入増加はなされていないという現象を意味する。さて、最も勾配が大きい地域は、ここでもサハラ砂漠以南のアフリカである。サハラ砂漠以南のアフリカでは、栄養不足の人が多く、食べる量が増える一方で、食べ物を得る経済力に乏しいということになる。他地域に比べて、格段に食糧と食糧を得るために必要なシステムが不足しているのである。また、図4はPPP GDPが高い地域ほど食事エネルギー供給量が高い傾向にあることも示している。つまり、食事エネルギーの十分な供給には経済力が必要であるということ、あるいは食事エネルギーが十分に摂取できれば経済力が付いてくるということである。さらに、PPP GDPに対する食事エネルギー供給量の割合は、PPP GDPが高い地域ほど減少することも示している。この傾向は、ある一定以上の食事エネルギーを供給するためには、経済的な因子が必要であることを意味する。また、栄養という面から眺めてみても同様のことが言え、PPP GDPが高い地域ほど、栄養不足の割合は減少する（図5）⁴⁾。これらの結果は、ある一定以下のPPP GDPを持つ地域ではPPP GDPを上げることが栄養不足の解決につながることを意味する。これらのことは以前から知られていることであるが、未だ解決に至っていない。そこには食習慣や歴史的背景が複雑に絡んでいるから

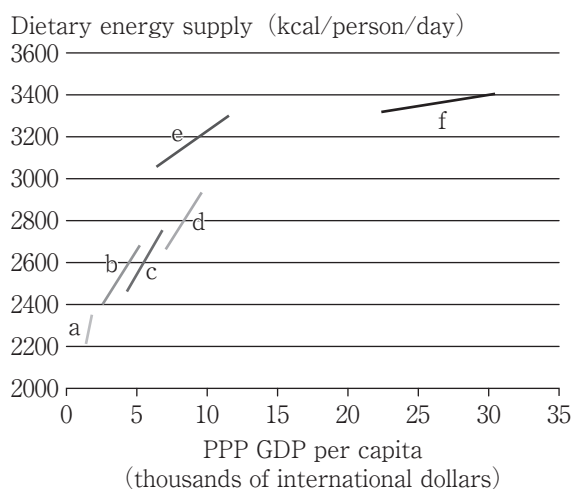


図4 食糧消費量と国内総生産（GDP）の関係性
文献4）より引用し、一部改変。a, サブサハラ以南のアフリカ, b, アジア, c, 開発途上国, d, ラテンアメリカおよびカリブ地域, e, 北アフリカ, f, 先進国。各線の左端は1990年を右端は2010年を示す。

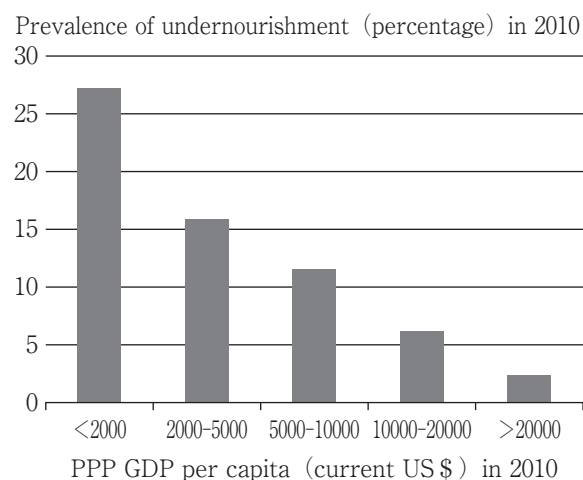


図5 栄養不足と国内総生産の関係性
文献4）より引用し、一部改変。

である。

4. 食事の内容から浮き彫りになる問題

経済発展と食習慣の変化について、FAOの興味深い報告がある⁴⁾。世界14カ国において、1961年から1963年の3年間と2007年から2009年の3年間に於ける食事調査を行い、総食事エネルギー供給量のうち、動物性食品から得たエネルギーの割合を調べた報告である（図6）。調査対象国として選択された14カ国はナイジェリア、バングラデシュ、インドネシア、中華人民共和国本土、インド、日本、ブラジル、メキシコ、パキスタン、スペイン、イタリア、ドイツ、フランス、アメリカ合衆国である。これらの国は、1961年から1963年にかけて、動物性食品から総食事エネルギー供給量の5%以下しか得ていなかった国（ナイジェリア、バングラデシュ、インドネシア、中華人民共和国本土、インド）、10%前後得ていた国（日本、ブラジル、メキシコ、パキスタン、スペイン、イタリア）、20%以上得ていた国（ドイツ、フランス、アメリカ合衆国）に分類される。その国々の動物性食品から得た総食事エネルギー供給量の割合は、約50年後にどのように変化しただろうか。図6が示すように、さほど大きな変化が見られない国と大きく変化した国に分けられる。大きく変化した国である、中華人民共和国本土、日本、ブラジル、メキシコ、スペイン、イタリアは、この50

年で大きく経済成長した国である。つまり、経済成長と動物性食品を食することは正の相関があると推測される。肉、魚、ミルク、卵などの動物性食品はタンパク質の供給源であり、タンパク質は体内で筋肉やエネルギーとなり得るので労働力には欠くことができない。また、動物性食品を食することで、鉄、亜鉛、カルシウム、ビタミンA、ビタミンB₁₂などの微量栄養素を多く得ることもできる。勿論、動物性食品を食べることで経済成長を成し遂げたのか、経済成長を成し遂げたことで動物性食品を食べるようになったのか、あるいは両方か、いずれが正しいかはこのデータからは不明であるが、動物性食品と経済成長には強い関連性があることが浮き彫りになった。さて、図6が示すように、この半世紀で動物性食品から得るエネルギーの割合を減らした国がある。アメリカ合衆国である。アメリカ合衆国では、1960年前半の総食事エネルギー供給量の約30%を動物性食品から得ていた。この50年で、肉や卵の過剰摂取が健康を害し、慢性非伝播性疾患（心臓病、癌、糖尿病、肥満）のリスクを上げることになり始めたことが減少につながったと考えられる。日本においても、昨今の食生活がアメリカナイズされていると言われており、同様な健康問題について考え始めたのが現状であろう。経済成長に必要なタンパク質摂取、それに伴う微量栄養素の摂取は動物性食品から得やすいが、動物性食品の大量摂取は健

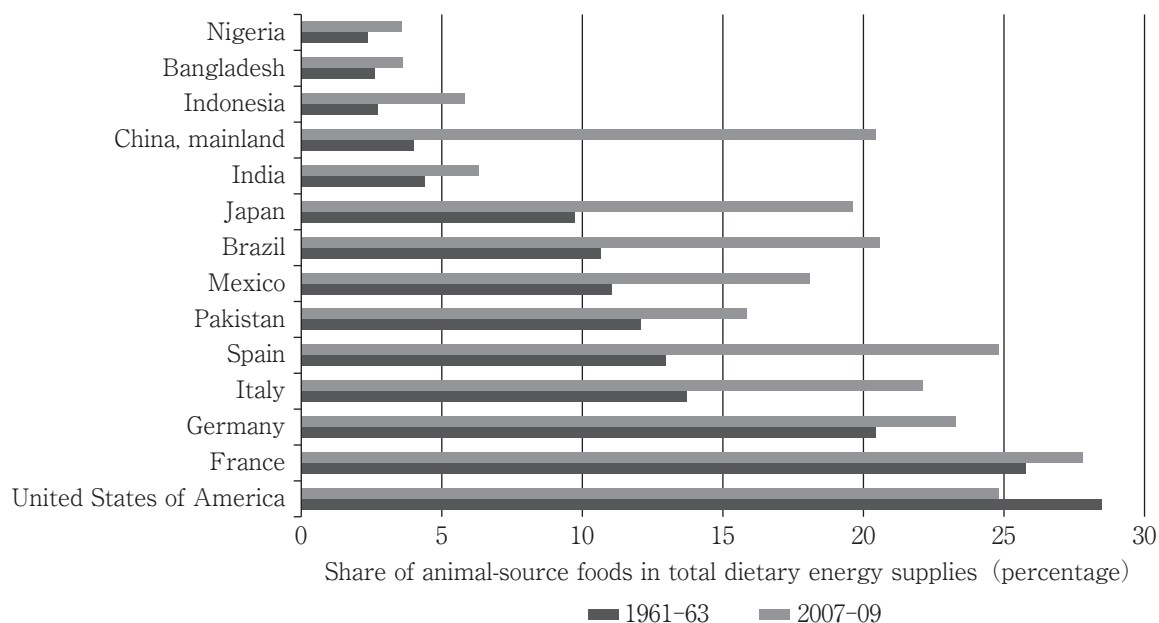


図6 経済成長と動物性食品由来の食事エネルギー供給量の関連性
文献4)より引用し、一部改変。

康を害するリスクを上げるということである。

さて、経済成長には動物性食品が不可欠のような構図が見られたが、その行き先には慢性非伝播性疾患のリスク上昇が浮き彫りになってきた現状で、著者は経済成長をするために動物性食品を過剰に摂取することを推奨することはできない。飢餓をなくするためにGDPを上げれば良いと単純にいう訳にはいかない理由の一つがここにある。そこで、動物性食品と植物性食品の摂取割合のバランスが大切となってくる。では、どのくらいの植物性食品を摂取することで、慢性非伝播性疾患を防ぐことができるのだろうか。WHOやFAOは、Gundgaardらの研究結果⁵⁾をもとにフルーツおよび野菜の一日当りの最低推奨摂取量を400 gと定め、これより低い場合は慢性疾患を増加させると述べている。さて、野菜やフルーツの摂取について、1990年から1992年の調査と2007年から2009年の調査を比較した報告がある（図7）。先進国においては、いずれの時期においても最低推奨摂取量の400 gを超えている。アジアにおいては、1990年から1992年の調査では最低推奨摂取量を下回っていたが、FAOの指導のもとに2007年から2009年の調査では大幅に上回っている。ラテンアメリカおよびカリブ地域では若干の改善がみられ、辛うじて最低推奨摂取量を上回った。しかしながら、アフリカでは、ほとんど改善されることなく、最低推奨摂取量の約75%に留まっている。ここでも、アフリカは問題を抱えていることが分かる。フルーツや野菜には有機酸や食物繊維が比較的多く含まれ、一般的に過剰な摂取はミネラルなどの微量栄養素の摂取を妨げると考えられるが、動物性食品と

合わせた適量のフルーツや野菜の摂取は微量栄養素の不足を改善する⁴⁾。そして、慢性非伝播性疾患の予防にも繋がる。微量栄養素不足の人は世界人口の30%以上であると推定⁴⁾されており、先進国においても多くの人が微量栄養素を不足している状態である。動物性食品と植物性食品をバランスよく食すことは、先進国においても様々な疾患の予防と改善へと繋がる。当然のことであるかも知れないが、実行されていないのが現状である。次章では、微量栄養素の一つである鉄の状況について紹介する。

5. 隠れた飢餓と社会問題

微量栄養素の一つである鉄が不足すると、鉄欠乏症が引き起こされる。鉄欠乏症の症状としては、鉄欠乏性貧血、運動機能の低下、イライラ、集中力の低下、倦怠感、疲れやすい、動悸、免疫機能の低下、ツメの異常、男性における抑うつ傾向などが挙げられる。これらの症状を有していても、鉄欠乏と結びつきにくいいため、自身による判断がつきにくい傾向にある。また、エネルギーを十分に摂取していても、鉄を十分には摂取できていないことがあり得ることも判断を難しくする。そして、女性や新生児・乳幼児の生命を脅かし、子どもの成長を妨げ、知的能力の発達や身体機能の発達を阻害する³⁾。すなわち、鉄欠乏症は‘隠れた飢餓’の一つに分類される。‘隠れた飢餓’とは、空腹感に苛まれる一般的な飢餓とは異なり、エネルギーを十分に摂取していても表面上外見的兆候が現れず、重篤な疾病を引き起こす原因となる微量栄養素不足を指す。勿論、これらの影響は国としての労働生産性を損なうことが容易に推測できる。さらに、運動によって鉄欠乏性貧血が引き起こされることも知られている⁶⁾。このことは男女スポーツ選手において、引退後も続く健康問題として重要な課題とされている。

さて、鉄欠乏症の一つである鉄欠乏性貧血は貯蔵鉄欠乏につづく鉄欠乏性造血後に起こる貧血である⁷⁾。開発途上国、先進国を問わず、妊娠していない女性が鉄欠乏性貧血である割合を示したデータがある（図8）。このデータから、いずれの地域においても、20%以上の女性が鉄欠乏性貧血であることが分かる。また、その割合はこの約20年間に於いて大きな変動がないことも明らかである。さらに、近年では南中央アジアでは妊娠していない女性の6割

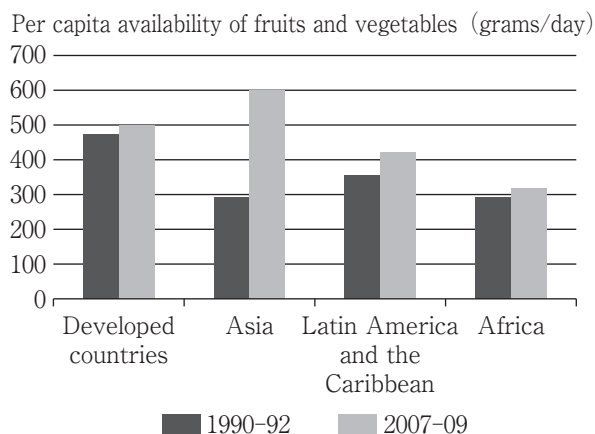


図7 フルーツおよび野菜の摂取量
文献4)より引用し、一部改変。

近くが鉄欠乏性貧血であること、西アフリカ、東アフリカ、中央アフリカにおいても5割近くが罹患していることが示されている。少し古いデータではあるが、これらの地域において、鉄欠乏症がGDPに与える影響について報告がある⁸⁾。インド、パキスタン、ベトナムにおいて、鉄欠乏症によって失われたGDPは各々1.25% (約5358億円)、0.6% (約376億円)、1.1% (約299億円)と推察された⁸⁾。また、西アフリカに位置するシエラレオネの場合、農業に従事する女性のうち、鉄欠乏症の女性が稼ぐ予定であった労働賃金は2005年からの5年間で、約94.5億円と推定されている⁹⁾。この国で子供一人が1日30円で十分な給食を食べることができると考えると、約8万6千人分の給食1年分に相当する金額である。ただし、シエラレオネの人口は2012年現在で約

598万人であり、全人口の41.2%が14歳以下の子供である¹⁰⁾。約241万人の子供のうち、30%が栄養不足と考えると、栄養不足の子供は約80万人に上り、先の94.5億円で賄えるのは1ヶ月程度ではある。焼け石に水かもしれない。しかし、この問題には平均寿命が47.78歳 (2011年のデータ)¹⁰⁾であることも関係しており、平均寿命を上げることで世帯当りの収入は確実に増えるであろう。やはり、栄養不足を改善することは経済発展に欠かすことができず、経済発展は栄養不足を改善するために必要である。ただし、物価の上昇も勘案する必要があるのは言うまでもない。さて、シエラレオネはダイヤモンド採掘を基盤とした輸出国で、ダイヤモンドを巡る植民地化や内戦で国民が虐げられてきた背景がある。男性の多くは鉱業に従事し、女性が中心となって農業が営まれている。この分業体制は、植民地時代の名残であると言われている。シエラレオネのような国における栄養問題は植民地政策の罪深さであり、問題解決に先進国が力を注がなければならない理由でもある。

鉄欠乏性貧血の予防・改善にはどのようなことが実施されているのであろうか。現行では、鉄が多く

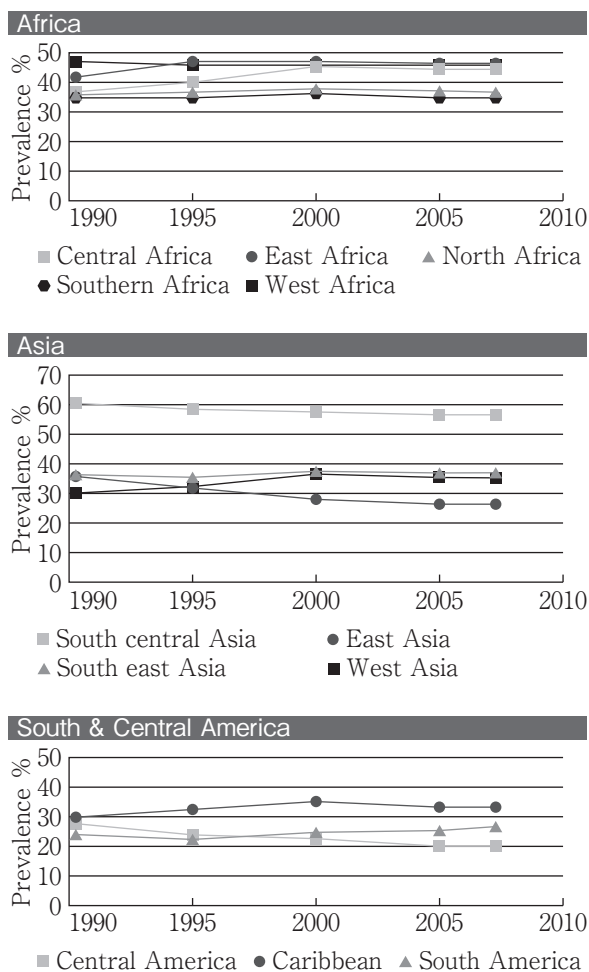


図8 妊娠していない女性における貧血の動向
アフリカ：白四角，中央アフリカ；丸，東アフリカ；三角，北アフリカ；六角形，南アフリカ；黒四角，西アフリカ。アジア：白四角，南中央アジア；丸，東アジア；三角，東南アジア；黒四角，西アジア。中南米：白四角，中央アメリカ；丸，カリブ地域；三角，南アメリカ。
文献6)より引用し，一部改変。

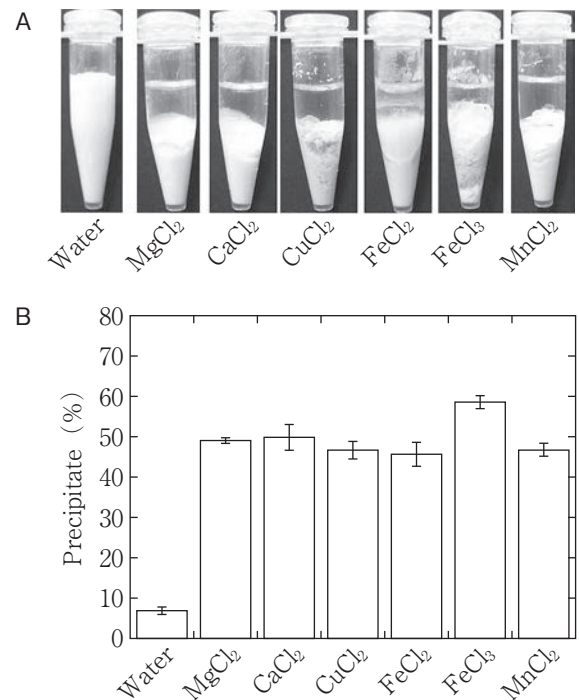


図9 様々な金属塩化物による豆腐様沈殿の形成
(A) 同量の豆乳に最終濃度が20 mMとなるように各凝固剤を添加し，遠心分離した。(B) 生じた沈殿の重量を開始時の豆乳重量で除することで，沈殿率を算出した。データは独立した異なる3回の実験の平均値±標準偏差で表されている。文献13)より引用し，一部改変。

添加された菓子、飲料、乳飲料、調味料、主食あるいは鉄剤を利用した継続的な摂取が推奨されている。ところが、これらの現行法をシエラレオネのような開発途上国で実施するには、いくつかの課題が生じる。その国の食文化にあった食品を持ち込む必要性、その食品を現地で製造するための技術の輸出、衛生管理に関する理論や技術の輸出、品質管理に関する測定技術の輸出、加えて継続性が重要である現行法を先進国主導で導入することによる植民地時代と同様な失敗の繰り返しの可能性など、である。これらの課題を解決するために、著者は自身の専門である食品科学研究の立場から、次のようなアプローチを試みている。

6. 新規鉄強化食品の開発に向けて

先述のように、世界において妊娠していない女性が鉄欠乏状態にある割合は20-60%と非常に高い状

態にある。一方、平成23年度国民健康・栄養調査によると、日本人の女性の5人に1人が鉄欠乏性貧血を罹患しており、罹患率は年々増加する傾向にある。つまり、日本においても、鉄欠乏症の予防・改善は取り組むべき課題である。本疾患の予防・改善には鉄の継続的摂取が不可欠であり、これまでに鉄が多く添加された菓子、飲料、乳飲料、調味料、主食あるいは鉄剤を利用した継続的な摂取が推奨されてきた。しかし、予防・改善法の選択性の低さ、対象者の生活環境の多様性（幅広い年齢層、食事制限の有無などの健康状態、男女スポーツ選手などの特殊な環境など）、鉄剤に対する嫌悪感などから継続的な摂取が困難となっている。これらの問題を解決するためには、鉄強化食品を対象者自身あるいはその家族が調理し、摂取方法にバラエティを持たせることが大切であると、著者は考えている。その様な観点から、強化する食品に豆腐を選択し、豆腐様鉄

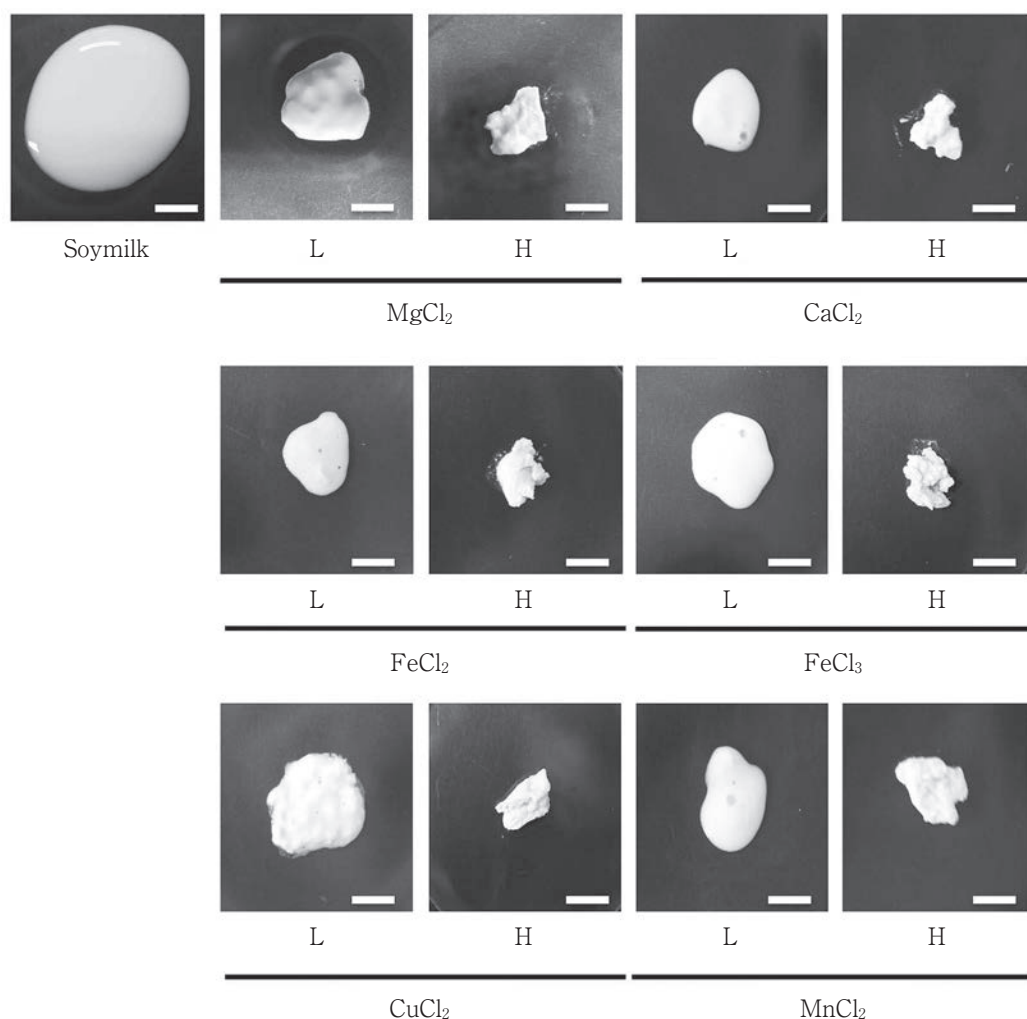


図10 様々な金属塩化物によって生じた豆腐様沈殿の様子
Lは低濃度、Hは高濃度の凝固剤添加濃度を示す。文献13)より引用し、一部改変。

強化食品の開発を試みている。また、豆腐を食することは植物性食品を摂取することにもつながる。

農林水産省総合食料局食品産業振興課によると、豆腐の定義は原材料である大豆から熱水によりタンパク質などの可溶性成分を抽出した豆乳に凝固剤を加えて凝固したものを指すとされている¹¹⁾。一般的には、凝固剤として、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、硫酸カルシウム、グルコノデルタラクトンが用いられている¹²⁾。とくに伝統的な加工法はミネラルを添加する方法である。著者は、伝統的な手法であるミネラルを含む凝固剤において、鉄が代用できないかと考えた。そこで、様々なミネラルの塩化物を豆乳に添加することで、これらミネラルによる豆腐様の沈殿の形成について検討した(図9)¹³⁾。従来の凝固剤である塩化マグネシウム、塩化カルシウムと同様に、塩化銅、塩化第一鉄、塩化第二鉄、塩化マンガンにおいて豆腐様沈殿が形成されることが示された¹³⁾。この結果は、これらの塩化物を用いて豆腐様食品を加工することができる可能性を示している。これらのミネラルを含む硫酸塩についても同様に豆腐様沈殿が形成されることを示している¹⁴⁾。また、塩化マグネシウムや塩化カルシウムを用いて、もめん豆腐やきぬごし豆腐を加工することが出来るが、著者はその作り分けに凝固剤濃度が重要であることを明らかにしている¹⁵⁾。すなわち、低濃度の凝固剤添加はきぬごし豆腐を、高濃度の凝固剤添加はもめん豆腐を、加工するのに有用である¹⁵⁾。これらの特長をもとに、各塩化物において低濃度添加によるきぬごし豆腐の加工と高濃度添加によるもめん豆腐の加工が可能であるかを検討した(図10)。その結果、いずれの塩化物においてもきぬごし豆腐ともめん豆腐を加工できる可能性が示された¹³⁾。現在は鉄強化された豆腐様食品の試作品が完成しており、鉄欠乏症の予防・改善に対する効果について検討を行っている。本鉄強化豆腐様食品の鉄含量は、研究室においてマグネシウムを利用して同じ方法で加工した豆腐の約50倍に鉄強化されており、市販豆腐と比較すると100倍以上に強化されている(未発表データ)。一日の1/3量を一食で食するとして換算すると、本食品を一食当り3g程度を食すれば、鉄の摂取上限量の1/3量を満たすこととなる(未発表データ)。本食品3gは1cm角の食品を3個程度に相当する(未発表データ)。現在、

本加工法は特許申請中である¹⁴⁾。実用化までには、遠い道の半ばではあるが、着実に進めることで、世界で起こっている栄養問題の一助となるように、研究を続けて行きたい。

謝 辞

著者の研究内容については、文部科学省科学研究費若手研究B(23700894)を用いて行ったものである。また、その研究の実施は、武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科食品科学研究室に所属した学生であった、一幡美佳氏、中谷友香氏、部家弥生氏、三木理沙氏、岡村麻衣氏、鳥居絵美氏、村上亜利紗氏、安田春奈氏のご協力の上に成り立った。さらに、特許申請については、武庫川女子大学研究活性支援課のご支援により申請することができた。ここに感謝申し上げる。

参考文献

- 1) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室：“生活習慣病をしよう！”，<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/seikatu/> (2014年1月14日閲覧)。
- 2) 国連世界食糧計画協会：ハンガーマップ。<http://ja.wfp.org/hunger-jp/map> (2014年1月14日閲覧)。
- 3) 中西由季子：開発途上国の主食や調味料に鉄の栄養強化を！。栄養兵庫，213，2012。
- 4) 国際連合食糧農業機関，国際農業開発基金，国連世界食糧計画協会：世界の食糧不安の現状2012～経済成長は必要，しかし飢餓と栄養不良の削減には不十分～，2012。
- 5) Gundgaard, J, Nielsen, JN, Olsen, J, *et al.*: Increased intake of fruit and vegetables: estimation of impact in terms of life expectancy and health-care cost. Public Health Nutri., 6, 25-30, 2003.
- 6) 宮崎保：運動と貧血—発育期における運動と貧血とくに鉄欠乏性貧血を中心に—。体力科学，46, 529-534, 1997。
- 7) International Nutritional Anemia Consultative Group: UNSCN. 2010: Six Report on the Nutrition Situation: Progress in nutrition., 2010.
- 8) Horton, S: Opportunities for investments in nutrition in low-income Asia. Asian Development Review, 17, 246-273.
- 9) Darnton-Hill, I, Webb, P, Harvey, PW, *et al.*: Micro-nutrient deficiencies and gender: social and economic costs. Am. J. Clin. Nutr., 81, 1198S-1205S, 2005.
- 10) THE WORLD BANK: <http://www.worldbank.org/>

(2014年1月24日閲覧).

- 11) 農水省総合食料局食品産業振興課：豆腐・納豆の現状, 2006.
- 12) 平春枝, 来嶋弘倫, 阿部範雄：凝固剤を異にした豆腐の一般成分組織および無機質成分組成. *Foods Food Ingredients J, Jpn.*, 188, 49-56, 2000.
- 13) Arie, Y and Takenaka, Y: Initiation of protein association in tofu formation by metal ions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78, 86-91, 2014.
- 14) 有井康博：豆腐の製造方法およびそれ得られた豆腐. 学校法人武庫川女子大学, 特開2013-051906, 2013年3月21日.
- 15) Arie, Y and Takenaka, Y: Magnesium chloride concentration-dependent formation of tofu-like precipitate with different physicochemical properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 928-933, 2013.

総説

野菜冷凍時の細胞傷害とドリップ生成

福田 満

Key Words : 野菜, 冷凍, 氷結晶, 細胞傷害, ドリップ

武庫川女子大学栄養科学研究所
〒663-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46
TEL: 0798-45-9879
E-mail: senjuoka@mukogawa-u.ac.jp

総説

野菜冷凍時の細胞傷害とドリップ生成

福田 満

要旨

最近の食生活では冷凍食品は不可欠な存在になっている。国内で生産される冷凍食品の大部分は調理食品であるが、農産物や水産物も冷凍食品として役立っている。最近では野菜冷凍食品の生産量が増え、輸入される野菜冷凍食品の量も増えている。しかしながら、大部分の野菜では90%以上が水分であるため、冷凍処理過程で生成した氷結晶が細胞を傷害し、解凍後に大量のドリップを生成して野菜の品質を低下させるというデメリットを生じる。そのため、野菜の種類によって冷凍に不適なものも多く認められる。野菜冷凍時の細胞内氷結晶の成長を抑制すれば、ドリップ量の増加を防ぎ食品テクスチャの低下を抑制することが可能である。本総説では、野菜の冷凍条件が細胞内の氷結晶と解凍時のドリップ量に及ぼす影響について紹介する。野菜の種類によって細胞内氷結晶の形状が異なり、細胞質氷核成分が氷結晶成長に影響する可能性も示した。細胞内凍結状態およびドリップ量の差異は、野菜の細胞質成分と冷却速度が関係することを述べ、ドリップ量と細胞内氷結晶の間に密接な関係が存在することを解説した。

Key Words：野菜，冷凍，氷結晶，細胞傷害，ドリップ

1. はじめに

最近では食生活において市販の冷凍食品は必需品となっている。日本冷凍食品協会の調査によると、平成25年の冷凍食品の国内生産量が1,550万トン（対前年比105%）であり、平成22年から4年間連続増加した。肉食志向の強まりや企業の製品開発努力などもあり、家庭用冷凍食品の消費が大幅に増え、業務用冷凍食品の需要も増加したことが要因となっている。平成25年度では業務用冷凍食品は、生産量が919万トン（対前年比103%）で3年連続増加した。一方、家庭用冷凍食品は、生産量が630万トン（対前年比108%）で、4年連続して増加し、業務用

も家庭用も過去最高となった。業務用と家庭用の生産量の比率は、それぞれが59%と41%（前年度61%、39%）と家庭用が4割を上回り、家庭用の比率が高まった。このように冷凍食品市場の拡大が認められる。冷凍食品の品目別生産量では、平成25年に調理食品が最も多く約100万トンとなり国内生産量の86%を占めていた。次に農産物が約25万トンで、さらに水産物、菓子類、畜産物が続いた。財務省貿易統計による25年のわが国の冷凍野菜輸入量は92万トンであり、国内生産量をはるかに上回っていた。輸入が増加した主な品目としては、ほうれん草、さといもなどであった。このように冷凍野菜の需要

は増加している。しかしながら、冷凍野菜には問題点が残っている。大部分の野菜は90%以上が水分であるため、冷凍処理によって生成した氷結晶が細胞の組織構造を損傷して冷凍傷害を与え、解凍後に大量のドロップを生成して食品を軟化させ品質を低下させる。冷凍傷害を防止すれば、解凍後の組織軟化を抑制し野菜の冷凍による長期保存が可能になる。本総説では、冷凍野菜の品質向上を目的として野菜冷凍時の細胞内氷結晶による冷凍傷害と解凍後のドロップ量との関係を中心に解説する。

2. 細胞の凍結

氷点下の低温に生物を移すと生体内の水分は凍結する。生体内の水分凍結では、多様な物質を溶解した水溶液から水の分子だけを結晶化する。そのため、氷結晶生成時に生物は物理的ストレスを受けると共に、氷結晶の形成・成長過程で水の濃縮による化学的ストレスも受け、細胞は多大なダメージを受ける。また、氷結晶の生成速度は冷凍庫の冷却速度の影響を受け、緩慢な凍結は細胞の原形質膜を傷害する¹⁻⁴⁾。特に水分の多い植物組織では大きなダメージを受ける⁵⁻⁷⁾。このような凍結による原形質膜傷害が植物性食品の解凍後のドロップ生成として細胞内液が漏出する原因になると考えられる。

3. 植物性食品の凍結速度と氷結晶のサイズ・形状

食品の凍結は基本的には水の液相から固相への相変化現象である。そのため、凍結により食品内部に形成される氷結晶性状の動態は凍結食品の品質を判断する上で重要な因子になる。上野らは⁸⁾氷結晶サ

イズが冷却速度に比例すると述べている。

図1にクライオSEM（冷凍装置付属走査型電子顕微鏡）によって観察したリンゴとタマネギの凍結細胞を示した。このSEM観察像では白い部分が細胞質の有機質であり黒く見える空間が氷の昇華した部分である。したがって黒い部分が氷結晶の形状を示す。図1のクライオSEM観察結果はSanchezらの植物細胞観察像^{9,10)}と同様の凍結細胞の氷結晶形状を示した。細胞内の氷結晶は2次的には長方形に観察されるので、3次的には一辺5-15 μ m程度の微小な直方体を形成していると考えられる。上野らは⁸⁾寒天を凍結した場合、氷結晶の長径は100 μ mと報告しているが、図1に示すように、著者が行った凍結リンゴの観察では約5 μ m、凍結タマネギでは約15 μ mとなり寒天よりさらに微小なつた。この差異は細胞質中の溶質の種類や濃度によるものと推定される。成熟した植物細胞は糖質に富むため、単糖やオリゴ糖が結晶生成に関係している可能性が高い。宮崎は^{11,12)}食品の凍結では氷核生成物質が不均一であり、氷結晶構造に影響すると推定しているので、リンゴとタマネギの氷結晶構造の違いは氷核生成物質の種類や量に起因すると考えられる。

4. 氷結晶と細胞傷害

急速冷凍時の庫内温度と試料温度の変化は図2に示すように、冷凍庫内温度低下に比べて試料の内部温度の低下はかなり遅れた。

食品を冷却すると、食品組織内部の水の分子運動は緩慢になる。水が凍結する時の温度帯は重要な要素であり、-1℃から-5℃が最大氷結晶生成帯と言

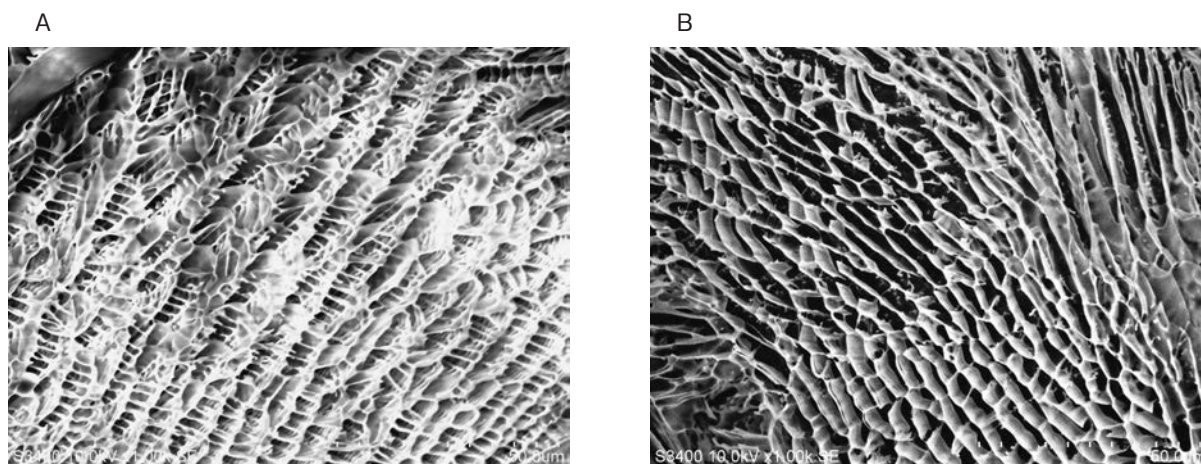


図1. 細胞質の氷結晶状態
A: リンゴ, B: タマネギ
クライオSEM観察 500倍

われ、氷の結晶が最も成長する温度帯である。この温度帯をいかに短時間で通過して氷結晶の成長を抑制するかが課題であり¹²⁾、最大氷結晶を生成させないための急速凍結では約30分以内で最大氷結晶生成帯を通過することが要求される。

図3に示すように、 -1°C から -5°C までの最大氷結晶帯を短時間で通過すると、後述するように氷結晶の成長が避けられる。

図4では急速凍結と通常凍結により凍結した場合の試料内部の温度変化の差異を示した。最大氷結晶生成帯(-1°C ～ -5°C)を通過する時間が通常凍結で

は約35分に対して、急速凍結では約15分であった。

細胞内凍結状態についてクライオSEMによって観察した像を図5と図6に示した。どちらも液体窒素瞬間凍結であるため、細胞内に生成した氷結晶は微細であることが認められる。

瞬間凍結と通常凍結では最大氷結晶生成帯を通過する時間がまったく異なったので、そのような冷凍条件の違いが凍結組織に与える影響を図7に示した。図から明らかなように液体窒素瞬間凍結では細胞内の氷結晶成長は抑制され、一辺 $5\sim 10\mu\text{m}$ 程度

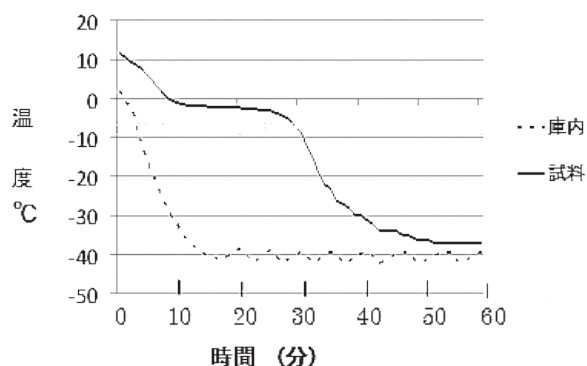


図2. 急速凍結時の庫内温度と試料温度の変化

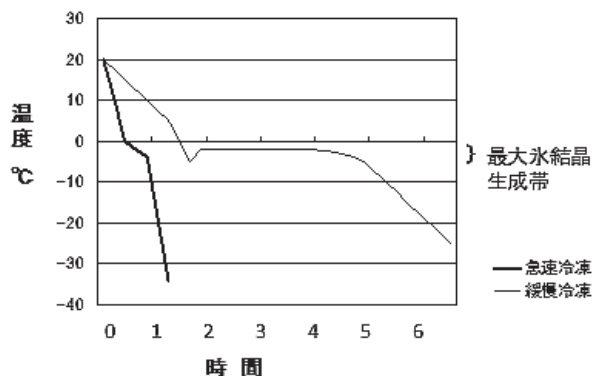


図3. 最大氷結晶生成帯 (-1°C ～ -5°C)

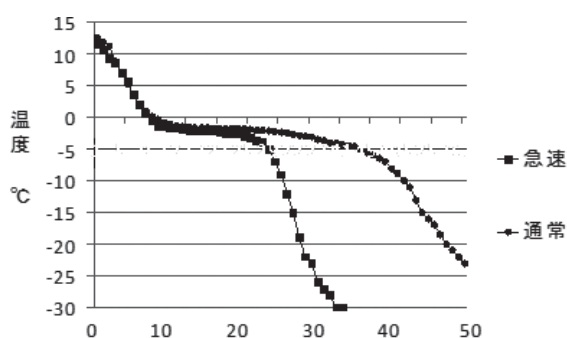


図4. 冷凍条件の違いによる植物性食品試料内部の温度変化

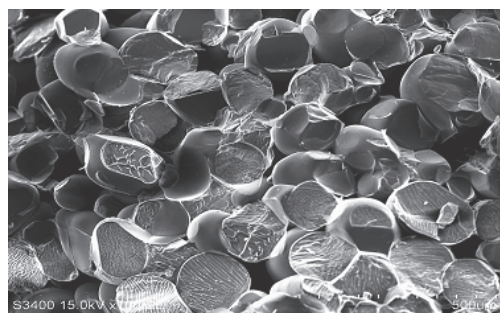


図5. クライオSEMによる植物試料断面の観察 100倍

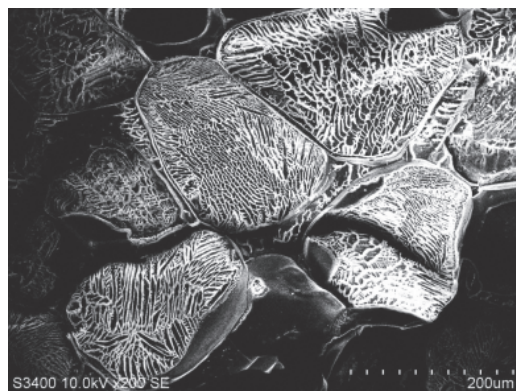


図6. クライオSEMによる植物試料断面の観察 200倍

A, 液体窒素瞬間凍結

B, 通常凍結

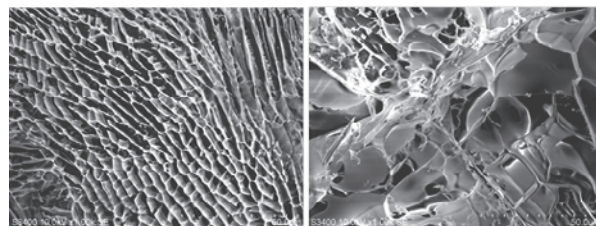


図7. 瞬間凍結と通常凍結によるタマネギ細胞内凍結状態の比較 (1,000倍)

A, Bいずれも細胞質ゾルの状態である。

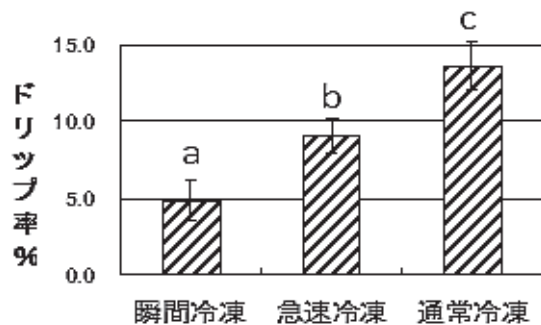


図8. 冷凍条件がダイコンの凍結－解凍時のドリップ量に与える影響
値は平均値±SD (n=10) a,b,cは多重比較検定で有意差を示す (p<0.05)

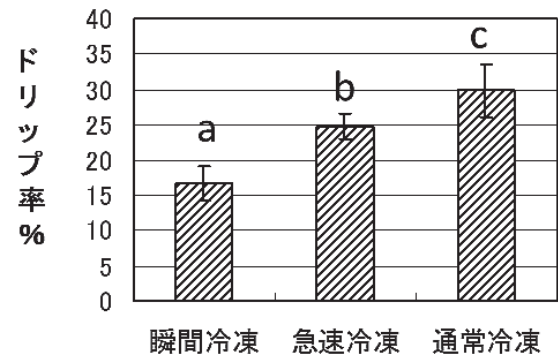


図9. 冷凍条件がハクサイの凍結－解凍時のドリップ量に与える影響
値は平均値±SD (n=10) a,b,cは多重比較検定で有意差を示す (p<0.05)

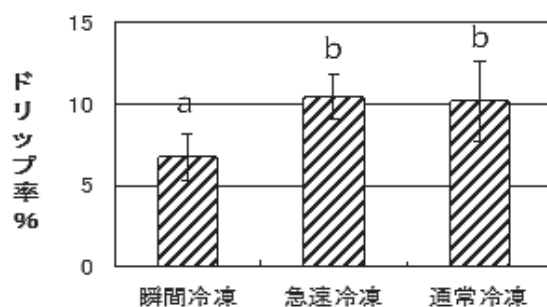


図10. 冷凍条件がキュウリの凍結－解凍時のドリップ量に与える影響
値は平均値±SD (n=10) a,bは多重比較検定で有意差を示す (p<0.05)

キュウリについて、瞬間冷凍、急速冷凍、通常冷凍解凍後のドリップ量を比較した。ダイコンとハクサイのドリップ量は、液体窒素瞬間冷凍<急速冷凍<通常冷凍(図8, 9)となり、瞬間冷凍、急速冷凍、通常冷凍の間に有意差を示した。しかし、キュウリのドリップ量は、瞬間冷凍<急速冷凍=通常冷凍(図10)となり、瞬間冷凍ではドリップ量は有意に低下したが、急速冷凍と通常冷凍の間には有意差は認められなかった。このような差異は細胞質に含まれる糖などの影響と考えられる¹⁴⁾。

の微小な氷結晶であったが、通常冷凍では大きな氷結晶が生成したため細胞質が破壊されていることが分かる。

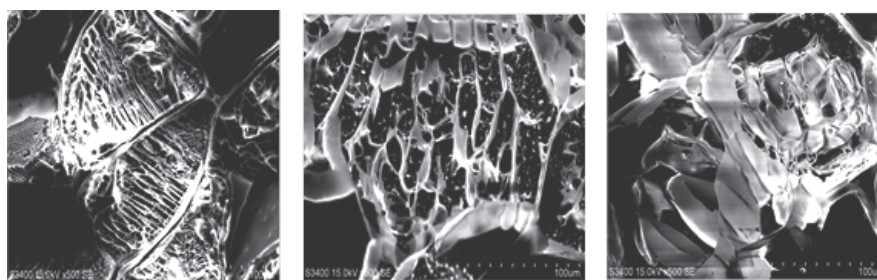
液体窒素による瞬間冷凍条件下では最大氷結晶生成帯通過時間の短縮が細胞内氷結晶を微小化して細胞内傷害を抑制したので、いかに短時間に最大氷結晶生成帯を通過するかが重要な冷凍条件であることが明らかである¹²⁾。

5. 解凍後のドリップ量の比較

根菜類のダイコン・葉菜類のハクサイ・果菜類の

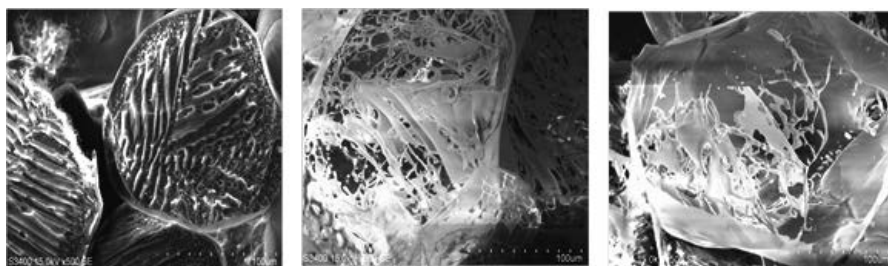
6. 冷凍方法の違いによる細胞内氷結晶サイズ比較

根菜類のダイコン・葉菜類のハクサイ・果菜類のキュウリについて凍結時の細胞内氷結晶生成状態をクライオSEM観察で図11, 12, 13に示した。冷凍時の細胞内氷結晶の形状や大きさは細胞質成分の種類や濃度によって影響を受けるため、野菜の種類によって冷凍適性が異なると示唆される。いずれの野菜でも瞬間冷凍は他の冷凍条件に比べて微細な氷結晶を示したが、急速冷凍では氷結晶がかなり成長し、通常冷凍では氷結晶が細胞質をかなり損傷することが明らかになった。



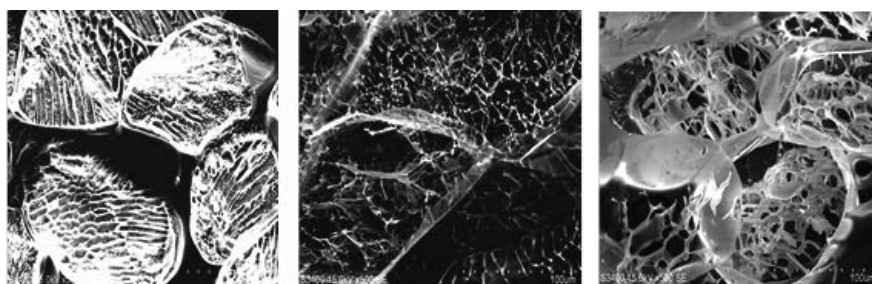
ダイコン 瞬間冷凍 500倍 ダイコン 急速冷凍 500倍 ダイコン 通常冷凍 500倍

図11. 冷凍条件がダイコンの細胞内氷結晶生成に与える影響



ハクサイ瞬間冷凍500倍 ハクサイ急速冷凍500倍 ハクサイ通常冷凍500倍

図12. 冷凍条件がハクサイの細胞内氷結晶生成に与える影響



キュウリ 瞬間冷凍 500倍 キュウリ 急速冷凍 500倍 キュウリ 通常冷凍 500倍

図13. 冷凍条件がキュウリの細胞内氷結晶生成に与える影響

したがって、冷却速度が遅いほど、野菜の細胞内氷結晶が成長し、生成した氷結晶による損傷が解凍後のドリップ量を増加させたと考えられる(図8, 9, 10)。また、通常冷凍で観察された氷結晶の成長は再結晶化による氷結晶の成長が原因と推定される

15)

7. 終わりに

冷却速度が細胞内の氷結晶生成状態に影響を与え、最大氷結晶生成帯を通過する時間が短いほど氷結晶の成長を抑制するという結果が得られた。氷結晶が微細であるほど、細胞質に与える傷害が軽減し解凍時のドリップ量を抑制した。冷凍時の細胞内氷結晶の形状や大きさは細胞質に含まれる成分の種類や濃度によって影響を受けたと推定され、野菜の種類によって冷凍適性が異なると考えられた。野菜冷凍時の氷結晶の形状に与える成分は多成分であり、今後の解析が必要である。本総説では細胞内の凍結状態を扱ったが、冷凍時には細胞外液が先に凍結するので、細胞外液凍結と細胞内凍結との関係についても検討すべき課題である。

参考文献

- 1) 藤川清三：生物の凍結に関する基礎研究，低温生物工学会誌，65，1-7，2012.
- 2) 上村松生，南杏鶴，河村幸男：凍結ストレスと植物，低温生物工学会誌，55，29-36，2009.
- 3) 山田明美，黒田克史，実山豊ほか：低温感受性植物細胞の凍結挙動，低温生物工学会誌，145，7-13，1999.
- 4) Yamada, T, Kuroda, K, Jitsuyama, Y *et al.* : Roles of the plasma membrane and the cell wall in the responses of plant cells to freezing. *Planta*, 215, 770-778, 2002.
- 5) 上村松生，Sreponkus, PL.：植物の耐凍性と細胞膜の凍結脱水下における安定性：細胞膜以外の要因の影響，低温生物工学会誌，45，36-38，1999.
- 6) 上村松生，鎌田崇：植物の凍結耐性増大過程における細胞内適合溶質の役割，低温生物工学会誌，47，49-50，2001.
- 7) 僧都博：生細胞の凍結による障害と保護の機構，化学と生物，18，78-87，1980.
- 8) 上野茂昭，都甲沫，相良泰行ほか：食品の凍結により形成される氷結晶性状の定量的解析，低温生物工学会誌，48，115-118，2002.
- 9) Lopez-Sanchez P, Schumm S, Pudney PDA *et al.* : Carotene location in processed food samples mea-

- sured by Cryo In-SEM Raman. Analyst, 136, 3691-3697, 2011
- 10) Van Dongen, JT, Ammerlaan, AMH, Woutwerlood, M et al. : Structure of the Developing Pea Seed Coat and the Post-phloem Transport Pathway of Nutrients, Amnals of Botany, 91, 729-737, 2003.
- 11) 宮崎長人：生物・食品と凍結，低温生物工学会誌，55，23-27，2009.
- 12) 宮崎長人：凍結食品における氷結晶状態制御とその応用，低温生物工学会誌，44，43-50，1998.
- 13) 中川良二，北川直揮，八十川大輔ほか：野菜の冷凍保存技術の開発，北海道立食品加工研究センター報告，3，59-63，1998.
- 14) 宮脇長人：食品凍結における氷結晶構造の解析・制御とその食品加工への応用，日本食品科学工学会誌，42，210-210，1995.
- 15) 石黒博：急速凍結された生体組織内の時系列再結晶化特性，低温生物工学会誌，52，145-149，2006.

「栄養科学研究」投稿規定

1. 「栄養科学研究」について

「栄養科学研究（The Mukogawa Journal of Nutrition Science Research; MJNSR）」（以下、本誌）は、栄養科学研究所が発刊する「研究所紀要」に該当する科学雑誌で、他誌に未発表の栄養科学に関する総説、原著、症例報告、短報・その他の投稿を受け付ける。

2. 投稿資格

依頼原稿を除き、原稿の筆頭著者は、原則として本学の教員や大学院生に限るが、編集委員会が認めた場合は学外からの投稿も受け入れる。

3. 論文の査読

審査の結果、編集方針に従って論文の採否や原稿の加筆、修正、削除などを決定し、著者に通知する。

4. 原稿の形式

1) 原稿記載の順序

- (1) 第1ページ目は表紙とし、総説、原著、症例報告、短報・その他の別を明記し、表題25文字以内のランニングタイトル、Key Words（5個以内）、著者全員の氏名とその所属、連絡責任者の住所、氏名、電話、FAX、E-mailアドレスを記載する。
- (2) 第2ページ目以降は、下記の順に配列する。
本文（400字以内の要旨、緒言、方法、結果、考察、謝辞等、文献）
表紙を第1ページとして、最終ページまで通し番号を記入する。
表（説明図をふくむ）、図、図の説明は別々に添付すること
- (3) 投稿にあたり、共著者全員が自筆署名した投稿承諾書を同封すること

2) 原稿作成上の注意

- (1) 原稿は原則として3部作成し、次ページ以降の投稿要領に従いCD-Rも付けて投稿すること
- (2) 図・写真はそのまま製版できる鮮明なものとし、片側コラムの幅(77mm)、または左右コラム幅(165mm)に合わせた大きさにする。組み合わせの図は、印刷領域(222mm×165mm)を超えない範囲(図説も考慮する)でまとめて、A4判の用紙で提出する。図中文字のサイズについては中ゴシック7.5ポイント(11級)とする。
- (3) 表については、体裁を統一するため、ワード（エクセルも可）にて作成し、フロッピーディスクに原稿とは別ファイルにて添付すること。
- (4) 文献の記載は引用順とし、末尾に一括して通り番号を付けること。
- (5) 文献番号1), 1) 2), 1) - 3) …を肩付とし、本文中に番号で記載すること。著者が4名以上のときは、3名を記載し、残りを「～ほか」「～et al.」とすること。
- (6) 誌名を略記する場合には、本邦のものは日本医学図書館協会編：日本医学雑誌略名表、外国のものはIndex Medicus 所載のものに従う。
- (7) 英文要旨が必要。
- (8) 度量衡の単位は本文、図表ともにmm, cm, ml, dl, l, pg, ng, μ g, mg, g, kgなどを用いる。

3) 文献記載例

- (1) 萩里早紀, 谷野永和, 山本遥菜ほか: 地域在宅高齢者のMini Nutritional Assessment (MNA) と血清アルブミン値の関係におけるBMIの影響. 日本病態栄養学会雑誌14: 317-324, 2011
- (2) Tanaka M, Yoshida T, Bin W, et al.: FTO, abdominal adiposity, fasting hyperglycemia associated with elevated HbA1c in Japanese middle-aged women. J Atheroscler Thromb. 19: 633-642, 2012.
- (3) 福尾恵介ほか: 予防とつきあい方シリーズ, 高血圧・糖尿病—生活習慣病— (萩原俊男, 監修, 池上博司, 楽木宏美, 編集) メディカルビュー社, 東京, 2009, pp.36-39
- (4) Liberman, U. A., Marx, S. J.: Vitamin D-dependent rickets. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism 4th ed (ed. by Favus, M. J.). Lippincott, Philadelphia, 1999, pp.323-328

5. 掲載料

掲載料は原則無料とするが, 刷り上り10頁以上の超過分については徴収する場合がある. カラー印刷等, 特殊なものは, 実費が必要である.

6. 著作権

本誌に掲載された論文の著作権は, 武庫川女子大学に帰属する. ただし, 著作者本人は論文を許諾なしに利用することができる. また, 論文は武庫川女子大学リポジトリに搭載し, インターネットを通じて公開されるものとする.

7. 投稿要領 (原稿3部とデータを入れたCD-R等の記録媒体を添付すること)

1) 使用ソフトについて

(1) Macを使う方へ

ソフトはマックライト, MSワードを使用すること.

その他にソフトを使用する場合はテキスト形式で保存すること.

文字は細明朝11ポイントで統一すること.

(2) Windowsを使う方へ

保存は必ず, テキスト形式で保存すること.

文字はMSP明朝またはCentury11ポイントで統一すること.

記録媒体は, Mac, WindowsともCD-Rを使用すること.

2) 文字は節や段落などの改行部分のみにリターンを使用し, その他は, 続けて入力すること.

3) 和文の句読点は「,」「.」にする.

4) 英文, 数字は, スペースも含め全て半角入力 (英文入力) すること.

カンマ (,), ピリオド (.), コロン (:) も含みます. ただし, (,), (.), (:) の前にスペースは入れない.

5) 日本語に英文が混ざる場合には, 日本語と英文との間に半角スペースを入れないこと.

6) 表と図の説明は, ファイルの最後にまとめて入力すること.

7) 入力内容の出力について

(1) 原稿は必ず完全な形に整え, A4判の用紙にワードプロセッサで印字する.

(2) 原稿1頁の体裁は, 1行40文字×40行で文字の大きさは11ポイントを使用, 上下左右のマージン (余白)

は30mm程度開ける。表紙を1頁とし、頁番号を印字する。

8. 原稿の送付先

〒663-8558 西宮市池開町6-46

武庫川女子大学栄養科学研究所 栄養科学研究雑誌編集委員会（代表 福尾恵介）

TEL/FAX：0798-45-9922

平成25年3月末日

投 稿 承 諾 書

栄養科学研究雑誌編集委員長殿

下記論文を「栄養科学研究」に投稿いたします。本論文は、他誌にすでに掲載あるいは投稿中ではないこと、執筆者全員は論文の内容について責任を有していること、および掲載された原稿の著作権は武庫川女子大学に帰属すること、さらに論文は武庫川女子大学リポジトリに搭載し、インターネットを通して公開することに同意いたします。

発表論文題目：

総説 / 原著 / 症例報告 / トピックス / 短報・その他

全著者の自筆署名を列記してください。捺印は不要です。なお、共著者の分が書ききれない場合は、別紙に欄を適宜追加し、全員の署名を受けてください。

筆頭著者署名 (年 月 日)

※ 責任著者署名 (年 月 日)

共著者署名 (年 月 日)

共著者署名 (年 月 日)

共著者署名 (年 月 日)

共著者署名 (年 月 日)

共著者署名 (年 月 日)

共著者署名 (年 月 日)

共著者署名 (年 月 日)

共著者署名 (年 月 日)

※筆頭著者が大学院生の場合、論文責任者の教員の署名を受けて下さい。

栄養科学研究

(平成25年度)

編 集 武庫川女子大学栄養科学研究所

発行者 学校法人 武庫川学院

〒663-8558 兵庫県西宮市池開町 6 番46号

電 話 0798-47-1212 (代表)

発行日 平成26年 3 月

印 刷 大和出版印刷株式会社