

2015年3月19日

後期研究報告会

摂食回復支援食と通常食との組織学的・免疫組織学的検討

—食肉を中心に—

天使大学看護栄養学部

栄養学科

賀来 亨・山口敦子

背景

高齢化社会への取り組み

栄養サポートチーム（NST）の普及



病院食の担う役割がクローズアップ



咀嚼や嚥下障害の症例に対する食の見直しが必要



- 臨床の現場では減退した咀嚼、嚥下および消化管機能に適応し、かつ医学的なエビデンスに基づいた食品の研究開発が強く求められている。
- 食品生成および形成技術の進歩も目覚ましく、食材組織を分解する酵素を食材内部に導入させて、形状を損なうことなく食材自体を軟化させる技術が開発された。



あいーと®

高齢者社会

高齢化社会は、総人口に占めるおおむね65歳以上の老年人口が増大した社会のことで、

- **高齢化社会** は高齢化率7%～14%
- **高齢社会** は高齢化率14%～21%
- **超高齢社会** 高齢化率21%以上
国連の報告書では定義されている。

65歳以上の高齢者人口は、過去最高の3,079万人(2012年、平成24年)(前年2,975万人)となり、総人口に占める割合(高齢化率)も**24.1%**(前年、23.3%)となった(**超高齢社会**)。
平成24年総人口1億2,752万人
「65～74歳人口:1,560万人」:総人口に占める割合は12.2%
「75歳以上人口:1,519万人」:総人口に占める割合は11.9%である

日本の高齢化の現状と将来像

わが国の65歳以上の高齢者人口は、**昭和25(1950)年には総人口の5%に満たなかったが、昭和45(1970)年に7%を超えさらに、平成6(1994)年にはその倍化水準である14%を超えた**(「**高齢社会**」と称された)。

高齢化率は上昇を続け、現在、**超高齢社会である24.1%(平成24年度)**に達している。

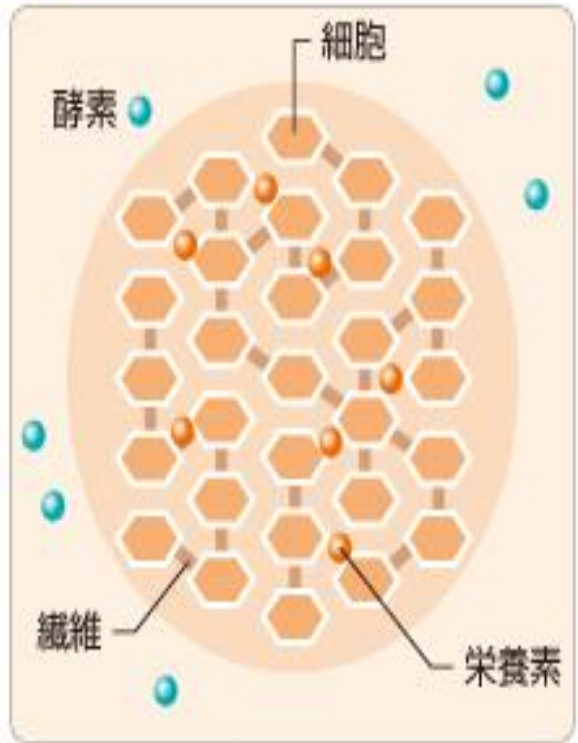
- **将来推計人口でみる50年後の日本は、9,000万人を割り込む総人口2.5人に1人が65歳以上、4人に1人が75歳以上に現役世代1.3人で1人の高齢者を支える社会**がくることが予想されている。
- 現実には**高齢社会が進むにつれて要介護高齢者の数は増加し、1993年に約200万人だったその数は2025年には約530万人に増加すると推計されています。**

食材自体を軟化させる技術

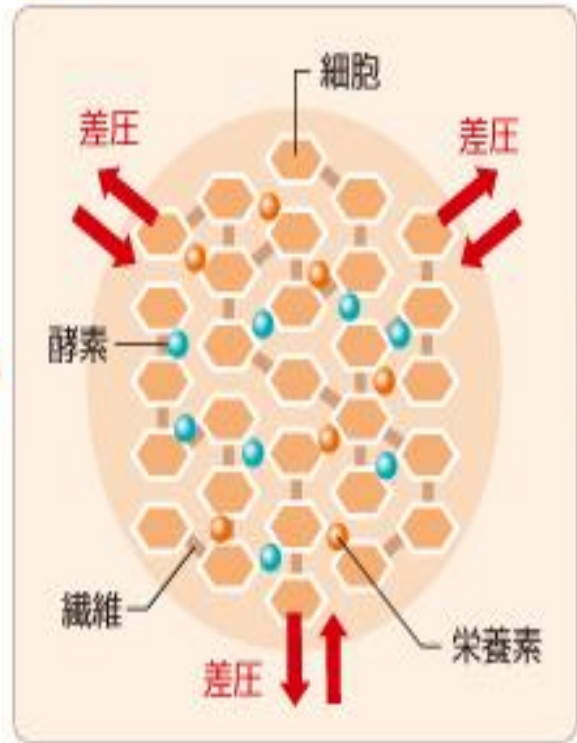
- 特定の組織分解酵素を選択して食材の骨格を形成する成分
- 植物食材では細胞壁接着物質のペクチン質
- 動物食材では**筋原線維蛋白質**を効率的に分解する。
- それによって従来の調理技術では成し得なかった外見は全く崩すことなく理想的な軟らかさを有する食材の開発が可能となり、咀嚼や嚥下機能が低下した高齢者や消化管術後の患者に適した食事への応用。

摂食回復支援食（あいーと）の原理

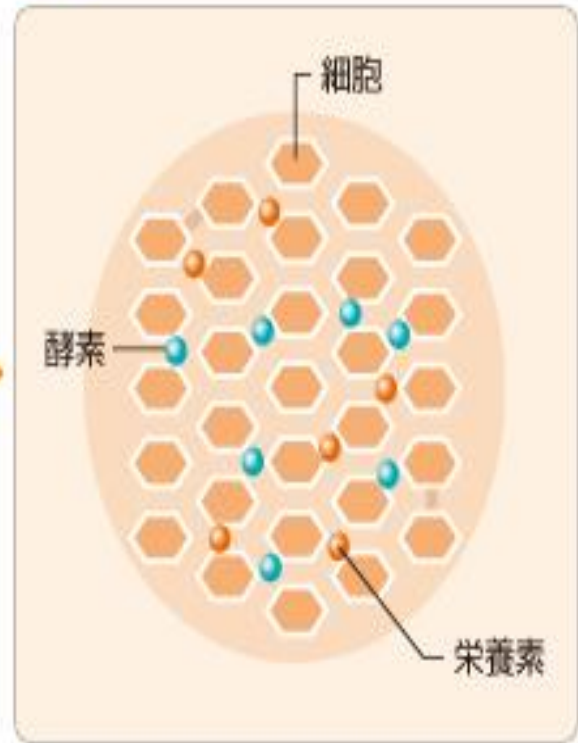
1 食材断面の模式図です。



2 圧力を変えて、酵素を食材に浸透させます。



3 酵素が均等に浸透し、繊維を分解します。



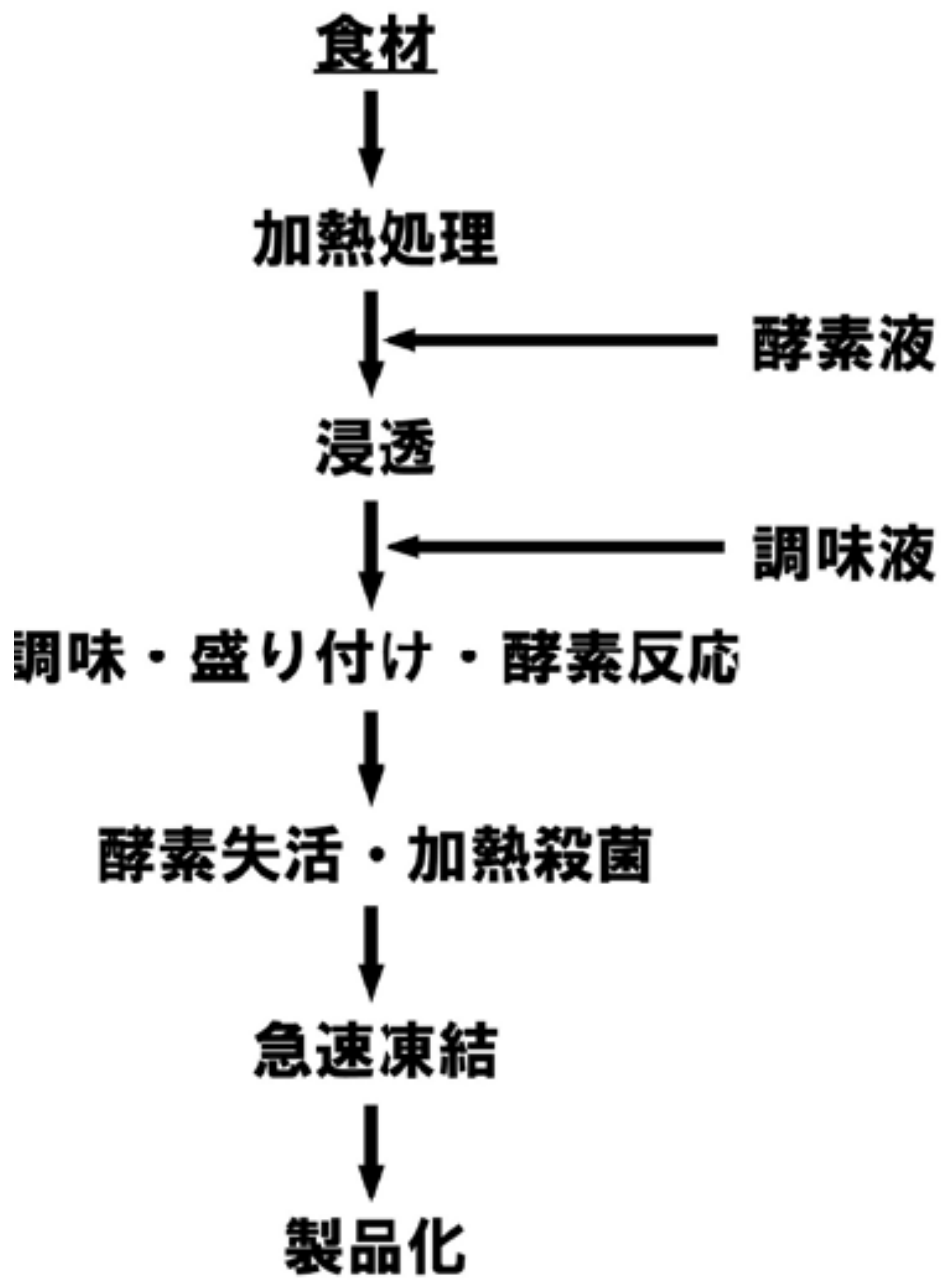
動物性食材では、

食材の構造によって酵素液を浸透させるか、あるいは注入器(インジェクター)を用いてプロテアーゼなどの酵素液を食材内部に均質に浸透せる方法を用いた。

適切な大きさに切り分け低温下で反応させ、さらに酵素の失活および殺菌を目的に加熱する。

容器内で調味、盛り付けを行い、シールにより密閉した後、再度殺菌を目的に加熱する。製品は凍結し、冷凍食品として保存する。

肉類、魚介類に野菜が添えられる場合には、肉類、魚介類の酵素処理が終了した後、加熱殺菌および凍結処理を経て製造している。



東口高志: 保形軟化食品“あいと®”の開発とその物性評価ならびに人工消化液浸漬試験による崩壊性と消化性の検討. 静脈経腸栄養26:965-976,2011

。常食の豚肉と鯖の蛋白質では、**ミオシン重鎖**に相当する分子量が約**230,000の蛋白**や**アクチン**に相当する分子量約**42,000**などの蛋白質のバンドが多く検出されたが、“あいと®”では、分子量42,000のバンドをはじめとして分子100,000以上のバンドが著しく減少し、逆に分子量の小さい**10,000以下のバンドが増加**していた。

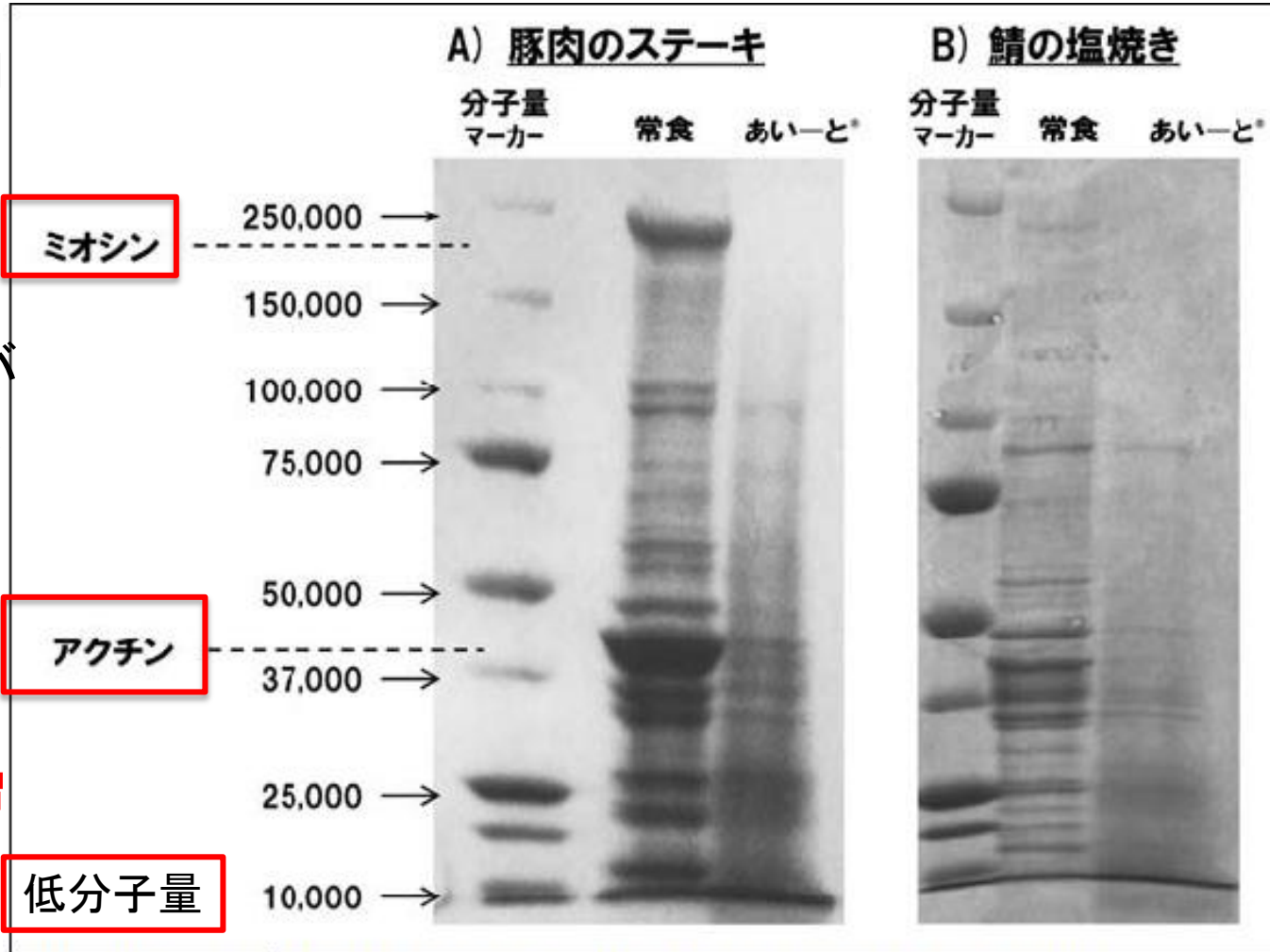


図4. “あいと®”豚肉と鯖のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン
電気泳動には2-15%アクリルアミド濃度のグラジエントゲルを用いた。サンプルはホモジナイズした250µgを分析した。対照として常食の豚肉と鯖を用いた。

背景

1. 高齢化社会への取り組み

栄養サポートチーム (NST) の普及



病院食の担う役割がクローズアップ



咀嚼や嚥下障害の症例に対する食の見直しが必要

・摂食回復支援食(以下**支援食**)

酵素均浸法を用い、一般の食事と変わらない外観と風味、咀嚼や嚥下障害患者の経口摂取に適した形状

2. 圧力処理(圧力鍋)

高温や高圧により、野菜類ならば細胞壁が早く破壊され、**肉類**なら**タンパク質**や**繊維**が**早く分解**され、短時間で調理することが可能となると言われている。

目的

1. これまでに報告されている支援食の食肉の組成成分の分析結果に基づいて、特に食肉の硬さに関係すると思われる成分について組織学的、免疫組織学的、超微構造的に検討すること
2. 圧力鍋により処理された食材(食肉)の組織学的・免疫組織学的検討を行った。

実験1

摂食回復支援食(あいーと[®])と通常食との
組織学的、免疫組織化学的検討

実験2

1. 圧力鍋、鍋(通常)
2. 人工消化液

人工胃液、pH. 1.2+0.4% 濃度(ペプシン)

(人工腸液、pH.6.8+1%パンクレオザイミン)

材料および方法

実験1

材料:

1. 支援食(豚の角煮/大塚製薬:あいーと[®])

2. 食肉(豚肉)

組織固定

10%中性ホルマリン液(武藤化学)

方法:

1. 光学顕微鏡による組織学的検討

2. 免疫組織化学的検討(膠原線維、筋線維など)

3. 透過型電子顕微鏡による検討

固定液:2.5%グルタルアルデヒド



摂食回復支援食（あいーと®）とは

- 食材ごとに最適な酵素を選び、圧力を変えながら注入する**酵素均浸法**という、独自技術を用いている。
- 形が崩れないギリギリの柔らかさで食感も残している
- 食材の細胞の損傷が少ないので、食材本来の栄養素、風味、色調が保たれている。

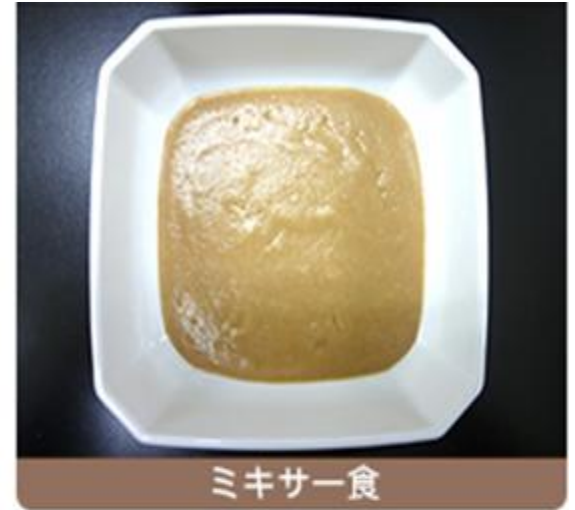
さわらの華風焼き



ホタテと野菜のあんかけ



すき焼き風寄せ煮



ミキサー食と摂食回復支援食の比較

。摂食回復支援食は通常の食事と見た目が変わらないので自然な感覚で食事ができる。

肉



れんこん



鮭



、あいーとは通常の食事と比べるとおよそ1/100～1/1000の硬さに調整

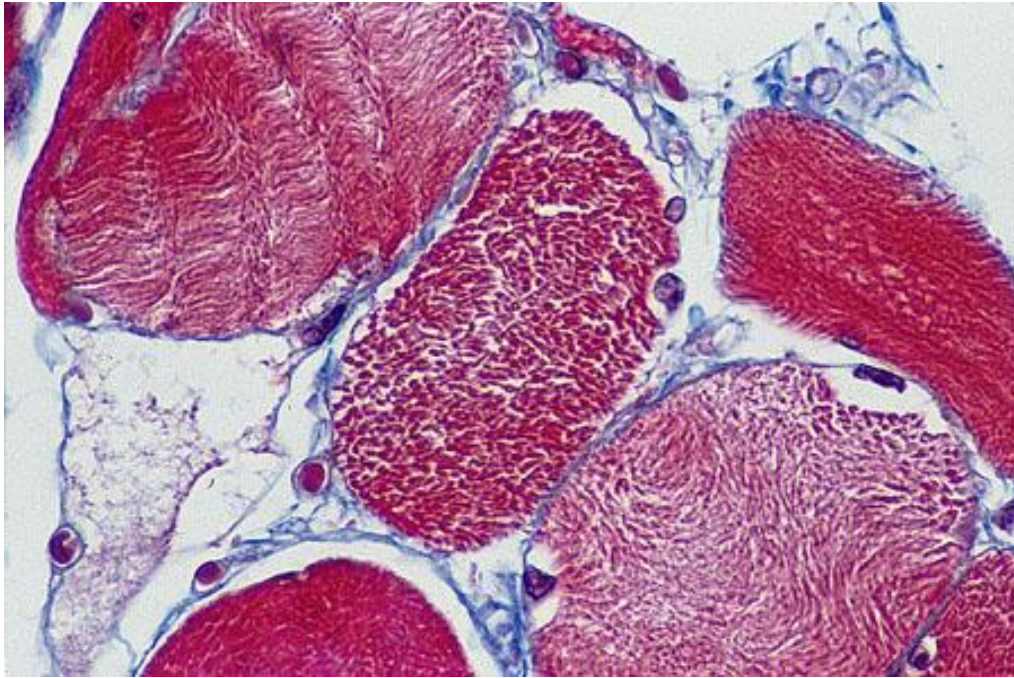
表 1-3 一般的な特殊染色

目 的		染 色 法	染色結果
細胞 間 線 維	膠原線維	ワンギーソン染色	膠原線維—青，筋線維—赤， 細胞内酸性物質—赤， 中性物質—紫，塩基性物質—青
		マッソン・トリクローム染色	膠原線維—緑（青）， 筋線維—赤褐（ゴールドナー変法）
	細網線維	パップの鍍銀法	細網線維—黒，膠原線維—褐紫
		PAM 染色	基底膜—黒，膠原線維—褐
弾性線維	ワイゲルト法	弾性線維—黒紫	
神経系線維	神経線維	ボデアン法	軸索，原線維—黒
		ホームズ法	軸索—黒
	膠線維	リタングステン酸ヘマトキシリン（PTAH）染色	膠線維—青，核，線維素—深青
多 糖 類	多糖類	PAS 染色	多糖類—深赤紫，膠原線維—桃
	糖原	ベストのカルミン染色	糖原—赤
	粘 液	マイヤーのムチカルミン染色 アルシアン青（ブルー）染色	上皮性粘液—赤， 結合組織性粘液—不染または弱赤染 酸性粘液多糖類—青
蛋 白 質	核 酸	フォイルゲン反応	DNA—赤紫
		メチルグリーン・ピロニン染色	DNA—緑，RNA—赤
	アミロイド	コンゴーレッド染色	アミロイド—淡朱
	線維素	ワイゲルト法	線維素—青紫

組織学的検討

1. 一般染色：組織像の概要を全体的に把握する染色
ヘマトキシリン・エオジン染色
2. 特殊染色：特定の組織成分だけを選択的に染色
マッソン・トリクローム染色あるいはAzan染色
鍍銀染色, elastica van Gieson染色

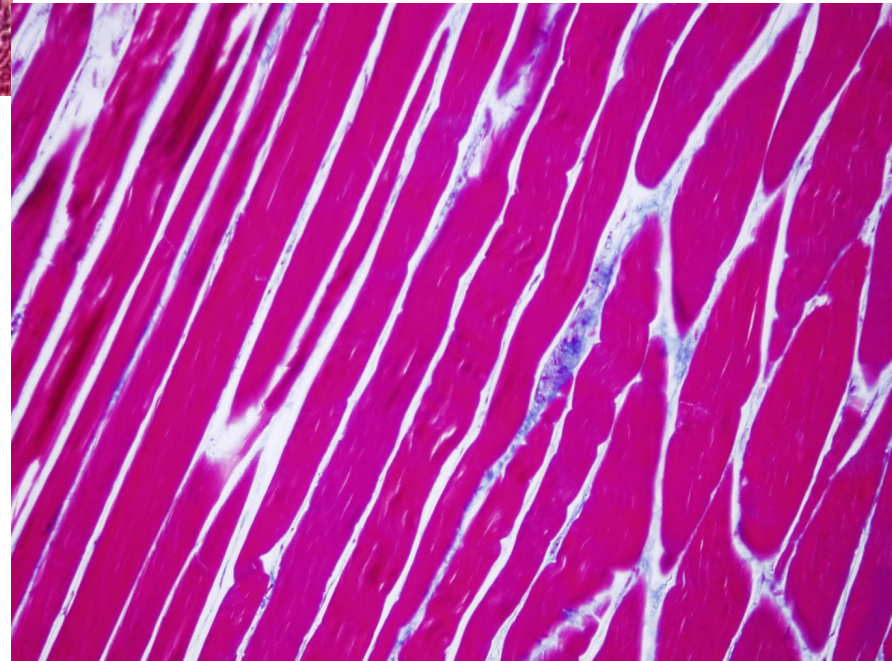
マッソントリクローム染色 Masson trichrome stain (MT)



染色結果

- 筋肉：赤色
- 膠原線維・細網線維：青色

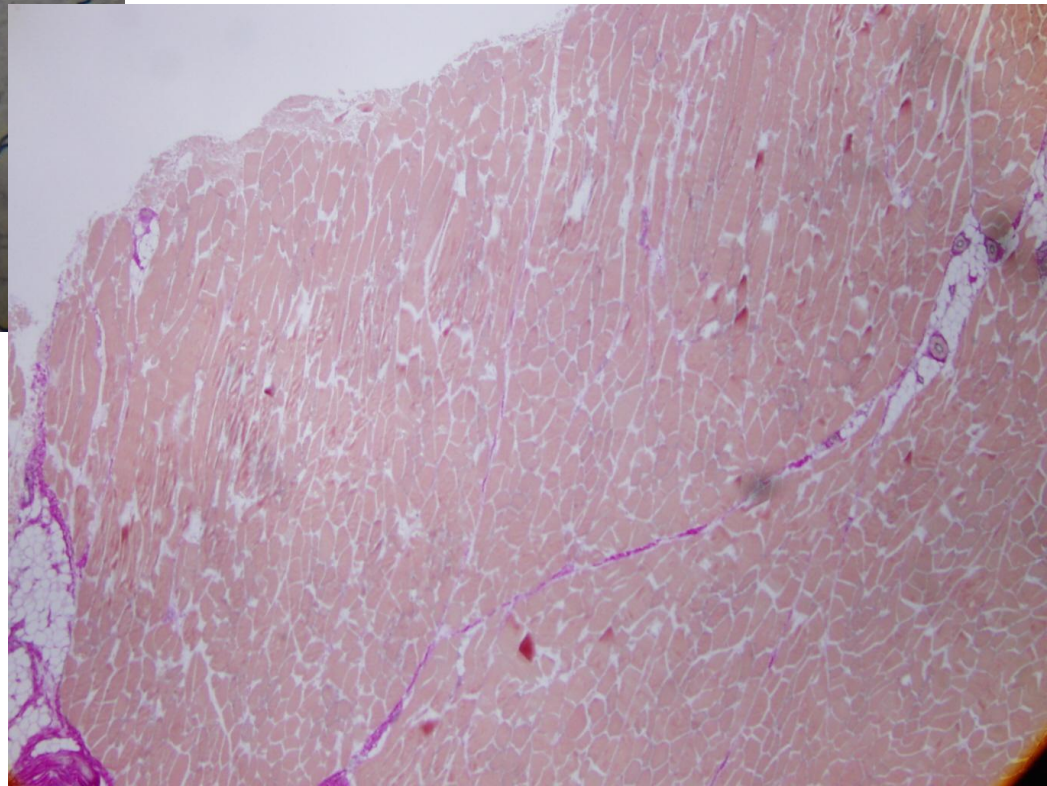
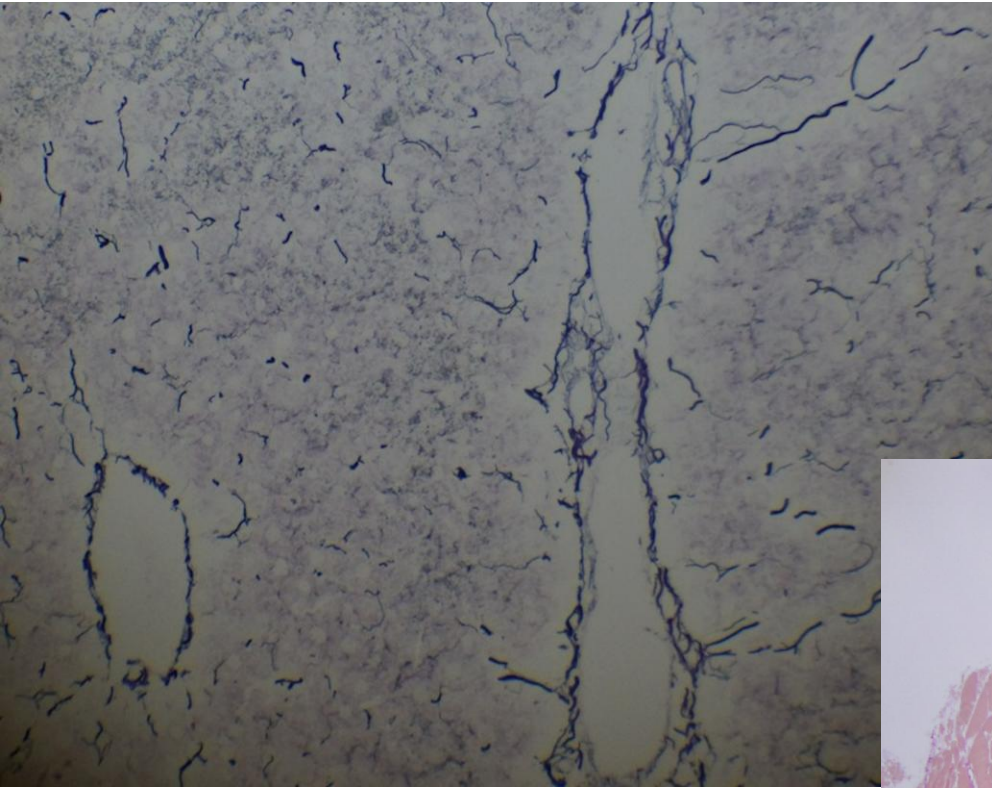
Azan染色



鍍銀染色(肝組織)

染色結果

細網線維：黑色



Elastica van Gieson染色

膠原線維：赤

彈性線維：黑

免疫組織化学染色

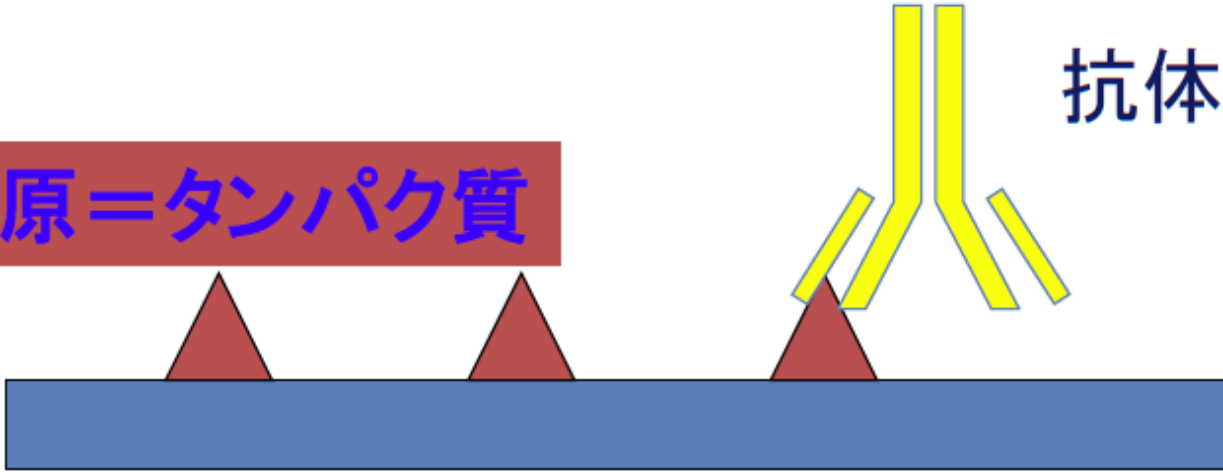
- ① 蛍光抗体法
- ② 酵素抗体法
- ③ 金属標識抗体法 (免疫電顕)

パラフィン切片を対象とする場合は②の酵素抗体法が用いられ、**間接法**が主流となる。

- 今回用いた抗体
 - デスミン
 - 横紋筋アクチン
 - α SMA (平滑筋アクチン、smooth muscle actin)

抗原＝タンパク質

抗体＝抗原とくっつく



免疫組織化学染色

組織標本の中にある、或る“タンパク質”の場所を目で見えるようにするための方法

目的とするタンパク質(抗原)にだけくっつく事ができる物質(抗体)を使う。

蛍光抗体法

蛍光抗体法<<酵素抗体法

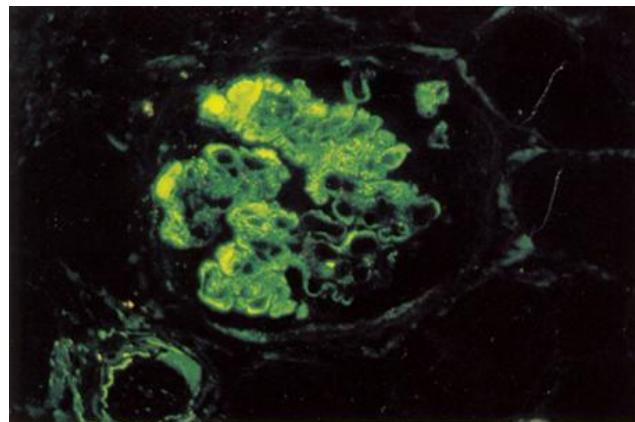


図5 腎糸球体に沈着したIgM免疫複合体

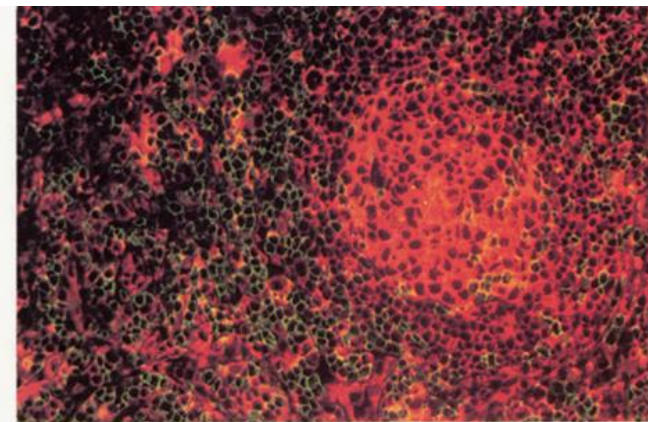
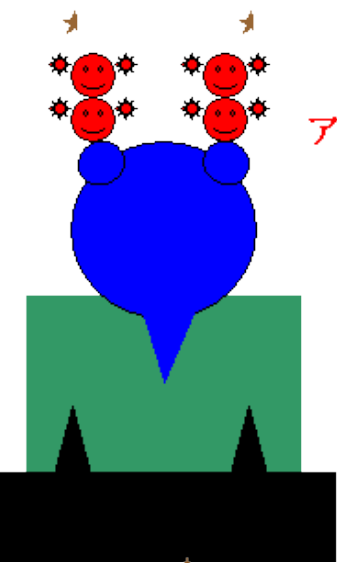
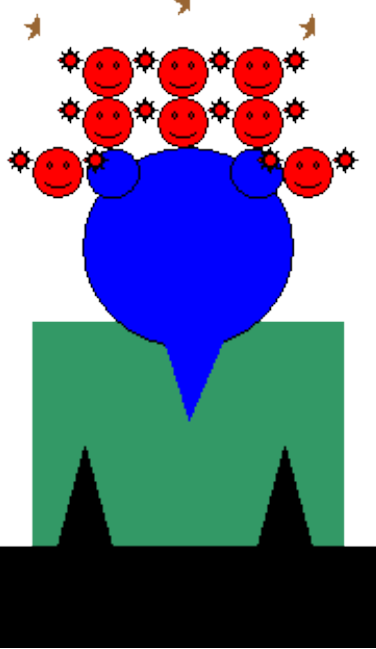


図6 リンパ節の抗HLA-DRモノクローナル抗体(PE標識)と抗CD4モノクローナル抗体(FITC標識)のdouble staining

ABC法 (Avidin-biotinylated peroxidase complex)



DAB 発色
+
アビジンとビオチン化酵素の複合体
+
ビオチン化2次抗体
+
1次抗体
+
抗原



LSAB法(Labeled streptavidin biotinylated antibody)
DAB発色
+
酵素標識スチレプトアビジン
+
ビオチン化2次抗体
+
1次抗体
+
抗原

原理

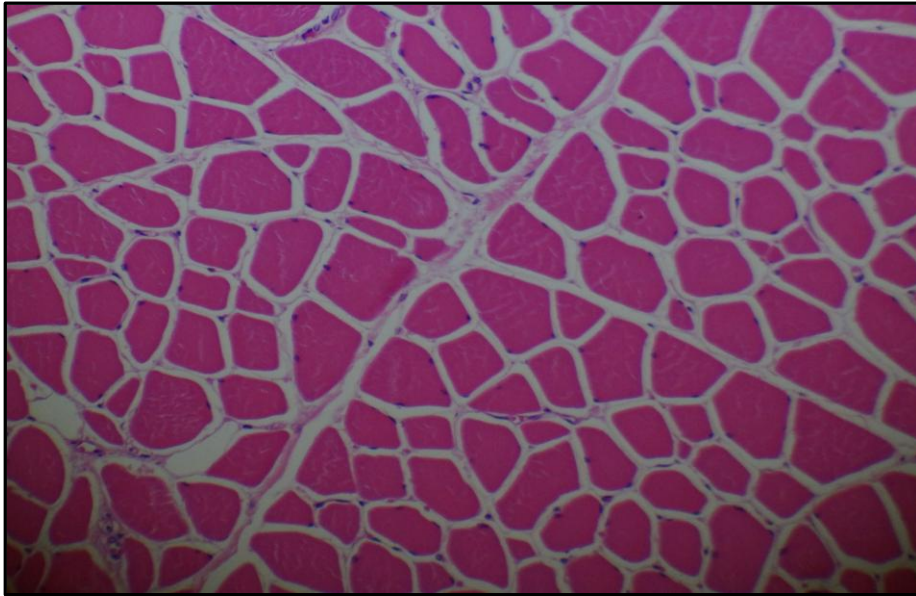
- 1) 抗原に抗体(一次抗体)がくっつく
 - 2) 一次抗体の特異的二次抗体を適用する。
 - ・二次抗体が蛍光標識されていれば、蛍光でひっかっている場所に抗原が存在(蛍光抗体法)
 - ・二次抗体に酵素が付いていれば、基質で様々な色に発色(酵素抗体法)
- ①酵素と基質の組み合わせを変えれば、見たいものを何色にすることもできる。
 Peroxidase ⇒ DABで茶色 AECで赤色 アセトニトリルで黒青色 など、Alkaline Phosphatase ⇒ Fast Redで赤色 Fast blueで青色 など



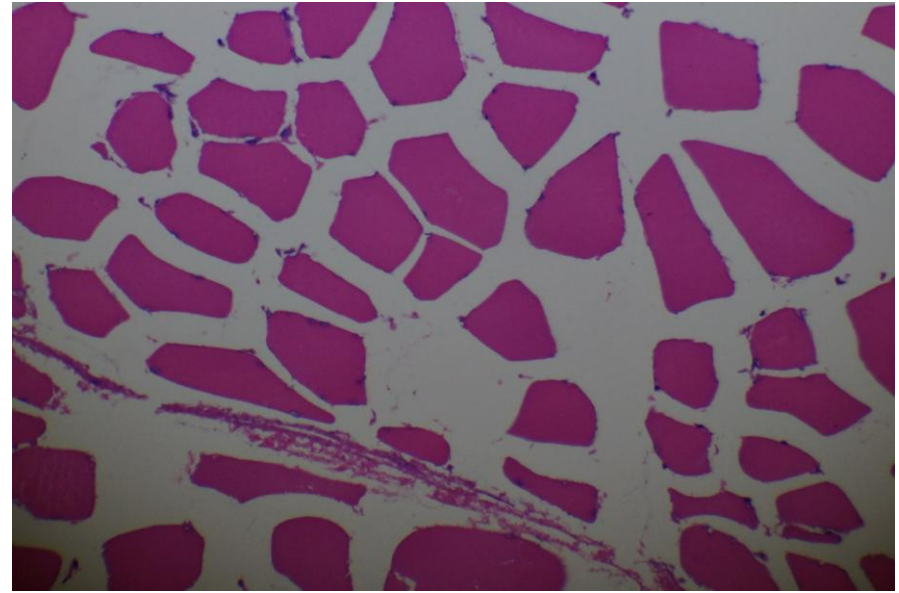
★★★★★★
★★★★★★
標識酵素ポリマー法
DAB発色
+
高分子ポリマー2次抗体
+
1次抗体
+
抗原

組織学的検討

ヘマトキシリン・エオジン染色



生肉

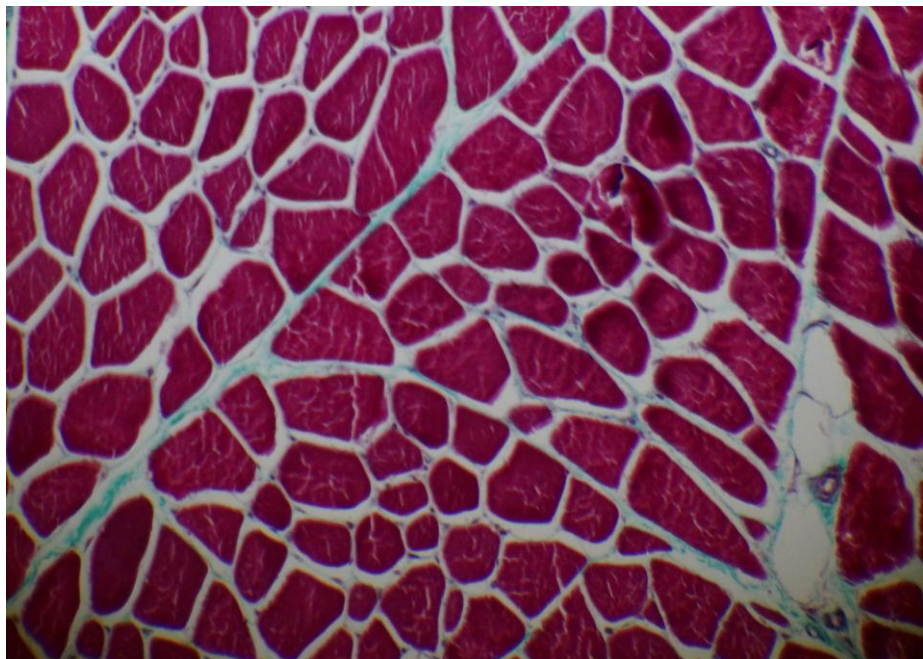


支援食

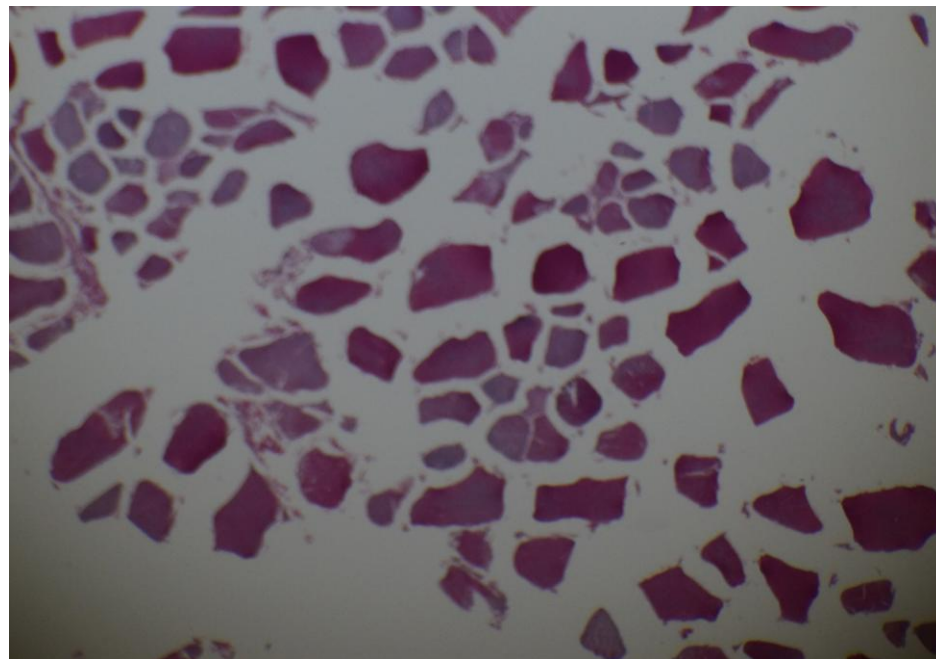
- 筋線維間の結合組織の消失を認める。
- 細胞質が均質性に染色され、筋線維の横紋様構造の消失を認める。

マッソン・トリクローム染色

トリクローム染色



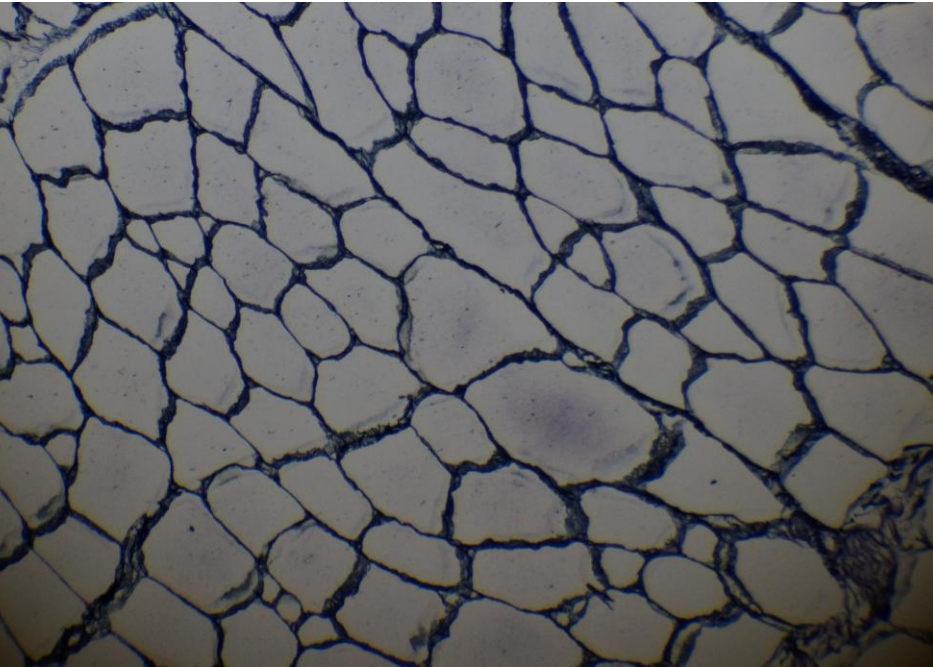
生肉



支援食

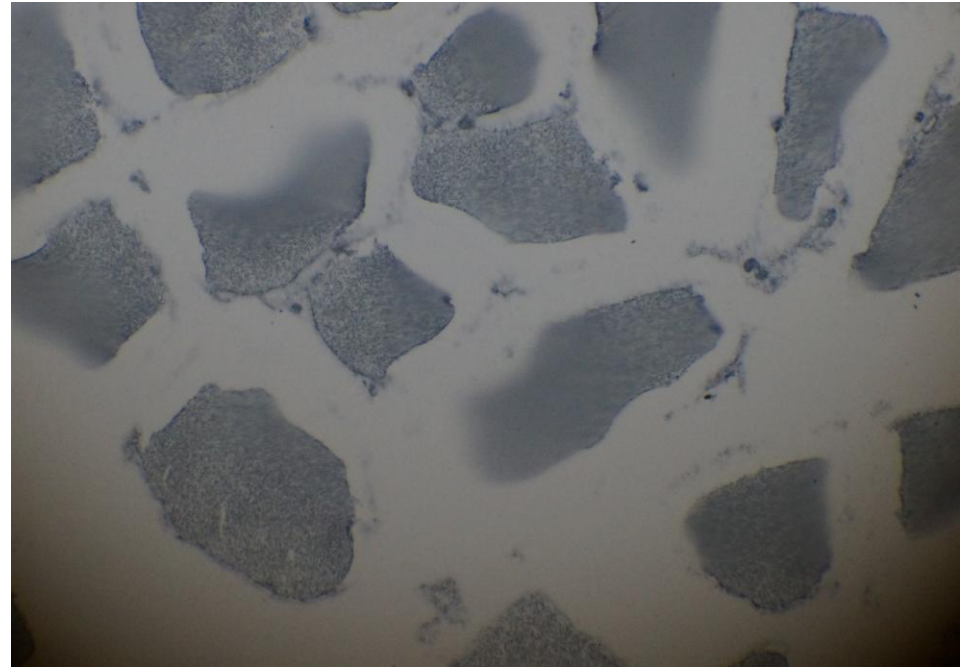
- 筋線維間の線維性組織の消失
- 筋線維の染色性の低下(赤色)

鍍銀染色



生肉

筋束周囲を細網線維が取り巻いている。



支援食

筋線維間の線維性組織の消失

免疫組織化学的検討

酵素抗体法（標識酵素ポリマー法）：

組織標本の中にあるたんぱく質の場所を目で見えるようにするための方法。目的とするたんぱく質（抗原）にだけくっつくことができる物質（抗体）を使う。

今回用いた抗体

① **デスミン**

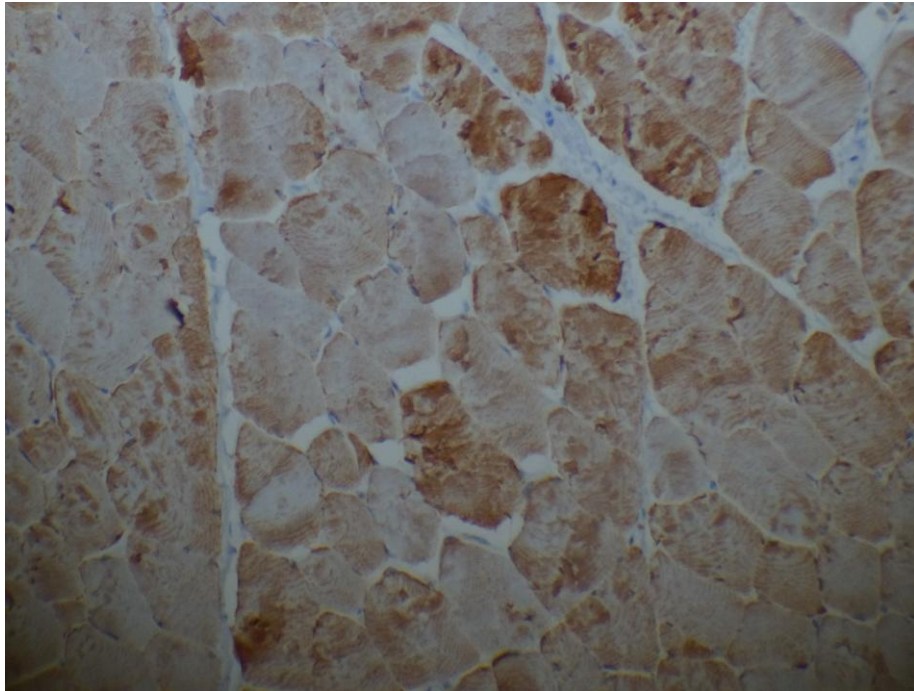
② **横紋筋アクチン**

③ α SMA（平滑筋アクチン、smooth muscle actin）

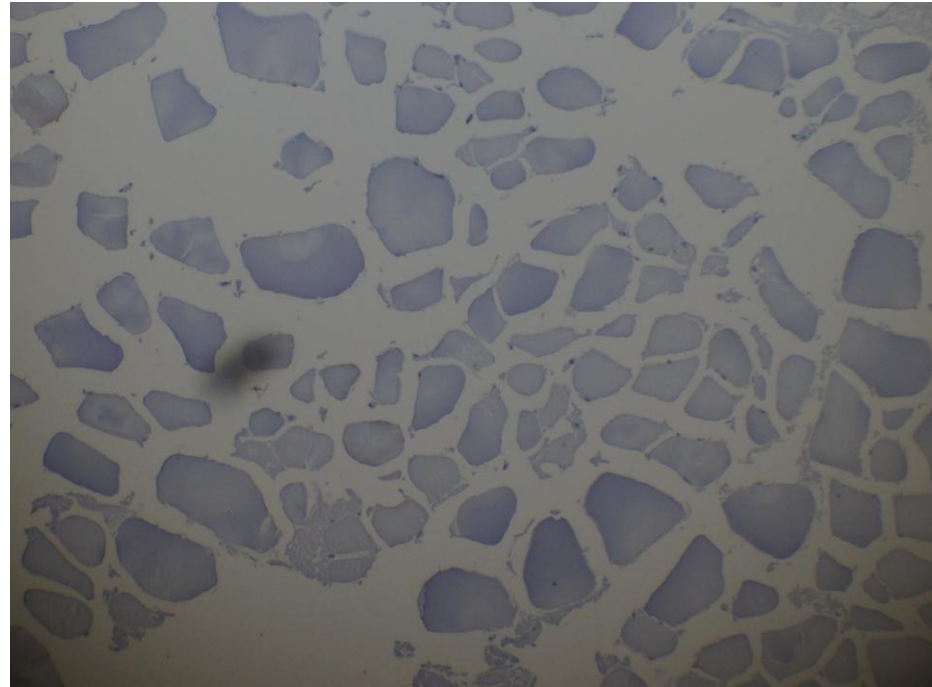
④ **vimentin**

⑤ **myosin**

免疫組織化学染色 デスミン



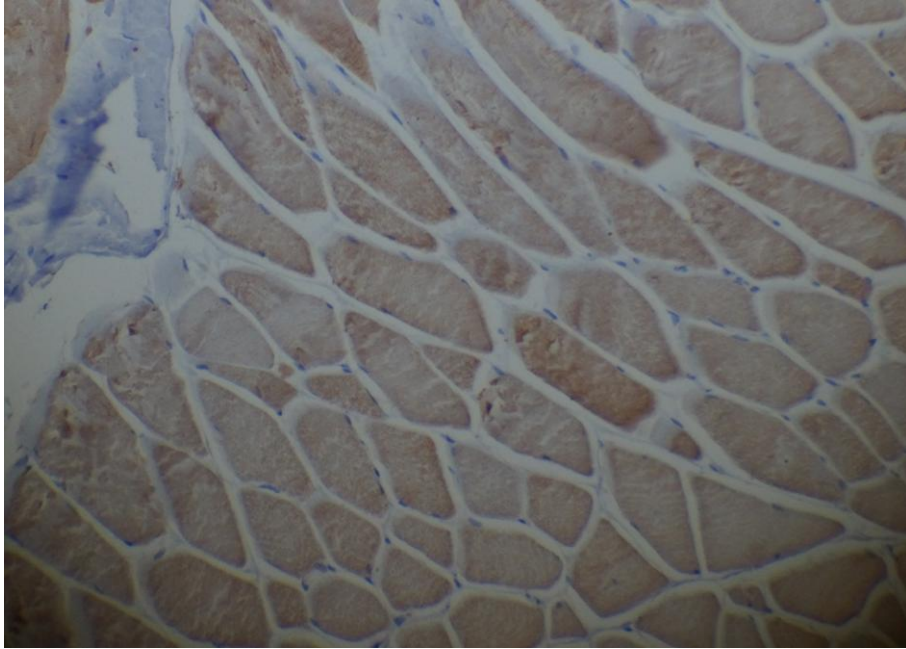
生肉



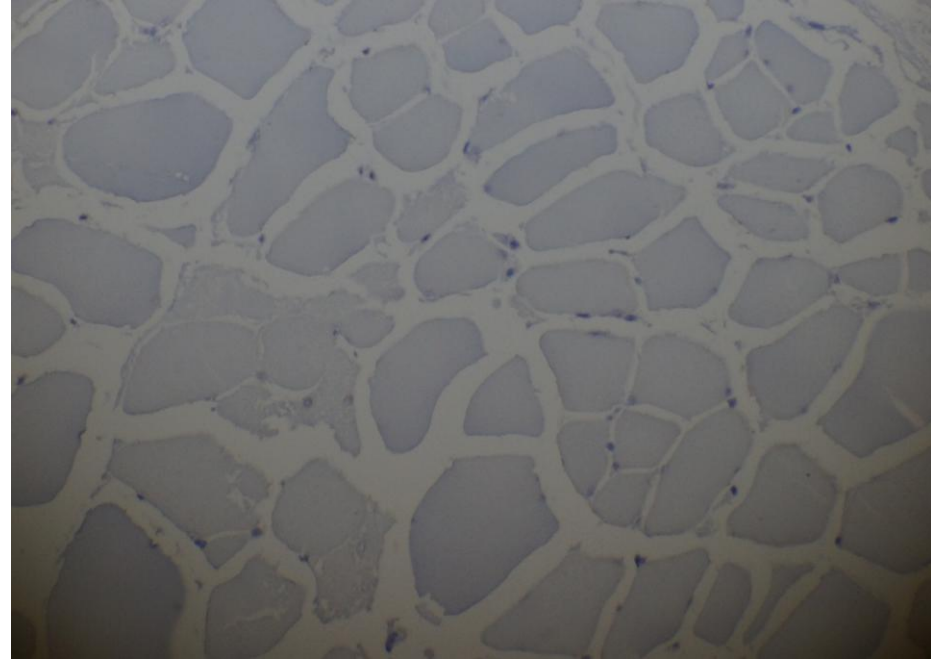
支援食

- 支援食が染色されていない。

横紋筋アクチン



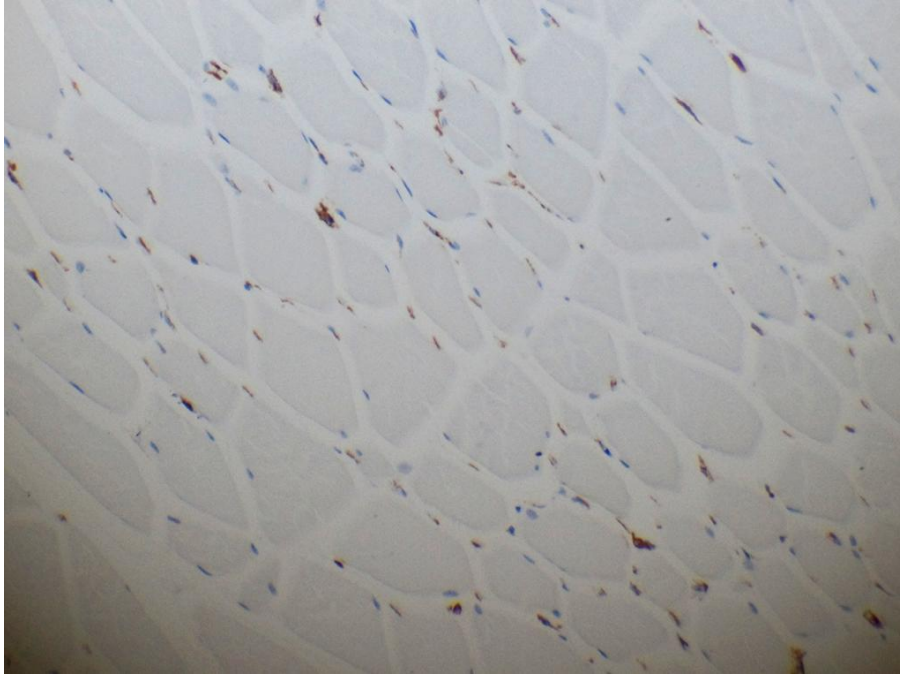
生肉



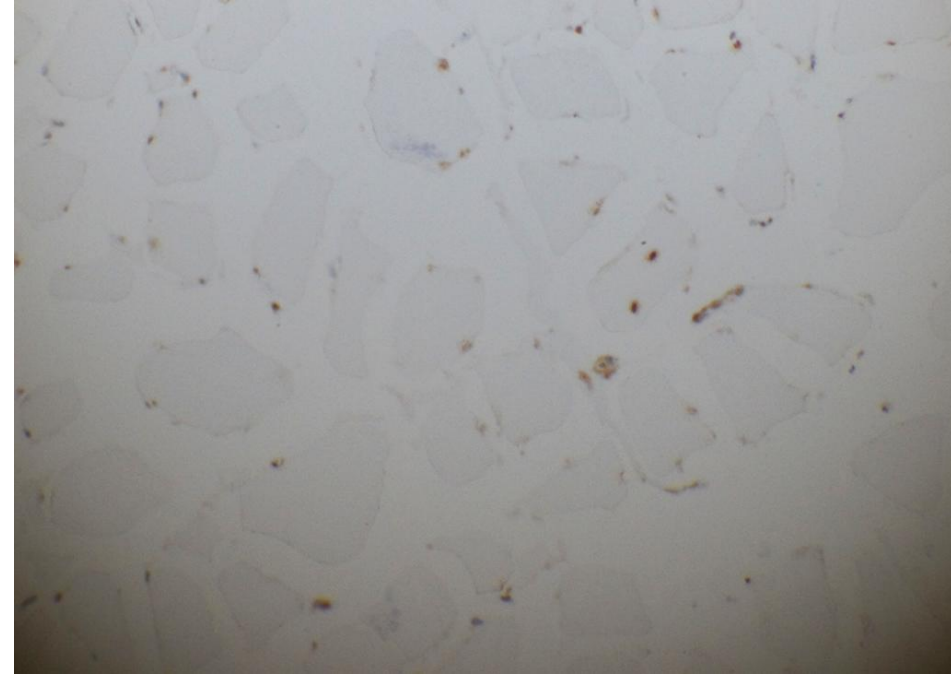
支援食

- ・支援食が染色されていない

平滑筋アクチン 毛細血管壁(平滑筋)



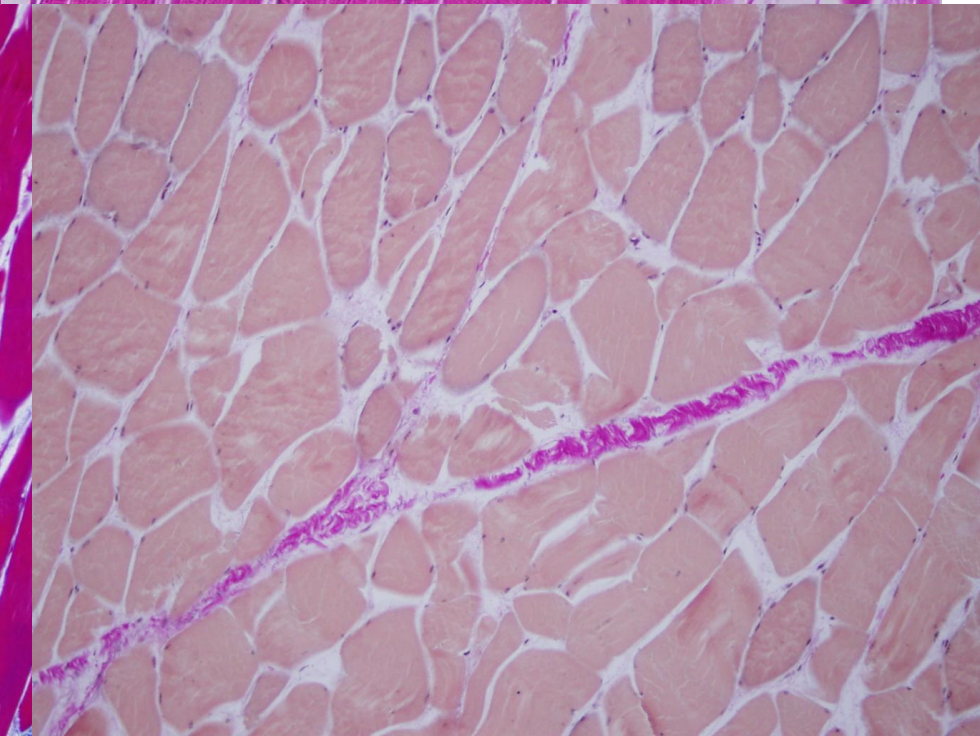
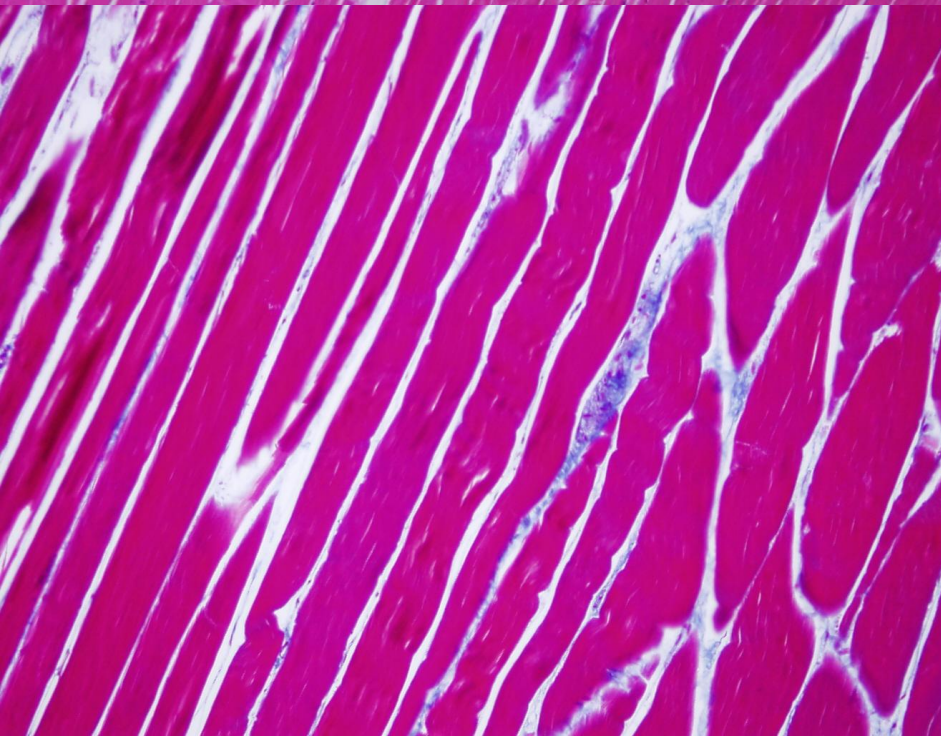
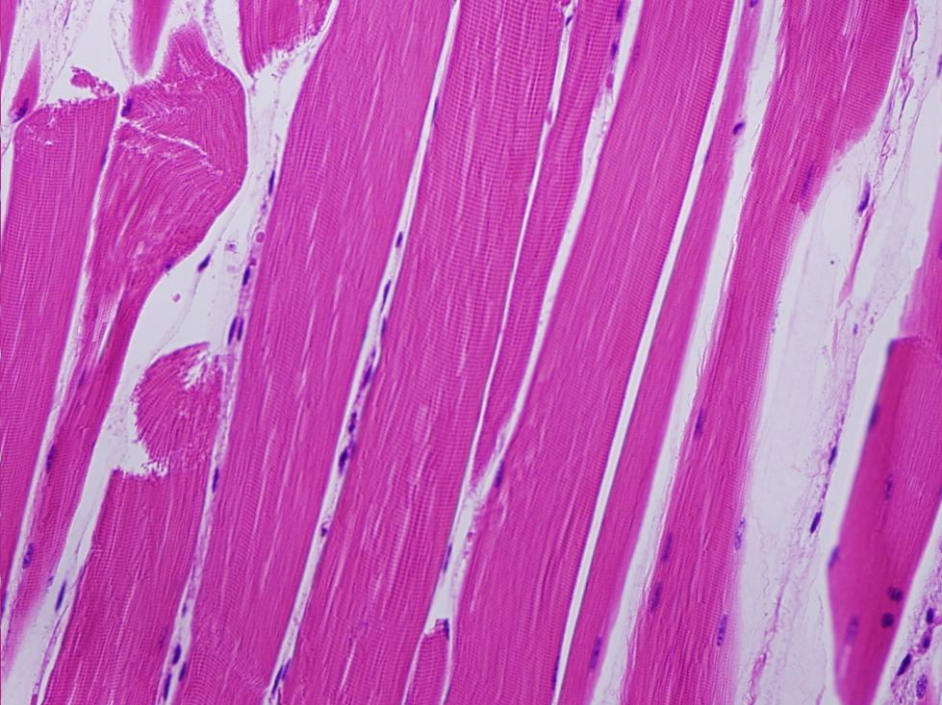
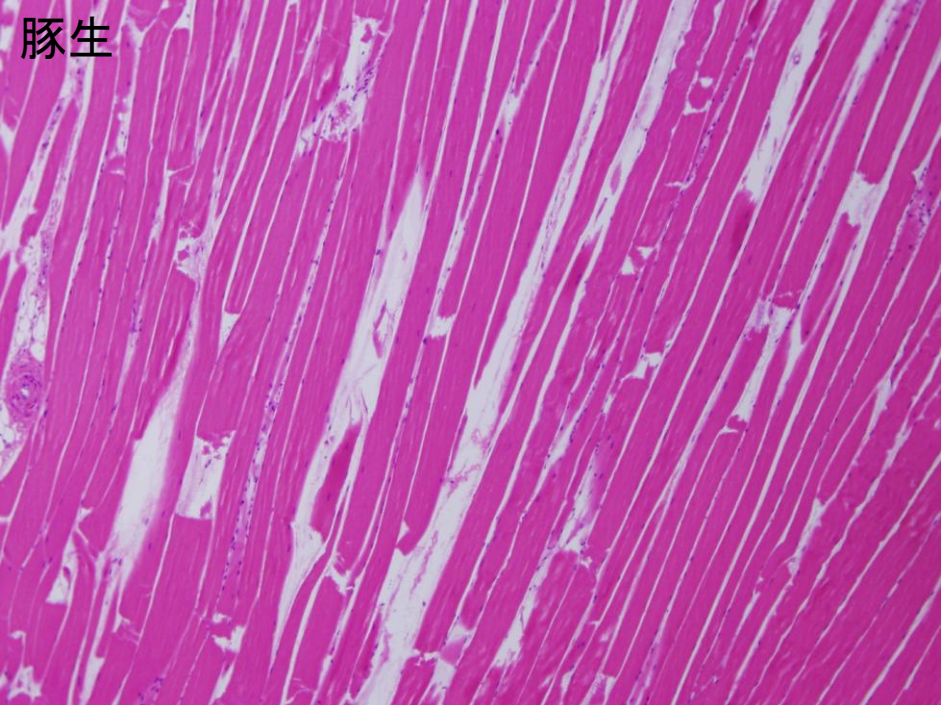
生肉



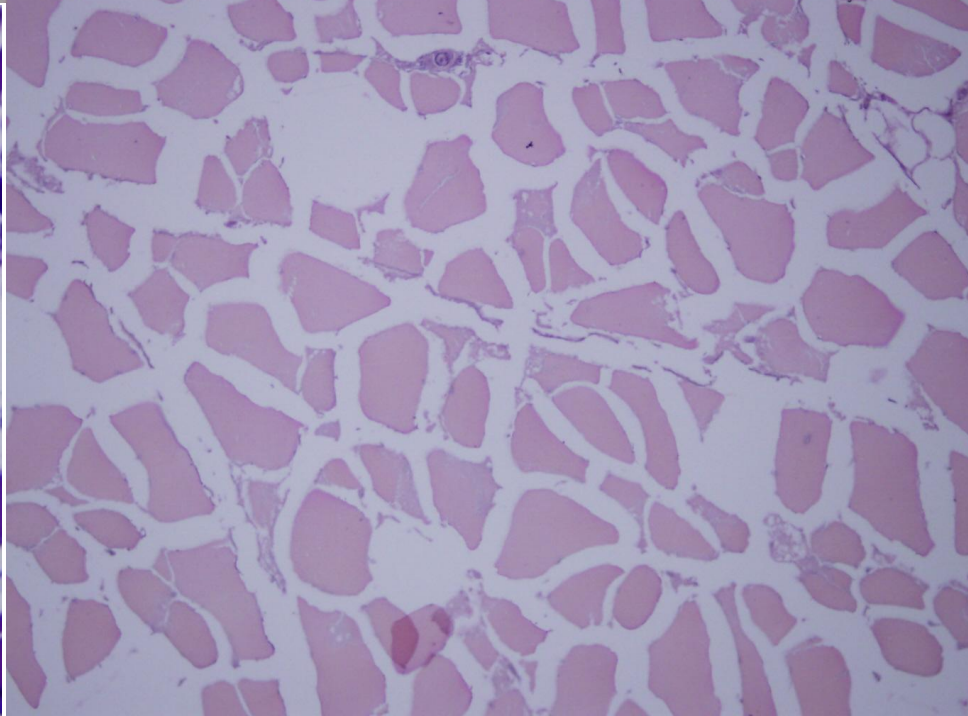
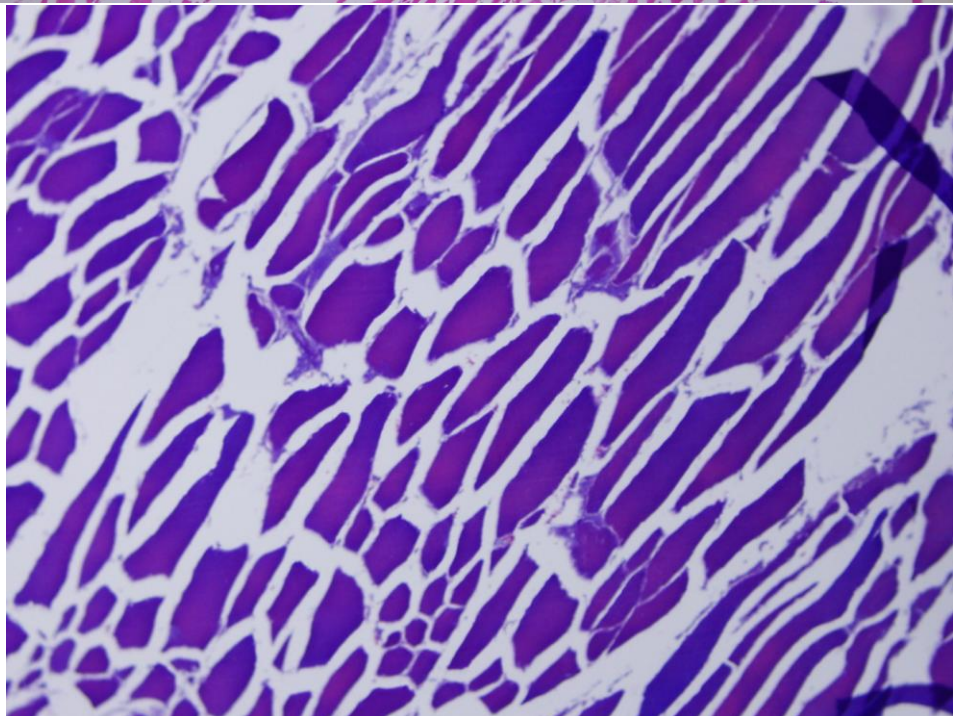
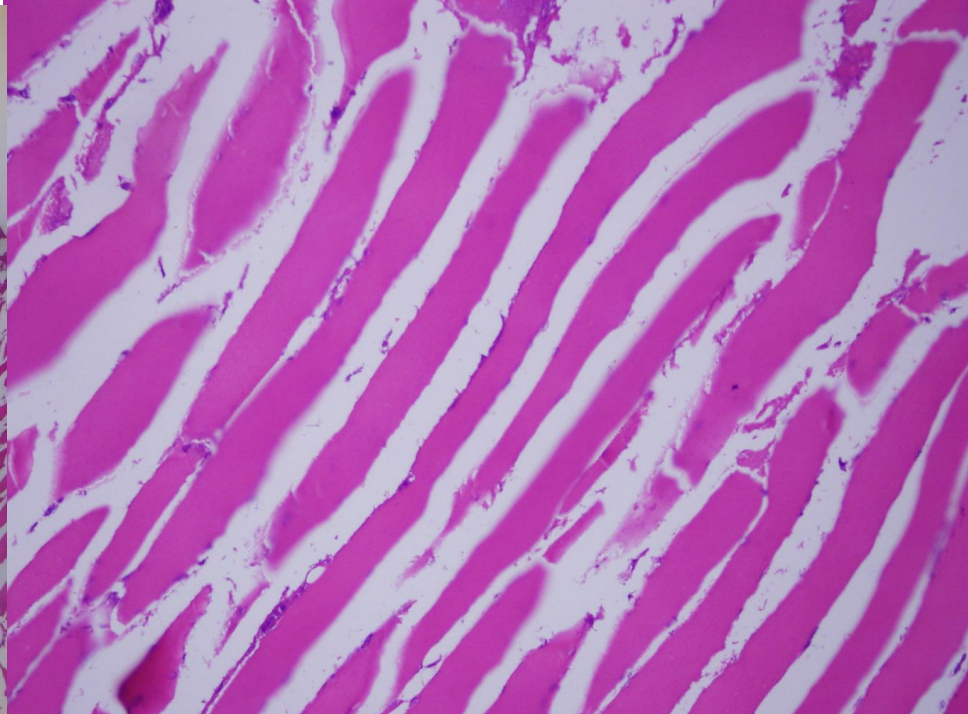
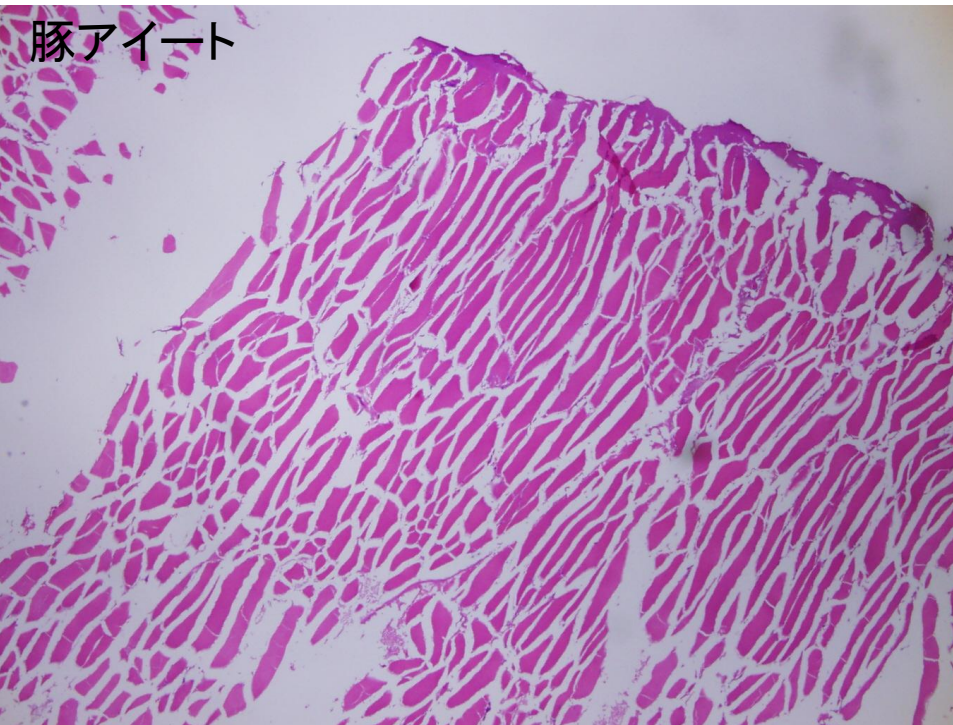
支援食

- ・横紋筋は染色されていない。
- ・毛細血管壁が染色されている。支援食では染色性が弱くなっている。

豚生

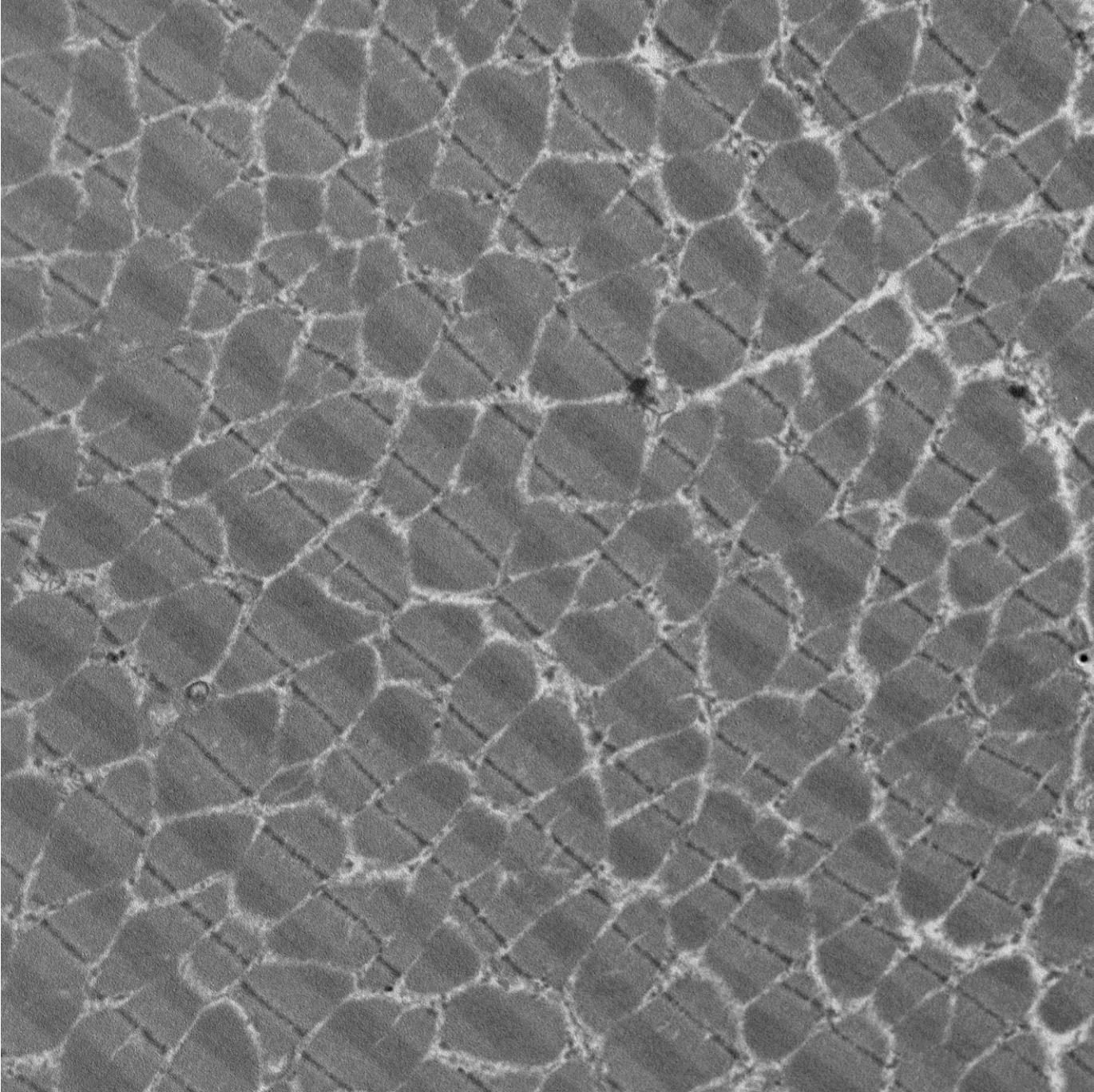


豚アイト



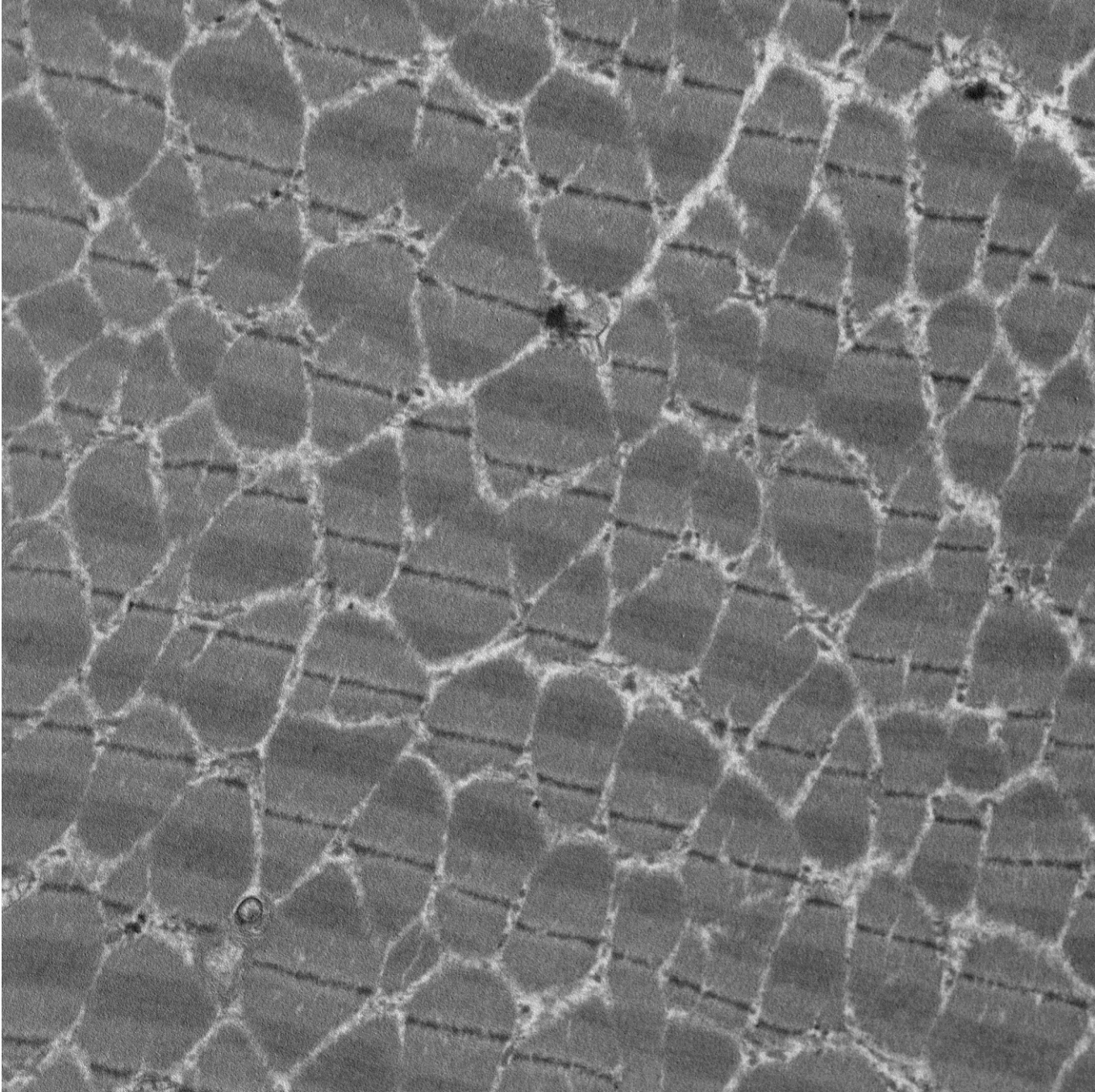
透過型電子顯微鏡

豚生肉



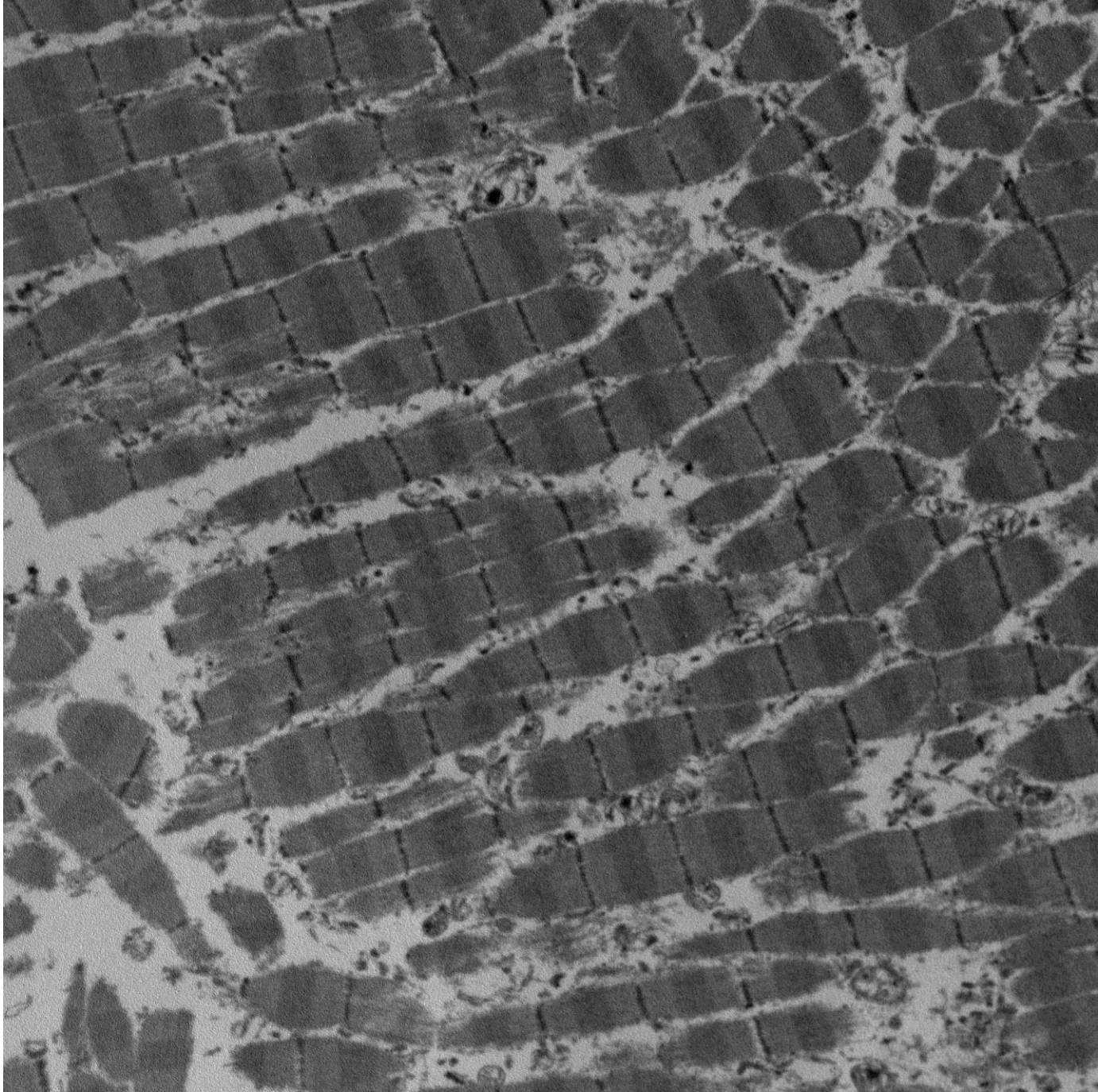
Mic	HV	Mag	Date	1383-1
JEM-1400	80 kV	8000 x	15/03/10, 14:40	-2 μm-

豚生肉



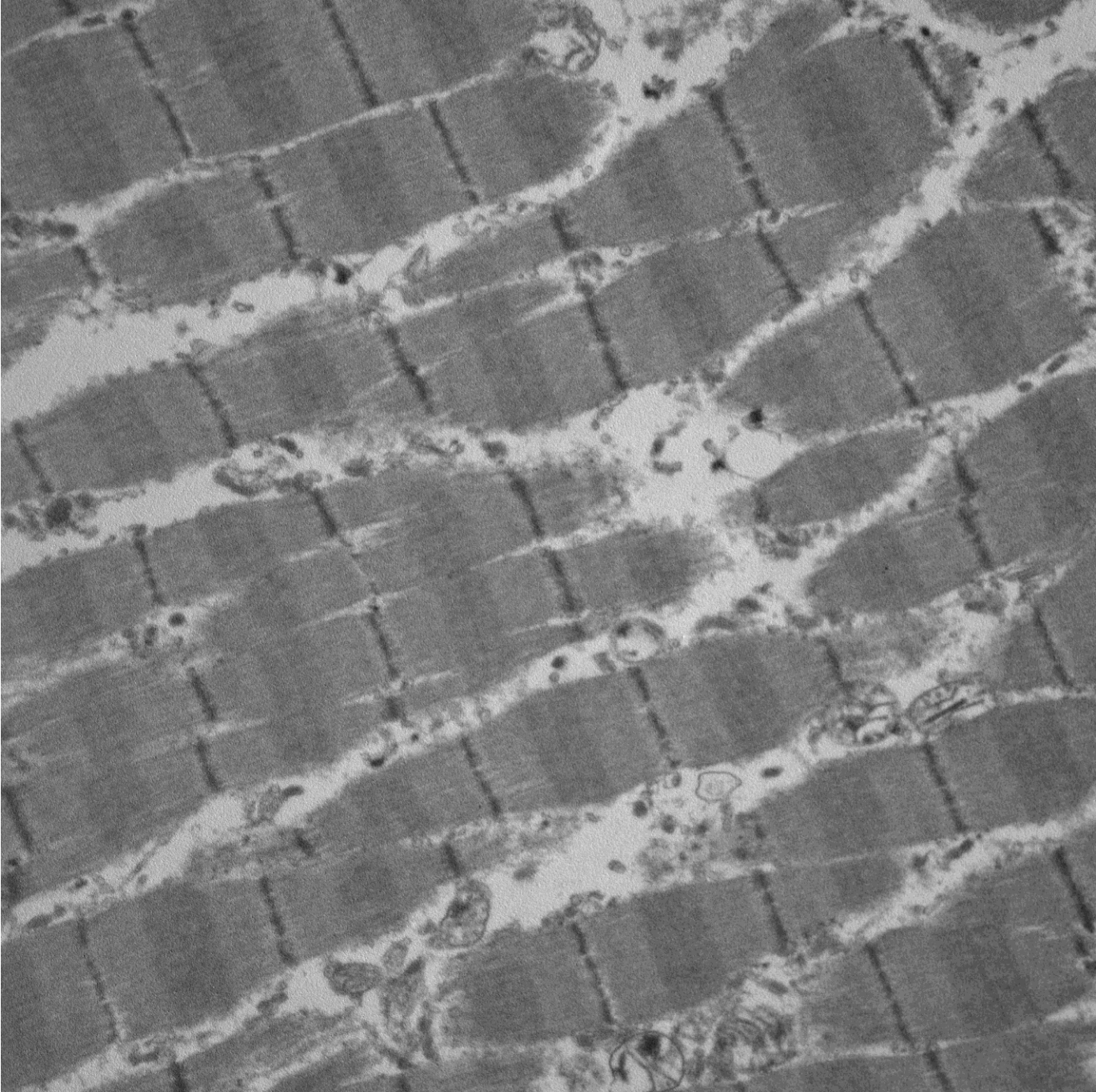
Mic	HV	Mag	Date	1383-1
JEM-1400	80 kV	10000 x	15/03/10, 14:41	—2 μm—

豚生肉



Mic	HV	Mag	Date	1383-1
JEM-1400	80 kV	8000 x	15/03/10 14:43	—2 μm—

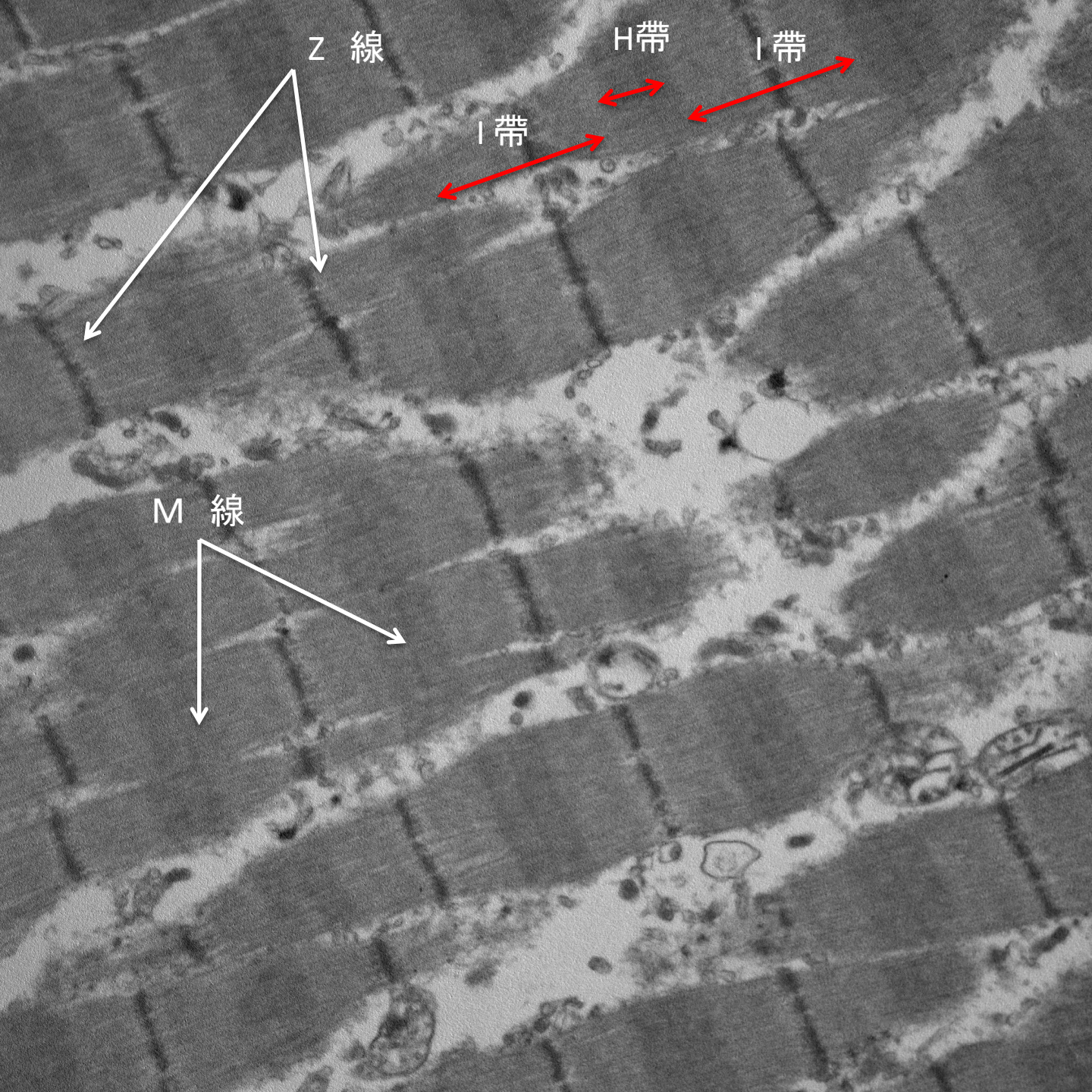
豚生肉



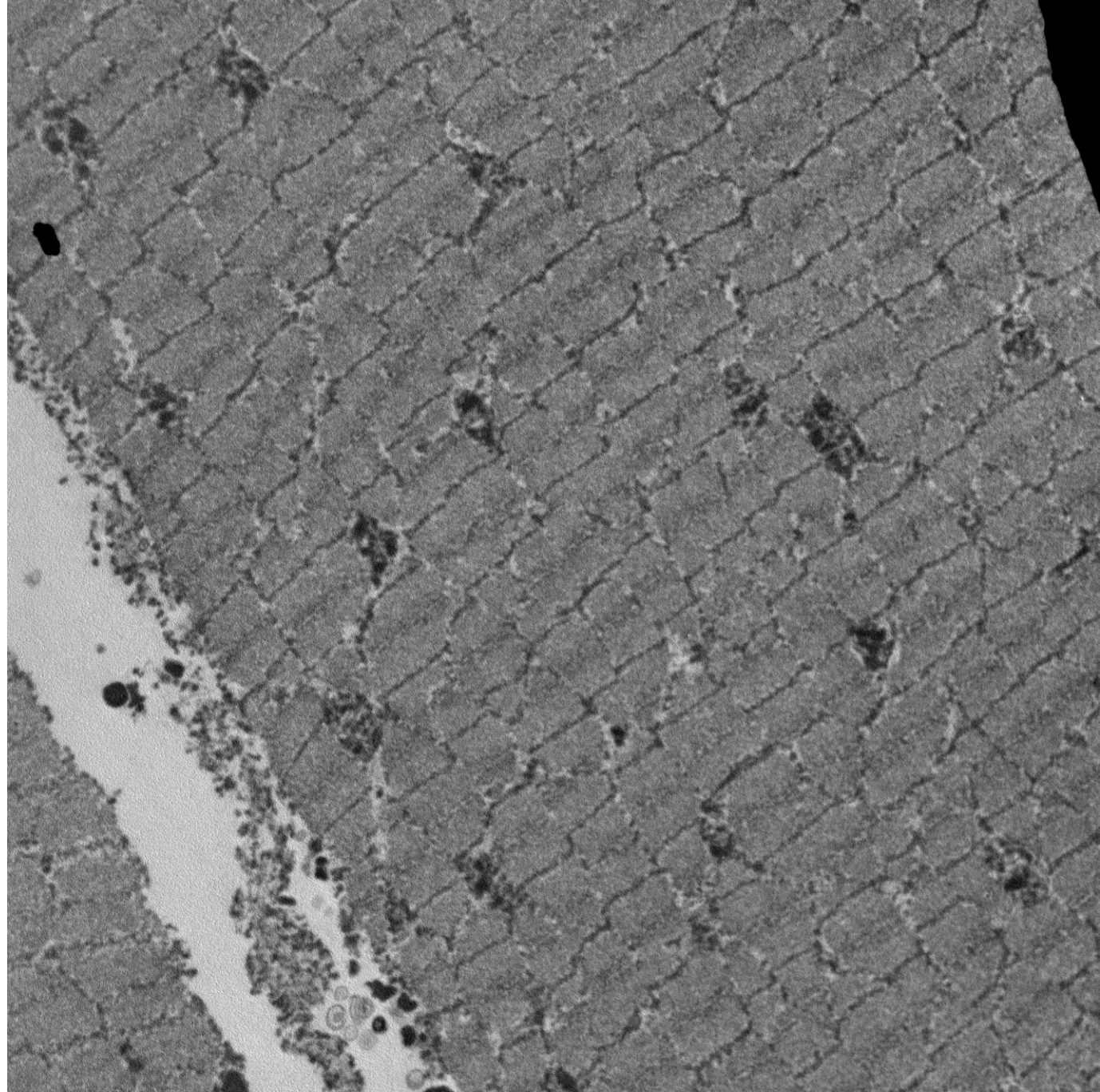
Mic	HV	Mag	Date
JEM-1400	80 kV	15000 x	15/03/10, 14:44

1383-1

— 2 μ m —



豚あいーと®

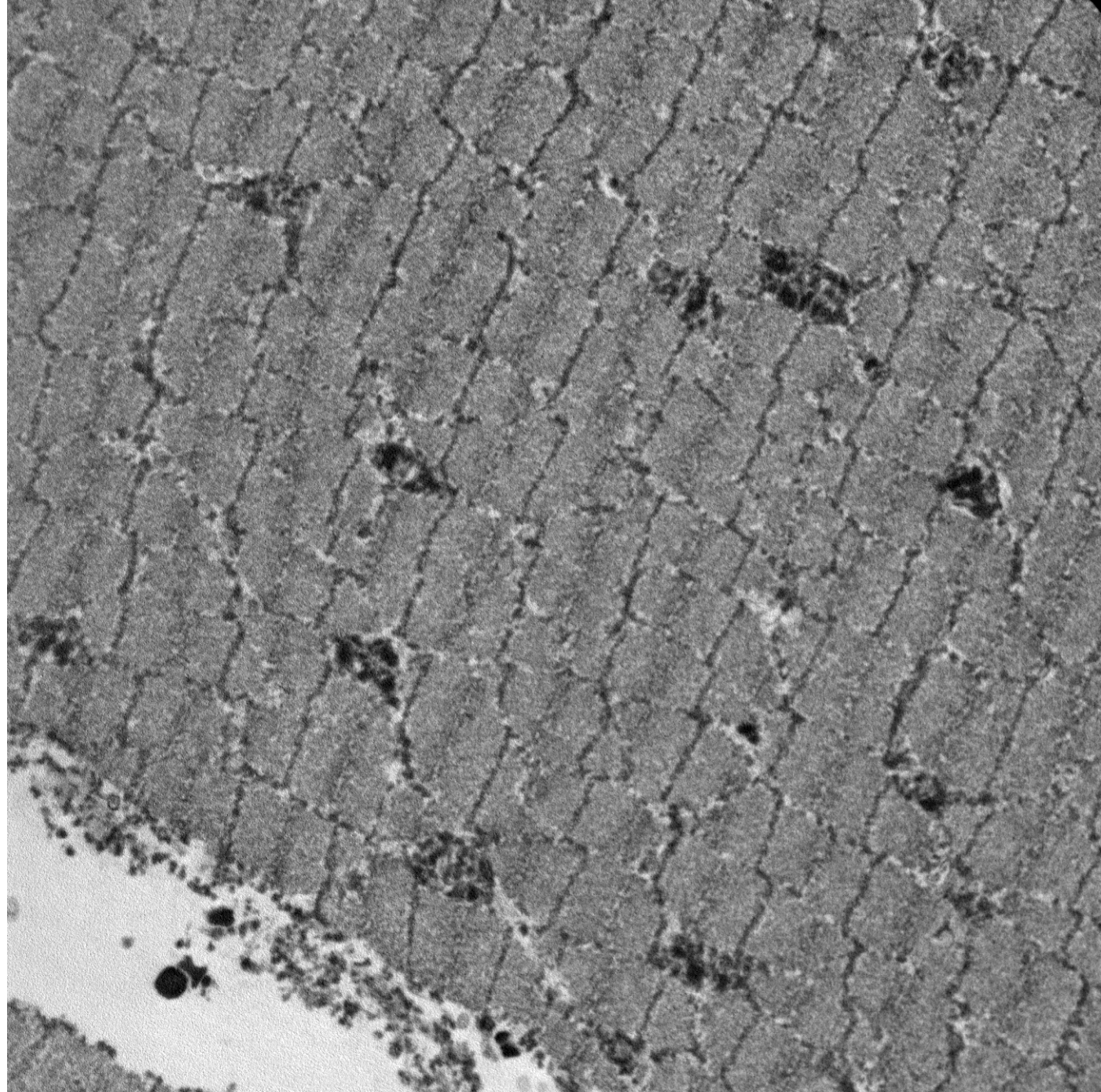


Mic	HV	Mag	Date
JEM-1400	80 kV	8000 x	15/03/10, 14:52

1384-1

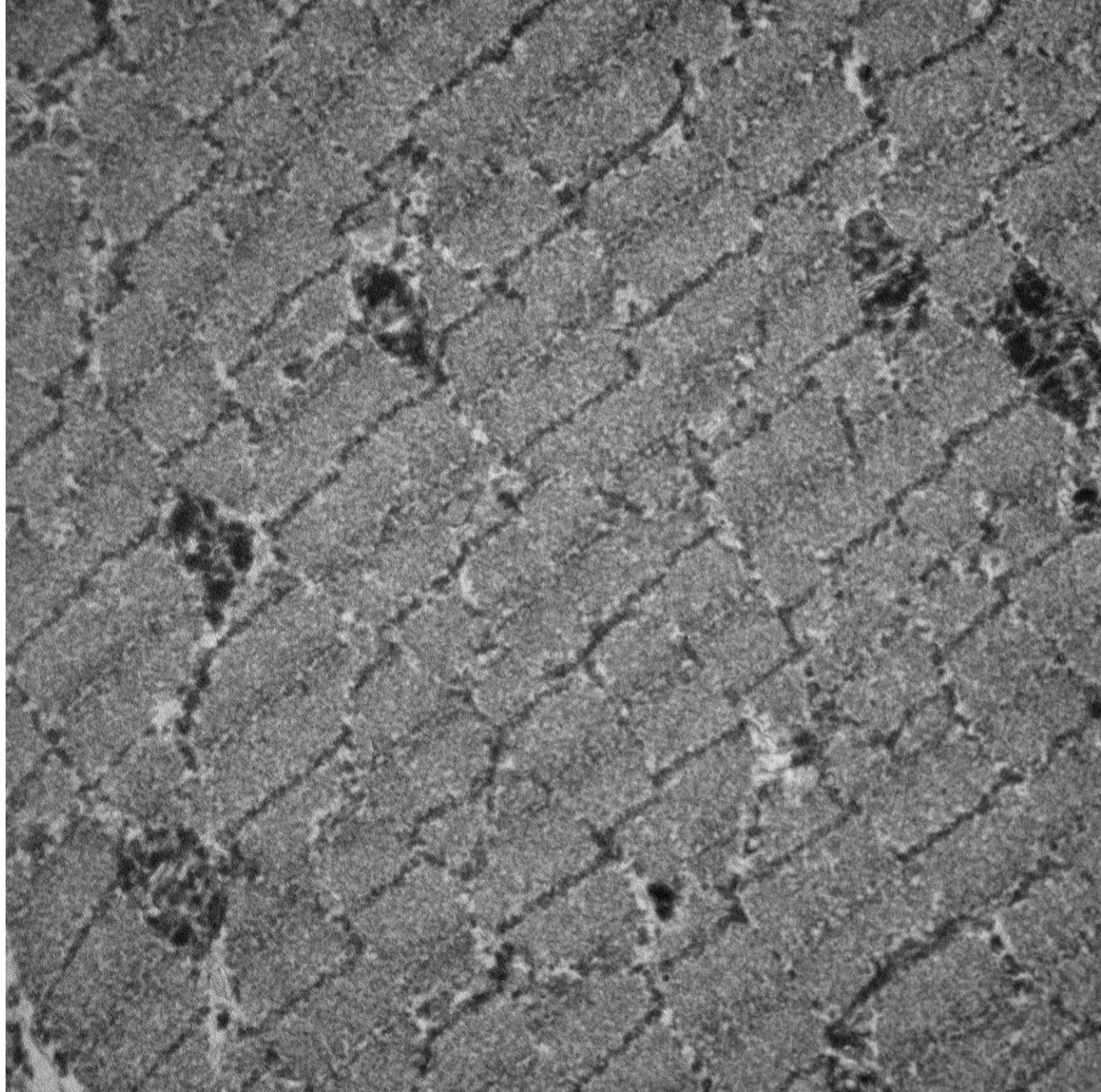
—2 μm—

豚あいーと®



Mic	HV	Mag	Date	
SEM-140000 LV	10000		15/02/10 14:50	1384-1

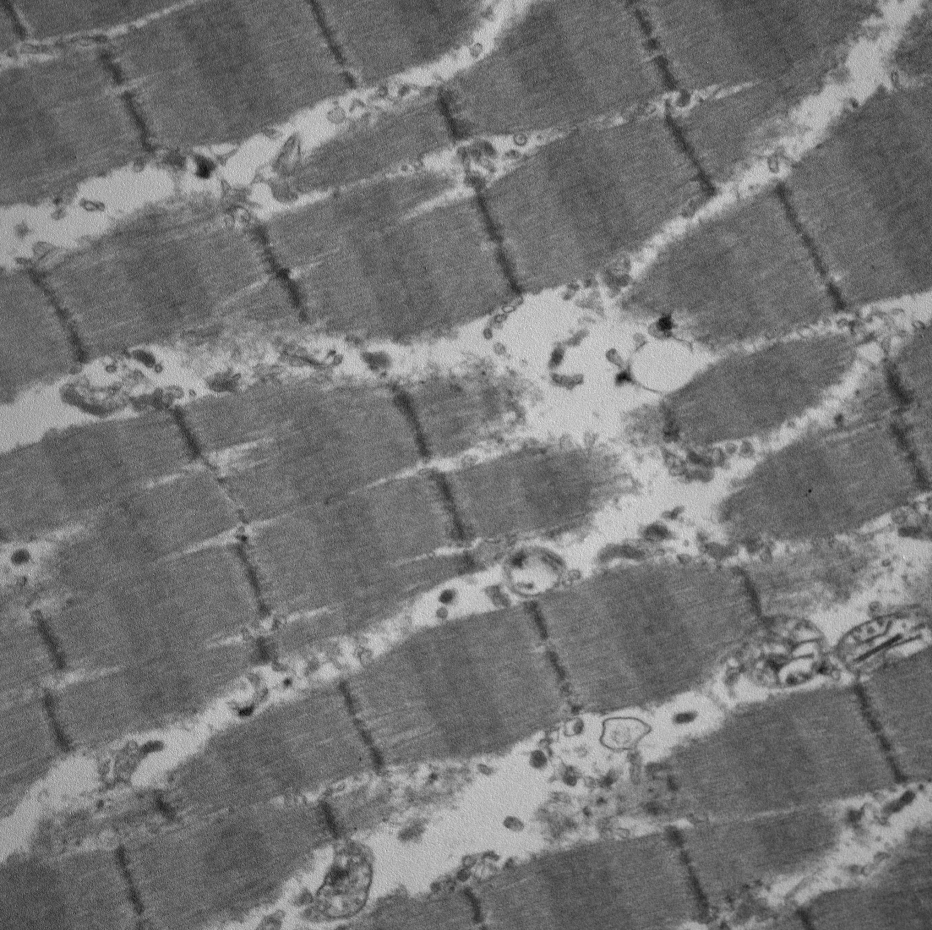
豚あいーと®



Mic	HV	Mag	Date
JEM-1400	80 kV	15000 x	15/03/10, 14:53

1384-1

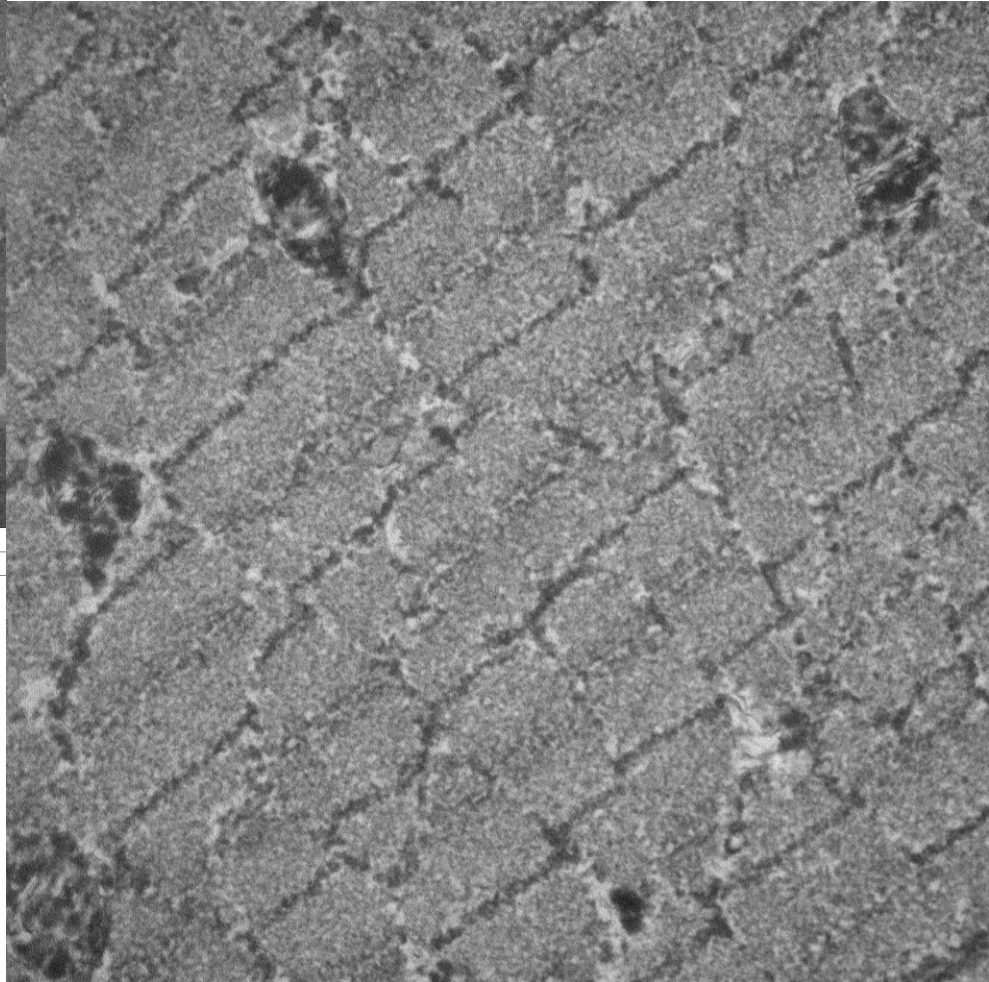
— 2 μ m —



筋原線維

あいーと®:豚

Mic	HV	Mag	Date	
JEM-1400	80 kV	20000 x	15/03/10, 14:45	1383-1
				—1 μm—



Mic	HV	Mag	Date	
JEM-1400	80 kV	20000 x	15/03/10, 14:54	1384-1
				—1 μm—

豚肉

結 果

1. 組織学的所見

1) ヘマトキシリン・エオジン染色

筋線維間の結合組織線維の消失を認める。
筋線維の横紋様構造の消失を認める。

2) 特殊染色

膠原線維、細網線維の消失

2. 免疫組織化学的所見

横紋筋アクチン、デスミン、ビメンチンの染色性の消失を認める。
毛細血管壁は平滑筋アクチンの染色性を認めるが、染色性が弱くなっている。

ミオシンは弱陽性であるが他の横紋筋のマーカに比し染色性を認める。

3. 透過型電子顕微鏡所見

横紋筋構造の消失、筋原線維の消失

考察

実験1

支援食(あいーと)の軟らかさは、光学顕微鏡的に膠原線維、細網線維の消失、筋線維の細胞質構造の消失(均質化)、および免疫組織学的に横紋筋アクチンの消失、デスミンの染色性の消失、ビメンチンの染色性の減弱などの線維成分に関連する結果と考えられる。

超微構造的(透過型電子顕微鏡)にも筋原線維の消失、横紋構造の消失を裏付ける結果である。



PJ-32N

日本薬局方一般試験法「溶出試験法」適合品

JP準拠
日本薬局方

理研式 溶出試験器



人工消化液

①第15改訂日本薬局方一般試験、溶出試験に記載された第1液 (pH1.2)、第2液 (pH.6.8)

1) 人工唾液の組成：BS 6 6 8 4、British Standard,1987

77mM NaCl,

4.0mM KCl,

2.1mM Na₂SO₄,

7.5mM NH₄Cl,

3.3mM urea,

33mM Lactic acid

pH 水酸化ナトリウムにより 4.5 に調整。

2) 人工胃液： 第1液 (pH1.2) +0.4%濃度でペプシン (関東化学製) を溶解し、人工胃液相当

3) 人工腸液：第2液 (pH.6.8) +1%濃度でパンクレオザイミン ((和光純薬製) を溶解し、人工腸液相当



圧力鍋

鍋

アイト(大塚製薬)



実験開始120分



圧力鍋

鍋

アイト

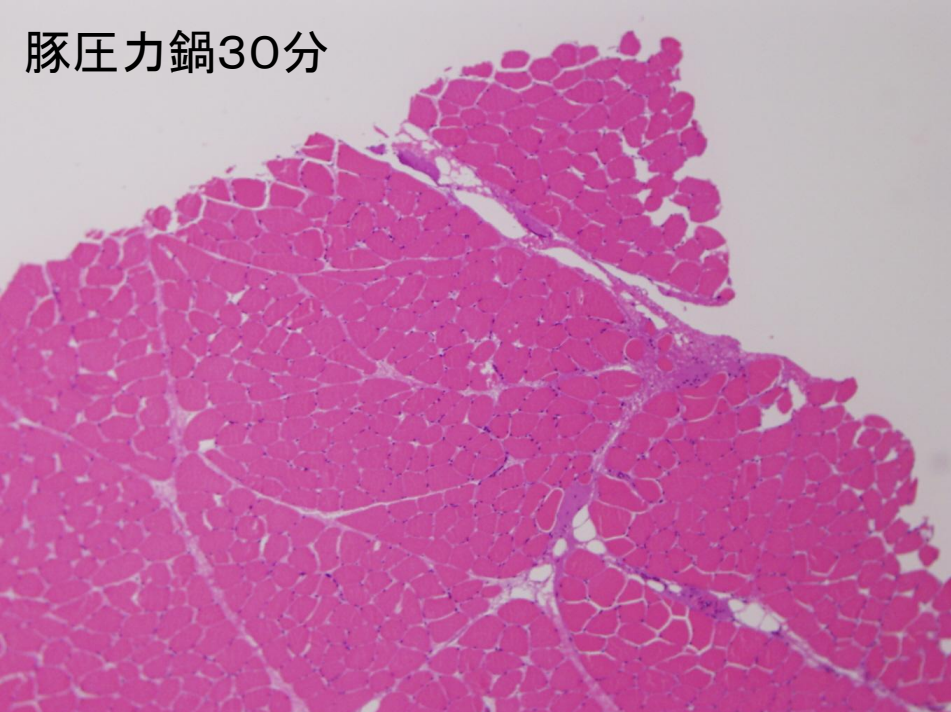


左

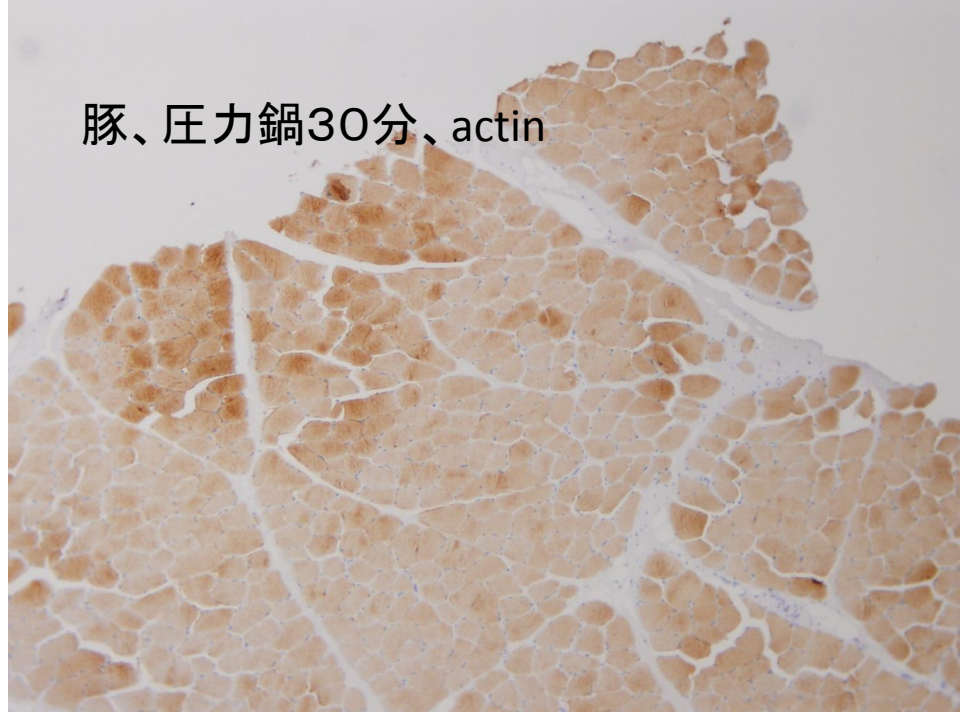
全品

アイト

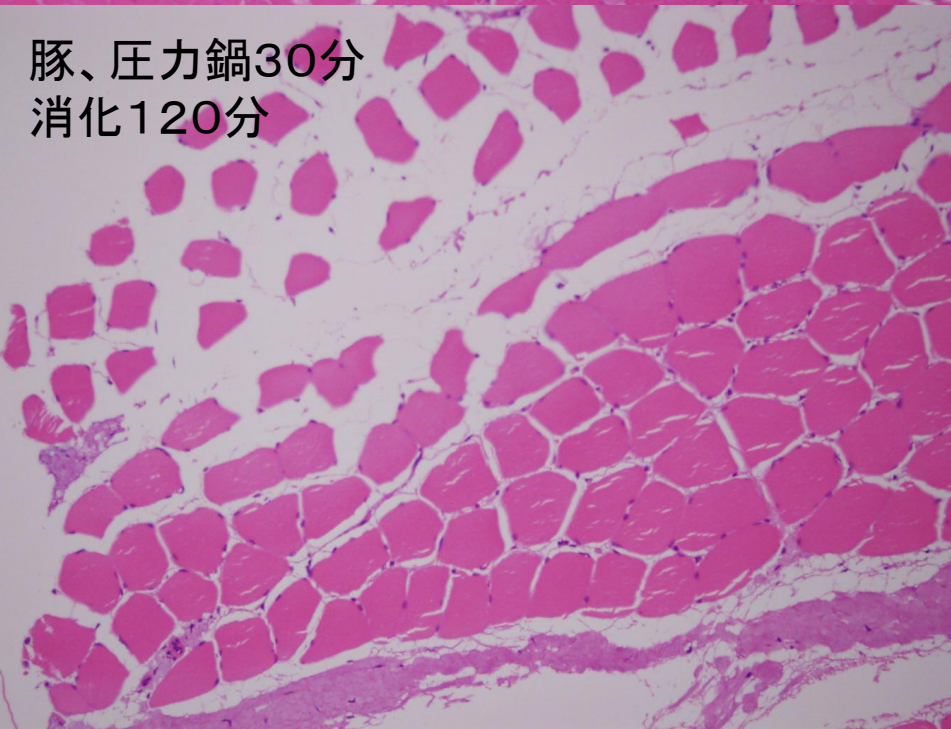
豚圧力鍋30分



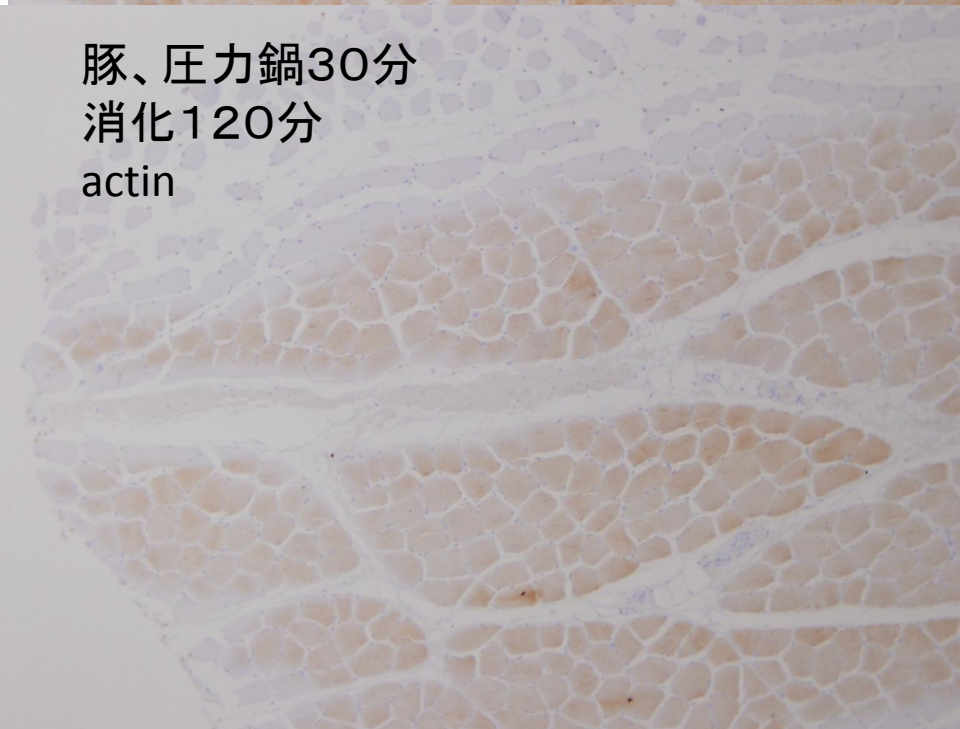
豚、圧力鍋30分、actin



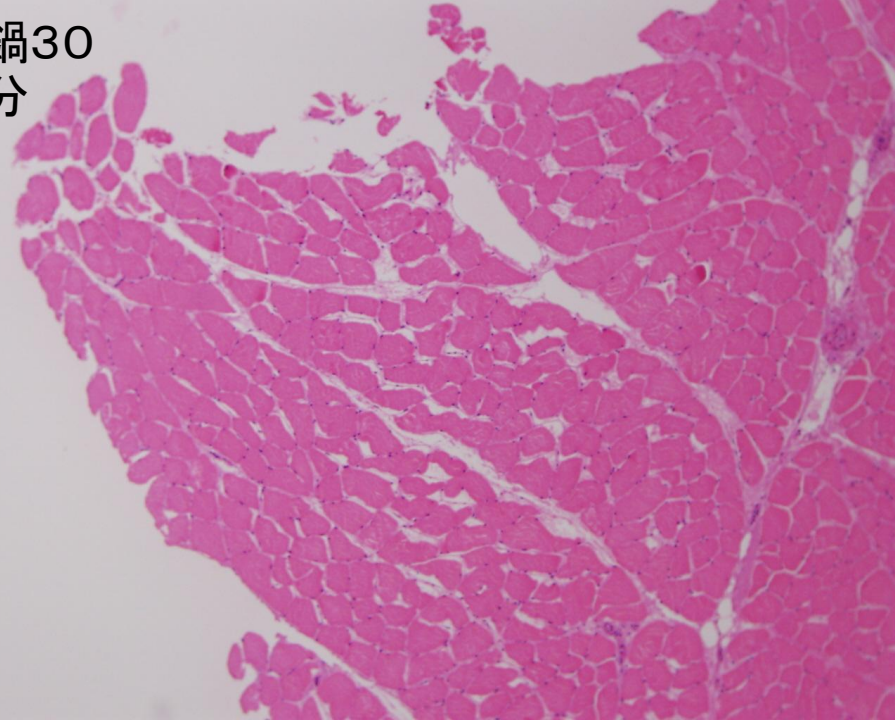
豚、圧力鍋30分
消化120分



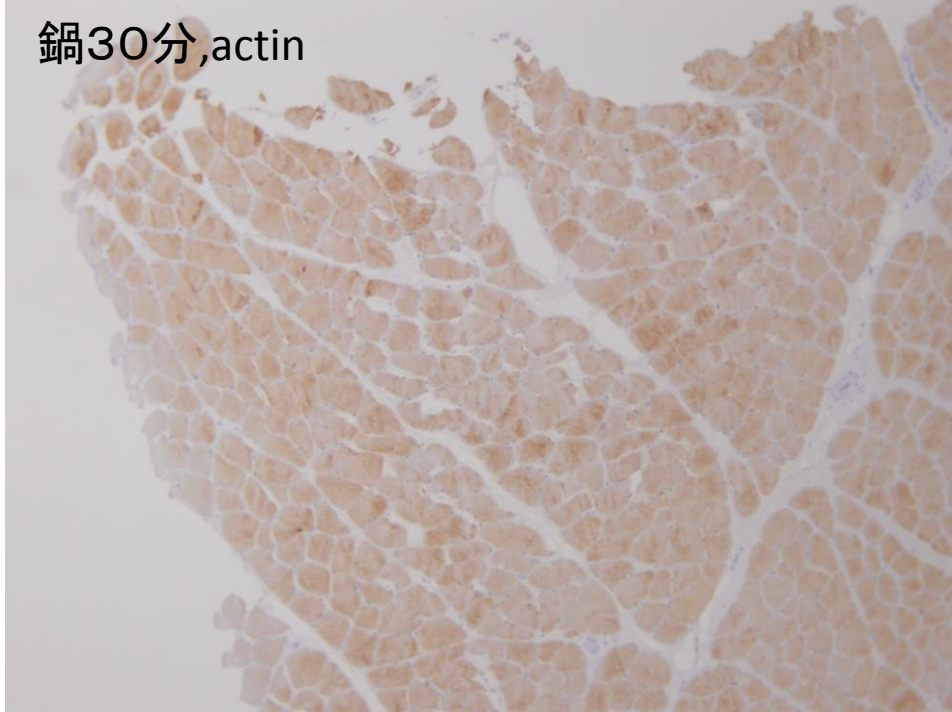
豚、圧力鍋30分
消化120分
actin



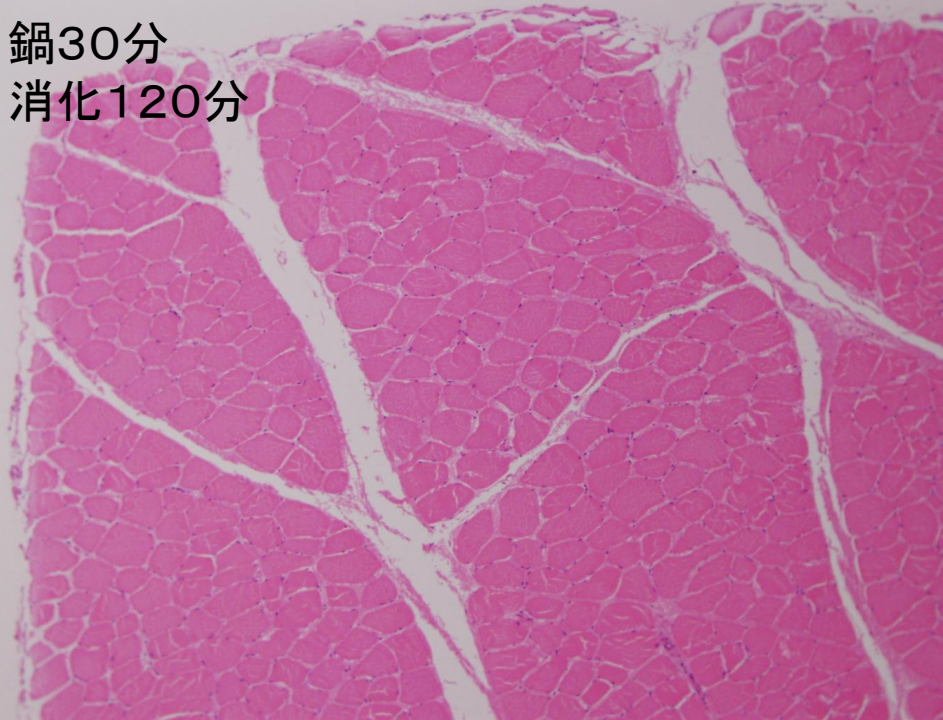
鍋30分
分



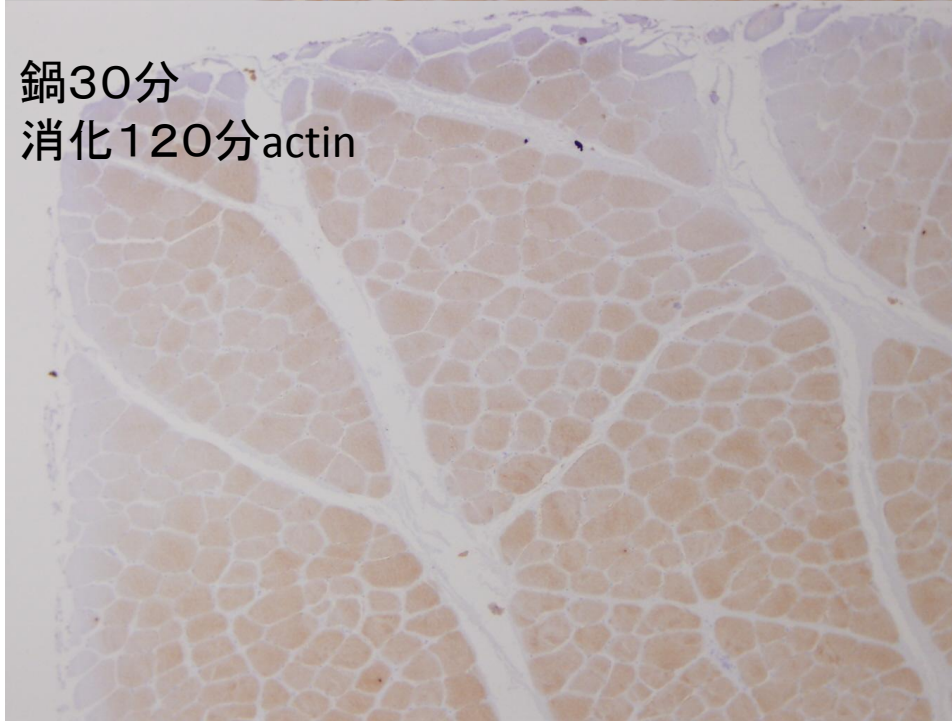
鍋30分,actin



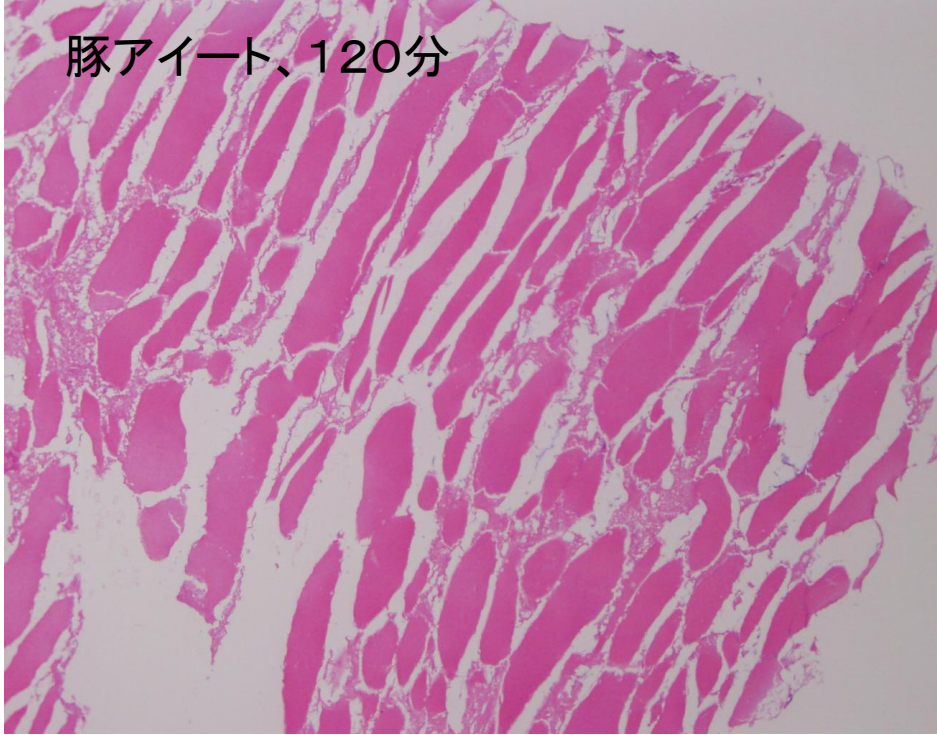
鍋30分
消化120分



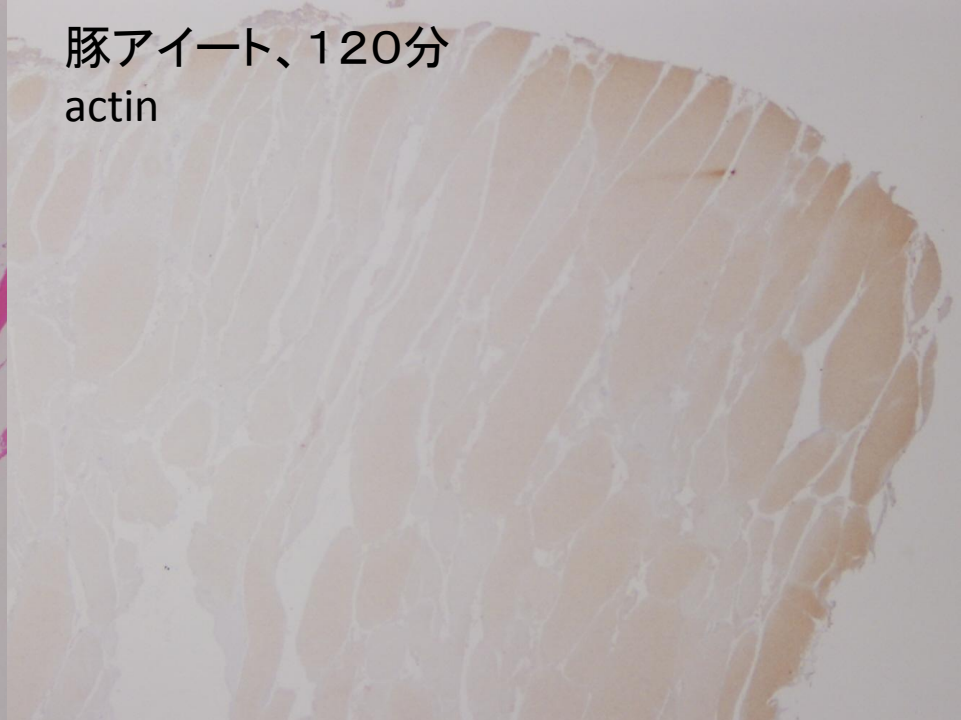
鍋30分
消化120分actin



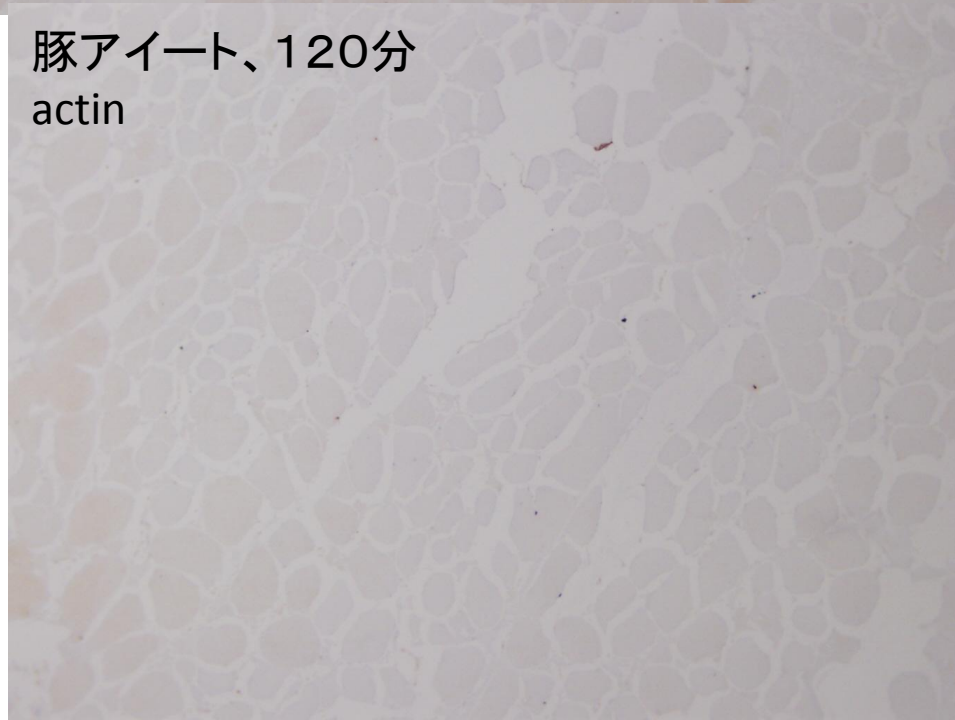
豚アイート、120分



豚アイート、120分
actin



豚アイート、120分
actin



鹿肉



- 压力鍋
- 鍋

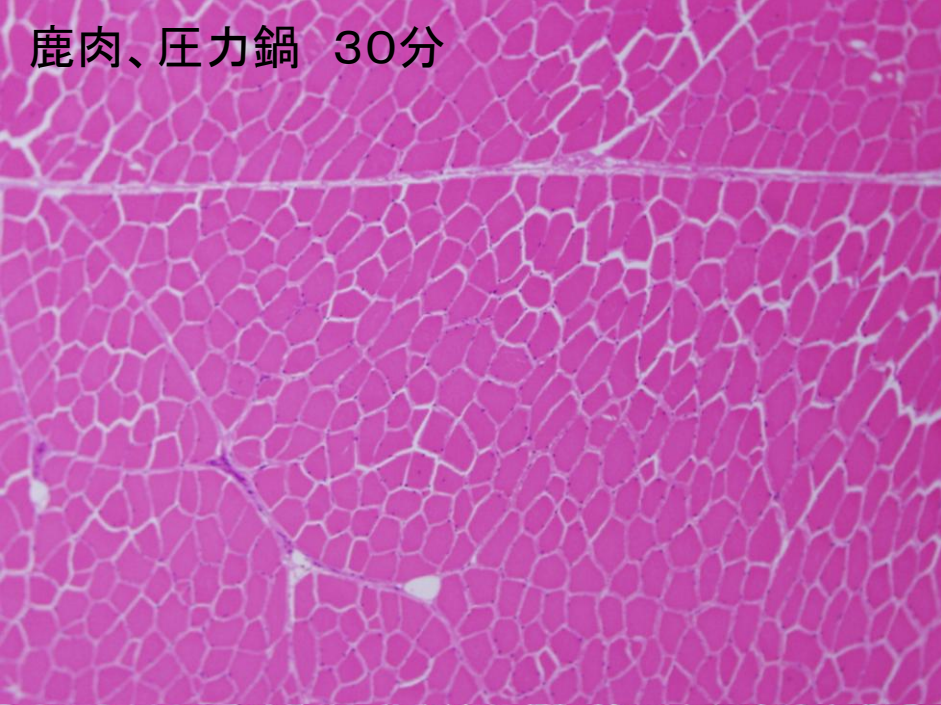
消化前



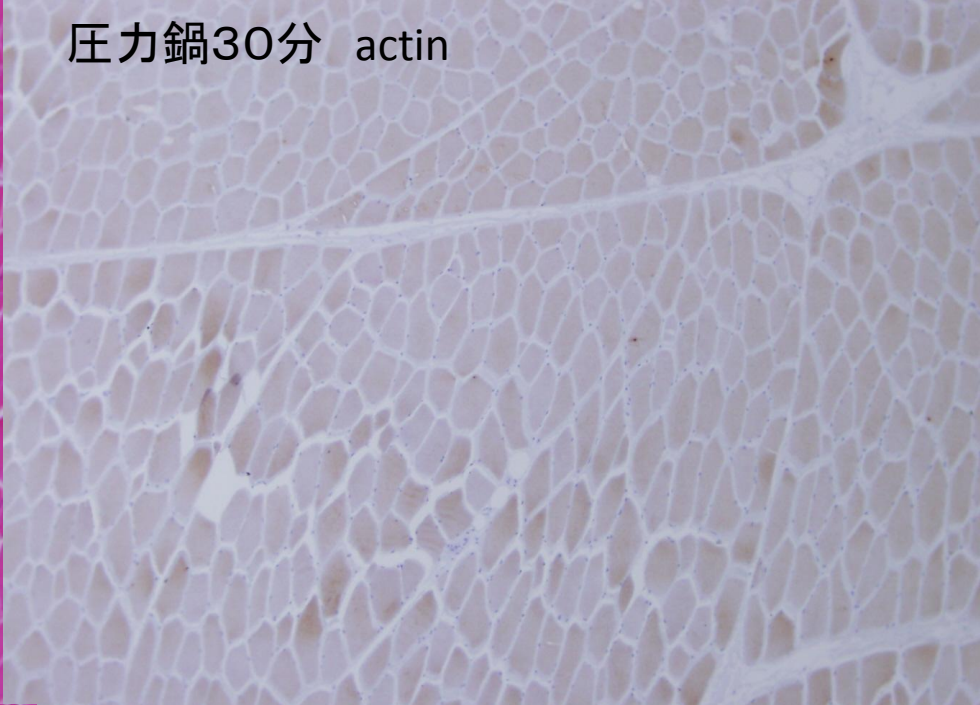
消化後



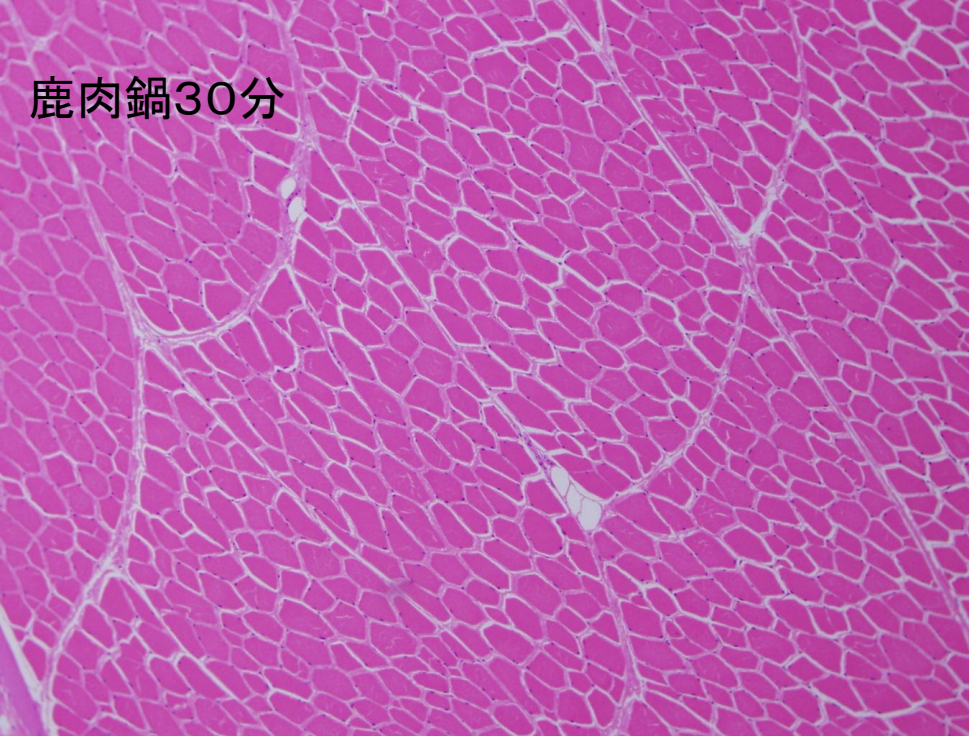
鹿肉、圧力鍋 30分



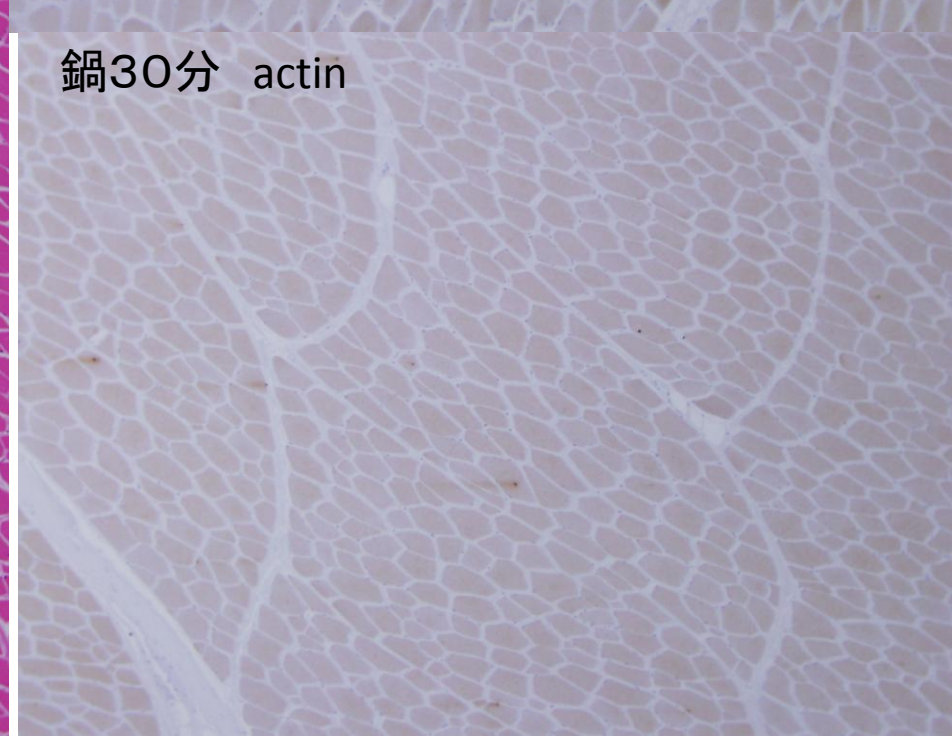
圧力鍋30分 actin

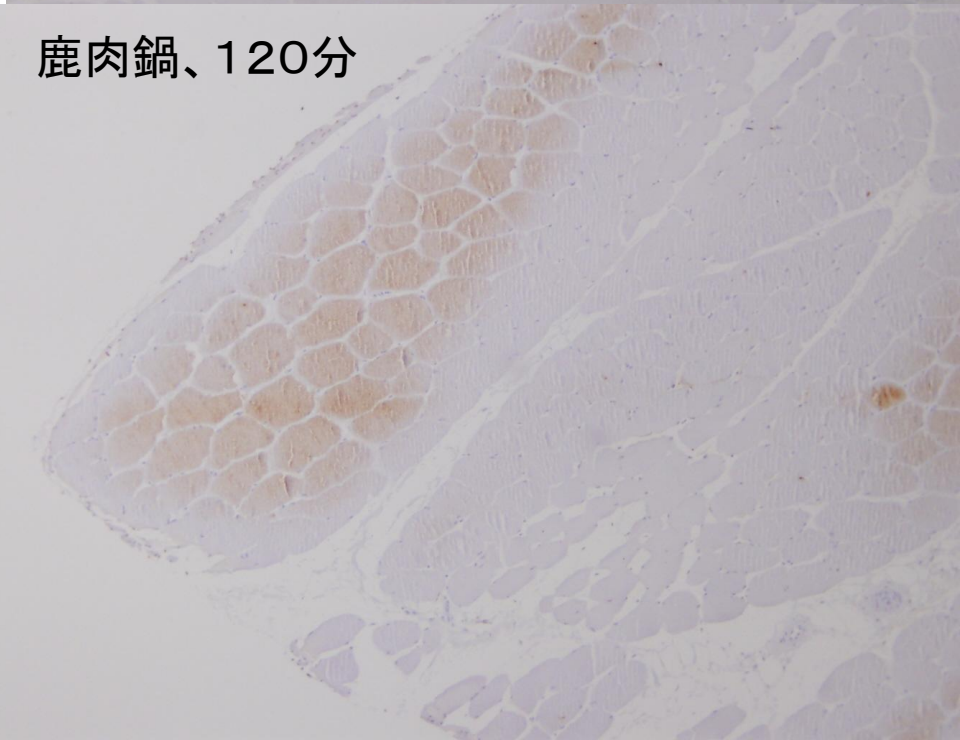
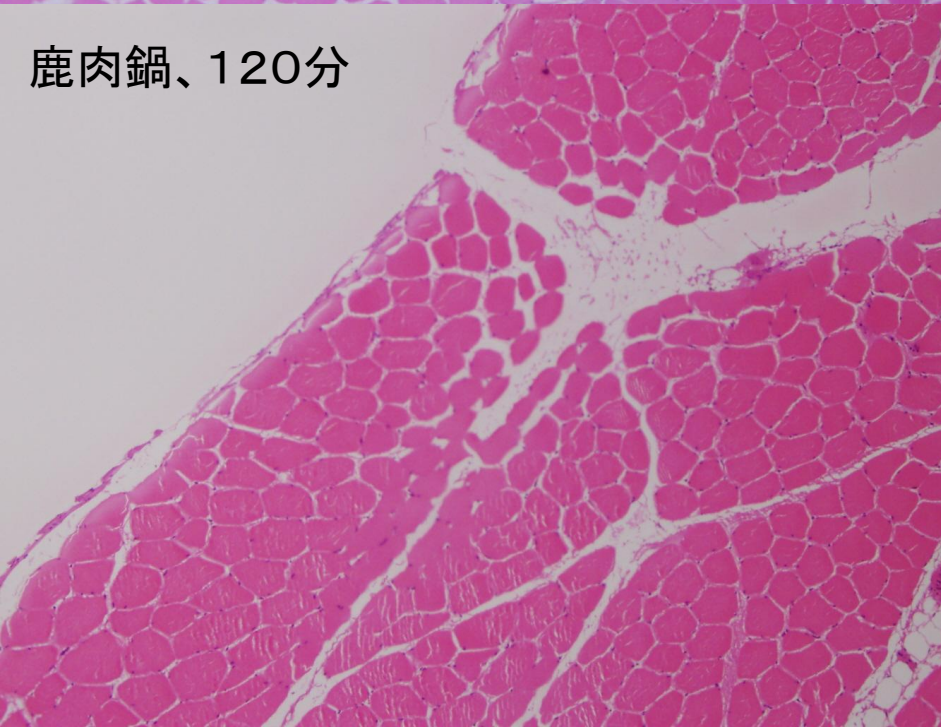
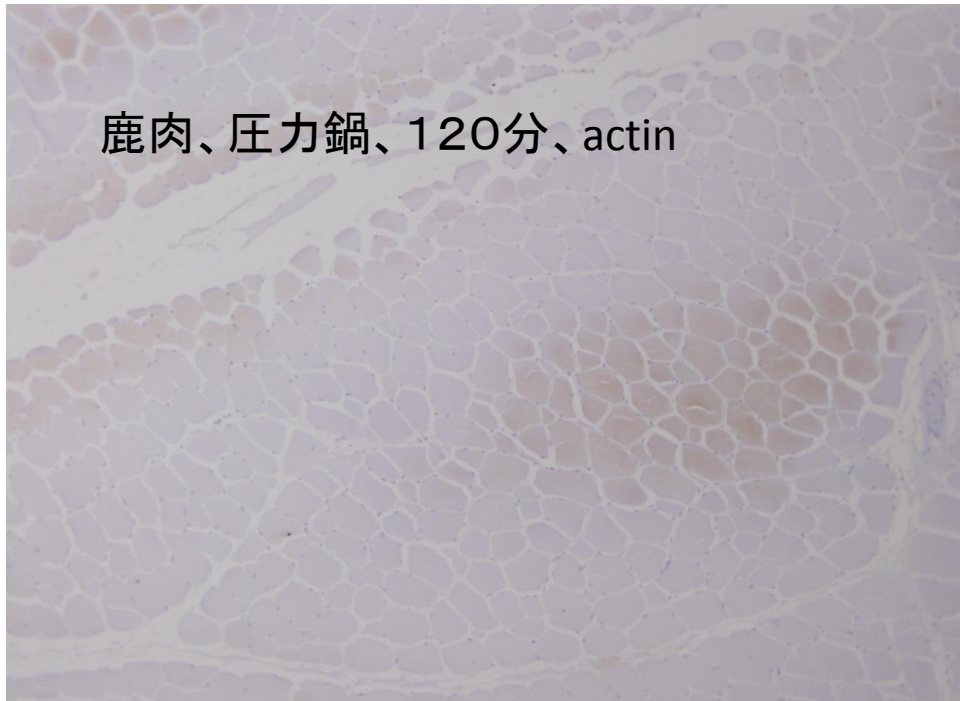
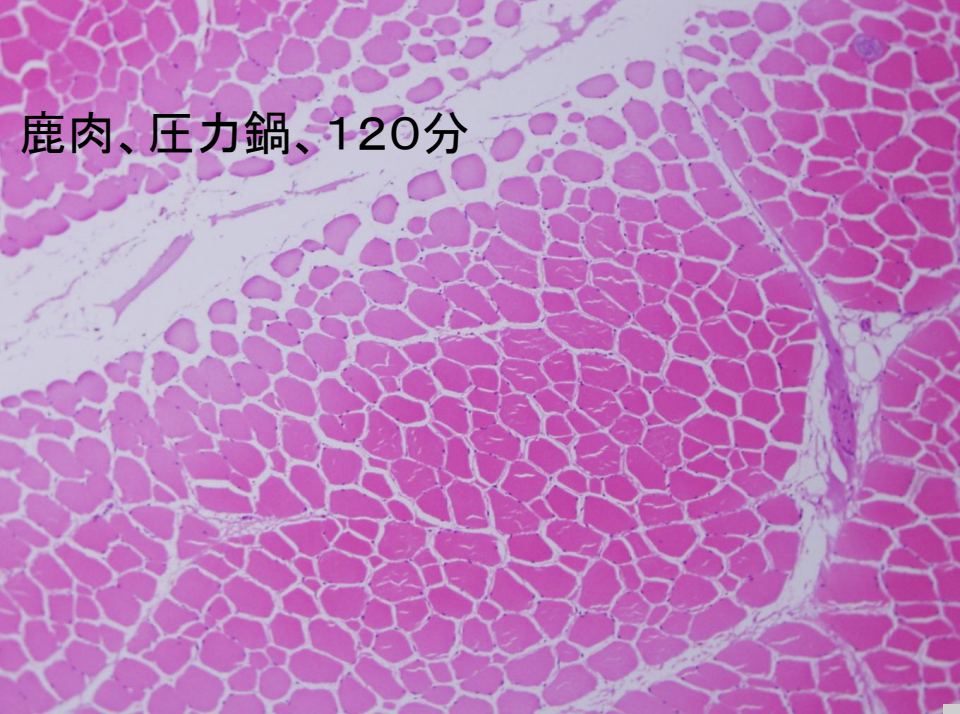


鹿肉鍋30分



鍋30分 actin





鹿生肉

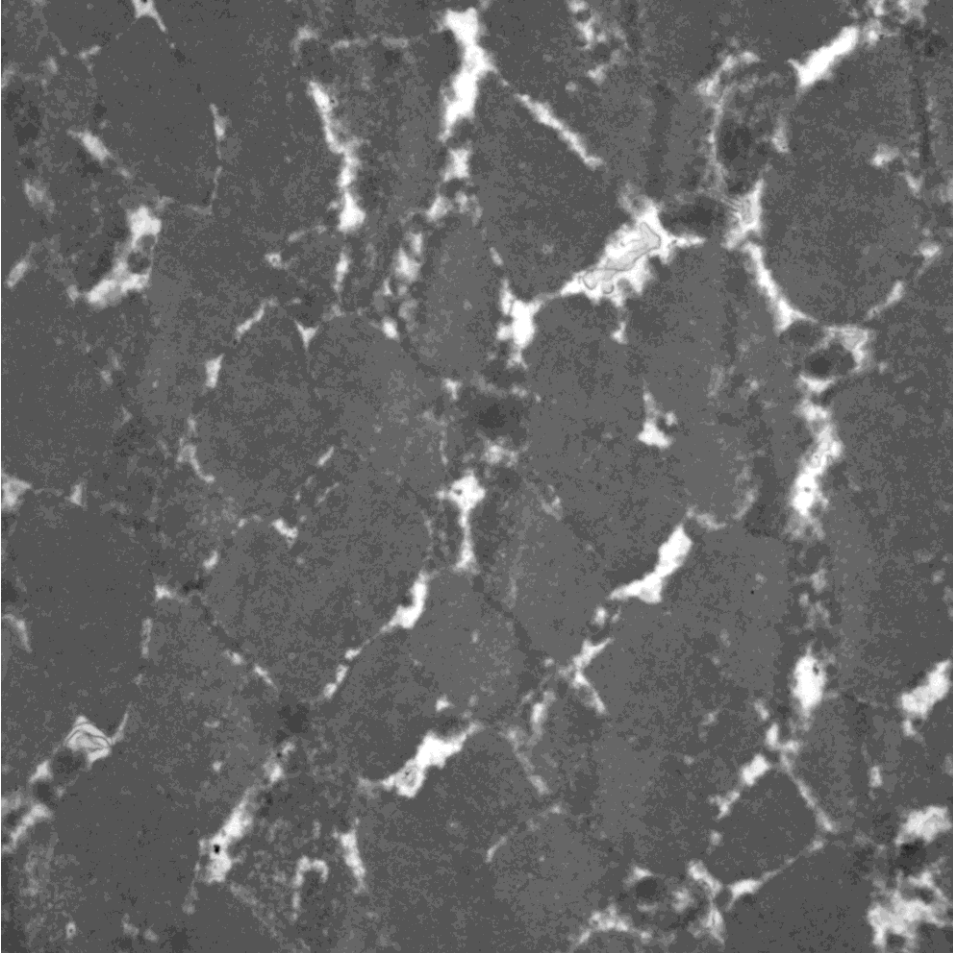
鍋30分



Mic	HV	Mag	Date	1363-1
JEM-1400	80 kV	20000 x	15/01/21, 13:51	—1 μm—



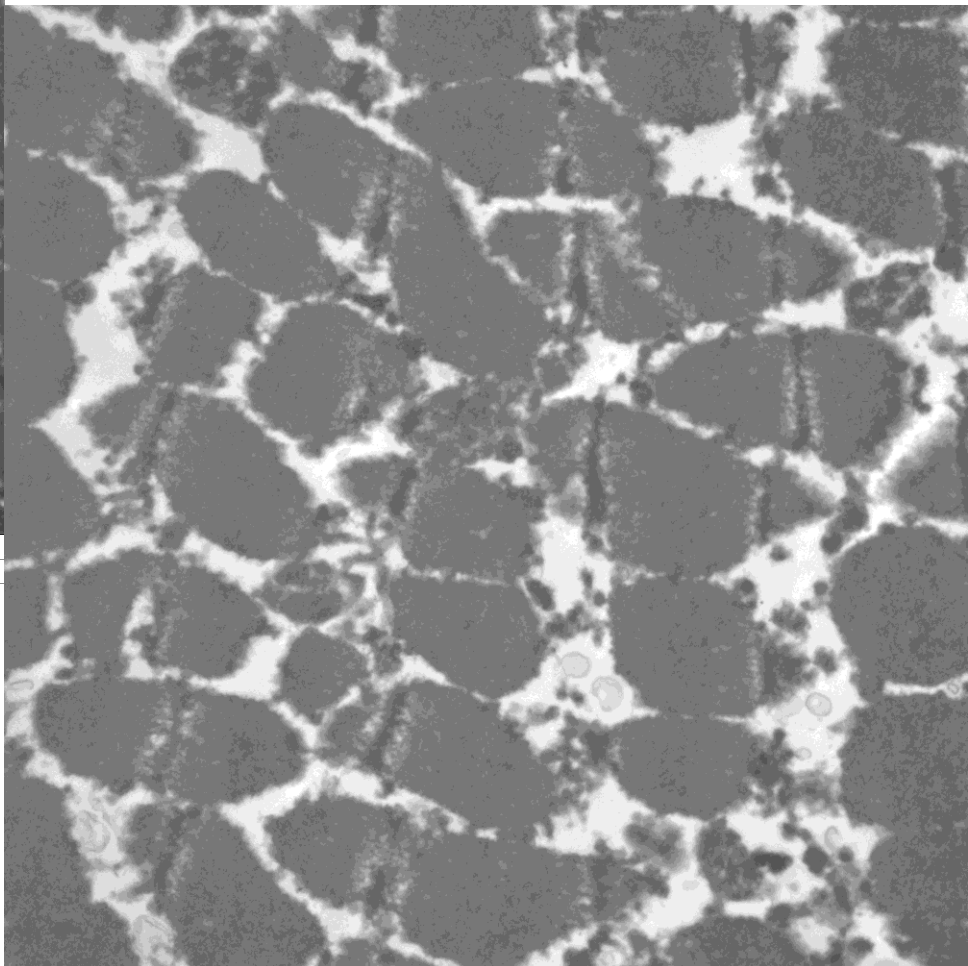
Mic	HV	Mag	Date	1364-1
JEM-1400	80 kV	20000 x	15/01/21, 14:08	—1 μm—



圧力鍋15分

圧力鍋30分

Mic	HV	Mag	Date	1365-1
JEM-1400	80 kV	20000 x	15/01/21, 14:18	—1 μm—



Mic	HV	Mag	Date	1366-1
JEM-1400	80 kV	20000 x	15/01/21, 14:28	—1 μm—

結 果および考察

消化酵素

1. 豚肉

- アイート

組織学的にも、組織が融合する所見を呈し、消化されている。

- 圧力鍋、通常の鍋

免疫染色的にもアイートほどの差はでなかった。表層部と内部で染色性が相違する。

2. 鹿肉

圧力鍋と通常の鍋

免疫染色的にもアイートほどの差はでなかった。表層部と内部で染色性が相違する。

3. 超微構造的には筋原線維構造は消失、電子密度が高く、構造が不明です。