

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580221

研究課題名（和文）食中毒菌の腸管付着・侵入を抑制する水産発酵微生物および水産食品成分に関する研究

研究課題名（英文）Studies on inhibitory effects of fresh and fermented marine foods on invasion of food related pathogens to enterocyte.

研究代表者

久田 孝 (KUDA TAKASHI)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号：00290081

研究成果の概要（和文）：

本研究では、主にリステリア菌の感染性および病原性を抑制する食餌因子（乳酸菌および成分）を水産食品中から探索し、新たな機能性と、食品衛生に資することを目的とし、ヒト腸管細胞およびマウスを用いた実験を行った。その結果、さばのなれずしより分離した乳酸球菌 *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 株がリステリアの感染、侵入を抑制し、免疫強化および抗炎症作用がかかわることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, to clarify the inhibitory effects of marine foods on *Listeria* infection, we investigated with human enterocyte like Caco-2 cells and A/J mice. *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 suppressed the invasion and infection of *Listeria*. The inhibitory effect of 1RM3 might be related with its immune promote and anti-inflammatory activities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：*Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, なれずし、マコンブ、腸管上皮細胞 Caco-2

### 1. 研究開始当初の背景

アメリカ合衆国では毎年約 2500 人が重症のリステリア症となり、その 20%が死亡していると推定されている<sup>8)</sup>。リステリアはとくに妊婦、新生児や免疫が低下している人に重篤な症状を引き起こす。我が国でもリステリ

ア症の報告があるが欧米に比べると少ない。その理由として、潜伏期間が長く、検査法も煩雑で実際に起こっているリステリア症を検出できていないことが考えられている。

欧米でのリステリア症の原因食として乳製品、サラダなどが多く、日本では原因食の喫食が少ないためとも考えられるが、国内で

流通している鮮魚類の 5-30% からリステリアは検出される。

一方、カンピロバクターは散発的ではあるものの、我が国も含め、発生頻度の最も多い食中毒菌のひとつである。原因は加熱不十分な鶏肉が多いが、実際には原因食不明の場合が多い。水産物に関する調査はまだ進められていないが、リステリアと同様に広く分布している可能性もある。リステリアとカンピロバクターは、様々な対処法が模索されているものの、上記の EPEC やサルモネラの場合のような腸管細胞、腸内環境からのアプローチの報告はない。

## 2. 研究の目的

近年食品衛生面で注目されているリステリア菌 *Listeria monocytogenes* は水産物でも高頻度に検出されているものの、我が国での発症数および重症患者数は欧米に比べて低い。本研究では水産食品成分中にリステリア、その他の病原菌の感染性および病原性を抑制する因子が存在するか検討し、食品衛生と水産食品の新たな機能性を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 水産発酵食品より分離した選抜乳酸菌および褐藻類中のヒト腸管上皮細胞様 Caco-2 細胞へのリステリア侵入抑制を検討した。また有望なサンプルについては A/J マウスにリステリアを経口投与した際の感染抑制能を検討した。

(2) 未処理のマウスマクロファージ RAW264.7 細胞にサンプルを加え酸化窒素 (NO) 産生 (免疫賦活) 作用を調べた。また、同細胞に *E. coli* O111 の LPS 添加による NO 産生 (炎症) 作用に対する影響も検討した。

(3) 飲料水に 5% のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を加え投与し誘発した腸炎 (IBD) モデルマウスに、分離選抜乳酸菌を経口投与し、抗炎症効果を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 水産発酵食品からの、酸耐性・胆汁耐性乳酸菌のスクリーニングと、病原菌のヒト腸管上皮細胞 Caco-2 への付着および侵入に対する、選抜乳酸菌および海藻抽出物の影響を検討した結果、選抜された *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 株とマコンブ付着部

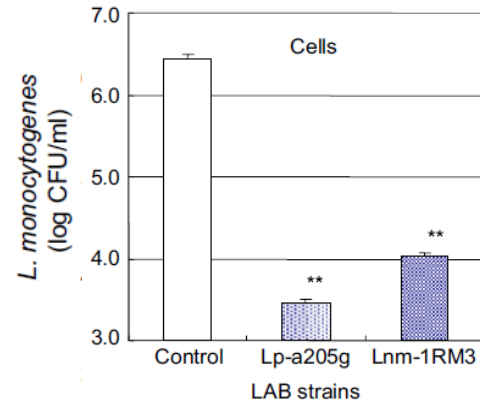


図 1 リステリア菌の Caco-2 細胞侵入に対する分離乳酸菌の影響

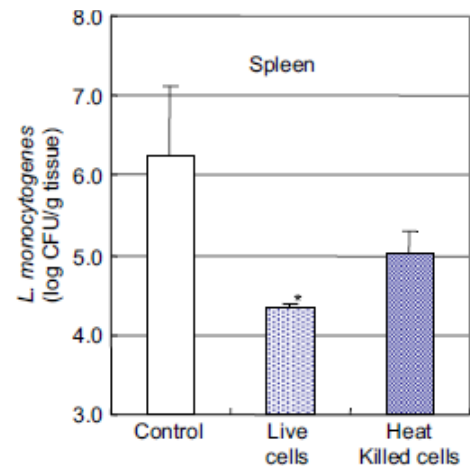


図 2 リステリア菌を経口投与した A/J マウスの肝臓、脾臓への感染に対する *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 細胞経口摂取の影響

(ガニアシ) 抽出物が、未分化および分化 Caco-2 細胞、また、マウス脾臓および肝臓へのリステリア菌およびサルモネラ菌 (*Salmonella* Typhimurium) の侵入あるいは感染を抑制することを確認した (図 1, 2)。

(2) これらのサンプルは、RAW264.7 細胞に対して免疫賦活作用および抗炎症作用を示した。また、過酸化水素による細胞毒性に対して保護作用を示した (図 3)。

(3) リステリアの侵入および感染の抑制、抗炎症性、免疫賦活効果が示された 1RM3 株について、DSS 投与誘発した IBD マウスに飲料水とともに摂取させた結果、血便や下痢などの症状が緩和され、組織学的にも改善が認められた (図 4)。

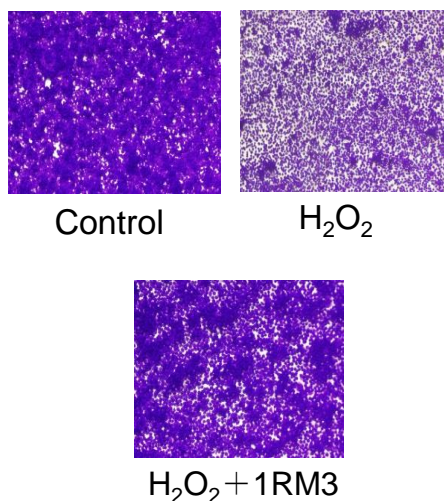


図3 過酸化水素のマウスマクロファージ細胞への毒性に対する *Ln. mesenteroides* 1RM3 の保護作用

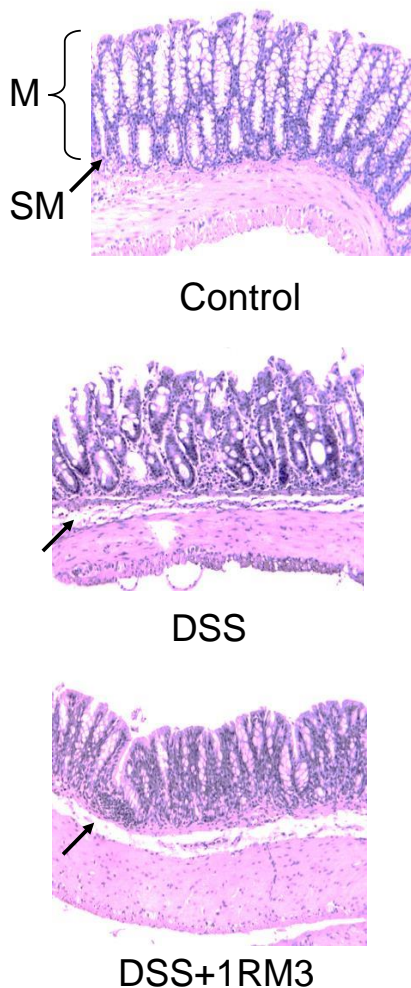


図4 5% DSS 飲料水投与による腸炎症 (IBD) マウスに対する 1RM3 の効果

本研究の成果は、伝統的な日本の食材のうち、海藻の多糖類および、なれずし中の乳酸菌が、食中毒菌の感染を抑制しうることを示唆している。今後も有効成分の分離、作用メカニズム、食べ合わせなども含め検討を続けたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

Kanno, T., Kuda, T., Choa, A., Takahashi, H., & Kimura, B. Radical scavenging capacities of *saba-narezushi*, Japanese fermented chub mackerel, and its lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 47, 25-30 (2012) 査読あり. doi:10.1016/j.lwt.2012.01.007

Nakamura, S., Kuda, T., An, C., Kanno, T., Takahashi, H., & Kimura, B. Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from *narezushi*, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice. *Anaerobe*, 18, 19-24 (2012) 査読あり. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.11.006

Kuda, T., Nakamura, S., An, C., Takahashi, H., Kimura, B., & Nishizawa, M. Effects of holdfast of *Laminaria japonica* on *Listeria* invasion on enterocyte-like Caco-2 cells and NO production of macrophage RAW 264.7 cells. *Applied Biochemical and Biotechnology*, 168, 928-935 (2012) 査読あり. doi: 10.1007/s12010-012-9831-4

An, C., Kuda, T., Yazaki, T., Takahashi, H., Kimura, B. FLX pyrosequencing analysis of the effects of the brown-algal fermentable polysaccharides alginate and laminaran on rat cecal microbiotas. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 860-866 (2013) 査読あり. doi:10.1128/AEM.02354-12

An, C., Yazaki, T., Takahashi, H., Kuda, T., & Kimura, B. Diet-induced changes in alginate- and laminaran-fermenting bacterial levels in the caecal contents of rats. *Journal of Functional Foods*, 5,

389-394 (2013) 査読あり.  
doi:10.1016/j.jff.2012.11.011

〔学会発表〕 (計 4 件)

中村伸介・菅野友美・高橋肇・木村凡・久田孝, さばのなれずしより分離した *Leuconostoc mesenteroides* による Caco-2 細胞および A/J マウスにおけるリステリアの侵入および感染の抑制. 日本乳酸菌学会大会, 2011. 7. 12. 大阪.

安チョア・久田孝・矢崎孝寛・木村凡, 褐藻類中の発酵性多糖類がラットの腸内フローラに及ぼす影響 - 次世代シーケンサーを用いた解析 -. 日本食品微生物学会学術総会, 2011. 10. 6. 東京

中村信介・安チョア・高橋肇・木村凡・西澤信・久田孝, Caco-2 およびマウスにおけるリステリア侵入および感染に対するマコンブ葉状体および付着部 (ガニアシ) 乾物の影響. 日本水産学会春季大会, 2012. 3. 26. 東京.

菅野友美・安チョア・高橋肇・木村凡・久田孝, さばのなれずしより分離した乳酸菌の抗酸化性および抗炎症性. 日本乳酸菌学会大会, 2012. 7. 13. つくば.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

久田 孝 (KUDA TAKASHI)  
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・  
准教授  
研究者番号：00290081