

リステリア・モノサイトジェネスの腸管細胞付着・侵入性に対する 牛乳および大豆たん白質加水分解物の影響

久田 孝*

東京海洋大学海洋科学部

Effects of Hydrolyzed Compounds of Milk and Soy Proteins on *Listeria monocytogenes* Infection to Intestinal Epithelial Cells

Takashi KUDA *

Laboratory of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology,
Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo 108-8477

ABSTRACT

Listeria monocytogenes (Lm) causes listeriosis in humans mainly through consumption of ready-to-eat foods, such as luncheon meat, cheese and salads. In Japan, there is only a reported food-borne Lm outbreak. In this study, to determine the dietary effect of soy protein that is rich in Japanese style diet on Lm invasion and infection, we examine the effect of digested soybean protein (Phytone peptone: PP) on the invasion of Lm using un-differentiated and differentiated human enterocyte-like Caco-2 cells, comparing with digested milk casein (Tryptone: TP). The invasion Lm in the intact Caco-2 cells was about 5.3 log cfu/well. Although there were no significant differences, the invasion number of Lm into the differentiated Caco-2 cells was tended to be increased by TP (10 mg/mL), rather than PP. Genetically Lm susceptible A/J mice were oral infected 7 log cfu/mL Lm suspension after 7 days feeding of diet containing 20%w/w casein or soy protein. Numbers of Lm cells in spleen and liver tissues were tended to be low in mice fed soy protein. Tumor necrosis factor (TNF)- α , a maker of inflammation and infection, in spleen tissue was significantly low in mice fed soy protein. Furthermore, interferon (IFN)- γ was also tended to be low in mice fed soy protein. These results suggest that differences of dietary protein affect infection of food related pathogens including Lm. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 44-47, 2011.

Key words : *Listeria monocytogenes*, soy protein; casein; Caco-2; A/J mouse

* 〒108-8477 東京都港区港南4-5-7

リステリア・モノサイトジェネス *Listeria monocytogenes* は欧米においてチーズなどの非加熱喫食 (Ready to eat: RTE) 食品を介して多くの罹患者を出し、妊婦や老人など免疫弱者では流産、敗血症など重篤な症状をもたらす¹⁾。一方、わが国でリステリア食中毒とされた事例は一例のみにとどまるが²⁾、ネギトロやイクラなどのRTE食品からもリステリア菌が高率 (5 ~ 13%) で検出されることが報告されている³⁾。わが国において症例が少ないのは、初期症例がインフルエンザと似ており誤診されてしまうことや、リステリア菌検出検査が広くは行われていないためとも考えられている。その一方で、欧米との食生活の違いが発症率に関わってくることも考えられ、例えば、わが国での大豆の摂取量は減少してきたとはいえ、欧米と比較するとまだ多い⁴⁾。大豆たん白質加水分解物はサルモネラのヒト腸管細胞Caco-2細胞への接着を阻害したことが本財団助成による研究でも報告されている⁵⁾。

本研究においては、大豆たん白質摂取の有効性を検討することを目的とし、Caco-2細胞へのリステリア菌の侵入性に対するミルクカゼイン (欧米型)、および大豆たん白の加水分解物の影響を検討した。さらに、リステリア菌感受性として知られるA/Jマウス⁶⁾にカゼインあるいは大豆たん白質を摂取させた検討も行った。

方 法

Caco-2細胞へのリステリア菌侵入性

Caco-2細胞はATCCより入手し、既報⁷⁾に沿って、10%FCS添加MEMおよびVessel 24 wellプレートをを用いて37℃で3日間 (未分化細胞) あるいは13日間 (腸管上皮分化細胞) 5%CO₂環境下で培養した細胞を実験に用いた。その後10 mg/mLのミルクカゼイン加水分解物: トリプトン (TP) あるいは大豆たん白質加水分解物: ファイトンペプトン (PP) を含む培地と交換し、24 h培養後に10⁷ cfuの *Listeria monocytogenes* CIP101821 (Lm) を懸濁したMEMと交換し、さらに2 h培養した。培養液を回収後、50 µg/mLのゲンタマイシンを含む培地で1 h処理し細胞外のLmを除去した。さらに生理食塩水 (PBS) で3回洗浄後、1% トライトンX-100を含むPBSで10 min処理し細胞内に侵入したLmを懸濁させ、すみやかにPALCAM寒天培地を用いて常法どおり生菌数を求めた。

A/Jマウスの経口投与と感染に対するたん白質の影響

リステリア感受性マウスを用いた経口感染実験はCzuprynskiらの方法⁶⁾に沿って行った。すなわち、A/

Jマウス4週齢♀12匹にAIN-76 (Table 1) および滅菌水を自由摂取させ7日間予備飼育した。マウスを2群に分け、一方にはそのままAIN-76 (カゼイン20%食: CD) を、もう一方にはカゼインを大豆たん白質に置き換えた食事 (大豆たん白質20%食: SPD) を摂取させた。試験食開始7日後に給餌を5 h中止し、ペントバルビタール酸Na (1 mg/25 g体重) を腹腔投与した。軽く麻酔のかかった状態のマウスに10⁷ cfu/mL PBSのLm Scott A懸濁液0.2 mLを経口投与した。その後、各試験食で3日間飼育後にCO₂ガスで安楽死させ、肝臓および脾臓を無菌的に摘出しPBSとホモジネート後、Lm菌数をPALCAM寒天培地を用いて測定した。また、このホモジネートに含まれるTNF- α およびIFN- γ を市販のELISAキットを用いて測定した。

Table 1. Composition of the test diets (g/100g)

	Casein	Soy protein
Casein	20	
Soy protein		20
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn oil	5.0	5.0
Corn starch	20	20
Sucrose	50	50
AIN-76 Mineral mixture	3.5	3.5
AIN-76 Vitamin mixture	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2

結果と考察

Caco-2細胞へのリステリア菌侵入性

Caco-2未分化細胞および分化細胞へのLm侵入に対する各たん白質加水分解物の影響をFig. 1に示す。Caco-2細胞へ侵入したLmの菌数は10⁵ cfu/well程度で、未分化細胞においては差は認められなかったが、分化細胞においてはカゼイン加水分解物 (TP) によってLm侵入が促進される傾向であった。ヒト腸管上皮細胞のモデルとしてCaco-2はよく用いられており、長期の培養によって腸管側および基底側が形成され、絨毛も生じるなど、より腸管上皮細胞と類似した形質となる。Lmの侵入性や毒性に関するたん白質 (inlA, prfA) は短期培養の未分化細胞でもその性状を示すが⁸⁾、Lmの侵入や乳酸菌の付着では未分化と分化細胞で差がある^{9, 10)}。今回の実験でも14日間培養した分化細胞での結果が実際の生体内での反応と相関していると考えられる。

A/Jマウスの経口投与感染に対するたん白質の影響

各たん白質の摂取による体重への影響は認められなかった (Table 2). Lm投与初日に1匹 (カゼイン食群) 死亡した. この個体については, その防止として半麻酔下でLmを投与しているものの⁶⁾, 投与直後のおう吐物が肺に入ったためと考えられる. その他のマウスはLm投与後体重の減少が認められたが, 解剖時まで生存した. 解剖時の肝臓および脾臓重量は大豆たん白食群で大きい傾向であった.

感染したLmの菌数は大豆たん白食群において低い傾向であり (Fig. 2), 上記の*in vitro*の結果と一致した. 炎症性のサイトカインとされるTNF- α の脾臓組織中の濃度は大豆たん白食群で有意に低く (Fig. 3), またIFN- γ についても同様の傾向が認められ, これらの結果は感染した菌数と相関しているものと考えられる.

大豆たん白質による病原菌の付着抑制に関して, Yang et al.¹¹⁾はCaco-2への*Salmonella typhimurium*侵

入をコングリシニン加水分解物が抑制したことを報告している. 一方, 牛乳のたん白質はシリカ表面へのLm付着を促進することが報告されている¹²⁾. 本研究での感染菌数や炎症性サイトカイン濃度の結果はこれらの報告とも一致しており, 大豆たん白質の摂取はリステリア感染のリスクを軽減させることを示唆するものと考えられる. しかし, より明確な結果を得るための濃度依存性試験や, 抑制のメカニズムに関して, 今後, より詳細な検討が必要と考えている.

Table 2. Body, spleen and liver weight of the experimental mice

	Casein	Soy protein
Body weight (g)		
Initial	16.3 $\pm$ 0.8	16.8 $\pm$ 1.0
7 days	17.8 $\pm$ 0.7	17.8 $\pm$ 1.1
After infection 3 days	15.7 $\pm$ 2.0	15.8 $\pm$ 2.0
Liver weight (mg)	956 $\pm$ 108	1018 $\pm$ 161
Spleen weight (mg)	85 $\pm$ 8	98 $\pm$ 14

Values are mean $\pm$ SD of five (Casein) or six (Soy protein) mice.

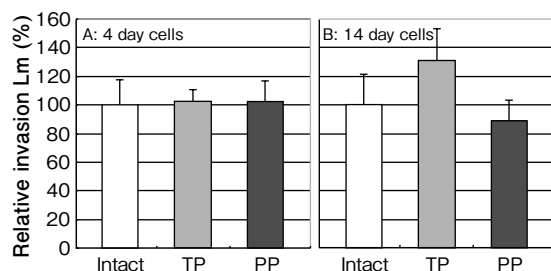


Fig. 1. Effect of digested casein: Tryptone (TP) and soy protein: Phyton peptone (PP) on invasion of *Listeria monocytogenes* (Lm) to undifferentiated (A) and differentiated (B) Caco-2 cells. Values are mean $\pm$ SEM ($n=4$).

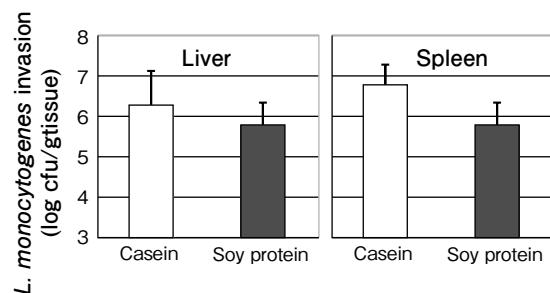


Fig. 2. Effect of casein or soy protein diet on oral *Listeria* infection. Mice were fed 20% casein ($n=5$) or soy protein diet ($n=6$) for 7 days and were infected. After 3 days, Lm number in liver and spleen was calculated. Values are mean $\pm$ SEM.

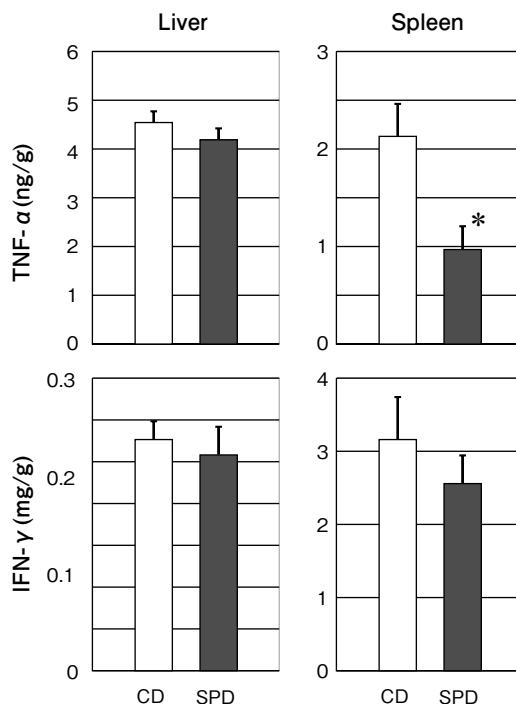


Fig. 3. Effect of casein or soy protein diet on liver and spleen TNF- α and IFN- γ in oral Lm infected mice. Mice were fed 20% casein (CD: $n=5$) or soy protein diet (SPD: $n=6$) for 7 days and were infected. Values are mean $\pm$ SEM.

要 約

リステリア・モノサイトジェネス *Listeria monocytogenes* (Lm) は欧米において発酵ソーセージ、チーズ、サラダなどの非加熱喫食 (Ready to Eat: RTE) 食品を介して多くの罹患者を出し、妊婦や老人など免疫弱者では重篤な症状をもたらす。一方、わが国でリステリア食中毒とされた事例は一例のみにとどまるが、ネギトロやイクラなど水産RTE食品からもLmが高率 (5 ~ 13%) で検出されることが報告されている。本研究においては大豆たん白質摂取のLm感染予防における有効性を検討することを目的とし、Caco-2細胞へのLmの侵入性に対するミルクカゼイン加水分解物 (トリプトン: TP) および大豆たん白加水分解物 (ファイトンペプトン: PP) の影響を検討した。またLm感受性として知られるA/Jマウスを用いた検討も行った。4日間培養した未分化Caco-2に対するたん白加水分解物の影響はみられなかったが、14日間培養し、腸管上皮細胞に分化したCaco-2へのLm侵入はTPによって促進される傾向であった。カゼインあるいは大豆たん白質を20%含有する食事を7日間摂取させたA/Jマウスに 10^7 cfu のLmを経口投与した場合、脾臓組織中のLm感染菌数は大豆たん白質食群で低い傾向であり、これに伴い炎症性サイトカインTNF- α の濃度は有意に低かった。これらの結果は大豆たん白質の摂取がLm感染のリスクを軽減させる可能性を示唆するものと考えられる。

文 献

- 1) Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM and Tauxe RV (1999): Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, **5**, 607-625.
- 2) Makino SI, Kawamoto K, Takeshi K, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S and Igimi S (2005): An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int J Food Microbiol*, **104**, 189-196.
- 3) Handa S, Kimura B, Takahashi H, Koda T, Hisa K and Fujii T (2005): Incidence of *Listeria monocytogenes* in raw seafood products in Japanese retail stores. *J Food Prot*, **68**, 411-415.
- 4) FAOSTAT Data Archives – Supply Utilization Account (2002).
- 5) 服部 誠 (2006): 大豆たん白質加水分解物の腸管感染予防効果の解析。大豆たん白質研究, **9**, 77-81.
- 6) Czuprynski CJ, Faith NG and Steinberg H (2003): A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. *Infect Immun*, **71**, 682-689.
- 7) Rousseaux S, Olier M, Lemaitre JP, Piveteau P and Guzzo J (2004): Use of PCR-restriction fragment length polymorphism of *inlA* for rapid screening of *Listeria monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 2180-2185.
- 8) Handa-Miya S, Kimura B, Talahashi H, Sato M, Ishikawa T, Igarashi K and Fujii T (2007): Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan. *Int J Food Microbiol*, **117**, 312-318.
- 9) Velge P, Bottreau E, Van-Langendonck N and Kaefter B (1997): Cell proliferation enhances entry of *Listeria monocytogenes* into intestinal epithelial cells by two proliferation-dependent entry pathways. *J Med Microbiol*, **46**, 681-692.
- 10) Chauviere G, Coconnier MH, Kerneis S, Fourniat J and Servin AL (1992): Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J Gen Microbiol*, **138**, 1689-1696.
- 11) Yang B, Lv Y, Chen Y, Wang J, Tang W and Guo S (2008): Inhibitory action of soybean beta-conglycinin hydrolysates on *Salmonella typhimurium* translocation in Caco-2 epithelial cell monolayers. *J Agric Food Chem*, **56**, 7522-7527.
- 12) al-Makhlafi H, McGuire J and Daeschel M (1994): Influence of preadsorbed milk proteins on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hydrophobic and hydrophilic silica surfaces. *Appl Environ Microbiol*, **60**, 3560-3565.