

調査・資料

嘔吐毒産生性セレウス菌検出イムノクロマトキットの評価

(平成24年5月28日受理)

中山素一¹ 宮下 隆² 細谷幸一¹ 人見 潤¹ 佐藤美紀² 須永幸恵²
 重松康彦² 小笠原 準³ 竹中重幸⁴ 濱崎光宏⁴ 堀川和美⁴
 磯部順子⁵ 小西良子⁶ 鎌田洋一^{6,*}

Evaluation of the Immunochromatography Kit for Detection of
Bacillus cereus Producing Emetic Toxin

Motokazu NAKAYAMA¹, Takashi MIYASHITA², Kouichi HOSOYA¹, Jun HITOMI¹, Miki SATO², Yukie SUNAGA²,
 Yasuhiko SHIGEMATSU², Jun OGASAWARA³, Shigeyuki TAKENAKA⁴, Mitsuhiro HAMASAKI⁴,
 Kazumi HORIKAWA⁴, Junko ISOBE⁵, Yoshiko SUGITA-KONISHI⁶ and Yoichi KAMATA^{6,*}

¹Kao Corporation: 2606 Akabane, Ichikai-machi, Haga-gun, Tochigi 321-3497, Japan;

²Kewpie Corporation: 5-13-1 Sumiyoshi-cho, Fuchu, Tokyo 183-0034, Japan;

³Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences:

8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan;

⁴Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences:

39 Mukaisano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan;

⁵Toyama Institute of Health: 17-1 Nakataikoyama,
 Imizu, Toyama 939-0363, Japan;

⁶National Institute of Health Sciences:

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

* Corresponding author

We evaluated the sensitivity and specificity of an immunochromatography kit, Single-path Emetic Tox Mrk (Merck), which targets a marker protein for the detection of *Bacillus cereus* that produces emetic toxin. Strains were isolated after outbreaks of food poisoning, and from retail prepared foods and food products. The strains were examined for the presence of the emetic toxin-synthetase gene by PCR. All 58 emetic strains isolated from the food poisoning cases showed a positive reaction in the immunochromatography kit. No emetic strains gave false negative result. Among 47 non-emetic strains, only two strains isolated from the food poisonings and one strain isolated from food products showed a false positive reaction in the test. We concluded that this method has high sensitivity and specificity. The test can be used for detection of emetic toxin-producing *B. cereus* not only from food poisoning cases, but also in food products.

(Received May 28, 2012)

Key words: セレウス菌 *Bacillus cereus*; 嘔吐毒 emetic toxin; セレウリド cereulide; イムノクロマト immunochromatography; 食中毒 food poisoning; スクリーニング Screening

* 連絡先 ykamata@nihs.go.jp

¹花王株式会社 安全性評価研究所 〒321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606

²キューピー株式会社 研究所 〒183-0034 東京都府中市住吉町5-13-1

³大阪市立環境科学研究所 〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34

⁴福岡県保健環境研究所 〒818-0135 福岡県太宰府市大字向佐野39

⁵富山県衛生研究所 〒939-0363 富山県射水市中太閤山17-1

⁶国立医薬品食品衛生研究所 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

緒 言

セレウス菌は *Bacillus* 属に属するグラム陽性菌であり、食中毒細菌の1種である。2010年の厚生労働省の食中毒統計によると、細菌性食中毒事例580件のうち、セレウス菌食中毒は15件(3%)を占めており^{*1}、2008年には死亡事例も報告されている¹⁾。セレウス菌は土壌に広く分布しており^{2), 3)}、食品や食品工場を汚染する。また本菌は熱や

*1 厚生労働省 食中毒資料 (2) 過去の食中毒発生状況 平成22年 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>

薬剤に高い耐性を示す芽胞を形成し、加熱殺菌した加工食品からも芽胞は検出される場合がある。

セレウス菌食中毒は、エンテロトキシン（下痢原性毒素）産生株による下痢型と、嘔吐毒産生株による嘔吐型の2型がある⁴⁾。嘔吐毒は極めて高い耐熱性を有し、一度食品中に産生されると通常の加熱条件では失活されず残存する。

今般、世界各国からさまざまな食品原料が輸入されており、受け入れ時セレウス菌数は少数であっても、加工工程、食品の保管・流通過程で発芽・増殖し、毒素産生が認められた場合、最終段階で加熱処理を行っても嘔吐毒の残存が危惧される。このため今後、嘔吐毒のリスク評価は食品業界においても重要となってくる。

嘔吐毒はアミノ酸とオキシ酸からなる環状の疎水性低分子ペプチド（分子量1,191.6）であり^{5), 6)}、抗体作製が困難である。質量分析器による嘔吐毒検出法が報告されているが、本検出機器は高価であり、また食品や食品原料からの嘔吐毒抽出操作も煩雑であり汎用性に乏しい⁷⁾。そこで、食品や食品原料に存在する嘔吐毒産生株を検出する方法が注目されている。嘔吐毒産生株はデンプン分解性陰性を示すものが多く、また本毒産生性は巨大プラスミドにコードされており、嘔吐毒（セレウリド）合成遺伝子（CSR）をPCR法で確認する方法が知られている⁸⁾。PCR法は安定性や再現性に優れているが、サーマルサイクラーなどの機器を準備しなければならず、スクリーニング法としては汎用性に乏しい。

今回発売された、メルク社製の「シングルパス・エメティックトキシンマーカー」は、嘔吐毒マーカータンパク質をイムノクロマト法で検出するものである¹⁰⁾。これまで、ヨーロッパにおける食中毒事例株の評価と日本での農産物由来株の評価において、その有効性は検証されている⁹⁾。しかし、検証に用いられた菌株に関しては、その起源、由来、分布地域など偏りがあり、同キットが普遍的に評価されたとは言い難い。分離源の異なる多くの菌株、とくにわが国で発生した食中毒事例分離株について評価を行うことが重要である。そこで今回、4か所の府・県・市立衛生研究所において、食中毒事例由来株について本キットの妥当性を検証した。さらに、各種食品分離セレウス菌株についても検証を行ったので報告する。

実験方法

1. 菌 株

①食中毒事例由来菌株

今回用いたセレウス菌株は、福岡県、大阪府、大阪市、および富山県で発生した食中毒事例、および苦情事例からの分離で、TaKaRa社製セレウリド合成酵素（CSR）遺伝子検出用プライマーで陽性反応を示したものを、嘔吐毒合成酵素遺伝子陽性菌（以下嘔吐毒遺伝子陽性菌）とし、嘔吐毒遺伝子陽性菌58株、同遺伝子陰性菌26株である（計84株）。

これらの菌株の由来は、ヒト（患者、原因施設の従業員）分離菌39株、食品および原因施設のふき取り分離36株、および不明6株である（計81株）。

②食品由来菌株

食品由来菌株としては、市販の調理食品から分離されたセレウス菌21株を用いた。食中毒事例株と同様、これらの菌株についても、TaKaRa社製セレウリド合成酵素（CSR）遺伝子検出用プライマーを用いるPCR法により、嘔吐毒遺伝子保有の有無を検討した。

2. 試 薬

①1%ブドウ糖添加CGY培地

嘔吐毒マーカータンパク質検出用培地として、1%ブドウ糖添加Casein-Glucose-Yeast Extract (CGY) 培地（メルク）を用いた。

②嘔吐毒マーカータンパク質検出イムノクロマトキット

嘔吐毒マーカータンパク質検出イムノクロマトキットとして金コロイド標識抗体を用いたイムノクロマトキット（シングルパス・エメティックトキシンマーカー、メルク、以下イムノクロマトキット）を用いた。

3. 試験方法

冷凍あるいは室温保管セレウス菌株をNGKG寒天培地（日水製薬）、普通寒天培地（日水製薬）で30、35あるいは37℃で16～24時間の前培養を行い、典型的集落を1%ブドウ糖添加CGY培地に接種し、30、35ないし37℃18～20時間増菌培養を行った。各菌株の培養液を室温まで冷却後、その150 μLを本イムノクロマトキットに滴下し、室温で30分間放置後、目視で検出バンドの有無を確認した。

4. イムノクロマトの感度および特異性

本イムノクロマトキットのような病原性因子の存否を示す検出キットの妥当性を判断する指標に、感度と特異性がある。感度は病原性因子が存在する場合に、検出キットが正しく陽性を示す割合をいい、特異性は病原性因子が存在しない場合に、正しく陰性を示す割合をいう。感度および特異性は以下の式で計算される。

$$\text{感度 (\%)} = \frac{\text{真陽性}}{\text{真陽性} + \text{擬陰性}} \times 100$$

$$\text{特異性 (\%)} = \frac{\text{真陰性}}{\text{真陰性} + \text{擬陽性}} \times 100$$

食中毒事例由来株および食品由来株について、真陽性（遺伝子検査陽性・イムノクロマト陽性）、擬陽性（遺伝子検査陰性・イムノクロマト陽性）、真陰性（遺伝子検査陰性・イムノクロマト陰性）、および擬陰性（遺伝子検査陽性・イムノクロマト陰性）を示す菌株数を集計し、本イムノクロマトキットの感度および特異性を求めた。

5. HEp-2細胞空胞化試験によるセレウス菌嘔吐毒の検出

本イムノクロマトキットで陽性と判定された菌株について、Szaboらの方法¹⁰⁾により嘔吐毒産生能を調べた。10%スキム培地に菌株を接種し、30℃ 24時間振とう培養

(150 rpm) 後, 121°C 15分間の滅菌後, フィルター (0.45 µm) をろ過したものを試験用検液とした. 組織培養用 96 ウェルプレートを用いて, 被検液を2段階階連続希釈した (25 µL/well). 1% ウシ胎児血清を含んだ Basal Eagle Medium で HEp-2 細胞 (ヒューマンサイエンス振興財団) をけん濁 (1×10^6 細胞/mL) 後, 希釈した検液の入ったウェルに細胞けん濁液を分注 (0.1 mL/well) し, 37°C 18 時間, CO₂ インキュベータ内で反応させた. 陽性対象として, 市販のセレウス菌嘔吐毒 (BioControl, 名古屋市) を用いた. 本嘔吐毒の純度は, HPLC チャート上 90% 以上であり, HEp-2 細胞における空胞変性効果が確認されている. 被検液を反応させた 48 時間後に細胞を観察し, 細胞質内に空胞が形成されているものを陽性と判断した.

結 果

1. 食中毒事例由来株

PCR 法で CSR 遺伝子保有菌株と判定された 56 株は, 本イムノクロマトキットですべて陽性であった. 一方, CSR 遺伝子検査では陽性反応が検出されなかった嘔吐毒素遺伝子陰性株 26 株中, 24 株は本イムノクロマトキットが陰性であったが, 富山県衛生研究所分離の 2 株 (T2011-2 株および T2011-4 株) は本キット陽性反応を示した (Table 1). これら 2 株は, 食中毒検査時に食品から分離されたものであるが, 食中毒の原因菌はセレウス菌以外のものであった. 本イムノクロマトキットの成績と食中毒事例時の菌分離由来 (ヒト, 食品, ふき取り検査) との間には, 特徴ある関係は見いだせなかった (Table 1).

嘔吐毒遺伝子陰性でイムノクロマトキット陽性の 2 株 (T2011-2 および T2011-4 株), および嘔吐毒遺伝子陽性・イムノクロマトキット陽性の 3 株 (大阪府立公衆衛生研究所保管株) の, 培養液中の嘔吐毒の有無を HEp-2 細胞空胞化試験で検証した. 嘔吐毒遺伝子陽性・イムノクロマトキット陽性 3 菌株の培養液は, それぞれ 1,024 ~ 2,048 倍希釈液まで空胞を誘導させたが, 当該の T2011-2 および T2011-4 株は 2 倍希釈においても HEp-2 細胞に空胞変性をもたらさなかった.

2. 食品由来株

市販の調理食品分離 13 株, 卵加工品からの 8 株は, PCR 法による嘔吐毒遺伝子はすべてが陰性だった. 一方, 本イムノクロマトキットでは 20 株が陰性を示したが, 卵加工品から分離した 1 株が陽性を示した (Table 2).

3. イムノクロマトの妥当性

食中毒事例由来株および食品由来株について, 真陽性, 擬陽性, 真陰性, および擬陰性の菌株数を集計し (Table 3), 本イムノクロマトキットの感度および特異性を求めた. その結果, 食中毒事例由来株の感度は 100%, 特異性は 92.3% となった (Table 4). 食品由来株については陽性株がなく, 感度は計算できなかった. 食品由来株についての特異性は 95.3% を示した. 全体の感度は 100%, 特異性は 93.6% と計算された.

考 察

食中毒事例に由来し, 嘔吐毒遺伝子を持つセレウス菌 58 株について, イムノクロマトキットの有効性を試験した. 検定した 58 株すべてがイムノクロマト陽性となり, 本イムノクロマトキットが嘔吐毒遺伝子を保有するセレウス菌を検出することについて有効であることが示された. 食中毒事例由来であるが, 嘔吐毒遺伝子をもたない 21 菌株では, 2 株が本イムノクロマト陽性となり, 残りは陰性を示した. 当該の 2 株が毒素を産生するか否か検討した. 同 2 株の培養液は HEp-2 細胞に空胞化変性を示さず, 同 2 株に嘔吐毒産生は認められなかった. この結果の原因の 1 つとしては, 本イムノクロマトキットに用いられている抗体が, 非特異的にセレウス菌体や菌体代謝産物などに反応していることが考えられる. 本イムノクロマトキットは, 嘔吐毒素産生菌の菌体表層に特異的な部位, もしくは嘔吐毒産生株のみが産生する代謝産物が存在して初めて成り立つ検査法である. メーカーによれば本イムノクロマトキットが検出するのは嘔吐毒素産生株の産生する代謝産物とされているが, 詳細は明らかにされていない. 今後, 抗体の反応する抗原が何であるかが明らかになり, 擬陽性の発生メカニズムが明らかになることが望まれる.

本イムノクロマトキットの妥当性を検証したところ, 感度 100% を示した. この結果は, 本イムノクロマトキットは嘔吐毒遺伝子を保有するセレウス菌を 100% 検知できることを示している. 本イムノクロマトキットは嘔吐毒遺伝子保有セレウス菌を確実に検出できるので, 本キットの利用により, 嘔吐毒産生性セレウス菌を含む食品を流通システムから排除できると考えられる. 一方, 試験に用いた食品由来のセレウス菌 21 株は, すべて嘔吐毒遺伝子を保有していなかったにもかかわらず, そのうちの 1 株が本イムノクロマトで陽性となり, 食品由来株における本キットの特異性は 95.3% となった. この結果は, 本イムノクロマトキットは, 4.7% の確率で, 嘔吐毒合成酵素遺伝子をもたないセレウス菌を, 嘔吐毒を産生するセレウス菌と誤判断する可能性を示している. 本イムノクロマトの結果に基づいて食品を取捨選択した場合, 約 5% の食品の損失にはなるものの, セレウス菌食中毒発生の危険性のない食品のみを流通システムに供給することが可能となる.

今回は分離菌を培地で純粋培養し増菌させ評価を行ったが, メーカーのプロトコールによれば食品試料を 10 g, 1% ブドウ糖添加 CGY 培地 90 mL に直接添加し検査することも可能とされている. 食品成分の影響に関してはこれまでに反応を妨害した食品成分はないとされているが, 検討した食品成分はミルク, パスタ, 米飯と少ない. 安形により食品成分の嘔吐毒素産生量に対する影響が報告されており⁷⁾, 今後さらに種々の食品成分の影響に関する精査が必要だと思われる. また, 使用する培地についてメーカーは 1% ブドウ糖添加 CGY 培地を推奨しているがその理由は明確にされておらず, 上田らの報告⁹⁾ において 10% スキム培地でも毒素産生株はすべて陽性となっている. しか

Table 1. Relationship between immunochromatographic and PCR test results of *Bacillus cereus* of various origins

| Case | Causative bacterium | Origin | Institute | Number of strains | | | | Name of isolate | |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|------------------|-------------------|----------|----------|----------------------|-----------------|----------|
| | | | | Tested | PCR | | Immunochromatography | | |
| | | | | | Positive | Negative | Positive | | Negative |
| Food poisoning | <i>B. cereus</i> | Human (Patient, employee) | Fukuoka | 5 | 5 | | 5 | | |
| | | | Osaka Prefecture | 7 | 7 | | 7 | | |
| | | | Osaka City | 9 | 8 | | 8 | | |
| | | | | | | 1 | | 1 | |
| | | | Toyama | 2 | 2 | | 2 | | |
| | | Food, manufacturing, environment | Fukuoka | 13 | 13 | | 13 | | |
| | | | Osaka Prefecture | 1 | 1 | | 1 | | |
| | | | Unknown | Osaka Prefecture | 2 | 2 | | 2 | |
| | | <i>B. cereus</i> and <i>S. aureus</i> | Unknown | Osaka Prefecture | 4 | 2 | | 2 | |
| | | | | | | | 2 | | 2 |
| Others | Human (Patient, employee) | Osaka City | 1 | | 1 | | 1 | | |
| | | Food, manufacturing, environment | Osaka Prefecture | 1 | 1 | | 1 | | |
| | | Osaka City | 5 | 5 | | 5 | | | |
| Not identified | Human (Patient, employee) | Osaka City | 2 | 1 | | 1 | | | |
| | | | | | 1 | | 1 | | |
| | | Toyama | 2 | 2 | | 2 | | | |
| | | Food, manufacturing, environment | Osaka City | 3 | 3 | | 3 | | |
| | | Toyama | 2 | | 2 | 2 | T2011-2, T2011-4 | | |
| Complaint (with symptoms) | Not identified | Human (Patient, employee) | Osaka Prefecture | 9 | 8 | | 8 | | |
| | | | | | | 1 | | 1 | |
| | | | Toyama | 2 | | 2 | | 2 | |
| | | Food, manufacturing, environment | Osaka Prefecture | 1 | | 1 | | 1 | |
| | | | Toyama | 5 | | 5 | | 5 | |
| Complaint (without symptoms) | Not identified | Food, manufacturing, environment | Osaka Prefecture | 1 | 1 | | 1 | | |
| | | | | | | | | | |
| Regular examination | — | Food, manufacturing, environment | Osaka Prefecture | 4 | 4 | | 4 | | |

Table 2. Reactivity of *Bacillus cereus* isolated from foods in PCR and immunochromatography

| Origin | Tested | Number of strains | | | |
|-----------------------|--------|-------------------|----------|----------------------|----------|
| | | PCR | | Immunochromatography | |
| | | Positive | Negative | Positive | Negative |
| Retail prepared foods | 13 | | 13 | | 13 |
| Egg products | 8 | | 8 | 1 | 7 |

Table 3. Reactivity of *Bacillus cereus* in PCR and immunochromatography

| Reactivity | | Number of strains isolated from | | Total |
|------------|----------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------|
| PCR | Immunochromatography | Food poisoning cases | Prepared food and egg products | |
| + | + | 58 | 0 | 58 |
| + | - | 0 | 0 | 0 |
| - | + | 2 | 1 | 3 |
| - | - | 24 | 20 | 44 |

Table 4. Sensitivity and specificity of the immunochromatography kit for detection of emetic type *Bacillus cereus*

| Category of <i>B. cereus</i> | Sensitivity (%) | Specificity (%) |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| Food poisoning | 100 | 92.3 |
| Prepared foods and food products | — | 95.3 |
| Total | 100 | 94.0 |

しながら、上田らの報告において毒素産生能と抗体反応の強さに相関が見られない菌株も存在し、やはり嘔吐毒素の代謝経路の詳細、本イムノクロマトキットに用いられている抗体が反応する抗原が判れば増菌培地についてさらなる改良も可能だと思われる。

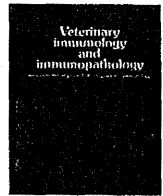
結論として、本イムノクロマトキットは、食中毒検査現場での嘔吐毒素産生セレウス菌分離を容易にする方法として利用できるだけでなく、食品企業における、食材や調理食品中の嘔吐毒産生性セレウス菌をスクリーニングする方法としても利用できると思われる。

謝 辞

本調査を遂行するにあたり、試験を実施し成績をご提供くださいました大阪府立公衆衛生研究所の河合高夫博士に深謝いたします。また、有益なご助言を賜りました名古屋市衛生研究所微生物部の安形則雄博士、九州大学大学院農学研究院の宮本敬久教授に心より感謝申し上げます。本調査報告は、政策創薬総合研究「病原微生物の抗病原性タンパク質抗体を用いた新規検査法の開発とその医療・公衆衛生への応用研究」の補助のもと、実施されました。

文 献

- 1) Shiota, M. *et al.* Rapid detoxication of cereulide in *Bacillus cereus* food poisoning. *Pediatrics*, **125**, e951-e955 (2010).
- 2) 上田成子ほか. 野菜類および土壌における *Bacillus cereus* と *B. thuringiensis* の分布について. *Nihon Syokuhin Biseibutsu Gakkai Zasshi* (Jpn. J. Food Microbiol.), **7**, 177-182 (1991).
- 3) 品川邦汎. *Bacillus cereus* と *Bacillus thuringiensis*. *Nihon Syokuhin Biseibutsu Gakkai Zasshi* (Jpn. J. Food Microbiol.), **9**, 41-49 (1992).
- 4) Turnbull, P. C. B. *et al.* Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxin of *Bacillus cereus*. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 219-228 (1976).
- 5) Agata, N. *et al.* A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, **121**, 31-34 (1994).
- 6) Agata, N. *et al.* Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Current Microbiology*, **33**, 67-69 (1996).
- 7) 安形則雄ほか. *Bacillus cereus* の食中毒毒素. *Nihon Saikingu Zasshi*, **51**, 993-1002 (1996).
- 8) Agata, N. *et al.* Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various food. *Inter. J. Food Microbiol.*, **73**, 23-27 (2002).
- 9) Ueda, S. *et al.* Rapid identification of emetic *Bacillus cereus* by immunochromatography. *Biocontrol Sci.*, **16**, 41-45 (2011).
- 10) Szabo, R. *et al.* Cell culture detection and conditions for production of a *Bacillus cereus* heat-stable toxin. *J. Food Prot.*, **54**, 272-276 (1991).
- 11) 上田成子. 細菌性食中毒講座⑦ *Bacillus cereus*. *J. Antibact. Antifung. Agents*, **25**, 656-669 (1997).



Research paper

Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and guanylin on the barrier integrity of intestinal epithelial T84 cells

Ryo Nakashima^a, Yoichi Kamata^b, Yoshikazu Nishikawa^{a,*}

^a Graduate School of Human Life Science, Osaka City University, Sugimoto 3-3-138, Osaka 558-8585, Japan

^b Division of Microbiology, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Tokyo 158-8501, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Enterotoxin
Intestinal barrier
Tight junction

ABSTRACT

Tight junctions contribute to the formation and establishment of intestinal epithelial barriers against microbial infections. However, a variety of enteric pathogens have developed strategies to adhere to and invade epithelial cells and disrupt epithelial integrity. The aim of this study was to ascertain if enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) can cause deterioration of epithelial barrier integrity. Since STa shows amino acid similarity to guanylin, we evaluated the effects of both of these molecules on T84 epithelial cells. T84 epithelial monolayers were grown on 24-well Transwell filters and barrier integrity was assayed by measurement of transepithelial electrical resistance (TER). Macromolecular permeability of the monolayers was determined by measuring the paracellular passage of FITC-labeled dextran 4000 from apical to basolateral compartments of the Transwell filter culture. Treatment of T84 monolayers with either ST or guanylin did not increase paracellular permeability to FITC-dextran. However, although guanylin, which is a physiological guanylate cyclase activator, did not change TER in polarized T84 monolayers, ST did elicit a reduction in TER within 2 h, at concentrations above 4 μ M. These data suggest that STa causes not only induction of water secretion but also intestinal barrier dysfunction.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Escherichia coli (*E. coli*) is the predominant facultative anaerobe of human colonic flora. Generally, most of the *E. coli* strains in the intestinal lumen of healthy people are harmless. However, some *E. coli* clones are virulent and can cause a spectrum of diseases such as sepsis, urinary tract infection, and diarrheal disease. Enterotoxigenic

E. coli (ETEC) are some of the best-known diarrheagenic *E. coli* in both livestock and humans (Croxen and Finlay, 2010; Turner et al., 2006). These organisms colonize intestinal mucosa using species-specific colonization factors. However, heat-labile enterotoxin (LT) and heat-stable enterotoxin (STa) are present in both animal and human ETEC strains. LT and STa cause an increase in intraepithelial cAMP and cGMP levels, respectively, and subsequently mediate decreased absorption of sodium and chloride ions, and increased secretion of bicarbonate and chloride ions, via activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (Fasano, 1999). Thus, ETEC cause watery diarrhea by changing epithelial function from absorption to secretion.

Tight junctions (TJ) of intestinal epithelial cells contribute to the formation and establishment of barriers between the intestinal lumen and subepithelial tissues. However, a variety of enteric pathogens have developed

Abbreviations: DEC, diarrheagenic *E. coli*; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; STa, heat-stable enterotoxin; TJ, tight junction; TER, transepithelial electrical resistance; LT, heat-labile enterotoxin; EGTA, ethylene glycol tetra acetic acid.

* Corresponding author at: Department of Food and Human Health Sciences, Osaka City University, Graduate School of Human Life Science, 3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585, Japan.
Tel.: +81 6 6605 2910; fax: +81 6 6605 2910.

E-mail address: nishikawa@life.osaka-cu.ac.jp (Y. Nishikawa).

strategies to disrupt epithelial integrity as well as to adhere to and invade the epithelial cells (Bonazzi and Cossart, 2011). For example, *Clostridium perfringens* and *C. difficile* use toxins to induce the deterioration of tight junctions.

A reduction in transepithelial electric resistance and the paracellular passage of FITC-labeled dextran are recognized as indices of the decreased barrier integrity of epithelial cells infected with microbes. The objectives of this study were to assess whether these indices of barrier integrity could be reduced by STa and to compare the effects of STa on these indices with the effects of guanylin. A comparison with guanylin was carried out because the amino acid sequence of STa is functionally similar to that of the physiological modulator guanylin, which is known to activate guanylate-cyclase-C in intestinal epithelial cells and to induce water secretion from epithelia (Taxt et al., 2010).

2. Materials and methods

2.1. Epithelial cell lines

The T84 human colon cell line was routinely maintained in medium containing a 1:1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) and Ham's F-12 (Nissui Pharmaceutical) supplemented with 2 mM L-glutamine, 0.15% NaHCO₃, 5% FBS (Invitrogen, Grand Island, NY), 63 mg/ml penicillin (Sigma, St. Louis, MO), and 100 mg/ml streptomycin (Sigma). The

cells were seeded at high density in 25 cm² polystyrene tissue culture flasks and were maintained in humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C. To generate polarized T84 cell monolayers, approximately 4 × 10⁴ cells were seeded onto 0.33 cm² polystyrene Transwell permeable support cell culture inserts (0.4 μm pore size; Costar) and were grown for 7–9 days. Transepithelial electrical resistance (TER) was calculated as Ω cm² using the electrical resistance measured with a Millicell Electrical Resistance System (Millipore, Bedford, MA) and the surface area of the filter. Monolayers were used for experiments in which TER was increased up to >1000 Ω cm².

2.2. Test for epithelial barrier integrity

T84 cells were seeded on 24-well Transwell polyester cell culture inserts as described above. The growth medium in the apical and basolateral compartments of the Transwell inserts was exchanged for DMEM/F12 (1:1) containing 0.5% FBS. After the medium change, T84 cells were maintained in 5% CO₂ at 37 °C for 2 h for equilibration. Peptides or chemicals were then added into the apical compartment of the Transwell inserts and TER was measured. The background reading of a cell-free control filter was subtracted from sample readings. Ethylene glycol tetra acetic acid (EGTA; Kanto Kagaku, Tokyo, Japan) treatment (4 mM) functioned as a positive control for induction of tight junction dilation and forskolin (Wako, Osaka, Japan) was used

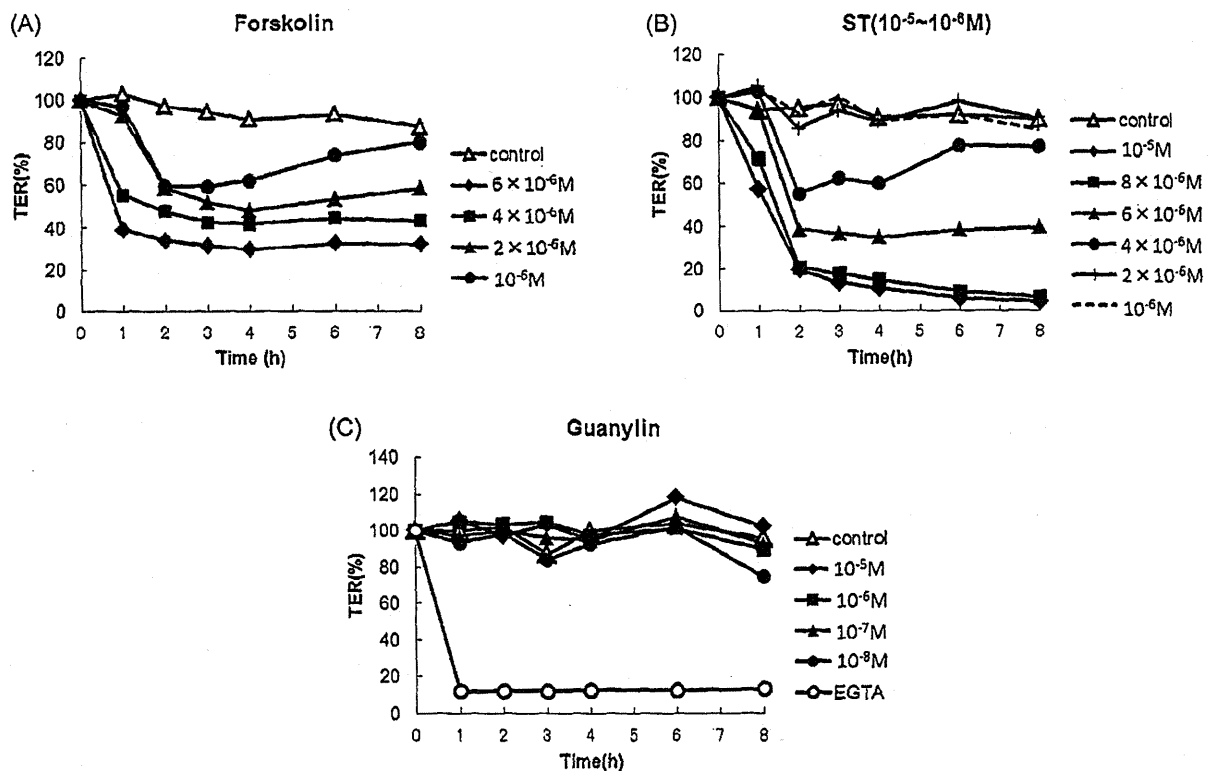


Fig. 1. Effect of forskolin, ST and guanylin on longitudinal changes in transepithelial electrical resistance (TER) through T84 monolayers. Forskolin (A), STa (B), or guanylin (C) were added to T84 monolayers and incubated for the indicated times. TER was then measured using a Millicell Electrical Resistance System (Millipore). Forskolin, an adenylate cyclase activator, was used as a substitute for the heat-labile enterotoxin of ETEC. EGTA, which loosens tight junctions, was used as a positive control.

as a substitute for LT and a positive control for adenylate cyclase activation.

Paracellular macromolecular permeability through T84 cell monolayers was determined by measuring the paracellular passage of FITC-dextran (molecular weight 4 kDa) (Sigma) from apical to basolateral compartments of the Transwell filter culture. The test substance and the FITC-dextran (2 mg/ml) were dissolved in phenol red-free DMEM/F12 (1:1) containing 0.5% FBS and the mixture (150 μ l) was loaded onto the apical side of the monolayer. The FITC-dextran concentration in the basolateral compartment was determined longitudinally on the basis of fluorescence intensity analyzed using a spectrofluorophotometer (Wallac 1420 ARVOSX; PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 535 nm.

2.3. Assay of cGMP

The cGMP level of T84 cells was measured using the Cyclic GMP EIA Kit (Cayman Chemical C., Ann Arbor, MI) after reaction of the cells with the test substance for 4 h.

3. Results and discussion

T84 epithelial monolayers were treated with enterotoxin STa, and its effect on TER was compared

with the effects of the endogenous peptide guanylin. Forskolin, a well-known cAMP inducer, was used as a positive control for decrease in TER (Fig. 1). STa reduced TER within 2 h at doses ranging between 4×10^{-6} and 10^{-5} M, and this reduction was similar to that of forskolin. In contrast, the guanylin, an endogenous guanylate-cyclase-C ligand, showed no effect on TER. Neither STa nor guanylin increased paracellular permeability as assessed by measurement of the paracellular passage of FITC-dextran although, the FITC-dextran did pass through the epithelia in 8 h when EGTA was added as a positive control of TJ dilation (Fig. 2A and B). Not only STa but also guanylin increased cellular cGMP within 4 h at doses between 10^{-6} and 10^{-5} M (data not shown).

T84 epithelial monolayers were reconfirmed as a useful in vitro model for the detection of effectors of TJ. Several studies have shown that toxins often have the ability to dilate TJ and increase paracellular permeability (Guttman and Finlay, 2009; Hofman, 2003; Soong et al., 2008). Both STa and forskolin (Fig. 2C) decreased TER but did not allow the passage of dextran-FITC, suggesting that both of these substances induced a moderate increase in paracellular permeability. In contrast, the physiological substance guanylin increased cGMP to the same level as that induced by STa, but did so without affecting TER. The observed effect of STa on TER is likely to play a role in the pathogenesis of ETEC.

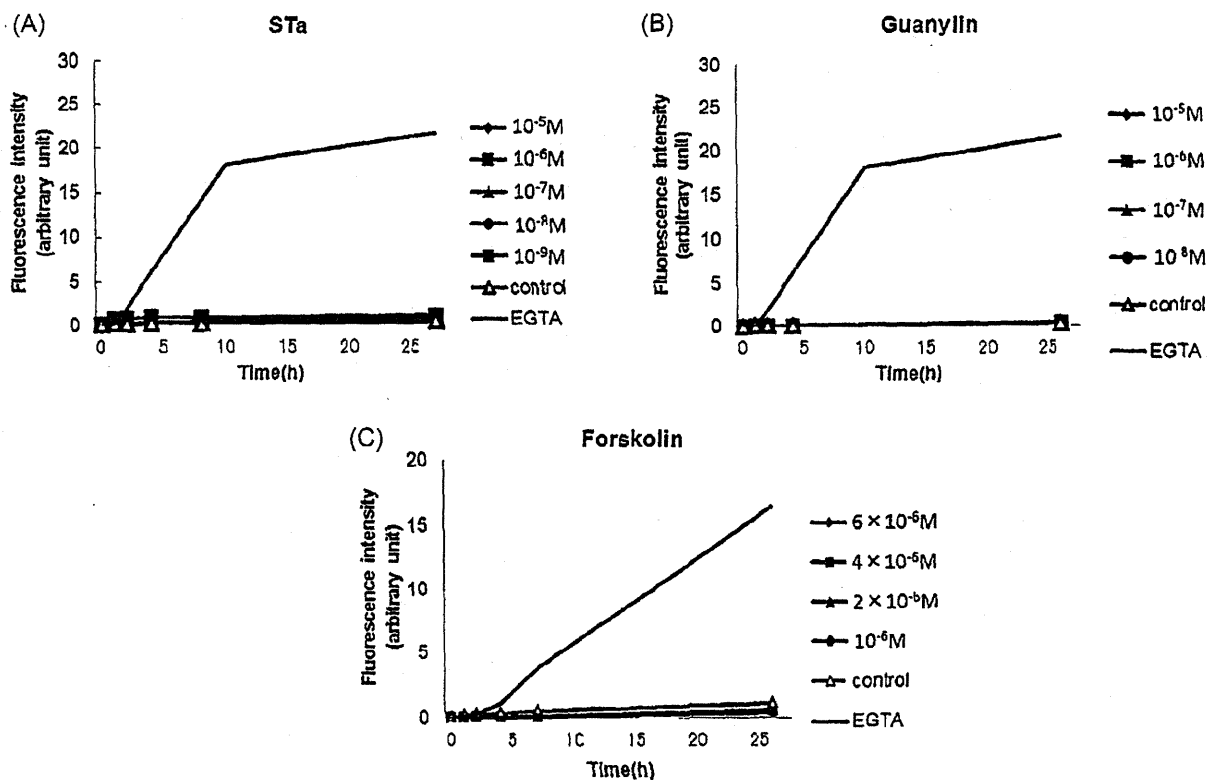


Fig. 2. Effects of ST and guanylin on macromolecular paracellular permeability of T84 monolayers. Cell permeability was longitudinally determined by measuring the paracellular passage of FITC-labeled dextran 4000 from apical to basolateral compartments of the Transwell filter culture after addition of STa (A), guanylin (B) or forskolin (C) to the apical side. EGTA, which loosens tight junctions, was used as a positive control.

It was recently reported that LT could cause not only a reduction in TER but also in the passage of dextran-FITC by disrupting the TJ of T84 cells (Kreisberg et al., 2011); the lack of dextran passage in the forskolin-treated cells would suggest that LT causes barrier permeability for large molecules in an cAMP independent way. On the other hand, STa-producing ETEC organisms did not affect the TER in that study. Since we observed a decrease in TER only when STa was added to T84 cells at doses of more than 4×10^{-6} M, it is possible that the STa-induced reduction of TER may only occur at the limited number of epithelial sites to which the ETEC organisms adhere and at which they elaborate the STa.

4. Conclusion

Although both STa and guanylin induced cellular cGMP production in T84 epithelial monolayers, only STa reduced barrier integrity. The effect of STa on epithelial tight junctions may contribute to enterotoxic activity.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest in connection with this paper.

Acknowledgement

A part of this study was financially supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- Bonazzi, M., Cossart, P., 2011. Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell–cell adhesion during infection. *J. Cell Biol.* 195, 348–357.
- Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38.
- Fasano, A., 1999. Cellular microbiology: can we learn cell physiology from microorganisms? *Am. J. Physiol.* 276, C765–C776.
- Guttman, J.A., Finlay, B.B., 2009. Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 832–841.
- Hofman, P., 2003. Pathological interactions of bacteria and toxins with the gastrointestinal epithelial tight junctions and/or the zonula adherens: an update. *Cell. Mol. Biol.* 49, 65–75.
- Kreisberg, R.B., Harper, J., Strauman, M.C., Marohn, M., Clements, J.D., Nataro, J.P., 2011. Induction of increased permeability of polarized enterocyte monolayers by enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 451–455.
- Soong, G., Parker, D., Magargee, M., Prince, A.S., 2008. The type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function. *J. Bacteriol.* 190, 2814–2821.
- Taxt, A., Aasland, R., Sommerfelt, H., Nataro, J., Puntervoll, P., 2010. Heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* as a vaccine target. *Infect. Immun.* 78, 1824–1831.
- Turner, S.M., Scott-Tucker, A., Cooper, L.M., Henderson, I.R., 2006. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 263, 10–20.

