

厚生労働科学研究補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生微生物および試験法に関する研究

平成25年度

分担研究報告書

ウエルシュ菌食中毒発現機構の解析

大阪府立大学大学院

三宅 眞実

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素の直接試験法の研究」

分担研究報告書

ウエルシュ菌食中毒発現機構の解析

分担研究者 三宅 眞実 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 教授

協力研究者 安木 眞世 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 助教

研究要旨：ウエルシュ菌は大規模型の食中毒を起こす。検査法は確立されているが、食中毒発生メカニズムには不明のことが多い。特に、腸管内での菌増殖、芽胞形成、毒素産生機構はほとんど研究されていない。本厚生労働科学研究で、新領域であるウエルシュ菌の腸管内増殖機構について、特にウエルシュ菌の芽胞形成に着目し研究を展開してきた。それは、芽胞形成は菌のエンテロトキシン産生と共制御されており、芽胞形成を抑制すれば食中毒発症を抑制することに繋がるからである。本年度はまず、昨年度に発見した胆汁酸(デオキシコール酸)による芽胞形成促進作用のメカニズム解析を行った。その結果、デオキシコール酸が芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A タンパクに直接、あるいは間接的にその上流に作用した結果、芽胞形成を強く誘導していることを明らかにできた。また、ウエルシュ菌食中毒において最も大きな役割を果たすとされるエンテロトキシンの効果を、科学的に評価するための材料を作出した。さらに、胆汁酸以外の芽胞形成調節因子を探索する過程で、マウス糞便中に芽胞形成を阻害する活性のあることを見いだした。以上の結果は、消化管内には胆汁酸などウエルシュ菌の芽胞形成を促進する圧力と、それを抑制する圧力の両者がバランスをとって存在し、このバランスが促進方向へ傾くことでウエルシュ菌食中毒のリスクが上昇する可能性を示唆するものである。今後さらにこれら成果を基に消化管内の環境因子が菌へ与える影響と、菌が宿主へ与える影響を分子レベルで解析することで、新しいウエルシュ菌食中毒発症リスク低減法を開発することが可能になることが期待される。

A. 研究目的

ウエルシュ菌はガス壊疽など創傷感染症を引き起こす他、経口感染して腸管内感染症をも引き起こす。腸管内感染症としてはトリの壊死性腸炎やウシのエンテロトキセミアが知られるが、ヒトでは本菌は食品媒介性の下痢症を引き起こす。これはウエルシュ菌食中毒と呼ばれ、その原因菌は特に A 型ウエルシュ菌に分類されるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌に限られる。ウエルシュ菌食中毒の原因食品は、カレー、シチューなど加熱加工食品が中心で、また大規模食品調理施設が関与する例が多いため、厚生労働省に指定されている食中毒原因細菌のうち、1 件あたりの患者数がもっとも多いことを特徴とする¹⁾。従って、ウエルシュ菌食中毒の制御には、大きな意義がある。

ウエルシュ菌食中毒は生体内毒素型食中毒に分類されている。本食中毒の発生機序として、1) 食品内での大量の生菌の存在、2) 食品を通じて取り込まれた生菌の胃通過、3) 生菌の腸管内での増殖、4) 芽胞とエンテロトキシンの産生、5) 毒素の腸管上皮細胞への攻撃、が認識されており、最終的にエンテロトキシンによる下痢誘発に至るものと理解されている¹⁾。ウエルシュ菌エンテロトキシンの産生は、菌が芽胞形成する過程と共制御されていて、つまり芽胞を形成する条件下でのみエンテロトキシン産生が起こる。これは芽胞形成に至るシグナル伝達系の下流にエンテロトキシン産生の制御系が置かれているこ

とが原因である。つまり芽胞形成を人為的に制御することができれば食中毒の制御が可能になる。ウエルシュ菌が芽胞形成する際には様々な環境因子がこれを制御していることが、試験管内での研究によって報告されてきた。しかしウエルシュ菌が実際に消化管内環境においてどのような環境因子により芽胞形成するののかについてはほとんど報告が無かった。

本厚生労働科学研究では、特に上記(4)および(5)の過程に着目して研究を展開してきた。平成23年度にはウエルシュ菌標準株を用いて *in vitro* 感染実験系を構築し、菌は消化管内では宿主細胞の代謝活性や宿主因子を利用して自らが増殖しやすい条件を作りだしていることを明らかにした。また、食中毒由来株と非食中毒由来株について腸上皮バリア破壊能を比較検討すると、食中毒由来株は同じ条件下ではバリア破壊能を示さないことを明らかにした。さらに、バリア破壊能を示さない食中毒由来株でも、環境(培地)条件を変化させるとバリア破壊を引き起こすことを明らかにした。これはウエルシュ菌の病原性が環境条件に厳密に制御されていること、またウエルシュ菌が下痢症を引き起こすためには、腸管内にある環境因子が非常に重要であることを示している。

平成24年度は *in vitro* 感染実験系を使用して消化管環境に存在する様々な因子の芽胞形成・毒素産生への影響を調べた。まず高濃度(5 mM 以上)のグルコースが芽胞形成をほぼ完全に抑制することを確認し、グルコースを溶性デンプン(soluble

starch、SS)に置き換えるとある程度まで芽胞形成・毒素産生性が回復することを確認した。また、この条件下で各種胆汁酸を添加すると芽胞形成・毒素産生が強く誘導されること、誘導効果は胆汁酸の種類により異なり、デオキシコール酸で最も効果的に(10 μM の濃度で確認できた)みられることを証明した。これらの結果は、ウエルシュ菌が腸管内で芽胞形成・毒素産生して下痢を引き起こす際には、胆汁酸が一種の誘導因子となっており、またこれを感知するシステムを菌が持っていることを示している。

そこで本年度はこの、ウエルシュ菌の胆汁酸感知システムを解明すべく、胆汁酸の芽胞誘導メカニズムの解明を試みた。また、胆汁酸以外にもウエルシュ菌の芽胞形成・毒素産生に影響を与える因子が存在することを疑い、マウス糞便中にその存在を求めたところ、芽胞形成・毒素産生を抑制する物質が存在することを見いだした。

B. 実験方法

1) ウエルシュ菌と菌数測定

菌株は食中毒由来の NCTC8239 株、SM101 株を用いた。菌は FTG 培地で培養後、PBS で洗浄してから DMEM/SS (後述) に懸濁し下記の種々の実験に用いた。培養後の栄養型菌、芽胞の菌数算出には colony forming unit (CFU) 法を用いた。栄養型菌の算出には培養液をそのまま 10 倍階段希釈し、その 50 μl を brain heart infusion 寒天培

地へ接種、嫌氣的に 16~24 時間培養し、培地上のコロニー数を計測した。芽胞数の検出には、培養液を 75 (NCTC8239 株) または 65 (SM101 株) で 20 分間加熱処理後、栄養型と同様に 10 倍階段希釈を行って CFU を算出した。総菌数は栄養型菌数と芽胞数の和とした。

2) *In vitro* ウエルシュ菌感染実験 (共培養系)

ヒト結腸由来細胞株 Caco-2 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FCS) 含有ダルベッコ MEM (DMEM) を用いて培養した。24 ウェル・プレートに細胞を播種し、3-4 日間培養した。この細胞の培地をグルコース不含 DMEM 培地 + 0.4% 可溶性デンプン (DMEM/SS) に換え、1 時間培養した。ここへ FTG 培地で前培養したウエルシュ菌を接種し、様々な時間で培養後のウエルシュ菌栄養型菌数、芽胞数を上述の方法で測定した。また、経時的に菌を採取し、抽出した RNA により菌の遺伝子発現を解析した。

3) マウス糞便抽出液の調製

4 週齢の dyd マウスの飼育ケージ内に散乱する糞便を採取し、重量を測定後、MiliQ 水を 5 倍量 (w/v) となるように加え、5 分間 vortex で攪拌した。その後、4、9,000 × g、20 分間遠心処理した遠心上清液を糞便抽出液とした。

4) ウエルシュ菌のマイクロプレート培養系

ウエルシュ菌の芽胞形成あるいはエンテロトキシン産生に対する宿主由来因子 (糞便抽出液) の影響を調べるために、宿主細胞の存在しない培養系としてマイク

ロプレート培養系を使用した。FTG 培地で前培養した菌を PBS で洗浄し、50 μ M デオキシコール酸含有 DMEM/SS (DMEM/SS/DCA) 培地に懸濁した。これを 100 μ l/well で 96 ウェル・マイクロプレートへ加え、試験液を 100 μ l/well でさらに加えた後、37 で嫌氣的に静置培養した。培養後の培養液をスライドガラスへ採取し、位相差顕微鏡で各検体について数視野を写真撮影した。写真は画像解析ソフトウェア ImageJ で解析し、視野中の栄養型菌数と芽胞数をその形態で定量し、得られた値から芽胞形成率を計算した。

5) ウエルシュ菌エンテロトキシンの測定

培養液中のエンテロトキシン濃度を、ウサギ抗エンテロトキシン抗体を用いたウエスタンブロット法により免疫学的に検出した。

6) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

FTG 培地にて前培養した NCTC8239 株を共培養実験に供した。感染 0~12 時間の培養液から菌体 total RNA を抽出し精製後マイクロアレイのサンプルとした。アレイチップは公開されたゲノム情報を基にデザインした。チップ作成はアジレントテクノロジー株式会社に委託し、マイクロアレイの実施と解析は大阪大学微生物病研究所附属感染症 DNA チップ開発センターに委託した。

7) ウエルシュ菌の発現遺伝子量の解析

上記と同様に抽出した菌体 total RNA を DNase にて処理し、ランダムプライマーを用いて逆転写を行った。合成された cDNA

を用い、芽胞形成に關与する遺伝子 (*spo0A*, *spoIIAA*, *spoIIAB*, *sigF*, *sigE*, *cpe*) をターゲットとした qPCR を行った。

d) エンテロトキシン遺伝子破壊株の調製

エンテロトキシン遺伝子破壊株の調製には市販のキット (TargeTron Gene Knockout System, Sigma-Aldrich) を使用した。遺伝子破壊に必要なプライマーの設計には TargeTron Design Site (<http://www.sigma-genosys.com/targetron/>) を利用し、破壊株作成はメーカーの指定する方法に従った。

C . 結果

1 . DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

前年度までに、消化管内の環境をある程度反映した *in vitro* 実験系を開発し、その系を用いてデオキシコール酸が芽胞形成・毒素産生を強く誘導することを見いだした。そこでデオキシコール酸の作用機序を解明するために、デオキシコール酸の存在下で特異的に発現する遺伝子を調べた。菌を細胞へ感染させ、0、1、2、4、6、12 時間後に培養液を回収し、菌体 RNA を抽出して各種遺伝子発現状態を DNA マイクロアレイで調べた(図 1)。その結果芽胞形成のマスター・レギュレーターとして知られる転写因子 *spo0A* 遺伝子の下流に位置する遺伝子群が、デオキシコール酸存在下で強く発現誘導されていることが明らか

かになった。一方 *spo0A* 遺伝子の発現レベルはデオキシコール酸の有無で同程度であった。感染 4 時間後に回収した菌体 RNA を用いた q-PCR において *spoIIAA*, *spoIIAB*, *sigF*, *sigE* ならびに *cpe* 遺伝子の発現はデオキシコール酸存在下で有意に上昇した。一方 *spo0A* 遺伝子の発現量に有意な差は認められなかった。これらの結果はマイクロアレイの結果とよく一致した(図 2)。

2 . マウス糞便中の芽胞形成阻害因子の同定

本研究により様々な環境因子とウエルシュ菌の病原性発現の関係が明らかになれば、環境を人為的に操作することでウエルシュ菌食中毒発症を制御することが可能になる。これを可能にするには *in vitro* で得られた成果を、動物モデルなどを使用した *in vivo* 実験系で確認する必要がある。しかし現在までにウエルシュ菌食中毒の動物モデルは報告されていない。これまで動物モデルが確立されていない原因として、マウスなど小動物の腸管内ではウエルシュ菌食中毒菌株は十分に芽胞形成しないことが理由の 1 つに挙げられている²⁾。本研究担当者は小動物腸管内にはウエルシュ菌の芽胞形成を阻害する物質が存在するのではないかと考えた。実際、過去の論文がモルモット小腸内にウエルシュ菌芽胞形成を阻害する物質が存在する可能性について言及している³⁾。そこで、マウスの糞便を材料として、そこに含有する物質がウエルシュ菌芽胞形成に対して

影響を与えるか調べた。

マウス糞便抽出液をウエルシュ菌培養系に添加すると、通常 60~80% の芽胞形成率が見られる条件下で、芽胞形成は強くかつ容量依存的に阻害された(図 3)。阻害活性は 100,000 × g、1 時間の超遠心上清に残存し、限外濾過膜を使用してその分子量を推定すると、分子量 100,000 以上であると見積もられた(図 4)。また、75、20 分間以上の加熱でこの阻害活性は失活することが明らかになった(図 5)。これら結果は、マウス糞便中に芽胞形成を阻害する易熱性の高分子物質(以下、阻害物質と称する)が存在することを示唆している。そこでこの阻害物質の作用機序を解析した。芽胞形成が阻害物質添加により強く阻害される条件下でも、ウエルシュ菌の増殖そのものはほとんど影響を受けていなかった。Q-PCR 法により遺伝子発現解析を行うと、阻害物質は rRNA の発現量には大きな影響を与えず、しかし芽胞形成関与する遺伝子 *sigE* や、芽胞形成カスケード下流に存在するエンテロトキシンの遺伝子 *cpe* の発現を有意に抑制していた(図 6)。この結果より阻害物質は芽胞形成を転写レベルで制御していることが明らかになった。

3 . エンテロトキシン遺伝子破壊株の解析

昨年度に作成したエンテロトキシン遺伝子破壊株(*cpe*(-)株)の Caco-2 細胞への細胞傷害性について調べた。まず *cpe*(-)株に *cpe* 遺伝子を相補した相補株(*cpe*(+)株)を作成した(図 7)。作製した *cpe*(-)株、*cpe*(+)株を Duncan-strong 培地

にて繰り返し継代して、高率に芽胞を形成するスターター株をそれぞれについて調製した。次に共培養に用いる各菌株の感染価を揃えるため、CFU 法ならびに培養液の濁度を用いて各株における前培養時の増殖曲線を作成した。そして感染価を揃えた野生株、cpe(-)株、cpe(+)株を用いて Caco-2 細胞との共培養実験を行った。DMEM/SS/DCA 培地で感染 24 時間後に野生株ならびに cpe(+)株では広範囲において細胞の円形化ならびに detachment が認められた(図 8)。一方 cpe(-)株では同条件下では感染前と同様の細胞形態を示した(図 6)。この時の栄養型菌数ならびに芽胞数は 3 菌株とも同程度であった。また産生エンテロトキシンは野生株ならびに相補株でのみ確認された(図 9)。

D. 考察

昨年度までに胆汁酸がウエルシュ菌芽胞形成・毒素産生を強く誘導すること明らかにした。そこで今年度はまずその誘導メカニズムを解析した。芽胞形成は、芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A のリン酸化で始まり、リン酸化 Spo0A が転写因子となって下流のカスケードを活性化することが知られる。デオキシコール酸存在下で強く誘導される遺伝子を解析したところ、誘導直後(4 時間)から Spo0A 下流の遺伝子群が総じて高発現していることが確認できた。結果は、デオキシコール酸の作用点は Spo0A 上流であるか、あるいは Spo0A そのものである

ことを示唆している。細菌が芽胞を形成する際の Spo0A 上流のカスケードについては、*Bacillus* 属細菌で詳細に解析されている。しかしウエルシュ菌など *Clostridium* 属細菌には *Bacillus* 属で同定されたシグナル分子がそもそもゲノム上に存在せず、Spo0A 上流のカスケードの詳細は不明である。本研究を継続することでウエルシュ菌の Spo0A 上流のカスケードに新たな情報が得られれば、多くの病原細菌を含む *Clostridium* 属細菌の芽胞形成に至る未知のカスケード同定が期待される。また、これまでまったく明らかにされてこなかった胆汁酸が芽胞形成を促進するメカニズムが分子レベルで明らかになることが期待できる。本研究の成果は、ウエルシュ菌が宿主体内環境の認識シグナルとして胆汁酸を利用していることを示しているが、菌側がどのようなメカニズムで胆汁酸を感知しているかを明らかにできれば、広く *Clostridium* 属細菌と宿主との共進化の過程まで明らかになることが期待される。さらに、芽胞形成に至る最初の引き金を分子レベルで理解することに繋がり、それを利用したウエルシュ菌食中毒の新しい制御法開発への大きなヒントが得られると考えている。

マウス糞便抽出液の芽胞形成への影響を調べたところ、芽胞形成を阻害する活性が確認できた。性状解析の結果、その阻害物質は易熱性の高分子であると推察された。現在この物質の本態は不明であるが、これまでマウスなど小動物でウエルシュ菌食中毒の動物モデルが作出されてい

いことには、この阻害物質が関与している可能性が疑われる。今後は糞便ではなく、マウスの消化管内容物を用いると共に、ヒト消化管内容物についてもその効果を検討し、この仮説の正当性を検証することが重要である。またこの阻害物質を同定すれば、得られた結果を基に、マウス消化管内でも十分量の芽胞形成を誘導することができるようになるかもしれない。それらの過程を経た先には、将来、マウスを用いたウエルシュ菌食中毒の動物モデルを開発することが期待できる。これは同食中毒のメカニズム解析の有力ツールとなるだけでなく、本食中毒の制御法を開発するため有用なモデルになると期待できる。

既に昨年度までに、ウエルシュ菌下痢症のモデルとなるバリア破壊実験系について報告した。この実験系では培地に含まれるグルコースを枯渇させることで、ウエルシュ菌が消化管上皮のバリア機能破壊を引き起こすことを観察している。バリア破壊は一般に下痢症のモデルになると解釈されていて、本結果はウエルシュ菌下痢症の1つのモデルとして利用可能と考えている。しかし昨年度まではこの腸上皮バリア破壊現象に、菌側のどんな因子が関与するのか明確に示すことはできていなかった。そこで昨年度作成した cpe(-)株と、本年度新たに作成した相補株 cpe(+)株を用いて、バリア破壊に関与する因子がウエルシュ菌エンテロトキシンであるのか検討した。現時点で得られている結果は、同条件下で観察される細胞障害性にはエンテロトキシンが強く関与していることを示

している。今後はエンテロトキシンが細胞障害活性だけでなくバリア破壊現象にも関与することを確認することが必要である。

本研究で得られた cpe(-)株、cpe(+)株を用いることで、ウエルシュ菌が引き起こす生物現象のうち、エンテロトキシンが関与する現象そうでない現象を区別することが可能となる。エンテロトキシンは下痢発症に大きな役割を演じていると理解されているが、これが単独で下痢発症に関与すると断言することはできていない。今後、食中毒発症を再現する動物モデルを開発し(上述)ウエルシュ菌食中毒を実験的に再現することが可能となれば、cpe(-)株、cpe(+)株を利用して、エンテロトキシンの関与についてより科学的(物質的)に論じることが可能となろう。ウエルシュ菌食中毒株はエンテロトキシン以外にも毒素を産生することが知られるが、食中毒症状における毒素の役割についてはまったくわかっていない。本研究の延長線上にはこのように、これまで明らかになっていない因子のウエルシュ菌下痢症に対する役割を明確化することがあり、さらにエンテロトキシンの未知の機能を明確にすることも含まれている。

E . 健康危害情報

特になし。

F . 文献

- 1) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄、微生物性食中毒、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京（2007）
- 2) Uzal FA, McClane BA. Animal models to study the pathogenesis of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infections. *Microbes Infect.*14:1009-16, 2012.
- 3) 坂本 憲市、森永 信一、山岸 高由、小西 健一、吉国 桂子. モルモット腸内容物培地における *Clostridium perfringens* の発育. *日本細菌学雑誌* 43: 917-926, 1988.

G . 研究発表

なし。

H . 学会発表

- 1) Mayo Yasugi, Hidenobu Hoshi, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. The impact of bile acid on the sporulation of

Clostridium perfringens in vitro infection model. *ClosPath* 2013, Palm Beach, Qld, Australia, Sep. 2013.

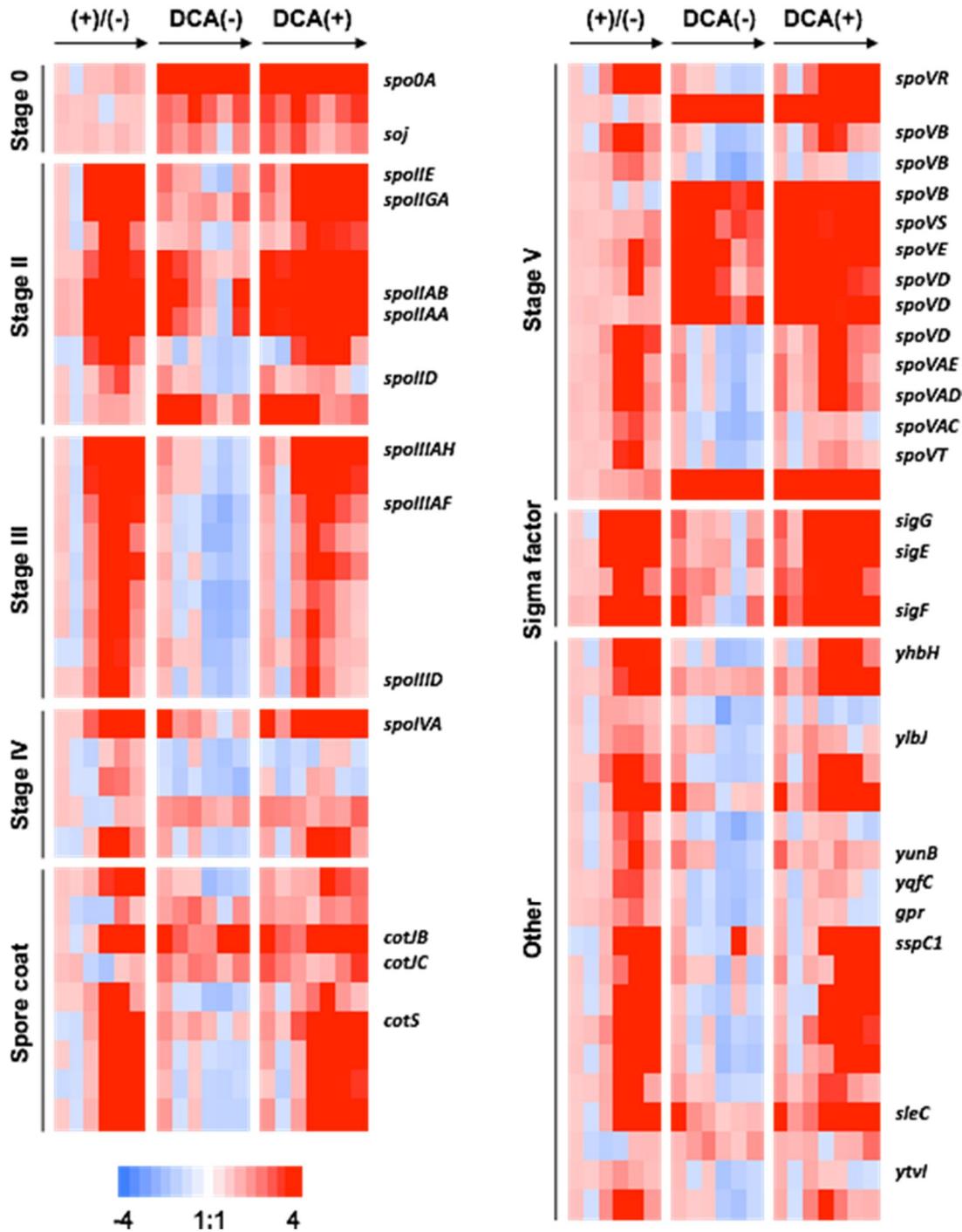
- 2) Masami Miyake, Hidenobu Hoshi, Kaori Kondo, Mayo Yasugi, Shigeki Yamamoto, and Yoichi Kamata. An *in vitro* model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. *ClosPath* 2013, Palm Beach, Qld, Australia, Sep. 2013.
- 3) Mayo Yasugi, Hidenobu Hoshi, Daisuke Okuzaki, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. Mechanism of bile acid-mediated sporulation in *Clostridium perfringens*. 第87回日本細菌学会総会. 東京. Mar. 2014.

I . 知的所有権の取得情報

特許申請

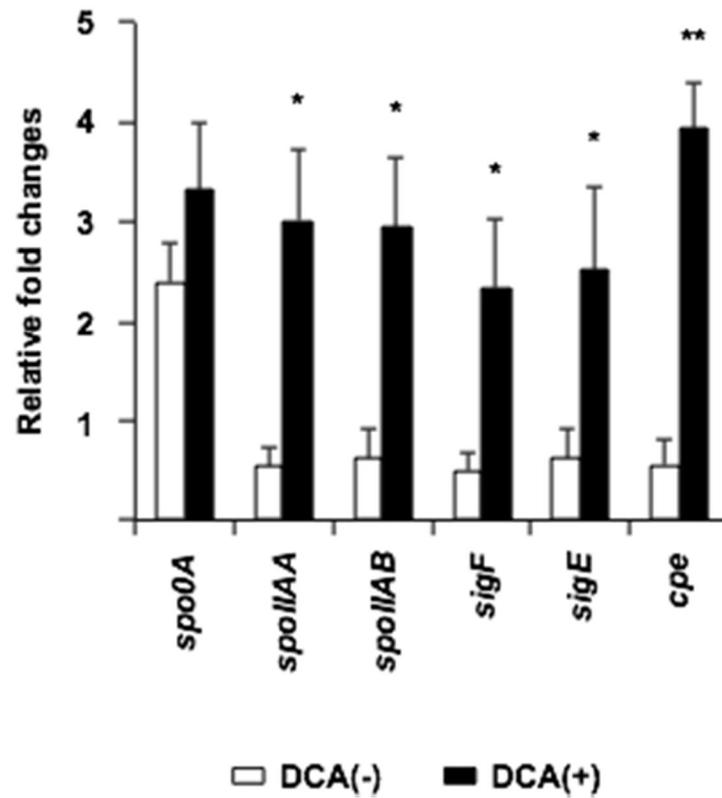
本年度該当するものなし

図1 DNAマイクロアレイ解析のヒートマップ



Stage 0~V は芽胞形成の各ステージで関与する芽胞形成関連遺伝子、Spore coat、Sigma factor も芽胞形成に関与する coat 蛋白、シグマ因子を示す。各遺伝子について 16S リボゾーム RNA 遺伝子の発現量で標準化した後、デオキシコール酸の有無での発現量比を算出したものが (+)/(-) に示されている。 (+)/(-) が高いほど (赤) デオキシコール酸存在下で高く誘導されていることを意味する。

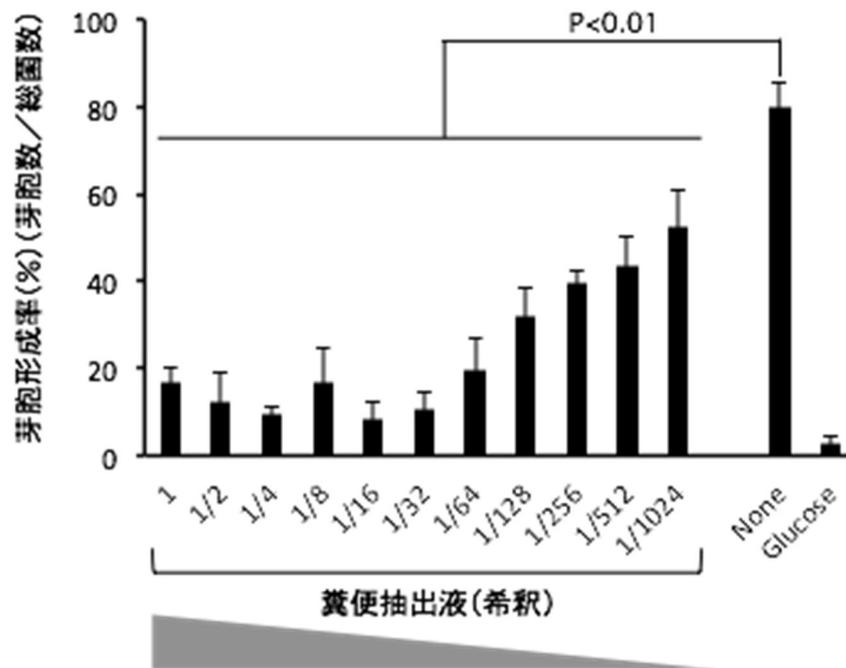
図2 q-PCRによる各遺伝子の発現量解析



DNA マイクロアレイで、デオキシコール酸存在で発現量の高かったいくつかの遺伝子についてリアルタイム PCR でその発現量を確認した。結果は 16S リボゾーム RNA の発現量で標準化して示している。

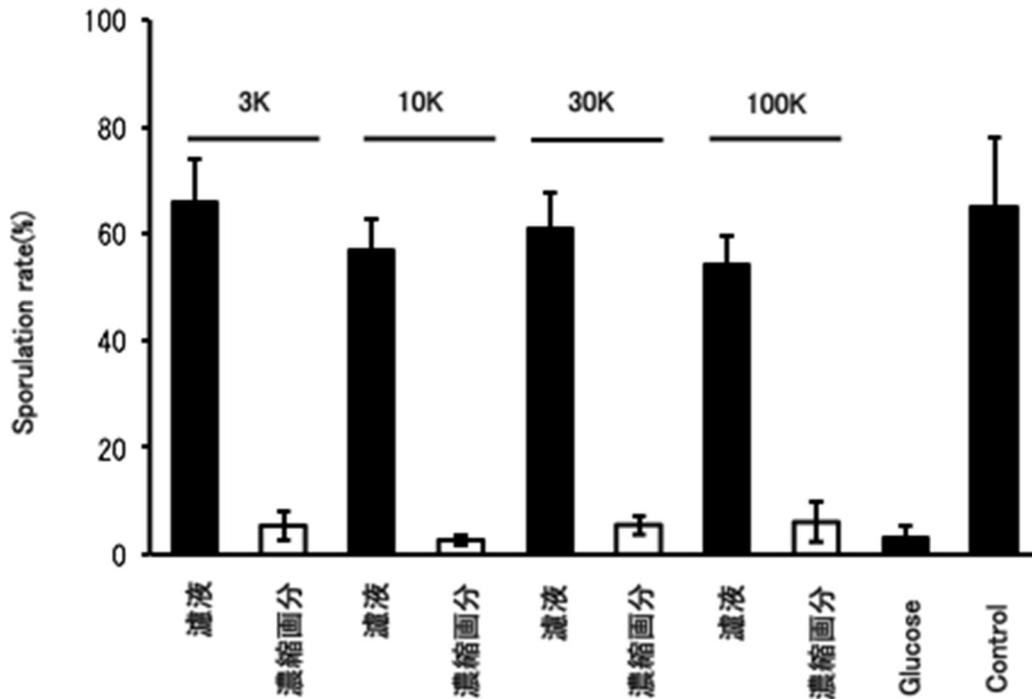
* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

図3 マウス糞便抽出液によるウェルシュ菌芽胞形成抑制



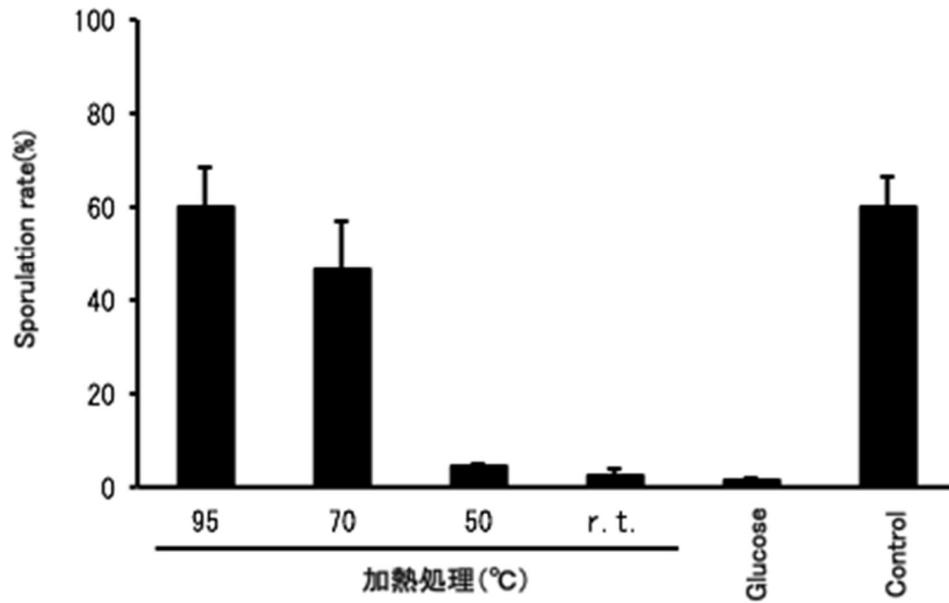
マウス糞便抽出液を2倍段階希釈した後、芽胞形成への影響を評価した。Noneは何も加えないときの芽胞形成率（陽性対照）、Glucoseは20 mM グルコースを加えたときの芽胞形成率（陰性対照）。

図4 限外濾過によるウェルシュ菌芽胞形成阻害物質の分子量の推定



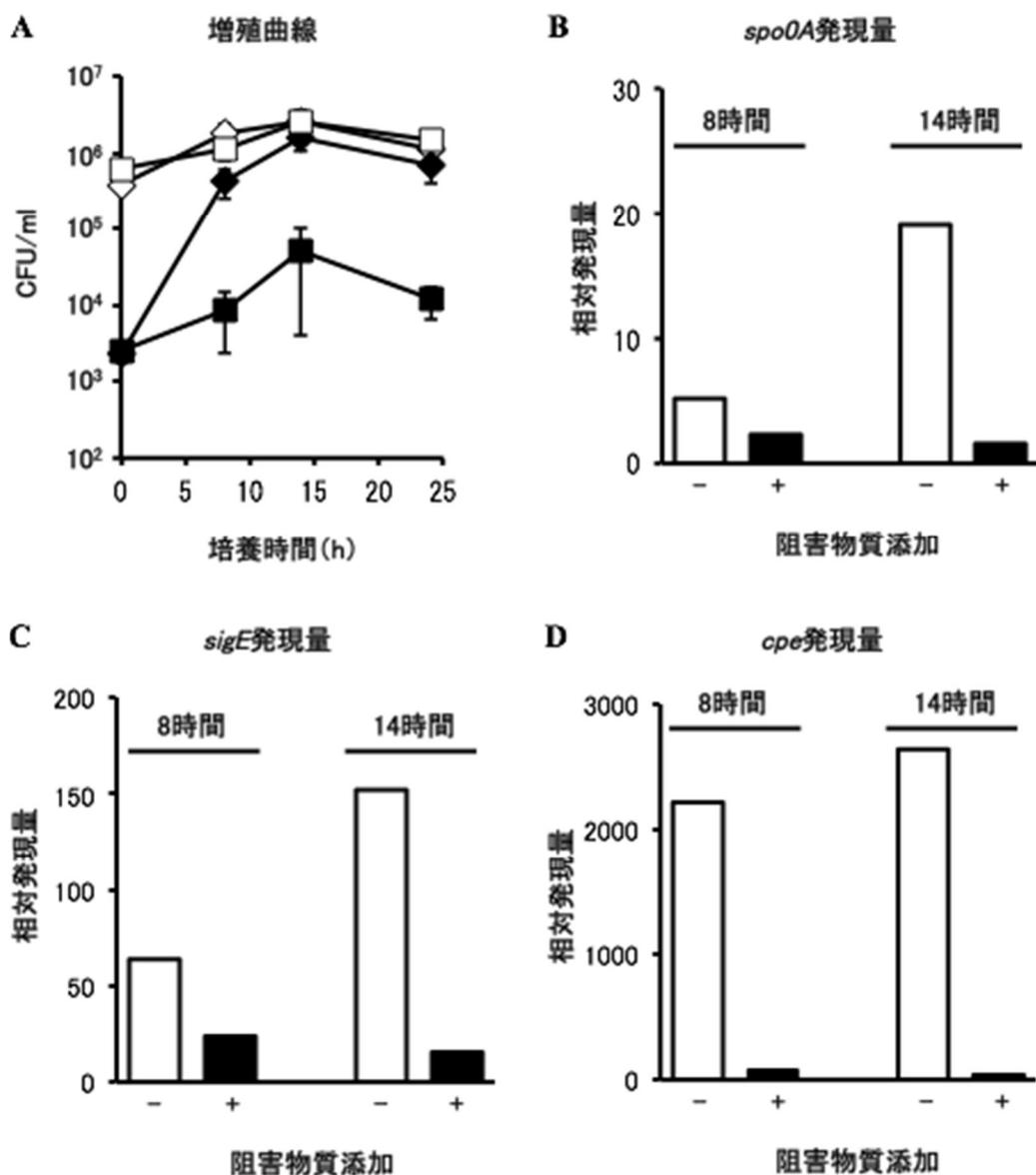
糞便抽出液を限外ろ過膜でろ過後、フィルターを通過した画分（濾液）とフィルター上に濃縮された画分（濃縮画分）のそれぞれについて、芽胞形成に対する効果を評価した。Control は何も加えない条件での芽胞形成率（陽性対照）、Glucose は 20 mM グルコースを加えたときの芽胞形成率（陰性対照）。3K~100K はそれぞれ使用したフィルターの分画分子量（分子量 3,000~100,000）を示す。

図5 ウェルシュ菌芽胞形成阻害物質の耐熱性の検討



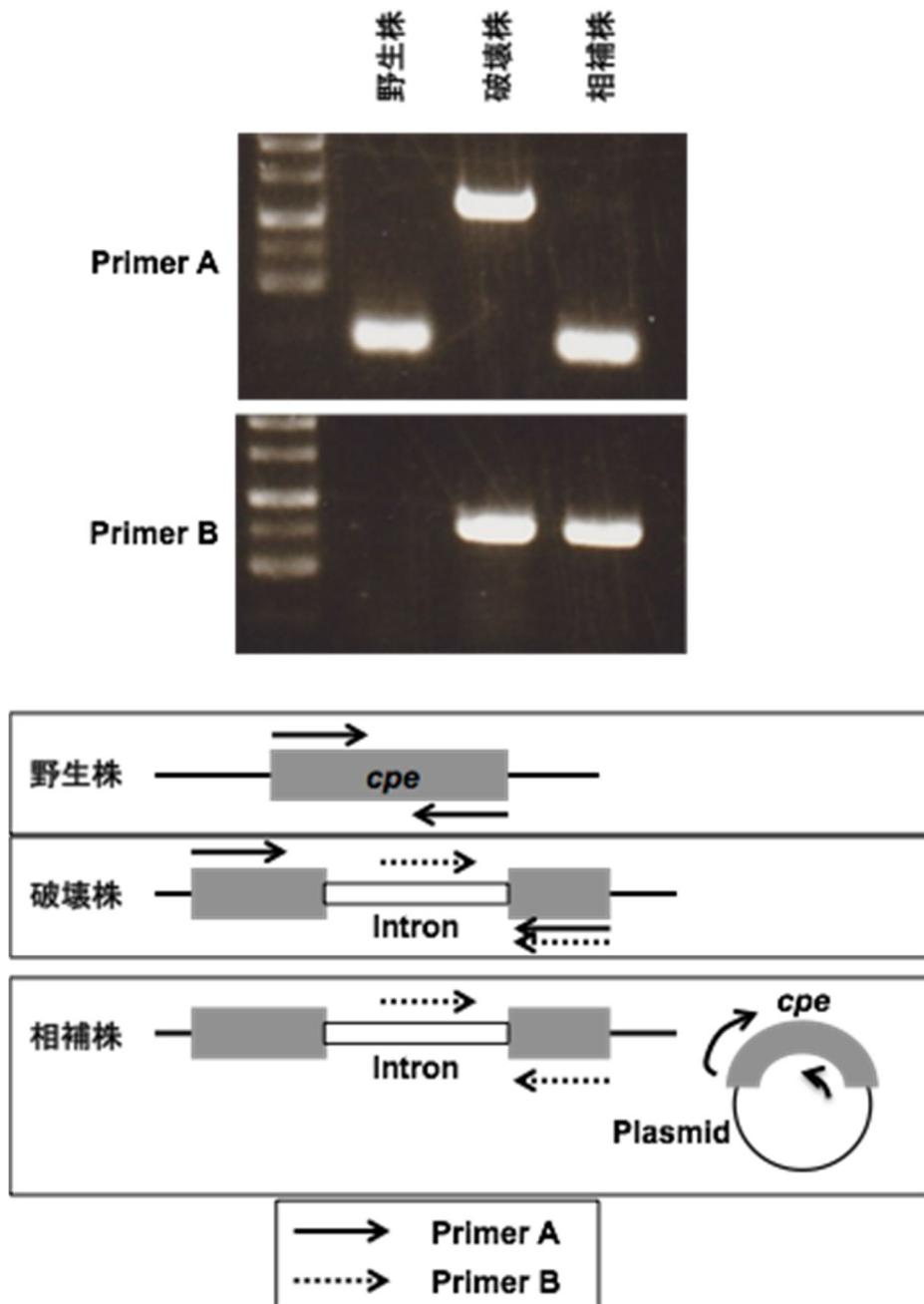
糞便抽出液を 100,000 × g、90 分間超遠心した上清をさらに分画分子量 100,000 の限外濾過膜でろ過したものについて、室温 (r. t.)、50、70、95 で 20 分間処理後、芽胞形成に対する抑制効果を評価した。Control は何も加えない条件での芽胞形成率 (陽性対照)、Glucose は 20 mM グルコースを加えたときの芽胞形成率 (陰性対照)。

図6 阻害物質の作用機序の検討



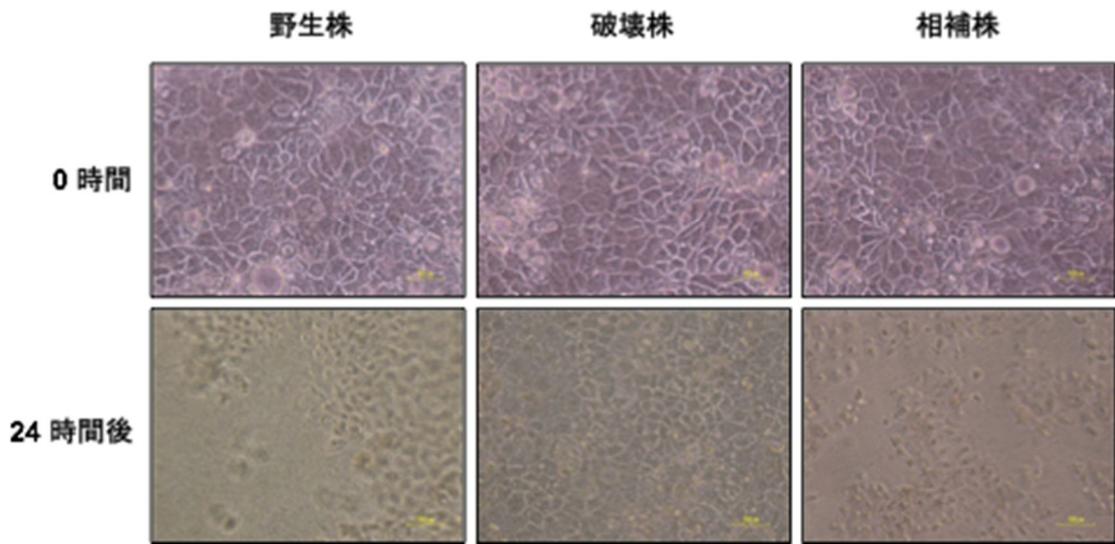
(A) は何も加えないときの栄養型ウエルシュ菌の菌数 (CFU)、 は阻害物質を加えたときの栄養型ウエルシュ菌の菌数、 は何も加えないときのウエルシュ菌の芽胞数 (CFU)、 は阻害物質を加えたときのウエルシュ菌の芽胞数 (CFU)。 (B)~(D) 16S リボゾーム RNA の発現量に対する各種芽胞形成関連遺伝子の発現量。 8 時間および 14 時間後の発現量を、それぞれ何も加えないとき、阻害物質を加えたときで比較した。 (B) *spo0A*、 (C) *sigE*、 (D) *cpe*。

図7 3菌株の遺伝子保有状況の確認



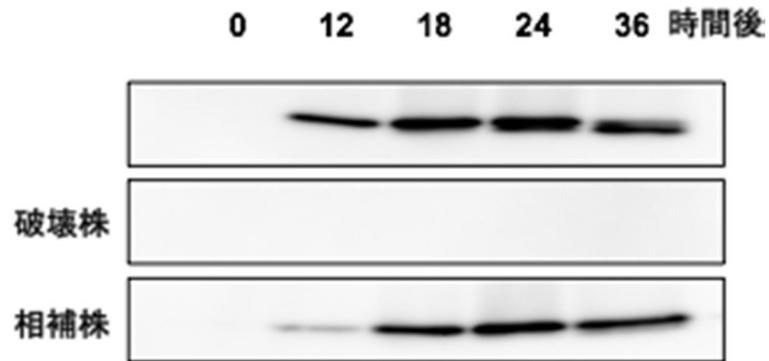
「野生株」は野生型 SM101 株、「破壊株」は *cpe*(-) 株、「相補株」は *cpe*(+) 株。それぞれの菌株のライゼートをテンプレートとして Primer A、Primer B を用いて PCR を行った。

図8 異なる3株を感染させたときの細胞障害性



感染後 24 時間後の細胞を位相差顕微鏡下で写真撮影した。「野生株」は野生型 SM101 株、「破壊株」は cpe(-) 株、「相補株」は cpe(+) 株。

図9 共培養系の培養上清中のCPE



感染 0、12、18、24、36 時間後の培養上清液を調製し、抗 CPE 抗体でウェスタンブロットを行った。「野生株」は野生型 SM101 株、「破壊株」は cpe(-) 株、「相補株」は cpe(+) 株。