

馬由来*Rhodococcus equi*に関する研究

中 澤 宗 生

1984

馬由来*Rhodococcus equi* に関する研究

中 澤 宗 生

1984

目 次

I. 緒 言	1
II. 実験材料と実験方法	3
1. 糞 便 材 料	
2. 供 試 菌 株	
3. 供 試 動 物	
4. 選択分離培養法	
5. 生理・生化学的性状検査法	
6. 抗血清の作製法	
7. 交差定量凝集反応	
8. 吸収テスト	
9. 血清群別法	
10. マウスに対する毒力試験	
1) 50%致死量 (LD ₅₀)	
2) 毒力株と非毒力株の判定法	
3) 体内における増殖態度	
4) 病理組織学的検査法	
11. マウス腹腔マクロファージの採取法, 培養法および感染法	
12. マウス腹腔マクロファージの殺菌能検査法	
13. 馬の単球の培養法と感染法	
14. 馬の単球の殺菌能検査法	
III. 実 験 成 績	11
1. 馬の糞便からの <i>R. equi</i> の定量培養	
1) 選択分離培地の検討	
2) 母馬および子馬の糞便内菌数の比較とその推移	
2. <i>R. equi</i> の生理・生化学的性状	
1) 分離株の同定	
2) 病変部および糞便由来株の生理・生化学的性状	
3) 病変部および糞便由来株のAPI ZYMによる酵素プロファイル	
3. <i>R. equi</i> の血清群別	
1) 未吸収抗血清を用いた交差定量凝集反応	
2) 吸収テスト	

3)	血清群別用抗血清を用いた交差定量凝集反応	
4)	スライド凝集反応による血清群別	
5)	病変部由来株の血清群	
6)	糞便由来株の血清群	
7)	NCTCおよびATCC由来株の血清群	
8)	Prescottの血清型との関連	
4.	<i>R. equi</i> の毒力	
1)	マウスに対するLD ₅₀	
2)	病変部および糞便由来株の毒力の比較	
3)	マウス体内における増殖態度	
4)	マウス腹腔マクロファージに対する態度	
5)	馬の単球に対する態度	
IV.	考 察	25
1.	馬の糞便からの <i>R. equi</i> の定量培養	
2.	<i>R. equi</i> の生理・生化学的性状	
3.	<i>R. equi</i> の血清群別	
4.	<i>R. equi</i> の毒力	
V.	総括および結論	40
1.	馬の糞便からの <i>R. equi</i> の定量培養のまとめ	
2.	<i>R. equi</i> の生理・生化学的性状のまとめ	
3.	<i>R. equi</i> の血清群別のまとめ	
4.	<i>R. equi</i> の毒力のまとめ	
5.	結 論	
VI.	謝 辞	45
VII.	参 考 文 献	46

付 表 : 1 ~ 22

図 : 1 ~ 11

I 緒 言

本菌の発見は、1923年にMagnusson〔53〕, MiessnerとWetzel〔60〕およびLütje〔52〕がほぼ時を同じくして、化膿性肺炎を伴う子馬からグラム陽性の桿菌を分離し、それぞれ *Corynebacterium equi*, *C. pyogenes* (*equi*), *C. (pyogenes) equi roseum* と命名したことにはじまる。その後、菌名に一時的な混乱はみられたが、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 第6版(1948)〔64〕に *C. equi* が菌名として採用されるに至り、最近までこれが用いられてきた。

ところが、1980年に発表された細菌学名承認リスト〔97〕には、本菌に2つの菌名、すなわち、*C. equi* と *Rhodococcus equi* が記載され、再び多少の混乱が生じた。しかしながら、GoodfellowとAlderson(1977)〔31〕の数値分類学的研究やKeddieとCure(1977)〔43〕およびMinnikinら(1978)〔61〕のミコール酸に関する研究、さらにMordarskiら(1980)〔63〕のDNAのGC含量に関する研究の結果などから、著者は *R. equi* が菌名として妥当だと考え、本論文では *R. equi* の学名を使用した。

一般に、*Rhodococcus* 属の菌種は、土壌、水あるいは動物の糞便など自然界に広く分布していることが知られている〔31〕。*R. equi* についても、Jensen(1934)〔40〕は庭や牧草地の土壌から、またBendixenとJepsen(1940)〔8〕は動物小屋の土壌から本菌を分離している。さらに、Woolcock一派(1979, 1980)〔66, 67, 117, 118〕やBartonとHughes(1981)〔6〕は、馬を含む各種動物の正常な糞便からの分離報告を行なっている。このような事実は、本菌が腐生菌として広く自然界に分布していることを示しているが、同時に子馬感染症の疫学においては、とくに馬の腸管に生息している本菌の存在を無視することはできない。したがって、病変部由来株と糞便由来株との関連を究明する必要がある、それには先ず、本菌の詳細な生物学的、生化学的および血清学的性状が追究されなければならない。

そこで、著者は健康な馬の正常な糞便からの *R. equi* の定量培養を行ない、その保有状況を調べ、馬における本菌の生態の一端を明らかにすることを試みた。次いで、病変部および糞便由来株の生理・生化学的性状を検討するとともに、血清

群別法を確立し、血清群による特徴づけを行ない、その分布を比較することによって、両者の関連や本菌の生態、さらには子馬感染症の疫学を知る上での有益な情報を得ようとした。

ところで、*R. equi* 感染症は馬〔3, 4, 13, 17, 22, 24, 25, 27, 34, 35, 46, 48, 51-54, 60, 73, 74, 83, 87, 91, 98, 112〕の他、豚〔20, 28, 47, 75, 88, 113〕、牛〔21, 36, 49, 59, 80, 119〕、羊〔1, 23, 86〕、山羊〔72, 110〕、猫〔39〕、野生動物〔81, 82, 84, 101〕、人〔9, 14, 30, 55, 92〕などに発生が認められている。とくに子馬の症例が多く、その報告はスウェーデン〔53, 54〕、ドイツ〔51, 52, 60〕、イギリス〔74〕、アイルランド〔34, 48〕、アメリカ〔13, 17, 25〕、カナダ〔27, 98〕、オーストラリア〔3, 4, 112〕、ニュージーランド〔24〕、インド〔83〕などに及んでいる。

わが国においても、本菌感染症は子馬の育成障害の原因の1つとして知られてきた。すなわち、原川と盛田（1949）〔35〕は、青森県下で発生した2例の本菌による子馬感染症を初めて報告し、その後、佐々木ら（1954）〔91〕は5例、久米ら（1966）〔46〕12例、西貝ら（1981）〔73〕は3例の臨床的、細菌学および病理学的所見を報告している。これらの成績や諸外国の症例報告によれば、本菌感染症の病型は化膿性肺炎を主とし、潰瘍性腸炎、化膿性腸間膜リンパ節炎、関節炎およびフレグモーネである。

以上のような数多くの症例報告によって、子馬における本菌の感染像はほぼ明らかにされたと思われるが、本菌の毒力因子や発症機序といった基本的な問題についての検討は極めて少ないのが実状である。

そこで、本菌の毒力を解析するために、マウスや培養細胞を実験モデルとして用い、一連の研究を実施し、菌株の由来や血清群の違いにより毒力に差があるかどうか、また、毒力因子が何であるかを究明した。

以上の結果、本菌の生態や血清学的分類、さらに毒力に関していささかの新知見を得ることができたので、それらについて報告する。

Ⅱ 実験材料と実験方法

1. 糞便材料

採材は1980年1月から8月にかけて青森県上北郡下の5か所の馬生産牧場で飼育されていた母馬91頭および子馬36頭から行なった。母馬の年齢は6～16歳，子馬は10日齢～7か月齢であり，全頭とも外見上健康なサラブレッド種である。

材料は脱糞直後に採取し，2時間以内に培養に供した。

2. 供試菌株

糞便由来株として健康な母馬91頭由来636株および健康な子馬36頭由来185株の計821株を用いた。病変部由来株として*R. equi*感染症の子馬21頭の肺，肺門リンパ節，肝，腸間膜リンパ節，関節および皮下織などの化膿性病巣部から分離された374株を用いた。また，参考株としてNational Collection of Type Cultures (NCTC, イギリス) から分与された*R. equi* 4株 (NCTC 1621, NCTC 4219, NCTC 5649 および NCTC 5650) および American Type Culture Collection (ATCC, アメリカ) から分与された*R. equi* 4株 (ATCC 6939, ATCC 7698, ATCC 7699 および ATCC 10146)，ならびに Prescott 博士 (ゲルフ大学, カナダ) から送付された7株 (ATCC 33701, ATCC 33702, ATCC 33703, ATCC 33704, ATCC 33705, ATCC 33706 および ATCC 33707) の計15株を用いた。

3. 供試動物

R. equi に対する抗血清の作製は日本白色種家兎の雄 (体重 2.0～2.5 kg) を用いた。マウスに対する毒力試験は近交系の SS 系マウス (体重 20～23 g) を雌雄の別なく用いた。また，マウスの腹腔マクロファージも近交系の SS 系マウスから採取した。さらに馬の単球は家畜衛生試験場飼育の重半種，6歳，雄 (体重 620 kg) から採取した。

4. 選択分離培養法

糞便から *R. equi* を選択的に分離するために Woolcock ら (1979) [114] の NANAT 培地を用いて予備実験を行なったが、この培地に含まれる亜テルル酸カリウムに *R. equi* に対する発育阻止作用があることがわかったので これを除き、NANAT 培地を改良した NANC 培地を作製し、糞便の定量培養を行なった。この培地の組成は以下に示すとおりである。

(基礎培地)

Tryptone soya broth	(Oxoid)	30 g
Yeast extract	(Oxoid)	1 g
寒 天	(Difco)	15 g
蒸 留 水		1,000 ml

pH 7.2

(阻 止 剤)

ナリジキン酸	(Sigma)	10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
ノボビオシン	(Sigma)	12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
シクロヘキシミド	(Sigma)	20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

定量培養は糞便 1 g を生理食塩水 9 ml に懸濁して均一な糞液とし 30 分間室温に放置後、その上清をさらに生理食塩水で 10 倍段階希釈し、各希釈液の 0.1 ml を NANC 培地各 2 枚に塗抹し 37°C で 40 時間好氣的に培養した。出現したコロニーのうち、*R. equi* に特徴的なムコイドコロニーの数を計測し、糞便 1 g 中の菌数を算出した。

5. 生理・生化学的性状検査法

分離株の同定は Trypticase soy 寒天 (TSA, BBL) 平板におけるコロニーの特徴、カタラーゼ反応、オキシターゼ反応、グラム染色性、Kinyoun の方法 [15] による抗酸性、硝酸塩還元試験、TSI 培地 (栄研) における糖分解能、SIM 培地 (栄研) における硫化水素の産生、インドール反応および運動性の成績にもとづき、Rogosa ら (1974) [89] の記載に準じて行なった。なお参考株として NCTC 1621 を用いた。

上記の性状から *R. equi* と同定された菌株のうち、無作為に選ばれた糞便由来 40 株と病変部由来 40 株および参考株 8 株（NCTC 1621, NCTC 4219, NCTC 5649, NCTC 5650, ATCC 6939, ATCC 7698, ATCC 7699 および ATCC 10146）を加えた 88 株についてはさらに次の性状を調べた。

硫化水素産生能：酢酸鉛試験紙法により，Brain heart infusion（BHI, Difco）液体培地を用いて 37°C，7 日間培養後判定した。

ウレアーゼ：ウレアーゼ培地（栄研）を用いて 37°C，5 日間培養後判定した。

ゼラチナーゼ：1%ゼラチン加BHI寒天平板を用いて 37°C，3 日間培養後，菌苔をふきとり塩化第2水銀溶液 2 ml を培地全面に流して菌苔周囲に形成される透明帯の有無により判定した。

カゼイナーゼ：5%脱脂乳加BHI寒天平板に 37°C，2 日間培養後，菌苔周囲の透明帯の出現の有無により判定した。

ヘモリジン：5%羊血液加BHI寒天平板に 37°C，2 日間培養後，溶血の有無を調べた。

亜テルル酸カリウム還元試験：0.02%亜テルル酸カリウム加BHI寒天平板に 37°C，3 日間培養後，コロニーの黒変の有無で判定した。

Listeria monocytogenes に対する *R. equi* の相乗溶血活性：Nakazawa と Nemoto の方法〔71〕により *L. monocytogenes* L1 株を指示株とし，5%羊血液加BHI寒天平板を用いて調べた。

糖分解能：基礎培地としてトリプチケース（BBL）10 g，塩化ナトリウム 5 g，蒸留水 1,000 ml，0.2% BTB 10 ml，pH7.2 を用い，これに濾過滅菌した次の糖液，フルクトース，マルトース，マンノース，ラムノース，シュークロースおよびキシロースをそれぞれ 1% に加えたものを糖分解検査用培地とした。培養は 37°C で 10 日間行ない，その期間において酸産生の有無を観察した。

菌体の酵素プロフィール：API ZYM キット（Societe Analytab Products Inc., フランス）を用いて次の 19 種類の酵素活性を調べた。すなわち，アルカリホスファターゼ，エステラーゼ（C4），エステラーゼリパーゼ（C8），リパーゼ（C14），ロイシンアリルアミダーゼ，バリンアリルアミダーゼ，シス

チンアリルアミダーゼ，トリプシン，キモトリプシン，酸性ホスファターゼ，ホスホアミダーゼ， α ガラクトシダーゼ， β ガラクトシダーゼ， β グルクロニダーゼ， α グルコシダーゼ， β グルコシダーゼ，N-アセチル- β グルコサミニダーゼ， α マンノシダーゼおよび α フコシダーゼである。

その方法は，API ZYMキットの記載に従った。すなわち，BHI 寒天平板に37°C，2日間培養した菌苔を生理食塩水にかきとり，その濃度をMcFarland No. 6 に調整した。この菌液の2滴（0.06 ml）をキットの各ウェルに滴下し，37°Cに4時間反応後，API 試薬AとBをそれぞれ1滴々下し，5分後強い光線を10秒間当てて得られた色調を比色表と対比させて判定した。なお比色表には色調の度合に応じて0～5までの数値が割当ててあるが，数値0は陰性，数値1は弱陽性および数値2～5は陽性と判定した。

6. 抗血清の作製法

総計27株に対する抗血清を家兎を用いて作製した。菌株名と由来はTable 1に示した。これらの菌株はわが国の分離株1,195株のなかから選ばれたものである。すなわち，まず最初に分離株3株に対する抗血清を作製し，これらと残りの1,192株の凝集反応を行ない，反応陽性の株は除き，再び反応陰性の株のなかから3株を選び抗血清を作製し，同様の作業を反復して全株を整理した結果，27の菌株が抗血清作製用として選抜された。なおこれらの免疫用菌株は電子顕微鏡観察において，SpringerとRoth（1973）〔100〕の方法によるルテニウムレッド染色法により，全菌株に莢膜様物質の存在が確認された（Fig. 1）。

免疫原としてはTSA平板に37°Cで24時間培養した菌をホルマリン処理死菌としたものを用いた。すなわち，発育した菌苔を0.3%ホルマリン加生理食塩水にかきとり均一な菌液とし，37°Cに1晩放置後，0.3%ホルマリン生理食塩水で3回遠心洗浄し，再び0.3%ホルマリン加生理食塩水に浮遊させ，濃度をMcFarland No. 5 に調整しホルマリン処理抗原とした。この抗原の0.1 mlを4日間々隔で5回ないし6回，家兎に静脈内注射し，最終免疫7日後に予備採血を行ない凝集素価が1：640以上の場合は全放血し血清を採取，-20°Cに凍結保存した。

7. 交差定量凝集反応

27株の抗原関係は27の抗血清とそれらのホモおよびヘテロのホルマリン処理抗原（K抗原）およびオートクレープ処理（121℃，2.5時間）抗原（O抗原）を用いた交差定量凝集反応により調べた。凝集抗原の濃度はMcFarland No. 3に調整し，2倍段階希釈（0.5 ml）した抗血清に等量の抗原を加えて混和後，37℃に18～20時間反応させて完全凝集を示した抗血清の最高希釈倍数の逆数で凝集素価を表現した。なお抗血清の希釈は1：20から開始した。

8. 吸収テスト

吸収用抗原はTSA平板で37℃，24時間培養した菌をホルマリン処理死菌として用いた。吸収用抗原の湿菌重量600 mgに1：10に希釈した抗血清3 mlを加えてよく混和し，37℃に2時間おき，さらに4℃に1晩おく。翌日，5,000 rpm，20分間遠心しその上清を吸収血清とした。この吸収操作を1回行なうことにより，凝集素は完全に除去された。

9. 血清群別法

血清群別はスライド凝集反応により行なった。1：4～1：10に希釈した特異抗血清と抗原濃度をMcFarland No.10に調整したホルマリン処理抗原をスライドグラス上で反応させ，1分間以内に凝集塊の出現したものを陽性と判定した。

10. マウスに対する毒力試験

1) 50%致死量（LD₅₀）

本試験に用いた菌株は分離後すみやかに凍結乾燥保存または-70℃に凍結保存されていたものである。これらの保存菌株をTSA平板に塗抹し37℃に24時間培養し，発育した菌苔をTrypticase soy broth（TSB，BBL）にかきとり，10⁶ CFU/ml，10⁷ CFU/ml，10⁸ CFU/mlおよび10⁹ CFU/mlの均一な菌液に調整したものを注射材料とした。これらの0.2 mlを各群5匹のマウスの尾静脈内に注射し，10日間マウスの生死を観察した。菌株のLD₅₀値はMatumoto（1949）〔57〕の方法により求めた。

2) 毒力株と非毒力株の判定法

1) と同様の方法で作製した注射材料 10^8 CFU/0.2 ml を 5 匹のマウスの尾静脈内に注射し、その後 10 日以内に 5 匹中 3 匹以上のマウスを斃した菌株を毒力株、そうでない菌株を非毒力株として判定した。

3) 体内における増殖態度

毒力株である CE 220 の 2.8×10^6 CFU/0.2 ml と非毒力株である NCTC 1621 の 2.0×10^8 CFU/0.2 ml を各群 40 匹のマウスの尾静脈内に注射し、注射 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 および 14 日後に 3 匹ずつ剖検し、脾臓と血液における生菌数を求めた。すなわち、3 匹のマウスの脾臓をまとめてガラスホモジナイザーに入れてよくすりつぶし、TSB を 3 ml 加えて均一な乳剤とし、同液体培地で 10 倍段階希釈する。各希釈当り 2 枚の TSA 平板を用いて定量培養を実施した。脾臓内の生菌数は Log 10/脾で表した。また、血液の培養はヘパリン処理した注射器を用いて 3 匹のマウスから 0.4 ml ずつ心臓穿刺によって採血し、それらをよく混和し上記と同様の方法で定量培養を行なった。血液中の生菌数は Log 10/ml で表した。

4) 病理組織学的検査法

マウスの各臓器は 10% リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、常法によって厚さ 5 μ m のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびグラム染色を施して鏡検した。

11. マウス腹腔マクロファージ (M ϕ) の採取法、培養法および感染法

おおむね Van Furth ら (1978) [109] の方法に準じて行なった。すなわち、M ϕ の誘発には可溶性デンプンとプロテオースペプトンの 5% 水溶液を用い、その 2.5 ml をマウスの腹腔内に注射、4 日後に心臓穿刺により放血死させ、直ちに 50 単位/ml ヘパリン加イーグル MEM (10% 非働化牛胎児血清含、抗生物質不含) の 3 ml を腹腔内注射し、軽く腹部を揉んだ後に開腹、腹腔細胞浮遊液を採取した。このようにして得られた細胞の約 90% は形態学的に M ϕ であつた。実験にあたっては 15 匹のマウスの腹腔細胞浮遊液を合せて用い、細胞数は 1.4×10^6 個/ml に調整した。

上記細胞浮遊液 1 ml を小試験管に分注し、炭酸ガス培養器で 37°C, 24 時間傾斜培養を行なった。その後、小試験管のガラス面に未吸着の細胞を除くために、37°C に保温した PBS で 2 回ガラス面を軽く洗った。このようにしてガラス面に付着した Mφ を純粋に得ることができた。

次に、菌を Mφ に感染させるために上記の Mφ の単層培養に 1.0×10^5 CFU/ml の菌を含むイーグル MEM の 1 ml を加えて、37°C, 90 分間傾斜培養を行なった。その後、この培養液は除き、Mφ を 37°C に保温した PBS で 1 回洗い、さらに新しいイーグル MEM (10% 非働化牛胎児血清および硫酸ストレプトマイシン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含) の 1 ml に置き換えて培養した。なお硫酸ストレプトマイシン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を培養液に添加することにより細胞外の *R. equi* の増殖は阻止される。

12. マウス腹腔マクロファージの殺菌能検査法

Mφ の殺菌能は細胞内菌数を経時的に定量することにより調べた。すなわち、菌と Mφ の接触後 90 分の経過時点を 0 時間とし、その後、3, 6, 9 および 24 時間毎に無作為に 3 本の培養試験管を選び、まず培養液を除き細胞を PBS で 2 回洗った。次に Mφ を破壊して細胞内の菌を放出させるために、滅菌した蒸留水を 1 ml 加えて時々激しく振盪し、20 分後にその生菌数を 10 倍段階希釈により TSA 平板を用いて求めた。Mφ 内での *R. equi* の生残率は次の式で計算した。

$$\text{生残率}(\%) = \frac{\text{一定時間後の M}\phi \text{ 内生菌数}}{\text{90 分感作後における M}\phi \text{ 内生菌数}} \times 100$$

また、食菌率は次の式で計算した。

$$\text{食菌率}(\%) = \frac{\text{90 分感作後における M}\phi \text{ 内生菌数}}{\text{培養 M}\phi \text{ に接種した菌数}} \times 100$$

13. 馬の単球の培養法と感染法

Kobayashi と Kono (1967) [45] の馬の白血球培養法に準じて行なった。すなわち、健康馬の頸静脈から 2.5 単位/ml のヘパリンを加えて採血し、20~30 分間室温に静置後、上層のプラズマをとり 1,000 rpm, 7 分間遠心を行なって白血球沈渣を集め、イーグル MEM (40% 非働化牛血清, 硫酸カナマイシン $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含) に浮遊させて 1 ml (総白血球数 10^7 個/ml) ずつ小試験管に分注し、

37°C, 24 時間 傾斜培養を行なった。その後, ガラス面に未吸着の細胞とカナマイシンを除くために, 37°C に保温したイーグルMEM (20% 非働化馬血清含, 抗生物質不含) 2 ml で 1 回洗い, 再び同液を 1 ml 加えてさらに 37°C, 24 時間培養した。この時点でガラス面に付着している細胞数は 5.0×10^5 個/ml で, これらの 90% 以上は形態学的に単球であり, これを実験に使用した。

菌を単球に感染させるために, 上記の単球の単層培養に 1.0×10^5 CFU/ml の菌を含むイーグルMEM の 1 ml を加えて, 37°C, 90 分間傾斜培養を行なった。その後, この培養液を除き, 単球を 37°C に保温した PBS で 1 回洗い, さらに新しいイーグルMEM (20% 非働化馬血清および硫酸ストレプトマイシン $50 \mu\text{g}$ /ml 含) の 1 ml に置き換えて培養した。また, 培養液の交換は 24 時間毎に行なった。

14. 馬の単球の殺菌能検査法

前述したマウス腹腔マクロファージの殺菌能検査法と同様に行なった。なお単球内の生菌数は培養 0, 3, 6, 9, 24, 48 および 72 時間後について調べた。

Ⅲ 実 験 成 績

1. 馬の糞便からの *R. equi* の定量培養

子馬の *R. equi* 感染症は わが国をはじめ世界各国に発生がみられることから、本菌が馬の飼育地帯に広く分布していることは容易に想像される。しかし、本菌の子馬への感染源については殆ど不明のまま現在に至っている。この原因の 1 つとして本菌の生態に関する知見が必ずしも十分に得られていなかったことによるものと思われる。

最近、Woolcock ら〔114〕は本菌の選択分離培地である NANAT 培地を用いて、127 例の馬の正常な糞便を培養し、そのうちの 90 例（70.9 %）から *R. equi* を分離し、高率に本菌が糞便中に存在していることを指摘した。しかしながら、この興味ある調査成績はあくまでも定性的であり、しかも用いた培地に *R. equi* に対する発育阻止作用のあることが指摘されている〔6〕。このことから馬の糞便における *R. equi* の保有状況が明らかにされたとは言い難く、本菌のより正確な生態を知る必要があった。

そこで、著者は NANAT 培地を改良して糞便からの本菌の定量培養を可能とするとともに、さらに母馬と子馬の保有状況の比較を行ない本菌の生態の一端を明らかにするため、以下の実験を行なった。

1) 選択分離培地の検討

Woolcock ら〔114〕の NANAT 培地と TYA 培地（対照として用いた NANA T 培地の基礎培地）および NANC 培地（NANAT 培地から亜テルル酸カリウムを除いた培地）を用いて *R. equi* の回収率を比較した。なお Table 2 に NANAT 培地の組成を記載した。

用いた菌株は参考株の ATCC 6939 と分離株の 11DKo85, CE220 および 1-5 の計 4 株である。これらの菌株の培養菌液 $2.2 \sim 4.1 \times 10^9$ CFU/ml を 10 倍段階希釈して上記 3 種類の培地に塗抹培養し、それぞれ形成されたコロニー数を算出することにより培地の発育支持能を比較した。

その結果は Table 3 に示すとおりで、NANAT 培地における *R. equi* の回収率を対照の TYA 培地と比較すると 4 株とも 1 % 以下であり、本培地に

R. equi に対する強い発育阻止作用のあることがわかった。一方, NANC 培地における回収率を TYA 培地と比較すると 91.1~101.1% であり, 本培地において *R. equi* は対照の培地と殆ど差がなく発育した。またこの事実は NANAT 培地に含まれる亜テルル酸カリウムには *R. equi* に対して発育阻止作用のあることを意味している。

次に, NANC 培地を用いて母馬 5 頭の糞便材料の培養を試みた。NANC 培地に含まれる 3 種類の阻止剤は Table 4 に示すように, 2 倍希釈によりそれぞれ 4 段階の濃度に添加した。糞便は 1:100 に希釈したものの 0.1 ml を塗抹培養し, 2 日後に出現した *R. equi* のコロニーを数えるとともに, その他の共存菌の発育状況も調べた。

その結果は Table 4 に示した。すなわち, (1) の阻止剤濃度を用いた場合では (2) のそれと比較すると共存菌の発育は明らかに阻止されるが, 同時に *R. equi* の発育も阻止されてしまう傾向がみられた。また, (2) と (3) を比較すると, (3) においては *R. equi* の発育菌数は (2) と殆ど差はないが共存菌の発育阻止の効果は十分でなく, *R. equi* の釣菌がむずかしくなってしまう。しかし, (2) ではそれがそれほど困難でなく最も優れていた。そこで以後の実験においては (2) のナリジキン酸 $10.0 \mu\text{g}/\text{ml}$, ノボビオシン $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ およびシクロヘキシミド $20.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した NANC 培地を用いて糞便の定量培養を行なった。なおこの NANC 培地に発育した *R. equi* の特徴的なコロニーを Fig. 2 に示した。

2) 母馬および子馬の糞便内菌数の比較とその推移

母馬 91 頭と子馬 36 頭の正常な糞便および胎児便 6 例から *R. equi* の定量培養を試みた。その成績は Table 5 に示すように, 母馬, 子馬の別なく, 調べた正常な糞便 127 例の全例から *R. equi* が分離された。その菌数は糞便 1 g 当たり $10^1 \sim 10^4$ CFU の範囲にあった。平均菌数は母馬において 8.42×10^2 CFU/g, 子馬において 7.57×10^2 CFU/g であり, それら平均の 95% 信頼限界はそれぞれ $6.48 \times 10^2 \sim 1.09 \times 10^3$ CFU/g と $4.19 \times 10^2 \sim 1.37 \times 10^3$ CFU/g であった。このことから母馬と子馬の糞便内の菌数の差は認められなかった。また, 子馬の正常便のうち生後最も早く培養に供した材料は 10 日齢のものであったが, その菌数は 5.6×10^2 CFU/g であり, すでに本菌の腸管内定着

が認められた。なお胎児便 6 例からは *R. equi* は勿論のこと、血液寒天培地を用いた培養においても他の細菌は全く分離されなかった。

一方、母馬 5 頭についてはそれぞれの個体から 1 月から 7 月にかけて月に 1 回の採材を行ない、糞便内菌数の推移を経時的に観察した。その結果は Fig. 3 に示すとおりである。この図から明らかなように、それらの菌数には個体差が認められるものの、採材の全期間を通して毎常 $10^2 \sim 10^4$ CFU/g 程度に本菌が一定して分離された。しかし、菌数の季節的な変動はとくに認められなかった。

2. *R. equi* の生理・生化学的性状

R. equi が馬の正常な糞便から例外なく分離されることから、本菌感染症における糞便由来株の存在を無視することはできない。そこで由来の相違により菌株間の生理、生化学的性状に特徴的な差異があるかどうかを知るために、糞便由来株と病変部由来株の諸性状を比較・検討し、以下の成績を得た。

1) 分離株の同定

糞便由来 821 株と病変部由来 374 株の計 1,195 株の同定は NCTC 1621 を参考株として行なった。その結果、参考株を含めた 1,196 株は以下に示す性状において全く同一の反応を示し、*R. equi* と同定された。

すなわち、TSA 平板に好氣的によく発育し、コロニーは光沢を帯び半透明略円形で粘液様に膨隆するいわゆるムコイド型で、培養 2 日後には直径 3 ~ 6 mm に達した。また、コロニーは最初灰白色であるが次第に薄桃色になり培養 10 日後には黄褐色に変った。カタラーゼ反応は陽性、オキシターゼ反応は陰性であった。グラム染色性は陽性であり異染小体は認められなかった。菌形には球状、楕円状ないし短桿状のものが混在していた。

TSA 平板 7 日間培養菌を用いた Kinyoun の抗酸性染色では菌の塗抹標本において、1 % 硫酸水の脱色に耐え赤染している菌体と完全に脱色されて青染する菌体が混在する特徴的な所見が得られた (Fig. 4)。なおこの染色性を Tammemagi (1953) [105] にならって部分的な抗酸性 (partial acid-fastness) と名付けた。硝酸塩還元試験は培養 3 日後に陽性の結果を得た。

TSI 培地においてはこの培地に含まれる 3 種類の糖からの酸産生は全く認められず、ガスや硫化水素の産生もなかった。さらに SIM 培地においても硫化水素の産生、インドール反応および運動性はすべて陰性であった。

2) 病変部および糞便由来株の生理・生化学的性状

病変部由来 40 株、糞便由来 40 株および参考株 8 株の計 88 株について、Table 6 に示す一般的な生理・生化学的性状 23 項目について調べた。その成績はこの表から明らかなように、参考株 8 株とわが国の分離株 80 株を比較すると両者は殆ど類似の性状を示した。また、病変部由来株と糞便由来株もおおむね同様の性状を示し両者に特徴的な差異は認められなかった。

23 項目のうち 90 % 以上の株に陽性の結果が得られた性状はコロニーの粘稠性と色素産生、グラム染色性、部分的な抗酸性、カタラーゼ産生、ウレアーゼ産生および硝酸カリウムと亜テルル酸カリウムの還元能の 8 項目であった。このうち、ウレアーゼ産生は培養 1 日後では全株陰性と判定されたが培養の経過にしたがって陽性の株が現われ、培養 5 日後には 90 % 以上の株が陽性となった。

一方、陽性率が 62.5 % から 85.0 % を示す 2 性状のうち、硫化水素は TSI 培地や SIM 培地においては全く検出されず、酢酸鉛試験紙法により はじめて検出され、病変部由来株の 85.0 %、糞便由来株の 72.5 % および参考株の 62.5 % が陽性であった。また、*L.monocytogenes* に対する 相乗溶血活性は Fig. 5 に示したが、*L.monocytogenes* の溶血活性を増強させ明瞭な β 溶血を起させる陽性の株 (C5, C12, C24, C28, C35, C39 および C40) と全く溶血活性の増強を示さない陰性の株 (C1, C3, C14, C38 および C41) に分かれた。この活性は病変部由来株の 67.5 %、糞便由来株の 75.0 % および参考株の 62.5 % に陽性の結果が得られたが、由来の相違による陽性率の差は認められなかった。

3) 病変部および糞便由来株の API ZYM による酵素プロファイル

病変部由来 40 株、糞便由来 40 株および参考株 8 株の計 88 株について 19 種類の菌体酵素活性を API ZYM キットを用いて調べた。

得られた菌体酵素プロフィールは Table 7 に示した。すなわち、参考株 8 株とわが国の分離株 80 株を比較すると、両者は 2 種類の酵素を除いては殆ど同様の反応を示した。このうち、 β グルコシダーゼ活性は分離株の 75.0 % が陽性であるのに対し、参考株は 37.5 % であり両者の陽性率に有意差が認められた ($P < 0.05$)。一方、 α フコシダーゼ活性は分離株では 80 株中 5 株 (6.25 %) に陽性を示す株がみられたが参考株では全く認められなかった。なお両者に有意差は認められなかった。

さらに病変部および糞便由来株の菌体酵素プロフィールを比較すると、両者は殆ど同様の反応を示し由来の相違による差異は認められなかった。

19 種類の酵素のうち 90 % 以上の株が陽性の活性を示すものはエステラーゼリパーゼ、ロイシンアリルアミダーゼ、バリンアリルアミダーゼ、酸性ホスファターゼ、ホスホアミダーゼおよび α グルコシダーゼであった。また、アルカリホスファターゼは 72.5 ~ 85.0 % の株が陽性であり、トリプシンは 62.5 ~ 77.5 % の株に弱陽性の結果が得られた。したがって、 β グルコシダーゼを含め 3 種類の酵素活性はいわゆる反応不定と判定された。

以上のように、*R. equi* の菌体酵素プロフィールはおおむね一定のパターンを示した。

3. *R. equi* の血清群別

本研究におけるこれまでの成績から *R. equi* が馬の腸内細菌叢を構成する 1 菌種であること、および糞便由来株と病変部由来株との間に生理・生化学的性状の差異は殆ど認められないことなどが明らかとなった。

そこで、血清学的性状にもとづく本菌の特徴づけのために血清群別法を確立し、病変部由来株と糞便由来株における血清群の分布や異同を明らかにすることを目的として実験を行なった。併せて国外由来株の血清群別や、最近 Prescott (1981) [76] によって報告された血清型と著者の血清群との関連を調べた成績についても述べる。

1) 未吸収抗血清を用いた交差定量凝集反応

R. equi 27 株の抗原関係を調べるために、ホルマリン処理抗原で家兎を免

疫して得られた 27 の抗血清とそれらのホモおよびヘテロのホルマリン処理抗原およびオートクレーブ処理抗原を用いて交差定量凝集反応を行なった。

凝集抗原としてホルマリン処理抗原を用いた交差定量凝集反応の成績は Table 8 に示した。すなわち、27 の抗血清はホモの抗原に対して 1 : 640 ~ 1 : 2,560 の凝集素価を示し、このうち 13 の抗血清はホモの抗原とのみ特異的に反応した。しかし、残りの 14 は凝集素価が 1 : 40 ~ 1 : 320 とホモのそれに比較すると低いものの 1 ~ 4 のヘテロ抗原とも交差反応を示した。

一方、Table 9 に示すように凝集抗原としてオートクレーブ処理抗原を用いた場合、27 の抗血清はホモの抗原に対して 1 : 320 ~ 1 : 2,560 の凝集素価を示した。このうちホモの抗原と特異的に反応した抗血清は 1 つのみで、残りの 26 の抗血清は 1 ~ 8 のヘテロ抗原とも交差反応を示した。このことはオートクレーブ処理 (121℃, 2.5 時間) によって抗原の特異性が失われ易いことを示している。とくに抗原 11 は 27 の抗血清のうち 25 に、また抗原 26 は 19 に 1 : 40 ~ 1 : 1,280 の凝集素価を示し全く株特異性が失われた。

以上のことから、ホルマリン処理抗原のほうがオートクレーブ処理抗原よりも株特異性があり、血清群別用抗原として優れていることが明らかとなった。

2) 吸収テスト

Table 8 から明らかなように、ホルマリン処理抗原を用いた交差定量凝集反応でも 14 の抗血清に交差反応が認められた。そこで、これらの抗血清をそれぞれに対応するヘテロ抗原で吸収することにより特異抗血清の作製を試みた。

Table 10 には 吸収テストに用いた抗血清と対応する交差反応抗原のリストを示した。この吸収テストの結果として、14 の抗血清にそれぞれ含まれる交差反応抗原に対する凝集素は完全に除去され、ホモの抗原とのみ特異的に反応する吸収抗血清が得られた。これらの吸収血清の最終の凝集素価は 1 : 320 ~ 1 : 2,560 であった。

次に、交差吸収テストの実際例を 2 つ挙げた。Table 11 は抗血清 3 と 16 の吸収テストの成績を示したものである。すなわち、未吸収抗血清 3 はホモ

の抗原ばかりでなくヘテロの抗原 16 に対して 1 : 160 の凝集素価を示す。そこで抗血清 3 を交差反応抗原 16 で吸収すると、ホモの抗原 3 に対する凝集素 (1 : 320) は残っているが、抗原 16 に対するそれは完全に除去された。また、未吸収抗血清 16 はホモの抗原ばかりでなくヘテロの抗原 3 に対して 1 : 160 の凝集素価を示すが、抗血清 16 を交差反応抗原 3 で吸収するとホモの抗原 16 に対する凝集素 (1 : 1,280) は残っているものの、抗原 3 に対するそれは完全に除去された。したがって、3 と 16 は抗原的に異なった菌株であることがわかる。

一方、抗血清 4 と参考株 ATCC 6939 に対する抗血清を用いた交差吸収テストの成績を Table 12 に示した。すなわち、抗血清 4 に対して抗原 4 と抗原 ATCC 6939 はそれぞれ 1 : 1,280 と 1 : 640 の凝集素価を示した。そこで、抗血清 4 と抗原 ATCC 6939 で吸収すると凝集素価は両者とも 1 : 20 以下に低下した。また、抗血清 ATCC 6939 を抗原 4 で吸収した場合も同様に両者に対する凝集素価は 1 : 20 以下になった。したがって、4 と ATCC 6939 は抗原的に同一の菌株であるということがわかる。

3) 血清群別用抗血清を用いた交差定量凝集反応

Table 8 に示すホモの抗原とのみ特異的に反応する 13 の抗血清と、吸収テストの結果得られた 14 の特異抗血清の計 27 の抗血清を群別用抗血清とし、血清群 1 ~ 27 の番号を付した。

Table 13 に 群別用抗血清を用いた交差定量凝集反応の成績を示した。この表からも明らかなように、群別用抗血清はそれぞれ対応するホモの抗原とのみ特異的に反応し、それらの凝集素価は 1 : 320 ~ 1 : 2,560 の範囲にあった。

次に、Table 13 に示された凝集素の特異性をさらに証明するために、27 の群別用抗血清をそれぞれホモのホルマリン処理抗原で吸収操作を行なった。その結果、これらの凝集素価は 1 : 20 以下に低下し完全に除去された。したがって、群別用抗血清中の凝集素の特異性が証明された。

4) スライド凝集反応による血清群別

分離株の血清群別を迅速かつ容易に行なうために，上記群別用抗血清を用いてスライド凝集反応による血清群別を検討した。

群別用抗血清は1：4～1：10に希釈したものをを用いた。このうち吸収操作によって得られた14の抗血清は1：10の希釈を，また，他の13の群別用抗血清のうち凝集素価1：640のものは1：4，1：1,280のものは1：6および1：2,560のものは1：8の希釈をそれぞれ用いた。

上記の希釈した群別用抗血清とMcFarland No.10に調整したホルマリン処理抗原との組合せで，交差スライド凝集反応を行なった結果，ホモの組合せのみに特異反応が出現し，Table 13の交差定量凝集反応の結果と同様の成績が得られた。このことからスライド凝集反応による血清群別が可能となった。

5) 病変部由来株の血清群

スライド凝集反応を用いて，*R. equi*感染症の子馬21頭の病変部由来374株の血清群別を行なった成績をTable 14に示した。21頭中12頭は同一個体から複数の菌株を分離しているため菌株数に片寄りがあるが，調べた374株は全株が10の血清群に群別された。その血清群は1～9と11であり，このうち，血清群2が分離された子馬は11頭，4が4頭，1が3頭，3と8および11がそれぞれ2頭，さらに5，6，7および9がそれぞれ1頭であった。

ここで注目されることは，同一個体由来株でも分離部位が異なると血清群が異なったり，また，同一病変部内に2～4の血清群の異なる菌が存在するということである。したがって，Table 14の子馬の総計が実際は21頭について調べているのに28頭になっているのはこの事実を反映しているためである。

Table 15に具体例として病馬3頭について，様々な病変部由来株の血清群を調べた成績を示した。すなわち，子馬No. TN-2においては肺膿瘍から血清群2，肺門リンパ節の膿瘍から2と8，あるいは大腿部の膿瘍や飛節炎から8が分離された。また，子馬No. TN-3においては肺の3か所に認められた膿瘍のうちの1つからは血清群4が，残りの2つのうちの一方からは2が，

他の1つからは2, 8および9が分離された。さらに, 腸間膜リンパ節や回腸部のリンパ節からは血清群8や2, 4および5が分離された。同時にこれらの血清群に属する菌は同一個体の腸内容からも分離されている。

以上のように, 病変部由来株は10の血清群に群別された。さらに, 病変部における血清群の分布は単純ではなく, 症例によっては2~4にも及ぶ血清群の異なる菌が同時に存在していることが明らかとなった。

6) 糞便由来株の血清群

スライド凝集反応を用いて, 母馬および子馬の糞便由来821株の血清群別を行なった成績をTable 16に示した。

結果として調べた全株が群別された。そのうち, 母馬由来株の主な血清群は4(25.6%), 2(13.1), 3(10.2), 11(9.0), 15(8.2), 14(4.9), 7(4.6), 1(4.2)および8(3.6)であり, 以上の9つの血清群に全体の83.4%が属していた。また, 子馬由来株の主な血清群は4(22.2%), 11(19.5), 2(13.0), 8(10.3), 3(9.2), 1(4.3), 7(3.8)および15(3.8)であり, 以上の8つの血清群に全体の86.1%が属していた。したがって, 糞便由来株では次の9つの血清群が母馬と子馬に共通して多く見いだされた。すなわち, 4(24.9%), 2(13.0), 11(11.3), 3(10.0), 15(7.2), 8(5.1), 7(4.4), 1(4.3)および14(4.1)であり, 総計821株中692株(84.3%)がこれらの血清群に属し, 残りの129株は他の18の血清群に属していた。

一方, 個々の糞便中に存在する*R. equi*の血清群を調べてみると, 母馬91頭と子馬36頭の計127頭中90頭の糞便から2~5の, 残りの37頭からは6~10の血清群の異なる菌が同時に分離された。その成績をTable 17に示した。このように, 複数の血清群の菌が糞便中に同時に存在していることが明らかとなった。

また, 母馬の糞便から経時的に分離された菌株の血清群の分布を調べてみると, 表には示していないが, 同一個体から長期にわたり連続して分離される血清群, 例えば2, 3, 4および8と, 一時的にかつ不規則に分離される血清群, 例えば12, 13, 16および22が存在した。このことは, *R. equi*のなかには馬の腸管に比較的定着しやすいものと, 単なる通過菌に終るものがあることを示唆している。

7) NCTC および ATCC 由来株の血清群

NCTC と ATCC から入手した参考株 8 株の血清群別をスライド凝集反応によって行なった。その結果，8 株とも群別され，その成績はこれらの菌株の由来とともに Table 18 に示した。このなかには馬由来株が 5 株あり，そのうちの 4 株は血清群 4，残りの 1 株は 16 であった。また，豚由来 1 株は血清群 12，庭の土壌由来 1 株は 2，さらに由来不明の 1 株は 4 であった。結局，8 株中 5 株が血清群 4 に属していた。

8) Prescott の血清型との関連

カナダの Prescott (1981) [76] は馬を含む，牛，豚，犬，猫および人由来 *R. equi* を 7 つの血清型に分類した。そこで，彼の血清型に属する菌株を入手し，著者の方法でそれらの血清群別を試みた。その結果を Table 19 に示した。すなわち，Prescott の 1 型は著者の血清群の 4，2 型は 16，3 型は 2，4 型は 12，5 型は 21，6 型は 1 および 7 型は 9 にそれぞれ一致した。以上のことから，著者の確立した血清群別法は馬を含む各種動物や土壌由来株の群別にも応用できることが明らかとなった。

4. *R. equi* の毒力

子馬の *R. equi* 感染症の病型は化膿性肺炎や化膿性腸間膜リンパ節炎あるいは潰瘍性腸炎など多彩であるが，その発症機序については殆ど不明のままである。一方，本菌感染症の実験的再現は常に成功するものではなく [25, 56, 77]，発症機序の複雑性がうかがわれるが，この理由の 1 つとして使用菌株の毒力に問題があると思われる。しかし，これに関する検討は十分になされているとはいえない現状にある。

本菌の毒力を検討する場合，最も適した動物が生後 2 か月以内の子馬であることは本症の疫学から明らかである。しかし，多数の菌株の毒力を調べるのに実験動物として子馬を使用することは実際的にはきわめて困難である。

一方，マウスやモルモットなどの実験小動物に対する本菌の毒力については，一定の成績が得られていないし，LD₅₀すら調べられていない。そこで，マウスを実験モデルとして，本菌の由来や血清群の違いにより毒力に差があるかどうか

かを調べるとともに、その毒力因子が何であることを検討した。

また、本菌の毒力に関連して *in vitro* で培養した馬の単球に対する態度も併せて検討したのでそれらの成績について述べる。

1) マウスに対する LD₅₀

本菌のマウスに対する毒力を知るために、近交系の S S 系マウスに対する LD₅₀ を調べた。使用した 6 株の由来とそれらの LD₅₀ は Table 20 に示すとおりで、6 株中 5 株は病変部由来株であり、残りの 1 株は土壌由来株である。病変部由来株のうち、CE 220, 46 および 843 はわが国の子馬感染症例由来の新鮮分離株であり、NCTC 1621 は Magnusson (1923) [53] の分離株である。

Table 20 から明らかなように、本菌のマウスに対する LD₅₀ は 10⁸ CFU 以上の株、10⁷ CFU の株および 10⁶ CFU の株の 3 階級に分かれた。すなわち、子馬の肺膿瘍由来株の ATCC 33701 と CE 220 が最も毒力が強く、続いて化膿性腸間膜リンパ節炎由来株の 843 と 46 であった。しかし、肺膿瘍由来株である NCTC 1621 は土壌由来の NCTC 4219 と同様に 10⁸ CFU でもマウスを全く斃さなかった。

以上のように、本菌のマウスに対する毒力は菌株によって異なることが明らかとなった。

2) 病変部および糞便由来株の毒力の比較

由来の相違により本菌の毒力に差があるかどうかを知るために、病変部由来 47 株と糞便由来 86 株のマウスに対する毒力の有無を調べた。毒力の判定はマウスに 10⁸ CFU を静脈内注射し、10 日以内に 5 匹中 3 匹以上のマウスを斃す株を毒力株、そうでない株を非毒力株とした。

その成績を Table 21 に示した。すなわち、病変部由来株では 47 株中 32 株 (68.1%) に、糞便由来株では 86 株中 13 株 (15.1%) に毒力が認められ、病変部由来株に毒力株の多いことが明らかとなった ($P < 0.01$)。

次に、血清群と毒力の関係をみると、病変部由来株では 1 から 9 群まですべてに、糞便由来株では 1, 2 および 8 群に毒力株が認められた。ところが、

同じ血清群に属しながら菌株によって毒力株と非毒力株があり，血清群と毒力との直接的な関連は認められなかった。しかし，8群に属する病変部由来株は全株，また糞便由来株は7株中6株が毒力株であり，逆に11群は病変部および糞便由来株とも非毒力株であった。

一方，NCTCやATCCの参考株の毒力の有無を調べた成績をTable 22に示した。この中には馬由来7株，豚由来4株，犬由来1株，人由来1株，土壌由来1株および由来不明1株が含まれているが，このうち毒力株は血清群4の他，わが国の分離株には認められなかった12，16および21群にも確認された。しかし，4や16群に属する株では非毒力株も存在し，参考株においても分離株と同様に血清群と毒力との関連は認められなかった。

なお，本菌を注射されたマウスの経過をみると，毒力株の場合は注射3日から5日後の間にマウスを確実に斃し，生存するマウスは殆ど認められなかった。

3) マウス体内における増殖態度

マウス体内における毒力株と非毒力株の増殖能の差を検討するために，毒力株のCE 220と非毒力株のNCTC 1621をそれぞれ 10^6 CFU 静脈内注射し，脾臓と血液の生菌数を経時的に調べた。

Fig. 6に脾臓における毒力株CE 220と非毒力株NCTC 1621の増殖曲線を示した。この図から明らかなように，両者の増殖能に顕著な差異が認められた。すなわち，毒力株CE 220は注射5日後に 2.8×10^7 CFU/脾の菌数まで漸増し，14日後でも 1.3×10^4 CFU/脾の菌が生存していた。これに対して非毒力株NCTC 1621は注射5日後に 2.4×10^2 CFU/脾の菌数に減少し，7日以後は脾臓から全く分離されずすみやかに体内から消失した。また，血液の定量培養の結果でも毒力株と非毒力株との間に差がみられ，毒力株CE 220注射マウスにおいては注射2日から5日後まで $10^2 \sim 10^3$ CFU/mlの菌が分離されたのに対し，非毒力株NCTC 1621注射マウスにおいては実験の全期間を通して血液からは全く分離されなかった。

一方，毒力株と非毒力株をそれぞれ注射されたマウスの経時的な病理組織学検査の結果からも上述の所見が裏付けられた。すなわち，毒力株CE 220

注射マウスにおいては注射 5 日後まで脾臓の細網細胞やマクロファージ、あるいは肝臓のクッパー細胞などの網内系の細胞内で菌は活発に増殖した。

Fig. 7 と Fig. 8 に CE 220 を注射 1 日後と 2 日後のクッパー細胞内の菌の所見を示した。Fig. 8 ではクッパー細胞内で増殖している本菌が確認される。なおこの菌の増殖は注射 7 日後以降において、形質細胞の反応を伴った活発なマクロファージの働きによってはじめて制止された。これに対して、非毒力株 NCTC 1621 は網内系の細胞内に感染のごく初期は認められたが、全く増殖できずすみやかに細胞内から消失した。

4) マウス腹腔マクロファージに対する態度

前述した *R. equi* のマウス体内における増殖態度や病理組織学検査の結果から、本菌の毒力解析への糸口は単核食細胞との交渉にあると考え、*in vitro* においてマウス腹腔マクロファージ (M ϕ) と本菌との交渉を、M ϕ 内生菌数を経時的に調べることによって検討した。

毒力株として CE 220 と ATCC 33701 を、非毒力株として NCTC 1621 と NCTC 4219 を用いた。まず、これらの菌株を M ϕ にそれぞれ接触させて食菌率を調べてみると、CE 220 が 17.3%，ATCC 33701 が 17.2%，NCTC 1621 が 18.8% および NCTC 4219 が 19.2% であり、菌株間に食菌率の有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

次に、M ϕ 内における本菌の生残率を調べてみると、Fig. 9 に示すように食菌 24 時間後における毒力株 CE 220 と ATCC 33701 の生残率は 298.8% と 151.9% であり、M ϕ 内で増殖していることがわかる。しかし、両菌株間の生残率には有意差が認められ ($P < 0.01$)、CE 220 が ATCC 33701 よりも活発に M ϕ 内で増殖することを示している。

一方、非毒力株 NCTC 1621 と NCTC 4219 の生残率は 48.9% と 13.0% であり漸減する傾向を示した。なお毒力株と非毒力株の生残率には有意差が認められている ($P < 0.01$)。

以上のように、毒力株は M ϕ 内で明らかに増殖できることがわかった。

5) 馬の単球に対する態度

R. equi がマウス腹腔Mφの殺菌能に抵抗し、細胞内増殖することは馬における本菌感染症の発症機序を考える上で興味ある事実である。そこで、本菌が馬の単核食細胞系の1つである単球内でも増殖できるかどうかを *in vitro* で検討してみた。

用いた菌株はCE 220, ATCC 33701, NCTC 1621 およびNCTC 4219 である。まず、これらの菌株を単球にそれぞれ接触させて食菌率を調べてみると、CE 220 が 8.7%, ATCC 33701 が 9.6%, NCTC 1621 が 12.4% および NCTC 4219 が 8.1% であり、菌株間に食菌率の有意差は認められなかった。 $(P > 0.05)$ 。

次に、単球内における本菌の生残率を調べてみると、Fig. 10 に示すように食菌 24 時間後において、CE 220 は単球の殺菌能に抵抗して 94.0% が生残しているのに対し、ATCC 33701, NCTC 1621 および NCTC 4219 はそれぞれ 33.0%, 17.3% および 18.9% であり、明らかに菌数の減少が認められた。さらに、食菌 72 時間後において、CE 220 の生残率は 226.8% と増加しているのに対し、ATCC 33701, NCTC 1621 および NCTC 4219 はそれぞれ 4.22%, 0.48% および 0.09% と激減した。なお食菌 24 時間、48 時間 および 72 時間後における CE 220 と他の 3 株との生残率には有意差が認められている ($P < 0.01$)。

以上のように、CE 220 は馬の単球内で増殖できることが明らかとなった。しかし、ATCC 33701 のように マウスの腹腔Mφ内では増殖できるが、馬の単球内では増殖できない株もあった。

IV 考 察

子馬の *R. equi* 感染症の発生は古くから世界各地で報告されてきたにもかかわらず、最近までその疫学、発症機序、血清学的診断法、予防法などに関する知見は必ずしも十分とはいえなかった。また、わが国の馬生産地帯においても以前から本菌感染症の発生が知られ、子馬の育成障害の原因の1つとして重要視されながらも、その防除のための基礎的研究は殆ど行なわれていなかった。しかし、1979年から1980年にかけてオーストラリア〔114, 118〕、日本〔70, 71〕およびカナダ〔77, 79〕において、*R. equi* の細菌学、感染症の疫学および免疫学的知見に関する論文が報告されるにおよび、ようやく本菌感染症の実態の一部が明らかにされつつある。

そこで、著者はこれまでに得られた知見をもとに、*R. equi* 感染症の実態をさらに明確なものにするために一連の研究を実施した。すなわち、馬における本菌の生態を調べ、また、本菌の血清学的分類法を確立し、病変部由来株と正常な糞便由来株との異同あるいは関連性について検討を加えた。さらに *R. equi* の病原性に関連して、その毒力をマウスや培養細胞を用いて解析した。

以下に、これまで得られた成績について考察を加えたい。

1. 馬の糞便からの *R. equi* の定量培養

R. equi が土壌中に存在することは古くから知られていた〔8, 40〕。しかし、最近、Woolcock一派の精力的な研究により〔66, 67, 117, 118〕、本菌が馬を含む各種動物の糞便にも存在することが明らかにされ、腸管は本菌の重要な生存場所と考えられるに至った。この知見は本菌の生態や感染症の疫学を知る上で興味ある事実であり、しかも糞便由来株が子馬感染症の原因菌となりうる可能性も示唆している。

さて、Woolcockら（1980）〔118〕の選択分離培地を用いた馬の糞便からの本菌の分離報告をみると、母馬では73頭中51頭（70%）、子馬では12頭中9頭（75%）および雄馬では10頭中5頭（50%）から分離され、本菌が高率に馬の糞便に存在していることがはじめて明らかにされた。

一方、BartonとHughes(1981)[6]も、Woolcockらの方法を追試し、土壌や糞便から分離率は低いものの本菌の分離に成功している。しかし、彼らはこの報告のなかでWoolcockら[114]の試作した選択分離培地、NANAT培地に本菌に対する発育阻止作用のあることを指摘した。また、この事実は著者もNANAT培地を用いた予備実験で経験し、本培地の改良を試みるきっかけとなった。

このように、NANAT培地に*R. equi*発育阻止作用が存在することから、本培地を用いて得られた成績では馬の糞便における本菌の正確な把握はできないと思われる。そこで、NANAT培地を改良し、満足のゆく本菌選択分離培地作製のための検討を行なった結果、この培地に0.005%の濃度に添加されている亜テルル酸カリウムに発育阻止作用のあることがわかった。しかし、亜テルル酸カリウムを単独に添加した培地においては、その濃度が0.04%であっても本菌は発育できることから、この培地に添加されている3種類の阻止剤と亜テルル酸カリウムの相乗作用によって、本菌の発育が阻止されるものと解釈される。

また、NANAT培地から亜テルル酸カリウムを除いたNANC培地においても、原法の阻止剤濃度を使用した場合は、糞便の定量培養において*R. equi*に対する部分的な発育阻止が観察された。これらの阻止剤のうち、ナリジキン酸に対して*R. equi*が自然耐性であることはすでに報告[116]されているし、シクロヘキシミドは抗真菌剤であり、細菌に対して殆ど作用しないことは周知の事実である。このことから、この部分的な発育阻止はノボビオシン25.0 μ g/mlに原因していることが推測された。事実、予備実験において、わが国の分離株37株のノボビオシンに対するMICを調べた成績によると、37株中12株(32.4%)が25.0 μ g/mlであり、残りの25株(67.6%)が50.0 μ g/mlであった。したがって、原法のノボビオシン25.0 μ g/mlの濃度では約30%の株に発育阻止が起こることになる。このような基礎的な検討のもとに、著者はNANAT培地を改良したNANC培地を試作し、馬の糞便からの*R. equi*の定量培養を可能とした。

前述したWoolcock一派[114, 118]やBartonとHughes[6]により、馬の糞便からの*R. equi*の分離報告がなされているが、それらはあくまで定性的な成績にとどまっており、しかも選択作用の強い培地を用いているため、糞便におけ

る本菌の実態を正確に反映しているとはいえない。これに比較して、ここに示した改良選択分離培地を用いた著者の成績は、その実態をより正確に反映したものと思われる。すなわち、この調査において、母馬 91 頭と子馬 36 頭の計 127 頭の全例から *R. equi* が分離され、その菌数は糞便 1 g 当り、平均 $10^2 \sim 10^3$ CFU であった。また、母馬と子馬との間に菌数の差は認められなかった。なお子馬においては、生後 10 日齢においてすでに 5.2×10^2 CFU/g の本菌が分離されていることから、生後間もなく母馬あるいは周囲の環境を介して本菌が子馬の腸管に侵入・定着するものと思われた。ちなみに、Trum (1949) [107] によると、出生直後の子馬の腸管は無菌であるが生後 2 日目ではその糞便 1 g 当りに 10^5 CFU 以上の大腸菌が存在し、生後 5 日から 12 日目にかけてはレンサ球菌が優勢な菌種になると報告している。

現在まで、*R. equi* が馬の腸内細菌叢を構成する 1 菌種であることを裏付ける詳細な成績は報告されていない。しかし、著者の上述した成績や母馬の糞便からの本菌の経時的な分離成績 (Fig. 3) から、*R. equi* が腸内細菌叢の 1 構成菌種であることは明らかである。だが、糞便 1 g 当り $10^2 \sim 10^3$ CFU という菌数は、Mitsuoka と Kaneuchi (1977) [62] の報告した馬の糞便菌叢における酵母の菌数、 6.3×10^2 CFU/g におおよそ匹敵し、けっしてその菌数は多いとはいえない。

一方、著者の考えとは異なり、Barton と Hughes (1984) [7] は本菌の生理学的特性や家畜の放牧とは無関係に本菌が種々な土壌から分離されることから、*R. equi* を土壌細菌とみなしている。

ところで、Jensen [40] による庭や牧草地の土壌からの、また Bendixen と Jepsen [8] による畜舎の土壌からの本菌の分離報告、あるいは Wilson [112] による本菌が土壌中で 1 年以上も生存できることの実験的証明などから、本菌感染症における感染源としての土壌の役割が強調された [3, 34, 48, 50]。とくに Lovell [50] は、本症の発生が晩春から夏にかけて生まれた子馬に多く見られるのは、この時期の気温が土壌中の *R. equi* の増殖は適していることと関係があると推測している。著者は彼の推測を裏付ける調査は行なっていないが、わが国においても本症の発生は遅生まれの子馬に多く見られる傾向がある。し

かし、5月から8月にかけて採材した子馬の糞便における *R. equi* の菌数は $10^2 \sim 10^3$ CFU/g であり、1月から4月の糞便から得られた菌数と殆ど同じであった。したがって、子馬の糞便における菌数の推移に季節的な変動は認められていない。仮に、子馬の腸管への本菌の侵入が周囲の環境、とくに土壌を介してなされ则认为すると、上述の成績からは晩春から夏にかけての本菌の土壌中における増殖は殆どないものと思われる。

そこで、本研究における糞便からの *R. equi* の分離成績から、著者は馬と周囲の環境とにおける本菌の循環と、母馬から子馬への伝播を Fig. 11 に示した模式図のように解釈した。すなわち、*R. equi* の母馬から子馬への伝播は直接糞便を介して、あるいは糞便に汚染された土壌や牧草を介して行なわれるものと思われる。また、子馬に移行した本菌はその糞便を介して母馬に伝播し、あるいは子馬自身に循環を繰返すものと考えられる。

2. *R. equi* の生理・生化学的性状

一般に *R. equi* の同定は Rogosa らが Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 第8版(1974) [89] に記載した10種類にも満たない性状を参考に行なわれている。実際、化膿性肺炎の子馬から、特徴的な粘液様に膨隆した薄桃色のコロニー性状を示す細菌が分離され、それがグラム陽性菌であれば、Rogosa らの記載した数種類の性状検査を追加することにより本菌の同定はできる。

しかし、本菌は子馬感染症の原因菌であるばかりでなく、馬の腸内細菌叢を構成する菌種の1つであり、しかも、本菌感染症は馬以外の家畜や人でも報告され獣医学領域にとどまらず広く知られてきている。したがって、著者は本菌の同定をより確実なものにするために、多数の菌株について数多くの性状を検討し、本菌同定のための資料を提供する必要があることを痛感している。

一方、これまでの本研究で明らかなように、*R. equi* が子馬感染症の病変部ばかりでなく、健康な馬の糞便に常に存在していることから、分離由来を異にする菌株間の生理・生化学的性状に差異があるかどうかを調べることは、本菌感染症の疫学を知るうえで興味深い。

ところで、最近各種の細菌簡易同定用キットが市販され、従来の培養による性状検査の成績と同定用キットで得られたその一致率が高いことから、一般に広く用いられてきている。なかでも、栄養要求性の厳しい菌種や、通常行なわれる同定のためのテストでは多くの項目で陰性を示すような菌種の同定に際して、API ZYMと称されるキットが用いられ、菌体の酵素活性を調べることにより迅速に菌種の同定が可能なが報告されている〔37, 44, 103〕。

すでに、Magnusson〔54〕, NatarajanとNilakantan (1974)〔72〕, ReddyとKao (1978)〔85〕およびMutimerとWoolcock (1981)〔68〕の報告でも明らかのように、本菌は従来の生化学的性状検査において陽性の結果を示す性状に乏しく、しかも反応不定の性状のあることが知られている。

そこで、従来の生理・生化学的性状検査の他にAPI ZYMを加えて、病変部由来40株と糞便由来40株さらに参考株8株を含めた本菌の諸性状を検討してみた。

その結果、Table 6に示すように88株の*R. equi*は23項目の生理・生化学的性状において、硫化水素産生と*L. monocytogenes*に対する相乗溶血活性を除いては、殆ど同様の反応を示し、本菌が均一な性状を示す菌種であることが明らかとなった。そこで、本菌に特異的な性状として、コロニー形状と色素産生、部分的な抗酸性、ウレアーゼの遅産生性および糖の非分解性をあげ、これらに加えてカタラーゼ産生、硝酸カリウムおよび亜テルル酸カリウムの還元を本菌同定のKey charactersと考察した。

なお、MutimerとWoolcock〔68〕は本菌にコロニー形状の変異と2・3の生化学的性状に反応不定の成績が得られることを強調して、本菌の同定はむしろ難しいだろうと報告している。しかし、著者の成績では調べた1,195株にコロニー形状の変異は認められなかったし、硫化水素産生などに反応不定の成績が得られた以外は殆ど一定の結果が得られ、上述したKey charactersにより本菌の同定は容易にできると考えられる。

ところで、Fraser (1964)〔29〕によって本菌の生物学的性状の1つとして、*Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Staphylococcus aureus*あるいは*L. monocytogenes*の溶血能を増強させる相乗溶血活性が報告されている。Nakazawa

と Nemoto (1980) [71] は *L.monocytogenes* の病原性と溶血能が関連することから [33], *L.monocytogenes* の不明瞭な溶血をはっきり識別するための方法として, *R. equi* と *L.monocytogenes* の相乗溶血現象を調べ報告した。この中で著者らは, *R. equi* は菌株によつて *L.monocytogenes* の溶血を増強させる株とそうでない株のあること, しかもこの活性と *R. equi* の卵黄反応とが良く相関することを明らかにした。ほぼ同時期に, Bernheimer ら (1980) [10] は *R. equi* のこの活性は本菌の産生するホスホリパーゼ C によることを明らかにし, これを “Equi 因子” と名付けた。その後, Skalka ら (1982) [96] や Prescott ら (1982) [78] によつて, *R. equi* に Equi 因子の存在が確認されたが, とくに Prescott らはこれを本菌に特異な活性であるとし, 同定上の有効な性状とみなした。しかし, Table 6 や Fig. 5 に示すように, 今回調べた 88 株中 26 株は Equi 因子陰性であり, 反応不定の成績が得られている。したがって, Equi 因子の存在の証明は同定上の参考にはなるものの, 有効な性状とは考えにくい。なお Equi 因子がホスホリパーゼ C であることから, これが本菌の毒力, 延いては由来と関係があるのではないかと推測したが, Table 6 から明らかなように, 病変部由来株と糞便由来株とで陽性率に差は認められていない。

一方, API ZYM により得られた *R. equi* の菌体酵素プロファイルは Table 7 に示したが, 19 種類の酵素活性のうち, 6 種類は陽性, 3 種類は反応不定および 10 種類は陰性であり, 従来の方法による性状検査成績と同様に一定の反応が得られ, 菌体酵素プロファイルからも本菌種の均一性が確認された。また, これは Goodfellow ら (1982) [32] の数値分類において, 本菌がきわめて均一な菌種であるという報告を支持するものである。しかし, このことは病変部由来株も糞便由来株もその諸性状においては殆ど差異がないことを示し, 生理・生化学的性状にもとづく本菌の特徴づけの困難さを意味している。

ところで, 糞便由来 4 株に α フコシターゼ陽性の結果が得られているが, これらの株は後述する本菌の血清群のうち, 16 に属するものであった。そこで, 血清群 16 の 12 株をさらに追加して本酵素活性を調べたところ, 8 株 (66.7%) に陽性の反応が得られた。したがって, この活性が血清群 16 に特異的とはいえないまでも, 特定の血清群に片寄った活性であることは事実であり興味深い。

しかしながら、血清群と諸性状との関連についても全体的に検討を加えたが、上述の α フコシターゼ以外の性状との関連は全く認められていない。

最近、Mutimer と Woolcock (1982) [69] は本菌や、*C. diphtheriae* , *C. pseudotuberculosis* , *C. Pyogenes* , *L. monocytogenes* および *Erysipelothrix rhusiopathiae* の同定に API ZYM が使用可能なことを報告したが、*R. equi* に関しては著者がトリプシンを弱陽性と判定した点を除いては、彼らの成績は著者のそれに一致した。いずれにしても、本菌同定における API ZYM の有効性が明らかにされ、このキットによる *R. equi* の迅速同定が可能となった。

3. *R. equi* の血清群別

本菌の生理・生化学的性状についての検討の結果から、分離由来にかかわらず、ほぼ均一な性状を示す菌種であることが明らかとなり、生理・生化学的性状にもとづく本菌の分類、すなわち、生物型別はむずかしいことがわかった。そこで血清学的性状にもとづく分類、すなわち、血清群別により本菌の特徴づけを行ない、菌株の由来と血清群との関連について検討を加えた。

本菌に血清学的性状の異なる菌株が存在することは、すでに Bruner ら (1939) [11] , Karlson ら (1940) [42] , Bruner と Edwards (1941) [12] および Woodroffe (1950) [113] などによって報告されていた。なかでも、Bruner ら [11] は本菌に種特異抗原と型特異抗原の存在することをはじめて明らかにした。すなわち、0.5N の塩酸で 100°C、40 分間加熱抽出した残渣の菌体を抗原とした補体結合反応において、調べた 20 株すべてに共通する強い種特異性が出現したことを、また、ホルマリン処理抗原による凝集反応では株特異性が認められ、それら 20 株は 7 つの血清型に分類され、しかもこの型特異性は塩酸抽出 (上清) 抗原による沈降反応でも同じ成績が得られたと報告した。またこの事実は Woodroffe [113] によっても確認されている。Table 9 に示す著者の成績でもオートクレーブ処理によって株特異性が失われる傾向がみられ、とくに抗原 11 と 26 は多数の抗血清と反応するようになったが、これは Bruner らが指摘した種特異抗原による反応かもしれない。

その後、Bruner と Edwards [12] は馬の産道や流産胎児、子馬の肺、野牛の

子宮分泌液および豚の顎下リンパ節の病的材料から分離された本菌34株の抗原関係を、主として凝集反応と凝集素吸収試験により調べ、19の血清型の存在を報告した。しかし、彼らの報告は病的材料由来の限られた菌株についての成績であり、多数の血清型が存在することは指摘したものの、具体的な血清型別法については記載していない。また、子馬の*R. equi*感染症における血清型別の意義についても殆ど触れていない。

このような背景から著者は*R. equi*の血清群別法を確立し、馬の糞便における本菌の生態や子馬の本菌感染症の疫学を分離株の血清群から整理してみた。なおBrunerら〔11〕や著者の成績（Table 8, 9）から、本菌の血清学的特異性が菌体表層にあり、それは莢膜様物質（Fig. 1）〔115〕に依存していると思われるが、本研究においてはそれを含めた本菌の抗原構造までは明らかにできなかった。したがって、ここでは厳密な意味での血清型という用語は使わずに、それを包括した“血清群”あるいは“血清群別”を用いている。

本研究において、著者は子馬の病変部および馬の糞便由来1,195株から血清学的性状の異なる27株を選抜し、交差定量凝集反応と吸収テストによって、それらの血清学的特異性を証明し、血清群27と血清群別法をはじめて確立した。それによると、母馬および子馬の糞便由来株のうち84.3%は分離頻度の高い順に次の9つの血清群、すなわち、4, 2, 11, 3, 15, 8, 7, 1および14に、残りの15.7%は他の18の血清群に属していた。一方、病変部由来株の主な血清群は2, 4, 1, 3, 8, 11などであり、調べた全株が10のそれに群別された。したがって、糞便由来株の血清群は病変部由来株のそれに比較すると多種多様であるが、上述の9つの血清群に集中する傾向があり、しかも、病変部由来株の主な血清群に共通する菌株の分離頻度の高いことが明らかとなった。よって、この事実は両者の関連を強く示唆するものと思われる。

ところで、個々の糞便内に存在する*R. equi*の血清群は単一ではなく、常に血清群の異なる複数の菌が同一糞便から分離された。また、糞便内の菌数を経時的に調べた母馬において、月別に血清群の分布を整理してみると、同一個体にあつて毎月、常に分離される血清群2, 4, 8などと、例えば12, 13, 16, 22などのように不規則に分離される血清群が存在していた。この事実から、前者の

血清群に属する菌はその個体にとっては定住菌であり，後者に属する菌は通過菌と理解することができる。また，分離頻度の高い血清群に属する菌を定住菌，そうでないものを通過菌と解釈することもできる。

SakazakiとMiura（1956）〔90〕は馬の糞便から経時的に分離された大腸菌のO群別を行ない，同一個体にO群の異なる複数の菌が同時に存在することを明らかにするとともに，連続的にしかも長期間分離されるO群と，間欠的で不規則に分離されるO群とが存在することを報告し，前者を定住菌，後者を通過菌と呼んだ。これは馬の糞便における*R. equi*の血清群の分布を調べた著者の成績に類似しており，腸内細菌叢を構成する菌種に共通する所見だと思われる。例えば，人における大腸菌〔93〕や*Clostridium perfringens*〔2〕においても同様の報告がなされている。

一方，*R. equi*感染子馬の種々な病変部から分離された菌株の血清群を調べた結果，興味ある事実が明らかとなった。すなわち，同一個体の病変部から血清群の異なる菌が分離されることである。Table 15に示すように，子馬No. TN-2においては肺膿瘍から2群，腸間膜リンパ節の膿瘍から2群と8群，さらに大腿部の膿瘍や飛節炎から8群が分離されている。したがって，血清群の分布からみると，この個体においては本菌の侵入門戸が複数存在したと考えることができる。そのうちの1つは呼吸器感染から肺膿瘍の形成，また，消化管感染から腸間膜リンパ節に膿瘍形成，さらに，外傷による創傷感染から皮下膿瘍や関節炎の併発である。

事実，本症の感染経路として呼吸器〔35, 41, 56〕，消化管〔4, 17〕，外傷〔98〕あるいは寄生虫の子虫による経皮感染〔24, 27〕が報告されているが，同一個体において複数の感染経路から本菌が体内に侵入したことを示唆する報告は見当らない。また，子馬No. TN-3においては，肺に形成された3か所の膿瘍からそれぞれ血清群の異なる菌が分離されたり，同一膿瘍内に血清群の異なる複数の菌が同時に存在していた。このことは，感染経路ばかりでなく，侵入菌も単一ではなく，血清群の異なる複数の菌による感染であることを示唆している。そして，この感染源として，子馬をとりまく環境が考えられ，そこが糞便および病変部から高頻度に分離される複数の血清群の菌によって，汚染され

ているためと推測される。

一方、馬における本菌感染症が主として子馬にみられることや、子馬の免疫不全と子馬病が関係あること〔58, 102〕, さらに人の本菌感染症がホジキン病や腫瘍などに起因する免疫不全患者〔9, 14, 30, 55〕, および免疫抑制剤や副腎皮質ステロイド剤などの生体の免疫不全を惹起する薬剤を投与された腎臓移植患者〔92〕にみられることから、いわゆる日和見感染症とみなすことができる。したがって、宿主－寄生体－環境相互関係によって感染症が成立することは真理であり、この概念のもとに本菌感染症も把握しなければならないと思われる。これまでの本研究において、血清群別法による本菌の特徴づけにより、その生態や感染症の疫学の1部は明らかにされたが、宿主側の発症要因についての検討はできなかった。今後はこの点を解明するための研究が必要だと考えている。

ところで、Prescott〔76〕は*R. equi*の血清型別を報告し、馬を含む各種動物由来97株を7つの血清型に分類している。彼の型別法はゲル内沈降反応によるもので、その抗原は生理食塩水抽出法という温和な方法で菌体表層の莢膜様物質を抽出したものである。

そこで、彼の7つの血清型に属する菌株を著者の方法で群別してみると、Prescottの1型は著者の4群、2型は16群、3型は2群、4型は12群、5型は21群、6型は1群および7型は9群にそれぞれ一致した。また、NCTCやATCCから入手した8株も著者の血清群に全株、群別された。したがって、著者の血清群別法は各種動物や土壌由来株の群別にも応用が可能であり、本菌感染症の疫学調査に広く応用できるものと思われる。

なお、カナダ〔76〕やオーストラリア〔65〕ではPrescottの1型が高頻度に分離されているが、彼の1型は著者の4群に一致し、4群はわが国においても優勢な血清群であり、その分布に共通性があるように思われる。

最近、Mutimerら(1982)〔65〕は馬、牛、豚、羊、人、カンガルー、コアラおよび土壌由来*R. equi* 100株の血清型別をPrescottの方法で行ない、84株は型別されたが16株は型別不能であったと報告し、未知の血清型の存在を示唆したが、これらの菌株が著者の血清群のいずれに該当するかは興味のもたれ

るところである。

いずれにしても、血清群別による *R. equi* の特徴づけによって、本菌感染症の実態を把握するための基礎資料が提供されたものと考えている。

4. *R. equi* の毒力

R. equi は土壌や各種動物の糞便から分離され、広く自然界に分布している菌種であることが明らかにされてきた。また、本菌による子馬感染症の感染像も数多くの症例報告によってほぼ結論が得られてきている。しかしながら、こうした生態学および臨床的研究に比較して、本菌の毒力因子や発症機序といった問題についての検討は最近まで殆どなされていない状況にあった。とくに、発症機序の研究には実験動物として生後2か月以内の子馬を用いなければならず、実験の範囲が制約されてしまう恨みがあった。しかも、本菌による病気の実験的再現が常に成功するものではなく〔25, 56, 77〕、これは宿主側の条件もさることながら、用いた菌株に毒力の差異があるためと推測された。そこで、マウスを実験モデルとして、本菌の毒力をLD₅₀、生体内での増殖態度さらに培養したマクロファージ(Mφ)に対する態度を指標として検討してみた。

これまでに本菌の毒力をマウス、モルモット、ウサギなどの実験小動物を用いて調べた成績はあるが、毒力を認めたという報告と、認めないという報告があり、一定した成績が得られていなかった。例えば、ThalとRutqvist (1959)〔106〕は子馬や豚由来株の大量菌液をマウスに腹腔内注射することにより、動物を5日以内に斃死させたと、またDimockとEdwards (1931)〔25〕は子馬由来株の実験小動物に対する病原性は認められなかったとそれぞれ報告している。Table 20に示す著者の成績でも、LD₅₀を調べた6株のうち、2株は10⁸ CFUをマウスに静脈内注射しても全頭が生存したのに対して、残りの4株は5日以内に動物を全頭斃死させた。また、それらのLD₅₀も10⁶ CFUの株、10⁷ CFUの株および10⁸ CFU以上の株の3階級に分かれた。したがって、本菌にはマウスに対する毒力株と非毒力株が存在することが明らかとなった。また、この成績は子馬の感染実験に際して、供試菌株の選択は慎重でなければならぬことを示唆している。

次に、菌株の由来や血清群を考慮し、多数の菌株についてマウスに対する毒力を調べてみた (Table 21)。そのうち、菌株の由来と毒力の関係をみると、病変部由来株は糞便由来株よりも毒力株の多いことが明らかとなった ($P < 0.01$)。しかし、この理由については本研究で解明できなかったが、Segal と Bloch (1957) [94] および Segal と Miller (1965) [95] によれば、結核菌においては *in vivo* 由来菌は *in vitro* 培養菌に比べ、マウスに対する毒力が強く、しかも両者に菌体構成々分、とくに脂質の量的および質的差異が認められるという。このことから類推すると、*R. equi* も子馬の病変部において、菌体構成々分の量的および質的修飾を受けることにより、毒力を増したものと考えられる。

一方、血清群と毒力株の関係をみると、同一血清群の菌株に毒力株と非毒力株が存在し、血清群と毒力の直接的な関係はないように思われた。この事実は、血清群別が菌体表層の莢膜様物質にもとづいていることから、本菌の毒力における莢膜様物質の役割はさほど重要でないことを示唆している。しかし、Smith (1966) [99] は何らの実験的証拠もなしに、本菌の莢膜は $M \phi$ の食菌作用に抵抗する機能があると考察し、本菌の病原性発現における莢膜の存在を重要視した。今回、著者が毒力を調べた菌株は、いずれも本菌に特徴的なコロニー形状を示し、莢膜様物質の存在が推測された。また、 LD_{50} を調べた菌株においては電子顕微鏡観察によりその存在を確認している。したがって、莢膜様物質の有無と本菌のマウスに対する毒力とに直接的な関係はないものと考えられる。

そこで、本菌の毒力因子が何であるかをさらに調べるために、毒力株 CE220 と非毒力株 NCTC 1621 をマウスに静脈内注射し、その後、経時的に脾臓と血液の生菌数を調べると同時に、病理組織学的検討を加えたところ、毒力株においては肝臓や脾臓の網内系の細胞内で増殖している所見が得られた (Fig. 8)。また、脾臓内における毒力株と非毒力株の増殖態度も明らかに異なり (Fig. 6)、毒力株が一時的に増殖し、注射 14 日後でも 10^4 CFU 以上の菌数を維持しているのに対し、非毒力株は注射 7 日以降すみやかに消失した。したがって、毒力株と非毒力株の決定的な違いは生体内、とくに網内系細胞内における増殖能の

差にあることが考えられる。

一般に、*Mycobacterium*, *Listeria*, *Nocardia*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Brucella* などに属する菌種は、生体内で食細胞に食菌されても容易には殺菌されず、細胞内で長期間生存し、さらに、細胞内での増殖も可能であることが知られている〔19, 38, 104〕。

一方、*R. equi* が細胞内寄生細菌であることを裏付ける実験的証拠は見当たらないが、著者はこれまでのマウスに対する感染実験の成績から、本菌の毒力解析への糸口は単核食細胞と本菌との交渉にあると考え、*in vitro* でマウス腹腔 M ϕ および馬の単球に対する態度を観察した。

その結果、マウス腹腔 M ϕ の毒力株と非毒力株に対する食菌率は 17.2～19.2% の範囲にあり、両者に差は認められなかったが、毒力株 CE220 と ATCC 33701 は M ϕ の殺菌作用に抵抗性が大で、食菌 9～24 時間後には M ϕ 内で増殖がみられた。とくに、CE220 は ATCC 33701 よりも約 2 倍増殖能があり、後述する馬の単球内における増殖能は両者に顕著な差が現れた。これに対し、非毒力株 NCTC 1621 と NCTC 4219 は M ϕ の殺菌作用に対して抵抗性が弱く、食菌後の時間の経過とともに漸減した。このように、毒力株と非毒力株の差異は M ϕ の殺菌作用に抵抗し、その中で増殖できるか否かにあることが明らかとなった。したがって、本菌の毒力因子の 1 つは M ϕ 内増殖能であると考察した。また、これまでに得られた所見から、本菌を細胞内寄生細菌とみなして差支えないと思われる。

Une (1977)〔108〕はウサギの腹腔 M ϕ と *Yersinia enterocolitica* とを *in vitro* で 90 分間接触させた結果、その食菌率が菌株によるばらつきはあるものの、平均 14～16% であったことを、また、ウサギに対して病原性のある菌株は食菌 6～9 時間後には M ϕ 内での増殖がみられるが、非病原性の菌株は増殖できずに漸減したことを報告し、M ϕ 内における増殖能を *Y. enterocolitica* の毒力因子の 1 つと考察している。

また、Wilder と Edberg (1973)〔111〕はマウス腹腔 M ϕ と *L. monocytogenes* の交渉を観察し、マウスに対する毒力株は食菌 24 時間後も殺菌されずに生存しているのに対して、非毒力株は漸減したことを報告し、M ϕ の殺菌作用に対

する抵抗性と毒力の関係を考察している。

このように、*Y. enterocolitica* や *L. monocytogenes* で得られた成績と *R. equi* のそれは良く類似していることが明らかとなった。

そこで、本菌が本来の宿主である馬の単核食細胞系の細胞内で増殖できるかどうかを調べることは、本菌感染症の発症機序や免疫を考える上で興味深い。すでに、Cimprich と Rooney [17] および Martens ら [56] は本菌の自然感染例や実験感染例の病理組織学的所見から、腸間膜リンパ節や肺の病変部に多数の本菌を貪食したMφの存在することを報告しているが、これは本菌が馬のMφ内でも生存し、増殖することを示唆しているものと考えられる。

著者は、培養方法 [45] の確立されている馬の単球を用いて本菌との交渉を観察した。すなわち、単球の毒力株と非毒力株に対する食菌率は 8.1~9.6% の範囲にあり、両者に差は認められないものの、マウスのMφで得られた成績と比較すれば食菌率は明らかに低かった。これは、Cline (1978) [18] が指摘しているように、成熟Mφに比べれば単球の貪食作用は劣るということを反映しているものと思われる。

さらに、単球内での態度をみると、毒力株 CE 220 は単球の殺菌作用に抵抗性で、食菌 24~72 時間後にかけて明らかな増殖がみられた (Fig. 10)。しかし、マウスのMφにおける成績とは異なり、食菌 24 時間後においては殺菌されないまでも増殖はできず食菌直後の菌数を維持し、その後において、増殖が認められた。一方、非毒力株は食菌 24 時間後において菌数は漸減し、72 時間後には殆ど検出されなくなった。ところが、ATCC 33701 はマウスのMφ内で増殖できたにもかかわらず、馬の単球内では程度の差こそあれ非毒力株と同様に漸減した。この理由については明らかでないが、ATCC 33701 はマウスのMφ内で増殖はできるものの、その能力は CE 220 のそれに比較すると有意に低い ($P < 0.01$) ことと関係があるものと推測される。

ところで、前述した *Mycobacterium*, *Listeria*, *Brucella*, *Salmonella* などのような細胞内寄生細菌による感染症は、Mφが免疫学的抵抗性の主役を演ずる感染症であり、それはT細胞を介した細胞性免疫にもとづく活性化Mφによって、感染防御が行なわれると一般に考えられている。また、これらの感

染症においては同時に遅延型過敏症が誘導されていることも周知の事実である。

R. equi 感染症においても細胞性免疫の成立を示唆する報告がなかった訳ではない。例えば、Wilson (1955) [112] は本菌の培養濾液を抗原として感染馬の皮膚反応を行ない、遅延型の反応パターンを得ているし、Carter と Hylton (1974) [16] は本菌感染馬の血清を間接血球凝集反応で調べたが抗体は証明されなかった事実や、Wilson [112] の成績を引用して、本菌感染症においては液性免疫よりも細胞性免疫のほうが一義的であると考察している。また、Barton と Hughes (1980) [5] や Elissalde ら (1980) [26] は本菌感染症における病変部の病理組織学的特徴は主として肉芽腫性炎であり、*Mycobacterium* 属菌の感染によって形成される病変に類似していること、この類似性は両菌種のリン脂質の類似性と関係があるかもしれないと記載している。さらに、Prescott (1979) [79] は本菌の死菌免疫による子馬の感染防御実験が失敗したことを報告している。

以上の報告や、前述した Cimprich や Rooney [17] および Martens ら [56] の本菌感染症の病変部に多数の本菌を貪食した $M\phi$ が存在しているという報告、さらに、著者によってはじめて証明された *in vitro* の単球内で本菌が増殖できるという事実から、本菌感染症においては細胞性免疫が成立するものと考えられる。したがって、子馬の *R. equi* 感染症の発症機序、診断法および予防法に関する研究は細胞性免疫の概念を考慮した方向に進むべきだと考えている。本研究で示したマウスや *in vitro* の培養細胞を用いた実験系は、本菌感染症の諸問題を解決するための有効な実験手段となるものと思われる。

しかし、今回の実験では本菌の毒力に關与する抗原が何かという点については解明できなかった。

V 総括および結論

1. 馬の糞便からの *R. equi* の定量培養のまとめ

- 1) *R. equi* の選択分離培地について検討した結果、Woolcock らの NANAT 培地は *R. equi* の発育阻止作用が強く、糞便からの本菌の定量培養には使用できないことがわかった。しかもこの原因が本培地に含まれる亜テルル酸カリウムの影響であることが明らかとなった。そこで、NANAT 培地から亜テルル酸カリウムを除き、さらにナリジキン酸 $10.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、ノボビオシン $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ およびシクロヘキシミド $20.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ に添加した NANC 培地を試作し、糞便の定量培養に応用したところ、*R. equi* の発育阻止作用は殆ど認められず、しかも共存菌の発育を抑える優れた培地であることがわかった。
- 2) NANC 培地を用いて母馬と子馬の糞便の定量培養を行なった結果、検索対象とした 127 頭の全例から *R. equi* が分離された。糞便内の平均菌数は母馬において $8.42 \times 10^2 \text{ CFU}/\text{g}$ 、子馬において $7.57 \times 10^2 \text{ CFU}/\text{g}$ であり、両者に菌数の差は認められなかった。また、母馬 5 頭の糞便内菌数の推移を経時的に調べたところ、本菌は全期間を通して $10^2 \sim 10^4 \text{ CFU}/\text{g}$ の範囲で分離されたが、季節的な菌数の変動は認められなかった。このように *R. equi* は馬の糞便内に常在しており、腸内細菌叢を構成する 1 菌種であることが明らかとなった。

2. *R. equi* の生理・生化学的性状のまとめ

- 1) 分離株 1,195 株は参考株 NCTC 1621 と同一の生理・生化学的性状を示し *R. equi* と同定された。
- 2) 病変部由来 40 株、糞便由来 40 株および参考株 8 株の計 88 株について、生理・生化学的性状 23 項目および 19 種類の菌体酵素活性を調べ比較したが、分離由来の相違による特徴的な差異は認められず、病変部由来株も糞便由来株もおおむね参考株と同様の性状を示した。

3. *R. equi* の血清群別のまとめ

- 1) 交差定量凝集反応において、ホルマリン処理抗原を凝集抗原として用いた場合、27の抗血清のうち13はホモの抗原とのみ特異的に反応したが、14は1～4のヘテロ抗原とも交差反応を示した。一方、オートクレーブ処理抗原を凝集抗原とした場合、ホモの抗原と特異的に反応した抗血清は1つのみで、他の26は1～8のヘテロ抗原とも交差反応を示した。このことから、ホルマリン処理抗原のほうがオートクレーブ処理抗原よりも株特異性があり、血清群別用の抗原として適していることがわかった。
- 2) ホルマリン処理抗原を用いた交差定量凝集反応において、交差反応の認められた14の抗血清はそれぞれに対応する交差反応抗原で吸収操作を行なった結果、特異凝集素の存在が確認され、総計27の特異抗血清を得た。これらの抗血清はホモの抗原とのみ反応し、その凝集素価は1:320～1:2,560の範囲にあった。また、ホモの抗原を用いた吸収テストにおいて、これらの凝集素価は1:20以下に低下し、特異凝集素は完全に除去され抗血清の特異性が証明された。これら27の特異抗血清を群別用抗血清とし、血清群1～27の番号を付した。
- 3) 分離株の血清群別を迅速かつ容易に行なうために、スライド凝集反応を検討した結果、1:4～1:10に希釈した群別用抗血清とMcFarland No. 10に調整したホルマリン処理抗原との組合せで、交差定量凝集反応と同様の特異反応が得られ、スライド凝集反応による血清群別が可能となった。
- 4) 子馬21頭の病変部由来374株の血清群別を行なった結果、全株が群別され、その血清群は分離頻度の高い順に、2, 4, 1, 3, 8, 11, 5, 6, 7および9であった。

また、病変部における血清群の分布をみると、同一個体由来株でも分離部位が異なると血清群が異なったり、同一病変部内に2～4の血清群の異なる菌が同時に存在している症例のあることがわかった。

- 5) 母馬と子馬の糞便由来821株の血清群を調べたところ、821株中692株(84.3%)は次の9つの血清群に属していた。すなわち、分離頻度の高い順に4, 2, 11, 3, 15, 8, 7, 1および14である。また、残りの129株(15.7%)

は別の 18 の血清群に属していた。

一方、個々の糞便中に存在する *R. equi* の血清群を調べてみると、127頭中 90 頭の糞便から 2 ～ 5 の、残りの 37 頭からは 6 ～ 10 の血清群の菌が同時に分離され、血清群の異なる複数の菌が糞便内に存在していることが明らかとなった。

6) NCTC と ATCC から入手した参考株 8 株の血清群を調べたところ、8 株中 5 株は血清群 4 であり、残りの 3 株は 2, 12 および 16 にそれぞれ群別された。

7) Prescott の血清型と著者の血清群を比較したところ、Prescott の 1 型は著者の血清群 4, 2 型は 16, 3 型は 2, 4 型は 12, 5 型は 21, 6 型は 1 および 7 型は 9 にそれぞれ一致した。

4. *R. equi* の毒力のまとめ

1) *R. equi* の 6 株についてマウスに対する LD₅₀ を調べたところ、10⁸ CFU 以上の株、10⁷ CFU の株および 10⁶ CFU の株の 3 階級に分かれた。

2) 病変部由来株と糞便由来株のマウスに対する毒力を比較すると、明らかに病変部由来株に毒力株が多く認められた ($P < 0.01$)。

3) 毒力株と非毒力株のマウス体内における増殖態度を調べてみると、毒力株は注射 14 日後でも 10⁴ CFU 以上の菌が脾臓から回収され、長期間体内で生存していた。しかし、非毒力株は 7 日以降、全く回収されずすみやかに消失した。

4) 毒力株は *in vitro* で培養したマウス腹腔 Mφ の殺菌作用に抵抗し、そのなかで増殖できたが、非毒力株は増殖できず生残率は有意に低下した ($P < 0.01$)。

5) *in vitro* で培養した馬の単球内で、マウスに対する毒力株の CE 220 は明らかに増殖できたが、同じく毒力株の ATCC 33701 や非毒力株の NCTC 1621 および NCTC 4219 は殺菌され、生残率は有意に低下した ($P < 0.01$)。

5. 結 論

馬における *R. equi* の生態を調べるとともに、分離株の生理・生化学的性状、血清学的性状および毒力について検討を行ない、以下に述べる成績を得た。

- 1) *R. equi* の選択分離用培地として、ナリジキン酸 $10.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、ノボビオシン $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、およびシクロヘキシミド $20.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した NANC 培地を作製し、馬の糞便からの本菌の定量培養を可能にした。
- 2) NANC 培地を用いて、母馬 91 頭と子馬 36 頭の糞便からの *R. equi* の定量培養を試みたところ、全例から本菌が分離された。母馬における平均の菌数は $8.42 \times 10^2 \text{ CFU}/\text{g}$ 、また、子馬のそれは $7.57 \times 10^2 \text{ CFU}/\text{g}$ であり、両者に菌数の差は認められなかった。
- 3) 母馬における本菌の糞便内菌数の推移には季節的な変動は認められず、採材した全期間を通して $10^2 \sim 10^4 \text{ CFU}/\text{g}$ の菌数が得られた。これらの知見から、本菌が馬の腸内細菌叢を構成する 1 菌種であることが明らかとなった。
- 4) *R. equi* 同定のための Key characters として、コロニー形状と色素産生、部分的な抗酸性、ウレアーゼの遅産生性、糖の非分解性、カタラーゼ産生、硝酸カリウムおよび亜テルル酸カリウムの還元が挙げられた。また、API ZYM の本菌同定への応用が可能となった。
- 5) 病変部由来 40 株と糞便由来 40 株との生理・生化学的性状 42 項目について比較・検討したが、由来の相違による性状の特徴的な差異は認められなかった。
- 6) 病変部および糞便由来 1,195 株から選抜された 27 株の抗原関係を交差定量凝集反応と吸収テストにより検討し、これらは相互に血清学的性状が異なることが明らかとなった。また、抗原の特異性は菌体表層の莢膜様物質に依存していると思われた。これら 27 株から調製した特異抗血清を血清群別用抗血清とし、血清群 1～27 の番号を付した。
- 7) 1:4～1:10 に希釈した群別用抗血清と、McFarland No.10 に調整したホルマリン処理抗原の組合せでスライド凝集反応を行なうことにより、分離株の血清群別が迅速かつ容易にできることがわかった。
- 8) 子馬の病変部由来 374 株の血清群は分離頻度の高い順に、2, 4, 1, 3, 8,

11, 5, 6, 7 および 9 であり, これらに全株が群別された。また, 同一個体由来株でも, 分離部位が異なると血清群が異なったり, 同一病変部内に血清群の異なる複数の菌が同時に存在している症例のあることがわかった。

9) 糞便由来 821 株中 692 株 (84.3%) は分離頻度の高い順に次の 9 つの血清群, すなわち, 4, 2, 11, 3, 15, 8, 7, 1 および 14 に属し, また, 残りの 129 株 (15.7%) は別の 18 の血清群に属していた。しかも, 個々の糞便には 2 ~ 10 の血清群の異なる菌が同時に存在していることが明らかとなった。

10) Prescott の血清型と著者の血清群の関係では, Prescott の 1 型が著者の 4 群, 2 型が 16 群, 3 型が 2 群, 4 型が 12 群, 5 型が 21 群, 6 型が 1 群および 7 型が 9 群にそれぞれ一致した。

11) *R. equi* のマウスに対する毒力は, LD_{50} が 10^6 CFU の株, 10^7 CFU の株および 10^8 CFU 以上の株に分かれ, 本菌には毒力株と非毒力株が存在することがわかった。

12) 病変部由来株と糞便由来株のマウスに対する毒力を比較すると, 明らかに病変部由来株に毒力株が多く認められた ($P < 0.01$)。また, 同一の血清群に属する菌株に毒力株と非毒力株とが認められた。

13) 毒力株と非毒力株の差異はマウスの網内系細胞内における増殖能と関係あることが, 病理組織学的所見や脾臓における増殖態度から明らかとなった。また, この事実は, 培養したマウス腹腔マクロファージにおいて毒力株は増殖できるが, 非毒力株は増殖できないことから裏付けられた。

14) マウスに対する毒力株のうち, CE 220 は馬の単球内でも増殖できたが, 他の毒力株 ATCC 33701 と非毒力株 NCTC 1621 および NCTC 4219 は増殖できず漸減した。

以上の成績をもとに, 馬における *R. equi* の生態, 分離株の生理・生化学的性状, 血清学的性状および毒力について考察を加えた。

VI 謝 辞

本論文の作成にあたり，原稿の校閲と有益な批判を賜った麻布大学獣医学部
田渕 清教授，清水武彦教授，および尾形 学教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究遂行にあたり指導を賜った前農林水産省家畜衛生試験場東北支場長
根本 久博士，農林水産省家畜衛生試験場北海道支場第三研究室長伊佐山康郎博
士に対し深甚の謝意を表します。また，本研究遂行の機会を与えて下さった同場
前場長清水武彦博士，場長佐澤弘士博士に深謝いたします。また，同場研究第一
部長東 量三博士，同細菌第一研究室長柏崎 守博士の有益な助言と批判に対し
ても感謝の意を表します。

Ⅶ 参 考 文 献

- [1] Addo, P.B., and Dennis, S.M. (1977). Ovine pneumonia caused by Corynebacterium equi. Vet. Rec., 101, 80.
- [2] 赤間清人, 大谷 昌, 伊藤明治, 亀山昭一, 村田良介 (1966). 健康人糞便中常在菌としてのウェルシュ菌に関する研究. 日本細菌学雑誌, 21, 645-650.
- [3] Bain, A.M. (1963). Corynebacterium equi infections in the equine. Aust. Vet. J., 39, 116-121.
- [4] Bain, A.M., Rofe, J.C., Hotson, I.K., and Murphy, S. (1969). Habronema megastoma larvae associated with pulmonary abscesses in a foal. Aust. Vet. J., 45, 101-102.
- [5] Barton, M.D., and Hughes, K.L. (1980). Corynebacterium equi: A review. Vet. Rec., 50, 65-80.
- [6] Barton, M.D., and Hughes, K.L. (1981). Comparison of three techniques for isolation of Rhodococcus (Corynebacterium) equi from contaminated sources. J. Clin. Microbiol., 13, 219-221.
- [7] Barton, M.D., and Hughes, K.L. (1984). Ecology of Rhodococcus equi. Vet. Microbiol., 9, 65-76.
- [8] Bendixen, H.C., and Jepsen, A. (1940). Fortgesetzte Untersuchungen über Corynebacterium equi, mit besonderer Berücksichtigung gewisser morphologischer und biologischer Verhältnisse sowie der Pathogenitätsverhältnisse Schweinen gegenüber. Z. Infektionskr. Parasit. Kr. Hyg. Haustiere., 57, 9-36.
- [9] Berg, R., Chmel, H., Mayo, J., and Armstrong, D. (1977). Corynebacterium equi infection complicating neoplastic disease. Am. J. Clin. Pathol., 68, 73-77.
- [10] Bernheimer, A.W., Linder, R., and Avigad, L.S. (1980). Stepwise degradation of membrane sphingomyelin by corynebacterial phospholipases. Infect. Immun., 29, 123-131.
- [11] Bruner, D.W., Dimock, W.W., and Edwards, P.R. (1939). The serological classification of Corynebacterium equi. J. Infect. Dis., 65, 92-96.

- [12] Bruner,D.W., and Edwards,P.R. (1941). Classifi-
cation of Corynebacterium equi. Kentucky Agric.
Exp. Stn. Bull., No.414, 91-107.
- [13] Burrows,G.E. (1968). Corynebacterium equi infection
in two foals. J. Am. Vet. Med. Assoc., 152, 1119-1124.
- [14] Carpenter,J.L., and Blom,J. (1976). Corynebacterium
equi pneumonia in a patient with Hodgkin's disease.
Am. Rev. Respir. Dis., 114, 235-239.
- [15] Carter,G.R. (1973). Diagnostic Procedures in
Veterinary Microbiology, 2nd edition, Charles C
Thomas Publisher, Illinois.
- [16] Carter,G.R., and Hylton,G.A. (1974). An indirect
hemagglutination test for antibodies to Corynebacte-
rium equi. Am. J. Vet. Res., 35, 1393-1395.
- [17] Cimprich,R.E., and Rooney,J.R. (1977). Corynebacte-
rium equi enteritis in foals. Vet. Pathol., 14, 95-
102.
- [18] Cline,M.J. (1978). Monocytes and Macrophages:
Functions and diseases. Ann. Intern. Med., 88, 78-88.
- [19] Collins,F.M., and Campbell,S.G. (1982). Immunity
to intracellular bacteria. Vet. Immunol. Immunopathol.,
3, 5-66.
- [20] Cotchin,E. (1943). Corynebacterium equi in the sub-
maxillary lymph nodes of swine. J. Comp. Pathol.
Ther., 53, 298-309.
- [21] Craig,J.F., and Davies,G.O. (1940). Corynebacterium
equi in bovine pyometra. Vet. J., 96, 417-419.
- [22] Dafaala,E.N., Irfan,M., and Imbabi,S. (1960). Iso-
lation of an organism resembling Corynebacterium equi
associated with bronchopneumonia in an adult horse.
Sudan J. Vet. Sci. Anim. Husb., 1, 26-30.
- [23] Dennis,S.M., and Bamford,V.W. (1966). The role of
Corynebacteria in perinatal lamb mortality. Vet. Rec.,
79, 105-108.

- [24] Dewes, H.F. (1972). Strongyloides westeri and Corynebacterium equi in foals. N. Z. Vet. J., 20, 82.
- [25] Dimock, W.W., and Edwards, P.R. (1931). Corynebacterium equi in pneumonia in foals. J. Am. Vet. Med. Assoc., 79, 809-812.
- [26] Elissalde, G.S., Renshaw, H.W., and Walberg, J.A. (1980). Corynebacterium equi: An interhost review with emphasis on the foal. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 3, 433-445.
- [27] Etherington, W.G., and Prescott, J.F. (1980). Corynebacterium equi cellulitis associated with Strongyloides penetration in a foal. J. Am. Vet. Med. Assoc., 177, 1025-1027.
- [28] Feldman, W.H., Moses, H.E., and Karlson, A.G. (1940). Corynebacterium equi as a possible cause of tuberculous-like lesions of swine. Cornell. Vet., 30, 465-481.
- [29] Fraser, G. (1964). The effect on animal erythrocytes of combinations of diffusible substances produced by bacteria. J. Pathol. Bacteriol., 88, 43-53.
- [30] Golub, B., Falk, G., and Spink, W.W. (1967). Lung abscess due to Corynebacterium equi. Ann. Intern. Med., 1174-1177.
- [31] Goodfellow, M., and Alderson, G. (1977). The Actinomycete-genus Rhodococcus: A home for the "rhodochrous" complex. J. Gen. Microbiol., 100, 99-122.
- [32] Goodfellow, M., Beckham, A.R., and Barton, M.D. (1982). Numerical classification of Rhodococcus equi and related actinomycetes. J. Appl. Bacteriol., 53, 199-207.
- [33] Groves, R.D., and Welshimer, H.J. (1977). Separation of pathogenic from apathogenic Listeria monocytogenes by three in vitro reactions. J. Clin. Microbiol., 5, 559-563.

- [34] Guven,M.N. (1963). Corynebacterium equi infection of a Thoroughbred foal in Ireland. Irish Vet. J., 17, 147-150.
- [35] 原川俊郎, 盛田慎蔵 (1949). Corynebacterium equi による仔馬の肺膿瘍. 日本獣医学雑誌, 11, 63-74.
- [36] Holtman,D.F. (1945). Corynebacterium equi in chronic pneumonia of the calf. J. Bacteriol., 49, 159-162.
- [37] Humble,M.W., King,A., and Phillips,I. (1977). API ZYM: A simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. J. Clin. Pathol., 30, 275-277.
- [38] 五十嵐 敢 (1981). マクロファージ. 免疫学 I (山村雄一 監修), p24-36. 中山書店, 東京.
- [39] Jang,S.S., Lock,A., and Biberstein,E.L. (1975). A cat with Corynebacterium equi lymphadenitis clinically simulating lymphosarcoma. Cornell Vet., 65, 233-239.
- [40] Jensen,H.L. (1934). Studies on saprophytic Mycobacteria and Corynebacteria. Proc. Linn. Soc. New South Wales, 59, 19-61.
- [41] Jubb,K.V.F., and Kennedy,P.C. (1970). Corynebacterium equi infection in foals. In: Pathology of Domestic Animals, 2nd edition, p 232, Academic Press, New York.
- [42] Karlson,A.G., Moses,H.E., and Feldman,W.H. (1940). Corynebacterium equi (Magnusson, 1923) in the submaxillary lymph nodes of swine. J. Infect. Dis., 67, 243-251.
- [43] Keddie,R.M., and Cure,G.L. (1977). The cell wall composition and distribution of free mycolic acids in named strains of coryneform bacteria and in isolates from various natural sources. J. Appl. Bacteriol., 42, 229-252.
- [44] Kilian,M. (1978). Rapid identification of Actinomycetaceae and related bacteria. J. Clin. Microbiol., 8, 127-133.

- [45] Kobayashi, K., and Kono, Y. (1967). Serial passages of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.), 7, 1-7.
- [46] 久米常夫, 佐々木昇, 佐野敬二, 秋山 綽, 平棟孝志, 村瀬信雄 (1966). 子馬の Corynebacterium equi 感染症の研究. 日本獣医師会雑誌, 19, 17-23.
- [47] Lesslie, I.W., Birn, K.J., Stuart, P., O'Neill, P.A.F., and Smith, J. (1968). Tuberculosis in the pig and the tuberculin test. Vet. Rec., 83, 647-651.
- [48] Linton, J.A.M., and Gallaher, M.A. (1969). Suppurative broncho-pneumonia in a foal associated with Corynebacterium equi. Irish Vet. J., 23, 197-200.
- [49] Lloyd, J., and Peet, R.L. (1979). Corynebacterium equi from a lesion resembling tuberculosis in a bovine lymph node. Aust. Vet. J., 55, 198.
- [50] Lovell, R. (1959). Corynebacterial diseases. In: Stableforth, A.W., and Galloway, I.A. (eds), Infectious diseases of animals, vol. 1, p 239-254, Butterworths Scientific Publications, London.
- [51] Lund, L. (1924). Ein Beitrag zur Infektion der Fohlen mit dem Corynebacterium pyogenes unter besonderer Berücksichtigung der Gewebsveränderungen. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., 32, 4-8.
- [52] Lütje, F. (1923). Ein Weiterer Beitrag zum Vorkommen des Corynebacterium pyogenes equi in Deutschland. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., 31, 559-561.
- [53] Magnusson, H. (1923). Spezifische infektiöse Pneumonie beim Fohlen. Ein neuer Eiterreger beim Pferd. Arch. Wiss. Prakt. Tierheilk., 50, 22-38.
- [54] Magnusson, H. (1938). Pyaemia in foals caused by Corynebacterium equi. Vet. Rec., 50, 1459-1468.
- [55] Marsh, J.C., and Graevenitz, A. (1973). Recurrent Corynebacterium equi infection with lymphoma. Cancer, 32, 147-149.

- [56] Martens,R.J., Fiske,R.A., and Renshaw,H.W. (1982)
Experimental subacute foal pneumonia induced by
aerosol administration of Corynebacterium equi.
Equine Vet. J., 14, 111-116.
- [57] Matumoto,M. (1949). A note on some points of cal-
culation method of LD₅₀ by Reed and Muench. Jpn. J.
Exp. Med., 20, 175-179.
- [58] McGuire,T.C., Poppie,M.J., and Banks,K.L. (1974).
Combined (B- and T-lymphocyte) immunodeficiency:
A fatal genetic disease in Arabian foals. J. Am.
Vet. Med. Assoc., 164, 70-76.
- [59] McKenzie,R.A., and Donald,B.A. (1979). Lymphade-
nitis in cattle associated with Corynebacterium equi:
A problem in bovine tuberculosis diagnosis. J. Comp.
Pathol., 89, 31-38.
- [60] Miessner,H., and Wetzel,R. (1923). Corynebacterium
pyogenes (equi) als Erreger einer infektiösen absze-
dierenden Pneumonie der Fohlen. Dtsch. Tieraerztl.
Wochenschr., 31, 449-454.
- [61] Minnikin,D.E., Goodfellow,M., and Collins,M.D. (1978).
Lipid composition in the classification and identi-
fication of coryneform and related taxa. In: Bous-
field,I.J., and Callely,A.G. (eds), Coryneform Bacte-
ria, p 85-160, Academic Press, London.
- [62] Mitsuoka,T., and Kaneuchi,C. (1977). Ecology of the
Bifidobacteria. Am. J. Clin. Nutr., 30, 1799-1810.
- [63] Mordarski,M., Goodfellow,M., Kaszen,I., Tkacz,A.,
Pulverer,G., and Schaal,K.P. (1980). Deoxyribo-
nucleic acid reassociation in the classification of
the genus Rhodococcus Zopf 1891 (Approved lists, 1980).
Int. J. Syst. Bacteriol., 30, 521-527.
- [64] Murray,E.G.D., and Breed,R.S. (1948). Genus 1. Coryne-
bacterium Lehmann and Neumann. In: Breed,R.S., Murray,
E,G,D,, and Hitchens,A.P. (eds), Bergey's Manual of
Determinative Bacteriology, 6th edition, p 381-408. The
Williams & Wilkins, Co., Baltimore.

- [65] Mutimer,M.D., Prescott,J.F., and Woolcock,J.B.
(1982). Capsular serotypes of Rhodococcus equi.
Aust. Vet. J., 58, 67-69.
- [66] Mutimer,M.D., and Woolcock,J.B. (1979). Corynebacte-
rium equi in human faeces. Med. J. Aust., 2, 422.
- [67] Mutimer,M.D., and Woolcock,J.B. (1980). Corynebacte-
rium equi in cattle and pigs. Vet. Qtly. 2, 25-27.
- [68] Mutimer,M.D., and Woolcock,J.B. (1981). Some problems
associated with the identification of Corynebacterium
equi. Vet. Microbiol., 6, 331-338.
- [69] Mutimer,M.D., and Woolcock,J.B. (1982). API ZYM for
identification of Corynebacterium equi. Zbl. Bakt.
Hyg., I. Abt. Orig., C3, 410-415.
- [70] Nakazawa,M. (1980). Detection of colt serum anti-
body against Corynebacterium equi by agar gel diffu-
sion. Jpn. J. Vet. Med., 42, 551-555.
- [71] Nakazawa,M., and Nemoto,H. (1980). Synergistic hemo-
lysis phenomenon of Listeria monocytogenes and Coryne-
bacterium equi. Jpn. J. Vet. Sci., 42, 603-607.
- [72] Natarajan,C., and Nilakantan,P.R. (1974). Studies
on Corynebacteria of animal origin, their isolation
and biochemical characteristics. Ind. J. Anim. Sci.,
44, 329-333.
- [73] 西貝正彦, 佐伯百合夫, 石谷類造, 乾 純夫, 成田 実, 浜崎 裕, 大島卓也
(1981). 北海道日高地方における幼駒の25剖検例. 日本中央競馬会競走馬
総合研究所報告, 18, 49-60.
- [74] Platt,H. (1973). Septicaemia in the foal: A review
of 61 cases. Br. Vet. J., 129, 221-229.
- [75] Plum,N. (1940). On corynebacterial infections in
swine. Cornell Vet., 30, 14-20.
- [76] Prescott,J.F. (1981). Capsular serotypes of Coryne-
bacterium equi. Can. J. Comp. Med., 45, 130-134.
- [77] Prescott,J.F., Johnson,J.A., and Markham,R.J.F.
(1980). Experimental studies on the pathogenesis of
Corynebacterium equi infection in foals. Can. J. Comp.
Med., 44, 280-288.

- [78] Prescott,J.F., Lastra,M., and Barksdale,L. (1982).
Equi factors in the identification of Corynebacterium equi Magnusson. J. Clin. Microbiol., 16, 988-990.
- [79] Prescott,J.F., Markham,R.J.F., and Johnson,J.A.
(1979). Cellular and humoral immune response of
foals to vaccination with Corynebacterium equi. Can.
J. Comp. Med., 43, 356-364.
- [80] Prescott,J.F., and Zubaidy,A.J. (1979). Coryne-
bacterium equi lymphadenitis in Ontario cattle. Can.
Vet. J., 20, 175.
- [81] Rahman,A. (1957). The sensitivity of various bacte-
ria to chemotherapeutic agents. Br. Vet. J., 113,
175-188.
- [82] Rahman,H., and Baxi,K.K. (1983). Corynebacterium
equi in mastitis in a buffalo (Bubalus bubalis).
Vet. Rec., 112, 208-209.
- [83] Rajagopalan,V.R. (1937). Pneumonia in foals due to
Corynebacterium equi. Indian J. Vet. Sci., 7, 38-53.
- [84] Rajagopalan,V.R., and Gopalakrishnan,V.R. (1938).
The occurrence of Corynebacterium equi in a She-Buf-
falo. Indian J. Vet. Sci., 8, 225-234.
- [85] Reddy,C.A., and Kao,M. (1978). Value of acid meta-
bolic products in identification of certain Coryne-
bacteria. J. Clin. Microbiol., 7, 428-433.
- [86] Roberts,D.S. (1957). Corynebacterium equi infection
in a sheep. Aust. Vet. J., 33, 21.
- [87] Roberts,M.C., Hodgson,D.R., and Kelly,W.R. (1980).
Corynebacterium equi infection in an adult horse.
Aust. Vet. J., 56, 96-97.
- [88] Roberts,R.J., and Hamilton,J.M. (1968). Tuberculous
lymphadenitis in pigs Vet. Rec., 83, 215-217.

- [89] Rogosa, M., Cummins, C.S., Lelliott, R.A., and Keddle, R.M. (1974). Coryneform group of bacteria, In: Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E. (eds), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edition, p 599-632, The Williams & Wilkins, Co., Baltimore.
- [90] Sakazaki, R., and Miura, S. (1956). The enteric bacterial flora of the intestinal tract of healthy horses. *Jpn. J. Vet. Res.*, 4, 57-63.
- [91] 佐々木昇, 武川義照, 細田哲哉 (1954). 青森県下の仔馬病に関する研究. *日本獣医師会雑誌*, 7, 104-109.
- [92] Savidie, E., Pigott, P., and Jennis, F. (1977). Lung abscess due to Corynebacterium equi in a renal transplant recipient. *Med. J. Aust.*, 1, 817-819.
- [93] Sears, H.J., Brownlee, I., and Uchiyama, J.K. (1950). Persistence of individual strains of Escherichia coli in the intestinal tract of man. *J. Bacteriol.*, 59, 293-301.
- [94] Segal, W., and Bloch, H. (1957). Pathogenic and immunogenic differentiation of Mycobacterium tuberculosis grown in vitro and in vivo. *Am. Rev. Tuberc.*, 75, 495-500.
- [95] Segal, W., and Miller, W.T. (1965). Comparative study of in vivo and in vitro grown Mycobacterium tuberculosis. III. Lipid composition. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 118, 613-616.
- [96] Skalka, B., Smola, J., and Elischerová, K. (1982). Different hemolytic activities of Listeria monocytogenes strains determined on erythrocytes of various sources and exploiting the synergism of Equi-factor. *Zbl. Vet. Med. B*, 29, 642-649.
- [97] Skerman, V.B.D., McGowan, V., and Sneath, P.H.A. (1980). Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30, 225-420.

- [98] Smith,B.P. (1980). Isolation of Corynebacterium equi from a foal with an ulcerated leg wound and a pectoral abscess. J. Am. Vet. Med. Assoc., 177, 623-624.
- [99] Smith,J.E. (1966). Corynebacterium species as animal pathogens. J. Appl. Bacteriol., 29, 119-130.
- [100] Springer,E.L., and Roth,I.L. (1973). The ultra-structure of the capsules of Diplococcus pneumoniae and Klebsiella pneumoniae stained with ruthenium red. J. Gen. Microbiol., 74, 21-31.
- [101] Stein,F.J., and Stott,G. (1979). Corynebacterium equi in the Cottontop Marmoset (Saguinus oedipus): A case report. Lab. Anim. Sci., 29, 519-520.
- [102] Studdert,M.J. (1978). Primary, severe, combined immunodeficiency disease of Arabian foals. Aust. Vet. J., 54, 411-417.
- [103] Tainturier,D.J., Delmas,C.F., and Dabernat,H.J. (1981). Bacteriological and serological studies of Haemophilus equigenitalis, agent of contagious equine metritis. J. Clin. Microbiol., 14, 355-360.
- [104] 武谷健二 (1978). 感染免疫におけるマクロファージの役割. マクロファージの機能と動態 (武谷健二, 林 秀男編集), p88-101. 南山堂, 東京.
- [105] Tammemagi,L. (1953). Tuberculosis-like lesions in the submaxillary lymph nodes of pigs in Queensland. Queensland J. Agric. Anim. Sci., 10, 81-107.
- [106] Thal,E., and Rutqvist,L. (1959). The pathogenicity of Corynebacterium equi for pigs and small laboratory animals. Nord. Vet. Med., 11, 298-304.
- [107] Trum,B.F. (1949). Diseases of the foal. J. Am. Vet. Med. Assoc., 114, 218-223.
- [108] Une,T. (1977). Studies on the pathogenicity of Yersinia enterocolitica. II. Interaction with cultured cells in vitro. Microbiol. Immunol., 21, 365-377.

- [109] Van Furth,R., Van Zwet,T.L., and Leijh,P.C. (1978).
In vitro determination of phagocytosis and intra-cellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In: Wier,D.M. (ed.), Handbook of Experimental Immunology, vol. 2, p 32.1-32.19, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- [110] Whitford,H.W., and Johes,L.P. (1974). Corynebacterium equi infection in the goat. Southwestern Vet., 27, 261-262.
- [111] Wilder,M.S., and Edberg,J.C. (1973). Interaction of virulent and avirulent Listeria monocytogenes with cultured mouse peritoneal macrophages. Infect. Immun., 7, 409-415.
- [112] Wilson,M.M. (1955). A study of Corynebacterium equi infection in a stud of Thoroughbred horses in Victoria. Aust. Vet. J., 31, 175-181.
- [113] Woodrooffe,G.M. (1950). Studies on strains of Corynebacterium equi isolated from pigs. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 28, 399-409.
- [114] Woolcock,J.B., Farmer,A.M.T., and Mutimer,M.D. (1979). Selective medium for Corynebacterium equi isolation. J. Clin. Microbiol., 9, 640-642.
- [115] Woolcock,J.B., and Mutimer,M.D. (1978). The capsules of Corynebacterium equi and Streptococcus equi. J. Gen. Microbiol., 109, 127-130.
- [116] Woolcock,J.B., and Mutimer,M.D. (1980). Corynebacterium equi: In vitro susceptibility to twenty-six antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother., 18, 976-977.
- [117] Woolcock,J.B., and Mutimer,M.D. (1980/1981). Corynebacterium equi in the gastrointestinal tract of ruminants. Vet. Res. Commun., 4, 291-294.

- [118] Woolcock, J.B., Mutimer, M.D., and Farmer, A.M.T.
(1980). Epidemiology of Corynebacterium equi in
horses. Res. Vet. Sci., 28, 87-90.
- [119] Woolcock, J.B., and Rudduck, H.B. (1973). Coryne-
bacterium equi in cattle. Aust. Vet. J., 49, 319.

Table 1. Source of R. equi used for preparation of antiserum

Designation of antigen	Original name of strain	Source
1	TN-1	Pulmonary abscess of foal
2	CE220	Pulmonary abscess of foal
3	11DKo85	Pulmonary abscess of foal ?
4	28	Ulcerative colitis of foal
5	24	Nasal swab of foal with pneumonia
6	35	Pulmonary abscess of foal
7	44	Suppurative arthritis of foal
8	46	Suppurative mesenteric lymphadenitis of foal
9	53	Pulmonary abscess of foal
10	F77	Normal feces of mare
11	F105	Normal feces of mare
12	F231	Normal feces of mare
13	F487	Normal feces of foal
14	F539	Normal feces of mare
15	F490	Normal feces of foal
16	F492	Normal feces of foal
17	F502	Normal feces of foal
18	F504	Normal feces of foal
19	F505	Normal feces of foal
20	F30	Normal feces of foal
21	F33	Normal feces of mare
22	F52	Normal feces of mare
23	F76	Normal feces of mare
24	F203	Normal feces of mare
25	F335	Normal feces of mare
26	F424	Normal feces of mare
27	F542	Normal feces of mare

Table 2. Composition of NANAT medium (Woolcock, et al. 1979)

Basal medium: Tryptone soya broth (Oxoid)		
Yeast extract (Oxoid)		0.1%
Agar (Difco)		1.5%
		pH 7.2
Inhibitor: Nalidixic acid (Sigma) 20.0 µg/ml		
Novobiocin (Sigma)		25.0 µg/ml
Cycloheximide (Sigma)		40.0 µg/ml
Potassium tellurite		0.005%

Table 3. Comparison of TYA, NANAT, and NANC media for recovery of pure cultures of R. equi

Strain	Medium		Recovery (%) of NANC medium
	TYA	NANAT	NANC
ATCC 6939	3.54×10^9 *	1.50×10^7	3.30×10^9
11DKo85	4.10×10^9	$< 10^7$	3.82×10^9
CE220	2.25×10^9	$< 10^7$	2.04×10^9
1-5	2.24×10^9	$< 10^7$	2.27×10^9

* : Colony forming units/ml.

TYA: Basal medium of NANAT one.

NANC: Medium improved by excluding potassium tellurite from NANAT one.

Table 4. Comparison of the concentration of the inhibitors in NANC medium for selective isolation of R. equi from feces

Fecal No.	Bacterium	Concentration of inhibitor			
		(1)	(2)	(3)	(4)
		NA* 20.0	10.0	5.0	2.5
		N** 25.0	12.5	6.25	3.125
		C*** 40.0	20.0	10.0	5.0
1	<u>R. equi</u> Other	0	4 ¹⁾	4	3
		+	++	+++	++++
2	<u>R. equi</u> Other	6	10	11	?
		+	++	+++	++++
3	<u>R. equi</u> Other	3	8	8	7
		+	++	+++	++++
4	<u>R. equi</u> Other	0	3	4	4
		+	++	+++	++++
5	<u>R. equi</u> Other	1	7	6	7
		+	++	+++	++++

* : Nalidixic acid (µg/ml), ** : Novobiocin (µg/ml), ***: Cycloheximide (µg/ml).

1): Colony forming units/plate

+ : Less than 20 colonies/plate, ++ : 21 to 50 colonies/plate, +++: 51 to 100 colonies/plate

++++ : More than 101 colonies/plate.

Table 5. Results of quantitative R. equi
culture from mare and foal feces

CFU*/g of feces	Mare	Foal
10 ⁴	2** (2.2%)	4 (11.1%)
10 ³	41 (45.0)	14 (38.9)
10 ²	44 (48.4)	14 (38.9)
10 ¹	4 (4.4)	4 (11.1)
None	0	6***
Total	91 (100%)	36 (100%)
Mean	8.42 x 10 ²	7.57 x 10 ²
95% Confidence limit	6.48 x 10 ² ~	4.19 x 10 ² ~
	1.09 x 10 ³	1.37 x 10 ³

* : Colony forming units.

** : Number of samples.

*** : Fetal feces.

Table 6. Physiological and biochemical characteristics
of R. equi

Character	Isolates from		Reference strain (8)
	lesions (40)*	feces (40)	
Colony			
viscosity	39** (97.5%)	38 (95.0%)	7 (87.5%)
pigmentation	40 (100)	40 (100)	8 (100)
Gram positiveness	40 (100)	40 (100)	8 (100)
Metachromatic granule	0	0	0
Acid fastness (partial)	39 (97.5)	38 (95.0)	8 (100)
Motility	0	0	0
Cytochrome oxidase	0	0	0
Catalase	40 (100)	40 (100)	8 (100)
Indole	0	0	0
Hydrogen sulfide	34 (85.0)	29 (72.5)	5 (62.5)
Urease	37 (92.5)	38 (90.0)	8 (100)
Gelatinase	0	0	0
Caseinase	0	0	0
Hemolysin	0	0	0
Reduction of nitrate	40 (100)	40 (100)	8 (100)
tellurite	40 (100)	40 (100)	8 (100)
Synergistic hemolysis against <u>Listeria mono-</u> <u>cytogenes</u>	27 (67.5)	30 (75.0)	5 (62.5)
Acid from fructose, maltose, mannose, rhamnose, sucrose and xylose	0	0	0

* Number of strain used.

** Number of strain showing a positive reaction.

Table 7. Enzymatic activities of R. equi detected
by API ZYM system

Enzyme	Isolates from		Reference strain (8)
	lesions (40)*	feces (40)	
Phosphatase alkaline	34 ^{**} (85.0%)	29(72.5%)	6(75.0%)
Esterase(C4)	1(2.5)	1(2.5)	1(12.5)
Esterase lipase(C8)	40(100)	40(100)	8(100)
Lipase(C14)	0	0	0
Leucine arylamidase	40(100)	40(100)	8(100)
Valine arylamidase	40(100)	40(100)	8(100)
Cystine arylamidase	0	0	0
Trypsin	[29(72.5)]	[31(77.5)]	[5(62.5)]
Chymotrypsin	0	0	0
Phosphatase acid	40(100)	40(100)	8(100)
Phosphoamidase	40(100)	40(100)	8(100)
α galactosidase	0	0	0
β galactosidase	0	0	0
β glucuronidase	0	0	0
α glucosidase	40(100)	40(100)	8(100)
β glucosidase	30(75.0)	30(75.0)	3(37.5)
N-acetyl- β glucosaminidase	0	0	0
α mannosidase	0	0	0
α fucosidase	1(2.5)	4(10.0)	0

* Number of strain used.

** Number of strain showing a positive reaction.

[] : Weakly positive reaction, which corresponds to API ZYM
value 1.

Table 8. Serological relationship among 27 strains of R. equi by cross-agglutination test with unabsorbed antiserum and formalized antigen

Anti-serum	Formalized antigen																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-	-	-	-	-	160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	2560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1280	-	-	-	-	40	-	80	-	-	-	-	-	-	-	40
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

The results are expressed in titer, which is the reciprocal of the highest antiserum dilution showing complete agglutination.
 -: Negative at 1:40 dilution.

Table 9. Serological relationship among 27 strains of R. equi by cross-agglutination test with unabsorbed antiserum and autoclaved antigen

Anti-serum	Autoclaved antigen																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	1280	-	-	-	80	-	-	-	-	-	640	-	-	-	-	-	160	-	-	-	-	-	-	40	-	80	-
2	-	1280	-	-	160	-	-	-	-	-	640	-	40	320	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	-	160	-
3	-	-	640	-	160	-	-	-	-	-	320	-	160	-	-	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	160	80
4	-	-	-	640	80	-	-	-	-	-	160	-	-	-	-	-	-	-	40	-	-	40	-	-	-	80	-
5	-	80	-	-	640	-	40	-	-	-	160	-	40	40	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	-	80	-
6	-	40	-	-	80	1280	-	-	-	-	160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-
7	-	-	40	-	-	-	1280	-	-	40	-	-	-	-	40	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	40	-	-	-	-	-	640	-	-	40	-	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	160	-	-	-	-	1280	-	320	-	40	-	-	-	-	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	80	40	-	40	-	-	-	40	-	-	320	40	-	-	-	-	80	-	160	-	-	-	-	-	-	80	-
12	40	-	40	40	-	-	-	-	-	-	640	1280	-	160	-	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40
13	-	-	80	-	-	-	40	-	-	-	1280	-	1280	-	-	160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	40	-	-	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	-
15	-	-	-	40	40	-	160	-	-	-	320	-	-	-	640	-	-	-	40	-	-	-	-	80	-	160	-
16	-	-	320	-	160	-	320	-	-	-	640	-	80	-	-	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	160	-
17	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	-	1280	-	-	-	-	-	-	40	-	40	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	-	-	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	80	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	40	-	-	-	40	-	-	-	-	80	-	40	-	-	-	-	1280	-	1280	-	-	-	-	-	640	40
21	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	-	-	-	-	1280	-	-	-	-	-	40	40
22	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	-	-	-	-	320	1280	-	-	-	-	40	320
23	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1280	-	-	-	-	40	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1280	-	-	-	80	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	-	-	160	-	40	-	-	-	-	-	2560	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-	-	-	-	-	-	-	40	-	640	-	-	-	1280	40	-
27	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	160	-	-	-	-	-	-	-	160	-	40	-	-	-	-	80	1280

The results are expressed in titer, which is the reciprocal of the highest antiserum dilution showing complete agglutination.
 -: Negative at 1:40 dilution.

Table 10. Absorbing antiserum and cross-reacting antigen used for absorption test

Designation of	
absorbing antiserum	cross-reacting antigen
1	11, 17
2	14
3	16
7	16
9	4
11	4, 17, 19, 26
13	16
15	7
16	3, 7
17	11
19	4, 11, 26
21	20, 27
24	15
25	21

Table 11. Cross-absorption test between antisera 3 and 16

Antiserum	Absorption	Agglutination titer	
		Formalized antigen 3	Formalized antigen 16
3	Unabsorption	1,280	160
	Absorbed with formalized antigen of strain 16	<u>320</u>	<20
16	Unabsorption	160	1,280
	Absorbed with formalized antigen of strain 3	<20	<u>1,280</u>

Table 12. Cross-absorption test between antisera 4 and ATCC 6939

Antiserum	Absorption	Agglutination titer	
		Formalized antigen 4	Formalized antigen ATCC 6939
4	Unabsorption	1,280	640
	Absorbed with formalized antigen of ATCC 6939	<u><20</u>	<20
ATCC 6939	Unabsorption	320	1,280
	Absorbed with formalized antigen of strain 4	<20	<u><20</u>

Table 13. Serological relationship among 27 strains of R. equi by cross-agglutination test with grouping antiserum

Grouping antiserum	Formalized antigen																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	1,280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	2,560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,560	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	640	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,560	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,560	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,560	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,280

The results are expressed in titer, which is the reciprocal of the highest antiserum dilution showing complete agglutination.
 -: Negative at 1:40 dilution.

Table 14. Serogroup distribution of R. equi isolated from
21 diseased foals

Serogroup	Number of strain	Number of foal
1	6 (1.6%)	3
2	112 (29.9)	11
3	10 (2.7)	2
4	122 (32.6)	4
5	4 (1.0)	1
6	1 (0.3)	1
7	1 (0.3)	1
8	89 (23.8)	2
9	13 (3.5)	1
11	16 (4.3)	2
Total	374 (100%)	28

Table 15. Serogroup distribution of R. equi in the lesions of 3 diseased foals

Foal No.	Source	Serogroup
TN-2	Pulmonary abscess	2
	Trachea	2, 8
	Abscess in the pulmonary hilum lymph node	2, 8
	Abscess in the mesenteric lymph node	2, 8
	Femoral abscess	8
	Arthritis in the gambrel	8
TN-3	Pulmonary abscess-1	4
	Pulmonary abscess-2	2
	Pulmonary abscess-3	2, 8, 9
	Tracheal lymph node	2, 4
	Abscess in the mesenteric lymph node	8
	Iliac lymph node	2, 4, 5
	Contents in the jejunum	2, 4, 5, 8
	Contents in the caecum	4, 8
	Contents in the colon	2
	Arthritis in the gambrel	1, 2, 4, 8
TN-4	Pulmonary abscess-1	4, 9
	Pulmonary abscess-2	2, 11
	Abscess in the pulmonary hilum lymph node	2
	Contents in the stomach	4
	Contents in the jejunum	2, 4
	Contents in the ileum	4, 11
	Contents in the caecum	2, 4, 8, 9, 11

Table 16. Serogroup distribution of R. equi derived from feces of healthy mares and foals

Serogroup	Number of strain	
	Mare	Foal
1	27 (4.2%)	8 (4.3%)
2	83 (13.1)	24 (13.0)
3	65 (10.2)	17 (9.2)
4	163 (25.6)	41 (22.2)
5	5 (0.8)	2 (1.1)
6	14 (2.2)	0
7	29 (4.6)	7 (3.8)
8	23 (3.6)	19 (10.3)
9	7 (1.1)	5 (2.7)
10	1 (0.2)	0
11	57 (9.0)	36 (19.5)
12	6 (0.9)	3 (1.6)
13	18 (2.8)	2 (1.1)
14	31 (4.9)	3 (1.6)
15	52 (8.2)	7 (3.8)
16	13 (2.0)	1 (0.5)
17	4 (0.6)	1 (0.5)
18	2 (0.3)	1 (0.5)
19	3 (0.5)	1 (0.5)
20	3 (0.5)	2 (1.1)
21	7 (1.1)	2 (1.1)
22	7 (1.1)	0
23	2 (0.3)	0
24	5 (0.8)	3 (1.6)
25	5 (0.8)	0
26	2 (0.3)	0
27	2 (0.3)	0
Total	636 (100%)	185 (100%)

Table 17. Variety of serogroup distribution of
R. equi found in feces of healthy
mares and foals

Number of serogroup found in a feces	Number of	
	Mare	Foal
1	0	0
2	10 (11.0%)	9 (25.0%)
3	11 (12.1)	9 (25.0)
4	18 (19.8)	8 (22.2)
5	20 (22.0)	5 (13.9)
6	11 (12.1)	2 (5.5)
7	9 (9.9)	1 (2.8)
8	8 (8.7)	1 (2.8)
9	3 (3.3)	1 (2.8)
10	1 (1.1)	0
Total	91 (100%)	36 (100%)

Table 18. Serogroups of 8 reference strains
received from NCTC and ATCC

Reference strain	Source	Serogroup
NCTC 1621	Lung of foal	4
NCTC 4219	Garden soil	2
NCTC 5649	Foal	4
NCTC 5650	Lung of foal	4
ATCC 6939	Lung of foal	4
ATCC 7698	?	4
ATCC 7699	Pig	12
ATCC 10146	Lung of foal	16

Table 19. Relationship between Prescott's serovars and the author's serogroups

Strain	Source	Prescott's serovar	The author's serogroup
ATCC 33701	Lung of horse	1	4
ATCC 33702	Skin of dog	2	16
ATCC 33703	Lymph node of pig	3	2
ATCC 33704	Lymph node of pig	4	12
ATCC 33705	Lymph node of pig	5	21
ATCC 33706	Lung of horse	6	1
ATCC 33707	Abscess of man	7	9

Table 20. Source of 6 strains of R. equi and
their LD₅₀ in mice

Strain	Source	LD ₅₀
NCTC 1621	Pulmonary abscess of foal	$> 3.3 \times 10^8$
NCTC 4219	Garden soil	$> 3.0 \times 10^8$
ATCC 33701	Pulmonary abscess of foal	1.7×10^6
CE220	Pulmonary abscess of foal	2.1×10^6
46	Suppurative mesenteric lymphadenitis of foal	6.2×10^7
843	Suppurative mesenteric lymphadenitis of foal	4.6×10^7

Table 21. Virulence of R. equi derived from lesions
and feces for mice

Serogroup	Source			
	Lesion		Feces	
	Number of strain examined	Number of virulent strain	Number of strain examined	Number of virulent strain
1	3	1	6	1
2	15	12	14	6
3	2	1	8	0
4	12	8	11	0
5	1	1	3	0
6	1	1	2	0
7	2	2	3	0
8	4	4	7	6
9	2	2	2	0
10			1	0
11	5	0	4	0
12			3	0
13			2	0
14			1	0
15			2	0
16			3	0
17			1	0
18			2	0
19			1	0
20			1	0
21			3	0
22			1	0
23			1	0
24			1	0
25			1	0
26			1	0
27			1	0
Total	47	32 (68.1%)	86	13 (15.1%)

Table 22. Virulence of 15 reference strains
for mice

Strain	Source	Serogroup	Virulence
NCTC 1621	Lung of foal	4	-
NCTC 4219	Garden soil	2	-
NCTC 5649	Foal	4	+
NCTC 5650	Lung of foal	4	+
ATCC 6939	Lung of foal	4	-
ATCC 7698	?	4	+
ATCC 7699	Pig	12	+
ATCC 10146	Lung of foal	16	+
ATCC 33701	Lung of horse	4	+
ATCC 33702	Skin of dog	16	-
ATCC 33703	Lymph node of pig	2	-
ATCC 33704	Lymph node of pig	12	+
ATCC 33705	Lymph node of pig	21	+
ATCC 33706	Lung of horse	1	-
ATCC 33707	Abscess of man	9	-

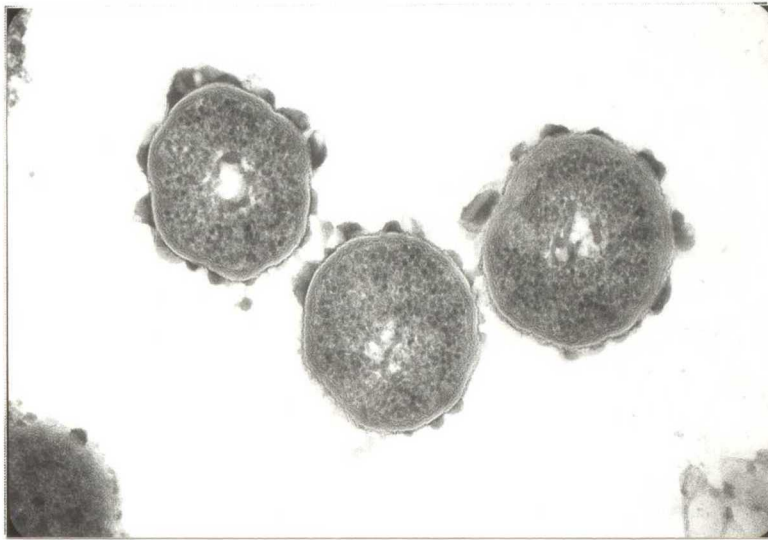


Fig. 1. R. equi strain CE220 with the capsular material showing as globular arrangements outside of the outer membrane. x 50,000.

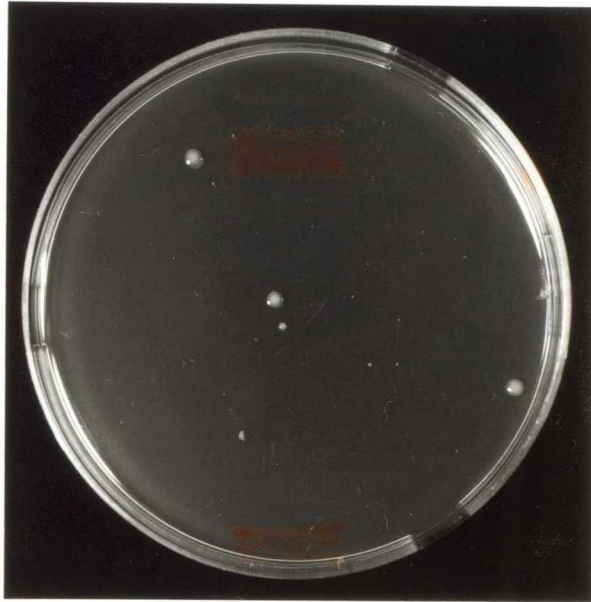


Fig. 2. Appearance of characteristic large, mucous and slimy colony of R. equi on NANC medium inoculated with foal feces diluted to 1:1,000.

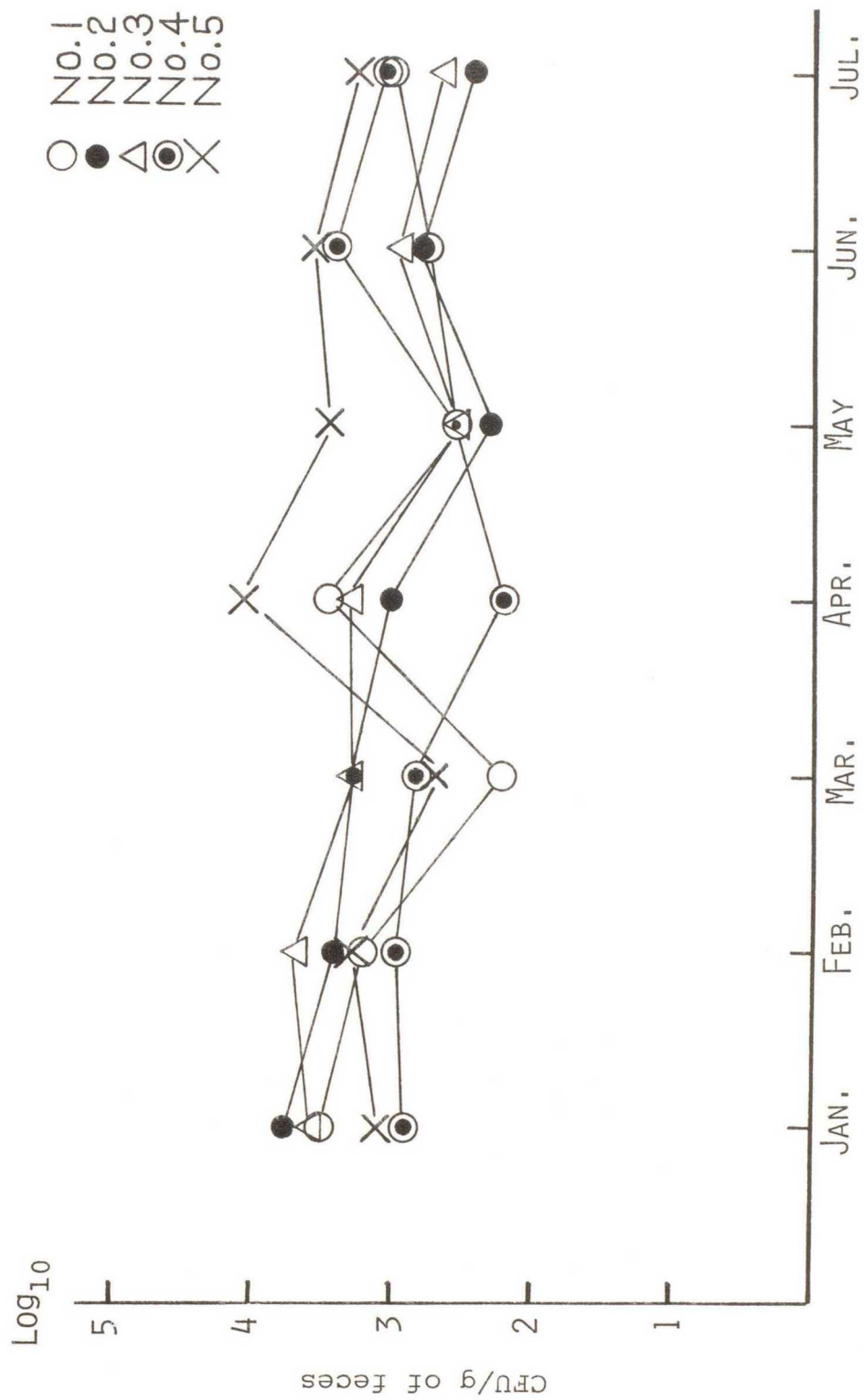


Fig. 3. Monthly incidence of R. equi from feces of 5 mares.

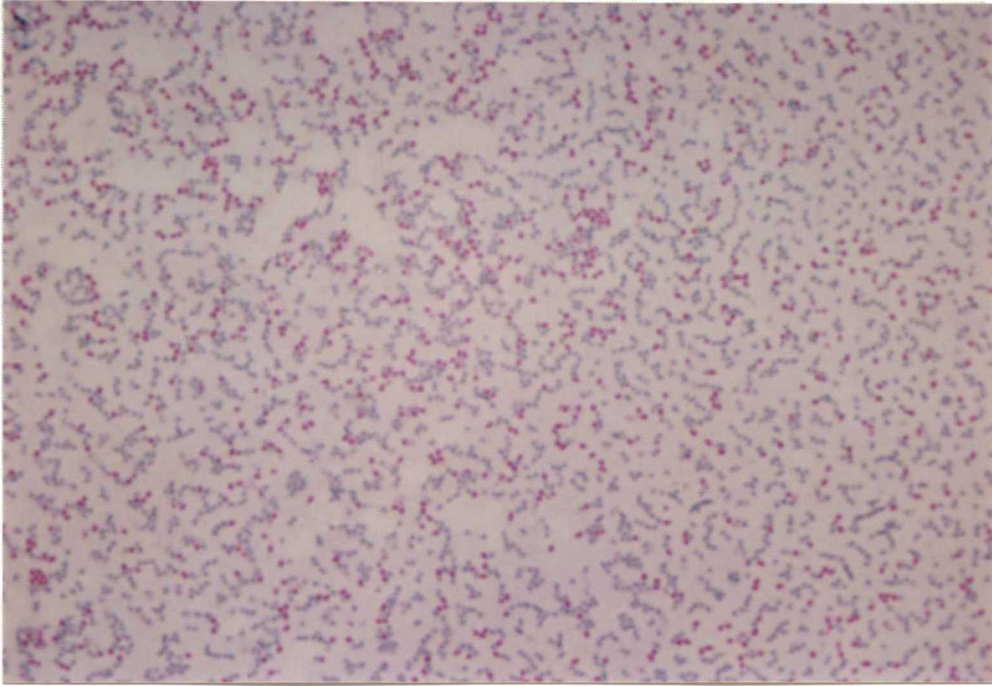


Fig. 4. A smear of R. equi showing a partial acid-fastness stained by the Kinyoun's method. x 750.

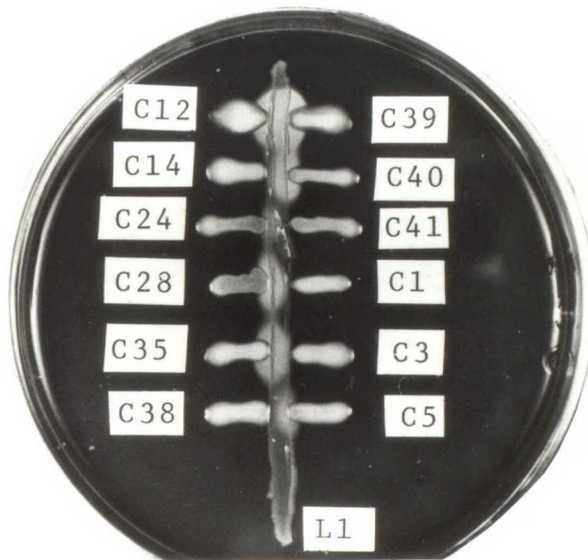


Fig. 5. Sheep blood agar plate, showing the synergistic hemolysis phenomenon of Listeria monocytogenes and R. equi.

L1: L. monocytogenes strain L1 used as an indicator strain.

Strains C5, C12, C24, C28, C35, C39 and C40 of R. equi showing a positive synergistic hemolytic activity, and strains C1, C3, C14, C38 and C41 negative.

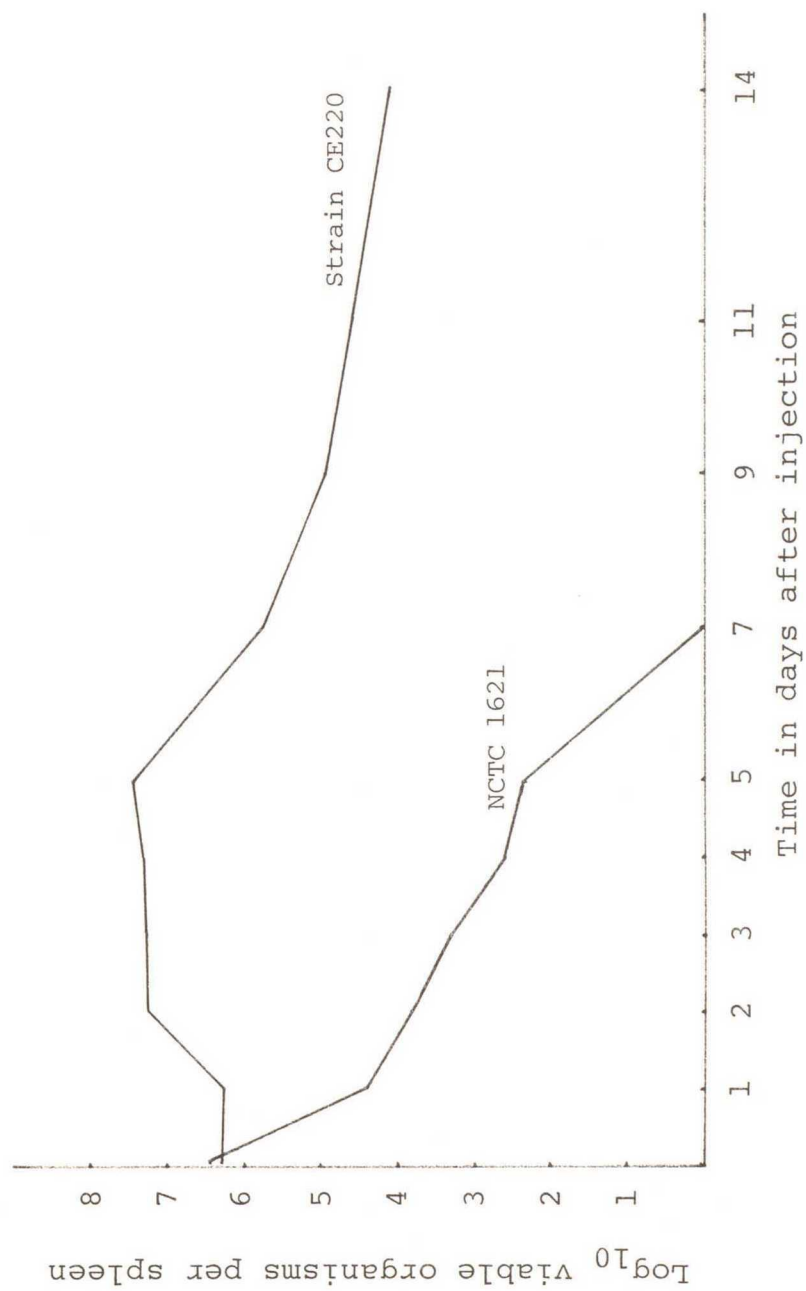


Fig. 6. Growth curve of *R. equi* strains CE220 and NCTC 1621 in the spleen after intravenous injection with 10^6 CFU per mouse

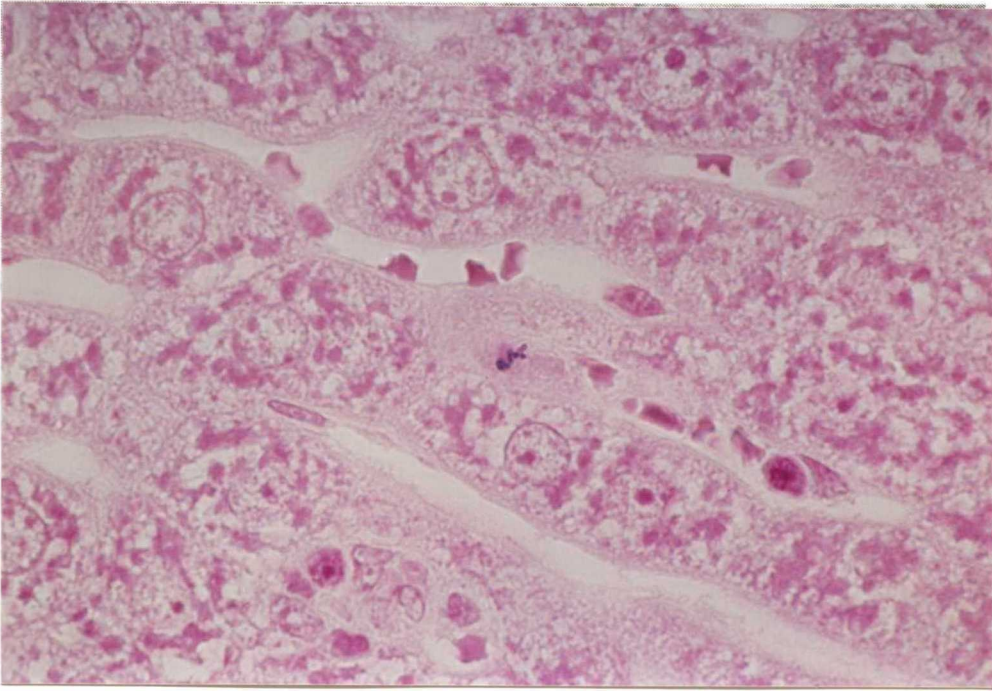


Fig. 7. The section of the liver of a mouse at
1 day after intravenous injection with
R. equi strain CE220.

A small number of rod-shaped bacteria are
demonstrated in a Kupffer's cell.

Gram stain, x 1,200.

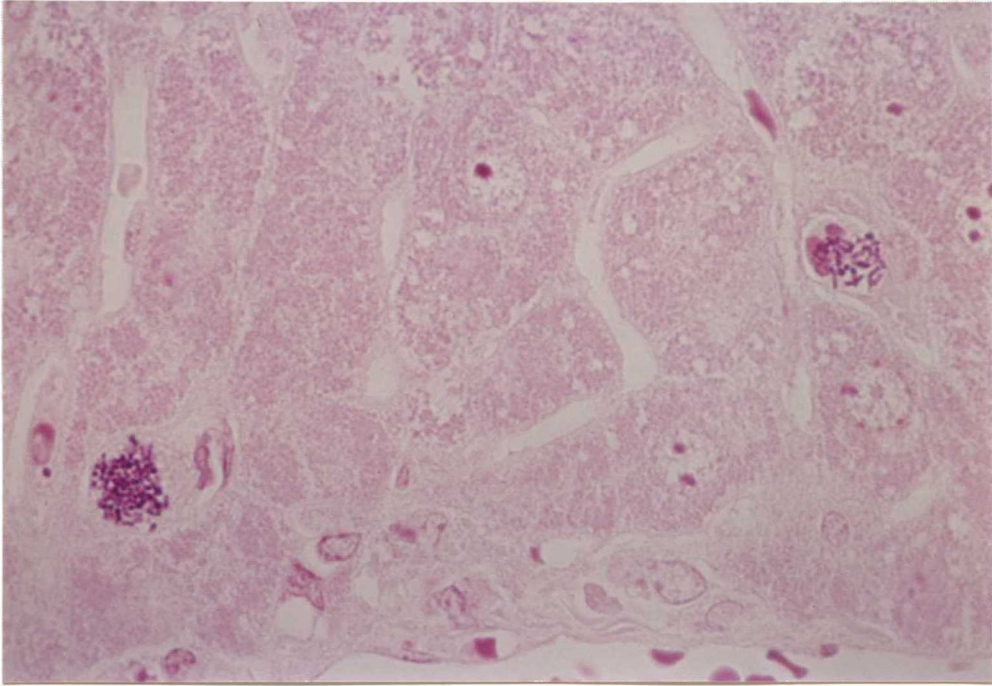


Fig. 8. The section of the liver of a mouse at
2 days after intravenous injection with
R. equi strain CE220.

Kupffer's cells are filled with rod-shaped
bacteria. Gram stain, x 1,200.

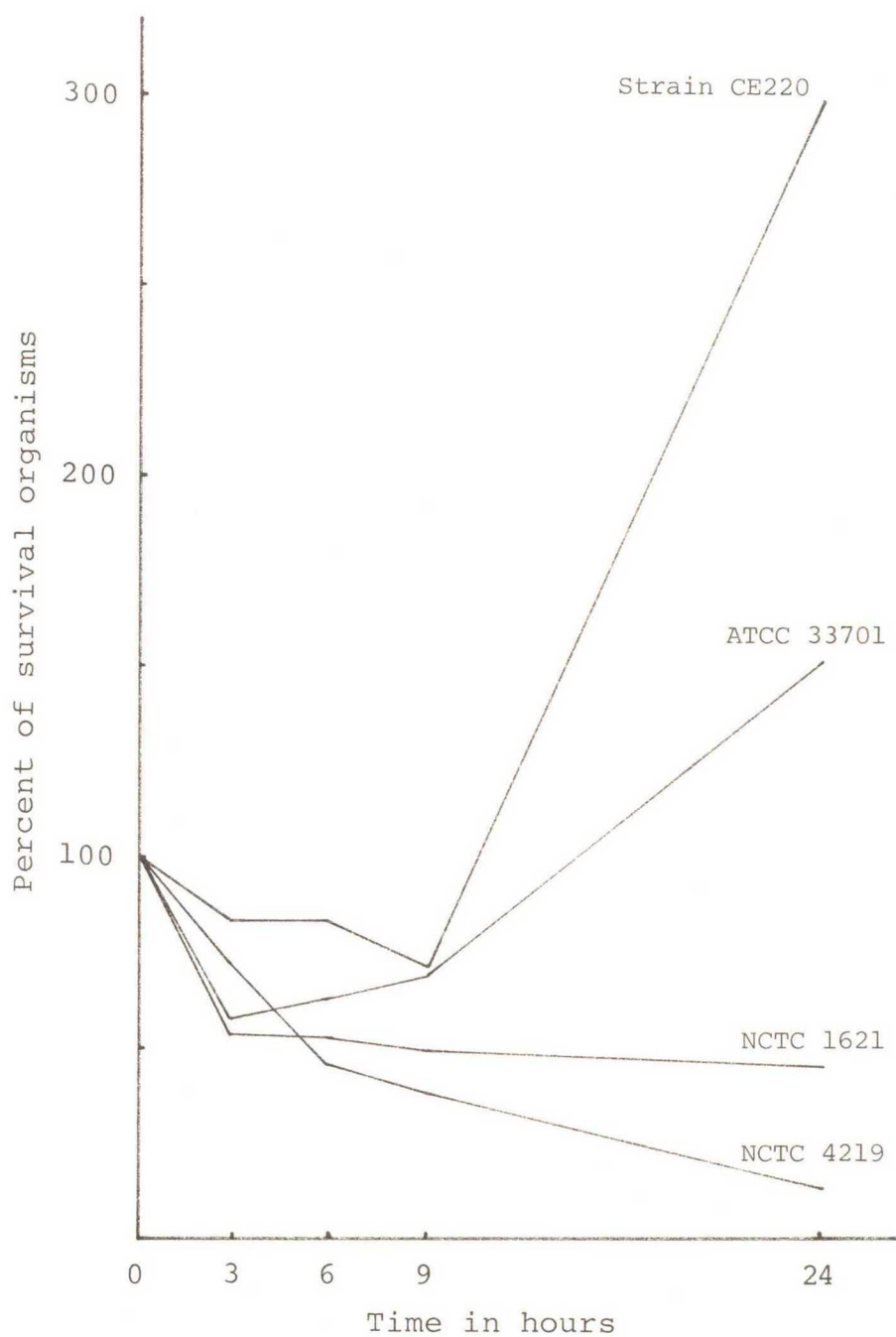


Fig. 9. Fate of *R. equi* within cultured mouse peritoneal macrophages

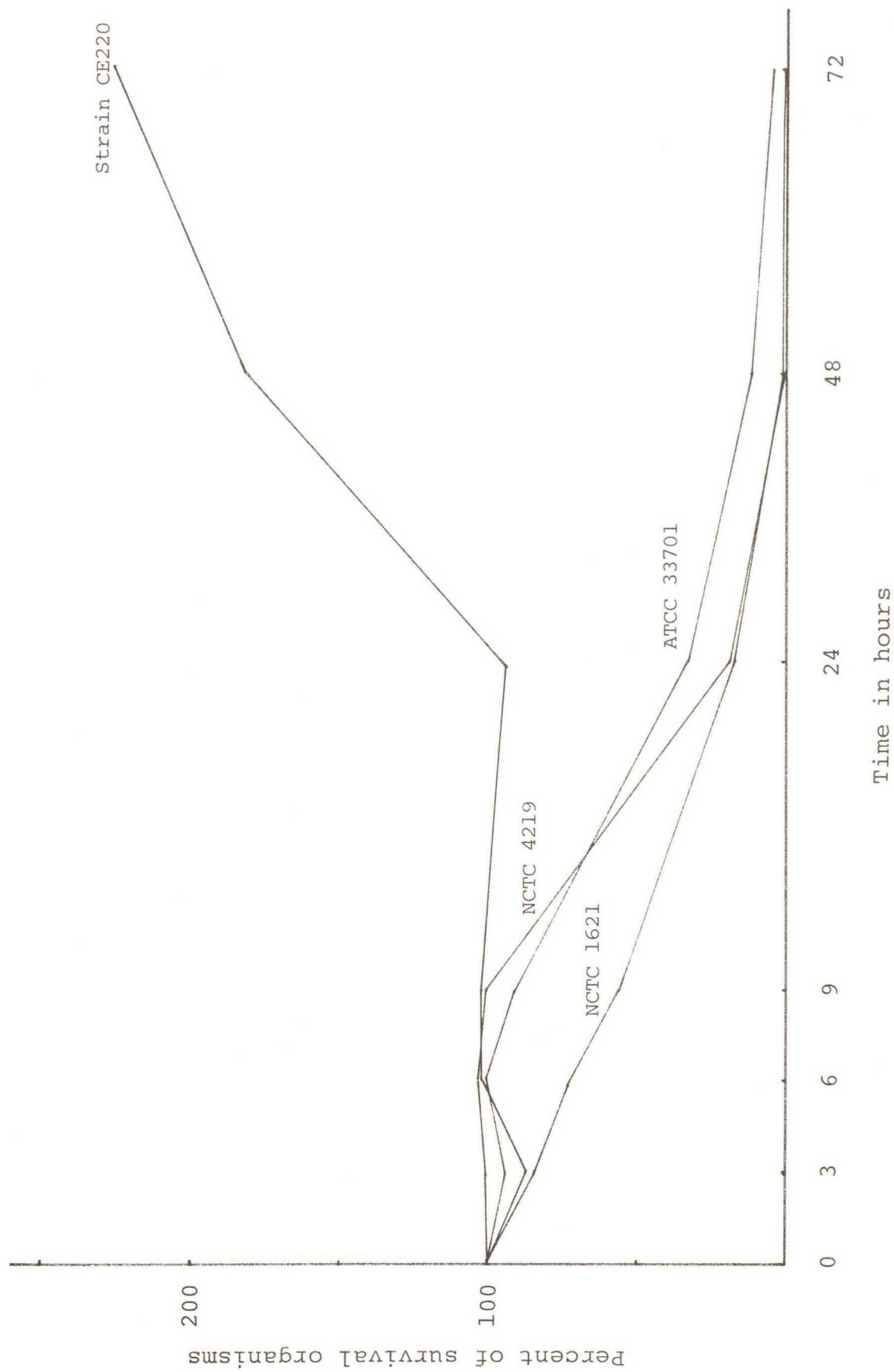


Fig. 10. Fate of *R. equi* within cultured equine monocytes

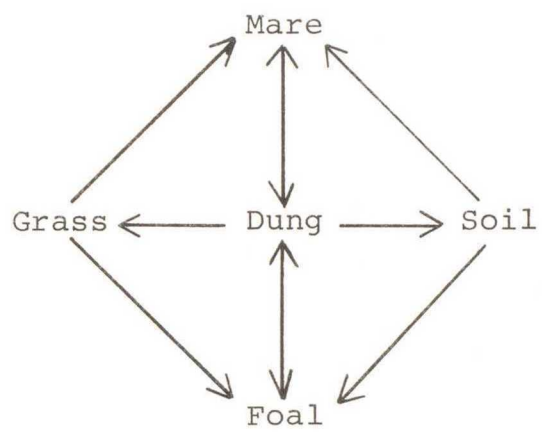


Fig.11. Schema to illustrate the cycle and dissemination of R. equi in horse