

## ブドウ球菌の培養細胞および生体由来細胞への付着

|       |                                                                              |
|-------|------------------------------------------------------------------------------|
| 誌名    | 神戸大学農学部研究報告 = The science reports of Faculty of Agriculture, Kobe University |
| ISSN  | 04522370                                                                     |
| 巻/号   | 191                                                                          |
| 掲載ページ | p. 93-98                                                                     |
| 発行年月  | 1990年1月                                                                      |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## ブドウ球菌の培養細胞および生体由来細胞への付着

清水 晃\*・河野潤一\*・葉杖真二\*\*・藤浪哲也\*\*\*  
行松 土貴子\*\*\*\*・尾崎潤一郎\*・木村 重\*

(平成元年8月10日受理)

### ADHERENCE OF *STAPHYLOCOCCUS* SPECIES TO VARIOUS CELLS

Akira SHIMIZU, Junichi KAWANO, Shinji HAZUE, Tetsuya FUJINAMI  
Tokiko YUKIMATSU, Junichiro OZAKI and Shige KIMURA

#### Abstract

Fourteen *Staphylococcus* species were examined for their adherence to tissue culture cells, epithelial cells of the nasal cavity and trachea of rabbits, and epidermal cells of mice and chickens. Among the 14 species, *S. aureus* Cowan I and *S. hyicus* NCTC 10350 strains which were positive for protein A adhered well to both Vero and MDCK cells, while 12 other species which were negative for protein A exhibited feeble adherence to both the cells. *S. aureus* Cowan I and *S. hyicus* NCTC 10350 strains also adhered well to both nasal and tracheal epithelial cells. Protein A is considered to be one of the factors taking part in the adherence of staphylococci to the surface of these cells. Among the protein A-negative species, *S. sciuri* ATCC 29062 strain was found to strongly adhere, especially to mouse epidermal cells. Interestingly, *S. sciuri* is a major member of the normal flora found on the skin of rodents, including laboratory mice. There may possibly be factors other than protein A responsible for the adherence of this species to mouse epidermal cells.

#### 緒 言

細菌感染とは細菌が宿主組織に侵入し、増殖、活動することを言うが、この感染成立までには細菌細胞と宿主細胞・組織との間に種々の反応が起こっている。細菌が病原性を発現するには、まず第一段階として宿主の細胞に付着することが不可欠であると考えられている。宿主細胞に付着した細菌は、そこを拠点として増殖をくり返し、組織に定着して生体に悪影響をおよぼす。この病原性の潜在的な指標の一つとも考えられる細菌の細胞付着に関する研究は、近年大腸菌をはじめとするグラム陰性桿菌について数多く行われており、その細胞付着に関与する菌側の因子についてもしだいに明らかにされてきた。

大腸菌、緑膿菌、レイ菌、リン菌、百日咳菌、気管支敗血性菌、コリネバクテリウム菌（グラム陽性桿菌）では線毛が付着因子の一つとして注目されている<sup>20, 21)</sup>。

一方、ブドウ球菌を中心とするグラム陽性球菌の細胞付着・機序についてはまだ十分解明されていない。A群レンサ球菌ではリボタイコ酸が、う蝕原性細菌として知られている *Streptococcus mutans*<sup>9, 10)</sup> では本菌の菌体外酵素グルコシルトランスフェラーゼの作用により、スクロースから産生される不溶性のグルカンが菌の表面への菌付着に重要な役割を演じると考えられている。ブドウ球菌の付着については、梅田・天児<sup>16)</sup> が培養細胞を用いて研究を行い、プロテインAの産生性が高い菌株ほどその付着性が高いこと、抗プロテインA血清で付着が阻止されることから、菌の付着に関与する因子はプロテインAであろうと述べている。

本研究では、ブドウ球菌の付着・定着性を決めている細菌側および宿主側の因子を解明するための第一歩とし

\* 家畜衛生学研究室

\*\* 日本ウェルカム株式会社

\*\*\* 兵庫県職員

\*\*\*\* 住友製薬株式会社

て、培養細胞、家兎の鼻腔および気管粘膜上皮細胞、マウスおよびニワトリの表皮細胞への付着性について検討したので報告する。

## 材料および方法

### 1. 供試菌株

コアグラゼ (コ) 陰性ブドウ球菌として12菌種の12株、コ陽性ブドウ球菌として2菌種の2株を用いた。これらのうち、*Staphylococcus aureus* Cowan Iと*S. hyicus* NCTC10350 はプロテインA産生株である (Table 1)。

### 2. 菌液の調整

各菌株はヒツジ血液加寒天培地 (日本生物材料センター) で37°C 18時間培養後、培養細胞への付着試験にはハートインフュージョン (HI) ブイヨン (ニッスイ) で一夜培養したものをを用い、その生菌数は $1.4 \times 10^7 \sim 2.5 \times 10^8$ 個/mlであった。その他の付着試験には、前述のようにヒツジ血液加寒天培地で培養後、HI寒天培地 (ニッスイ) に移植し、37°C 18時間培養した。つぎに、これら培養菌をリン酸緩衝塩類溶液 (PBS, pH7.4) に浮遊させ、3,000rpm 10分間の遠心洗浄を3回行った。細胞付着用には洗浄菌体を $10^7$ 個/mlの濃度に調整し、PBSに浮遊させた菌液を用いた。

### 3. 細胞の調整

#### 1) 培養細胞と付着試験

培養細胞はサル腎臓由来のVero細胞とイヌ腎臓由来のMDCK細胞の2種類の株化細胞を用いた。これらの細胞は仔牛血清加イーグルMEM培地 (ニッスイ) にて37°Cで炭酸ガス培養を行った。菌の細胞への付着性は梅田・天見<sup>16)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、細胞をスライドグラス (76×26mm) に植え、これに菌液2.0mlを満載して37°Cで15分間反応後、細胞をPBSで3回洗浄した。ついで乾燥後、メタノールで2分間固定し、ギムザ液で染色した。標本は光学顕微鏡下で観察し、細胞100個について細胞1個当りの平均付着菌数を算出した。

#### 2) 鼻腔粘膜上皮細胞と付着試験

鼻腔粘膜上皮細胞は健康な家兎 (日本白色種、雌、2.0~2.5kg) から採取した。鼻より鼻甲介、夾雑物を除き、鼻腔粘膜組織をシート状に剥離してPBSで洗浄した。これをPBSに浮遊させ、ブレンダーをかけて上清中に粘膜上皮細胞を単離し、1,200rpm 5分間の遠心洗浄を3回行った。洗浄細胞は細胞濃度を $10^5$ 個/mlに調整した。この細胞浮遊液1mlに菌液1ml ( $10^7$ 個/ml) を加え、37°C 1時間反応させた。この間、15分間静置と5分間振と

うを3回くり返した。反応後、PBSで600rpm 5分間の遠心洗浄を3回行い、未吸着菌を除去した。洗浄した細胞はスライドグラス (76×26mm) に塗抹し、乾燥後メタノール固定してギムザ液で染色した。標本細胞100個について観察し、細胞1個当りの平均付着菌数を算出した。

#### 3) 気管粘膜上皮細胞と付着試験

気管粘膜上皮細胞は健康な家兎 (日本白色種、雌、2.0~2.5kg) より採取した。家兎より気管を取り出し、夾雑物を除き、PBSで洗浄した後、2~3mm角に細切してブレンダーをかけ、上清中に粘膜上皮細胞を単離させた。その後、細胞を3回遠心洗浄し、細胞濃度を $10^5$ 個/mlに調整した。以後は鼻腔粘膜上皮細胞と同様の方法で付着試験を行った。

#### 4) 表皮細胞と付着試験

実験にはマウスおよびニワトリの表皮細胞を用いた。マウス表皮細胞は、Std: ddy系、雄マウス、5週齢の背部皮膚を剥離し、真皮深部層、皮下脂肪、毛を除去してPBSで3回洗浄後、1mm角程度に細切した。細切した組織片はPBSで遠心洗浄し、消化液 (0.25%トリプシン、0.02% EDTA、PBS溶液) 中で、37°C 45分間マグネチックスターラーを用いて予備消化を行った。予備消化の終わった組織片は再度消化液中に浮遊させ、4°C 4時間消化を行い、上清中に表皮細胞を得た。表皮細胞は1,200rpm 10分間の遠心洗浄を3回くり返してトリプシンを除去し、細胞濃度を $10^6$ 個/mlに調整して、この細胞浮遊液1mlに菌液 ( $10^7$ 個/ml) 1mlを加え、以後は鼻腔粘膜上皮細胞への付着試験と同様の方法で行った。ニワトリ表皮細胞は、白色レグホン、雌成鶏の胸部から腹部にかけて皮膚を剥離し、皮下脂肪および真皮深部層を取り除いた後に、細切・トリプシン処理して単離した。なお、細胞の消化法は前述のマウス表皮細胞とほぼ同様の方法で行った。摂取した表皮細胞は3回遠心洗浄し、細胞濃度を $10^6$ 個/mlに調整し、この細胞浮遊液1mlに菌液 ( $10^7$ 個/ml) 1mlを加え、以後は鼻腔粘膜上皮細胞と同様の方法で付着試験を行った。

## 成 績

ブドウ球菌14菌種14株の培養細胞、家兎の鼻腔および気管粘膜上皮細胞、マウスおよびニワトリの表皮細胞への付着性を調べたところ、Table 1に示すような結果が得られた。

### 1. 培養細胞への付着性

13菌種の13株を用いた。Vero細胞によく付着した菌種は*S. aureus* Cowan Iで、細胞1個当りの平均付

Table 1. Adherence of *Staphylococcus* species to various cells

| Species                    | Strain                   | Mean number of bacteria adhered per cell |                    |                                   |         |       |                    |  |
|----------------------------|--------------------------|------------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|---------|-------|--------------------|--|
|                            |                          | Cell culture                             |                    | Epithelial cells <sup>a)</sup> of |         |       | Epidermal cells of |  |
|                            |                          | Vero                                     | MDCK               | Nasal cavity                      | Trachea | Mice  | Chicken            |  |
| Coagulase-negative species |                          |                                          |                    |                                   |         |       |                    |  |
| <i>S. epidermidis</i>      | ATCC 12228               | 1.15                                     | 1.79               | 0.22                              | 0.13    | 0.84  | 0.21               |  |
| <i>S. saprophyticus</i>    | ATCC 15305               | 2.71                                     | 0.56               | 0.10                              | 0.14    | 0.09  | 0.04               |  |
| <i>S. cohnii</i>           | DSM 20260                | 3.29                                     | 1.27               | 0.06                              | 0.12    | 0.16  | 0.25               |  |
| <i>S. haemolyticus</i>     | DSM 20263                | 0.79                                     | 0.42               | 0.05                              | 0.07    | 1.93  | 0.14               |  |
| <i>S. capitis</i>          | ATCC 27840               | 2.20                                     | 0.88               | 0.12                              | 0.15    | 0.20  | 0.04               |  |
| <i>S. xylosus</i>          | DSM 20266                | 1.53                                     | 1.44               | 0.10                              | 0.10    | 0.33  | 0.07               |  |
| <i>S. warneri</i>          | ATCC 27836               | 1.44                                     | 6.39               | 0.13                              | 0.15    | 0.47  | 0.67               |  |
| <i>S. simulans</i>         | ATCC 27848               | 0.96                                     | 1.09               | 0.01                              | 0.01    | 0.24  | 0.20               |  |
| <i>S. hominis</i>          | ATCC 27844               | 1.87                                     | 0.92               | 0.07                              | 0.12    | 0.04  | 0.04               |  |
| <i>S. sciuri</i>           | ATCC 29062               | ND <sup>b)</sup>                         | ND <sup>b)</sup>   | 0.10                              | 0.10    | 10.26 | 0.20               |  |
| <i>S. hyicus</i>           | NCTC 10350 <sup>c)</sup> | 11.67 <sup>d)</sup>                      | 5.94 <sup>d)</sup> | 0.87                              | 1.08    | 0.20  | 0.21               |  |
| <i>S. chromogenes</i>      | NCTC 10530               | 2.06                                     | 0.33               | 0.11                              | 0.07    | 0.18  | 0.04               |  |
| Coagulase-positive species |                          |                                          |                    |                                   |         |       |                    |  |
| <i>S. aureus</i>           | Cowan I <sup>c)</sup>    | 14.43                                    | 10.06              | 1.15                              | 1.77    | 0.13  | 0.13               |  |
| <i>S. intermedius</i>      | ATCC 29663               | 3.91                                     | 0.84               | 0.06                              | 0.32    | 0.15  | 0.12               |  |

a) Epithelial cells of nasal cavity and trachea were collected from rabbits.

b) Not done.

c) Protein A-positive strains.

d) Results supplied by Teranishi *et al.*<sup>13)</sup>

着菌数は14.43個で、ついで *S. hyicus* NCTC 10350 (11.67個) であった。その他の菌種では0.79~3.91個であった。MDCK細胞に対しては、*S. aureus* Cowan Iが10.06個と最も高く、ついで *S. warneri* ATCC 27836 (6.39個)、*S. hyicus* NCTC 10350 (5.94個) であった。その他の菌種では0.33~1.79個であった。

## 2. 鼻腔粘膜上皮細胞への付着性

14菌種の14株を用いた。鼻腔粘膜上皮細胞によく付着した菌種は *S. aureus* Cowan Iで、細胞1個当りの平均付着菌数は1.15個で、ついで *S. hyicus* NCTC 10350 (0.87個) であった。その他の菌種では0.01~0.22個であった。

## 3. 気管粘膜上皮細胞への付着性

14菌種の14株を用いた。気管粘膜上皮細胞によく付着した菌種は *S. aureus* Cowan Iで、細胞1個当りの平均付着菌数は1.77個で、ついで *S. hyicus* NCTC 10350 (1.08個) であった。その他の菌種では0.01~0.32個であった。

## 4. 表皮細胞への付着性

14菌種の14株を用いた。マウス表皮細胞によく付着した菌種は *S. sciuri* ATCC 29062 (細胞1個当りの平均付着菌数10.26個) で、その他の菌種では0.04~1.93個であった。ニワトリ表皮細胞に対してはどの菌種もほとんど付着せず、その平均付着菌数は0.04~0.67個の間であった。

## 考 察

細菌が宿主に対して病原性を発揮するには、まず宿主細胞に付着・定着することが不可欠条件である。大腸菌などのグラム陰性桿菌では、各種の細胞に付着する際には線毛が重要な役割を演じている<sup>20, 21)</sup>。

一方、ブドウ球菌のように菌体表面に線毛様構造物などを持たないものが、どのようにして宿主細胞に付着し定着するのかについては、まだ十分な解析がなされていない。梅田・天児<sup>16)</sup>は *S. aureus* を含む数種類の菌種の付着性について検討し、その付着性はプロテインA産生性のよい菌株ほど高いこと、トリプシン処理で付着性がなくなること、プロテインA抗体で付着性が阻止されることなどを見出し、ブドウ球菌ではプロテインAが付着因子の一つである可能性を示唆した。また、細胞側の付着因子として、細胞表面のフィブロネクチンをあげている。さらに、梅田ら<sup>15, 17, 18)</sup>は *S. aureus* の培養細胞への付着因子について、Vero細胞を用いて検討を行い、本菌の細胞への付着には細胞壁に存在する疎水性蛋

白が密接に関与していることを示唆した。BARRETT<sup>4)</sup>は、クランピング因子(C)とプロテインA(P)の両者を保有する *S. aureus* 菌株はどちらか一方を欠いた菌株よりも、silicone implant polymerによく付着すると報告し、また、これらの菌株(C<sup>+</sup>P<sup>+</sup>, C<sup>+</sup>, P<sup>+</sup>)をトリプシンで処理すると、いずれの菌株も付着能が著明に低下したことから、クランピング因子とプロテインAが付着に重要な役割を演じていることを示唆した。著者ら<sup>14)</sup>はVero細胞を用いて、ブタ由来 *S. hyicus* のプロテインA保有株と非保有株の付着能を比較検討し、プロテインAを保有する株はプロテインAを保有しない株よりもVero細胞に付着しやすいことを見出した。また、トリプシンで菌体を処理すると、プロテインA保有株の付着能は著しく低下したが、非保有株ではほとんど影響を受けなかったことを報告した。

ブドウ球菌のウシ乳腺組織への付着性に関して、FR-OSTら<sup>7, 8)</sup>は、*S. aureus*および *Streptococcus agalactiae*は大腸菌やその他のグラム陰性桿菌よりも乳管上皮細胞への付着性が強く、特に乳管上皮の微細線毛の欠損した上皮細胞に容易に付着して、そこで増殖することを報告し、また、*S. aureus*では乳頭管上皮細胞および乳槽上皮細胞よりも太い乳管上皮細胞に付着しやすいことを見出した。WANASINGHE<sup>19)</sup>は、ブドウ球菌のウシ乳腺上皮細胞への付着研究のための簡単な *in vitro* の系を開発し、この系を用いて、*S. aureus*の付着に及ぼす生理学的、化学的、酵素学および生物学的諸因子の影響を調べた。*S. aureus*のウシ乳腺上皮細胞への付着性は加熱(60℃、30分)、トリプシン、パバイン、ラウリル硫酸ナトリウム、トリトンX-100およびツイーン80などによって著しく阻止されたことから、本菌の該細胞への付着にはある種の蛋白が関与している可能性を示唆した。

浅井ら<sup>1-3)</sup>はヒトの臨床材料から検出されるコ陰性ブドウ球菌の中で、特に静脈カテーテルや患者血液培養由来の菌株がヒト上皮由来培養細胞に強く付着することに着目し、コ陰性ブドウ球菌の細胞付着の機序について検討を加え、細菌側の付着に関与する因子として細胞壁構成成分であるリボタイコ酸を想定している。CHRISTENSENら<sup>5)</sup>は、*S. epidermidis*ではslime産生(強い?)株は非産生株(弱い?)よりも、カテーテル表面によく付着することを見出し、このslimeが付着に重要な役割を演じていることを示した。さらに彼ら<sup>6)</sup>はslime産生株と非産生株を用いて、マウス実験感染を行った結果、前者は後者に比べて有意に *S. epidermidis* 感染症が惹

起されたことを示し、病原性因子の一つとして slime の存在を示唆した。

本研究において、ブドウ球菌13菌種の13株を、Vero および MDCK 培養細胞に付着させたところ、両細胞によく付着した菌種はプロテインA保有の *S. aureus* Cowan I と *S. hyicus* NCTC 10350 であった。このことから、菌体にプロテインAが存在すると、Vero および MDCK 細胞への付着性は高くなることが考えられた。しかし、MDCK 細胞においては *S. warneri* ATCC 27836 がプロテインA非保有にもかかわらず、かなり高い付着性を示したことから、MDCK 細胞への付着にはプロテインA以外の付着因子の存在の可能性が想定された。

ブドウ球菌の鼻腔、気管、肺などの呼吸器系粘膜上皮細胞への付着に関してはこれまであまり報告がない<sup>11)</sup>。本研究で、14菌種の14株の家兎の鼻腔、気管粘膜上皮細胞への付着性を調べたところ、いずれの細胞に対しても、プロテインA保有の *S. aureus* Cowan I と *S. hyicus* NCTC 10350 が、他のプロテインA非保有のブドウ球菌に比べ高い付着性を示した。このことより、ブドウ球菌の上部気道粘膜上皮細胞への付着にはプロテインAが一つの因子と推察された。しかし、LEFEVRE & JENSEN<sup>12)</sup> は七面鳥由来 *S. aureus* の air-sac 細胞（七面鳥由来）への付着について検討し、プロテインA含有量の高い菌株は概して高い付着性を示したが、プロテインAを有しない菌株でも高い付着性を示したことから、該細胞への付着能とプロテインA含有量とは相関がないものと結論した。

ほとんどのブドウ球菌はヒトおよび動物の皮膚を生息場所としているが、種によっては好んで寄生する部位がある。例えば、*S. capitis* はヒトの頭部、特に皮脂腺の多い頭皮やひたいに大きな菌集団として見出される。*S. auricularis* は外耳道に、*S. hominis* と *S. haemolyticus* は腋下、恥骨部に、*S. aureus* は前鼻腔に好んで生息する。この皮膚定着性を決めている細菌側および宿主側の因子については、まだほとんど解明されていない。そこで本研究では、ブドウ球菌のマウスおよびニワトリ表皮細胞への付着性を検討した。供試した14菌種の14株の中で、マウス表皮細胞によく付着した菌種は *S. sciuri* であった。この *S. sciuri* は主としてげっ歯類の皮膚より高頻度に分離される菌種であり、本菌がマウス表皮細胞に対して高い付着性を示したことは非常に興味深い知見であった。また前述したように、培養細胞や上部気道粘膜上皮細胞によく付着したプロテインA保有の

*S. aureus* Cowan I と *S. hyicus* NCTC 10350 は、マウス表皮細胞に対する付着性はよくなかった。また、両菌種はニワトリ表皮細胞にもあまり付着しなかった。このことより、ブドウ球菌の表皮細胞への付着にはプロテインAはあまり関与していないものと推察された。

## 要 約

ブドウ球菌14菌種の14株を用い、培養細胞、家兎の鼻腔および気管粘膜上皮細胞、マウスおよびニワトリの表皮細胞への付着性について検討し、つぎの結果を得た。

1. Vero 細胞によく付着した菌種は *S. aureus* Cowan I (1細胞当り14.43個) および *S. hyicus* NCTC 10350 (11.67個) で、その他の菌種では0.79~3.91個であった。MDCK 細胞に対しても *S. aureus* (10.06個) と *S. hyicus* (5.94個) はよく付着した。

2. 鼻腔 (N) 粘膜上皮細胞および気管 (T) 粘膜上皮細胞によく付着した菌種は *S. aureus* Cowan I (1細胞当りNで1.15個、Tで1.77個) と *S. hyicus* NCTC 10350 (Nで0.87個、Tで1.08個) で、その他の菌種ではNで0.01~0.22個、Tで0.01~0.32個であった。

3. マウス表皮細胞によく付着した菌種は *S. sciuri* ATCC 29062 (10.26個) で、その他の菌種では0.04~1.93個であった。ニワトリ表皮細胞に対してはどの菌種もほとんど付着せず、その付着菌数は0.04~0.67個の間にあった。

以上のことから、ブドウ球菌の培養細胞および上部気道粘膜上皮細胞には、*S. aureus* Cowan I と *S. hyicus* NCTC 10350 が高い付着性を示すことがわかった。この両株はプロテインAを保有しており、このことから、プロテインAを保有する菌株ほど該細胞への付着性が高いことが推察された。また、マウス表皮細胞には *S. sciuri* ATCC 29062 が高い付着性を示し、興味深いことに、この *S. sciuri* は主としてげっ歯類の皮膚より高頻度に分離される菌種であった。

本研究は文部省科学研究費（課題番号 61560340）の補助を受けて行われた。ここに記して深く感謝の意を表す。なお本論文の要旨は、第101回日本獣医学会（1986年、4月、東京）において発表した。

## 文 献

- 1) 浅井隆志・小池直人・ルナル純子・金 兌貞：日細菌誌、41、207、1986.
- 2) 浅井隆志・小池直人・ルナル純子・金 兌貞・保

- 科定頼・黒坂公生：日細菌誌、40, 196, 1985.
- 3) 浅井隆志・吉浜 勲・小池直人・ルナル純子・金  
兌貞：日細菌誌、42, 185, 1987.
- 4) BARRETT, S. P.: *J. Med. Microbiol.*, 20, 249  
-253, 1985.
- 5) CHRISTENSEN, G. D., W. A. SIMPSON, A.  
L. BISNO and E. H. BEACHEY: *Infect. Immun.*, 37, 318-326, 1982.
- 6) CHRISTENSEN, G. D., W. A. SIMPSON, A.  
L. BISNO and E. H. BEACHEY: *Infect. Immun.*, 40, 407-410, 1983.
- 7) FROST, A. J.: *Infect. Immun.*, 12, 1154-1156,  
1975.
- 8) FROST, A. J., D. D. WANASINGHE and J.  
B. WOOLCOCK: *Infect. Immun.*, 15, 245-253,  
1977.
- 9) 浜田茂幸：日細菌誌、36, 557-564, 1981.
- 10) 浜田茂幸：日細菌誌、37, 80, 1982.
- 11) JENSEN, M. M., W. C. DOWNS, J. D. MOR-  
REY, T. R. NICOLL, S. D. LEFEVRE and C.  
M. MEYERS: *Avian Dis.* 31, 64-69, 1987.
- 12) LEFEVRE, S. D. and M. M. JENSEN: *Avian  
Dis.* 31, 70-73, 1987.
- 13) TERANISHI, H., A. SHIMIZU, J. KAWANO  
and S. KIMURA: *Mem. Grad. School Sci.  
& Technol., Kobe Univ.*, 6-A, 91-98, 1988.
- 14) TERANISHI, H., A. SHIMIZU, J. KAWANO  
and S. KIMURA: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 50, 825  
-827, 1988.
- 15) 梅田昭子：日細菌誌、40, 61, 1985.
- 16) 梅田昭子・天児和暢：日細菌誌、37, 120, 1982.
- 17) 梅田昭子・天児和暢：日細菌誌、41, 208, 1986.
- 18) 梅田昭子・植木祐司・天児和暢：日細菌誌、40,  
645, 1985.
- 19) WANASINGHE, D. D.: *Acta Vet. Scand.*, 22,  
99-108, 1981.
- 20) 山本達男：日細菌誌、42, 627-651, 1987.
- 21) 梁川 良：モグンメディア、30, 461-468, 1984.