歯周病原菌の酵素活性を指標とした迅速診断法 (SK-013)

— SK-013 の特性と酵素特異性の検討 —

石原和幸 内藤祐子 加藤哲男 高添一郎
奥田克爾 江口 徹* 中島光一* 松田尚樹*
山崎恭子* 長谷川健二* 水道裕久* 杉原邦夫*

東京歯科大学微生物学講座

(主任：高添一郎教授)

*サンスター株式会社オーラルケア事業本部研究部

(部長：中村正一)

(平成元年12月19日受付)

A Rapid Diagnosis (SK-013) for Periodontitis Based on the Enzymatic Activity of Periodontopathic Bacteria

Study on the Characterization of the SK-013 and the Enzyme Specificity

Kazuyuki ISHIHARA, Yuko NAITO, Tetsuo KATO, Ichiro TAKAZOE,
Katsuji OKUDA, Toru EGUCHI*, Koichi NAKASHIMA*, Naoki MATSUDA*,
Kyoko YAMASAKI*, Kenji HASEGAWA*, Hirohisa SUIDO* and Kunio SUGIHARA*

Department of Microbiology, Tokyo Dental College

1-2-2 Masago, Chiba-City Chiba 260, JAPAN

(Chief : Prof. Ichiro TAKAZOE)

*Research and Development Department, Oral Care Business Headquarters, Sunstar Inc.

(Chief Manager : Masakazu NAKAMURA)

We present studies for development of an enzymatic diagnostic method for periodontitis. A rapid and sensitive diagnostic method named SK-013 was provided by Sunstar Inc. to evaluate the peptidase activities specifically derived from periodontopathic

bacteria such as *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* and some strains of *Capnocytophaga* species. The results obtained indicated the specificity of the enzymatic reaction in this system.

Key words : Periodontopathic bacteria, Enzymatic activity, Rapid diagnosis, SK-013

要旨：本研究は、歯周病診断に役立つ歯周病原菌由来の酵素活性を測定する試薬開発を目的として計画した。歯周病原菌由来のペプチダーゼ活性を測定するため、私たちは、SK-013 と名付けた感度の高い試薬を開発した。本試薬(SK-013)は、*Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, いくつかの *Capnocytophaga* 菌種に特異的に反応した。この試薬は、歯齦縁下ブラーク中のそれらの菌種の存在を日常的なスクリーニングとして短時間で検出するのに有効なものであろう。

索引用語：歯周炎病原菌, 酵素活性, 迅速診断法, SK-013

本論文の要旨は、第32回春季日本歯周病学会総会(1989年5月13日)、第237回東京歯科大学学会(1989年6月10日)において発表した。

結 言

ヒトの歯周炎は、特定のグラム陰性桿菌とスピロヘータの増殖によって発症し進行する¹⁻³⁾。また active site⁴⁾, refractory periodontitis⁵⁾ の局所、さらには recurrent pocket⁶⁾ にはそれらの菌種の増加のあることもわかってきた。特定細菌の存在や消長を把握することは、歯周疾患の病態を的確にとらえてその治療方針さらには予後を知る必須条件となっている。

歯周疾患の細菌学的診断には、患者プラークサンプルの暗視野顕微鏡や位相差顕微鏡などによる直接的な観察、また種々の特異抗体を利用した蛍光抗体法などがある。時間がかかるが培養法に基づく細菌叢の検討も研究室レベルで多用されている。さらに特定細菌の DNA をプローブとした DNA プローブ法などがある。しかしこれらの検査法は、設備と時間がかかる欠点がある。したがって簡便で迅速に局所細菌叢を知る目的で、歯周局所から採取した材料の酵素活性を測定する方法が検討されている。

歯周病に関連する細菌は、さまざまな酵素活性を持っている⁷⁻¹¹⁾。それらの活性は特定菌種に限定されるものや多くの菌種に共通するものなどさまざまである。Laughon ら¹²⁾は、19種類の酵素活性を調べることのできる API ZYM System を用い、歯周病関連菌種の酵素活性を調べ、それらが菌種の同定に役立つことなどを明らかにした。ついで Suido ら¹³⁾は、歯周病関連細菌の合成基質分解酵素活性パターンの違いから菌種を同定することが可能なことを示した。彼らの共通した知見は、*Bacteroides gingivalis* と *Treponema denticola* さらに特定の *Capnocytophaga* 菌種が N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide (BANA) を切断するいわゆるペプチダーゼ活性を持つことを明らかにしていることである。

歯周病原性菌である *B. gingivalis* と *T. denticola* のペプチダーゼ活性は、C 末端部の発色基質として β -NA や p -NA を結合させたものが汎用されているが、これらの基質を用いた場合、歯周局所から得られる細菌量を

勘案すると、短時間で活性を発現させるのは必ずしも容易ではない。我々は、酸化酵素により色源体が酸化される反応系が非常に微量のジプロモヒドロキシアニリン (DBHA) を加えることによって色素の生成を顕著に促進する反応を見出し、このエンハンス系を組込んだ本酵素活性を調べる系を SK-013 (サンスター株式会社、大阪) と名付けた。本研究では、この SK-013 の特性と特定菌種に特異的に反応する検査法が否かについて検討した。

材料および方法

1. SK-013 の基本的原理

B. gingivalis, *T. denticola* のペプチダーゼ活性を測定するためには、従来、Fig. 1 に示すような方法が使われていた。

我々が開発した SK-013 は、Fig. 2 のように基質ペプチドの C 末端に DBHA を結合させた化合物を合成し、ペプチダーゼにより切断され遊離した DBHA のエンハンス反応系を用いて測定するものである。基質として N-Carbobenzoyl-glycyl-glycyl-arginyl-DBHA (CBz-Gly-Gly-Arg-DBHA) を用い、エンハンス反応では酸化酵素にアスコルビン酸オキシダーゼ (AOD) およびビリルビンオキシダーゼ (BLOD) を用いた。

色源体には 4, 4'-bis (dimethylamino) diphenyl (2-hydroxy-1-naphthyl) methane (β -NTM), 4, 4'-bis (dimethylamino) diphenyl (2-hydroxy-3-carboxy-6-sulfo-1-dinaphthyl) methane (LHG) および 10-(methylcarbamoyle)-3, 7-bis (dimethylamino)-phenothiazine (MCDP) を使用した。

酸化酵素と色源体の組合せを決定する試験においては、それらを組合せた反応系に一定量の DBHA を加えた後、37°C, 15 分間反応させた。反応終了後、直ちに 630 あるいは 666 nm における吸光度を測定した。

以上の検討の結果選択された酸化酵素と色源体の組合せに、歯周炎病原菌由来ペプチダーゼの基質である CBz-Gly-Gly-Arg-DBHA を加えた検査キットを作成し、SK-013 とした。

Fig. 1 Principle of the ordinary method for the detection of peptidase activity derived from oral bacteria

〈DBHA release reaction〉

〈Enhance reaction〉

Abbreviation CBz-Gly-Gly-Arg-DBHA : N-Carbobenzoxy-Glycyl-Glycyl-Arginyl-3, 5-dibromo-4-hydroxyaniline

DBHA : 3, 5-dibromo-4-hydroxyaniline

β -NTM : 4, 4'-bis (dimethylamino) diphenyl (2-hydroxy-1-naphthyl) methane

LHG : 4, 4'-bis (dimethylamino) diphenyl (2-hydroxy-3-Carboxy-6-sulfo-1-dinaphthyl) methane

MCDP : 10-(methylcarbamoyl)-3, 7-bis (dimethylamino)-phenothiazine

AOD : Ascorbate oxidase

BLOD : Bilirubin oxidase

Fig. 2 Principle of SK-013 for the detection of peptidase activity derived from oral bacteria

SK-013 に対する種々の細菌の反応性の検討は、後述する方法で培養した細菌の洗浄菌体 0.5 ml を SK-013 0.5 ml に加え、37°C 15 分反応後の 666 nm における吸光度を測定することにより行なった。

2. 供試菌株と培養

実験に供した菌株は、44 菌種 115 株である。菌の継代は、menadione と hemin を加えた Trypticase soy agar (BBL Microbiology System, Cockeysville, MD.) にウマ脱繊維血液 (コージン, 東京) を 10% の割合で加えたものを用い 2 週間ごとに行なった。通性嫌気性菌を含め培養は、N₂ : 80%, CO₂ : 10%, H₂ : 10%, とした嫌気チャンパー内で行なった。菌体は、Trypticase peptone (BBL), Trypticase phytone (BBL), Yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) の透析外液を中心とした培地¹⁴⁾に 2 日から 3 日間培養させたものを集菌し、リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.2) で 3 回洗浄した。*Eikenella corrodens* の発育には 0.2% の KNO₃ を加え、*Wolinella recta* の発育にはフマル酸とギ酸を加えた培地を用いた。*B. forsythus* は、血液平板発育菌体を集菌し、PBS で洗浄した。口腔内トレポネーマは、TYGVS⁹⁾ 培地を用い 3 日間から 7 日間培養したものを集菌し供試した。

3. 菌数の調整

各菌濃度における SK-013 活性の検討に用いた *B. gingivalis* 381 株, *T. denticola* ATCC 33520 株および

Bacteroides forsythus ATCC 43037 株の菌数の調整は、EKDS 算定板 (Bacteria 用, 荳垣医理工工業 KK, 東京) を用い、位相差顕微鏡下で算定した。また SK-013 の特異性を調べるための被験菌の菌数は、660 nm での吸光度で調整した。

成 績

1. SK-013 の感度

酸化酵素と色源体の組合せを調べた結果を表 1 に示した。一定量の DBHA を加えたエンハンス反応で反応系を検討した所、AOD の方が BLOD に比べて活性が強かった。色源体を比較したところ、 β -NTM, LHG にくらべ MCDP に対する活性が強かった。酸化酵素と色源体の組み合わせは AOD と MCDP の組合せが最もエンハンス効果が高く、SK-013 ではこの組合せを用いた (Table 1)。

B. gingivalis 381 株と *T. denticola* ATCC 33520 株のペプチダーゼ活性の温度依存性を調べた結果を Fig. 3 に示した。図からもわかるように *B. gingivalis*, *T. denticola* では 30°C~37°C に活性値のピークが見られた。

両菌種による本ペプチダーゼ活性の至適 pH を調べた結果を Fig. 4 に示した。pH 7.0 における活性値を 100% とおき相対活性で表した。*B. gingivalis* では pH 7.0~7.5, *T. denticola* では pH が 6.0~7.0 で高い活性を示

Table 1 Comparisons between the enhance activities in each oxidase-chromogen mixture

Chromogen	Oxidase	
	BLOD	AOD
β -NTM	0.16*	0.24*
LHG	0.18*	0.29*
MCDP	0.54**	1.70**

DBHA conc.: 25 ng/ml (94 pmol/ml)

* Absorbancy at 630 nm

** Absorbancy at 666 nm

した。

従来からの口腔細菌の trypsin 様ペプチダーゼ活性を調べる方法と SK-013 との検出感度を比較した。*B. gingivalis* および *T. denticola* 菌数を 1.5×10^6 から 6.0×10^8 に変えて 15 分間で反応させその吸光度を調べた結果を Table 2 に一括して示した。従来法は、 10^8 オーダーでないとその活性が測定しにくい のに対し、SK-013 では 6.0×10^6 の少ない菌数でも明確な反応性があり従来法に比べ 25 倍から 200 倍の感度があることがわかった。また供試した両菌種の β -NA および DBHA 基質に対するペプチダーゼ活性に差のあることがわかった。

2. 各菌数による SK-013 の反応性

Loesche らの報告や¹⁵⁾予備試験の結果から BANA 分解活性が *B. forsythus* 菌株に存在することがわかっていたので本試験に *B. gingivalis*, *T. denticola* と共に供試した。菌数 10^6 から 10^7 オーダーでの SK-013 の 37°C 15 分間の反応性を Fig. 5 に示した。算定板で数えた菌数で見ると *T. denticola*, *B. forsythus*, *B. gingivalis* の順に高いことがわかった。

3. SK-013 の特異性の検討

発育菌体を PBS で洗浄後、660 nm で、吸光度が 0.02 になるように調整した菌液 0.5 ml を直ちに SK-013 0.5 ml に加え、37°C 15 分放置し、直ちにその 666 nm の吸光度を測定した。この吸光度を、牛豚臓由来のトリプシン (Sigma, T-8253, USA) を用いて作成した標準曲線から 1 ml あたりの Trypsin unit (Try U/ml) に換算して SK-013 活性値として求めた。

Table 3 には、供試した 115 株中、陽性となった 6 菌種の活性値を示した。供試した菌種の中で *B. gingivalis*, *B. forsythus*, *B. macacae*, *T. denticola* が本活性陽性であった。*Capnocytophaga gingivalis* ATCC 33624 株も中程度の陽性を示し、*Capnocytophaga sputigena* ATCC

Fig. 3 Temperature dependency of CBz-Gly-Gly-Arg-DBHA peptidase activity

Fig. 4 pH dependency of CBz-Gly-Gly-Arg-DBHA peptidase activity

33612 株も弱いながら本活性が陽性であった。

SK-013 活性が陰性であった 92 株は、Table 4 に一括して示した。供試グラム陽性菌で本活性を示すようなものは存在しなかった。

考 察

口腔内からは、約 200~300 種類の細菌が分離されるが¹⁶⁾、そのうち特定のグラム陰性桿菌とスピロヘータが歯周病原性菌と考えられるようになった^{17,18)}。このことから、歯周病所の細菌叢の把握は、次のような意味を持っている。即ち、歯周病の診断に役立ち、特に歯周炎病原菌の割合の高いいわゆるハイリスクな部位の治療の必要

Table 2 Comparisons between the sensitivities of ordinary method and SK-013 method

No. of bacterial cell	Ordinary method (Abs. at 525 nm)		SK-013 method (Abs. at 666 nm)	
	<i>T. denticola</i>	<i>B. gingivalis</i>	<i>T. denticola</i>	<i>B. gingivalis</i>
1.5×10^6	0	0	0.09	0.04
6.0×10^6	0	0	0.27	0.11
1.2×10^7	0	0	0.47	0.21
2.2×10^7	0	0	0.81	0.38
8.0×10^7	0.02	0.10	ND*	ND
1.5×10^8	0.03	0.15	ND	ND
6.0×10^8	0.10	0.43	ND	ND

Incubated at 37°C for 15 min

*ND : Not determined

Fig. 5 SK-013 activity at various number of cells of *B. gingivalis*, *B. forsythus* and *T. denticola*

性が明確になる。また歯周治療後のメンテナンスを的確にでき、リコール間隔なども決定することができる。以上のように歯周局所の細菌叢は臨床上極めて有用な情報を提供するものといえよう。

このような背景からこれまでに種々の細菌叢を検出・評価する原理・方法が考案され試みられてきている。この中で近年、簡便かつ迅速で、特殊な設備や熟練した技術が必要としないという特徴をもった酵素法が注目されていた。本研究ではこの酵素法の特徴を活かし、かつ、従来の方法で問題であった感度の向上をはかる目的で開発された SK-013 の特性を明らかにするとともに、歯周疾患に関連があるとされている特定菌種との特異性に基づき、本品の歯周疾患診断薬としての可能性を検討した。

従来の方法では CBz-Gly-Gly-Arg-β-NA を基質として歯周病原菌由来のペプチダーゼにより C 末端の β-NA を切断し、遊離した β-NA と Fast-Garnet GBC のカップリング反応による赤色変化を測定するものであった。一方、SK-013 は、CBz-Gly-Gly-Arg-DBHA を基質として用いており、ペプチダーゼで切断されて遊離する DBHA は、色源体の酸化反応のエンハンサーとして働くもので、この反応による青色変化を測定している。我々はこのエンハンス反応系を利用し、酸化酵素として AOD を、色源体として MCDP を用いることで、ペプチダーゼ活性の測定感度を従来法に比べて 25 倍から 200 倍も高くできることを明らかにした。この、検体としての歯齦縁下プラークサンプルが少なくすむ、あるいは極めて少量

Table 3 SK-013 reactivity of gram-negative periodontopathic bacteria

Bacterial species	Strain	Reactivity (TryU/ml) mean $\pm$ S.D.
<i>B. gingivalis</i>	381	0.97
	ATCC 33277	0.39
	1021	0.93
	11	0.56
	16-1	0.83
	A 7 A 1-28	0.78
	F-1	0.27
	I-2	0.42
	S-2	0.62
	W 50	0.17
	W 83	0.20
		0.56 $\pm$ 0.29
<i>B. forsythus</i>	ATCC 43037	0.23
	choi	0.23
		0.23 $\pm$ 0.00
<i>B. macacae</i>	ATCC 33141	0.51
<i>T. denticola</i>	ATCC 33520	0.59
	ATCC 33521	0.13
	ATCC 35404	0.27
	ATCC 35405	0.87
	M-1	0.07
	M-2	0.97
	M-3	1.00
		0.56 $\pm$ 0.40
<i>C. gingivalis</i>	ATCC 33624	0.32
<i>C. sputigena</i>	ATCC 33612	0.11
		0.22 $\pm$ 0.15

の歯周病原菌を15分で検出できるという点は、本法の最大の長所であり、従来法の感度向上の必要性という問題点が解決されたことを意味している。

さらに我々は本法の温度依存性、pH 依存性を検討し、至適条件を 37°C pH 7.0 と設定した。こうして作成された SK-013 は、既に trypsin 様酵素活性の存在が明らかにされていた *B. gingivalis*, *T. denticola* および *B. forsythus* が CBz-Gly-Gly-Arg-DBHA を基質とするペプチダーゼ活性を有し、かつ、これらの菌を定量的に測定できる可能性を示唆した。

また、SK-013 の菌に対する特異性を 44 菌種 115 株について検討し、*B. gingivalis*, *T. denticola* などの歯周病原菌に特異性があり、他の口腔内に見出される菌、特にグラム陽性菌では反応は起こらないことを明らかにし

た。このことは、SK-013 が歯周病原菌を特異的に検出できるという意味で、歯周疾患の診断に極めて有効であることを示唆している。

一方、歯周疾患が特定の細菌によって起こる感染症という概念が提唱されて以後、口腔内の細菌叢を検出・評価する原理・方法が考案され試みられてきたが、多くの口腔内に見出される菌の中から特定の歯周病原菌を検出し、モニタリングすることは容易ではなかった。即ちその多くが特殊な設備や操作の熟練、反応に時間を要するものであった。この点 SK-013 はあらかじめ調製された基質、酸化酵素、色素体を含んだ反応液に、被検菌体を加え、37°C で 15 分間反応させるだけで生じる色調の変化を測定するだけでよいという極めて簡便で迅速な方法であり、感度の面でも大きく改善がはかられている。

Table 4 SK-013 negative strains of oral bacteria

Bacterial species	Strain	Mean Reactivity±S.D. (TryU/ml)
<i>B. intermedius</i>	10 strains	0.03±0.02
<i>B. corporis</i>	4 strains	0.03±0.03
<i>B. levii</i>	1312	0.04
<i>B. loescheii</i>	ATCC 15930	0
<i>B. melaninogenicus</i>	ATCC 25845	0.02
<i>B. denticola</i>	ATCC 33185	0.01
<i>B. oralis</i>	ATCC 33269	0.05
<i>B. oris</i>	ATCC 33573	0.04
<i>B. buccae</i>	ATCC 33574	0.06
<i>B. heparinolyticus</i>	ATCC 35895	0
<i>C. ochracea</i>	2 strains	0.03±0.04
<i>Capnocytophaga</i> spp.	8 strains	0.05±0.03
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5 strains	0.03±0.02
<i>H. aphrophilus</i>	3 strains	0 ±0.01
<i>F. nucleatum</i>	4 strains	0.02±0.03
<i>E. corrodens</i>	6 strains	0.02±0.02
<i>Veillonella</i> spp.	2 strains	0.03±0.00
<i>Selenomonas</i> spp.	3 strains	0.15±0.06
<i>W. recta</i>	ATCC 33238	0
<i>T. pectinovorum</i>	ATCC 33768	0.04
<i>T. socranskii</i> subsp. <i>buccae</i>	ATCC 35534	0.04
<i>T. socranskii</i> subsp. <i>paredis</i>	ATCC 35535	0.02
<i>T. socranskii</i> subsp. <i>socranskii</i>	ATCC 35536	0.02
<i>T. vincentii</i>	ATCC 35580	0.02
<i>A. viscosus</i>	4 strains	0.05±0.05
<i>A. naeslundii</i>	ATCC 12104	0.06
<i>A. israelii</i>	ATCC 12102	0.03
<i>S. mutans</i> group	9 strains	0.01±0.01
<i>S. sanguis</i>	2 strains	0
<i>S. mitis</i>	ATCC 9811	0
<i>S. salivarius</i>	ATCC 9759	0.03
<i>S. intermedius</i>	2 strains	0.03±0.01
<i>Streptococcus</i> spp.	ATCC 9895	0.04
<i>P. acnes</i>	2 strains	0.01±0.01
<i>P. parvum</i>	ATCC 11829	0.02
<i>P. micros</i>		0.01
<i>Peptococcus</i> spp.		0
<i>Lactobacillus</i> spp.	5 strains	0.03±0.02

以上のように SK-013 は、チェアーサイドでの有用な歯周疾患診断薬としての可能性が示唆されたが、次のステップとして、実際に歯周ポケットから得られるプラークサンプル中のこれらの特定菌種の存在と SK-013 活性値との関連を検討する予定である。また、さらに多様な歯周疾患の病態や歯周治療の経過に伴う変化との関連に

ついても臨床的に検討する必要があると思われる。

結 論

特定の歯齦溝内細菌のもつ trypsin 様酵素活性は、従来、ペプチドに発色基質として β -NA や p-NA を結合

させて調べられていた。この活性をもっと鋭敏に調べられるものとして SK-013 を開発した。

1. SK-013 の反応の至適 pH は *B. gingivalis* で 7.0~7.5, *T. denticola* で 6.0~7.0 であった。この方法によるペプチダーゼの検出感度は、 10^8 のオーダーでないと活性を測定できない従来法に比べ、 6.0×10^6 の菌数でも測定できる感度を持つことがわかった。

2. SK-013 は *B. gingivalis*, *T. denticola*, *B. forsythus* および特定の *Capnocytophaga* 菌種に特異性がありこれらの菌種の歯周局所材料中の存在を簡便で迅速に知る方法であることを示唆した。

文 献

- 1) Slots, J. and Genco, R.J. : Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : Virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. J. Dent. Res., 63 : 412-421, 1984.
- 2) Genco, R.J., Zambon, J.J. and Christersson L.A. : The role of specific bacteria in periodontal disease : The origin of periodontal infections. Adv. Dent. Res., 2 : 245-259, 1988.
- 3) Loesche, W.J. and Laughon, B.E. : Role of spirochetes in periodontal disease, In : Host-parasite interactions in periodontal disease, Genco, R.J. and Mergenhagen S.E. Eds, Washington, D.C., American society for Microbiology, 1982, 62-75.
- 4) Dzink, J.L., Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. : The predominant cultivable microbiota of active regions of destructive periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 15 : 316-323, 1988.
- 5) Haffajee, A.D., Socransky, S.S. Dzink, J.L., Taubman, M.A. and Ebersole, J.L. : Clinical microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. J. Clin. Periodontol., 15 : 390-398, 1988.
- 6) Choi, J.I., Nakagawa, T., Yamada, S., Takazoe, I. and Okuda, K. : Clinical, microbiological and immunological studies on the recurrent periodontal disease. J. Clin. Periodontol. (in press)
- 7) Nakamura, M., Mashimo, P.A. and Slots, J. : Dipeptidyl arylamidase activity of *Bacteroides gingivalis*. Microbios Letts., 25 : 157-160, 1984.
- 8) Nakamura, M. and Slots, J. : Aminopeptidase activity of *Capnocytophaga*. J. Periodont. Res., 17 : 597-603, 1982.
- 9) Ohta, K., Makinen, K.K. and Loesche, S.S. : Purification and characterization of an enzyme produced by *Trebonema denticola* capable of hydolyzing synthetic trypsin substrates. Infect. Immun., 53 : 213-220, 1986.
- 10) Suido, H., Nakamura, M., Mashimo, P.A., Zambon, J.J. and Genco, R.J. : Arylaminopeptidase activities of oral bacteria. J. Dent. Res., 65 : 1335-1340, 1986.
- 11) Ono, M., Okuda, K. and Takazoe, I. : Purification and characterization of a thiol-protease from *Bacteroides gingivalis*. Oral Microbiol. Immun., 2 : 77-81, 1987.
- 12) Laughon, B.E., Syed, S.A. and Loesche, W.J. : API ZYM System for identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* spp. and spirochetes of oral origin. J. Clin. Microbiol., 15 : 97-102, 1982.
- 13) Suido, H., Eguchi, T., Tanaka, T. and Nakamura, M. : Identification of periodontopathic bacteria based upon their peptidase activities. Adv. Dent. Res., 2 : 304-309, 1988.
- 14) Okuda, K., Naito, Y., Ohta, K., Fukumoto, Y., Kimura, Y., Ishikawa, I., Kinoshita, S. and Takazoe, I. : Bacteriological study of periodontal lesions in two sisters with juvenile periodontitis and their mother. Infect. Immun., 45 : 118-121, 1984.
- 15) Loesche, W.J. : The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. Oral Microbiol. Immunol., 1 : 65-70, 1986.
- 16) Listgarten, M.A. and Hellden, L. : Relative distribution of bacteria at clinically health and periodontally diseased sites in humans. J. Clin. Periodontol., 5 : 115-132, 1978.
- 17) Socransky, S.S., Tanner, A.C.R., Haffajee, A., Hillman, J.D. and Goodson, J.D. : Present

status of studies on the microbial etiology of periodontal disease, In : Host Parasite interactions in periodontal disease, Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E. Eds., Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1982, 1-12.

- 18) Tanner, A.C.R., Strzempko, M.W., Belsky, C.A. and McKinley, G.A. : API-ZYM and API-ANADENT reactions of fastidious gram negative species. J. Clin. Microbiol., 22 : 333-335, 1985.
-

連絡先 :

東京歯科大学微生物学講座

〒 260 千葉市真砂 1-2-2