

〔原著〕 松本歯学 6 : 100~108, 1980

*Bacteroides melaninogenicus* の  
black pigment (hematin) の抗菌活性

中村 武, 藤村節夫, 金川直博

松本歯科大学 口腔細菌学教室 (主任 中村 武 教授)

Antibacterial Activity of the Black Pigment (Hematin)  
of *Bacteroides melaninogenicus*

TAKESHI NAKAMURA, SETSUO FUJIMURA and NAOHIRO KANAGAWA

Department of Oral Microbiology, Matsumoto Dental College  
(Chief: Prof. T. Nakamura)

Summary

From cells of *Bacteroides melaninogenicus*, isolated from human gingival crevice deposits, the black pigment was extracted by the established methods. The extracted pigment was identified as hematin upon examination of its various properties. Extracted hematin from five different strains inhibited the growth of the many kinds of Gram positive bacterial species, in which *Actionomyces viscosus* and *Bacterionema matruchotii* were very susceptible (Minimum Inhibitory Concentration=MIC, 25.0  $\mu$ g/ml) as *Streptococcus mutans*. In other species, *Actinomyces*, *Strep. mitis*, *Corynebacterium parvulum*, and *Propionibacterium acnes* were moderately sensitive. They were inhibited at a concentration of 50.0  $\mu$ g/ml. The same results were shown with the use of authentic hematin. There was a proportional relationship between hematin concentration and the squares of diameters of inhibitory zones on agar plates.

Other tested strains grew almost normally even if they were exposed to hematin at concentration over 200  $\mu$ g/ml.

A similar antimicrobial activity as hematin was detected, if not so markedly, in the pus obtained from inflammatory lesion produced by experimental mixed infection including *B. melaninogenicus*.

## 緒 言

口腔細菌叢は、多くの菌種から構成されている。しかし、口腔内部位別には必ずしもその細菌叢が同一ではなくある程度の特長を有する<sup>6) 15)</sup>。これら細菌叢の構築に関する生態学は複雑であり不明な点が多い<sup>7)</sup>。内因感染である口腔領域疾患の病因に重要な役割を有するこれら常在菌叢における菌種相互作用の検討は、潜在的病原菌種の動態に関連しても興味ある問題である。われわれは、口腔細菌叢の菌種相互作用を明らかにするため拮抗因子、特に bacteriocin 様活性について一連の検討を行い、これまで *Streptococcus sanguis* の Sanguicin<sup>4) 12)</sup> および *Prorionibacterium acnes* の Acnecin<sup>3) 10)</sup> について明らかにして来た。また、これらの研究経過中で血液平板上で黒色集落を形成する *Bacteroides melaninogenicus* の black pigment<sup>1)</sup> (hematin) が、齲蝕病因に深く関連性を有する *Streptococcus mutans*<sup>2)</sup> の発育を阻害する事を見出し、その概要についても報告している<sup>13)</sup>。*B. melaninogenicus* は、歯肉溝細菌叢の約 4.5% をしめ<sup>6)</sup>、また、病巣局所で増量が認められ<sup>6) 20)</sup>、種々の生物学的活性と共に本菌は歯周疾患の病因に関連して重要な役割を有する菌種と考えられている<sup>5) 8) 16) 19) 21)</sup>。

本研究は、*B. melaninogenicus* の black pigment である hematin を抽出し<sup>18)</sup>、口腔内に見られる種々の細菌種に対する発育阻止作用を検討したものである。

## 研究 方 法

供試菌と培養。*B. melaninogenicus* は、成人歯肉溝材料より分離した 5 株で、いずれも血液平板培地 (Heart Infusion Broth (Difco) 2.5%, hemin 5 mg/ℓ, menadine 0.5 mg/ℓ, 馬脱線維血液 10%, Agar 1.5%) で顕著な黒色集落を形成する菌株を供試した。培養は、Anaerobic glove box (Coy Co. Mich., U. S. A.) で嫌氣的に行った。指示菌として *Streptococcus mutans* Ingbritt, *Bacterionema matruchotii* ATCC 14266, *Actinomyces viscosus* ATCC 15987, *A. naeslundii* ATCC 12104, *A. israelii* ATCC 12102, *Corynebacterium parvulum* ATCC 11829, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, *Streptococcus mitis*

ATCC 9811, *Strep. salivarius* ATCC 9759, *Strep. sanguis* ATCC 10556, *Veillonella alcalescens* ATCC 17745, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25286, Heparinase 産生性 *Bacteroides* No. 26 および *B. melaninogenicus* NM-2 を供試した。*B. matruchotii* は、0.2% Yeast Extract (Difco) 加 Brain Heart Infusion (Difco) 培地、*Bacteroides* 種は、前記血液平板培地を使用し、その他の菌種は、GAM 半流動 (日本製薬) 培地を使い、これら培地の 2~5 日前培養菌を実験に使用した。

発育阻止活性の検索。抗菌活性は、主にこれまでの bacteriocin 様活性の検索に準じて指示菌平板培地での拡散法<sup>3) 12)</sup> による発育阻止帯から判定した。なお、*B. matruchotii* については、本菌液滴下による drop method<sup>13)</sup> によっても検した。また指示菌が *Bacteroides* 種では Trypticase 培地<sup>14)</sup>、その他は、前記 Yeast Extract 加 Brain Heart Infusion 培地を主に使用した。MIC (最小発育阻止濃度) は、各種濃度の抽出 hematin 含有寒天培地各 2 枚を使用し、指示菌を 1 白金耳塗抹し培養後、これら指示菌の発育の有無によって判定した。なお、hematin は予め 2% KOH 液の少量で溶解した後、0.1M phosphate buffer pH 7.0 で適宜希釈して使用した。培養は *B. matruchotii* は、好氣的に、その他の菌種はすべて Anaerobic glove box で行った。

黒色菌体の温度処理による阻止活性の発現性。*B. melaninogenicus* PAM-1 株を血液平板培地で 7 日間培養した黒色菌体を 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 に 5.0mg/ml wet weight に懸独し、60°~120°C, 20 分間処理した。各菌浮遊液およびその遠心 (12,000×G, 4°C, 20 分) 上清について発育阻止活性を *Strep. mutans* Ingbritt を指示菌として検した。なお、cell free の遠心上清の黒褐色程度をフォトメーターを用い、580 nm で測定した。

培養日数による発育阻止活性の検索。*B. melaninogenicus* PAM-1, PAM-2, PAM-6, PBM-5 および PBM-8 の 5 株を血液平板培地で 3, 5 および 7 日間培養した。各平板より前記同様の菌液を調製し 120°C, 20 分間処理した試料について上記温度処理の検索と同様に阻止活性を検した。

Black pigment (hematin) の抽出。上記 5 株を供試し、それぞれ血液平板培地で 7~10 日間培養

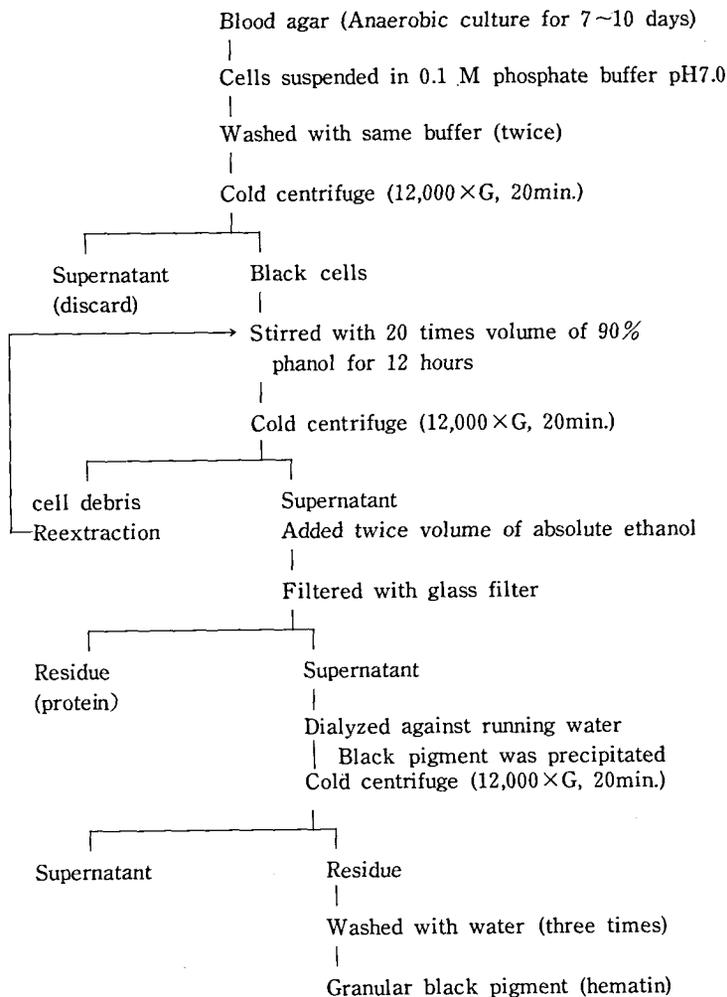


Fig. 1. Extraction procedure for the black pigment (hematin) of *B. melaninogenicus*

した黒色菌体を 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 に集菌懸濁した。これを同 buffer で 2 回洗浄をくり返した。各洗浄菌体 (約 18~25.0 g W. W) から black pigment の抽出を Schwabacher ら<sup>18)</sup> の phenol 法に準じて行った。その概略は Fig. 1 に示した。すなわち、各洗浄菌体量に対して、90% phenol 液を 20 倍量加え、50~60°C 12 時間スターラーで攪拌抽出した。これを遠心 (12,000×G, 20 分, 4°C) し、残渣にはさらに phenol 液を加え再抽出した。上清は 2 倍量の ethanol を加え、4°C, 4 時間放置後 glass filter で濾過し、沈澱物を除去した。この濾過上清を精製水に対して、24 時間透析後、遠心によって沈澱を回収し、これを精製水

で 3 回洗浄をくり返し、顆粒状の black pigment を得てそれぞれ乾燥した (280~420 mg dry weight)。また、モルモットを用いての *B. melaninogenicus* を含む実験混合感染症膿汁<sup>20)</sup> から本抽出法によって得た試料についても disk 法<sup>10)</sup> で阻止活性を検した。

抽出 black pigment (hematin) の性状。PAM-1 株から得た抽出試料を Schwabacher らの方法<sup>18)</sup> に準じて 0.1 N NaOH 液、0.1 N NaOH 液と 1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 混液、これに 25% pyridine 液を加えた混液、濃酢酸液および 90% phenol 液にそれぞれ溶解し、フォトメーターで光の吸収スペクトルを調べた。

拡散法による hematin 濃度と阻止帯との関係。抽出 hematin を少量の 2% KOH 液で溶解後、0.1 phosphate buffer pH 7.0 で 0.01~5 mg/ml 溶液を調製した。各濃度の hematin 液の 0.25 ml を使用し拡散法によって *B. matruchotii* を指示菌とし、培養後に発現した阻止円の直径を測定した。また、市販の hematin (Sigma Chem. Co.) についても同様に検討した。

### 研究成績

黒色菌体の各温度処理による阻止活性の発現性は Table 1 に示した。非加熱菌液では、阻止円の直径が 12 mm であるのに対して、60°C~100°C 処理菌液の活性は、処理温度が高くなるに伴い 14~16 mm の広い阻止円を発現した。本活性は、120°C でも安定であった。また、各温度処理菌液からの遠心上清 (cell free) 試料の阻止円の直径も処理温度の上昇によって 9~16 mm と増大した。一方、これら各上清試料の黒褐色度を 580 nm の吸収で見ると処理温度の上昇によって明らかに吸収の増量が認められ、本阻止活性は、試料の黒褐色度に相関して認められた。

培養日数による阻止活性の発現状況は、3日培養菌試料では、供試 5 株とも全く阻止円が認められず、これら試料の 580 nm 吸収も 0.019~0.04 とその数値が低かった。5日培養菌試料では、その吸収度は 0.14~0.69 であり、阻止円の直径が 9~12 mm であった。さらに 7日培養では、吸収度も 1.18~1.70 と高く、いずれの菌株においても阻止円の直径が 14~16 mm と大きくその活性が増量した。これら阻止円の直径は、また、試料の 580 nm の吸収度に比例して認められた (Table 2)。本

菌試料のこれら阻止活性は、菌体の黒色度に起因する事実は、本菌が血液平板上で培養日数と共に黒色集落化する肉眼的所見からも明らかであった。また、7日培養の黒色集落を白金耳で寒天平板培地に置き、37°C、3日間 incubate 後、その集落上に指示菌液の 1~2 滴を滴下した drop method によっても集落周辺に *B. matruchotii* の明らかな阻止帯が認められた (Fig 3-A)。

抽出 black pigment (hematin) の各種溶媒処理による光の吸収は、対照として使用した市販の hematin の成績と一致して認められ (Table 3)。また Schwabacher ら<sup>18)</sup>の抽出 hematin の吸収特性とも近似していた。この成績から抽出 black pigment は明らかに hematin と考えられる。

抽出 hematin の種々の細菌種に対する阻止作用は、各菌株より得た試料の 0.5 mg/ml で検討し

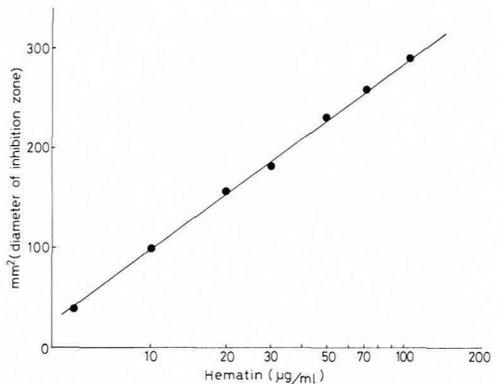


Fig. 2. Relationship between concentrations of hematin and squares of diameters of inhibitory zones. Indicator strain was *Bacterionema matruchotii* ATCC 14266.

Table 1 : Increase of inhibitory activity of *B. melaninogenicus* (PAM-1) by heat treatment

Heat treatment	Diameter mm of inhibition zone by		
	cell suspension	supernatant	absorbance (580 nm)
None	12	9	0.14
60°C	14	12	0.69
80°C	15	14	1.18
100°C	16	15	1.45
120°C	16	16	1.72

Indicator was used *Strep. mutans* Ingbritt.

Cell suspension were prepared 5.0 mg/ml W.W.

in 0.1M phosphate buffer pH7.0

Table 2: Inhibitory activity of *Strep. mutans* by *B. melaninogenicus* black pigment (hematin)

<i>B. melaninogenicus</i> Strains	Blood agar					
	Sample from cells for 3 days culture		Sample from cells for 5 days culture		Sample from cells for 7 days culture	
	absorbance (580 nm)	inhibition zone (diameter mm)	absorbance (580 nm)	inhibition zone (diameter mm)	absorbance (580 nm)	inhibition zone (diameter mm)
PAM-1	0.024	—	0.69	12.0	1.74	16.5
PAM-2	0.026	—	0.24	11.0	1.60	16.0
PAM-6	0.040	—	0.14	9.0	1.28	14.0
PBM-5	0.054	—	0.15	9.5	1.45	15.0
PBM-8	0.019	—	0.24	10.0	1.52	15.5

Indicator was used *Strep. mutans* Ingbritt. Samples were used 0.25 ml of supernatant obtained from cell suspension (5.0 mg/ml w.w.) in 0.1M phosphate buffer pH 7.0 by heating at 120 °C for 20 min.

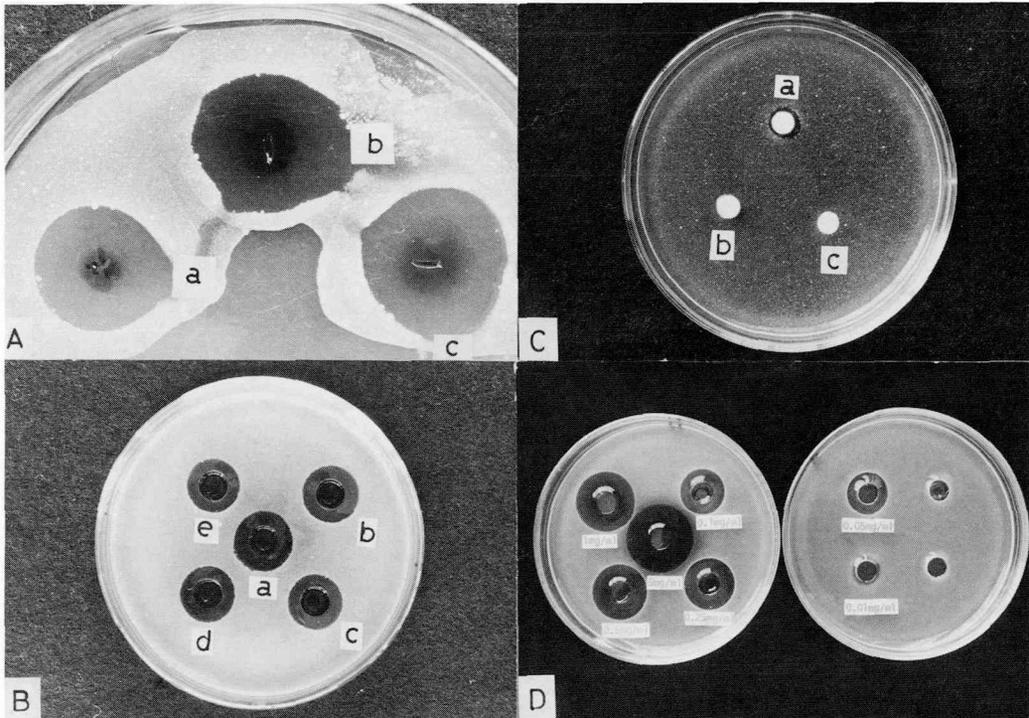


Fig. 3. Growth inhibition of *Bacterionema matruchotii* ATCC 14266 by the black pigment (hematin) from *Bacteroides melaninogenicus*.

- Growth inhibition around the black colonies of *B. melaninogenicus*. (a) PAM-1, (b) PAM-2, (c) PAM-6 on blood agar.
- Growth inhibition by the extracted hematin from *B. melaninogenicus*. (a) PAM-1, (b) PAM-2, (c) PAM-6, (d) PBM-5, (e) PBM-8
- Growth inhibition by (a) extracted sample from pus of experimental anaerobic mixed infection, (b) heated pus, and (c) 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 (control).
- Effect of the extracted hematin on the growth at various concentration.

Table 3 : Characteristic absorption of the extracted black pigment and authentic hematin

Solvent, treatment	Extracted black pigment from <i>B. melaninogenicus</i> (wave length, nm)	Authentic hematin (Sigma Chemical Co.) (wave length, nm)
0.1N-NaOH	6 0 8	6 0 8
	4 9 0	4 9 0
0.1N-NaOH +Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	5 7 5	5 8 0
	5 5 5	5 5 5
0.1N-NaOH +Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> +Pyridine	5 5 4	5 5 4
	5 2 5	5 2 5
	4 7 5	4 7 5
Acetic acid	6 3 5	6 3 5
	5 3 0	5 3 5
	5 0 5	5 0 5
90% Phenol	6 2 5	6 2 5
	5 3 0	5 3 0
	5 0 0	5 0 0

Table 4 : Inhibitory spectrum of the hematin extracted from *Bacteroides melaninogenicus*

Indicator	Inhibition zone diameter mm	Positive / Tested hematin
<i>Strep. mutans</i> Ingbritt	15~16	5/5
<i>Strep. mitis</i> ATCC 9811	12~13	5/5
<i>B. matruchotii</i> ATCC 14266	16~17	5/5
<i>A. viscosus</i> ATCC 15987	15~16	5/5
<i>A. naeslundii</i> ATCC 12102	12~13	5/5
<i>C. parvulum</i> ATCC 11829	12~13	5/5
<i>P. acnes</i> ATCC 6919	10~12	5/5
<i>Strep. salivarius</i> ATCC 9759	—	0/5
<i>Strep. sanguis</i> ATCC 10556	—	0/5
<i>V. alcalescens</i> ATCC 17745	—	0/5
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25286	—	0/5
<i>B. melaninogenicus</i> NM-2	—	0/5
Heparinase-producing <i>Bacteroides</i> No.26	—	0/5

— : Not inhibition

た。その成績は、Table 4 に示す如く、いずれの菌株から得た抽出 hematin も *Strep. mutans*, *Strep. mitis*, *B. matruchotii*, *A. viscosus*, *A. naeslundii*, *C. parvulum* および *P. acnes* の発育を阻止した。特に *Strep. mutans*, *A. viscosus* および *B. matruchotii* に対していずれの菌株から得た試料も阻止円の直径が 15~17 mm でその活性が顕著であった (Fig. 3-B)。しかし、その他の供試指示菌に対しては、いずれも阻止円が認められなかった。また、実験感染症膿汁よりの抽出試料は、*Strep. mutans* および *B. matruchotii* に対してわ

ずかながら阻止作用を示した (Fig. 3-C)。

抽出 hematin 量と阻止円の直径との関係は、Fig. 2 に示した。hematin 濃度に比例して阻止円の直径も大きく発現し、指示菌が *B. matruchotii* では、0.01 mg/ml hematin 濃度でも明らかな阻止帯が見られた (Fig. 3-D)。また、市販の hematin にも同様の阻止活性が認められた。

抽出 hematin の各菌種に対する MIC は、*A. viscosus* および *B. matruchotii* では 25.0 μg/ml で最も小さくその値は、*Strep. mutans* と一致する<sup>13)</sup>のものであった。*A. naeslundii*, *A. israelii*, *C.*

Table 5: MIC of the extracted hematin from *B. melaninogenicus* for various species of microorganisms.

Strains	Hematin						
	0 $\mu\text{g/ml}$	6.2 $\mu\text{g/ml}$	12.5 $\mu\text{g/ml}$	25.0 $\mu\text{g/ml}$	50.0 $\mu\text{g/ml}$	100.0 $\mu\text{g/ml}$	200.0 $\mu\text{g/ml}$
<i>Str. mutans</i> Ingbritt <sup>13)</sup>	##	##	+	—	—	—	—
<i>B. matruchotii</i> ATCC 14266	##	##	+	—	—	—	—
<i>A. viscosus</i> ATCC 15987	##	##	+	—	—	—	—
<i>A. naeslundii</i> ATCC 12104	##	##	##	+	—	—	—
<i>A. israelii</i> ATCC 12102	##	##	##	+	—	—	—
<i>C. parvum</i> ATCC 11829	##	##	##	##	—	—	—
<i>P. acnes</i> ATCC 6919	##	##	##	##	—	—	—
<i>Str. mitis</i> ATCC 9811	##	##	##	+	—	—	—
<i>Str. salivarius</i> ATCC 9759	##	##	##	##	##	##	##
<i>Str. sanguis</i> ATCC 10556	##	##	##	##	##	##	##
<i>V. alcalescens</i> ATCC 17745	##	##	##	##	##	##	##
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25286	##	##	##	##	##	##	##
<i>B. melaninogenicus</i> NM-2 <sup>1)</sup>	##	##	##	##	##	##	##
Heparinase-producing <i>Bacteroides</i> No.26	##	##	##	##	##	##	##

#: Inhibition free,      #: Slight inhibition,      +: Heavy inhibition,  
—: Complete inhibition

*parvum*, *P. acnes* および *Strep. mitis* ではないずれも 50.0  $\mu\text{g/ml}$  で前記 3 菌種と比較してその値は大きいものであった。しかし、その他の供試菌では、最高 200  $\mu\text{g/ml}$  濃度によっても殆んど発育に影響はなく、阻止作用が見られなかった (Table 5)。

### 考 察

*B. melaninogenicus* の他菌種に及ぼす抗菌的属性についての検討は少ない<sup>11)13)</sup>。 *B. melaninogenicus* は血液培地で培養すると black pigment を産生し、菌体を黒色化する特長を有する<sup>1)</sup>。この black pigment は古く melanin とされていた<sup>17)</sup> が、Schwabacher らが本菌の黒色菌体より抽出した black pigment について検討し、hematin であることを明らかにした<sup>18)</sup>。しかし、この black pigment (hematin) の生物学的活性については不明である。われわれは、先に *B. melaninogenicus* の黒色菌体が *Strep. mutans* の発育を阻止する活性を示すことから、阻止因子を検討し、その本体は hematin である事を見出した<sup>13)</sup>。この *Strep. mutans* を指示菌として *B. melaninogenicus* の培養日数による阻止活性を検討すると、本活性は、経日的に増量を示し、その程度が菌体試料の黒褐色程度に比例して認められた。このことは本菌が

血液培地で培養日数と共に菌体が黒色化する事実と一致していた。また、菌体の温度処理によって、本活性が強く発現する事からこの阻止活性は、熱に安定であり、加熱処理によって菌体から black pigment が release することに起因するものと考えられた。

抽出 hematin の性状について、spectrophotometrically に各溶媒処理による吸収特性は、市販の hematin および Schwabacher らの成績<sup>18)</sup> と近似して認められるので本抽出 black pigment は明らかに hematin と考えられる。この事実は、市販の hematin によっても種々の細菌に対する阻止作用がわれわれの抽出 hematin と極めて近似して認められることから明らかである。また、各菌株からの抽出 hematin 収量は、湿菌体量 18~25 g に対してそれぞれ乾燥量で 280~420 mg が得られ、その recovery は可成り高いものであった。しかし、本抽出標品の純度については断言出来ない。Schwabacher らは本抽出法では、極めて純度の高い事を指摘している。勿論、その収量が供試菌体の黒色程度に相関するものであろう。

抽出 hematin の inhibitory spectrum は、*Strep. mitis*, *B. matruchotii*, 種々の *Actinomyces* sp, *C. parvum* および *P. acnes* に対して阻止作用

を示し、特に *A. viscosus* および *B. matruchotii* の MIC はそれぞれ 25.0  $\mu\text{g/ml}$  と低い値であり、その感受性が *Strep. mutans* と同様に<sup>13)</sup>強いものであった。その他の菌種の MIC は、50.0  $\mu\text{g/ml}$  で前3菌種に比較し感受性がやや低かった。しかし、拡散法で阻止活性が認められなかったその他の菌種は、200  $\mu\text{g/ml}$  でも発育に殆んど影響が見られなかった。これらの成績は、hematin の発育阻止作用が菌種特異性である事を示している。この hematin 感受性の差異は近縁菌種の分類同定上に応用出来る可能性もあると考えられる。本研究で明らかになった感受性菌種は Gram 陽性菌に限定され、これら菌種に対する hematin の発育阻止機構の解明が今後さらに必要である。

さて、*B. melaninogenicus* のこれら black pigment (hematin) が in vitro で、口腔内に常在する種々の細菌に対して抗菌作用を有する事が明らかとなったが、本活性の発現には、hematin 産生のための血液成分が必須となる。in vivo における本菌の hematin 産生は不明である。しかし、本菌は、潜在的に hematin 産生能を有する菌種である事は、in vivo においてもその産生を否定出来ない。本菌を含めた実験感染症局所膿汁から hematin 抽出と同様に得た試料中にもこれら阻止活性がある程度認められる事は、この推定を支持するものかも知れない。勿論、hematin のみならず、すでに明らかとなっている本菌の bacteriocin 様活性<sup>11)</sup>と共にこれらの抗菌 spectrum と考え合せ、口腔細菌叢ひいては病巣局所における他菌種の構成に影響を及ぼす可能性があり興味深い。in vivo におけるこれら抗菌活性について、さらに検討を要すると考えられる。

#### 結 論

ヒトの歯肉溝から分離した *B. melaninogenicus* を血液加培地で培養した黒色菌体について発育阻止活性を検討したところ、60~120°C までの処理温度に比例して活性の増量が認められた。また、培養日数による菌体の阻止活性は培養3日でいずれの菌株にも阻止作用が認められなかったが、その後経目的に全株の活性が強くなり発現した。これら各菌体による阻止円の直径がいずれも試料の 580 nm 吸収すなわち黒褐色程度と比例していた。7~10日培養菌体から phenol 法によって black

pigment を抽出してフォトメーターで各溶媒処理による吸収を調べたところ hematin の性状と近似していた。5菌株から抽出した hematin は、いずれも種々の Gram 陽性菌に対し発育阻止作用を示し、特に *A. viscosus* および *B. matruchotii* に対しては、*Strep. mutans* と同様の強い感受性を示し、その MIC は 25.0  $\mu\text{g/ml}$  と低いものであった。また、種々の *Actinomyces*, *Strep. mitis*, *C. parvulum* および *P. acnes* に対しても阻止作用を示したが、これら菌種に対する MIC は、いずれも 50.0  $\mu\text{g/ml}$  とやや高かった。これら感受性菌に対して市販の haematin も同様の値を示した。また、hematin 濃度に比例して阻止円の直径が発現する事もわかった。しかし、その他の供試菌種に対しては 200  $\mu\text{g/ml}$  でも殆んど発育に影響はなく阻止作用が認められなかった。本菌を含む実験混合感染症膿汁からの抽出試料にもある程度の阻止作用が認められた。本研究で明らかとなった *B. melaninogenicus* のこれら抗菌活性の口腔細菌叢に及ぼす影響について考察した。

#### 文 献

- 1) Buchanan R. E. and Gibbons N. E. (1974), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed., 384-404, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 2) Fitzgerald, R. J. and Keyes P. H. (1960), Demonstration of the etiologological role of *Streptococci* in experimental caries in hamstere J. A. dent. Ass. 61: 9-19.
- 3) Fujimura, S. and Nakamura, T. (1978), Purification and properties of a bacteriocin-like substance (acnecin) of oral *Propionibacterium acnes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14: 893-898.
- 4) Fujimura, S. and Nakamura, T. (1979), Sanguicin, a bacteriocin of oral *Streptococcus sanguis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 262-265.
- 5) Gibbons R. J and MacDonald J. B. (1961), Degradation of Collagenous substrates by *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bacteriol.* 81: 614-621.
- 6) Gibbons, R. J., Socransky, S. S., Sawyer, S., Kapsimalis, B. and MacDonald J. B. (1963), The microbiota of the gingival crevice area of Man-II, the predominant cultivable organisms. *Arch. Oral. Biol.* 8: 281-290.
- 7) Hardie, M. J. and Bowden, H. G. (1974), The

- normal microbial flora of the mouth. In *The Normal Microbial Flora of Man*. 47—74, Academic Press, London and New York.
- 8) Mergenhagen S. E., Hampp E. G., and Scherp, H. W. (1961), Preparation and biological activities of endotoxins from oral bacteria. *J. infect. Dis.* **108**: 304—310.
  - 9) 中村 武 (1969), 口腔内嫌気性 Heparinase 産生菌に関する研究, 十全会誌. **78**: 509—530.
  - 10) Nakamura, T., Fujimura, S., Obata, N., Yamazaki, N., and Kanagawa, N. (1978), Bacteriocin (acnecin) activity of oral *Propionibacterium acnes*. *Bull. Tokyo dent. Coll.* **19**: 235—244.
  - 11) 中村 武, 藤村節夫, 田村 睦. (1980), *Bacteroides melaninogenicus* の bacteriocin (melaninocin) 活性とその性状 (抄録). *日細誌.* **35**: 361.
  - 12) Nakamura, T., Suginaka, Y., Obata, N., and Yamazaki, N. (1977), Bacteriocin-like activities of human dental plaque flora against oral anaerobic microorganisms. *Bull. Tokyo dent. Coll.* **18**: 217—229.
  - 13) Nakamura, T., Suginaka, Y., Obata, N., Yamazaki, N., and Takazoe, I. (1978), Growth inhibition of *Streptococcus mutans* by the black pigment (haematin) of *Bacteroides melaninogenicus*. *Arch. Oral Biol.* **23**: 593—595.
  - 14) 中村 武, 高添一郎. (1973), 口腔内 Dextran 分解性菌の実証. *歯科学報*, **73**: 1802—1810.
  - 15) Nolte, W. A. (1977), *Oral Microbiology*, 3rd ed., 197—250. C. V. Mosby Co., Saint Louis.
  - 16) 奥田克爾 (1973), *Bacteroides melaninogenicus* の感染機序に関する免疫学的研究. *歯科学誌*, **73**: 912—924.
  - 17) Oliver, W. W., and Wherry W. B. (1921), Notes on some bacterial parasites of the human mucous membranes. *J. infect. Dis.* **28**: 341.
  - 18) Schwabacher, H., Lucas D. R., and Rimington C. (1947) *Bacterium melaninogenicus*—a misnomer. *J. gen. Microbiol.* **1**: 109—120.
  - 19) Socransky, S. S., and Gibbons, R. J. (1965), Required role of *Bacteroides melaninogenicus* in mixed anaerobic infection. *J. infect. Dis.* **115**: 247—253.
  - 20) Takazoe, I., and Nakamura, T. (1971), Experimental mixed infection by human gingival crevice material. *Bull. Tokyo dent Coll.* **12**: 85—93.
  - 21) Takazoe, I., Tanaka, M., and Homma T., (1971), A pathogenic strain of *Bacteroides melaninogenicus*. *Arch. Oral Biol.* **16**: 817—822.