

〔原著〕 松本歯学 12 : 293~301, 1986

key words : *B. intermedius* — 核酸分解酵素 — 精製

## *Bacteroides intermedius* の核酸分解酵素 (DNase) の 精製とその性状

柴田幸永, 志村隆二, 藤村節夫, 中村 武

松本歯科大学 口腔細菌学教室 (主任 中村 武 教授)

### Purification and Characterization of DNase from *Bacteroides intermedius*

YUKINAGA SHIBATA, RYUJI SHIMURA, SETSUO FUJIMURA,  
and TAKESHI NAKAMURA

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

#### Summary

When 8 strains of *B. intermedius* were isolated from pus samples collected from the human oral lesions and examined for their DNase production on DNA-TBO agar plates, it was found that all the strains had DNase activity. DNase was purified partially from the cell extract of one of those strains, LM-4, and its enzymatic properties were studied. Molecular weight was estimated to be 52,000 and isoelectric point was 7.2. Optimum pH for the activity was around 7.0. The enzyme was activated by  $Mg^{2+}$  or  $Fe^{2+}$ , and inhibited by EDTA. The DNase hydrolyzed both denatured DNA and RNA, indicating that this DNase may be a non-specific nuclease.

#### 緒 言

歯周疾患の病巣局所に嫌気性グラム陰性桿菌の著明な増量がみられ<sup>1)</sup>, これら桿菌群の病原性が注目されている。とくに成人歯周炎の主要な病原菌群として黒色素産生の *Bacteroides sp.* が示され<sup>2)</sup>, *B. gingivalis* をはじめとする各菌種の病原的屬性についての検討が加えられ, これら *Bacteroides sp.* の病原的因子は極めて多様であることも明らかになっている<sup>3)</sup>。

われわれは, 歯周炎の病巣局所で増量し, *B. gingivalis* などと共にその病原的役割が注目される *B. intermedius* に強い DNase 活性を認めた。

DNase 産生細菌としては, レンサ球菌<sup>4)</sup>, ブドウ球菌<sup>5)</sup>, 大腸菌, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>6)</sup> など種々の菌種が示され, これら菌種の DNase 産生の多くは菌種ないし近縁菌の鑑別上の性状の一つとされている<sup>7,8)</sup>。一方, A群レンサ球菌の産生する DNase は本菌感染症の患者血清中に DNase に対する特異抗体が見られることから, その血清

学的診断にも利用されている<sup>9)</sup>。

口腔細菌とくにグラム陰性嫌気性桿菌種の DNase 産生について Richard<sup>10)</sup>らが報告しているが、これら菌種の産生する酵素の性状は必ずしも明らかではない。本論文は歯周疾患病巣局所から分離した *B. intermedius* の DNase 活性を調べ、この酵素の抽出・精製を行い、その性状について検討したものである。

## 方 法

### 1. 供試菌株と DNase 活性の検索

成人の歯周炎患者より分離した *B. intermedius* 8 株を供試した。各菌株を DNA 培地 (栄研) に GAM broth (日本製薬) 1/2 量と 0.01% toluidine blue を添加した培地 (DNA-TBO 培地) に画線塗抹した。活性は 4 日間 anaerobic glove box 内で嫌気培養後、集落の周囲に発現する DNA 分解帯 (メタクロマジー) を調べた。

### 2. DNase の抽出と局在

平板法によって強い DNase 活性を示した LM-4 株を供試し、本活性の抽出と局在について検討した。すなわち、LM-4 株の GAM broth 2  $\ell$  (hemin 5 mg/ $\ell$ , menadione 0.5 mg/ $\ell$  添加) で 5 日間嫌気培養した培養液から遠心 (15,000 $\times$ G, 4 $^{\circ}$ C, 15分) によって菌体と培養上清を得た。菌体は 0.05M トリス緩衝液 (pH7.2) で 2 回洗浄後、同緩衝液に懸濁して、超音波処理 (Kubota model 200M, 180W, 20分) した。この試料を超遠心 (100,000 $\times$ G, 4 $^{\circ}$ C, 30分) し、その上清を超音波処理試料 (150 ml) とした。培養上清はエバポレーターによって 10 倍に濃縮後、0.05M トリス緩衝液 (pH7.2) に透析した。この超音波処理試料、および培養上清濃縮試料について DNase 活性を測定した。

### 3. DNase 活性の測定法

#### 1) DNA 寒天平板法

DNA 平板に作製した well (直径 8 mm) に一定量の酵素試料を入れ、37 $^{\circ}$ C, 24 時間反応させた。反応後、平板上に 1N 塩酸を添加して well の周囲に発現する透明帯を調べた。また上記の DNA-TBO 培地を用いて同様に well 周囲に発現するメタクロマジーによって調べた。

#### 2) DNA・Methyl green 測定法<sup>11)</sup>

DNA・Methyl green (Sigma) を 0.05M トリス

緩衝液 (pH7.2) に溶解し 640 nm 吸光度 0.7 になるように調製した。この DNA 基質液 0.9 ml に酵素試料 0.1 ml 加え 37 $^{\circ}$ C で一定時間反応させた後、吸光度 (640nm) を測定した。酵素活性の単位は、試料 1 ml 当り 1 分間で 0.001 の吸光度を減少させる活性を 1 unit とした。

#### 3) UV 測定法

DNA (Sigma, Type III) を 0.05M トリス緩衝液 (pH7.2) に溶解 (2 mg/ml) した。この DNA 基質液 0.9 ml に酵素試料 0.1 ml 加え 37 $^{\circ}$ C で一定時間反応させた後、3% 過塩素酸 1 ml 加え反応を停止させた。これを 10 分間水中に静置後、遠心 (3,000 rpm, 10分) により沈殿を除去し本上清の 260 nm 吸光度を測定した。酵素単位は試料 1 ml 当り 1 分間に 260 nm 吸光度を 0.001 増加させる活性を 1 unit とした。

#### 4. リボヌクレアーゼ (RNase) 活性の測定法

##### 1) RNA 寒天平板法

0.05M トリス緩衝液 (pH7.2) に 1.5% の agar (栄研) を溶解し、これに 0.2% RNA (Sigma, Type III) を加えて平板を作製した。DNA 寒天平板法と同様に、well に酵素試料を入れ 37 $^{\circ}$ C, 24 時間反応後、RNase 活性を調べた。

##### 2) UV 測定法

RNA を 0.05M トリス緩衝液 (pH7.2) に溶解 (2 mg/ml) した。これを RNA 基質液として DNase 活性の検索に準じて RNase 活性を測定した。

#### 5. 酵素の精製

GAM broth (4  $\ell$ ) から得た LM-4 株の洗浄菌体 (湿重量, 約 82 g) を上記同様に超音波処理を行い、その超遠心上清を DNase の精製の出発試料とした。

出発試料を 0.05M トリス緩衝液 (pH7.2) で平衡化した DE-32 (Whatman) カラム (2.6 $\times$ 35 cm) に添加した。このカラムの非吸着画分を集め濃縮後、0.15M NaCl 含有の トリス緩衝液 (pH7.2) に透析した。

この試料を同緩衝液で平衡化した Sephacryl S-300 (Pharmacia) カラム (2.4 $\times$ 90 cm) によりゲル濾過を行った。なお各溶出画分は 5 ml/tube とした。

活性画分を集め濃縮後、0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0) に透析した。

この活性画分を同緩衝液で平衡化したハイドロキシアパタイト (Clarkson Chemical Company) カラム (1.6×18 cm) に添加し、約100 ml の同緩衝液でカラムを洗浄した後、同緩衝液を開始点として0.4M リン酸緩衝液までの直線濃度向配で溶出した。なお各溶出画分は3.4 ml/tube とした。

#### 6. Polyacrylamide gel 電気泳動 (PAGE)

ハイドロキシアパタイトカラムで溶出した活性画分の濃縮試料に Sodium dodecyl sulfate (SDS) および 2・メルカプトエタノールをそれぞれ、2.5% になるように添加し、100°C、2 分間処理をした。この試料を Laemmli の方法<sup>12)</sup> に準じて SDS-PAGE (0.1%, 10%) を行った。泳動ゲルは銀染色した<sup>13)</sup>。また、酵素活性の測定は Davis の方法<sup>14)</sup> に準じ濃縮酵素試料を用い PAGE (7.5%) を行い、泳動ゲルを DNA および RNA 寒天平板に埋め込み、それぞれ活性を検索した。

#### 7. 酵素の性状

##### 1) 分子量

精製試料および標準標品として Bovine Serum Albumin, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A, Cytochrome C (Pharmacia) を用いて Sephadex G-200 カラムによるゲル濾過法によって算定した。

##### 2) 等電点

本酵素の等電点は Vesterberg らの方法<sup>15)</sup> に準じて isoelectric focusing (110 ml カラム, LKB) による電気泳動法によって測定した。なお、供試試料は Sephacryl S-300 によるゲル濾過で溶出した活性画分を 1% グリシン溶液に透析後、1% アンホライト pH3.5-10.0 (LKB) を用い定電圧 (600V) で 45 時間泳動した。各画分は 3 ml/tube としてそれぞれ 280 nm 吸光度, pH および DNase 活性を測定した。

##### 3) 至適 pH

0.05M の各緩衝液 (pH4.0, 4.5, 5.0, 5.5 は酢酸緩衝液, pH5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 はトリス-マレイト緩衝液, pH7.5, 8.0, 8.5, 9.0 はトリス-塩酸緩衝液, pH9.0, 9.5, 10.0 は炭酸緩衝液) にそれぞれ DNA を 2 mg/ml になるように溶解した。これを基質液として精製酵素を用いて UV 測定法により DNase 活性を測定した。

##### 4) 熱感受性

精製酵素を 30°C ~ 70°C まで 8 段階の各温度でそ

れぞれ 10 分間処理した。各試料の DNase 活性は DNA・Methyl green 法で測定した。

##### 5) 金属イオンの影響

CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> の各化合物を 1.0 mM または 0.1 mM になるように DNA・Methyl green 基質液に溶解した。この金属イオン添加基質液と精製酵素を反応させ DNase 活性を測定した。

##### 6) 阻害剤の影響

精製酵素液に阻害剤として *κ*-ケースリン酸、*γ*-グルタミン酸、ジイソプロピルフルオロリン酸、2・メルカプトエタノール、ヨード酢酸、N-エチルマレイミド、EDTA、EGTA、1,10-フェナントロリンを 1~10 mM 添加して、37°C 10 分間インキュベートした。各試料の DNase 活性を DNA・Methyl green 法で測定し、活性残存率から阻害剤の影響を判定した。

## 結 果

### 1. DNase 活性と局在

歯周炎病巣より分離した *B. intermedius* 8 株は DNA-TBO 培地でいづれも集落周辺に幅広い (5~8 mm) DNA 分解帯を発現した (Fig. 1)。

LM-4 株の GAM broth で培養した上清試料には、わずかな活性が認められたに過ぎなかった。これに対して菌体の超音波処理試料の活性は極めて強かった。すなわち、DNA 寒天平板法でこの試

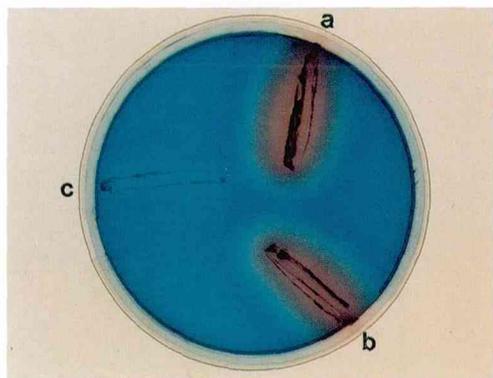


Fig. 1. Screening test of DNase production on DNA-TBO agar plate.

a : *B. intermedius* LM-4

b : *B. intermedius* LM-2

c : *B. heparinolyticus* No. 26

料の128倍希釈液によっても分解帯が発現した。また、DNA・Methyl green法で238 U/mlの活性を示した。

## 2. 酵素の精製

本活性はDE-32カラムに吸着せず非吸着画分のみ活性が認められた。

非吸着画分のSephacryl S-300によるゲル濾過

の溶出パターンはFig. 2に示した。DNase活性は、Fraction No. 50を中心とした小さな280 nm吸光度ピークに接して認められた。

本ゲル濾過の活性画分をハイドロキシアパタイトカラムに吸着させリン酸緩衝液の直線濃度勾配で溶出させると、DNase活性は0.23~0.33 Mで溶出した (Fig. 3)。

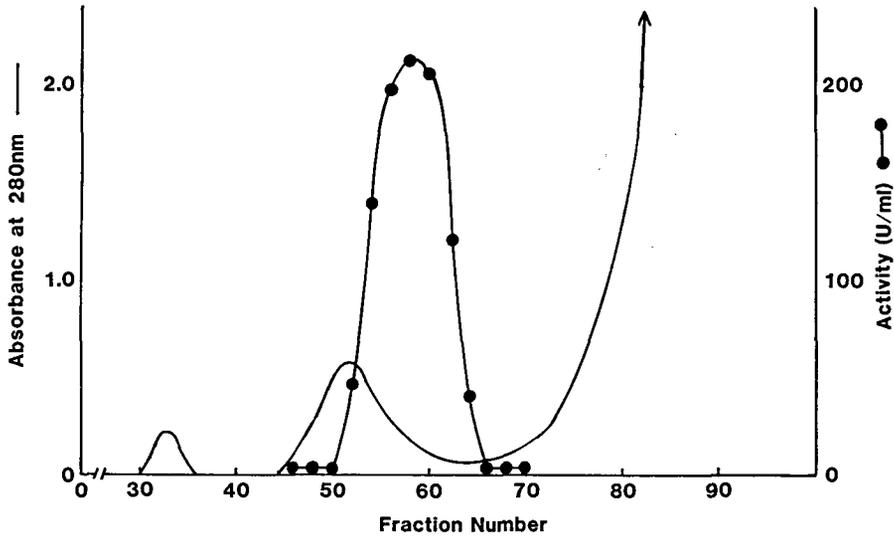


Fig. 2. Gel filtration on Sephacryl S-300 of DNase

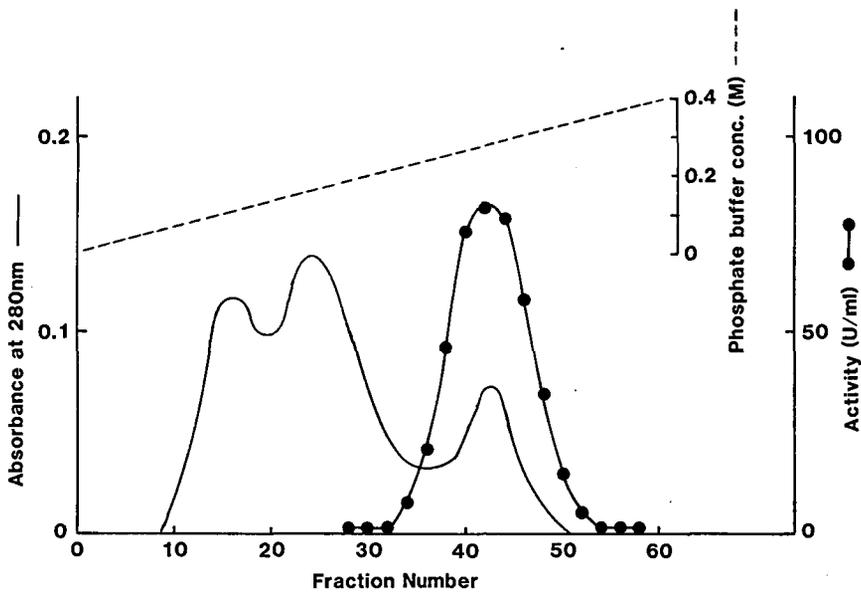


Fig. 3. Chromatography of DNase on a hydroxylapatite column

ハイドロキシアパタイトカラムで溶出した活性画分の SDS・PAGE 所見は、分子量 50,000~60,000 の位置に 2 本のバンドが認められた。なお、本酵素をゲル濾過によって分子量を測定すると 52,000 程度と算定されることから、この 2 本のバンド所見は、本酵素がサブユニットに分かれたものではなく完全な精製標品でないことを示す。

各精製段階における成績は Table 1 に要約した。菌体の超音波処理試料に対して最終のハイドロキシアパタイトカラムによって比活性は 382 倍上昇し、回収率は 18.6% であった。

### 3. DNase の性状

#### 1) 分子量

Sephadex G-200 によるゲル濾過法によって本酵素の分子量は 52,000 と算定された (Fig. 4)。

#### 2) 等電点

本酵素の isoelectric focusing による成績は Fig. 5 に示した。DNase 活性は Fraction No. 22 をピークとする 280 nm 吸光度と一致して認められた。その最大活性は pH 7.2 で、本酵素の等電点は 7.2 と推定された。

#### 3) 至適 pH

pH 7.0 で最大活性を示し、pH 5.0 以下および pH 9.0 以上ではほとんど活性が認められなかつ

Table 1. Purification of *B. intermedius* DNase

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Cell sonicate	176	1,443.2	41,888	29.0	100	1.0
DE-32	315	299.3	39,375	131.5	94	4.5
Sephacryl S-300	60	25.8	10,500	407.0	25	14
Hydroxylapatite	73	0.82	7,811	9,526	19	328

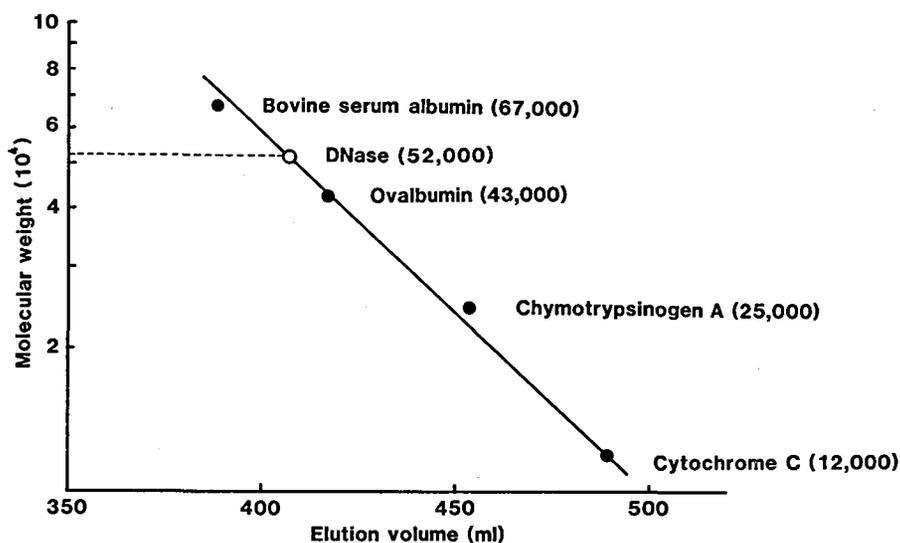


Fig. 4. Estimation of molecular weight of DNase: DNase and 2 mg of each standard protein were chromatographed on Sephadex G-200. The elution volume was determined by absorbance at 280 nm.

た(Fig. 6). 本酵素の作用至適 pH は7.0とみられる.

4) 熱感受性

40℃, 10分処理まで活性の低下は認められな

かった. 45℃より活性が低下し, 65℃, 10分処理で本酵素は完全に失活した(Fig. 7).

5) 金属イオンおよび阻害剤の影響

本酵素は  $Fe^{2+}$  および  $Mg^{2+}$  によって活性の上昇

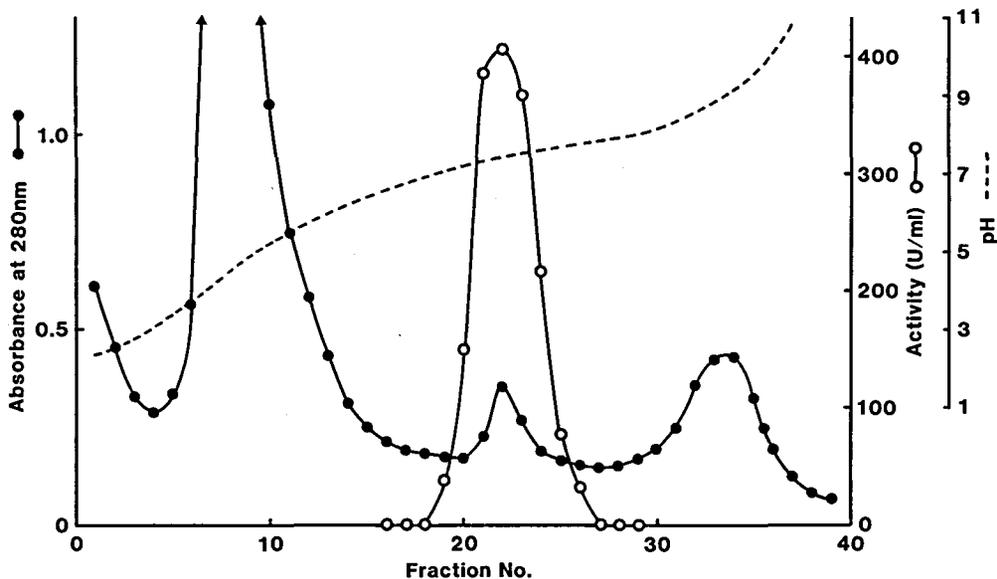


Fig. 5. Isoelectric focusing of DNase: The conditions are described in the text.

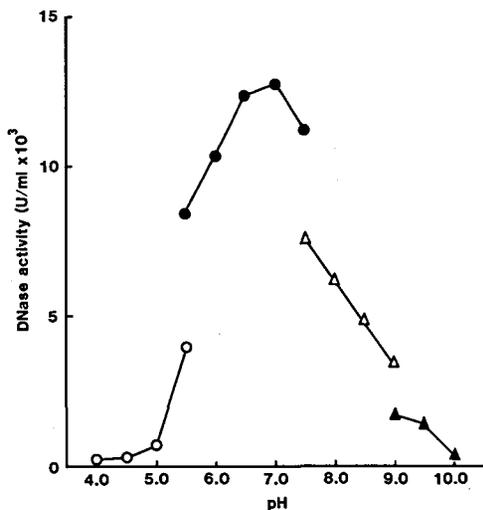


Fig. 6. Effect of pH on DNase activity  
 ○—○ : acetate buffer  
 △—△ : Tris-HCl buffer  
 ●—● : Tris-maleate buffer  
 ▲—▲ : carbonate-bicarbonate buffer

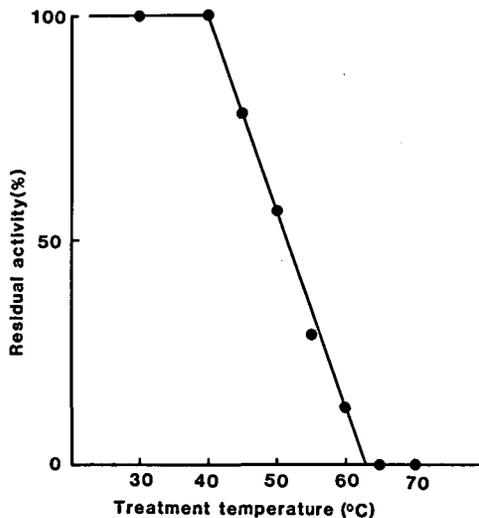


Fig. 7. Heat stability of DNase activity: The enzyme preparation was treated at various temperature for 10 min.

がみられた。とくに  $Mg^{2+}$  の添加によって約 4 倍の活性上昇を示した。一方、 $Zn^{2+}$  によって強い阻害を受け、0.1 mM で 80%、1 mM で 100% の阻害を示した (Table 2)。SH 阻害剤、還元剤およびセリン酵素阻害剤ではほとんど活性に影響がみられなかった。キレート剤である EGAT および 1・10-フェナントロリンでは阻害されなかったが EDTA で本活性が完全に阻害された (Table 3)。

6) 基質特異性

精製酵素を用いて RNA に対する分解性を RNA 寒天平板および RNA-TBO 平板法によって調べた。いずれの平板上においても明瞭な分解帯を発現した。また、DNA、熱変性 DNA、RNA の各核酸に対する分解性を調べるため、それぞれの基質と作用させ UV 測定法によって検討した。

Table 2. Effect of divalent ions on DNase activity

Ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	—	100
$Ca^{2+}$	1.0	86
$Mg^{2+}$	1.0	424
$Fe^{2+}$	1.0	254
$Co^{2+}$	1.0	101
$Mn^{2+}$	1.0	95
$Zn^{2+}$	1.0	3
	$1.0 \times 10^{-1}$	23

Table 3. Effect of various reagents on DNase activity

Reagents	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	—	100
p-Chloromercuribenzoic acid	1.0	116
	10.0	57
2-Mercaptoethanol	1.0	110
	10.0	112
Diisopropyl fluorophosphate	1.0	124
Iodoacetic acid	1.0	101
	10.0	114
N-Ethylmaleimide	1.0	128
	10.0	156
EDTA	1.0	0
EGTA	1.0	100
1.10-Phenanthroline	1.0	120

なお、熱変性 DNA の調製は DNA を 0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.2) に溶解 (2 mg/ml) し、100°C、30 分間加熱した。加熱後は水中にて急冷し、4°C

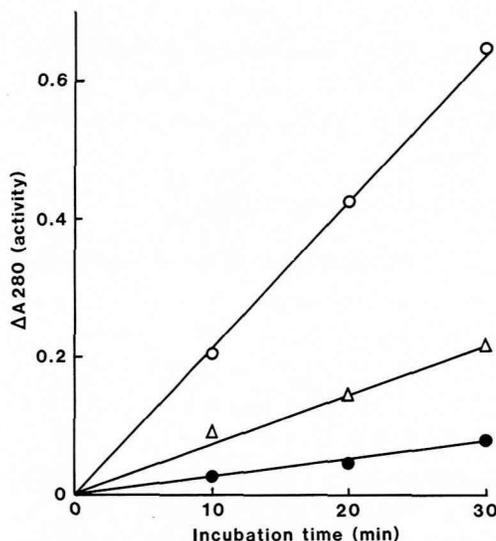


Fig. 8. Time course of hydrolysis by the DNase of DNA, denatured DNA, and RNA

△—△ : denatured DNA  
○—○ : DNA,  
●—● : RNA

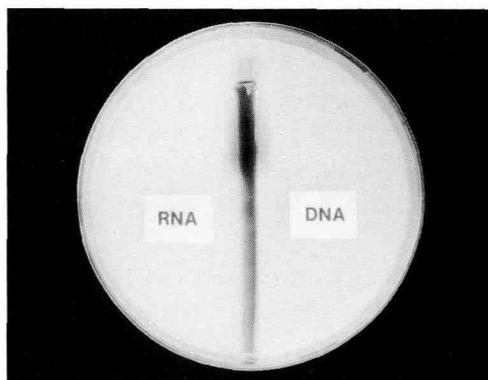


Fig. 9. Polyacrylamide gel electrophoresis of DNase: Gel was embedded in agar plate containing RNA (left half) and DNA (right half), followed by incubation at 37°C for 24hr. After the incubation, the plate was overlaid with 1N HCl to visualize the hydrolytic zones of nucleic acids.

に保存した。

本酵素はいずれの核酸に対しても作用が認められたが、熱変性 DNA および RNA に対してはその分解程度が低く、DNA に対する分解のそれぞれ10~30%であった (Fig. 8)。

一方、DNA, RNA に対する作用が電気泳動的な手段で分離できるか否かについて検討したが、両基質に対する活性は同一の泳動部位に認められた (Fig.9)。

## 考 察

成人歯周炎病巣より分離した *B. intermedius* 8株について DNase 活性を検索したところ、いずれの菌株においても強い DNase 活性が認められた。この成績から DNase 産生能は本菌種の普遍的属性と考えられる。Richardら<sup>10)</sup>、嫌気性グラム陰性桿菌の DNase 活性について検討し、*Bacteroides* 中 *B. fragilis* および *B. melaninogenicus* が本活性を有することを示している。しかし、これら *Bacteroides sp.* の DNase の性状は明らかではない。

濱田らは口腔から分離した *S. sanguis* の菌体外産生 DNase について報告している<sup>16)</sup>が、多くの細菌の DNase は菌体結合性であることが示されている<sup>17)</sup>。*B. intermedius* の DNase 活性は培養上清にはわずかに認められたに過ぎず、菌体の超音波処理試料中に強く発現した。このことは多くの細菌の DNase と類似して本菌の DNase も菌体結合性と考えられる。

菌体から超音波処理によって抽出した本菌の DNase 活性は DE-32カラム (0.05 M トリス緩衝液 pH 7.2) に吸着せず、非吸着画分を Sephacryl S-300、ヒドロキシアンパタイトカラムによって精製し、超音波による抽出試料に対し382倍に精製することができた。この精製試料中 (蛋白量0.06  $\mu\text{g}$ ) の純度を7.5%polyacrylamide ディスクゲルおよび同スラブで PAGE を行ったところ、コマジーブリリアントブルー染色および高感度な蛋白検出法である銀染色を行ったが、いずれも明瞭な蛋白バンドを得ることができなかった。しかし、この泳動ゲルを DNA 寒天平板に埋没して活性を調べてみると、 $R_f=0.26$ の泳動部位にやや幅広く活性が認められた。この成績から本酵素蛋白は、電気泳動的に不均一な性状を有することを示

唆する。SDS・PAGE では2本のバンドが認められた。この2本のバンドは分子量50,000~60,000の部位に相当したが本酵素の分子量はゲル濾過法により52,000であることを考え合わせると、この SPS・PAGE 所見はサブユニットに分かれたのではなく、本試料は未だ単離精製標品でないことを示し、部分精製と考えられた。本酵素の最終的なヒドロキシアンパタイトカラムでの回収率は19%であったが、さらに調製用 isoelectric focusing, P-セルロースなどによって精製を試みたが、本酵素活性は精製が進むにつれ失活性も強く完全な酵素標品を得ることができなかった。

一般に細菌のみならず多くの DNase は2価金属イオン要求性であることが示されている<sup>17)</sup>。本菌酵素も、キレート剤である EDTA で強い阻害を受け  $\text{Fe}^{2+}$  や  $\text{Mg}^{2+}$  の添加で2.5~4倍の活性上昇を示すことから、2価金属イオン要求性であると考えられた。

本酵素は、DNA, 熱変性 DNA, RNA いずれの基質にも作用したが、DNA に対し最も強い活性を示すこと、さらに DNA, RNA に対する分解性について、PAGE ゲルの DNA, RNA 寒天平板による検討からは、両基質に対する活性は同一部位に確認されることから、両基質に対する作用は同一酵素蛋白に起因することを示唆する。これらの所見から、本菌 DNase は非特異的なヌクレアーゼと考える。

*B. intermedius* の産生する DNase の生理的意義は不明である。A群レンサ球菌の DNase は streptodornase と呼ばれ<sup>4)</sup>、staphylokinase とともに膿汁や濃厚滲出液の粘稠度を低下させ、薬剤が病巣に到達し易くする目的で製剤化され、臨床的に応用されている。*B. intermedius* は歯周疾患病巣局所に増量している菌種でもあり、本菌の DNase は感染局所の侵襲機序に関与する可能性が考えられる。

## 文 献

- 1) Takazoe, I. and Nakamura, T. (1971) Experimental mixed infection by human gingival crevice material. Bull, Tokyo dent. Coll. 12: 85-93.
- 2) Slots, J. (1981) Importance of black-pigmented bacteroides in human periodontal disease. Host-parasite interactions in Periodontal dis-

- eases, 27-45. American Society for Microbiology, Washington.
- 3) 奥田克爾 (1982) *Bacteroides gingivalis* の性状と歯周疾患誘発能. 浜田茂幸編, う蝕と歯周病—研究の進歩 第1巻, 151~183. 日本歯科評論社, 東京.
  - 4) Wannamaker, L. W. (1958) The differentiation of three distinct deoxyribonuclease of group A streptococci. *J. Exp. Med.* **107** : 797-814.
  - 5) Macfaddin, J. F. (1980) *Biochemical Test for Identification of Medical bacteria.* 2nd ed, 94-113. Williams and Wikins, Baltimore.
  - 6) Streifeld, M. M. Hotlman, M. M. Hotlman, M. M. and Janklow, H. M. (1962) Evaluation of extracellular deoxyribonuclease activity in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **84** : 77-80.
  - 7) Janice, B. S. (1968) Modification of deoxyribonuclease test medium for rapid identification of *Serratia marcescens*. *Am J. Clin. Pathol.* **57** : 711-716.
  - 8) Barbara, G. W. (1956) Deoxyribonuclease activity of microcococci from clinical sources. *J. Bacteriol.* **73** : 747-753.
  - 9) 山田俊彦, 設楽政治, 佐藤 恭, 菊地百合子, 奥田 稔 (1979) 溶血連鎖球菌の核酸分解酵素に関する臨床細菌学的研究. *感染症学雑誌*, **53** : 329-333.
  - 10) Richard, K. P. and Sandra, S. (1974) Extracellular deoxyribonuclease production by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol.* **27** : 1031-1033.
  - 11) Kurnick, N. B. (1950) The determination of deoxyribonuclease activity by methyl green; application to serum. *Arch. Biochem.* **29** : 41-42.
  - 12) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227** : 680-685.
  - 13) James, H. M. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* **117** : 307-310.
  - 14) Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121** : 404-427.
  - 15) Vesterberg, O., Wadstrom, T., Vesterberg, P., Svensson, H. and Malmgmen, B. (1967) Studies on extracellular proteins from *Staphylococcus aureus*. I. Separation and characterization of enzymes and toxins by isoelectric focusing. *Biochem. Biophys. Acta.* **133** : 435-445.
  - 16) 濱田育男, 本田寿子, 田近志保子, 柳原 敬, 金子 克 (1982) *Streptococcus sanguis* DNase の分離精製, *岩医大歯誌*, **7** : 124-130.
  - 17) 竹田美文, 藪内英子, 三輪谷俊夫 (1985) 病原細菌の生化学的検査法, 1版, 81-97. 医学書院, 東京.