

—原著—

ヒト口腔由来と腸管由来の*Enterococcus faecalis* に
おける遺伝学的検討

中 條 和 子^{1,2)}, 中 澤 太¹⁾, 星 野 悦 郎¹⁾

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
口腔健康科学講座

¹⁾ 口腔環境・感染防御学分野, ²⁾ う蝕学分野

Phylogenetic Diversity of *Enterococcus faecalis* from
Human Oral Cavities and Intestinal Tracts

Nakajo Kazuko^{1,2)}, Nakazawa Futoshi¹⁾, Hoshino Etsuro¹⁾

*Division of Oral Ecology in Health and Infection¹, Cariology²,
Department of Oral Health Science, Course for Oral Life Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

平成15年11月14日 受付 11月14日 受理

Key words : *Enterococcus faecalis*, 16S rDNA sequence similarity (16SリボゾームDNA塩基配列類似性),
Phylogenetic diversity (遺伝学的多様性), Human oral cavities and intestinal tracts (ヒト口腔由来株と
腸管由来株)

Abstract : *Enterococcus faecalis* has been isolated frequently from human intestinal tracts. Also we have reported previously that these bacterial species has been occurred as predominant alkali resistant bacteria in human infected root canals. The aim of this study is to evaluate phylogenetic diversity of 16S rRNA of the human oral *E. faecalis*.

In the present study, we used 9 strains of *E. faecalis*, ATCC 19433^T, 4 strains isolated from human infected root canals and 4 strains isolated from human feces. From cells of these bacterial strains, genomic DNAs were extracted by using InstaGene Matrix and used as templates for amplification of 16S rDNA with universal primer sets in Polymerase Chain Reactions (PCR). For cycle sequence method of 16S rDNA sequence analysis, a Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit was used with the 11 universal primer sets labeled with Cy-5, following the manufacture's protocol. Sequences of 16S rDNA were analyzed with a DNA sequencer. The segmented nucleotide sequences of 16S rDNA were connected using Seqman in LASERGENE computer program. Sequence similarity was analyzed by a clustal W method, which is programmed by Megalign in the LASERGENE computer program.

16S rDNA sequences of the *E. faecalis* reference strain (ATCC 19433^T) was highly similar (98.4~100%) to those of the feces isolates and oral isolates, respectively. On the other hands, when the 16S rDNA sequences of oral isolates were compared to those of isolates from feces, these similarities were ranged widely and low (93.1~99.1%). These results of the present study has suggested that some of human oral *E. faecalis* may adapt to oral conditions and change genetically.

抄録：*Enterococcus faecalis*はヒトの腸管細菌叢に広く生息している。我々はこれまで、本菌種が感染根管象牙質から検出されることや、強いアルカリ耐性を示すことを報告してきた。今回は、生息の場の違いによる遺伝学的変異を明らかにする目的で、感染根管及び腸管分離*E. faecalis*について、その16S rRNA geneの塩基配列を明らかにし、相

互に比較検討した。

E. faecalis の標準株ATCC 19433の他、感染根管象牙質、およびヒト糞便から得た*E. faecalis*分離株を用い、その培養菌体からInstaGene MatrixにてDNAを抽出した。そのDNAをtemplateとし、universal primersを用いてPCR法にて16S rDNAを増幅後、精製16S rDNA, Thermo Sequenase Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTPと11種類のprimerにてPCRし、ALF expressを使ってその塩基配列を明らかにした。更にsequence解析プログラムLASERGENEを用いて相互のsequence similarityを明らかにし、遺伝学的相互関係を検討した。

その結果、根管由来と腸管由来の菌株それぞれと、標準株との比較では著しく高い相同性(98.4~100%)を示したのに対し、根管由来と腸管由来の菌株間の相同性は93.1~99.1%であった。これらの結果から、根管由来と腸管由来の*E. faecalis*においては、生息の場の違いと共に菌株間にも遺伝学的差異が認められた。

諸 言

ヒトの生体には多種多様の細菌種が生息し、その生息場所に応じた独自の細菌叢を形成している。即ち、細菌はそれぞれに最も適した環境を持つ場所に生息し、その細菌叢は独特の細菌群によって構成され、それぞれに遺伝学的進化を展開していると考えられる。例えば、ヒト歯周病の原因菌の1つとされる黒色色素産生性グラム陰性桿菌*Porphyromonas gingivalis*は、その大部分が口腔領域に生息しており、非口腔領域から分離され生物学的に酷似している菌種*Porphyromonas asaccharolyticus*と遺伝学的に異なっていることが明らかにされている¹⁾。また、これまで同じ*Lactobacillus*属の細菌種として分類されていた*Lactobacillus uli*と*Lactobacillus rimae*は、16SリボソームRNA(16S rRNA) geneの塩基配列を明らかにした近年の研究によって、発生遺伝学的に*Lactobacillus*属の基準菌種とは極めて異なっていることが明らかになり、ヒト口腔内に生息する*Lactobacillus uli*は*Olsenella uli*として、また非口腔由来の*Lactobacillus rimae*は*Apotobium rimae*として、新しく再分類されている²⁻⁴⁾。同様なことは*Propionibacterium acnes*にも見られ、ヒト口腔内から分離される*P. acnes*株は、ヒトの皮膚などに生息し、ニキビなどの炎症を起こす*P. acnes*の分離株とは異なった生化学的性状を示すことが知られ、生息場所の異なる*P. acnes*は遺伝学的にも異なる可能性が示唆されている⁵⁾。

*Enterococcus faecalis*はヒトの腸管細菌叢に広く生息する通性嫌気性グラム陽性球菌である。長い間、本菌種は*Streptococcus*属の血清D群に属する*Streptococcus faecalis*として分類されていた。しかし、細菌のDNAを用いた分類方法の導入によってDNA-DNA hybridizationによるDNA相同性において*Streptococcus*属の他の菌種との間に著しい違いがあることが明らかになり、*Enterococcus faecalis*として再分類された^{6, 7)}。また表現形質においても*E. faecalis*は*Streptococcus*属細菌種とは異なり6.5% NaCl存在下で生育することも報告されている⁸⁾。

一方、*E. faecalis*はヒト歯蝕象牙質や歯内病巣部から分離されることが知られている。現在、根管治療において最も効果が期待される薬剤のひとつとして、水酸化カルシウム製剤が広く使用されてる。しかし、水酸化カルシウム製剤貼薬後の根管から、*Enterococcus*属細菌種が高頻度に分離されることが報告されている^{9, 10)}。また、高濃度アルカリ性培地を用い、根尖性歯周炎、歯周歯内病変におけるアルカリ耐性細菌を検討した結果、*E. faecalis*が高い頻度で検出され、アルカリ耐性細菌としての*E. faecalis*の重要性が指摘されている¹¹⁾。

本研究では、これらヒト口腔から分離される*E. faecalis*の由来を明らかにする目的で、ヒト口腔内から分離した*E. faecalis*と、ヒト腸管由来と考えられる糞便から分離した*E. faecalis*を用い、その16S rRNA geneの塩基配列を明らかにし、相互の遺伝学的類縁性を比較検討した。

材料および方法

1: 使用細菌株

*Enterococcus faecalis*の標準株であるATCC 19433株の他、表1で示したヒト口腔由来(感染根管から分離)の4株と、ヒト腸管由来(糞便から分離)の4株を用いた。

2: 細菌種の同定方法

- 1) 一般性状検査: 本研究で用いた分離株は、純培養を確認した後、Virginia Polytechnic Institute manual¹²⁾に準じて性状検査を行った。またPepton-yeast extract-glucose (PYG) brothに産生された最終産物をガスクロマトグラフィーを用いて分析を行い^{13, 14)}、更にグラム染色、6.5% NaCl含有培地における生育の確認を行った。
- 2) Polymerase Chain Reactions (PCR) 法: BHI血液寒天平板に培養した菌株のコロニーをエッペンドルフチューブに採取し、滅菌生理食塩水で遠心洗浄後、InstaGene Matrix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を加え、通法に従って加熱処理を加

表1 使用菌株

菌株名	由来	分離機関
NE1	根管(感染根管)	新潟大学歯学部附属病院
S3372	根管(感染根管)	Umeå大学(SWEDEN)
S3375	根管(感染根管)	Umeå大学(SWEDEN)
S3376	根管(感染根管)	Umeå大学(SWEDEN)
F1	腸管(糞便)	新潟大学医学部附属病院
F2	腸管(糞便)	新潟大学医学部附属病院
F4	腸管(糞便)	新潟大学医学部附属病院
F5	腸管(糞便)	新潟大学医学部附属病院

える事によって全ゲノムDNAを抽出した。特異的primerを用いたPCR法を行うにあたり、反応溶液は50 μ Lとし、その内訳は25 μ LのTaKaRa Premix Taq solution (Takara, Tokyo, Japan) と4 pmolの特異的primerと菌株から抽出したDNAのtemplateである。Programmable Thermal Controller PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA, USA)を用いて94 $^{\circ}$ Cで1分、54 $^{\circ}$ Cで90秒、72 $^{\circ}$ Cで90秒を35回繰り返す、DNAの増幅を行った。使用した特異的primerの構成は5'-ATC AAG ACA GTT AGT CTT TAT TAG-3'と5'-ACG ATT CAA AGC TAA CTG AAT CAG T-3'であり、941-bpを産生する*Enterococcus faecalis*のみに特異的に反応を示すprimerを用いた¹⁵⁾。DNAの増幅を行った後PCR産物を1.8%アガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロマイドによる染色を行い、UV下で観察し、*E. faecalis*に特異的なampliconの生成を確認した。

3: 16S rRNA geneの塩基配列解析方法

全ゲノムDNA及び16SrDNAのuniversal primerを用いたPCRにて16S rRNAを増幅した。その16S rRNAを精製した後、Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)とCy-5に標識された11種類のuniversal primerと共に通法に従って¹⁶⁾ PCRを行った後、DNAオートシーケンサー ALF express, (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)を用いて分析を行った。得られたデータは、LASERGENE computer program (DNA Star, Madison, WI, USA)中のSeqmanを用いて、ほぼ1500 bpの長さの16S rDNA sequenceを解析した。

4: 遺伝学的解析方法

得られたこれら分離株の16S rDNA sequenceは、LASERGENE computer programのMegalignを用いて¹⁷⁾ Clustal Wアルゴリズム及びneighbor-joining法¹⁸⁾にて、相互のsequence similarityを検討し、その遺伝学的類縁性を解析した。

結 果

1: 細菌種の同定

本研究で用いた*Enterococcus faecalis*の分離株は何れも、通性嫌気性グラム陽性球菌であり、PYG brothにおける終末代謝産物として乳酸を産生した。また、カタラーゼ反応は陰性、6.5% NaClを添加したBHI寒天培地で良好な生育を示した。

菌体のゲノムDNAをtemplateとして、*E. faecalis*特異的primerを用いてPCR反応を行った結果、何れの菌株においても、941 bpの*E. faecalis*に特異的なampliconの増幅のみを認めた。

以上の結果から、本研究で用いた分離株は何れも*E. faecalis*であることが確認された。

2: 16S rRNA geneの塩基配列

本研究において*E. faecalis* ATCC 19433標準株の16S rRNA geneの完全塩基配列を初めて明らかにした。また、その他の分離8株においても、それぞれ約1,200~1,500 bpの16S rRNA geneの塩基配列を全て解析した(表2)。その結果、何れの菌株においてもA, C, G, T各塩基の構成割合はほぼ同じであり、更にMegalignプログラムを用い、ATCC 19433標準株とこれらの分離株の16S rDNA sequence similarityを検討した結果においても、何れも98.3~100%の高い値を示し、これらが全て*E. faecalis*であることが確認された(表3)。

3: 遺伝学的類縁性

表4に、口腔由来の4株と腸管由来の4株の16S rDNA sequence similarityの結果を示した。F1株とNE1株, S3372株, S3376株間において、またF4株とS3372株間において、やや高いsimilarity値が認められた。しかし、口腔由来株と腸管由来株の間では、全体としては広範な

similarity%を示し(93.1~99.1%), その平均値は97.1%と低い値であることが明らかとなった。この結果から、ヒト口腔内に生息する*E. faecalis*と、ヒト腸管内に生息する*E. faecalis*の間には、遺伝学的な差異が認められることが示唆された。

表2 16S rRNA geneの塩基配列

株	塩基数	%A	%G	%T	%C	%G+C
ATCC 19433 ^T	1464	25.20	30.33	20.77	23.70	54.03
NE1	1316	24.92	30.17	20.90	23.71	53.88
S3372	1482	35.37	30.36	20.99	23.21	53.58
S3375	1495	25.35	30.64	20.87	23.14	53.78
S3376	1403	25.37	30.48	20.74	23.38	53.81
F1	1461	25.12	30.18	20.74	23.27	53.46
F2	1517	25.18	30.45	21.09	23.27	53.72
F4	1455	25.22	30.52	20.96	23.30	53.81
F5	1232	25.24	30.36	20.70	23.54	53.90

表3 *Enterococcus faecalis*の標準株との類似性 (%)

株	相同性 (To ATCC 19433 ^T)
NE1	100
S3372	100
S3375	98.8
S3376	100
F1	100
F2	98.4
F4	98.4
F5	100

表4 *Enterococcus faecalis*の標準株との類似性 (%)

腸管由来株	口腔由来株			
	NE1	S3372	S3375	S3376
F1	98.5	99.1	95.6	99.1
F2	97.6	97.4	93.1	97.3
F4	97.3	98.5	94.4	97.9
F5	97.5	97.1	95.4	97.9

平均値と標準偏差: 97.1±1.6

考 察

たんぱく質の合成は全ての細胞に必要であり、その合成装置であるリボソームの核酸要素、即ちrRNAは全ての細菌に共通に存在し、構造上も機能上も大きな変化がない分子である。そのため、16S rRNA geneの塩基配列の比較は、広範な細菌種の系統の構造および系統発生関係の進化を分析するために最も優れた方法であることが認められている^{19, 20)}。1987年C. R. Woeseによって、この16S rRNA geneの塩基配列を比較する手法が、細菌の分類方法に初めて導入されて以来²¹⁾、現在では約9割の細菌種の16S rRNA geneの塩基配列が解明されGenBankに蓄積されてきたことによって、その塩基配列の異なる新しい細菌属種が多数報告されている²²⁻²⁹⁾。同時に、従来の細菌の分類も、その塩基配列の類縁性によって大きく見直され、再分類が進められている³⁰⁾。

これまで研究で、*Enterococcus faecalis* 標準株ATCC 19433^Tでは、その16S rRNA geneの塩基配列の約400 bpの部分配列が明らかにされていたが、本研究では1464 bpの完全塩基配列を決定した。また口腔由来と腸管由来のそれぞれ4株の分離株（合計8株）についても、その完全塩基配列を明らかにした。そして、それらの塩基配列は、CLUSTAL W及びneighbor-joining法による比較を行い、相互の遺伝学的類縁性を解析した。

その結果、分離株は何れも、ATCC 19433標準株に対して高いsequence similarityを示した。しかし、口腔由来株と腸管由来株の間では、そのsequence similarityは広範な値を示し（93.1~99.1 %）、その平均値は97.1 %とやや低い値であった。この結果から、本研究で用いた分離株は全て*E. faecalis*と同定されるものの、口腔由来と腸管由来の*E. faecalis*には僅かながら遺伝学的差異が認められた。

現在の細菌分類において、同一細菌種と判定するための明確な16S rDNA sequence similarity %の基準値は必ずしも定められてはいない。しかし、Munson等は、そのための最小cut-off値を98 %とすることを提案し、その有用性を報告している³¹⁾。本研究で、ヒト口腔由来株と腸管由来株の16S rDNA sequence similarityを比較した場合、16例中12例において、その値が98 %以下であった。これらの低い値が、直ちに異なる細菌種の可能性を示唆するものではないが、少なくともこれらの分離株において、ヒトの口腔内で生息する*E. faecalis*と腸管内に生息する*E. faecalis*とでは、系統発生的に異なった方向への進化が進んでいる可能性が示された。即ち、腸管を起源とする*E. faecalis*が口腔内に移り、その環境に適応し生息を続けることによって、次第に腸管の*E. faecalis*とは違う遺伝的形質を獲得しつつあると考えら

れる。

本研究では、検討した分離株の数は必ずしも充分ではないが、*E. faecalis*の口腔由来株と腸管由来株の16S rRNA sequenceに僅かながら遺伝学的差異が認められた。一方、細菌の16S rRNA geneは、細菌の種々の遺伝子の中で最も変異の少ない安定した分子として知られている。このことから、口腔由来株と腸管由来株の間には、16S rRNA gene以外の遺伝子において、更に著しい変異が起こっていることも考えられる。即ち、系統発生的に安定した16S rRNA geneでは僅かな変異であるが、変異を起こしやすい種々の遺伝子において、口腔及び腸管それぞれの場所に適応するための塩基配列の変異が進んでいる可能性もある。本研究の結果を受けて今後、16S rRNA以外のDNAの類似性、或いは表現型の変化など、口腔環境への適応との関連を検討する必要があると考えられる。

結 論

*Enterococcus faecalis*において、ヒト口腔由来の分離株と腸管由来の分離株の16S rRNA sequenceを明らかにし、相互のsequence similarityを検討した。その結果、口腔由来株と腸管由来株の間には僅かながら発生遺伝学的差異が認められた。

文 献

- 1) Shah, H. N., Collins, M. D. : Proposal for Reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a New Genus, *Porphyromonas*. Int. J. Syst. Bacteriol., 38 : 128-131, 1988.
- 2) Harmsen, H. J. M., Wildeboer-Veloo, A. C. M., et al : Development of 16S rRNA-Based Probes for the *Coriobacterium* Group and the *Atopobium* Cluster and Their Application for Enumeration of *Coriobacteriaceae* in Human Feces from Volunteers of Different Age Groups. Appl. Environ. Microbiol., 66 : 4523-4527, 2000.
- 3) Dewhirst, F. E., Paster, B. J., et al : Characterization of novel human oral isolates and cloned 16S rDNA sequences that fall in the family *Coriobacteriaceae* : description of *Olsenella* gen. Nov., reclassification of *Lactobacillus uli* as *Olsenella uli* comb. Nov. and description of *Olsenella prousa* sp. Nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51 : 1797-1804, 2001.
- 4) Collins, M. D., Wallbanks, S. : Comparative

- sequence analyses of the 16S rRNA genes of *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rimae* and *Streptococcus parvulus*: proposal for the creation of a new genus *Atopobium*. FEMS. Microbiol. Lett., 74 : 235-240, 1992.
- 5) Hoshino, E., Horigome, T., et al : Characteristics of Propionibacterium and Arachnia isolated from carious dentine. 歯科基礎医学会雑誌, 26 : 276-279, 1984.
 - 6) Schleifer, K. H., Kilpper-Balzals, R. : Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus Enterococcus nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 34 : 31-34, 1984.
 - 7) Collins, M. D., Jones, D., et al : *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 34 : 220-223, 1984.
 - 8) Holt, J. G., Krieg, N. R., et al : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed., p. 528, Williams & Wilkins., Baltimore, USA, 1994.
 - 9) Siqueira, J. F., Uzeda, M. : Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. J. Endod., 22 : 674-67, 1996.
 - 10) Stevens, R. H., Grossman, L. I. : Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. J. Endod., 9 : 372-374, 1983.
 - 11) 中條和子, 中澤太他 : 感染根管象牙質病巣のアルカリ耐性細菌の分類と同定. 歯科基礎医学会雑誌, 44 : 159, 2002.
 - 12) Holdeman, L. V., Cato, E. P., et al : Anaerobe Laboratory Manual, 4 th ed. Verginia Polytechnic Institute and State University, Blacksbyrg, 1977.
 - 13) Hoshino, E. : Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. J. Dent. Res., 64 : 1195-1198, 1985.
 - 14) Hoshino, E., Sato, M. : Production and degradation of formate by *Veillonella dispar* ATCC 17745. J. Dent. Res., 65 : 903-905, 1986.
 - 15) Kariyama, R., Mitsuhashi, R., et al : Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J. Clin. Microbiol., 38 : 3092-3095
 - 16) Hashimura, T., Nakazawa, F., et al : Phylogenetic analysis of 16S rDNA of *Eubacterium exiguum* and the species-specific region for primer designation. Japan. J. Oral. Biol., 42 : 555-562, 2002.
 - 17) Hashimura, T., Sato, M., et al : Detection of *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* and *Eubacterium saphenum* from pulpal and periradicular samples using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Int. Endodont. J., 34 : 463-470, 2001.
 - 18) Saitou, N., Mei, M., : The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic tree. Mol. Biol. Evol., 4 : 406-425, 1987.
 - 19) Park, Y. H., Hori, H., et al : Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from *Rhodococcus erythropolis*. Nucleic. Acid. Res., 15 : 365, 1986.
 - 20) Park, Y. H., Hori, H., et al : Phylogenetic analysis of the coryneform bacteria by 5S rRNA sequences. J. Bacteriol., 169 : 1801-1806, 1987.
 - 21) Woese, C. R., : Bacterial evolution, Microbiol Rev., 221-271, 1987.
 - 22) Uematsu, H., Nakazawa, F., et al : *Eubacterium saphenum* sp.nov., Isolated from Human Periodontal Pockets. Int. J. Syst. Bacteriol., 43 : 302-304, 1993.
 - 23) Poco, S. E., Nakazawa, F., et al : *Eubacterium minutum* sp.nov., Isolated from Human Periodontal Pockets. Int. J. Syst. Bacteriol., 46 : 31-34, 1996.
 - 24) Poco, S. E., Nakazawa, F., et al : *Eubacterium exiguum* sp.nov., isolated from human oral lesions. Int. J. Syst. Bacteriol., 46 : 1120-1124, 1996.
 - 25) Umemoto, T., Nakazawa, F., et al : *Treponema medium* sp. nov., isolated from Human subgingival Dental plaque. Int. J. Syst. Bacteriol., 47 : 67-72, 1997.
 - 26) Nakazawa, F., Umemoto, T., et al : Genetic characterization of an oral treponemae isolated from human subgingival plaque. Oral. Microbiol. Immunol., 12 : 189-192, 1997.
 - 27) Nakazawa, F., Poco, S. E., et al : *Cryptobacterium curtum* gen. nov., sp. nov., a New Genus of Gram-positive Anaerobic Rod Isolated from Human Oral Cavities. Int. J. Syst. Bacteriol., 49 : 1193-1200, 1999.

- 28) Nakazawa, F., Poco, S. E., et al : Taxonomic characterization of *Mogibacterium diversum* sp. nov. and *Mogibacterium neglectum* sp. nov., isolated from human oral cavities. Int. J. Syst. Evolut. Microbiol., 51 : 115-122, 2002.
- 29) Nakazawa, F., Hoshino, E., et al : Amended biochemical characteristics and phylogenetic position of *Treponema medium*. Oral. Microbiol. Immunol., 18 : 127-130, 2003.
- 30) Nakazawa, F., Poco, S. E., et al : Description of *Mogibacterium pumilum* gen. nov., sp. nov. and *Mogibacterium vescum* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Eubacterium timidum* (Holdeman et al. 1980) as *Mogibacterium timidum* gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evolut. Microbiol., 50 : 679-688, 2000.
- 31) Munson, M. A., Pitt-Ford, T., et al : Molecular and culture analysis of the microflora associated with endodontic infections. J. Dent. Res., 81 : 761-766, 2002.