原 著

Mycoplasma の口腔粘膜細胞への付着性について*

Studies on Adherence of Mycoplasmas to Oral Epithelial Cells*

中 永 大 喜** 高 木 興 氏** 渡 邊 継 男***

Motoki NAKANAGA**, Okiuji TAKAGI** and Tsuguo WATANABE***

Received April 15, 1989; accepted June 29, 1989

Abstract: In order to demonstrate that oral mycoplasmas adhere to oral epithelial cells, attempts were made to isolate mycoplasmas from the cells. The cells from 121 subjects (60 males and 61 females, ranging in age from 0 to 81 years) were sampled from buccal mucosa and gingiva with sterile swabs; suspended in liquid medium for the growth of mycoplasmas; washed 3 times without changing a centrifuge tube for each washing in 3 ml of the liquid medium (Experiment I) or with changing in 5 ml of the medium (Experiment II); suspended in the medium; and incubated at 37°C. The cells were sedimented by centrifugation at 90×g for 5 min. In Experiment I, mycoplasmas were isolated from buccal cells of 15 (71%) of 21 subjects and from gingival cells of 14 (67%); and from buccal cells of 34 (42%) of 81 subjects in Experiment II. Of 268 strains isolated from buccal cells, 217 (81%) and 51 (19%) were identified with *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma orale*, respectively; and 143 (76%) of 188 strains from gingival cells and 45 (24%) with the former and the latter. Thus, oral mycoplasmas were demonstrated to adhere to oral epithelial cells.

Therefore, experiments were carried out to know whether or not *M. salivarium* adheres to buccal cells *in vitro*. An enzyme-linked immunosorbent assay was applied to detect the organisms quantitatively. The organism was shown to have adhered *in situ* to the buccal cells of 17 (89%) of 19 subjects, when the cells were sampled, and to adhere to these cells slightly or not to adhere entirely, when they were incubated with the organism. On the other hand, the organism was not detected from the cells of 2 subjects, and was shown to adhere to these cells.

索引用語: 口腔マイコプラズマ, 付着性, 口腔上皮細胞

Key words: Oral mycoplasmas, Adherence, Oral epithelial cells

* 本研究の要旨の一部は昭和63年5月の第15回日本マイコプラズマ学会において発表した。

** 長崎大学歯学部予防歯科学講座 (主任: 高木興氏教授)

** Department of Preventive Dentistry (Director: Prof. Okiuji TAKAGI)

*** 北海道大学歯学部口腔細菌学講座 (主任: 渡邊継男教授)

*** Department of Oral Microbiology, Hokkaido University School of Dentistry (Director: Prof. Tsuguo WATANABE)

緒 言

mycoplasma は細胞壁を持たず、細胞膜のみに包まれた自己増殖可能な最小の微生物で、自然界に広く分布している。1951年に Morton ら¹⁾が人間の口腔より初めて mycoplasma を分離培養することに成功して以来、多くの研究者が分離培養することに成功し²⁻¹⁴⁾、mycoplasma は口腔内に常在していることがわかった。

口腔内に常在する mycoplasma は主に *M. salivarium* と *M. orale* の二種類であり^{9,14)}、極く稀に *M. hominis*^{9,10)}、*Ureaplasma*¹¹⁾ が検出される。

M. salivarium は歯垢²⁾と歯肉溝³⁻⁵⁾が主な生息部位で唾液⁶⁻⁸⁾からも検出される。歯周炎患者では口腔からの検出頻度⁹⁾ならびに生菌数^{9,10)}が増加し、*M. salivarium* に対する抗体が健常者より高率に検出される⁹⁾。また、この mycoplasma は磷脂質分解作用¹⁵⁾、磷酸エステル分解作用¹⁶⁾、蛋白質分解作用¹⁷⁾、溶血作用¹⁸⁾、アンモニア産生¹⁹⁾などの組織障害性の活性を示すことから、歯周疾患となんらかの病因的なかわりをもっているものと考えられている。*M. orale* は咽頭が主な生息部位で唾液からも検出されるが、歯垢、歯肉溝などからはほとんど検出されない²⁻⁴⁾。生体組織への付着性²⁰⁾は、微生物の病原性を規定する重要な因子の一つと考えられる。

本研究では口腔に常在する *M. salivarium* と *M. orale* の口腔粘膜細胞への付着性を明らかにするために、良く洗浄した粘膜細胞からの mycoplasma の検出率、検出される mycoplasma の種類などについて検索し、さらに、*M. salivarium* の付着性を ELISA 法によっても検討した。

材料ならびに実験方法

1. 培地

Difco PPLO broth (70%, v/v), horse serum (20%, v/v), 25% yeast extract (10%, v/v), penicillin G (1,000U/ml), thallium acetate (0.05%, w/v), arginine-HCl (1.0%, w/v) および phenol red (0.002%, w/v) から成り、pH を7.0に調整した液体培地と、この培地から arginine-HCl と phenol red を除き、pH を7.8として、Oxoid agar No. 1 (1.0%, w/v) を加えた寒天培地を使用した²¹⁾。

2. 被検者

長崎大学歯学部附属病院予防歯科外来を1987年9月から1989年3月までの間に訪れた0歳から81歳までの患者

121名(男性, 60名; 女性, 61名)を被検者とした。

3. 粘膜細胞の採取

診療前に口腔粘膜を滅菌綿棒で擦過して、21名からは頬粘膜ならびに歯肉粘膜の両方から、残りの100名からは頬粘膜のみから剝離細胞を得た。綿棒を直ちに液体培地に浸し、vortex で強く振盪させて細胞浮遊液を得た。

4. mycoplasma の粘膜細胞に対する付着性の検討

1) 分離培養法

粘膜細胞を液体培地で4°C, 90×g (トミー社製遠心機, CD-100; ローター, TS-7) の5分間の遠心で3回洗浄した後に、液体培地に浮遊させ、37°C で incubate した。pH が1単位上昇した培養液を液体培地で10倍連続希釈し、10⁻⁴から10⁻⁷に希釈された培養液を0.05ml ずつ寒天平板に接種し、この寒天平板を37°C で7日間嫌気的条件下(80% N₂, 12% CO₂, 8% H₂)で incubate した。平板に形成された colony を実体顕微鏡下(×80)で寒天ブロックとして切り取り、液体培地に投入・接種し、分離培養を行った。得られた菌株は常法に従って *M. salivarium* ATCC 23064ならびに *M. orale* ATCC 15539に対するウサギ抗血清 (MI 価≥10,240) を用いて、metabolism inhibition (MI) test²²⁾ で同定した。

2) ELISA 法

phenol red と thallium acetate を除いた液体培地で、*M. salivarium* ATCC 23064を増菌(約10⁹CFU/ml)した。この培養液0.9ml と頬粘膜細胞浮遊液0.1ml とをマイクロチューブに入れ(A), 20°C で2時間振盪しながら反応させた。これを4°C, 90×g (日立社製遠心機 RMC-150; ローター, RT15A)で5分間遠心し、沈渣を1ml の液体培地で3回洗浄し、細胞数を血球計算盤で測定した後に、0.05M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) 1ml に溶解させた。細胞溶解液50μl を EIA microtitration plate (Flow 社)の well に入れ、37°C で4時間 incubate して、付着させた。plate を washing solution (0.05% (w/v) Tween 20を含む0.9% (w/v) NaCl) 200μl で4回洗浄した後に、PBS-TA (0.05% (v/v) Tween 20と0.002% (w/v) NaN₃を含む phosphate-buffered saline, pH 7.3)で100倍に希釈した抗 *M. salivarium* ウサギ血清200μl を、各 well に入れ、37°C で2時間作用させた。washing solution で洗浄後、alkaline phosphatase 標識抗ウサギ IgG (Sigma 社; PBS-TA で1:1,000に希釈, 200μl/well), p-nitrophenyl phosphate (Sigma 社; 1mM MgCl₂・6H₂Oを含む0.05M carbonate buffer (pH 9.8)に1mg/ml となるように溶解; 200μl/well)を順次反応させ、最

Table 1 Adherence of mycoplasmas to oral mucosa in Experiment I

	Days required to cause a color change			
	Supernatants of cell suspensions at the indicated washing frequency			Suspensions of washed cells
	1	2	3	
M.±S.D.*	12.1 ± 5.6	9.5 ± 3.0	8.8 ± 3.1	7.5 ± 2.4
Range	3 - 19	3 - 15	4 - 13	4 - 14
No.	11(52%)**	13(62%)**	9(43%)**	15(71%)*
M.±S.D.***	8.7 ± 4.1	11.5 ± 4.0	9.6 ± 4.2	7.8 ± 3.4
Range	3 - 15	3 - 18	3 - 16	4 - 15
No.	7(33%)**	14(67%)**	8(38%)**	12(57%)**

* Buccal mucosa.

*** Gingiva.

** (No. of color change-positive/tested) × 100

Table 2 Incidence of mycoplasmas in oral mucosa in Experiment I

Age (year)	No. of subjects positive/tested	
	Buccal mucosa	Gingiva
6-12	13/16 (81%)	13/16 (81%)
13-15	2/5 (40%)	1/5 (20%)
Total	15/21 (71%)	14/21 (67%)

Table 3 Identification of isolates in Experiment I

	No. of isolates identified with	
	<i>M. salivarium</i>	<i>M. orale</i>
Buccal mucosa	217(81%)	51(19%)
Gingiva	143(76%)	46(24%)

後に 1 N NaOH (50 μ l/well) で反応を停止させて、Titertek Multiscan MCC で 405nm での吸収 ($A \cdot A_{405}$) を測定した。対照として、細胞浮遊液 0.1ml と液体培地 0.9ml (B)、液体培地 0.1ml と *M. salivarium* の培養液 0.9ml (C)、液体培地 1 ml (D) をそれぞれ同様に処理し、 A_{405} を測定した。そして、 $(A \cdot A_{405} - C \cdot A_{405}) - (B \cdot A_{405} - D \cdot A_{405})$ を細胞に付着した *M. salivarium* 菌量とした。この数値を菌体タンパク量に換算するために、Lowry ら²⁴⁾の方法でタンパク量をあらかじめ測定しておいた *M. salivarium* 菌体浮遊液を同様に処理して、calibration curve を作成した。

成 績

1. 分離培養

1) 実験 I

採取した粘膜細胞をスピッツ (10ml) に分注しておいた液体培地 3 ml に浮遊させ、90×g で 5 分間遠心した。得られた細胞を同じ条件で更に 2 回洗浄した後に、3 ml の液体培地に浮遊させた。この細胞浮遊液と滅菌バイアルに移した各回の洗浄上清とを 37°C で incubate した。

頬粘膜細胞において培養液の色の変化 (mycoplasma の発育と共に培地の色が黄色から赤色に変化する) に要する時間は細胞浮遊液で最も短く、洗浄上清では洗浄回数が増すのに伴い短くなる傾向が認められ、これらの間には有意な相関関係があった ($r = -0.428$, $p < 0.01$)。歯肉粘膜細胞においても、洗浄 1 回目の上清を除いて、頬粘膜細胞の時と同じ傾向が認められた ($r = -0.399$, $p < 0.05$)。洗浄 1 回目の上清で、色の変化に要する時間が短かったのは、細胞を採取する際に、唾液の混入が多かったためと考えられる (Table 1)。

頬粘膜では被検者 21 名 (男性, 10 名; 女性, 11 名) 中 15 名 (71%)、そして歯肉粘膜では 14 名 (67%) の頻度で mycoplasma が分離された (Table 2)。同定を試みた 456 株中 360 株が *M. salivarium* そして、96 株が *M. orale* と同定された。分離株中 *M. salivarium* が占める比率は歯肉よりも頬粘膜で高かった (Table 3)。

2) 実験 II

粘膜細胞からの mycoplasma の分離頻度が予想外に高かったため、被検者の年齢層を広げると共に、さらに厳密に洗浄した細胞からの mycoplasma の分離培養を試みた。すなわち、実験 I では 1 つの試料を 1 本のスピッツを用いて 3 ml の液体培地で 3 回洗浄していたのに

Table 4 Incidence of mycoplasmas in buccal mucosa in Experiment II

Age (year)	No. of subjects
	positive/tested
0-2	0/10 (0%)
3-5	7/19 (37%)
6-12	16/31 (52%)
13-15	5/8 (64%)
16-81	6/13 (46%)
Total	34/81 (42%)

対して、実験Ⅱでは洗浄毎に細胞を新しいスピッツに移し、5 ml の medium で3回洗浄することにした。また、実験Ⅰでは歯肉と頬粘膜からの mycoplasma の検出率と検出される mycoplasma の種類にあまり差が見られなかったので、実験Ⅱでは頬粘膜のみから細胞を採取することにした。

上に述べた方法で頬粘膜細胞を集め、洗浄し、mycoplasma の分離培養を試みたところ、被検者81名（男性、41名；女性、40名）中34名（42%）から mycoplasma が

Fig. 1 Relation between the number of buccal cells and the amount of *M. salivarium* cells detected from the buccal cells which were not incubated with *M. salivarium* cultures

分離された (Table 4)。実験Ⅰ (Table 2) と同じ年齢層における検出率はやや低かった (39名中21名, 54%) けれども、かなり多くの人の口腔粘膜細胞に mycoplasma は付着していることが確認された。また、0歳から2歳の被検者群では mycoplasma が検出されなかった。

Table 5 Adherence of *M. salivarium* to buccal epithelial cells

Subject No.	Sex	Age (yr.)	No. of cells	Amounts (μg proteins) of <i>M. salivarium</i> detected from the cells incubated with	
				uninoculated medium	<i>M. salivarium</i> culture
1	Female	2	3×10^4	0.164	0.185
2	Female	2	4×10^4	0.259	0.270
3	Male	2	3×10^4	0.360	0.267
4	Female	1	15×10^4	0.264	0.208
5	Female	1	13×10^4	0.209	0.201
6	Male	2	10×10^4	0.208	0.247
7	Female	1	7×10^4	0.204	0.193
8	Female	1	5×10^4	0.066	0.094
9	Male	2	15×10^4	0.000	0.070
10	Male	2	5×10^4	0.342	0.387
11	Male	2	6×10^4	0.371	0.335
12	Female	2	10×10^4	0.284	0.307
13	Male	1	6×10^4	0.313	0.372
14	Male	2	2×10^4	0.000	0.393
15	Female	1	3×10^4	0.240	0.294
16	Female	2	7×10^4	0.203	0.175
17	Female	2	2×10^4	0.191	0.139
18	Male	2	6×10^4	0.201	0.206
19	Male	2	3×10^4	0.206	0.219

2. *in vitro* での付着性

以上の成績から、mycoplasma が口腔粘膜細胞に付着していることが分かったので、次に、口腔粘膜細胞への mycoplasma の付着性を *in vitro* で調べることにし、mycoplasma の検出には ELISA 法を用いた。

実験Ⅱで、0歳から2歳の被検者からは mycoplasma が検出されなかったので、1歳から2歳の新たな被検者19名（男性、9名；女性、10名）の頬粘膜細胞から mycoplasma の検出を試み、同時にその細胞に対する *M. salivarium* の付着性を調べた。その結果、17名（89%）から *M. salivarium* が検出された。なお、付着菌量と細胞数との間には有意な相関性は認められなかった（Fig. 1）。このことは、細胞1個あたりのあらかじめ付着していた付着菌量はサンプルによって一定でなかったことを示している。これらの人から得られた粘膜細胞には実験系に加えた *M. salivarium* の付着はほとんど認められないか、認められても、非常に微量であった（Table 5）。残りの2名では、細胞から *M. salivarium* が検出されず、実験系に加えた *M. salivarium* が細胞に付着した（Table 5）。

考 察

M. salivarium が *in vitro* において HeLa 細胞ならびにトリ胎児細胞に²⁸⁾、そして *M. orale* がトリ赤血球に付着する²⁷⁾ことが報告されている。しかしながら、これらの mycoplasma が人の口腔粘膜に付着するかどうかは調べられていない。

M. salivarium は歯周炎患者において口腔から高率に検出され⁹⁾、生菌数が増加していることが報告されている。また、この微生物はその主たる生息部位である歯肉溝の内縁上皮に付着して、障害作用を及ぼしていることが推測される。今回は、容易に採取できる歯肉及び頬粘膜からの剝離細胞を使用し、口腔粘膜細胞への mycoplasma の付着性を培養法ならびに ELISA 法で検討した。

歯肉溝由来と考えられる *M. salivarium* が唾液から高率に検出され⁶⁻⁸⁾、正常者の唾液にも mycoplasma が相当数（median 1.4×10^4 CFU/ml）含まれている⁹⁾。このために、口腔粘膜細胞に付着した mycoplasma を検出するためには、あらかじめ、細胞を良く洗浄して、細胞に付着していない mycoplasma を除去する必要がある。そこで、まず最初に、洗浄の条件を設定するため実験を行った。その結果、90×g で5分間の遠心で粘膜細胞浮遊液から遊離の mycoplasma を除けることが

わかった。この遠心力は *M. pneumoniae* の赤血球への付着を調べた Chandler ら²⁵⁾の実験で採用された 400×g、1分間と較べてかなり弱く、本実験では遊離の mycoplasma を沈澱させることなくより確実に除去できたものと思われる。このことは、データは示されていないけれども、付着実験の対照とした液体培地と *M. salivarium* 培養液との混液ならびに液体培地からの沈澱がほぼ同じ ELISA 値を示したことによっても支持された。

実験Ⅰで、mycoplasma が予想外に高率に口腔粘膜細胞から検出された（Table 2）。そこで、遊離の mycoplasma の混入の可能性が考えられたので、更に、厳しい条件で洗浄した頬粘膜細胞から mycoplasma の分離培養を試みた。この実験Ⅱでの検出率（Table 4）は実験Ⅰのそれ（Table 2）と較べてかなり低く、42%であった。ただし、これら2つの実験では異なった被験者群を対象としたので、検出率の低下が直ちに洗浄の効果を反映しているとは限らない。検出率42%というのはこれまでに報告されている唾液からの検出率（46%、Morton ら¹⁾；44%、Watanabe⁶⁾）と近い値であり、唾液中に mycoplasma が存在すれば、mycoplasma はほぼ確実に口腔粘膜に付着しているものと考えられる。

検出される mycoplasma の種類については、本研究では実験Ⅰにおいて *M. salivarium* と *M. orale* についてのみ検討した。総分離株中に占める *M. salivarium* と *M. orale* の比率は頬粘膜細胞で約4：1、そして歯肉粘膜細胞で約3：1であった。これより、口腔から採取した唾液から検出される *M. salivarium* と *M. orale* の比率は臨床的に見て、歯肉炎、歯周炎の認められないほぼ正常と思われる者では1：1、歯肉炎のある者では2：1、歯周炎のある者では4：1であるという所見¹⁰⁾と実験Ⅰの被検者集団の平均 PM-index が0.52と殆ど歯肉炎が認められず歯肉の状態が良好であることを較べることによって、*M. salivarium* は *M. orale* と較べて粘膜細胞に付着しやすい性質を持っているものと考えられる。

例数は少ないけれども、0歳から2歳までの年齢層の被検者の頬粘膜からは mycoplasma が培養法では検出されなかった（Table 4）ので、同じ年齢層の被検者の頬粘膜から細胞を採取し、その細胞に対する *M. salivarium* の付着性を ELISA 法で調べた。その結果、量的なばらつきはあったけれども、19名中17名の細胞から *M. salivarium* が検出され、これらの細胞には付着実験系に入れた *M. salivarium* はほとんど付着しないか、

付着したとしても非常に微量であることが示された (Table 5)。これに対して、残り2名の細胞からは *M. salivarium* が検出されず、これらの細胞には実験系に加えた *M. salivarium* が付着し、付着菌量は他の被検者の細胞に採取した時から付着していたと思われる菌量とあまり違わなかった (Table 5)。これらの事実から粘膜細胞表層には *M. salivarium* に対する receptor があって、その数はある範囲に限定されているように思われる。なお、経験的に、*M. salivarium* の培養液 (約 10^9 CFU/ml) 100ml から得られる菌量はタンパク量にして約10mgである。従って、 $0.1\mu\text{g}$ あたりの生菌数は約 10^6 CFU となり、おおまかに言って、細胞1個あたり約10個前後の菌体は付着し得るものと推測される。歯牙未萌出、萌出開始期の乳児の口腔からの mycoplasma の検出頻度はそれぞれ8%、13%と低く、乳歯列の完成するころには44%と高くなることが報告されている¹³⁾。ELISA法で被検者は、年齢が1歳から2歳の範囲にあり、第2乳臼歯を除き、ほとんどの乳歯が萌出していた。従って、44%以上の検出率が予想されたけれども、89% (19名中17名) という高い値は予想外であった。

結 論

培養法ならびに ELISA 法によって、良く洗浄した頬及び歯肉粘膜細胞に *M. salivarium* ならびに *M. orale* が付着していることが明らかにされた。分離株中 *M. salivarium* と *M. orale* が占める比率はそれぞれ3:1 (歯肉)あるいは4:1 (頬)であった。*in vitro*の実験系で *M. salivarium* が頬粘膜細胞に付着することが示された。

本研究の一部は、文部省科学研究費、奨励研究A (昭和63年度課題番号63771837) の補助を受けた。

文 献

- 1) Morton, H. E., Smith, P. F., Williams, N. B. and Eickenberg, C. F.: Isolation of pleuropneumonia-like organisms from human saliva: a newly detected member of the oral flora, *J. Dent. Res.*, **30**; 415, 1951.
- 2) Uchida, A.: Isolation and enumeration of mycoplasmas in dental plaques, *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, **28**; 117, 1981.
- 3) Kumagai, K., Iwabuchi, T., Hinuma, Y., Yuri, K. and Ishida, N.: Incidence, species, and significance of *Mycoplasma* species in the mouth, *J. Inf. Dis.*, **123**; 16, 1971.
- 4) Engel, L. D. and Kenny, G. E.: *Mycoplasma salivarium* in human gingival sulci, *J. Periodont. Res.*, **5**; 163, 1970.
- 5) Razin, S., Michmann, J. and Shimshoni, Z.: The occurrence of mycoplasma (pleuropneumonia-like organisms, PPLO) in the oral cavity of dentulous and edentulous subjects, *J. Dent. Res.*, **43**; 402, 1964.
- 6) 竹内太刀夫: 口腔内 pleuropneumonia-like organisms (PPLO) の分離について, *歯科学報*, **62**; 305, 1962.
- 7) Morton, H. E., Smith, P. F. and Keller, R.: Prevalence of pleuropneumonia-like organisms and the evaluation of media and methods for their isolation from clinical material, *Am. J. Pub. Health.*, **42**; 913, 1952.
- 8) Watanabe, T.: Biological and serological studies on oral mycoplasma, *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, **14**; 447, 1967.
- 9) Watanabe, T., Matsuura, M. and Seto, K.: Enumeration, isolation, and species identification of mycoplasmas in saliva sampled from the normal and pathological human oral cavity and antibody response to an oral mycoplasma (*Mycoplasma salivarium*), *J. Clin. Microbiol.*, **23**; 1034, 1986.
- 10) Watanabe, T., Mishima, K., Fujita, O., Horikawa, T., Noguchi, T., Ishizu, T. and Kinoshita, S.: Possible role of mycoplasmas in periodontal disease, *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, **19**; 93, 1972.
- 11) Watanabe, T., Matsuura, M. and Seto, K.: Isolation and serological typing of ureaplasma in human saliva, *Archs. Oral. Biol.*, **28**; 545, 1983.
- 12) Shklair, I. L., Mazzarella, M. A., Gutekunst, R. R. and Kiggins, E. M.: Isolation and incidence of pleuropneumonia-like organisms from the human oral cavity, *J. Bacteriol.*, **83**; 785, 1962.
- 13) 小佐野悦雄, 小林やす子, 武井 盈, 今村基遵, 森田正人, 村田晴彦: 乳幼児口腔からの *Mycoplasma* の分離成績, *日本マイコプラズマ学会記録*, **4**; 24, 1977.
- 14) Taylor-Robinson, D., Canchola, J., Fox, H. and Chanock, R. M.: A newly identified oral mycoplasma (*M. orale*) and its relationship to other human mycoplasmas, *Am. J. Hyg.*, **80**; 135, 1964.
- 15) Ichimaru, H. and Nakamura, M.: The components of *Mycoplasma salivarium* and its growth medium that are responsible for film formation, *J. Gen. Microbiol.*, **112**; 389, 1979.
- 16) Shibata, K., Totuka, M. and Watanabe, T.: Phosphatase activity as a criterion for diffe-

- rentiation of oral mycoplasmas, J. Clin. Microbiol., **23** ; 970, 1986.
- 17) Watanabe, T.: Proteolytic activity of *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma orale* 1, Med. Microbiol. Immunol., **161** ; 127, 1975.
 - 18) Sobeslavsky, O. and Chanock, R. M.: Peroxide formation by mycoplasmas which infect man, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **129** ; 531, 1966.
 - 19) Schimke, R. T. and Barile, M. F.: Arginine metabolism in pleuropneumonia-like organisms isolated from mammalian cell culture, J. Bacteriol., **86** ; 195, 1963.
 - 20) Manchee, R. J. and Taylor-Robinson, D.: Studies on the nature of receptors involved in attachment of tissue culture cells to mycoplasmas, Brit. J. Exp. Pathol., **50** ; 66, 1969.
 - 21) Chanock, R. M., Hayflick, L. and Barile, M. F.: Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a pleuropneumonia-like organism, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **48** ; 41, 1962.
 - 22) Purcell, R. H., Taylor-Robinson, D. Wong, D. and Chanock, R. M.: A color test for the measurement of antibody to the non-acid-forming *Mycoplasma* species, Am. J. Epidemiol., **84** ; 51, 1966.
 - 23) Busolo, F., Tonin, E. and Convetti, L.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* antibodies, J. Clin. Microbiol., **12** ; 69, 1980.
 - 24) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., **193** ; 265, 1951.
 - 25) Chandler, D. K. F., Collier, A. M. and Barile, M. F.: Attachment of *Mycoplasma pneumoniae* to hamster tracheal organ cultures, tracheal outgrowth monolayers, human erythrocytes, and WiDr human tissue culture cells, Infect. and Immun., **35** ; 937, 1982.
 - 26) Freundt, E. A. and Razin, N.: Bergey's manual of systematic bacteriology 1, Williams & Wilkins., Baltimore, 1984, p. 768.
 - 27) Freundt, E. A. and Razin, N.: Bergey's manual of systematic bacteriology 1, Williams & Wilkins., Baltimore, 1984, p. 766.