

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2016 年度 博士論文

*Porphyromonas salivosa* ATCC 49407 株の

線毛精製とその性状に関する研究

2017 年 3 月 3 日

古谷田泰徳

Yasunori Koyata

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔科学講座微生物感染学分野

浜田信城教授 指導

## 緒 言

*Porphyromonas salivosa* (*P. salivosa*) は、黒色色素産生性の非運動性無芽胞偏性嫌気性グラム陰性桿菌であり、ヒト歯周病患者のポケットから高率に分離される *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) と同属の細菌である。*P. salivosa* は、1987 年に Love らによってネコの皮下膿瘍と膿胸から糖非分解性黒色色素産生桿菌 *Bacteroides salivosa* として報告された<sup>1)</sup>。その後、1992 年に *Porphyromonas* 属として再分類され、*Porphyromonas salivosa* となった<sup>2)</sup>。ネコから分離された糖非分解の株は、ヒト歯周病原細菌である *P. gingivalis* とは性状が異なり、カタラーゼとインドール陽性でありグルコシダーゼ非産生である。歯周炎は、イヌやネコにおける歯の喪失の最も一般的な原因として受け入れられている<sup>3)</sup>。イヌおよびヒトで歯周病は、嫌気性グラム陰性桿菌によって引き起こされ<sup>4-6)</sup>、Mallonee らによる 32 匹のネコの歯肉縁下歯垢が、ヒト歯周炎と同様に好気性グラム陽性細菌主体の菌叢から偏性嫌気性桿菌への菌叢変化を伴って起こることが示されている<sup>7)</sup>。さらに、グラム陰性桿菌の割合が増加すると歯周病の病態も悪化することから、歯周病の程度と好気性や通性嫌気性グラム陽性細菌の菌数と負の相関を示し、*Porphyromonas gingivalis* に類似したグラム陰性桿菌が検出されたと報告している<sup>8-10)</sup>。

ネコにおける *Bacteroides* 属の 3 菌種は、ネコの口腔から高頻度に分離される

ことが報告されている<sup>11-14)</sup>。これらの結果から、現在の *Porphyromonas* 属が、ネコにおいても口腔の生態系で役割を果たしていることが明らかとなっている。

ヒト歯周炎の病原細菌である *P. gingivalis* に対する血清抗体価が歯周病血清において有意に高い値を示すことから、歯周病原細菌の有力候補の一つとして注目されている。歯周炎の発症や進行には、*P. gingivalis* のコラゲナーゼやトリプシン様酵素など直接的に組織破壊を引き起こすタンパク分解酵素や免疫細胞の活性化や歯周組織を構成する細胞からサイトカインの産生を惹起する内毒素など、様々な病原因子が関与すると考えられている。菌体表層に線状構造物として存在する線毛も免疫細胞や歯周組織を刺激してサイトカインの産生を誘発する活性の他に組織細胞への付着を介して本菌の歯周ポケット内への定着に重要な役割を果たしていると考えられている<sup>15)</sup>。また、*P. gingivalis* 381 株から精製した線毛抗原で免疫した動物の血清中には高力価の抗線毛抗体が見いだされ、歯周病患者血清中には同線毛に対する特異抗体の著明な上昇が認められることから、線毛が強力な抗原物質であることが注目されている。

ヒト歯周炎は、*Porphyromonas gingivalis* を含む特定のグラム陰性嫌気性細菌数の増加した歯肉縁下プラークと密接な関連性がある。*P. gingivalis* は、典型的な慢性炎症性疾患である歯周病を引き起こす病原体である<sup>16-19)</sup>。細菌の線毛は、重要な細胞への付着および宿主細胞への侵入に関与し、炎症を誘発して歯

周組織破壊に関与する<sup>20-23)</sup>。また、*P. gingivalis* 線毛は、唾液タンパク質、共生細菌、細胞外マトリックスおよび宿主細胞である歯肉線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞に特異的に結合することが報告されており、これらの細胞接着は、歯周組織破壊を引き起こす主要な病原性であると考えられている<sup>24-26)</sup>。また、線毛はマクロファージおよび線維芽細胞による炎症性サイトカインの産生誘導することが報告されている<sup>27-29)</sup>。特に、線毛は、細菌や宿主との間の初期の相互作用を促進する上で重要な役割を果たしていることが報告されていることから<sup>20,30,31)</sup>、本研究では、ネコ由来の菌株である *P. salivosa* の線毛タンパク質を単離して精製することでヒト歯周病原細菌 *P. gingivalis* 線毛と性状を比較することにより、線毛の多様性とヒト口腔内への定着機序の解明を目的として、*P. gulae* ATCC 51700 株線毛と *P. gingivalis* ATCC 33277 線毛との免疫学的反応性について検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 菌株および培養条件

供試菌は、神奈川歯科大学口腔科学講座微生物感染学分野保有の *P. gingivalis* ATCC 33277、*P. gulae* ATCC 51700、*P. salivosa* ATCC 49407 を用いた。培養には、ブレインハートインフュージョンブロス (BHI, Difco, Detroit, MI, USA) に

イーストエキストラクト (5 mg/ml)、ヘミン (5 µg/ml) およびビタミン K<sub>1</sub> (0.5 µg/ml) を添加した培地 (BHI 液体培地) もしくは 5% ヒツジ脱繊維血を含む BHI 血液寒天培地 (BHI 血液平板) を用いて嫌気条件下 (15% CO<sub>2</sub>, 15% H<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) 37°C で培養した。

## 2. 線毛の精製

線毛の分離精製は、Yoshimura ら<sup>31)</sup>の方法に従って行った。すなわち、*P. salivosa* ATCC 49407 を BHI 液体培地で 37°C、18 時間嫌気培養した。その後、細菌を 8,000 x g、30 分間の遠心操作を行って集菌し、0.15M NaCl と 10 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) に懸濁し、繰り返しのピペッティング操作により線毛を菌体表層から剥離した。さらに、INSONATOR 201 M (KUBOTA、東京)を用いて 200 W の出力で 1 分間超音波処理により菌体表層から線毛を機械的に剥離した。菌体から線毛を剥離した画分を 10,000 x g 4°C で 30 分間遠心分離して未破壊の菌体を除き、上清に硫酸アンモニウムを段階的に添加することによって、40%の飽和硫酸アンモニウム塩析操作を行った。沈殿したタンパク質を 20 mM トリス緩衝液 (pH 8.0)に懸濁し、未破壊菌体を除去する目的で、4°C で 30 分間 10,000 x g での遠心操作を行った。この上清を同緩衝液により 2 日間透析した。粗線毛画分を含有する透析液を 20 mM トリス緩衝液、pH 8.0 で平衡化した DEAE Sepharose CL-6B 陰イオン交換カラムクロマトグラ

フィーにより精製した (GE ヘルスケア社) (20 cm by 1.5 cm) 。まず、透析操作で硫酸アンモニウムを除去したサンプルを DEAE Sepharose CL-6B カラムに添加後、20 mM トリス緩衝液で洗浄し、次いで 0 M から 0.3 M の NaCl の直線濃度勾配で溶出した。画分のタンパク質含量は、280 nm での紫外線波長により測定した。

### 3. SDS-PAGE

DEAE Sepharose CL-6B にて溶出した線毛画分を SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により確認した。SDS サンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl、2 % メルカプトエタノール、10% グリセロール、0.002% ブロムフェノールブルー、pH 6.8) に懸濁し、5 分間 100°C で煮沸したものを試料とした。試料は、12.0% ポリアクリルアミドスラブゲルを用いて、1 時間、30 mA の定電流で電気泳動した。その後、クーマシーブリリアントブルーR-250 と銀染色 (和光純薬、日本) を行った。分子量マーカーは、低分子量マーカーキット (ATTO、日本) を使用した。

### 4. ポリクローナル抗体の作製

ポリクローナル抗体の作製は、精製タンパク質を抗原として BALB / c マウス (日本 SLC、日本) を用いて行った。フロイント不完全アジュバント (Difco, Detroit, MI, USA) を混合した精製タンパク質を 50 µg を複数の部位に皮下接種

した。1週間ごとに複数回接種を行った。最終接種後に麻酔下で全採血し、遠心操作により血清を分離し、-20℃で保存した。尚、本抗血清の作製は、神奈川県大学実験動物倫理委員会によって承認を得て実施した（実験承認番号 No. 49）。

#### 5. ウェスタンブロッティング

精製タンパク質の確認のため、12.0% SDS-PAGE によって分離されたタンパク質をゲルから、PVDF メンブレン（日本ミリポア、日本）に 200 mA の定電流 1 時間処理により転写後、非特異的吸着反応を起こさないように 1% ウシ血清アルブミン（BSA）を含む TBS 溶液（20 mM のトリス塩酸 pH7.4, 0.5M NaCl）を用いて、1 時間ブロッキング操作を行った。このメンブレンに抗線毛血清を一昼夜 4℃で作用させた。その後、TBS 溶液で洗浄操作を行い、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を 37℃で 1 時間作用させた後、余剰の抗体を TBS-Tween 溶液で洗浄し、ECL 試薬（ゼネラルエレクトリック社、USA）を用いて検出操作を行った。

#### 6. 電子顕微鏡観察

*P. salivosa* 菌体表層と精製タンパク質の線毛構造物の確認は、透過型電子顕微鏡で行った。すなわち、18 時間培養 *P. salivosa* 菌体をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）（pH7.4）で洗浄した菌体をカーボンコートしたコロジオン膜のグリッド

上で 2% 酢酸ウラニルでネガティブ染色後、JEM-100B 型透過型電子顕微鏡（日本電子、日本）で観察した。また、精製タンパク質も同様の操作を行って観察した。

## 7. 免疫電子顕微鏡観察

PBS で懸濁した菌液をカーボンコートしたコロジオン膜のグリッド上に固定後 1% BSA を含む PBS 溶液で 100 倍希釈した抗精製タンパク質抗体を 10  $\mu$ l 滴下して 37°C で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、1% BSA を含む PBS 溶液で 10 倍希釈した 5 nm 金コロイド標識抗マウス IgG 二次抗体 (BBI Solutions、UK) を 37°C で 30 分間反応させた後に再び PBS で洗浄した試料を 2% 酢酸ウラニルでネガティブ染色後、JEM-1220 型透過型電子顕微鏡（日本電子、日本）で観察した。

## 8. N 末端アミノ酸配列

精製線毛タンパク質を 10% SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、200 mA 定電流で 1 時間の操作で PVDF 膜に転写後、クーマシーブリリアントブルー R-250 で染色し、目的の精製線毛タンパク質のバンドをカミソリで切り出し、PPSQ-33A アミノ酸シーケンサ（島津製作所、日本）を用いて解析した。

## 9. 細胞への付着性



ヒト口腔由来の歯肉上皮細胞(KB)を用いて *P. gingivalis* ATCC 33277 と *P. salivosa* ATCC 49407 のヒト口腔由来の細胞への付着性を検討した。ヒト歯肉上皮細胞は、200 mM L-グルタミンを含むイーグルの最小必須培地(MEM; GIBCO, Renfrewshire, United Kingdom)を用いて 5% CO<sub>2</sub> 環境下 37°C で培養した。*P. gingivalis* と *P. salivosa* 菌体は、BHI 液体培地で培養し、PBS にて洗浄、10<sup>9</sup> CFU/ml に調整した。菌液を 10<sup>5</sup> cells/ml に調整した細胞に 10 µl 加えて 37°C で 90 分間保温して細菌を付着させ、PBS で 2 回洗浄後滅菌蒸留水を 1 ml 加えて細胞を破壊して細胞に付着した細菌数を BHI 血液平板に塗抹して付着細菌数を測定した。ヒト歯肉上皮細胞へ作用させた菌数に対して歯肉上皮細胞へ付着した菌数から付着率を算出した。付着菌数から全ての実験は、同一試料について 3 回実施し平均値と標準偏差 (SD)を求めた。

#### 10. 実験的歯周炎モデルによる病原性の評価

*Porphyromonas* 属 3 菌種の感染実験は、生後 3 週齢の Sprague-Dawley 系の SPF ラット（日本エスエルシー、静岡）を用いて 1 群 6 匹として行なった。健康状態を観察後、イオン交換水中に最終濃度 1 mg/ml のサルファメトキサゾールと 200 µg/ml のトリメトプリムを混合したものを飲料水として 1 週間与えて口腔常在菌を減少させた後、3 日間抗生物質を含まないイオン交換水を与えて口腔内に残存した抗生物質を除去した。その後、PBS で作製した 5% カルボキシ

メチルセルロース溶液で調整した菌体浮遊液 ( $10^9$  CFU/ml) を一日毎に 5 回、ラット口腔内へ直接投与した。コントロールである細菌未接種群 (Sham) には 5% カルボキシメチルセルロース溶液のみを与えた。すべてのラットは、食事、飲料水を自由に摂取できるようにし、温度 23°C、湿度 60% および明暗 12 時間のサイクルの環境下で飼育した。最終投与日より 45 日目にすべてのラットをエーテル麻酔下で断頭瀉血により屠殺した。本動物感染実験は、神奈川歯科大学実験動物倫理委員会の承認を得て実施した（実験承認番号 No. 51）。

#### 11. 歯槽骨吸収の評価

歯槽骨の吸収量は、上顎臼歯部のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を片側 7 箇所測定して行なった。頭蓋骨を 2 気圧下で 10 分間加熱後 3% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬して軟組織を除去後、1% メチレンブルー溶液で歯槽骨を染色乾燥させた試料を実体顕微鏡で 40 倍の倍率で測定した。7 箇所の測定値を平均して個体当たりの骨吸収量とし、それぞれ 6 匹分の平均値を実験群の骨吸収量としてミリメートルで表し平均値と標準偏差 (SD) を求めた。

#### 12. 統計学的分析

細胞付着率の検定は、Student's *t* test を用い、歯槽骨吸収量の多重比較検定は、One-way ANOVA と Tukey 法により統計解析ソフト SPSS Statistics 22 (IBM, USA) を用いて行った。有意水準は、 $P < 0.05$  および  $P < 0.01$  とした。

## 結 果

### 1. *P. salivosa* ATCC 49407 株の電子顕微鏡観察

*P. salivosa* ATCC 49407 株をネガティブ染色し電子顕微鏡観察した結果、菌体周囲に線毛の存在が確認された。菌体周囲の線毛は、幅 5 nm、長さ 150 nm の線状構造物が認められた（図 2, 4）。

### 2. 線毛の精製

*P. salivosa* ATCC 49407 株の線毛タンパク質を含む画分を DEAE セファロー ス CL-6B 陰イオン交換カラムを用いて *P. salivosa* ATCC 49407 の粗線毛精製物を分離、精製を行った。その結果、0.15 M NaCl 濃度で溶出するタンパク質が確認された（図 1）。*P. salivosa* ATCC 49407 株の全菌体と硫酸塩析で得られたタンパク質と精製タンパク質を 12.0% SDS-PAGE で確認したところ、分子量 60-kDa の位置に単一のバンドとして確認された（図 1 レーン 3）。銀染色を行った結果においても同様に単一のバンドとして確認され、他に混入物質は認められなかった（図 1 レーン 4）。この精製タンパク質を電子顕微鏡観察したところ、線毛構造物が確認された（図 2）。

### 3. ウェスタンブロット分析

ウェスタンブロット分析では、*P. salivosa* ATCC 49407 から精製したタンパク質を BALB/c マウスに免疫して得られた血清を用いて、全菌体に対してウエス

タンブロット法による検討した。その結果、抗精製タンパク質血清は、線毛構造物と確認されたタンパク質とのみ反応することが確認された（図 3）。また、*P. gingivalis* ATCC 33277 と *P. gulae* ATCC 51700 株全菌体に対して反応するバンドは確認されなかった。また、60-kDa に相当するタンパク質は、SDS-PAGE でも確認されなかった（図 3A）。したがって、*P. salivosa* ATCC 49407 株線毛タンパク質は、*P. gingivalis* ATCC 33277 と *P. gulae* ATCC 51700 株とは異なる抗原性を有する線毛であることが確認された。

#### 4. 免疫電子顕微鏡観察

*P. salivosa* ATCC 49407 株の菌体周囲に存在する線毛の確認を、抗精製タンパク質血清を用いた免疫電子顕微鏡により検討した。その結果、*P. salivosa* ATCC 49407 株線毛は、抗精製線毛タンパク質血清に反応し金粒子が線毛特異的に結合している像が確認された（図 4）。しかし、*P. salivosa* ATCC 49407 株の抗精製線毛タンパク質血清は、*P. gingivalis* ATCC 33277 と *P. gulae* ATCC 51700 菌体表層の線毛に対しては反応せず金粒子の付着像は認められなかった（図 5）。

#### 5. N 末端アミノ酸配列の比較

*P. salivosa* ATCC 49407 株から精製したタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定したところ、これまでに報告されている線毛タンパク質とは明らかに異なるアミノ酸配列であることが判明した（表 1）。本研究で精製した *P. salivosa* 線

毛タンパク質は *P. gingivalis* や *P. gulae* の線毛タンパク質とは N 末端アミノ酸 15 残基の配列において最初のアラニンのみがすべての線毛タンパクで確認されたものの *P. gingivalis* や *P. gulae* の線毛タンパク質とは相同性が高いもので 20.0%であった。この結果から、*P. salivosa* の線毛タンパク質の N 末端アミノ酸配列が明らかに異なり、これまで報告されている線毛タンパク質とは明らかに異なる構成タンパク質によって形成されている線毛であることが明らかになった。

#### 6. ヒト培養細胞への付着性

*P. gingivalis* ATCC 33277と*P. salivosa* ATCC 49407株を用いて、ヒト歯肉上皮細胞への付着性を検討した。その結果、*P. salivosa* ATCC 49407株の*P. salivosa* は 1.81%であり、*P. gingivalis* ATCC 33277の付着率2.58%に比較して低いものであった。この値については、線毛タンパク質のアミノ酸配列の違いだけではないと考えられるが、*P. salivosa* がヒト歯肉上皮細胞への付着性が*P. gingivalis*よりも低いことが判明した（図6）。また、ヒト歯肉上皮細胞への付着性が*P. gingivalis*よりも有意に低いことがヒト口腔から*P. salivosa* が検出されない理由のひとつと考えられた ( $P < 0.01$ )。

#### 7. 歯槽骨の吸収

ラットを用いた実験的歯周炎モデルを用いて、*Porphyromonas* 属に分類される 3 菌種について歯槽骨吸収を指標として病原性を検討した（図 7）。その結果、非感染群、*P. gingivalis* 感染群、*P. gulae* 感染群、*P. salivosa* 感染群の各々の骨レベルは、それぞれ非感染群  $0.33 \pm 0.22$  mm、*P. gingivalis* 感染群  $0.41 \pm 0.27$  mm、*P. gulae* 感染群  $0.43 \pm 0.27$  mm、*P. salivosa* 感染群  $0.49 \pm 0.27$  mm であった（図 8, 9）。この結果から、ラット歯槽骨吸収においては、非感染群と比較して *Porphyromonas* 属 3 菌種すべてが有意な骨吸収を示し、*P. salivosa* においても顕著な歯槽骨吸収を引き起こすことが判明した ( $P < 0.01$ )。

## 考 察

歯周病は、口臭、歯肉の炎症によって特徴づけられる口腔疾患であり、歯の動揺や歯の損失をもたらす。また、歯周病は、糖尿病や動脈硬化症や心内膜炎などの全身疾患との関連も指摘されている<sup>32)</sup>。

コンパニオンアニマルにおける歯周炎は、ヒトの疾患と同じ臨床症状を示す疾患である。黒色色素産生偏性嫌気性桿菌は、野生動物の口腔内から単離される<sup>33-35)</sup>。イヌの歯周ポケットの中で高頻度に検出される黒色素性嫌気性細菌は *P. gulae*、*P. salivosa* と *P. denticanis* である<sup>33,36)</sup>。しかし、人間とコンパニオンアニマルとの間では、*Porphyromonas* 分離株が異なることが報告され、歯周病

原体が周囲の組織に炎症反応を誘発することが報告されている<sup>34,37)</sup>。これまでの報告で*P. gulae* ATCC 51700 株には2種類の抗原性と分子量の異なる線毛タンパク質と病原性について報告している<sup>38-40)</sup>。*P. gingivalis* 線毛遺伝子 *fimA* にコードされた約 41-kDa の線毛構成タンパク質 (FimA) は、歯周炎との関わりに重要であることが多数報告されている<sup>20,21)</sup>。本研究では、*P. salivosa* 60-kDa 線毛タンパク質の存在を確認し (図 1, 2)、ラットを用いた実験的歯周炎により *P. salivosa* を感染させたラットの歯槽骨が *P. gingivalis* や *P. gulae* と同様に歯槽骨吸収像が確認された (図 9)。 *P. salivosa* の 60-kDa 線毛タンパク質においても、*P. gingivalis* や *P. gulae* の線毛タンパク質と同様に歯周炎に関連性があるものと推測される。ウェスタンブロッティング法の結果から *P. salivosa* 60-kDa 線毛タンパク質に対する特異抗体は、*P. gingivalis* や *P. gulae* の線毛タンパク質と反応せず (図 3)、N 末端 15 残基のアミノ酸配列の相同性が低いことから (表 1)、*P. salivosa* 線毛タンパク質は他の線毛と異なる抗原性を持つ線毛であることが強く示唆された。

*P. gingivalis* 41-kDa 線毛は、ヒト歯肉線維芽細胞やマウス腹腔マクロファージにおける炎症性サイトカインを誘導するだけでなく、組織への付着を促進することが報告されている<sup>41,42)</sup>。したがって、*P. salivosa* の 60-kDa 線毛タンパク質も破骨細胞の分化誘導や炎症性サイトカイン産生誘導に関わる活性を有して

いる可能性は十分にあると考えられる。また、線毛だけではなく、グラム陰性菌であることから LPS を保有し強い骨破壊を引き起こすと考えられる。

本研究結果において、*P. salivosa* を口腔内感染させたラットは、*P. gingivalis* や *P. gulae* を感染させたラットに比較して顕著な歯槽骨吸収像を示した（図 8, 9）。これまでの *P. gingivalis* の動物実験の報告で線毛遺伝子を不活化し線毛を欠損させた変異株を用いた実験結果から、ヒト口腔内細胞への付着性とラット歯槽骨破壊を誘導することから、線毛が極めて重要な病原因子であることが報告されている<sup>43)</sup>。

*Porphyromonas gingivalis* の線毛については、これまでに多く研究報告がある<sup>15)</sup>。特に、*P. gingivalis* の *fimA* 遺伝子をコードする DNA は既にクローン化され、*P. gingivalis* 9 株おける *fimA* 遺伝子の塩基配列の比較から *P. gingivalis* においては線毛遺伝子の特定領域が高度に保存されていることが報告されている<sup>42)</sup>。さらに、*P. gingivalis* ATCC 33277 株には 41-kDa 線毛に比較して短い線毛が存在し、ウェスタンブロッティングおよび免疫電子顕微鏡観察の結果から 41-kDa 線毛とは形態学的と免疫学的に異なる線毛であることを明らかにし、既にその遺伝子をクローン化し、その遺伝子を *mfal* として報告している<sup>30)</sup>。同様に、*P. gingivalis* 381 株から 41-kDa 線毛遺伝子変異株 FPG41 株を作製し、菌体表層に存在する短い線毛の精製を行った結果、分子量 53-kDa のタンパク質により構成



される分子量と抗原性の異なる線毛であることが我々の研究で明らかになっている<sup>44)</sup>。本研究では、*P. gingivalis* ATCC 33277 株に存在する 41-kDa 線毛のほか 67-kDa 線毛や *P. gingivalis* 381 株に存在する 53-kDa 線毛との性状比較を目的として *P. salivosa* ATCC 49407 株の線毛の精製を試みた。電子顕微鏡観察の結果、*P. salivosa* ATCC 49407 株に存在する線毛が観察され（図 4）、ウェスタンブロッティングおよび免疫電子顕微鏡観察の結果からこれまでに報告されている *Porphyromonas* 属に存在する線毛とは分子量とともに免疫学的に異なる線毛であることが確認された(図 3, 5)。

Duncan ら<sup>45)</sup>は、*P. gingivalis* 381 株 と無線毛株の W50 を用いてヒト口腔上皮細胞への付着性の違いを報告している。*P. gingivalis* 381 株では KB 細胞上に細胞から微絨毛が出現し、自家凝集した菌体を確認されるが、W50 株では自家凝集しないと報告している。これらの結果は、上皮細胞へ *P. gingivalis* 株が付着することで上皮細胞から微絨毛が再構成される引き金になることを意味するものと考えられる。線毛が細胞への付着性と侵入性に関与する重要な因子であることが明らかにされており、これらの性状には菌体の自家凝集性が強く関与していることが推測された。本研究において、*P. salivosa* ATCC 49407 株が *P. gingivalis* ATCC 33277 株よりもヒト上皮細胞への付着率が低い理由のひとつとして、線毛タンパク質の違いによる可能性が考えられる（図 6, 表 1）。これ

までの *P. gingivalis* 線毛の報告から、53-kDa マイナー線毛タンパク質は、*mfa1* 遺伝子の 1497 bp の塩基配列にコードされている 498 アミノ酸で構成され、67-kDa マイナー線毛は、1692 bp の塩基配列にコードされる 563 アミノ酸から構成されていた。DNA の塩基配列では、53-kDa 線毛遺伝子の方が 195 塩基少なく、相同性は 54.79%であった。また、アミノ酸配列での相同性は 30%であった。N-末端アミノ酸配列の比較から、67-kDa マイナー線毛には、49 残基にわたる長いシグナルペプチドが存在し、53-kDa マイナー線毛にも、46 残基から成るシグナル配列が存在しており、いずれもアルギニン残基とアラニン残基の部位で切断されていた<sup>46)</sup>。また、C-末端部分にプロリンが多数存在する領域の存在が共通した部分で確認された。プロリンリッチ領域は、親水性で抗原性が高いことがいくつかの細菌タンパク質において報告されている。例えば、*Streptococcus* 属の菌体表層に存在するプロリンを含む M 蛋白は、ペプチドグリカンに対する結合に関与し<sup>47)</sup>、マイコプラズマの組織定着に関わるタンパク質もプロリンを多く含むことが報告されている<sup>48)</sup>。これらの報告から、この領域が *P. gingivalis* の歯周組織への定着に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。今後、*P. salivosa* の 60-kDa 線毛タンパク質の遺伝子解析とともに、*Porphyromonas* 属細菌のヒト口腔内定着や口腔内常在菌種との凝集に関わる線毛タンパク質の役割を解明したいと考えている。さらに、*P. salivosa* のヒトへ

の伝播や歯周病発症に関わる因子についても検討を進めていきたいと考えている。

## 結 論

*P. salivosa* の 60-kDa 線毛タンパク質について検討した結果以下の結論を得た。

1. DEAE セファロース CL-6B カラムを用いて精製を行った結果、推定分子量 60-kDa のタンパク質を精製した。
2. 電子顕微鏡像から線毛構造を確認することができた。また 60-kDa 特異的に反応する血清を作製し金コロイド法を用いたところ金コロイド粒子は線毛に付着することが確認された。
3. 分子量 60-kDa のポリクローナル抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法と免疫電子顕微鏡観察を行った結果、*Porphyromonas* 属である *P. gingivalis* と *P. gulae* には反応するタンパク質は存在せず、これまで報告されている線毛タンパク質とは異なる抗原性を示す線毛タンパク質であることが明らかになった。また、アミノ酸シーケンスの結果から、N 末端 15 残基のアミノ酸配列の相同性を比較した結果、相同性が低いことが確認された。
4. *P. salivosa* のヒト歯肉上皮細胞への付着は、*P. gingivalis* よりも低いことが明らかになった。

5. ラットを用いた実験的歯周炎モデルの実験において、非感染群と比較してそれぞれの *Porphyromonas* 属菌種とは有意な骨吸収が認められた。*P. salivosa* においても顕著な歯槽骨吸収を引き起こすことが判明した。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇切なるご指導と御校閲を賜りました神奈川歯科大学 口腔科学講座微生物感染学分野、浜田信城教授に深甚なる謝意を表します。また、御校閲と御鞭撻をいただきました神奈川歯科大学 口腔科学講座 口腔機能成育歯科学分野 木本茂成教授、ならびに咀嚼機能制御補綴学分野 木本克彦教授、口腔科学講座 合田征司教授に厚く御礼申し上げます。

さらに本研究の遂行にあたり終始ご教示を賜りました神奈川歯科大学 口腔科学講座 微生物感染学分野教室員各位に深甚なる謝意を表します。

## 利益相反

本研究に関連して、申告すべき利益相反はない。

## 文 献

1. Love DN, Johnson JL, Jones RF, Calverley A. *Bacteroides salivosus* sp. nov., an asaccharolytic, black-pigmented species from cats. Int J Syst Bacteriol **37**: 307-309, 1987.
2. Love DN, Bailey GD, Bastin D. Chromosomal DNA probes for the identification of asaccharolytic anaerobic pigmented bacterial rods from the oral cavity of cats. Vet Microbiol **31**(2-3): 287-295, 1992.
3. Colmery B3<sup>rd</sup>, Frost P. Periodontal disease. Etiology and pathogenesis. Vet Clin North Am Small Anim Pract **16**(5): 817-833, 1986.
4. Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. J Periodontol **47**(1): 1-18, 1976.
5. Hennet P, Harvey CE. Aerobes in periodontal disease in dog: a review. J Vet Dent **8**(1): 9-11, 1991.
6. Hennet P, Harvey CE. Anaerobes in periodontal disease in dog: a review. J Vet Dent **8**(2): 18-21, 1991.
7. Mallonee DH, Harvey CE, Venner M, Hammond BF. Bacteriology of periodontal disease in the cat. Arch Oral Biol **33**(9): 677-683, 1988.
8. Karjalainen J, Kanervo A, Vaisanen ML, Forsblom B, Sarkiala E,

- Jousimies-Somer H. *Porphyromonas*-like gram-negative rods in naturally occurring periodontitis in dogs. FEMS Immunol Med Microbiol **6**(2-3): 207-212, 1993.
9. Sarkiala E, Asikainen S, Wolf J, Kanervo A, Happonen I, Jousimies-Somer H. Clinical, radiological and bacteriological findings in canine periodontitis. J Small Anim Pract **34**: 265-270, 1993.
10. Boyce EN, Ching RJW, Logan EI, Hunt JH, Maseman DC, Gaeddert KL, King CT, Reid EE, Hefferren JJ. Occurrence of Gram-negative black-pigmented anaerobes in subgingival plaque during the development of canine periodontal disease. Clin Infect Dis **20**: S317-319, 1995.
11. Love DN, Jones RF, Bailey M, Johnson RS, Gamble N. Isolation and characterisation of bacteria from pyothorax (empyema) in cats. Vet Microbiol **7**(5): 455-461, 1982.
12. Love DN, Jones RF, Calverley A. Asaccharolytic black pigmented *Bacteroides* strains from soft tissue infections in cats. Int J Syst Bacteriol **34**: 300-303, 1984.
13. Love DN, Johnson JL, Moore LVH. *Bacteroides* species from the oral cavity and the oral-associated diseases of cats. Vet Microbiol **19**(3): 275-281, 1989.
14. Love DN, Vekselstein R, Collings S. The obligate and facultatively anaerobic

- bacterial flora of the normal feline gingival margin. *Vet Microbiol* **22**(2-3): 267-275, 1990.
15. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4): 1244-1263, 1998.
  16. Genco CA, Van DT, Amar S. Animal models for *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. *Trends Microbiol* **6**(11): 444-449, 1998.
  17. Landi L, Amar S, Polins AS, Van DT. Host mechanisms in the pathogenesis of periodontal disease. *Curr Opin Periodontol* **4**: 3-10, 1997.
  18. Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol* **1**(1): 879-925, 1996.
  19. van Winkelhoff AJ, de Graaff J. Microbiology in the management of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* **18**(6): 406-410, 1991.
  20. Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res* **39**(2): 136-142, 2004.
  21. Lamont RJ, Jenkinson HF. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* **15**(6): 341-349, 2000.
  22. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival

- crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. J Clin Periodontol **22**(11): 885-890, 1995.
23. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, Yamaguchi A, Kodama H, Martin TJ, Suda T. The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. Endocrinology **125**(4): 1805-1813, 1989.
24. Amano A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. Periodontol 2000 **52**(1): 12-37, 2010.
25. Hajishengallis G, Wang M, Liang S, Liang S, Shakhathreh MA, James D, Nishiyama S, Yoshimura F, Demuth DR. Subversion of innate immunity by periodontopathic bacteria via exploitation of complement receptor-3. Adv Exp Med Biol **632**: 203-219, 2008.
26. Nakagawa I, Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, Amano A. Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. Infect Immun **74**(7): 3773-3782, 2006.
27. Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. Infect Immun



- 63**(10): 3878-3885, 1995.
28. Okuda K, Yamamoto A, Naito Y, Takazoe I, Slots J, Genco RJ. Purification and properties of hemagglutinin from culture supernatant of *Bacteroides gingivalis*. Infect Immun **54**(3): 659-665, 1986.
  29. Enersen M, Nakano K, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. J Oral Microbiol. <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v5i0.20265>. 2013.
  30. Hamada N, Sojar HT, Cho MI, Genco RJ. Isolation and characterization of a minor fimbria from *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun **64**(11): 4788-4847, 1996.
  31. Yoshimura F, Takahashi K, Nodasaka Y, Suzuki T. Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. J Bacteriol **160**(3): 949-957, 1984.
  32. Igari K, Kudo T, Toyofuku T, Inoue Y, Iwai T. Association between periodontitis and the development of systemic diseases. Oral Biol Dent <http://dx.doi.org/10.7243/2053-5775-2-4>. 2014.
  33. Allaker RP, de Rosayro R, Young KA, Hardie JM. Prevalence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the dental plaque of dogs. Vet Rec **140**(6): 147-148. 1997.

34. Fournier D, Mouton C, Lapierre P, Kato T, Okuda K, Menard C. *Porphyromonas gulae* sp. nov., an anaerobic, gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(Pt3): 1179-1189, 2001.
35. Hardham J, Dreier K, Wong J, Sfintescu C, Evans RT. Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. *Vet Microbiol* **106**(1-2): 119-128, 2005.
36. Isogai H, Kosako Y, Benno Y, Isogai E. Ecology of genus *Porphyromonas* in canine periodontal disease. *Zentralbl Veterinarmed B* **46**(7): 467-473, 1999.
37. Koide M, Kinugawa S, Takahashi N, Udagawa N. Osteoclastic bone resorption induced by innate immune responses. *Periodontol 2000* **54**(1): 235-246, 2010.
38. Hamada N, Takahashi Y, Watanabe K, Kumada H, Oishi Y, Umemoto T. Molecular and antigenic similarities of the fimbrial major components between *Porphyromonas gulae* and *P. gingivalis*. *Vet Microbiol* **128**(1-2): 108-117, 2008.
39. Oishi Y, Watanabe K, Kumada H, Ishikawa E, Hamada N. Purification and characterization of a novel secondary fimbrial protein from *Porphyromonas gulae*. *J Oral Microbiol* <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v4i0.19076>. 2012.
40. Sasaki H, Watanabe K, Toyama T, Koyata Y, Hamada N. *Porphyromonas gulae* 41-kDa fimbriae induced osteoclast differentiation and cytokine production. *J Vet*

Med Sci **77**(3): 265-271, 2015.

41. Hanazawa S, Hirose K, Ohmori Y, Amano S, Kitano S. *Bacteroides gingivalis* fimbriae stimulate production of thymocyte-activating factor by human gingival fibroblasts. Infect Immun Jan; **56**(1): 272-274, 1988.
42. Hamada S, Amano A, Kimura S, Nakagawa I, Kawabata S, Morisaki I. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. Oral Microbiol Immunol Jun; **13**(3): 129-138, 1998.
43. Umemoto T, Hamada N. Characterization of biologically active cell surface components of a periodontal pathogen. The roles of major and minor fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontol **74**(1):119-122, 2003.
44. Arai M, Hamada N, Umemoto T. Purification and characterization of a novel secondary fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis* strain 381. FEMS Microbiol Lett **193**(1):75-81, 2000.
45. Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. Infect Immun **61**(5): 2260-2265, 1993.
46. Hollingshead SK, Fischetti VA, Scott JR. Complete nucleotide sequence of type 6 M protein of the group A *Streptococcus*. Repetitive structure and membrane anchor. J Biol Chem **261**(4): 1677-1686, 1986.

47. Baseman JB, Reddy SP, Dallo SF. Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protean manifestations of mycoplasma-mediated human infections. *Am J Respir Crit Care Med* **154**(4 Pt 2): S137-144, 1996.

## 付図説明

表 1 線毛遺伝子のアミノ酸配列の比較

図 1 精製線毛タンパク質の分子量決定

*P. salivosa* ATCC 49407 株の精製線毛タンパク質は、12.0% SDS-PAGE から分子量 60-kDa であることが判明した。クマシー染色像 (A)、銀染色像 (B)。レーン 1, *P. salivosa* ATCC 49407 株全菌体; レーン 2, 硫酸塩析; レーン 3, 精製タンパク質; レーン 4, 精製タンパク質。

図 2 *P. salivosa* ATCC 49407 株精製タンパク質の電子顕微鏡像

電子顕微鏡観察により線毛構造物であることが確認された。スケールバー: 200 nm。

図 3 抗 60-kDa 線毛タンパク質血清によるウェスタンブロッティング

*Porphyromonas* 属の全菌体タンパク質の SDS-PAGE 像 (A)。抗 60-kDa 線毛タンパク質血清によるウェスタンブロッティング像 (B)。 *P. salivosa* 60-kDa 菌体タンパク質のみに抗体と反応するバンドが観察された。レーン 1, *P. gingivalis* ATCC

33277 株全菌体; レーン 2, *P. gulae* ATCC51700 株全菌体; レーン 3, *P. salivosa* ATCC 49407 株全菌体。\*: 60-kDa。

#### 図 4 抗 60-kDa 線毛タンパク質血清による免疫電子顕微鏡観察

*P. salivosa* ATCC 49407 株全菌体のネガティブ染色像 (a)。*P. salivosa* ATCC 49407 株全菌体に対して、抗 60-kDa 線毛タンパク質血清を用いた免疫電子顕微鏡像 (b)により、*P. salivosa* 菌体周囲に存在する線毛に金粒子の特異的な付着が確認された。スケールバー: 200 nm。

#### 図 5 *P. gingivalis* と *P. gulae* 線毛との抗 60-kDa 線毛タンパク質血清の反応性

*P. gingivalis* ATCC 33277 (a) と *P. gulae* ATCC 51700 (b) の菌体を 2% 酢酸ウラン溶液を用いてネガティブ染色により菌体表層に線毛の存在が確認された。抗 60-kDa 線毛タンパク質血清を用いて金コロイド法を行った結果、*P. gingivalis* (c)と *P. gulae* (d) の線毛には金粒子の付着は認められなかった。スケールバー: 200 nm。

#### 図 6 ヒト歯肉上皮細胞への付着性

ヒト歯肉上皮細胞を用いて検討した結果、*P. gingivalis* ATCC 33277 に比較して *P. salivosa* ATCC 49407 は、付着率が有意に低く認められた。1, *P. gingivalis* ATCC 33277; 2, *P. salivosa* ATCC 49407。 \*\*:  $P < 0.01$ 。

#### 図7 ラットの実験スケジュール

生後3週齢の Sprague-Dawley 系の SPF ラットを用いて1群6匹として行なった。健康状態を観察後、イオン交換水中に最終濃度 1 mg/ml のサルファメトキサゾールと 200  $\mu$ g/ml のトリメトプリムを混合したものを飲料水として与えて口腔常在菌を減少させた後、5% カルボキシメチルセルロース溶液で調整した菌体浮遊液 ( $10^9$  CFU/ml)を一日毎に5回、ラット口腔内へ直接投与した。コントロール群には5% カルボキシメチルセルロース溶液のみを与えた。

#### 図8 ラット歯槽骨の吸収像

実験開始から60日目の歯槽骨像から骨吸収の状態を観察した。*Porphyromonas* 属細菌の接種により、歯槽骨の吸収像が認められた。A, Sham; B, *P. gingivalis* ATCC 33277; C, *P. gulae* ATCC 51700; D, *P. salivosa* ATCC 49407。

#### 図9 ラット実験的歯周炎の歯槽骨吸収

歯槽骨の吸収量は、それぞれ 6 匹分の平均値を実験群の骨吸収量としてミリメートルで表し平均値と標準偏差(SD)を求めた。*Porphyromonas* 属細菌の接種により、非感染群と比較して有意な歯槽骨吸収が認められた。*P. salivosa* 感染群が最も歯槽骨吸収量が認められた。1, Sham; 2, *P. gingivalis* ATCC 33277; 3, *P. gulae* ATCC 51700; 4, *P. salivosa* ATCC 49407。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ 。



表 1 線毛遺伝子のアミノ酸配列の比較

Strains	Fimbriae	Amino acid sequence															Homology (%)
<i>P. salivosa</i> ATCC 49407	60-kDa	A	N	A	D	G	Q	D	K	P	N	P	D	F	N	Y	
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	41-kDa	A	F	G	V	G	D	D	E	S	K	V	A	K	L	T	20.0
	67-kDa	A	G	D	G	Q	D	Q	A	N	P	D	Y	H	Y	V	6.7
<i>P. gingivalis</i> 381	41-kDa	A	F	G	V	G	D	D	E	S	K	V	A	K	L	T	20.0
	53-kDa	A	G	D	N	D	Y	N	P	I	G	E	Y	G	G	V	6.7
<i>P. gulae</i> ATCC 51700	41-kDa	A	F	G	V	A	D	D	E	A	K	V	A	K	L	T	13.3
	53-kDa	A	G	D	N	D	Y	N	H	V	G	E	Y	G	G	V	6.7

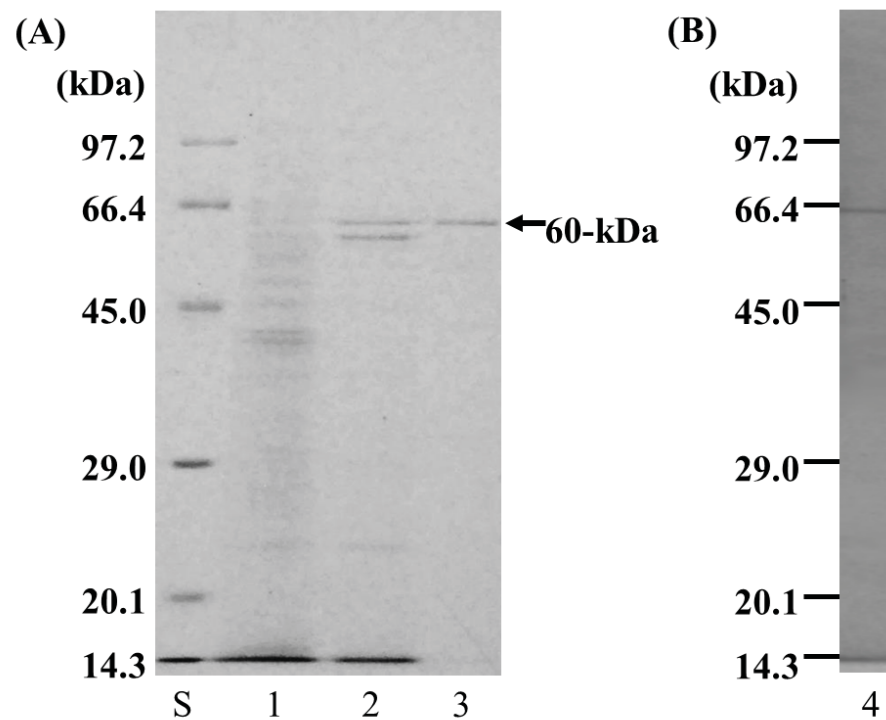


図1 精製線毛タンパク質の分子量決定

*P. salivosa* ATCC 49407 株の精製線毛タンパク質は、12.0% SDS-PAGE から分子量 60-kDa であることが判明した。クマシー染色像 (A)、銀染色像 (B)。レーン 1, *P. salivosa* ATCC 49407 株全菌体; レーン 2, 硫酸塩析; レーン 3, 精製タンパク質; レーン 4, 精製タンパク質。

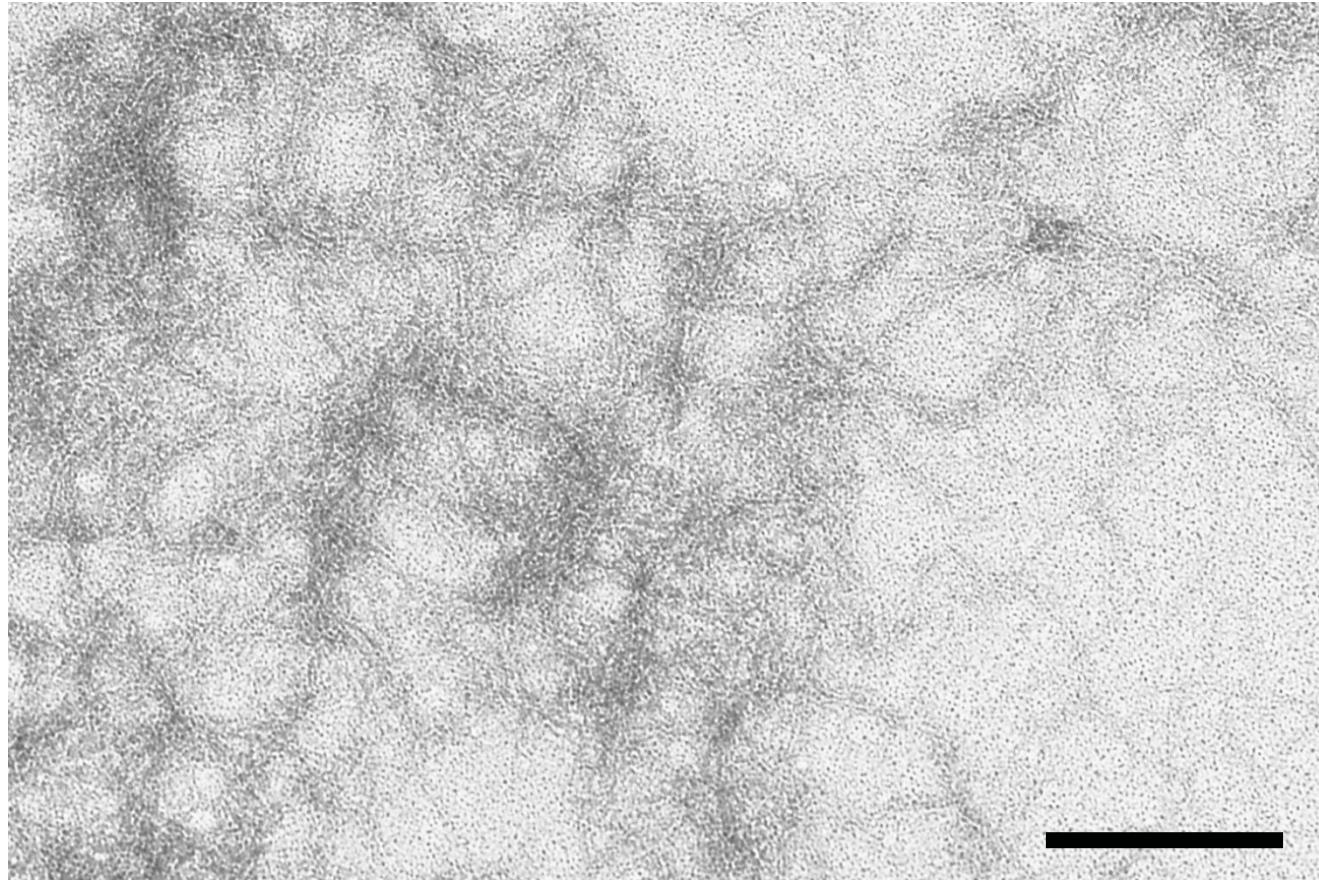


図2 *P. salivosa* ATCC 49407 株精製タンパク質の電子顕微鏡像  
電子顕微鏡観察により線毛構造物であることが確認された。スケールバー: 200 nm。

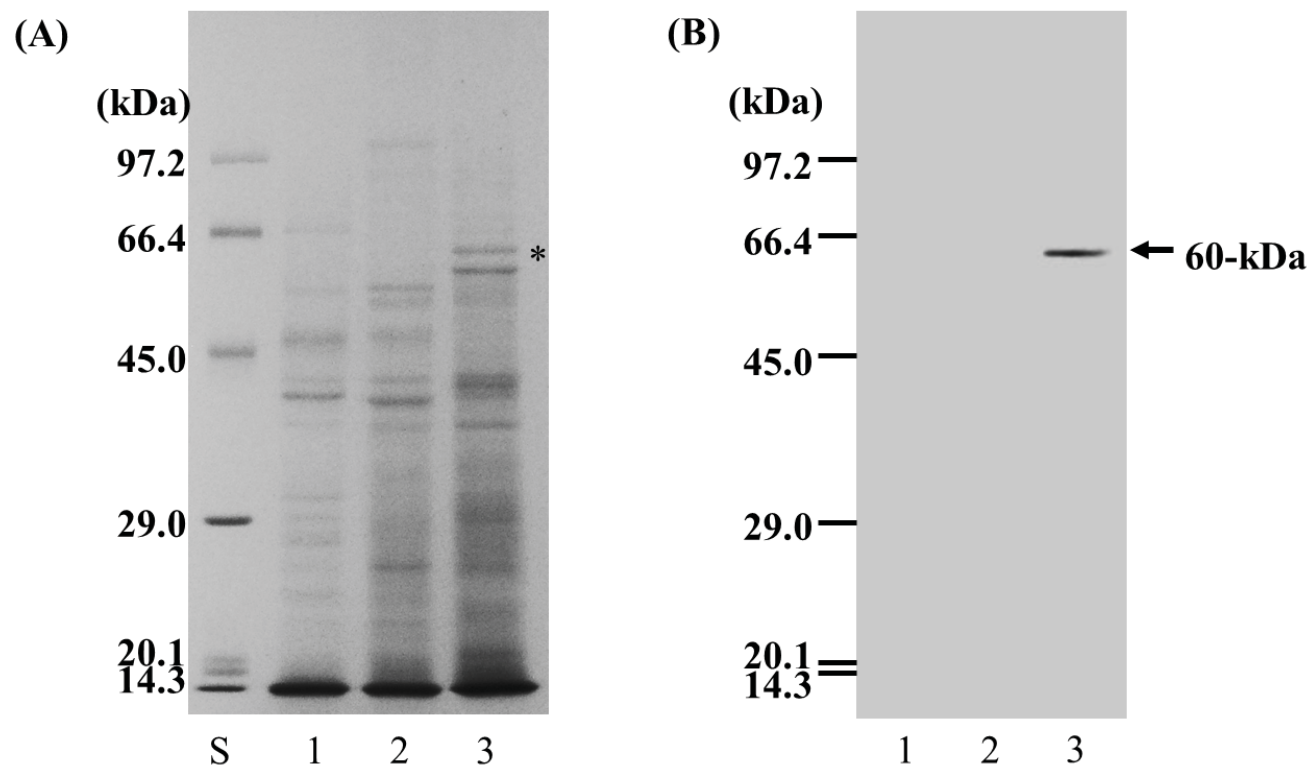


図3 抗 60-kDa 線毛タンパク質血清によるウェスタンブローディング

*Porphyromonas* 属の全菌体タンパク質の SDS-PAGE 像 (A)。抗 60-kDa 線毛タンパク質血清によるウェスタンブローディング像 (B)。*P. salivosa* 60-kDa 菌体タンパク質のみに抗体と反応するバンドが観察された。レーン 1, *P. gingivalis* ATCC 33277 株全菌体; レーン 2, *P. gulae* ATCC51700 株全菌体; レーン 3, *P. salivosa* ATCC 49407 株全菌体。\*: 60-kDa。



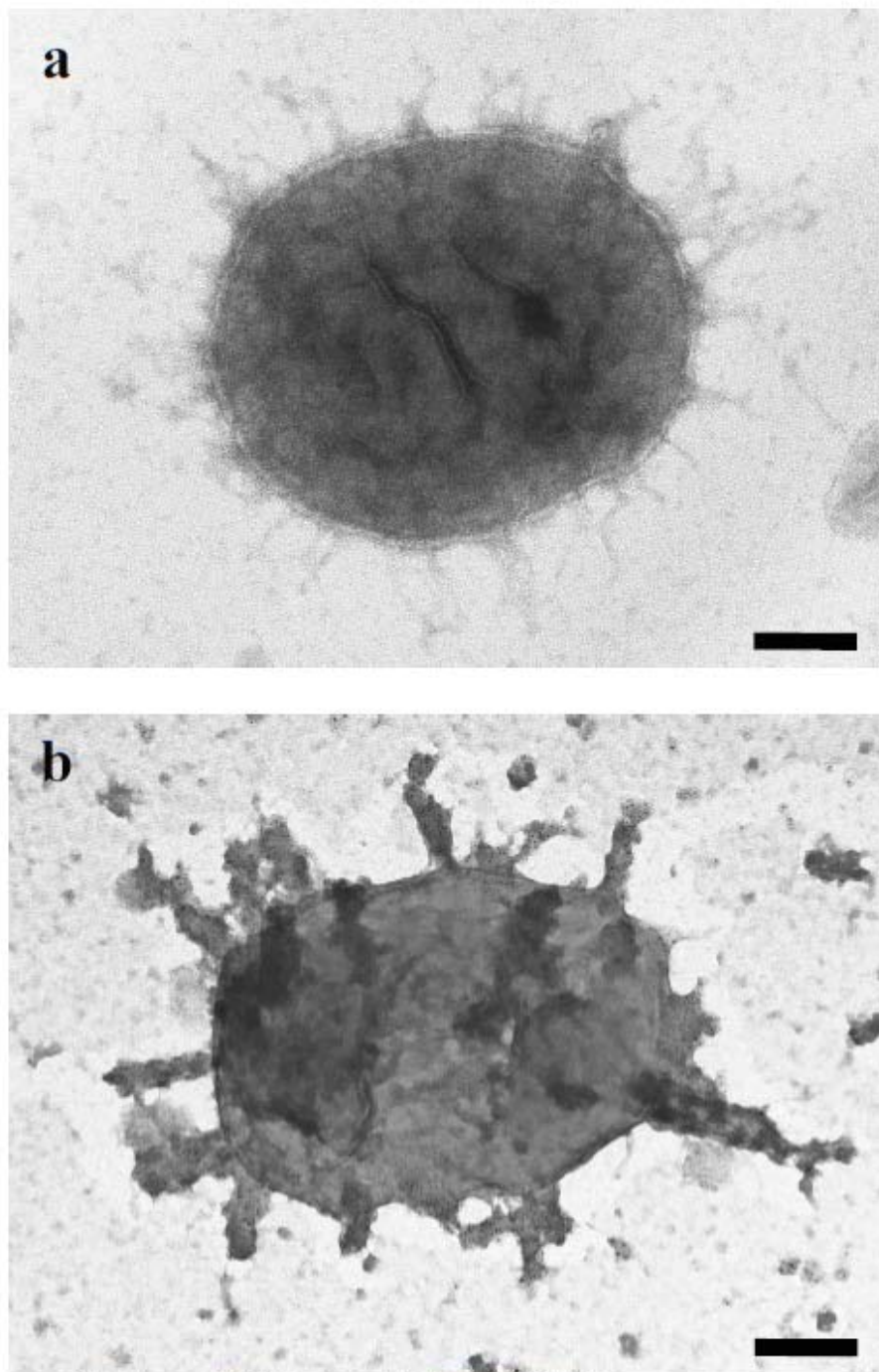


図4 抗 60-kDa 線毛タンパク質血清による免疫電子顕微鏡観察  
*P. salivosa* ATCC 49407 株全菌体のネガティブ染色像 (a)。*P. salivosa* ATCC 49407 株全菌体に対して、抗 60-kDa 線毛タンパク質血清を用いた免疫電子顕微鏡像 (b) により、*P. salivosa* 菌体周囲に存在する線毛に金粒子の特異的な付着が確認された。スケールバー: 200 nm。

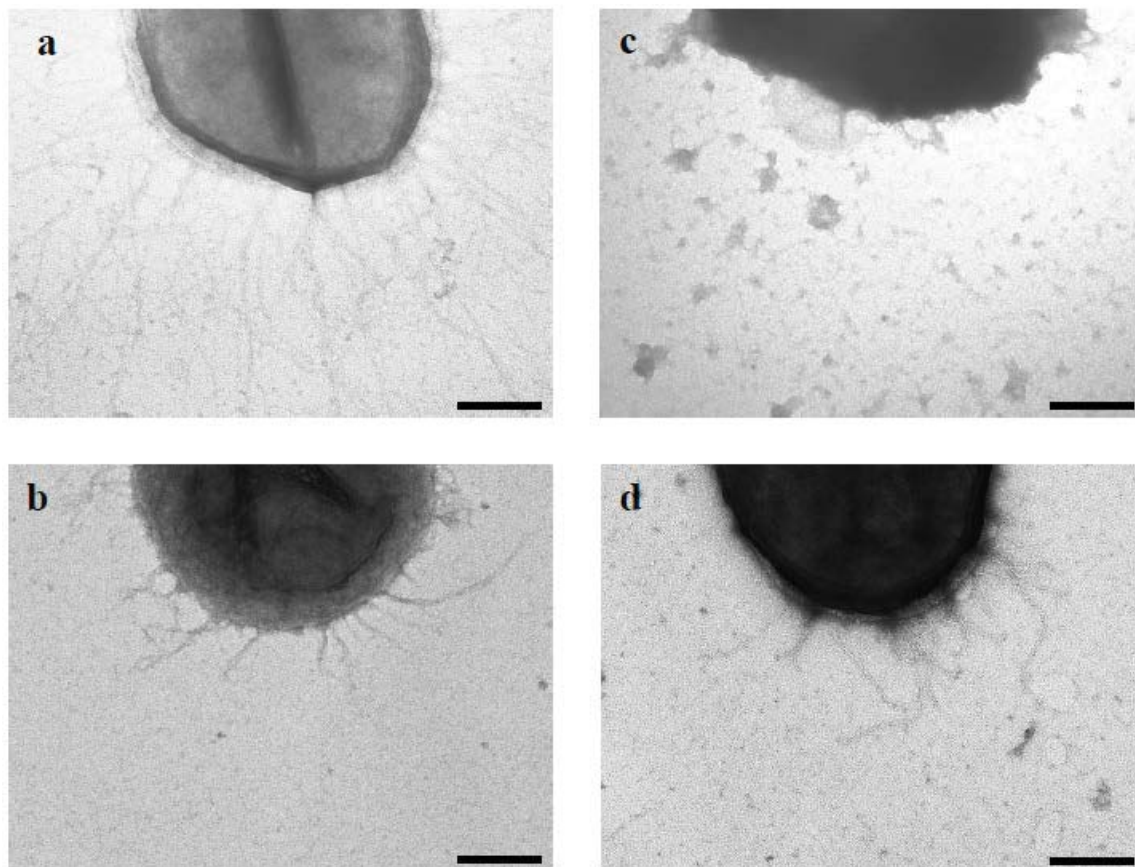


図5 *P. gingivalis* と *P. gulae* 線毛との抗 60-kDa 線毛タンパク質血清の反応性  
*P. gingivalis* ATCC 33277 (a) と *P. gulae* ATCC 51700 (b) の菌体を 2% 酢酸ウ  
 ラニル溶液を用いてネガティブ染色により菌体表層に線毛の存在が確認され  
 た。抗 60-kDa 線毛タンパク質血清を用いて金コロイド法を行った結果、*P.*  
*gingivalis* (c)と *P. gulae* (d) の線毛には金粒子の付着は認められなかった。ス  
 ケールバー: 200 nm。

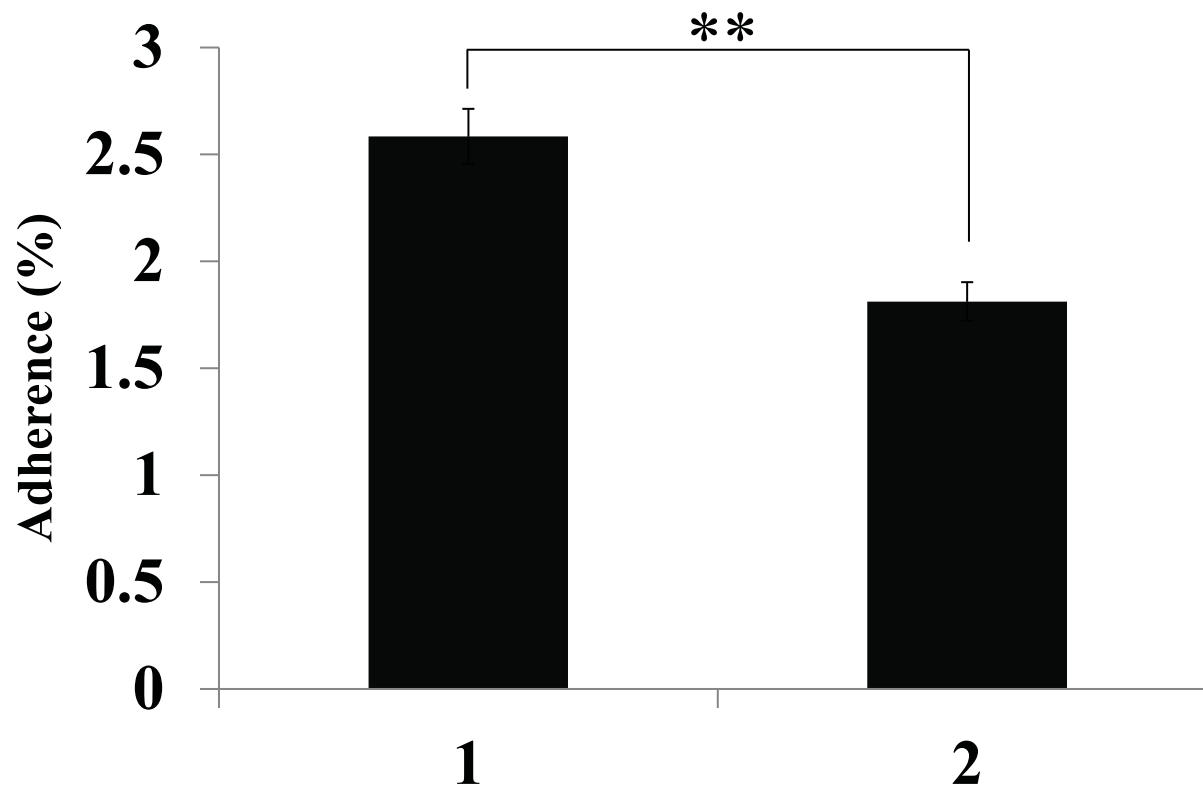


図6 ヒト歯肉上皮細胞への付着性

ヒト歯肉上皮細胞を用いて検討した結果、*P. gingivalis* ATCC 33277 に比較して *P. salivosa* ATCC 49407 は、付着率が有意に低く認められた。1, *P. gingivalis* ATCC 33277; 2, *P. salivosa* ATCC 49407。 \*\*:  $P < 0.01$ 。

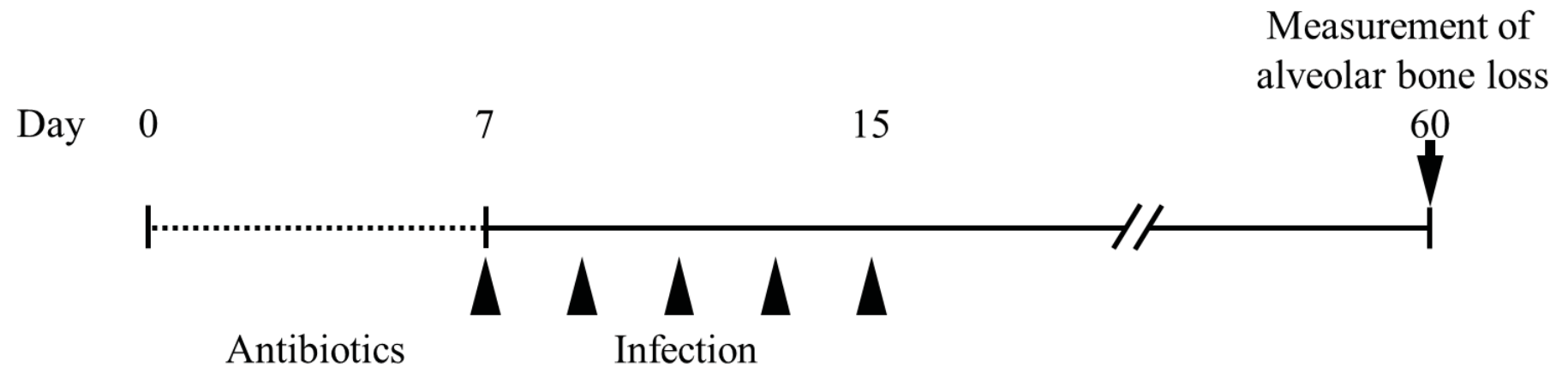


図7 ラットの実験スケジュール

生後3週齢の Sprague-Dawley 系の SPF ラットを用いて1群6匹として行なった。健康状態を観察後、イオン交換水中に最終濃度1 mg/ml のサルファメトキサゾールと200 µg/ml のトリメトプリムを混合したものを飲料水として与えて口腔常在菌を減少させた後、5% カルボキシメチルセルロース溶液で調整した菌体浮遊液 ( $10^9$  CFU/ml)を一日毎に5回、ラット口腔内へ直接投与した。コントロール群には5% カルボキシメチルセルロース溶液のみを与えた。



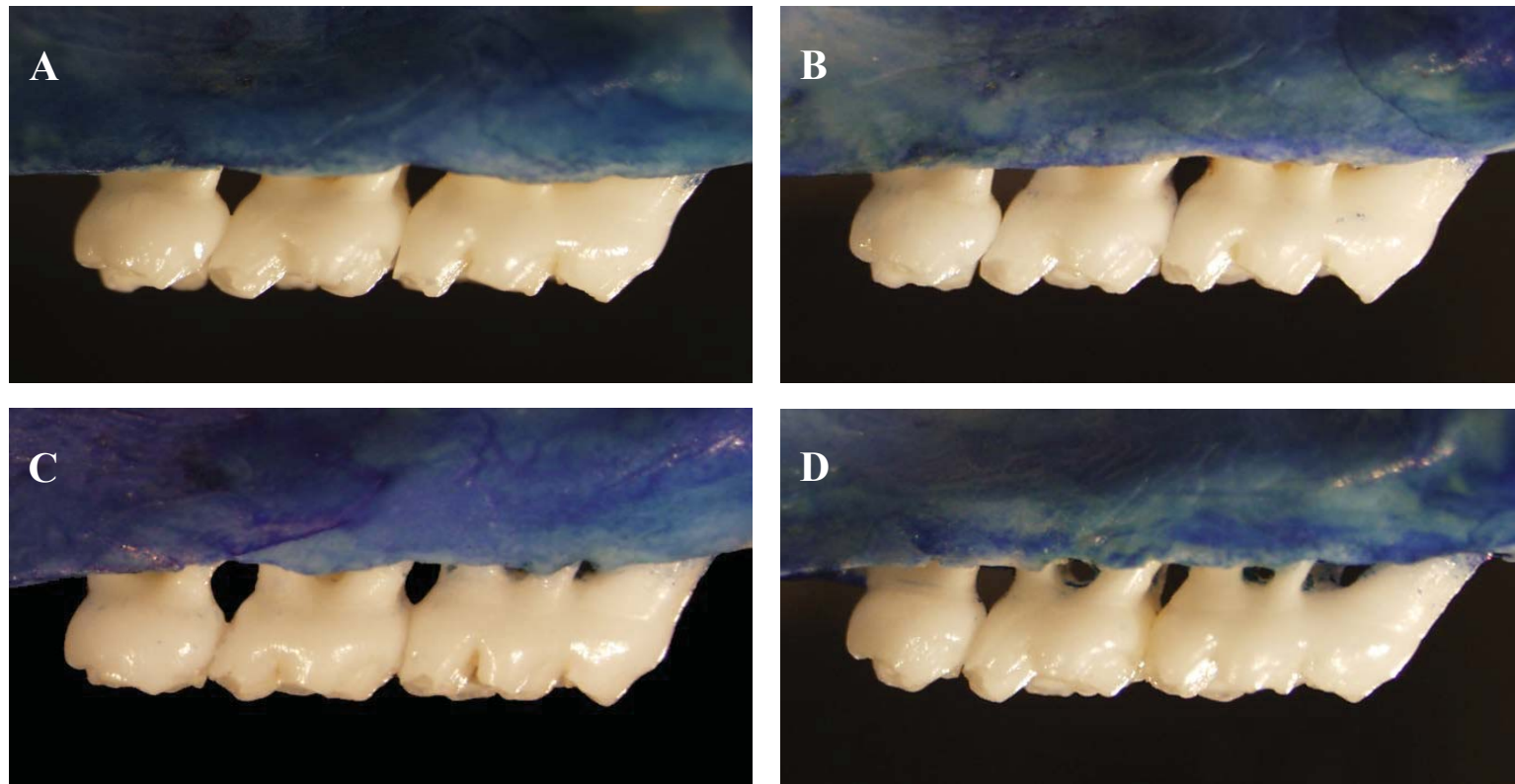


図8 ラット歯槽骨の吸収像

実験開始から60日目の歯槽骨像から骨吸収の状態を観察した。*Porphyromonas* 属細菌の接種により、歯槽骨の吸収像が認められた。A, Sham; B, *P. gingivalis* ATCC 33277; C, *P. gulae* ATCC 51700; D, *P. salivosa* ATCC 49407。

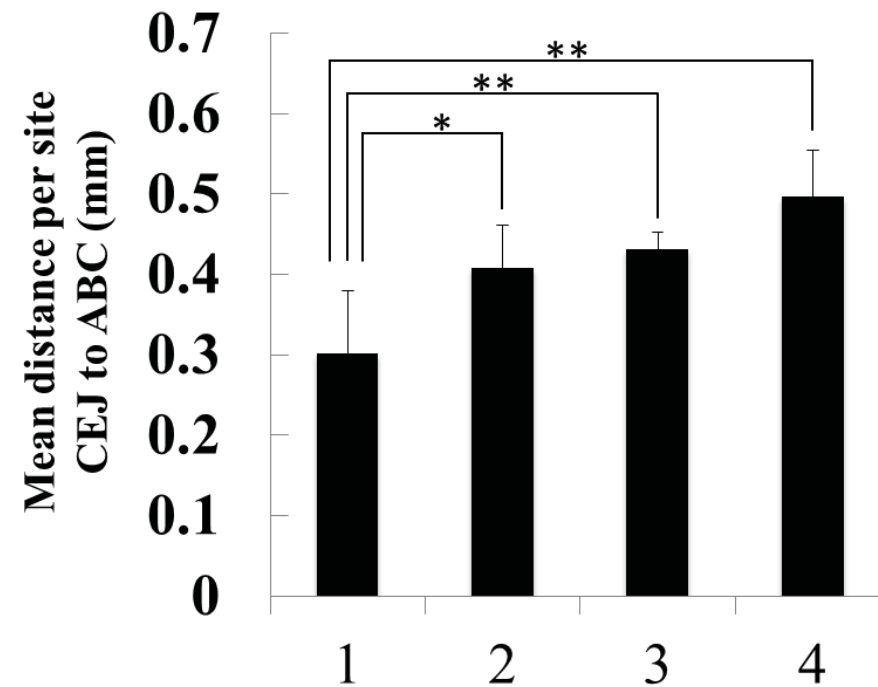


図9 ラット実験的歯周炎の歯槽骨吸収

歯槽骨の吸収量は、それぞれ6匹分の平均値を実験群の骨吸収量としてミリメートルで表し平均値と標準偏差(SD)を求めた。*Porphyromonas* 属細菌の接種により、非感染群と比較して有意な歯槽骨吸収が認められた。*P. salivosa* 感染群が最も歯槽骨吸収量が認められた。1, Sham; 2, *P. gingivalis* ATCC 33277; 3, *P. gulae* ATCC 51700; 4, *P. salivosa* ATCC 49407。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ 。