

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2018年度 博士論文

Porphyromonas salivosa 線毛の

破骨細胞分化とサイトカイン産生誘導能に関する研究

2019年3月1日

稲葉 啓太郎

Keitaro Inaba

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

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2018年度 博士論文

Porphyromonas salivosa 線毛の

破骨細胞分化とサイトカイン産生誘導能に関する研究

2019年3月1日

稲葉 啓太郎

Keitaro Inaba

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

論文内容要旨

Porphyromonas salivosa (*P. salivosa*) は、様々な動物の歯肉溝に存在するグラム陰性の偏性嫌気性黒色色素産生細菌であり、ヒト歯周病に深く関わる *P. gingivalis* と同属の菌種である。*Porphyromonas* 属の菌種に存在する線毛の口腔内定着と病原性状を明らかにすることは極めて重要な知見になると考えられる。これまでに *P. gingivalis* 線毛に関する生物学的性状に関する報告がされていることから、*P. salivosa* に存在する線毛の役割を解明することを目的とした。

これまでの *P. gingivalis* の研究結果から、菌体表層に存在する線毛は、口腔内への付着能を有することが報告されている。また、*P. gingivalis* 線毛はマクロファージや線維芽細胞を刺激しサイトカイン産生を誘導し、細菌感染による炎症反応に関与があることが示されている。しかしながら、*P. salivosa* 線毛の役割については、未だ報告が何もされていない。

本論文では、*P. salivosa* ATCC 49407 株から線毛タンパク質を精製し、マウスマクロファージを用いて破骨細胞分化誘導能とサイトカイン産生誘導能について検討し、歯周病の病原因子となりうる可能性について検討した。

P. salivosa ATCC 49407 株線毛タンパク質の精製は、超音波処理により線毛を菌体表面から剥離後、40% 硫酸により粗線毛を分画し、DEAE sepharose CL-6B 陰イオン交換クロマトグラフィーにより行った。その後、線毛に対する特異抗体を作製し、ウエスタンブロット分析と電子顕微鏡観察で確認した。また、25 匹のネコ血清に対する *P. salivosa* 全菌体の反応性をウエスタンブロット法で検討した。破骨細胞分化誘導能は、マウス骨髄細胞と MC3T3-G2/PA6 の共培養系を用いて、種々の濃度の精製線毛タンパク質で刺激して、破骨細胞の分化誘導能について検討した。成熟破骨細胞による吸収窩形成能は、マウス骨髄細胞と MC3T3-G2/PA6 の共培養により誘導した前破骨細胞を線毛タンパク質で刺激し、吸収窩の面積を測定し評価した。サイトカイン産生誘導能は、マウス骨髄細胞由来マクロファージを線毛タンパク質で刺激後に産生された IL-1 β および TNF- α 量を ELISA 法にて測定した。

その結果、*P. salivosa* ATCC49407 株の菌体表層に線毛が存在し、線毛タンパク質は分子量 60 kDa であることが確認された。また、25 匹中 17 匹のネコの血清において 60 kDa 線毛タンパク質と反応することが確認され、生後 1 年以上のネコにおいては、陽性率が 85%であった。また、60 kDa 精製線毛タンパク質は、有意な破骨細胞分化誘導能を有し、成熟破骨細胞による吸収窩の形成を誘導した。さらに、マウスマクロファージを濃度依存的に刺激し、炎症性サイトカインである IL-1 β および TNF- α の産生誘導が確認された。

以上の結果から、*P. salivosa* 菌体周囲に存在する 60 kDa 線毛は、歯周組織破壊に関わる破骨細胞分化誘導能やサイトカイン産生誘導能を有する重要な病原因子であることが示唆された。

論文審査要旨

Porphyromonas salivosa (*P. salivosa*) は、様々な動物の歯肉溝に存在するグラム陰性の偏性嫌気性黒色色素産生細菌であり、ヒト歯周病に深く関わる *P. gingivalis* と同属の菌種である。これまでに *P. gingivalis* 線毛に関する生物学的性状に関する報告がなされ、菌体表層に存在する線毛は、口腔内への付着能を有すること、マクロファージや線維芽細胞を刺激しサイトカイン産生を誘導し、細菌感染による炎症反応に関与があるとされている。本研究は、*Porphyromonas* 属の *P. salivosa* に存在する線毛の役割を、破骨細胞分化誘導能とサイトカイン産生誘導能について検討し、歯周病の病原因子となりうる可能性を評価した論文である。

実験方法は、*P. salivosa* ATCC 49407 株線毛タンパク質の精製について、超音波処理により線毛を菌体表面から剥離後、40% 硫酸により粗線毛を分画し、DEAE sepharose CL-6B 陰イオン交換クロマトグラフィーにより行っている。その後、線毛に対する特異抗体を作製し、ウエスタンブロット分析と電子顕微鏡観察で確認している。また、25 匹のネコ血清に対する *P. salivosa* 全菌体の反応性をウエスタンブロット法で検討している。破骨細胞分化誘導能については、マウス骨髄細胞と MC3T3-G2/PA6 の共培養系を用いて種々の濃度の精製線毛タンパク質で刺激して、破骨細胞の分化誘導能について検討している。成熟破骨細胞による吸収窩形成能は、マウス骨髄細胞と MC3T3-G2/PA6 の共培養により誘導した前破骨細胞を線毛タンパク質で刺激し、吸収窩の面積を評価している。サイトカイン産生誘導能は、マウス骨髄細胞由来マクロファージを線毛タンパク質で刺激後に産生された IL-1 β および TNF- α 量を ELISA 法にて測定を行っている。本研究は、線毛タンパク質分子量 60 kDa の結果をもとに、破骨細胞分化誘導能や炎症性サイトカインの産生誘導について同時に着目している点は評価されるものである。研究結果として、*P. salivosa* ATCC49407 株の菌体表層に線毛が存在し、線毛タンパク質は分子量 60 kDa であること、また 25 匹中 17 匹のネコの血清において 60 kDa 線毛タンパク質と反応することが認められ、とくに生後 1 年以上のネコにおいては陽性率が 85%であることを確認している。60 kDa 精製線毛タンパク質は、有意な破骨細胞分化誘導能を有し、成熟破骨細胞による吸収窩の形成誘導を確認している。さらに、マウスマクロファージを濃度依存的に刺激した場合、炎症性サイトカインである IL-1 β および TNF- α の産生誘導を認めている。以上より、これまで *P. salivosa* 線毛の役割についての報告はなかったが、本研究論文は *P. salivosa* 菌体周囲に存在する 60 kDa 線毛が、歯周組織破壊に関わる破骨細胞分化誘導能やサイトカイン産生誘導能を有する重要な病原因子で

あることを示した。

本審査委員会は、すべての教育課程を修了し、教育理念に相応しい成果が認められ、高度専門職として豊かな学識を有すると判定されたことから、申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

2019年3月1日

主査：児玉 利朗 教授

副査：合田 征司 教授

副査：青山 典生 准教授

目 次

緒 言	1
実験材料および方法	3
結 果	10
考 察	14
結 論	17
謝 辞	18
文 献	19
表および図	
表 1	28
図 1	29
図 2	30
図 3	31
図 4	32
図 5	33
図 6	34
図 7	35

緒 言

Porphyromonas salivosa (*P. salivosa*) は、ヒト歯周病患者の歯周ポケットから高頻度に分離される *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) と同属の黒色素産生グラム陰性嫌気性桿菌である。イヌやネコを含む様々な動物の歯肉溝から分離されることから¹⁻³⁾、イヌやネコの歯周炎との関連性が指摘されている。コソパニオンアニマルの歯周炎は、病因や病態がヒトの場合と同様であり、多くのイヌやネコが歯周炎に罹患し、年齢の増加に伴い歯周炎が増悪することが報告されている⁴⁻⁶⁾。Norris ら⁷⁾は、イヌやネコにおける歯周炎の病態と *P. salivosa* の分離頻度が非常によく相関していることを報告しており、Hardham ら⁸⁾は、イヌ歯周ポケットより分離された *P. salivosa* が、マウスを用いた実験的歯周炎モデルでの歯槽骨吸収を誘導することを報告した。また、*P. salivosa* はヒトと同じ霊長類であるサルから分離される *P. macacae* と同一の菌種であることが知られている^{9,10)}。したがって、*P. salivosa* のヒトへの伝播の可能性を考慮し、*P. salivosa* の病原性状について検討することが重要であると考える。

P. gingivalis は慢性炎症であるヒト歯周炎の主要な病原細菌である¹¹⁻¹⁴⁾。細菌の線毛は、宿主細胞への付着と侵入に関与する重要な細胞構造であり¹⁵⁻¹⁷⁾、歯周組織の炎症を誘導することが報告されている^{18,19)}。*P. gingivalis* 線毛は、細菌の菌体表面に存在する構造物で、口腔内側の構成要素（歯肉線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞を含めた宿主細胞や唾液タンパク質、常在細菌、細胞外マトリックスなど）へ特異的に付着する能力がある²⁰⁾。この接着能力は、歯周組

織破壊を引き起こす重要な病原因子であると考えられる²¹⁾。さらに、Ozaki ら²²⁾は、*P. gingivalis* 線毛がマクロファージや線維芽細胞を刺激しサイトカイン産生を誘導したことから、歯周炎での炎症反応において、線毛が病原因子として作用することを示唆した。炎症部位で活性化マクロファージなどから産生されるサイトカインである Interleukin-1 (IL-1)、Interleukin-6 (IL-6) および Tumor necrosis factor- α (TNF- α) などは、著名な破骨細胞分化と機能の促進作用を持つため骨吸収性サイトカインとも呼ばれている²³⁾。これらのサイトカインは、骨芽細胞・ストローマ細胞などの破骨細胞支持細胞において、細胞上に RANKL 発現を誘導するとともに、その可溶化を強力に促進する。可溶型 RANKL は破骨細胞の分化のみならず、細胞遊走と生存延長に作用する可能性が示唆されている²⁴⁻²⁶⁾。実際、Hamada ら²⁷⁾は、*P. gingivalis* 67 kDa 線毛がマウス腹腔マクロファージを刺激して IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 ならびに TNF- α の産生を誘導することを報告している。これらの結果は、歯周炎における炎症反応の惹起および歯槽骨吸収に、線毛が重要な役割を果たしていることを示している。

しかしながら、歯周炎における *P. salivosa* 線毛の役割はまだ分かっていない。我々はマウスマクロファージを用いて破骨細胞分化とサイトカイン産生における線毛タンパク質の役割について検討した。

実験材料および方法

1. 供試菌株及び培養条件

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 株, *P. salivosa* ATCC 49407 株を用いた。培養にはブレインハートインフュージョンブロス (BHI: Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) にイーストエキストラクト (5 mg/ml) (Becton, Dickinson and Company), ヘミン (5 µg/ml) (和光純薬, 大阪, 日本) およびビタミン K₁ (10 µg/ml) (和光純薬) を添加した BHI 培地 (BHI 液体培地) もしくは 5% ヒツジ脱繊維血 (Nippon Biotech Laboratories Inc., 埼玉, 日本) 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% CO₂, 15% H₂, 70% N₂) (ANX-1, Hirasawa Works, 東京, 日本) 37°C で培養した。

2. 線毛の精製

線毛の分離精製は、Yoshimura ら²⁸⁾の方法に従って行った。*P. salivosa* ATCC 49407 株を 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 rpm, 30 分間の遠心操作を行って集菌し, 20 mM トリス塩酸緩衝液 (和光純薬) (pH 8.0) 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面から剥離した。さらに, INSONATOR 201 M (KUBOTA, 東京, 日本) 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分画を 10,000 rpm 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（和光純薬）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 トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）に懸濁し未破壊の菌体を除去する目的で，10,000 rpm 4°C で 30 分間遠心操作を行い，上清を同緩衝液により 2 日間透析した。粗線毛分画を含有する透析液を 20 mM トリス塩酸緩衝液（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 Healthcare, CT, USA）（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 トリス塩酸緩衝液で洗浄し，次いで 0 M から 0.3 M の NaCl（和光純薬）の直線濃度勾配で溶出した。各分画のタンパク質含有量は，280 nm での紫外線波長により測定した。

3. SDS-PAGE

DEAE Sepharose CL-6B にて溶出した線毛分画を 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 トリス塩酸，2%メルカプトエタノール（和光純薬），10%グリセロール（和光純薬），0.002% ブロムフェノールブルー（和光純薬），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% 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 (和光純薬) と銀染色 II キットワコー (和光純薬) を用いて染色を行った。分子量マーカーは、precision plus protein™ standards dual color (Bio-Rad, CA, USA) を使用した。

4. ポリクロナール抗体の作製

ポリクロナール抗体の作製は、精製 60 kDa 線毛タンパク質を抗原として BALB/c マウス (日本 SLC, 静岡, 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 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°C で保管した。尚、本研究は、神奈川歯科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. 17-026, 17-051)。

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% SDS-PAGE によって分離されたタンパク質をゲルから、PVDF Membranes for Protein Blotting (PVDF メンブレン: Bio-Rad) に 200 mA の定電流 1 時間処理により転写後、非特異性吸着反応を起こさないように 1% ウシ血清アルブミン (BSA: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む Tris Buffered Saline (TBS 溶液: 20 mM トリス塩酸 pH 7.4, 0.5 M 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 60 kDa 線毛血清を一昼夜 4°C 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 (GE Healthcare) を 37°C で 1 時間作用させた後、余剰の抗体を TBS-Tween 溶液 (20 mM トリス塩酸 pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween) で洗浄し、4-クロロ-1-ナフトール溶液 (Sigma) を用いて検出した。

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 時間培養後 *P. salivosa* 菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS : 日水製薬, 東京, 日本) (pH 7.4) で洗浄し、カーボンコートしたコロジオン膜 (日新 EM, 東京, 日本) のグリット上で 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, 東京, 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. ネコ血清中の 60 kDa 線毛に対する抗体の検出

ネコ血清は横須賀市の小川動物病院から提供していただいた (4 ヶ月~16 歳, 雄 12 匹, 雌 13 匹)。粗線毛画分のタンパク質を 12% SDS-PAGE によって分離し、ゲルから PVDF メンブレンに 200 mA の定電流 1 時間処理により転写後、非特異性吸着反応を起こさないように 1% BSA を含む TBS 溶液を用いて、1 時

間ブロッキング操作を行った。このメンブレンにネコから採取した血清を一昼夜 4°C 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ネコ IgG 抗体 (Invitrogen, CA, USA) を 37°C で 1 時間作用させた後、余剰の抗体を TBS-Tween 溶液で洗浄し、4-クロロ-1-ナフトール溶液を用いて検出操作を行った。

8. 破骨細胞分化誘導能

破骨細胞分化は、MC3T3-G2/PA6 (PA6) 細胞との共培養系を用いて行った。PA6 細胞は、C57BL/6N マウスの頭蓋新生骨から樹立され、Udagawa ら²⁹⁾より提供された。BALB/c マウス大腿骨より無菌的に採取した骨髄細胞 (1×10^7 cells/well) と PA6 細胞 (1×10^6 cells/well) を 20% ウシ胎児血清 (FBS : Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) , 10^{-8} M dexamethasone (DEX : Sigma) , 2 ng/ml RANKL (Sigma) and 10^{-8} M $1\alpha,25$ (OH) $_2$ D $_3$ (活性型ビタミン D $_3$: 和光純薬) を含む α -Minimum Essential Media (α -MEM : Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて 48 well plate (住友ベークライト, 東京, 日本) へ播種した。また、精製線毛タンパク質 (1.0, 0.1, 0.01, 0.001 μ g/ml) または *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) F583 (1.0 μ g/ml) (Sigma) を添加し、5% CO $_2$ 下、37°C にて 7 日間培養した。7 日間培養後、培養細胞は破骨細胞の酵素のマーカである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色液を用いて染色し

た。TRAP 染色液はナフトール AS-MX ホスファターゼ (Sigma) , ナトリウム酒石酸塩 (Sigma) , ファーストバイオレッド LB 塩 (Sigma) により作製した。3 核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞としてカウントした³⁰⁾。 *P. salivosa* 線毛タンパク質を添加していないものをネガティブコントロール, *E. coli* LPS を添加したものをポジティブコントロールとした。

9. 吸収窩形成能

吸収窩の測定は Kawata ら³¹⁾の方法にいくつかの変更を加えて行われた。破骨細胞前駆細胞は以下の通りに準備した。100 mm ディッシュ (Corning Inc., NY, USA) にて 2% I 型コラーゲン (新田ゼラチン, 大阪, 日本), 10% FBS, マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF : Sigma), RANKL, DEX, 活性型ビタミン D₃ を含んだ α -MEM を用いて BALB/c マウス骨髄細胞を 7 日間培養した。マウス破骨細胞前駆細胞をさらに Osteo Assay Surface Multiple Well Plates (Corning Inc.) にて RANKL, M-CSF, DEX, 活性型ビタミン D₃, *P. salivosa* 線毛タンパク質または *E. coli* LPS を含んだ α -MEM を用いて 7 日間培養した。培養後, 細胞に 10% 漂白溶液を 5 分間作用させ, dH₂O で 2 回洗浄した。それぞれのウェルを Olympus image analysis system (オリンパス, 東京, 日本) を使用して計測した。結果は平均値 \pm standard deviation (SD) として表記した。

10. サイトカイン産生誘導能

BALB/c マウス骨髄細胞を 10% FBS および 100 ng/ml M-CSF 添加 α -MEM 培地を用いて 16 時間 5% CO₂ 下で培養した。その後、非付着細胞を採取し、同培地を用いてさらに 2 日間培養し、付着した細胞をマウスマクロファージとした。炎症性サイトカインの産生性の検討は、96 well culture plate（住友ベークライト）を用いてマウスマクロファージ（ 5×10^5 cells/well）を播種した後、種々の濃度の *P. salivosa* 線毛タンパク質あるいは *E. coli* LPS を添加し 6 時間培養した。6 時間後、上清を回収し、サイトカイン測定まで -80°C で保管した。IL-1 β と TNF- α のサイトカイン量は Quantikine ELISA（biotechne, MN, USA）を用いて enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法にて測定した。試験結果は、それぞれ作成した検量線を用いて決定した。

11. 統計学的分析

破骨細胞分化誘導能と吸収窩の形成誘導能の検定は、Dunnett 検定により、統計解析ソフト エクセル統計 Bellcurve for excel 2.15（社会情報サービス、東京、日本）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* 線毛タンパク質の電子顕微鏡観察

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 (図 1 A)。

2. 線毛の精製

P. salivosa ATCC 49407 株の線毛タンパク質を含む分画をセファロース CL-6B 陰イオン交換カラムを用いて *P. salivosa* ATCC 49407 株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 C)。硫酸塩析で得られたタンパク質と精製タンパク質を 12% SDS-PAGE で確認したところ、分子量 60 kDa の位置に単一バンドとして確認された。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、他に混入物は認められなかった。この精製タンパク質を電子顕微鏡観察したところ、線毛構造が確認された (図 1 B)。

3. ウェスタンブロット分析

P. salivosa ATCC 49407 株と *P. gingivalis* ATCC 33277 株での 60 kDa 線毛の存在を確認するため、抗 60 kDa 線毛血清を用いた。その結果、SDS-PAGE で 60 kDa に相当するタンパク質は *P. gingivalis* ATCC 33277 株では確認されなかった (図 2 A)。ウェスタンブロット法では、抗 60 kDa 線毛血清は、線毛構造

物と確認された *P. salivosa* 精製 60 kDa 線毛のみに反応することが確認された (図 2 B)。また, *P. gingivalis* ATCC 33277 株全菌体と反応するバンドは確認されなかった。したがって, *P. salivosa* ATCC 49407 株線毛タンパク質は, *P. gingivalis* ATCC 33277 株とは抗原性の異なる線毛であることが確認された。

4. ネコ血清中の 60 kDa 線毛に対する抗体の検出

P. salivosa の感染を確認するため, 25 匹のネコ血清を用いて, *P. salivosa* ATCC 49407 株粗線毛画分のタンパク質を用いて抗体の有無を検討した。その結果, 25 匹中 17 匹のネコ血清において 60 kDa に相当するタンパク質と反応することが確認された (図 3)。また, 生後 1 年以上のネコにおいては, 陽性率 85%, 雄 8 匹, 雌 9 匹であった。

5. 破骨細胞分化誘導能

BALB/c マウス骨髄細胞を種々の濃度の精製線毛タンパク質または *E. coli* LPS で刺激し, 破骨細胞の分化誘導能を検討した。破骨細胞分化は 60 kDa 精製線毛タンパク質により有意に増強された (図 4)。処置後の多核の TRAP 陽性細胞数は, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ において 551.67 ± 36.81 cells/well, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ において 312.00 ± 24.18 cells/well, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ において 174.67 ± 33.69 cells/well, 0.001 $\mu\text{g/ml}$ において 90.33 ± 7.36 cells/well, 非刺激時において 56.00 ± 14.31 cells/well, *E. coli* LPS 1.0 $\mu\text{g/ml}$ において 481.00 ± 15.25 cells/well であった (図 5)。*P. salivosa* 精製線

毛タンパク質は 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において、*E. coli* LPS と同等の破骨細胞分化誘導能を示した。1.0 $\mu\text{g/ml}$ 線毛タンパク質の刺激により破骨細胞形成は最大となり、非添加時と比較し 9.85 倍となった。

6. 吸収窩形成能

吸収窩の測定は、マウス骨髄細胞と PA6 の共培養により誘導した前破骨細胞を 60 kDa 線毛タンパク質で刺激し、吸収窩の面積を測定することで評価した。吸収窩の形成は、すべてのウェルで確認された (図 6)。吸収窩総面積は、精製線毛タンパク質 1.0 $\mu\text{g/ml}$ において $12.78 \pm 1.57 \text{ mm}^2$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ において $13.55 \pm 0.96 \text{ mm}^2$ 、0.01 $\mu\text{g/ml}$ において $9.30 \pm 0.33 \text{ mm}^2$ 、0.001 $\mu\text{g/ml}$ において $8.53 \pm 1.15 \text{ mm}^2$ 、非刺激時において $3.06 \pm 0.56 \text{ mm}^2$ 、RANKL 30 ng/ml において $9.97 \pm 0.96 \text{ mm}^2$ であった (図 7)。

7. サイトカイン産生誘導能

サイトカイン産生誘導能は、マウス骨髄細胞由来マクロファージを種々の濃度の線毛タンパク質で刺激後、培養上清中に産生された IL-1 β および TNF- α 量を ELISA 法にて測定した。IL-1 β の産生は、精製線毛タンパク質 1.0 $\mu\text{g/ml}$ において $64.99 \pm 5.64 \text{ pg/ml}$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ において $11.21 \pm 1.17 \text{ pg/ml}$ 、0.01 $\mu\text{g/ml}$ において $0.00 \pm 0.30 \text{ pg/ml}$ 、非刺激時において $0.00 \pm 0.61 \text{ pg/ml}$ 、*E. coli* LPS 1.0 $\mu\text{g/ml}$ において 161.55 ± 10.80 、TNF- α の産生は、1.0 $\mu\text{g/ml}$ において $4270.30 \pm$

45.45 pg/ml, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ において 1076.91 ± 66.54 pg/ml, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ において 11.00 ± 1.41 pg/ml, 非刺激時において 0.00 ± 0.56 pg/ml, *E. coli* LPS 1.0 $\mu\text{g/ml}$ において 1683.73 ± 170.80 pg/ml であった (表 1)。TNF- α 産生量は精製線毛タンパク質 1.0 $\mu\text{g/ml}$ において同濃度の *E. coli* LPS と比較し, 2.5 倍の値を示した。また, IL-1 β 産生量は, 同濃度の *E. coli* LPS と比較し 0.4 倍であったが, 非刺激時と比較すると有意に高かった。

考 察

コンパニオンアニマルの歯周炎の臨床症状は、ヒトと同様に歯肉の炎症、歯周ポケットの増加、アタッチメントロスと歯槽骨吸収によって特徴づけられる。したがって、歯周炎はヒトだけでなく、コンパニオンアニマルにおいても重大な疾患と考えられる。近年、歯周炎において重要な病原細菌と考えられる黒色色素産生嫌気性菌である *Porphyromonas* 属のいくつかは、動物の口腔から分離されており、その病原性状について検討する必要があると考えられる。Sasaki³²⁾は、イヌ歯周炎の病原細菌とされる *P. gulae* が保有する 41 kDa 線毛には、マウス骨髄細胞の破骨細胞への分化能およびサイトカイン産生誘導能が認められることを報告している。

本研究において、*Porphyromonas salivosa* ATCC 49407 株の菌体表層には線毛構造物が存在することが電子顕微鏡観察により明らかとなり、DEAE Sepharose CL-6B 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製線毛タンパク質を得ることに成功した。SDS-PAGE において得られた精製線毛タンパク質は、分子量 60 kDa であり、単一バンドとして確認された。このタンパク質は、*P. gingivalis* 菌体には存在しないことが SDS-PAGE と抗 60 kDa 線毛血清を用いたウェスタンブロッティングにおいて確認された (図 2)。このことから、*P. salivosa* の 60 kDa 線毛タンパク質は *P. gingivalis* 菌体に存在する線毛タンパク質とは分子量

と抗原性が明らかに異なるタンパク質であることが判明した。

ネコ血清中の 60 kDa 線毛タンパク質抗体の検出では、25 匹中 17 匹のネコ血清において 60 kDa に相当する線毛タンパク質と反応することが確認され、生後 1 年以上のネコにおいて陽性率 85% で検出されたことから (図 3)、加齢により多くのネコが *P. salivosa* に感染していることが判明した。*P. salivosa* 60 kDa 線毛抗体に対する抗体が確認されない 8 匹のネコは 62.5% が生後 1 年未満であり、*P. salivosa* の感染が認められていないと考えられた。

P. gingivalis 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を刺激して炎症性サイトカインを誘導することが報告されている^{27,33)}。破骨細胞分化誘導能では、60 kDa 線毛タンパク質の添加により濃度依存的に破骨細胞数の増加が認められ、1.0 µg/ml 濃度の線毛タンパク質は同濃度の *E. coli* LPS F583 よりも破骨細胞分化誘導能が高く認められた (図 4, 5)。また、吸収窩の形成は、60 kDa 線毛タンパク質の添加により有意に吸収窩面積の拡大が認められ (図 6, 7)、60 kDa 線毛タンパク質の濃度に依存して増強された ($P < 0.01$)。これらの結果は、*P. salivosa* 60 kDa 線毛には *P. gingivalis* 線毛や *P. gulae* 線毛と同様に歯周炎における歯槽骨吸収を惹起する可能性があることを示唆している。

炎症性サイトカインは、歯周炎における歯槽骨吸収に関与していることが報告されている^{34,35)}。特に、IL-1 および TNF- α は単球・マクロファージから産

生され、骨芽細胞の RANKL 発現を増強することで破骨細胞の分化を誘導することが知られている³⁶⁾。本研究においても、マウスマクロファージによる IL-1 β および TNF- α 産生は、60 kDa 線毛タンパク質の添加により有意に産生誘導が認められた (表 1)。

以上の結果から、*P. salivosa* 60 kDa 線毛タンパク質は、破骨細胞への分化誘導能、吸収窩形成能ならびに骨吸収性サイトカイン産生を誘導することにより、歯周炎の発症および増悪に関係していることが示唆された。

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 Sepharose CL-6B カラムを用いて精製された *P. salivosa* 線毛は、推定分子量 60 kDa のタンパク質であった。

2. 電子顕微鏡観察から、精製 60 kDa タンパク質は線毛構造として確認された。

3. *P. salivosa* 60 kDa 線毛タンパク質は、*P. gingivalis* には存在せず、*P. gingivalis* 線毛タンパク質とは分子量と抗原性の異なることが明らかとなった。

4. ネコ血清中の 60 kDa 線毛タンパク質に対する抗体は、多くのネコに感染していることと抗原性を有していることが判明した。

5. 破骨細胞分化誘導能、吸収窩の形成能と炎症性サイトカイン産生能が濃度依存的に認められた。

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 高度先進口腔医学講
座 児玉利朗教授、口腔科学講座 合田征司教授ならびに口腔統合医療学講座
青山典生准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. Lenzo JC, O'Brien-Simpson NM, Orth RK, Mitchell HL, Dashper SG, Reynolds EC. *Porphyromonas gulae* Has Virulence and Immunological Characteristics Similar to Those of the Human Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* **84**(9): 2575-2585, 2016.
2. Love DN, Karjalainen J, Kanervo A, Forsblom B, Sarkiala E, Bailey GD, Wigney DI, Jousimies-Somer H. *Porphyromonas canoris* sp. nov., an asaccharolytic, black-pigmented species from the gingival sulcus of dogs. *Int J Syst Bacteriol* **44**(2): 204-208, 1994.
3. Norris JM, Love DN. Serum antibody responses of cats to soluble whole cell antigens and isolated fimbriae of feline *Porphyromonas salivosa* (*macacae*) and associations with periodontal disease. *Vet Microbiol* **79**(3): 225-237, 2001.
4. Harvey CE. Periodontal disease in dogs. Etiopathogenesis, prevalence, and significance. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **28**(5): 1111-1128, 1998.
5. Lommer MJ, Verstraete FJ. Radiographic patterns of periodontitis in cats: 147 cases (1998-1999). *J Am Vet Med Assoc* **218**(2): 230-234, 2001.
6. Wallis C, Patel KV, Marshall M, Staunton R, Milella L, Harris S, Holcombe LJ. A longitudinal assessment of periodontal health status in 53 Labrador retrievers.

- J Small Anim Pract **59**(9): 560-569, 2018.
7. Norris JM, Love DN. Associations amongst three feline *Porphyromonas* species from the gingival margin of cats during periodontal health and disease. Vet Microbiol **65**(3): 195-207, 1999.
 8. Hardhama J, Dreier K, Wong J, Afintescu C, Evans RT. Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. Vet Microbiol **106**(1-2): 119-128, 2005.
 9. Love DN. *Porphyromonas macacae* comb. nov., a Consequence of *Bacteroides macacae* Being a Senior Synonym of *Polphyromonas salivosa*. Int J Syst Bacteriol **45**(2)1: 90-92, 1995.
 10. Paster BJ, Dewhirst FE, Olsen I, Fraser GJ. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. J Bacteriol **176**(3):725-732. 1994.
 11. Genco CA, Van Dyke T, Amar S. Animal models for *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. Trends in microbiology **6**(11): 444-449, 1998.
 12. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1244-1263, 1998.
 13. Landi L, Amar S, Polins AS, Van Dyke TE. Host mechanisms in the pathogenesis of periodontal disease. Current opinion in periodontology **4**: 3-10, 1997.

14. Van Winkelhoff AJ, de Graaff J. Microbiology in the management of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* **18**(6): 406-410, 1991.
15. 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.
16. Lamont RJ, Jenkinson HF. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral microbiology and immunology* **15**(6): 341-349, 2000.
17. Yilmaz O, Watanabe K, Lamont RJ. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cellular microbiology* **4**(5): 305-314, 2002.
18. Amano A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontology 2000* **52**(1): 12-37, 2010.
19. Hajishengallis G, Wang M, 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. *Advances in experimental medicine and biology* **632**: 203-219, 2008.
20. Goulbourne PA, Ellen RP. Evidence that *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae function in adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J Bacteriol*

- 173**(17): 5266-5274, 1991.
21. 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.
 22. Ozaki K, Hanazawa S. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae inhibit caspase-3-mediated apoptosis of monocytic THP-1 cells under growth factor deprivation via extracellular signal-regulated kinase-dependent expression of p21 Cip/WAF1. *Infect Immun* **69**(8): 4944-4950, 2001.
 23. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* **83**(3): 170-179, 2005.
 24. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* **7**(4): 292-304, 2007.
 25. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* **20**: 795-823, 2002.
 26. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by

- osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* **275**(3): 768-775, 2000.
27. Hamada N, Watanabe K, Arai M, Hiramane H, Umemoto T. Cytokine production induced by a 67-kDa fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol, Immunol* **17**(3): 197-200, 2002.
28. 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.
29. 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.
30. Kanatani M, Sugimoto T, Kaji H, Kobayashi T, Nishiyama K, Fukase M, Kumegawa M, Chihara K. Stimulatory effect of bone morphogenetic protein-2 on osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity. *J Bone Miner Res* **10**(11): 1681-1690, 1995.
31. Kawata Y, Hanazawa S, Amano S, Murakami Y, Matsumoto T, Nishida K, Kitano S. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae stimulate bone resorption in vitro. *Infect*

- Immun **62**(7): 3012-3016, 1994.
32. 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.
 33. 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 **13**(3): 129-138, 1998.
 34. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. J Periodontol **79**(8): 1585-1591, 2008.
 35. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. Periodontology 2000 **52**(1): 163-206, 2010.
 36. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: The key to bone resorption in periodontal disease. J Periodontol **76**(11): 2033-2041, 2005.

付図説明

図 1 電子顕微鏡像

P. salivosa ATCC 49407 株菌体表面に線毛構造が確認された (A)。60 kDa 精製線毛タンパク質の電子顕微鏡像 (B) と SDS-PAGE 像 (C)。S, スタンダードプロテイン; レーン 1, *P. salivosa* 粗線毛画分; レーン 2, 60 kDa 精製タンパク質。スケールバー: 200 nm。

図 2 *P. salivosa* 線毛のウエスタンブロットティング分析

P. gingivalis ATCC 33277 株, *P. salivosa* ATCC 49407 株を 12% SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った (A)。レーン 1, *P. gingivalis* ATCC 33277 ; レーン 2, *P. salivosa* ATCC 49407。また, PVDF メンブレンに転写し, 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を行った (B)。S, スタンダードプロテイン; レーン 1, *P. gingivalis* ATCC 33277 ; レーン 2, *P. salivosa* ATCC 49407。

* : 60 kDa

図3 ネコ血清を用いたウエスタンブロッティング分析

粗線毛分画を 12% SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンを短冊状に切断し、ネコ血清を作用させた。その後、抗ネコ IgG 抗体を作用させた。25 匹中 17 匹のネコ血清において 60 kDa に相当するタンパク質と反応することが確認された。

図4 破骨細胞の TRAP 染色像

マウス骨髄由来マクロファージに *P. salivosa* 60 kDa 線毛タンパク質および *E. coli* LPS を添加し、破骨細胞の分化を観察した。A, 線毛 1.0 $\mu\text{g/ml}$; B, 線毛 0.1 $\mu\text{g/ml}$; C, 線毛 0.01 $\mu\text{g/ml}$; D, 線毛 0.001 $\mu\text{g/ml}$; E, コントロール ; F, *E. coli* LPS 1.0 $\mu\text{g/ml}$ スケールバー : 200 μm 。

図5 線毛タンパク質による破骨細胞分化誘導

P. salivosa 60 kDa 線毛タンパク質の添加により、有意に破骨細胞分化誘導が増強された。特に、1.0 $\mu\text{g/ml}$ の添加で、同濃度の *E. coli* LPS と同程度の増強が認められた。A, 線毛 1.0 $\mu\text{g/ml}$; B, 線毛 0.1 $\mu\text{g/ml}$; C, 線毛 0.01 $\mu\text{g/ml}$; D, 線毛 0.001 $\mu\text{g/ml}$; E, コントロール ; F, *E. coli* LPS 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ** : $P < 0.01$ Dunnett 検定

図6 破骨細胞による吸収像

マウス骨髄由来マクロファージに *P. salivosa* 60 kDa 線毛タンパク質および RANKL を添加し、破骨細胞による吸収を観察した。A, 線毛 1.0 $\mu\text{g/ml}$; B, 線毛 0.1 $\mu\text{g/ml}$; C, 線毛 0.01 $\mu\text{g/ml}$; D, 線毛 0.001 $\mu\text{g/ml}$; E, コントロール; F, RANKL 30 ng/ml スケールバー : 200 μm 。

図7 吸収窩の測定

マウス骨髄由来マクロファージに *P. salivosa* 60 kDa 線毛タンパク質および *E. coli* LPS を添加し、吸収窩の面積を測定した。60 kDa 線毛タンパク質の添加により、有意に吸収の増強が認められた。A, 線毛 1.0 $\mu\text{g/ml}$; B, 線毛 0.1 $\mu\text{g/ml}$; C, 線毛 0.01 $\mu\text{g/ml}$; D, 線毛 0.001 $\mu\text{g/ml}$; E, コントロール; F, RANKL 30 ng/ml

** : $P < 0.01$ Dunnett 検定

表1 マクロファージの炎症性サイトカイン産生能

Stimulant	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Cytokine level (pg/ml)	
		IL-1 β	TNF- α
<i>P. salivosa</i> 60-kDa fimbriae	1.0	64.99 \pm 5.64	4270.30 \pm 45.45
	0.1	11.21 \pm 1.17	1076.91 \pm 66.54
	0.01	0.00 \pm 0.30	11.00 \pm 1.41
<i>E coli</i> LPS F583	1.0	161.55 \pm 10.80	1683.73 \pm 170.77
	None	0.00 \pm 0.61	0.00 \pm 0.56

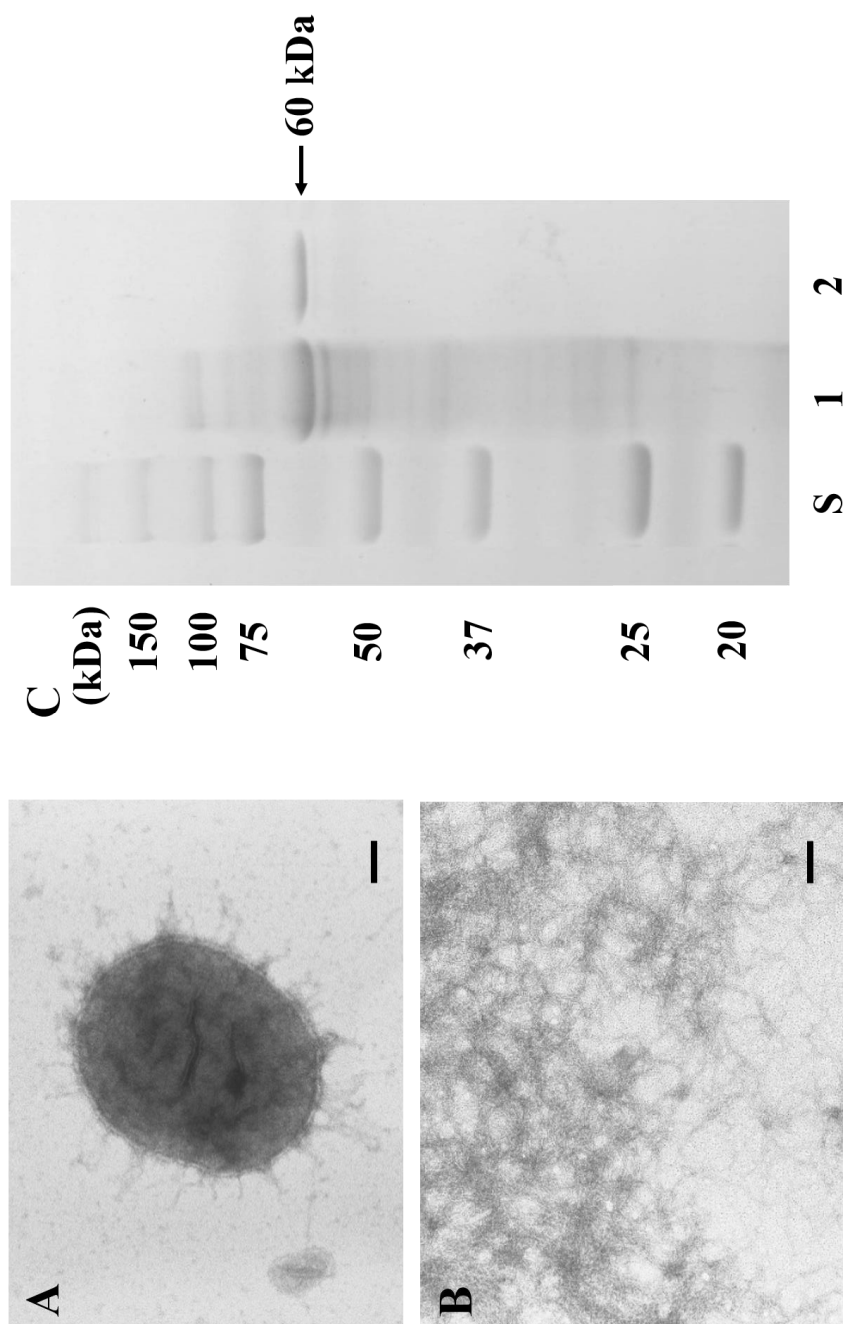


図1 電子顕微鏡像

P. salivosa ATCC 49407 株菌体表面に線毛構造が確認された (A)。60 kDa 精製線毛タンパク質の電子顕微鏡像 (B) と SDS-PAGE 像 (C)。S, スタンダードプロテイン; レーン 1, *P. salivosa* 粗線毛画分; レーン 2, 60 kDa 精製タンパク質。スケールバー: 200 nm。

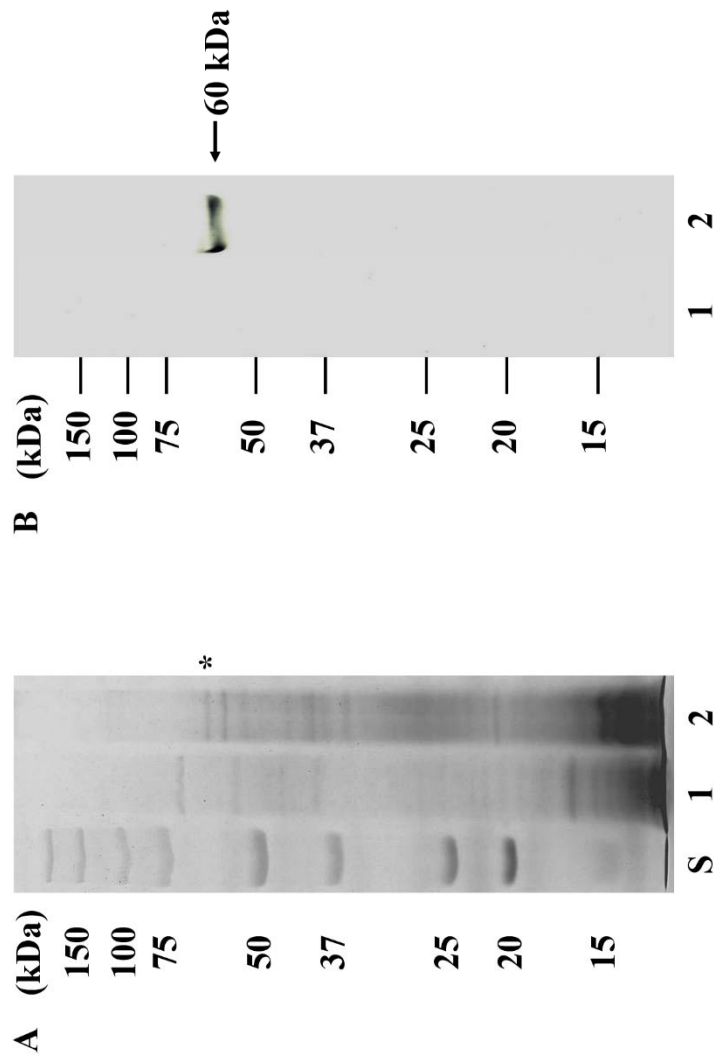


図2 *P. salivosa* 線毛のウエスタンブロットティング分析

P. gingivalis ATCC 33277 株, *P. salivosa* ATCC 49407 株を 12% SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った (A)。レーン1, *P. gingivalis* ATCC 33277 ; レーン2, *P. salivosa* ATCC 49407。また, PVDF メンブレンに転写し, 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を行った (B)。S, スタンダードプロテイン; レーン1, *P. gingivalis* ATCC 33277 ; レーン2, *P. salivosa* ATCC 49407。* : 60 kDa

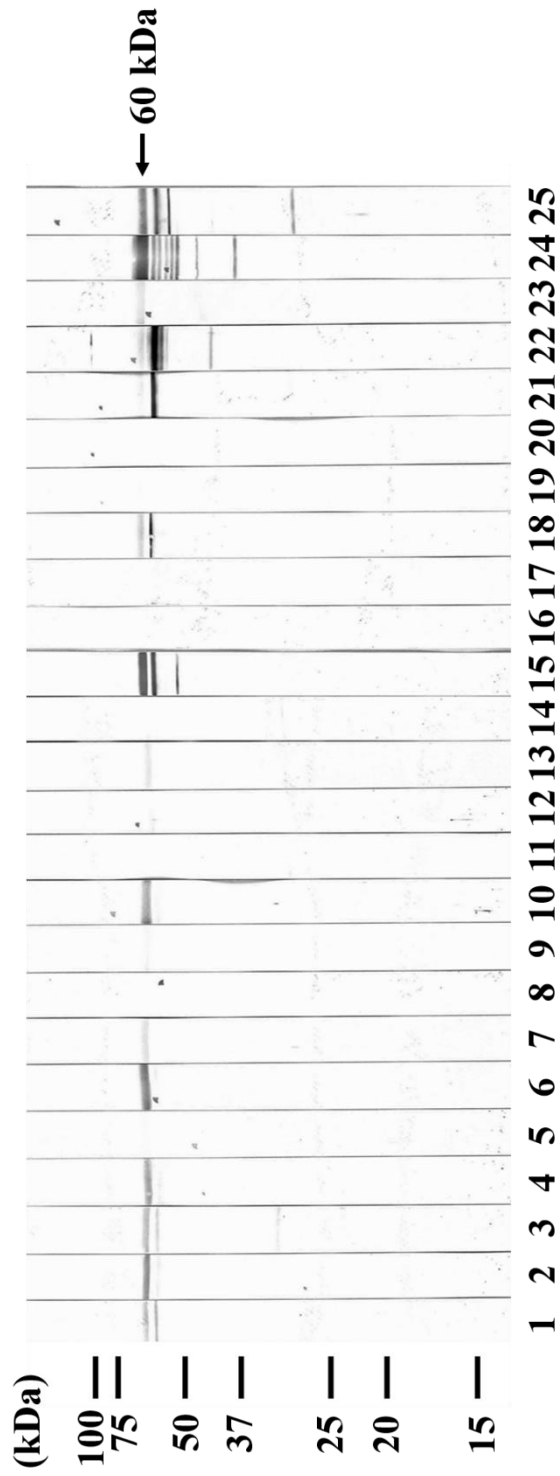


図3 ネコ血清を用いたウエスタブロットティング分析
粗線毛分画を 12% SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンを短冊状に切断し、ネコ血清を作用させた。その後、抗ネコ IgG 抗体を作用させた。25 匹中 17 匹のネコ血清において 60 kDa に相当するタンパク質と反応することが確認された。

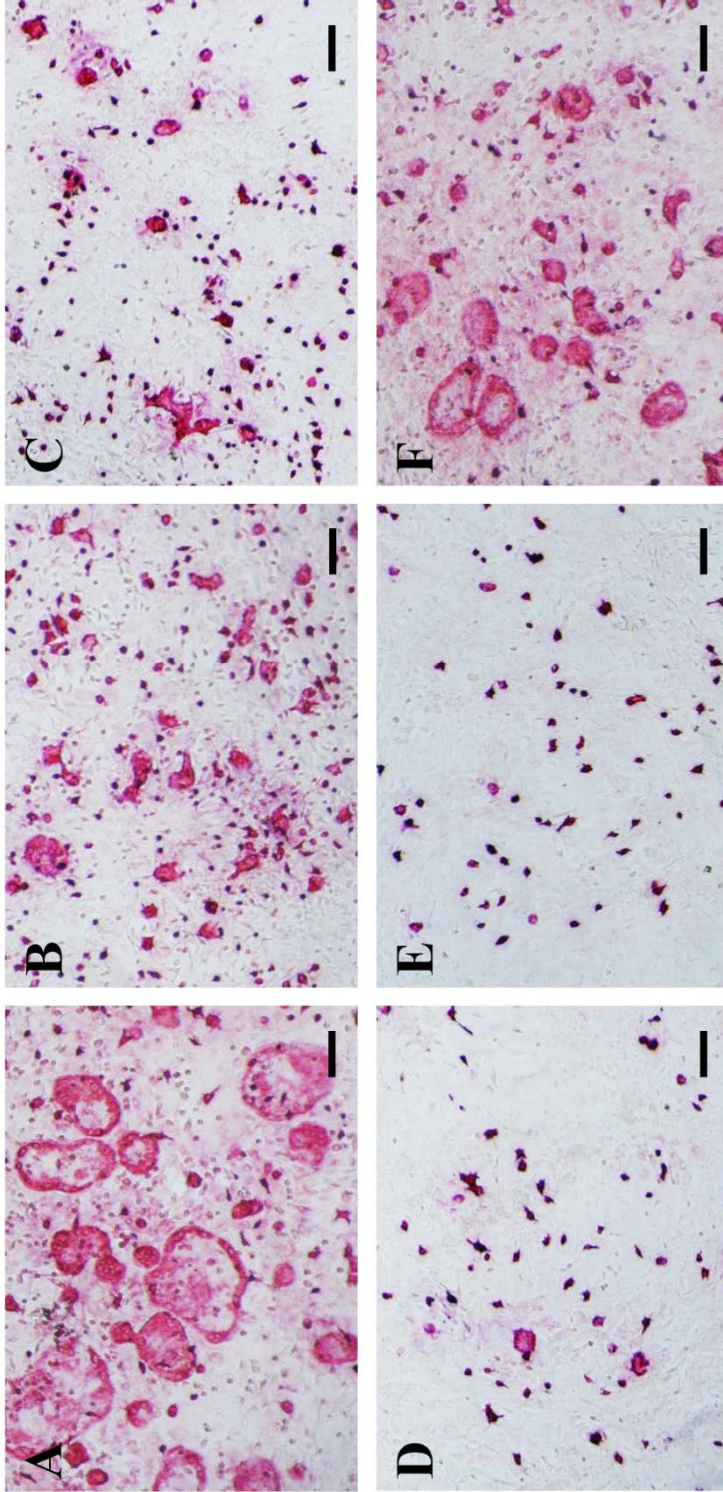


図4 破骨細胞のTRAP染色像
 マウス骨髄由来マクロファージに *P. salivosa* 60 kDa 線毛タンパク質および *E. coli* LPS を添加し、破骨細胞の分化を観察した。A, 線毛 1.0 µg/ml ; B, 線毛 0.1 µg/ml ; C, 線毛 0.01 µg/ml ; D, 線毛 0.001 µg/ml ; E, コントロール ; F, *E. coli* LPS 1.0 µg/ml スケールバー : 200 µm。

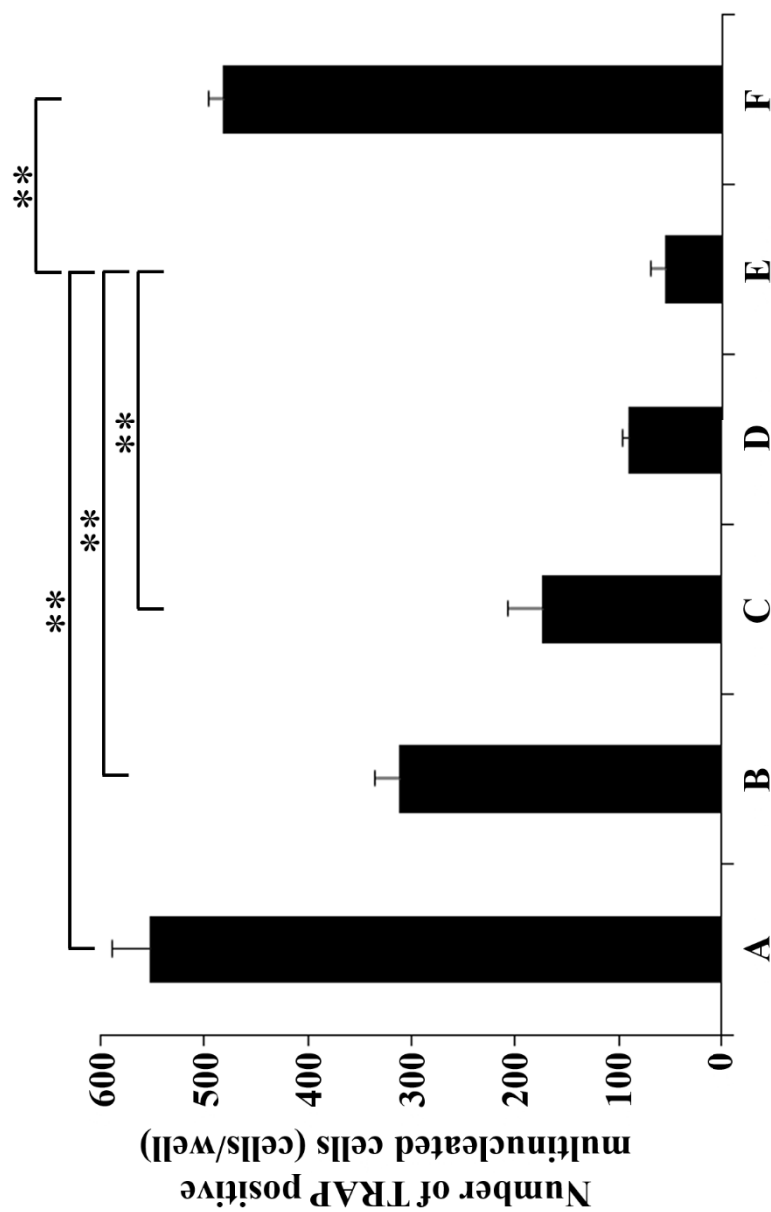


図5 線毛タンパク質による破骨細胞分化誘導
P. salivosa 60 kDa 線毛タンパク質の添加により，有意に破骨細胞分化誘導が増強された。特に，1.0 $\mu\text{g/ml}$ の添加で，同濃度の *E. coli* LPS と同程度の増強が認められた。A，線毛 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ；B，線毛 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ；C，線毛 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ；D，線毛 0.001 $\mu\text{g/ml}$ ；E，コントロール；F，*E. coli* LPS 1.0 $\mu\text{g/ml}$ **：P<0.01 Dunnett 検定

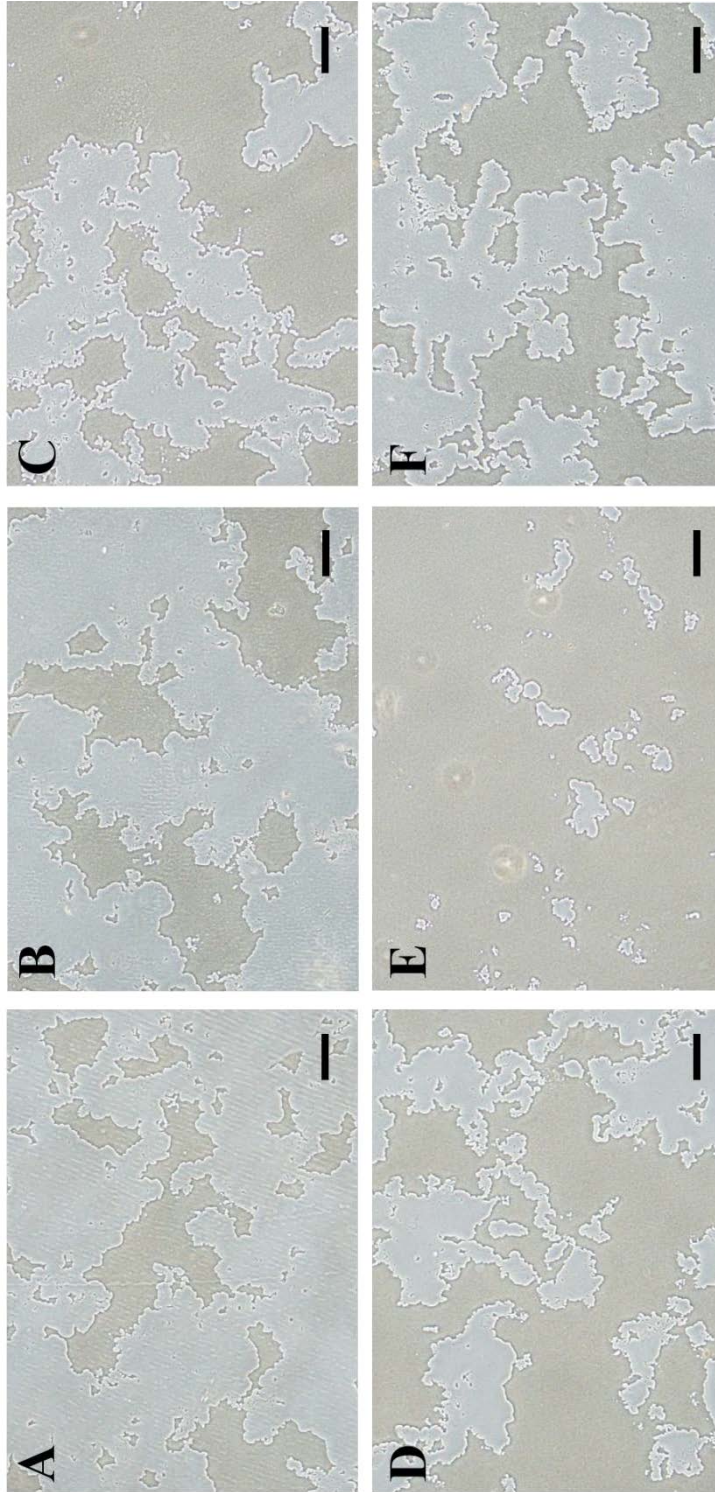


図6 破骨細胞による吸収像
マウス骨髄由来マクロファージに *P. salivosa* 60 kDa 線毛タンパク質およびRANKL を添加し，破骨細胞による吸収を観察した。A, 線毛 1.0 µg/ml ; B, 線毛 0.1 µg/ml ; C, 線毛 0.001 µg/ml ; D, コントロール ; E, RANKL 30 ng/ml スケールバー : 200 µm。

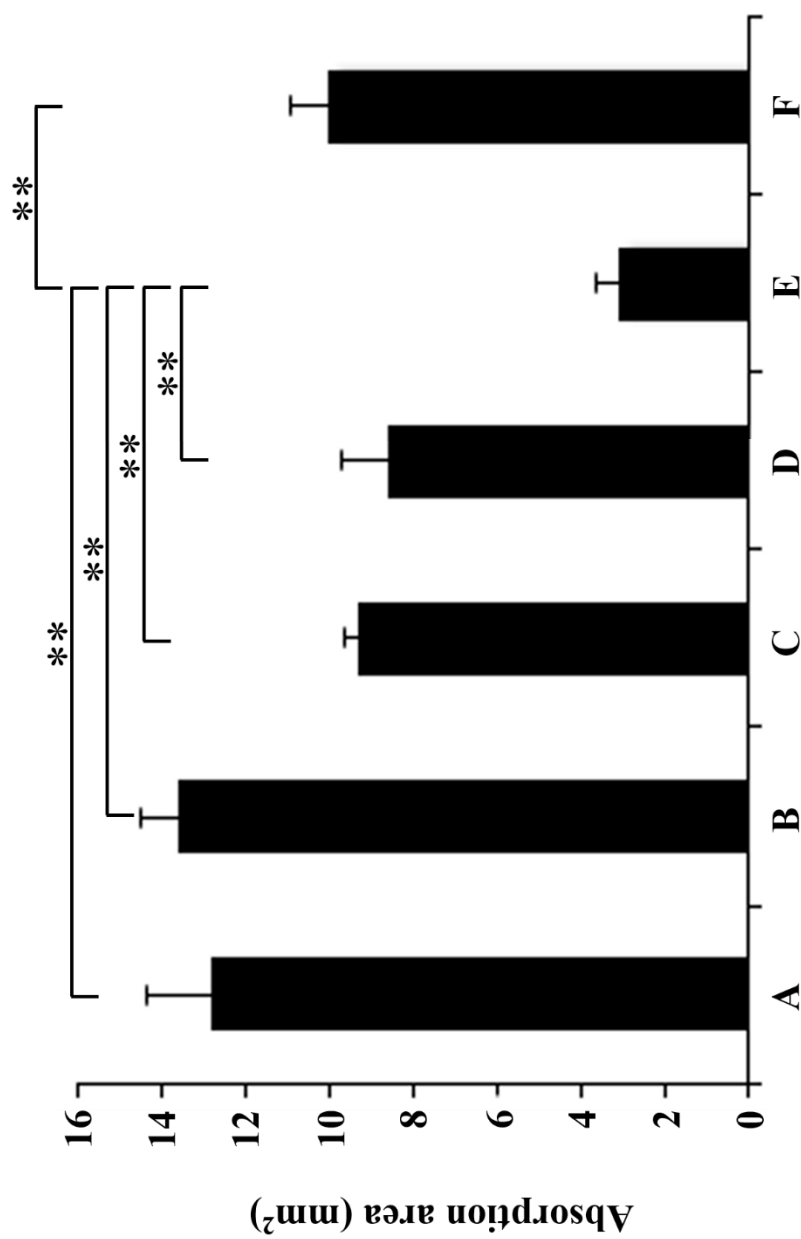


図7 吸収窩の測定
マウス骨髄由来マクロファージに *P. salivosa* 60 kDa 線毛タンパク質および *E. coli* LPS を添加し，吸収窩の面積を測定した。60 kDa 線毛タンパク質の添加により，有意に吸収の増強が認められた。A，線毛 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ；B，線毛 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ；C，線毛 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ；D，線毛 0.001 $\mu\text{g/ml}$ ；E，コントロール；F，RANKL 30 ng/ml **：P<0.01 Dunnett 検定