

カイコモデルを用いた *Porphyromonas gulae* FimA の
病原性機能の解析

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻

小児歯科学分野

吉田 翔

はじめに

犬や猫などの伴侶動物では、家庭内飼育の増加、栄養および医療環境の改善により高齢化が進む一方、歯周病、肥満や糖尿病など生活習慣病の増加が問題となっている^{1,2)}。歯周病は、齶蝕と並ぶ歯科の二大疾患であり、歯周組織の炎症や破壊を伴い、歯周病変部位のデンタルバイオフィームから高頻度で分離される複数の嫌気性菌種に起因する感染症である³⁾。犬口腔内の pH は 8.5~9.0 と弱アルカリ性の環境にあるため、成犬の齶蝕罹患率は 5.25% と低い^{4,5)}。一方で、高齢の小型犬では、95~100%が歯肉炎に、50~70%が歯周炎に罹患していることが報告されている^{6,7)}。歯周炎に罹患している犬は、食欲不振、体重減少、慢性的疼痛、歯牙の動揺の症状を呈するだけでなく、菌血症を引き起こすことが知られている^{8,9)}。歯周炎が原因である菌血症は、口腔以外の臓器にも歯周病菌の感染をもたらし、間質性腎炎、糸球体腎炎、肝炎、慢性気管支炎、肺線維症、僧帽弁閉鎖不全症、心内膜炎を誘発することが報告されている^{10,11,12)}。これらの報告からも歯周病罹患により、全身の健康を脅かす可能性が示唆されている。

Porphyromonas 属の細菌は縁上および縁下プラークに棲息する偏性嫌気性黒色色素産生菌であり、歯周疾患に関わる重要な病原細菌として、細菌の検出もしくは線毛遺伝子の検出が歯周疾患の指標となる可能性があることが報告されている^{13,14,15)}。2001年、犬、猫、熊、

コヨーテ、狼、猿などの多種の動物から *Porphyromonas* 属の新種として、*Porphyromonas gulae* が発見された¹⁶⁾。*P. gulae* はグラム陰性の偏性嫌気性桿菌で、非運動性、芽胞非形成性の特徴を有し、犬などの伴侶動物において健康な歯肉と比較して歯周病変部位から高頻度に検出される^{16, 17)}。犬や猿などの伴侶動物と生活を共にするヒトの歯肉健常部位から *P. gulae* が検出される (21.4%) だけでなく、伴侶動物の歯周病変部位からは健常部位よりも高頻度に検出される (52.6%) ことが報告されている^{18, 19)}。さらに、伴侶動物とその飼い主のプラークに含まれる微生物の塩基配列を解析したところ、*Porphyromonas* 属細菌や *Fusobacterium* 属細菌が共通して存在することが明らかにされている²⁰⁾。1986年、Parent らは、*P. gingivalis* が関与する歯周病は人獣共通感染症であることを既に指摘していたが²¹⁾、近年の研究により、歯周病は人獣共通感染症の1つである可能性をより高めている。*P. gulae* は、*P. gingivalis* と同様のビルレンス因子を保有しているため、伴侶動物の歯周病発症に関与している可能性も報告されている²²⁾。特に *P. gulae* が保有する線毛タンパクは、*P. gingivalis*の線毛タンパクと塩基配列で 94%、推定アミノ酸配列で 96.8% の相同性があり²³⁾、線毛タンパクをコードする *fimA* 遺伝子の塩基配列の違いにより、細胞傷害能も異なることが明らかとなっている²⁴⁾。*P. gulae* をマウスに経口感染させた場合、マウス血清中には *P. gulae* 特異的 IgG 抗体価が上昇し、*P. gingivalis* の感染と同様に骨吸収が誘発され

るが、死菌により作製された *P. gultae* 全菌体ワクチンの投与により、その発症が抑制される^{25-27, 28)}。しかし、*P. gultae* 菌体もしくはビルレンス因子をターゲットにした創薬は現段階では行われていない。

本研究では、カイク感染モデルを用いて、*P. gultae* の線毛が保有する宿主病原性を明らかにした。さらに線毛をターゲットにした病原性発現の抑制について着目し、クリンダマイシンや抗線毛抗血清が *P. gultae* 線毛による病原性発揮におよぼす作用を検討した。

材料と方法

1. 供試菌株と培養条件

本研究では、犬由来歯周病菌 *P. gulae* ATCC51700 株 (A 型線毛保有株)、D040 株 (B 型線毛保有株)、D049 株 (C 型線毛保有株) を供試菌株とした。*P. gulae* ATCC51700 株は ATCC (American Type Culture Collection, MD, USA) より購入した。*P. gulae* D040 株と D049 株は加藤行男博士 (麻布大学) より分与された。培養には、Trypticase Soy Broth (TSB) 液体培地 (Beckton Deckinson, Sparks, MD, USA) に yeast extract (1 mg/ml)、menadione (1 μ g/ml)、および hemin (5 μ g/ml) を添加したものを使用した²⁹⁾。*Escherichia coli* BL21 株と DH5 α 株 (ニッポンジーン、東京) の培養には、Luria-Bertani 培地 (和光純薬、大阪) を使用し、必要に応じてカナマイシンを 100 μ g/ml となるよう添加した。寒天平板培地の作製には 1.5% (w/v) の寒天 (和光純薬) を添加した。

2. 組換え体線毛タンパクの作製

犬のデンタルプラークから Puregene Yeast/Bact Kit B (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) を用いてゲノム DNA を抽出した。*fimA* 遺伝子については、抽出したゲノム DNA を鋳型として *fimA* タイプ別特異的プライマー (表 1) を用い、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で増幅した。95°C で 5 分間反応後、94°C で 30 秒間、46°C で 30 秒間、72°C で 90 秒間

を 30 回繰り返し、PCR 産物を pGEM-T Vector (Promega, Madison, WI, USA) に 16°C、12 時間のライゲーション反応を行い、*E. coli* DH5 α 株に形質転換した。LB 培地で培養した *E. coli* からのプラスミド DNA の抽出と精製には、Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を使用した。まず、再懸濁液 250 μ l に *E. coli* を懸濁し、溶解液 250 μ l を加えて 5 分間、アルカリプロテアーゼ溶液 10 μ l を加えて 5 分間静置した。中和液 350 μ l を加えた *E. coli* 可溶画分を、カラムで精製することによりプラスミド DNA を得た。得られたプラスミドを A 型 *fimA* は EcoRI と HindIII、B 型 *fimA* は BamHI と XhoI ならびに C 型 *fimA* は EcoRV と SalI で制限酵素処理し、同じ制限酵素で処理した GST 融合タンパク発現ベクター pET42a (+) (タカラバイオ、大津、滋賀) に組み込み、各線毛遺伝子別 *fimA* 含有プラスミド pET42a (+) を構築した (図 1)。T4 DNA Ligase (Promega, Madison, WI, USA) を加えて、16°C、12 時間のライゲーション反応を行い、*E. coli* BL21 株に形質転換した。1 mM イソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) で誘導することにより目的タンパクを発現している *E. coli* を選択し、カナマイシン含有 2 \times yeast extract-tryptone (2YT) 培地 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) 1L 中で 37°C にて培養した。A₆₀₀ = 0.6 の時点で、終濃度が 1 mM になるように IPTG を添加し、3 時間培養後菌体を回収した。回収した菌体は超音波で破碎した後、遠心分離を行った。得られた上清

画分は、GST アフィニティーカラムクロマトグラフィー (Sepharose 4B, GE ヘルスケア・ジャパン, 東京) を用いて精製した。精製後の組換え線毛タンパクは、GeBaFlex-tube kit (Gene Bio-Application Ltd., Israel) を用いて透析した。組換え線毛タンパクの発現は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で展開させた後、ウェスタンブロット法により解析した。GST 融合タンパクの免疫反応は、一次抗体に 1,000 倍希釈ヤギ抗 GST 抗体 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)、二次抗体に 1,000 倍希釈アルカリフォスファターゼ標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (Chemicon International, MA, USA) を用いた。BCIP/NBT 含有 Alkaline Phosphatase Substrate (Mosssubstrates, Pasadena, MD, USA) を加え、適度な発色が得られたところで 0.5 M EDTA (pH 8.0) を加えて反応を停止させた。

3. 抗生物質による *P. gulae* 増殖能抑制の検討

ATCC51700 株、D040 株ならびに D049 株をヘミン、メナジオン含有 TSB 液体培地に 37、18 時間で培養した菌液を 4.0×10^8 CFU/ml に調整し、最終濃度 0.005~0.4 $\mu\text{g/ml}$ になるようクリンダマイシン、アンピシリン、メトロニダゾール、ゲンタマイシンを菌液に添加した。37°C 嫌気条件下で 24 時間培養後、マイクロプレートリーダー (SH-1000, コロナ電気, 茨城) を用いて、波長 595 nm で吸光度を測定した。

4. 抗線毛抗血清の作製

抗線毛抗血清の作製にはウサギ (New Zealand white rabbit, 体重 1 kg, 北山ラベス, 長野) を使用した。各線毛タイプ別組換え線毛タンパク 2 mg を phosphate buffered saline (PBS) に懸濁した。これを等量の Freund's Complete Adjuvant (FCA; Becton Dickinson) と混和して油中水滴とし、ウサギ背側皮下に 1ml 注入した。7 日後に組換え体線毛タンパク 2mg と等量の FCA との混和物をウサギ背側皮下に注射し、その 7 日後から 0~6 日目に採血した。試料血液を遠心分離し血清を得、抗線毛抗血清とした。抗体価は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定し、最も抗体価の高い 3 日目の血清を以後の実験に用いた。作製された各線毛抗血清の交差反応ならびに特異反応は、組換え体線毛タンパクを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で展開させた後、ウェスタンブロット法により解析した。

5. カイコモデルを用いた病原性の評価

病原性の評価モデルとして、5 令のカイコに、各線毛タイプ別 *P. gulae* (5×10^7 cfu) あるいは組換え線毛タンパク 50 μ l (5 μ g) をカイコの腹腔内に背部から注射し感染させた。その直後にクリンダマイシンまたは抗線毛抗血清を同様に腹腔内投与し、37°C のインキュベーター中で 10 日間飼育し、1 群 10 匹として 12 時間毎にカイコの生存数を測定した。コントロール群には PBS あるいは GST タンパク 50 μ l (5 μ g) を腹腔内投与した。

6. 統計学的分析

実験データは平均値±標準誤差で示した。生存率曲線は、 Kaplan-Meier法を用いて作成した。また、統計分析には、 Student's t-test と log-rank test を用いた。有意水準は 0.05% に設定し、 p 値が有意水準を下回る場合に有意差ありと判断した。

結果

1. *P. gulae* 感染によるカイコの生存率への影響

犬の歯周病変部位からは C 型線毛遺伝子を保有する *P. gulae* による感染が密接に関係していることが報告されている²⁴⁾。そこで、線毛遺伝子型による *P. gulae* 病原性を *in vivo* で評価するために、カイコを宿主とした *P. gulae* 感染実験によって検証した。各線毛を有する *P. gulae* 感染によるカイコの生存率は、いずれの感染群も対照群と比較して有意に生存率が低下しており、感染 144 時間後、C 型線毛保有株 D049 株の感染群は全て死亡した (図 3)。一方、A 型線毛保有株 ATCC51700 株と B 型線毛保有株 D040 株感染群は 50% 以上の生存が認められ、C 型保有株感染群と A 型保有株感染群 ($P=0.001$) もしくは B 型保有株感染群との間に有意差が認められた ($P=0.006$)。さらに感染 228 時間後 B 型線毛保有株感染群全てが死亡したが、A 型線毛保有株感染群は約 10% の生存が確認された。C 型線毛保有株の感染後では、A 型ならびに B 型線毛保有株の感染と比較して、早期にカイコの死亡をもたらすことから、高い病原性を保有することが示唆された。

2. 線毛遺伝子別組換え線毛タンパクによるカイコの生存率への影響

P. gulae 線毛による病原性を評価するために、各線毛遺伝子別組換え線毛タンパクによる病原性をカイコモデルで検証した。SDS-PAGE にて展開した *E. coli* BL21 株から精製され

た各線毛遺伝子別組換え線毛タンパクは、約 26 kDa の GST と約 49 kDa FimA を合計した約 75 kDa のシングルバンドが検出された (図 2A)。また、ウェスタンブロット法により、抗線毛抗血清が組換え線毛タンパクに反応することが確認された (図 2B)。いずれの組換え線毛投与群も、GST タンパクのみを投与した対照群と比較して生存率が低下しているが、特に組換え C 型線毛投与群において顕著に低下した (図 4)。これに対し、*P. gulae* 感染同様に組換え A 型線毛タンパク投与群と組換え B 型線毛タンパク投与群は、50% 以上の生存が認められ、組換え A 型線毛タンパク投与群と GST 投与群 ($p=0.1692$)、および B 型線毛タンパク投与群と GST 投与群 ($p=0.3586$) に有意差は認められなかった。これらの結果から、C 型線毛保有株の病原性は線毛に依存している可能性が示唆された。

3. 抗生物質による *P. gulae* 増殖抑制効果

C 型線毛を有する *P. gulae* の増殖能の抑制を検討するため、クリンダマイシン、アンピシリン、メトロニダゾール、ゲンタマイシンの 4 種類の抗生物質の *P. gulae* 増殖能抑制効果を調べた (図 5)。クリンダマイシンは、抗生物質無添加の対照群と比較して有意に *P. gulae* の増殖能を抑制し ($p<0.001$)、C 型線毛保有株の増殖能は A 型ならびに B 型線毛保有株と比較して有意に抑制された ($p<0.001$)。またアンピシリンも *P. gulae* の増殖能を有意に抑制したが、クリンダマイシンの方がアンピシリンよりも有意に増殖能を抑制した ($p<0.001$)。

これに対し、メトロニダゾール、ゲンタマイシンは *P. gulae* の増殖能に対して抑制効果を示さなかった。クリンダマイシンによる *P. gulae* の増殖能におよぼす濃度を更に検討したところ、0.005 µg/ml で増殖抑制能が認められ、以後も濃度依存的に増殖を抑制した (図 6)。さらに C 型線毛保有株の増殖を有意に抑制し、0.025 µg/ml で 50% 以上の増殖阻害が認められた (図 6)。これらの結果から、クリンダマイシンは C 型線毛保有株の増殖を顕著に抑制することが示唆された。そこで、クリンダマイシンによる *P. gulae* 感染カイコ致死活性の抑制効果を検討した。C 型線毛保有株 D040 株感染群にクリンダマイシンを投与したところ、濃度依存的にカイコの生存率が回復した (図 7)。続いて A 型線毛保有株 ATCC51700 株、B 型線毛保有株 D040 株感染群、および C 型線毛保有株 D040 株感染群に 0.4 µg/ml のクリンダマイシンを投与した場合、B 型および C 型線毛保有株感染カイコの生存率は有意に回復したが、A 型線毛保有株感染カイコの生存率は改善が認められなかった (図 8)。これらの結果から、C 型線毛をターゲットにすることにより、*P. gulae* の病原性を効果的に抑制できる可能性があることが示唆された。

4. 抗線毛抗血清によるカイコの生存率の回復

P. gulae 線毛による病原性を特異的に抑制するために、抗線毛抗血清を用いて組換え体線毛によるカイコの生存率の改善効果を検討した。抗線毛抗血清の投与はカイコの生存率に

は影響しなかった (図 9)。組換え C 型線毛タンパク投与カイコ群に抗線毛抗血清を投与したところ、濃度依存的にカイコの生存率が回復した (図 10)。さらに、線毛遺伝子別組換え線毛タンパクを投与し、各線毛タイプ別抗線毛抗血清を添加したところ、組換え A 型線毛タンパク投与群のカイコ生存率は有意に回復したが、組換え B 型線毛タンパク投与群に効果は認められなかった (図 11)。そこで、*P. gulyae* 感染カイコモデルに対する抗線毛抗血清の、カイコの生存率の改善効果を検討した。C 型線毛保有株 D040 株感染群に抗線毛抗血清を投与したところ、濃度依存的にカイコの生存率が回復した (図 12)。一方、A 型線毛保有株 ATCC51700 株ならびに B 型線毛保有株 D040 株感染群では、抗線毛抗血清による生存率の回復は有意に認められなかった。これらの結果から、*P. gulyae* が有する C 型線毛機能を抑制することは、結果的に宿主に対する病原性を抑制することが示唆された。

考察

細菌の感染とは宿主の体表面、体内または組織内に細菌が付着し、増殖し、定着している状態を指し、感染により引き起こされる疾病を感染症という³⁰⁾。なかでも、付着はその部位において感染の成立を決定する重要な因子の一つである³⁰⁾。菌と宿主細胞表面の接触を可能にしているのが線毛であり、*Bordetella pertussis*、*E. coli*、*Neisseria gonorrhoeae* などのグラム陰性菌の多くにみられる^{31, 32, 33)}。歯周病関連菌の中では、ヒト口腔内から高頻度で検出される *P. gingivalis* が保有する線毛が宿主におよぼす影響が多数報告されている。*P. gingivalis* の線毛は、歯肉上皮細胞、繊維芽細胞への付着侵入に関与している^{34, 35)}。また線毛が単球やマクロファージなどを刺激し、IL-1 β 、IL-8、TNF- α などの炎症性サイトカインを誘導するだけでなく^{36, 37)}、破骨細胞の分化を促進し歯槽骨の吸収に関与する³⁸⁾など、歯周病発症の病原因子となることが示唆されている。さらに、*P. gingivalis* 線毛タンパクの遺伝子構造の違いにより、異なる遺伝子型が存在し、病原性に違いがあることが報告されている^{34, 39, 40)}。動物由来歯周病菌 *P. gulae* の線毛も *P. gingivalis* 同様、線毛タンパクの遺伝子構造の違いにより、A/B/C 型から成る 3 つの異なる遺伝子型が存在する²⁴⁾。なかでも C 型線毛保有株は歯周病を罹患している犬から高頻度で検出されるだけでなく、僧帽弁閉鎖不全症にも関与していることが報告されている^{41, 59)}。さらに、C 型線毛保有株の歯肉上皮

細胞への感染は、細胞増殖能や細胞遊走性を抑制することから²⁴⁾、細胞傷害性を有する歯周病原性の高い菌であることが示唆されている。

これまでヒト由来の歯周病原菌の病原性の評価には、主にマウス感染モデルが使用されてきた。しかしながら、マウスなどの哺乳類動物の感染モデルを多数利用することはコスト面と倫理面の問題から難しい⁴²⁾。近年、カイコモデルは低コストで倫理的な問題も少ないため、新しい実験動物として優れていることが報告されている⁴³⁾。これまでに、*Staphylococcus aureus*、*Vibrio cholerae*、*Pseudomonas aeruginosa*、および腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *E. coli* ; EHEC) のカイコ感染モデルが報告されている^{43,44)}。さらにカイコは哺乳類の体温と同じ 37°C の環境に耐えることができ、37°C における感染実験が行えることが可能であることが知られている⁴⁵⁾。そこで本研究ではこのカイコモデルを用いて、*P. gulae* の病原性を評価した。カイコ腹腔内に感染した *P. gulae* は C 型線毛保有株の感染により顕著にカイコの生存率は低下した (図 3)。一方、C 型線毛保有株の増殖能を有意に抑制するクリンダマイシンの投与により、カイコの生存率は回復した (図 8)。また、線毛タンパクの病原性を評価するために、組換え体 C 型線毛タンパクをカイコ腹腔内に投与したところ、C 型線毛を保有する *P. gulae* の病原性は、他の線毛遺伝子型を保有する *P. gulae* と比較して病原性が高いことが示唆された。このことは、疫学的知見より C 型線毛遺伝子

型をもつ *P. gulyae* が歯周病の病状ならびに発症と関連しており²⁴⁾、本研究データとの相互性が認められる。これらのことから、感染カイクモデルは、*P. gulyae* の病原性を評価するために有効であると考えられる。

リンコマイシン系抗生物質であるクリンダマイシンは細菌のリボゾーム 50S サブユニットに作用し、ペプチド転移酵素反応を阻止することでタンパク合成を阻害する⁴⁶⁾。クリンダマイシンの特徴として、その薬効は菌量や菌の増殖時期に関係せずに効果を示し、潜在的に細菌の毒素産生を抑制するだけでなく、ペニシリンやセファロスポリンと異なり薬剤が消失した後も微生物の増殖をある一定期間抑制できることなどが知られている⁴⁷⁾。これらの効果は、タンパク合成阻害薬または核酸合成阻害薬では高頻度に観察される。一方、細胞壁合成阻害作用を有する β -ラクタム系やグリコペプチド系抗生物質では効果がほとんど確認されないため、薬剤投与により菌の DNA 機能に何らかの変化をもたらしている可能性が示唆されている⁴⁸⁾。マクロライド系抗生物質であるアジスロマイシンは、クリンダマイシン同様、菌のリボゾーム 50S サブユニットに作用しタンパク合成阻害作用を保有する⁴⁹⁾。アジスロマイシンは *N. gonorrhoeae* の細胞膜表面に変化を起こし、線毛形成を減少させることが知られている⁵⁰⁾。さらに、*P. gingivalis* の線毛タンパク合成を阻害し⁵¹⁾、歯周病の病態改善に効果を発揮している⁵²⁾。本研究では、クリンダマイシンの投与により *P.*

gulae の増殖が抑制され、特に C 型線毛保有株の増殖が有意に抑制された (図 6)。さらには *P. gulae* C 型線毛保有株によるカイコ生存率を回復した (図 8)。クリンダマイシンの作用機序はアジスロマイシンに類似していることから、クリンダマイシンは *P. gulae* の線毛形成を阻害することにより、病原性を抑制している可能性が考えられた。C 型線毛保有株への効果は、タンパク合成で形成された線毛タンパクの生化学的解析と X 線結晶構造解析を行うことにより、クリンダマイシンが特異的に抑制する箇所を探索できる可能性があると考えられる。また、線毛タンパクの機能を抑制することは、*P. gulae* が保有する病原性を減少させ、*P. gulae* 感染に対する治療効果があることが示唆された。

今日、ウイルス感染防御や細菌毒素中和のために、抗体を用いた治療法が広く行われている⁵³⁾。ポリクローナル抗体は受動免疫の代替として機能し、*Corynebacterium diphtheriae*、*Clostridium Tetani*、*Streptococci*、*Mumps virus* の感染を防御することが報告されている^{54,55)}。また中和抗体の投与により、Human immunodeficiency virus (HIV) ウイルス感染が長期に渡り防御される⁵⁶⁾。*Streptococcus pneumoniae* が保有する粘膜付着因子 pneumococcal surface adhesin A (PsaA) に対する中和抗体は、*S. pneumoniae* の鼻咽頭細胞への付着を阻害する⁵⁷⁾。微生物に対する抗線毛抗体は、*Streptococcus parasanguis* や口腔ビリダンスレンサ球菌感染によるラット心内膜炎の発症を抑制するだけでなく^{58, 59)}、喉頭由来

上皮細胞や歯肉線維芽細胞への *P. gingivalis* 付着を阻害することが報告されている⁶⁰⁾。*P. gulae* C型線毛に反応する抗線毛血清は、*P. gulae* 感染カイコや組換え線毛タンパク投与カイコの生存率を回復したことから (図 10、 図 11)、*P. gulae* の病原性は、線毛タンパクに基づく特異的なものであることが示唆された。カイコには抗体による獲得免疫機構は存在しないが、哺乳類と共通した自然免疫機構が備わっており⁶¹⁾、獲得免疫機構のブースト反応に似た抗菌ペプチドの産生増強による後天的な感染防御機構を保有していることが知られている⁶²⁾。そのため、直接 *P. gulae* の線毛に作用することにより、*P. gulae* の持つ病原性を抑制したのではないかと推測される。線毛の立体構造を各 *fimA* 遺伝子別に検討し、クリンダマイシンとの結合部位を同定することで、*P. gulae* に対して最も奏功する阻害薬開発の可能性がある。さらに抗線毛抗血清によるカイコ生存率の改善は、新たな治療法の確立へと繋がると考える。本研究の結果をもとに、*P. gulae* の線毛を標的とした創薬を行うことは、伴侶動物ならびに生活を共にするヒトの歯周疾患の発症や進行を効果的に抑制し、健康寿命の延長に大きく貢献できる可能性を示唆している。

謝辞

本研究を行うにあたって、終始ご懇意なる御指導をくださいました岡山大学大学院医歯薬総合研究科小児歯科学分野の仲野道代教授に心からお礼申し上げます。また終始様々な御指導、御校閲をくださいました大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学教室仲野和彦教授ならびに野村良太准教授に厚くお礼申し上げます。そして本研究の遂行にあたり、様々な御教示をくださいました岡山大学大学院医歯薬総合研究科小児歯科学分野の稲葉裕明准教授ならびに山崎由衛博士研究員に深く感謝いたします。最後に、研究に際し常に御理解と御協力をくださいました岡山大学大学院医歯薬総合研究科小児歯科学分野の教室員の皆様に心よりお礼申し上げます。

文献

- 1) Baldwin, K., Bartges, J., Buffington, T., Freeman, L.M., Grabow, M., Legred, J., Ostwald, D. Jr. : AAHA nutritional assessment guidelines for dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **46**(4), 285-296, 2010.
- 2) German, A.J. : The growing problem of obesity in dogs and cats. *J. Nutr.*, **136**(7), 1940-1946, 2006.
- 3) Tsaousoglou, P., Nietzsche, S., Cachovan, G., Sculean, A., Eick, S. : Antibacterial activity of moxifloxacin on bacteria associated with periodontitis within a biofilm. *J. Med. Microbiol.*, **63**(Pt 2), 284–292, 2014.
- 4) Hale, FA. : Dental caries in the dog. *J. Vet. Dent.*, **15**(2), 79-83, 1998.
- 5) Lavy, E., Goldberger, D., Friedman, M., Steinberg, D. : pH values and mineral content of saliva in different breeds of dogs. *Isr. J. Vet. Med.*, **67**(4), 244-248, 2012.
- 6) Harvey, C.E., Shofer, F.S., Laster, L. : Association of age and body weight with periodontal disease in North American dogs. *J. Vet. Dent.*, **11**(3), 94-105, 1994.
- 7) Harvey, C.E. : Management of periodontal disease: understanding the options. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **35**(4), 819-836, 2005.
- 8) Calvert, C.A., Greene, C.E., Hardie, E.M. : Cardiovascular infections in dogs: epizootiology, clinical manifestations, and prognosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **187**(6), 612-616, 1985.
- 9) Nieves, M.A., Hartwig, P., Kinyon, J.M., Riedesel, D.H. : Bacterial isolates from plaque and from blood during and after routine dental procedures in dogs. *Vet. Surg.*, **26**(1), 26-32, 1997.

- 10) DeBowes, L.J., Mosier, D., Logan, E., Harvey, C.E., Lowry, S., Richardson, D.C. : Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. *J. Vet. Dent.*, **13**(2), 57-60, 1996.
- 11) DeBowes, L.J. : The effects of dental disease on systemic disease. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **28**(5), 1057-1062, 1998.
- 12) Hamlin, R.L. : Geriatric heart diseases in dogs. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **35**(3), 597-615, 2005.
- 13) Amano, A., Kuboniwa, A.M., Nakagawa, I., Akiyama, S., Morisaki, I., Hamada, S. : Prevalence of Specific Genotypes of *Porphyromonas gingivalis fimA* and Periodontal Health Status. *J. Dent. Res.*, **79**(9), 1664-1668, 2000.
- 14) Holts, S.C., Ebersole, J.L. : *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol. 2000.*, **38**(1), 72–122, 2005.
- 15) Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra-and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000;27(10):722-732.
- 16) 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**(3), 1179 –1189, 2001.
- 17) Senhorinho, G.N., Nakano, V., Liu, C., Song, Y., Finegold, S.M., Avila-Campos, M.J. : Detection of *Porphyromonas gulae* from subgingival biofilms of dogs with and without periodontitis. *Anaerobe*, **17**(5), 257–258, 2011.

- 18) Gaetti-Jardim, E. Jr., Pereira, M.F., Vieira, E.M., Schweitzer, C.M., Okamoto, A.C., Ávila-Compos, M.J. : Occurrence of periodontal pathogens in ethnic groups from a native Brazilian reservation. *Arch. Oral. Biol.*, **60**(6), 959-965, 2015.
- 19) Yamasaki, Y., Nomura, R., Nakano, K., Naka, S., Matsumoto-Nakano, M., Asai, F., Ooshima, T. : Distribution of periodontopathic bacterial species in dogs and their owners. *Arch. Oral Biol.*, **57**(9), 1183–1188, 2012.
- 20) Sturgeon, A., Stull, J.W., Costa, M.C., Weese, J.S. : Metagenomic analysis of the canine oral cavity as revealed by high-throughput pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Vet. Microbiol.*, **162**(2-4), 891-898, 2013.
- 21) Parent, R., Mouton, C., Lamonde, L., Bouchard, D. : Human and animal serotypes of *Bacteroides gingivalis* defined by crossed immunoelectrophoresis. *Infect. Immun.*, **51**(3), 909–918, 1986.
- 22) Lenzo, J.C., O'Brien-Simpson, N.M., Orth, R.K., Mitchell, H.L., Dashper, S.G., Reynolds, E.C. : *Porphyromonas gulae* has virulence and immunological characteristics similar to those of the human periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.*, **84**(9), 2575-2585, 2016.
- 23) 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.
- 24) Yamasaki, Y., Nomura, R., Nakano, K., Inaba, H., Kuboniwa, M., Hirai, N., Shirai, M., Kato, Y., Murakami, M., Naka, S., Iwai, S., Matsumoto-Nakano, M., Ooshima, T., Amano, A., Asai,

- F. : Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gulae* carrying a new *fimA* genotype. *Vet. Microbiol.*, **161**(1-2), 196-205, 2012.
- 25) Hardham, J., Reed, M., Wong, J., King, K., Laurinat, B., Sfintescu, C., Evans, R.T. : Evaluation of a monovalent companion animal periodontal disease vaccine in an experimental mouse periodontitis model. *Vaccine*, **23**(24), 3148 –3156, 2005.
- 26) Hardham, J., Dreier, K., Wong, J., Sfintescu, C., Evans, R.T. : Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. *Vet. Microbiol.*, **106**(1-2), 119–128, 2005.
- 27) Hardham, J., Sfintescu, C., Evans, R.T. : Evaluation of cross-protection by immunization with an experimental trivalent companion animal periodontitis vaccine in the mouse periodontitis model. *J. Vet. Dent.*, **25**(1), 23–27, 2008.
- 28) O'Brien-Simpson, N.M., Pathirana, R.D., Paolini, R.A., Chen, Y.Y., Veith, P.D., Tam, V., Ally, N., Pike, R.N., Reynolds, E.C. : An immune response directed to proteinase and adhesin functional epitopes protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss. *J. Immunol.*, **175**(6), 3980–3989, 2005.
- 29) Inaba, H., Tagashira, M., Kanda, T., Murakami, Y., Amano, A., Matsumoto-Nakano, M. : Apple- and Hop-polyphenols inhibit *Porphyromonas gingivalis*-mediated precursor of matrix metalloproteinase-9 activation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *J. Periodontol.*, **87**(9), 1103-1111, 2016.
- 30) Talaro, K.P., Talaro, A. : Foundations in Microbiology. 4th ed, McGraw-Hill College, Boston, 2002.

- 31) van den Berg, B.M., Beekhuizen, H., Willems, R.J., Mooi, F.R., van Furth, R. : Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect. Immun.*, **67**(3), 1056-1062, 1999.
- 32) Hung, M.C., Christodoulides, M. : The biology of *Neisseria* adhesins. *Biology (Basel)*., **2**(3), 1054–1109, 2013.
- 33) Teng, C.H., Cai, M., Shin, S., Xie, Y., Kim, K.J., Khan, N.A., Cello, F.D., Kim, K.S. : *Escherichia coli* K1 RS218 interacts with human brain microvascular endothelial cells via type 1 fimbria bacteria in the fimbriated state. *Infect. Immun.*, **73**(5), 2923–2931, 2005.
- 34) 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..
- 35) Njoroge, T., Genco, R.J., Sojar, H.T., Hamada, N., Genco, C.A. : A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect Immun.*, **65**(5), 1980-1984, 1997.
- 36) Eskan, M.A., Hajishengallis, G., Kinane, D.F. : Differential activation of human gingival epithelial cells and monocytes by *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infect. Immun.*, **75**(2), 892-898, 2007.
- 37) Sugano, N., Ikeda, K., Oshikawa, M., Sawamoto, Y., Tanaka, H., Ito, K. : Differential cytokine induction by two types of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.*, **19**(2), 121-123, 2004.
- 38) Okahashi, N., Inaba, H., Nakagawa, I., Yamamura, T., Kuboniwa, M., Nakayama, K., Hamada, S., Amano, A. : *Porphyromonas gingivalis* induces receptor activator of NF-kappaB ligand

- expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. *Infect. Immun.*, **72**(3), 1706-1714, 2004.
- 39) Inaba, H., Kawai, S., Kato, T., Nakagawa, I., Amano, A. : Association between epithelial cell death and invasion by microspheres conjugated to *Porphyromonas gingivalis* vesicles with different types of fimbriae. *Infect. Immun.*, **74**(1), 734-739, 2006.
- 40) Nakano, K., Kuboniwa, M., Nakagawa, I., Yamamura, T., Nomura, R., Okahashi, N., Ooshima, T., Amano, A. : Comparison of inflammatory changes caused by *Porphyromonas gingivalis* with distinct fimA genotypes in a mouse abscess model. *Oral. Microbiol. Immunol.*, **19**(3), 205-209, 2004.
- 41) Shirai, M., Nomura, R., Kato, Y., Murakami, M., Kondo, C., Takahashi, S., Yamasaki, Y., Matsumoto-Nakano, M., Arai, N., Yasuda, H., Nakano, K., Asai, F. : Short communication: Distribution of *Porphyromonas gulae* fimA genotypes in oral specimens from dogs with mitral regurgitation. *Res. Vet. Sci.*, **102**, 49-52, 2015.
- 42) Hamamoto, H., Kurokawa, K., Kaito, C., Kamura, K., Iony, M.R., Kusuhara, H., Santa, T., Sekimizu, K. : Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48**(3), 774-779, 2004.
- 43) Kaito, C., Akimitsu, N., Watanabe, H., Sekimizu, K. : Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. *Microb. Pathog.*, **32**, 183-190, 2002.
- 44) Miyashita, A., Iyoda, S., Ishii, K., Hamamoto, H., Sekimizu, K., Kaito, C. : Lipopolysaccharide O-antigen of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for killing both insects and mammals. *FEMS Microbiol. Lett.*, **333**(1), 59-68, 2012.

- 45) Kaito, C., Usui, K., Kyuma, T., Sekimizu, K. : Isolation of mammalian pathogenic bacteria using silkworms. *Drug Discov. Ther.*, 5(2):66–70, 2011.
- 46) Dunkle, J.A., Xiong, L., Mankin, A.S., Cate, J.H. : Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **107**(40), 17152-17157, 2010.
- 47) Stevens, D.L. : The flesh-eating bacterium: what's next? *J. Infect. Dis.*, **179**(suppl 2), 366-374, 1999.
- 48) Sharma, K.K., Sangraula, H., Mediratta, P.K. : Some new concepts in antibacterial drug therapy. *Indian J. of Pharmacol.*, **34**, 390-396, 2002.
- 49) Champney, W.S., Burdine, R. : Macrolide antibiotics inhibit 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 39(9), 2141-2144, 1995.
- 50) Garcia-Bustos, J.F., Dougherty, T.J. : Alterations in peptidoglycan of *Neisseria gonorrhoeae* induced by sub-MICs of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **31**(2), 178-182, 1987.
- 51) Lo Bue, A.M., Rossetti, B., Cali, G., Nicoletti, G., Condorelli, F. : Antimicrobial interference of a subinhibitory concentration of azithromycin on fimbrial production of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **40**(5), 653-657, 1997.
- 52) Muniz, F.W., de Oliveira, C.C., de Sousa Carvalho, R., Moreira, M.M., de Moraes, M.E., Martins, R.S. : Azithromycin: a new concept in adjuvant treatment of periodontitis. *Eur. J. Pharmacol.*, **705**(1-3), 135-139, 2013.

- 53) Claire, N., Anthony, R.N. : Antibody production: Polyclonal-derived biotherapeutics. *Journal of Chromatography B.*, **848**(1), 2-7, 2007.
- 54) Casadevall, A., Pirofski, L.A. : The potential of antibody-mediated immunity in the defence against biological weapons. *Expert Opin. Biol.*, **5**(10), 1359-1372, 2005.
- 55) Bregenholt, S., Haurum, J. : Pathogen-specific recombinant human polyclonal antibodies: biodefence applications. *Expert Opin. Biol.*, **4**(3), 387-396, 2004.
- 56) Gautam, R., Nishimura, Y., Pegu, A., Nason, M.C., Klein, F., Gazumyan, A., Golijanin, J., Buckler-White, A., Sadjadpour, R., Wang, K., Mankoff, Z., Schmidt, S.D., Lifson, J.D., Mascola, J.R., Nussenzweig, M.C., Martin, M.A. : A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. *Nature.*, **533**(7601), 105-109, 2016
- 57) Romero-Steiner, S., Pilishvili, T., Sampson, J.S., Johnson, S.E., Stinson, A., Carlone, G.M., Ades, E.W. : Inhibition of Pneumococcal Adherence to Human Nasopharyngeal Epithelial Cells by Anti-PsaA Antibodies. *Clin. Vaccine. Immunol.*, **10**(2), 246-251, 2003.
- 58) Kitten, T., Munro, C.L., Wang, A., Macrina, F.L. : Vaccination with FimA from *Streptococcus parasanguis* protects rats from endocarditis caused by other viridans Streptococci. *Infect. Immun.*, **70**(1), 422-425, 2002.
- 59) Viscount, H.B., Munro, C.L., Burnette-Curley, D., Peterson, D.L., Macrina, F.L. : Immunization with FimA protects against *Streptococcus parasanguis* endocarditis in rats. *Infect. Immun.*, **65**(3), 994-1002, 1997.
- 60) Nakagawa, I., Amano, A., Kuboniwa, M., Nakamura, T., Kawabata, S., Hamada, S. : Functional differences among FimA variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. *Infect. Immun.*, **70**(1), 277-285, 2002.

- 61) Kurokawa, K., Kaito, C., Sekimizu, K. : Two-component signaling in the virulence of *Staphylococcus aureus*: A silkworm larvae-pathogenic agent infection model of virulence. *Methods Enzymol.*, **422**, 233-244, 2007.
- 62) Miyashita, A., Kizaki, H., Kawasaki, K., Sekimizu, K., Kaito, C. : Primed immune responses to gram-negative peptidoglycans confer infection resistance in silkworms. *J. Biol. Chem.*, **289**(20), 14412-14421, 2014.

図の説明

図 1. 組換え線毛タンパクの作製

各線毛遺伝子別 *fimA* 含有プラスミド pET42a(+) を構築し、タンパク発現用 *E. coli* BL21 株に形質転換した後、組換え線毛タンパクを精製した。

図 2. 線毛タンパクの発現の確認

A. BL21 株の組換え線毛タンパクの発現を確認。M: タンパク分子量マーカー、レーン 1: A 型組換え線毛タンパク、レーン 2: B 型組換え線毛タンパク、レーン 3: C 型組換え線毛タンパク。B. 組換え線毛タンパクと抗線毛抗血清との反応を確認。M: タンパク分子量マーカー、レーン 1: A 型組換え線毛タンパク、レーン 2: B 型組換え線毛タンパク、レーン 3: C 型組換え線毛タンパク。

図 3. *P. gultae* を感染させたカイコの生存率

カイコに線毛遺伝子別 *P. gultae* (5×10^7 cfu) をカイコに腹腔内投与し感染させ、37°C のインキュベーター中で 10 日間飼育し、12 時間毎にカイコの生存数を測定した。測定結果をもとに Kaplan-Meier 法を用いて生存率曲線を作成し、240 時間における生存率の有意差を評価した。log-rank 検定; ***: $P < 0.001$, vs PBS, n = 10

図 4. 組換え線毛タンパクによるカイコの生存率

カイコに各線毛タイプ別組換え線毛タンパク 50 μ l (5 μ g) をカイコに腹腔内投与し感染させ、37°C のインキュベーター中で 10 日間飼育し、12 時間毎にカイコの生存数を測定した。測定結果をもとにカプラン-マイヤー法を用いて生存率曲線を作成し、240 時間における生存率の有意差を評価した。log-rank 検定; *** : $P < 0.001$, vs GST, n = 10

図 5. 抗生物質による *P. gultae* 増殖能への影響

各線毛遺伝子別 *P. gultae* 株をクリンダマイシン (0.2 μ g/ml)、アンピシリン (0.2 μ g/ml)、メトロニダゾール (0.1 μ g/ml)、ゲンタマイシン (75 mg/ml) を添加した hemin・menadione 含有 TSB 液体培地に培養した。37°C 嫌気条件下で 24 時間培養後、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。log-rank 検定; ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, n = 10

図 6. クリンダマイシンによる *P. gultae* 増殖能への影響

各線毛遺伝子別 *P. gultae* 株をクリンダマイシン (0.005~0.4 μ g/ml)、を添加した hemin・menadione 含有 TSB 液体培地に培養した。37°C 嫌気条件下で 24 時間培養後、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。log-rank 検定; * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, n = 10

図 7. C 型線毛保有 *P. gultae* 感染カイコに対するクリンダマイシンの治療効果

5 令のカイコに C 型線毛保有 *P. gulae* D049 株 (5×10^7 cfu) を腹腔内投与し感染させ、その直後にクリンダマイシン (0.01~0.8 $\mu\text{g/ml}$) を腹腔内投与した。37°C のインキュベーター中で 10 日間飼育し、12 時間毎にカイコの生存数を測定した。測定結果をもとに Kaplan-Meier 法を用いて生存率曲線を作成し、240 時間における生存率の有意差を評価した。

log-rank 検定; *** : $P < 0.001$, vs 0 $\mu\text{g/ml}$, n = 10

図 8. 各線毛遺伝子別 *P. gulae* 感染カイコに対するクリンダマイシンの治療効果

5 令のカイコに各線毛遺伝子別 *P. gulae* (5×10^7 cfu) を腹腔内投与し感染させ、その直後にクリンダマイシン (0.4 $\mu\text{g/ml}$) を腹腔内投与した。37°C のインキュベーター中で 10 日間飼育し、12 時間毎にカイコの生存数を測定した。測定結果をもとに Kaplan-Meier 法を用いて生存率曲線を作成し、各線毛遺伝子別 *P. gulae* を感染させた群と、*P. gulae* 感染後にクリンダマイシンを投与した群の 240 時間の生存率を比較した。A: ATCC 51700 株感染群とクリンダマイシン投与群の間には有意差は認めなかった。B: D040 株感染群とクリンダマイシン投与群の間には有意差がみられた。C: D049 株感染群とクリンダマイシン投与群の間には有意差がみられた。log-rank 検定; * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, n = 10

図 9. 抗線毛抗血清によるカイコの生存率への影響

各線毛タイプ別血清をカイコ腹腔内に投与した。37°C のインキュベーター中で 10 日間飼育し、12 時間毎にカイコの生存数を測定した。測定結果をもとにカプラン-マイヤー法を用いて生存率曲線を作成し、240 時間の生存率の有意差を評価した。log-rank 検定, n = 10

図 10. 組換え C 型線毛タンパク投与したカイコに対する抗線毛抗血清の治療効果

5 令のカイコに C 型線毛タンパク 40 μ l (5 μ g) を腹腔内投与し感染させ、その直後に濃度の異なる抗線毛抗血清 10 μ l を腹腔内投与した。37°C のインキュベーター中で 10 日間飼育し、12 時間毎にカイコの生存数を測定した。測定結果をもとにカプラン-マイヤー法を用いて生存率曲線を作成し、240 時間の生存率の有意差を評価した。log-rank 検定; * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, vs C 型のみ, n = 10

図 11. 線毛遺伝子別組換え線毛タンパク投与したカイコに対する抗線毛抗血清の治療効果

カイコに各線毛タイプ別組換え線毛タンパク 40 μ l (5 μ g) をカイコに腹腔内投与し感染させ、その直後に 1/10 希釈抗線毛抗血清 (10 μ l) を腹腔内投与した。37°C のインキュベーター中で 10 日間飼育し、12 時間毎にカイコの生存数を測定した。測定結果をもとにカプラン-マイヤー法を用いて生存率曲線を作成し、各線毛タイプ別組換え線毛タンパクを投与した群と、線毛タンパク投与後に抗線毛抗血清を投与した群の 216 時間の生存率を比較し

た。A: A 型組換え線毛タンパク群と抗 A 型線毛抗血清投与群 B: B 型組換え線毛タンパク投与群と抗 B 型線毛抗血清投与群 C: C 型組換え線毛タンパク投与群と抗 C 型線毛抗血清投与群 log-rank 検定; * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, n = 10

図 12. 各線毛遺伝子別 *P. gultae* を感染カイコに対する抗線毛抗血清の治療効果

5 令のカイコに各線毛遺伝子別 *P. gultae* (5×10^7 cfu) を腹腔内投与し感染させ、その直後に 1/10 抗線毛抗血清 (10 μ l) を腹腔内投与した。37°C のインキュベーター中で 10 日間飼育し、12 時間毎にカイコの生存数を測定した。測定結果をもとに Kaplan-Meier 法を用いて生存率曲線を作成し、各線毛遺伝子別 *P. gultae* を感染させた群と、*P. gultae* 感染後に抗線毛抗血清を投与した群の 0 時間~240 時間の生存率を比較した。A: ATCC 51700 株感染群と抗 A 型線毛抗血清投与群の間には有意差を認めなかった。B: D040 株感染群と抗 B 型線毛抗血清投与群の間には有意差を認めなかった。C: D049 株感染群と抗 C 型線毛抗血清投与群の間には有意差がみられた。log-rank 検定; *** : $P < 0.001$, n = 10