IRUCAA TDC
Institutional Resources for Unique Collection and Academic Archives at Tokyo Dental College

Title	LAMP 法による唾液中Aggregatibacter actinomycetemcomitans 簡易検出法の確立
Author(s)	北川，雅恵；長嶺，憲太郎；應原，一久；水野，智仁；宮内，俊介；中野，由紀子；平井，公人；高柴，正悟；宮内，睦美
Journal	日本口腔検査学会雑誌，17(1)：3-9
URL	http://doi.org/10.15041/jsedp.17.3
Right	
Description	

Posted at the Institutional Resources for Unique Collection and Academic Archives at Tokyo Dental College,
Available from http://ir.tdc.ac.jp/

原　著

LAMP 法による唾液中 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 簡易検出法の確立

北川雅恵[1,6,7)*]　長嶺憲太郎[2)]　應原一久[3)]
水野智仁[3)]　宮内俊介[4,5)]　中野由紀子[5)]
平井公人[6)]　高柴正悟[6)]　宮内睦美[7)]

1）きたがわ歯科クリニック
2）広島国際大学健康科学部医療栄養学科
3）広島大学大学院医系科学研究科歯周病態学
4）広島大学保健管理センター
5）広島大学医系科学研究科循環器内科学
6）岡山大学学術研究院医歯薬学域歯周病態学分野
7）広島大学大学院医系科学研究科口腔顎顔面病理病態学

抄　録

目的：*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*（*A.a*）は侵襲性歯周炎の主な原因菌とみなされており、本菌と全身疾患との関連についての報告も散見される。しかしながら、従来の *A.a* 検出法は煩雑で費用が高く、また検出結果を得るまでに長い時間を要するため、より安価で簡易な新しい検出法の確立が望まれていた。そこで、*A.a* の保菌率、本菌と疾患との関連性や本菌の病原性を正確かつ簡便に解析するのに有用な検出法の確立を目的として、本研究を行った。

方法：タブレット型培地を用いて採取唾液を培養後、loop-mediated isothermal amplification（LAMP）法を用いて *A.a* の検出を行った。また、DNA を鋳型として *A.a* 検出の感度、特異度を検討した。さらに、臨床検体として心房細動患者の唾液試料を用いてその保菌率を調べた。

結果：*A.a* の検出感度の検討では、10^4CFU/μL 相当から検出可能であった。*A.a*、*Porphyromonas gingivalis*、*Fusobacterium nucleatum* および *Streptococcus mutans* を用いて特異度の検討を行ったところ、*A.a* 以外の菌では増幅されなかった。また、患者唾液 19 検体中 10 例で陽性となり、保菌率 52.6％であった。

結論：唾液試料から *A.a* の感度・特異度ともに優れた簡易検出法を確立できた。

Key words：*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、saliva、LAMP

受付：2024 年 8 月 10 日　受理：2024 年 11 月 11 日

緒　言

Aggregatibacter actinomycetemcomitans（*A.a*）は通性嫌気性、非運動性の小型グラム陰性桿菌で、その粘着性や凝集性などの性状が、遺伝子型の安定性や遠隔感染への進展に関与すると考えられている[1)]。*A.a* は侵襲性歯周炎の主な病原菌として知られており、成人歯周炎患者の約 50％、若年性歯周炎患者の約 90％から検出される[2)]。また、侵襲性歯周炎を発症した患者の家族のほとんどが患者由来の *A.a* 分離株と同一の遺伝子型 *A.a* 株を保有していること[3,4)]や、本菌が歯周炎患者

＊：〒 731-0138　広島市安佐南区祇園 3-64-6
TEL：082-225-7648
E-mail：mkitagawadental@gmail.com

の口腔内に一度定着すると、その後長期に渡って保菌し続けることも報告されている[5]。さらに、健康な歯肉からの検出率は低いとされる一方で、本菌が垂直感染や水平感染することも示唆されている[6,7]。加えて近年、*A.a* と感染性心内膜炎などを含む全身疾患との関連も注目されており[1]、今後さらに本菌と疾患との関連性や病原性に関する詳細な解明が期待されている。しかしながら、従来の *A.a* 検出法は煩雑で費用が高く、また検出結果を得るまでに長い時間を要するため、スクリーニング検査への応用や速やかな検出という点でより安価で簡易な新しい検出法の確立が今までに望まれていた。そこで、*A.a* の保菌率、本菌と疾患との関連性や本菌の病原性を正確かつ簡便に解析するのに有用な検出法の確立を目的として、本研究を行なった。

我々は以前、バシトラシン含有 Mitis-Salivarius 培地（MSB 培地）をタブレット型に成形したもの（タブレット型培地）を用いて、唾液試料から *cnm* 遺伝子陽性 *Streptococcus mutans*（*S. mutans*）をチューブ内で培養する手法によって、通性嫌気性菌である *S. mutans* を 24 時間で増殖させて、検出する方法を確立した[8,9]。*A.a* は歯周ポケット、粘膜および唾液などの様々な試料から検出可能であるが、本研究では嫌気ポーターなどの特別な器材を使わずに実験室への運搬が可能な唾液試料を検体として選んだ。また、変法 GAM 寒天培地で成形したタブレット型培地上に唾液試料を接種・塗抹・培養後、WarmStart Colorimetric loop-mediated isothermal amplification（LAMP）2 x Master Mix 試薬を使用して *A.a* 検出法の確立を試みた。本試薬は、LAMP 反応が進むと反応液が酸性に傾く性質があり、増幅試薬中の pH 指示薬が赤から黄色に変化する。すなわち、反応液が黄色になると増幅したことがわかる性質を利用している。目視で目的遺伝子の有無が判別できるため、簡易さと判定の正確さを考慮すると、本方法は歯科の施設において受け入れられやすいと考えられる。

本研究では、タブレット型培地を用いた培養法と目視で判定可能な LAMP 法を組み合わせた手法によって、唾液検体から *A.a* を簡易に検出可能な方法を確立し、本方法を用いて心房細動患者における *A.a* 保菌率と本方法の臨床的利用価値に関して調査した。

材料と方法

1. タブレット型培地の作製

培地は変法 GAM 寒天培地（日水製薬株式会社）を用い、滅菌蒸留水にて加温しながら溶解後、2 気圧、115℃、15 分の条件でオートクレーブをかけた。オートクレーブ処理終了後、20mL の培地を直径 10cm のシャーレに注ぎ入れ、培地が固まるまで室温にて静置した。パスツールピペットの上部をシャーレ中の培地に押し当て、タブレット状の培地（直径 6 mm、重量約 75mg）を取り出し、これをタブレット型培地とした（図 1a 中の写真）。

2. 供試菌株

A.a（Y4 株）、*Porphyromonas gingivalis*（*P.g*；W83株）、*Streptococcus mutans*（*S.m*；NBRC 13,955株）、*Fusobacterium nucleatum*（*F.n*；ATCC 2,558 株）の 4 菌株を本実験では供試菌株として使用した。

3. *A.a* 遺伝子の検出

タブレット型培地に安静時唾液 200μL を接種し、37℃の恒温槽中に静置した。24 時間培養後、唾液を遠心し、沈殿物から DNA 抽出（Qiagen., 東京）を行い、その抽出物 1 μL と Miyagawa ら[10] が確立した *A.a* 増幅用プライマー（FIP、BIP、LF、LB、F3 および B3）を用いて、LAMP 法のプロトコルに従い[11,12]、*A.a* 遺伝子の増幅を行った。すなわち、LAMP 法試薬である WarmStart Colorimetric LAMP 2 x Master Mix（New Englad Biolabs Inc., 東京）に最終濃度が 0.8M のベタイン、0.8μM の FIP および BIP、0.4μM の LF および LB、0.2μM の F3 および B3 を加え、さらに 1.0μL の DNA 抽出液および蒸留水を加えて全量 25μL になるよう調整した。LAMP 反応は 64℃で行った。試薬の色が黄色に変化したものを陽性とした。

4. 臨床検体を用いた検討

2020 年 4 月から 2023 年 10 月までに広島大学病院において、心房細動（発作性心房細動および持続性心房細動）に対する初回カテーテルアブレーション治療を受けた患者のうち、本研究への参加に同意した患者 19 名の安静時唾液を落ち着いた環境下で 200μL 採取し、本研究の検出法を用いて *A.a* の検出を試みた（広島大学疫学倫理

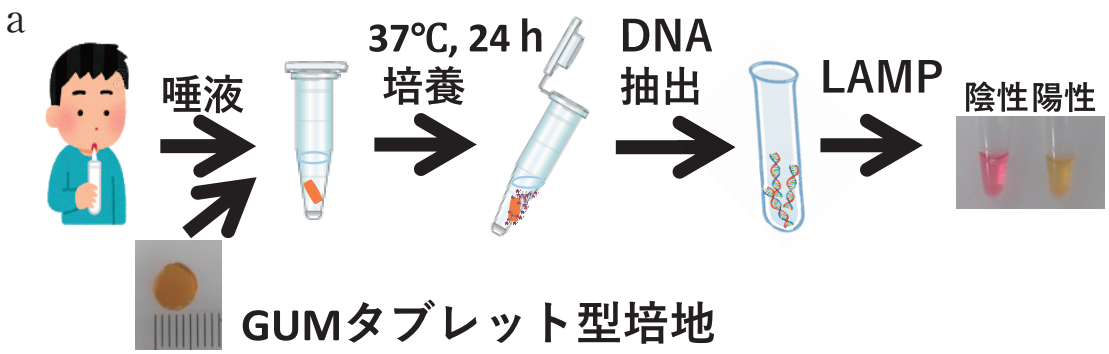

図 1　タブレット型培地を用いた検出

a：唾液の採取から LAMP 検出までの概略図。GUM タブレット培地の写真のメモリは 1 mm である。LAMP は WarmStart Colorimetric LAMP を使用した。陰性はピンク、陽性は黄色を呈する。

b：タブレット型培地が入ったチューブの写真。（左）タブレット型培地が入った 2.0mL チューブ、（中央）200 μL の唾液を入れた直後のチューブ、（右）培養後のチューブ。

審査、E-1954）。

結　果

1. タブレット型培地を用いた *A.a* の培養

唾液の採取から LAMP 検出までの概略図を示す。唾液接種・培養後、WarmStart Colorimetric LAMP　試薬を使用して *A.a* 遺伝子を増幅した。陰性はピンク、陽性は黄色を呈する（図 1a）。

タブレット型培地が入った 2.0mL チューブ（図 1b、左）、200 μL の唾液を入れた直後のチューブ（図 1b、中央）、24 時間培養後のチューブ（図 1b、右）では、培養後にチューブの液は濁り、唾液中の菌が良好に培養された。

2. LAMP 法による *A.a* 遺伝子の検出

1）感度

LAMP 法による *A.a* の検出感度の検討を行ったところ、試薬が黄色に 10^4CFU/μL 相当から変化し、*A.a* の検出が可能であった（図 2a）。

2）特異度

10^4CFU/μL に調整した 4 菌株を用いて特異度の検討を行ったところ、*A.a* 以外の菌では試薬は黄色に変化せず、これらの菌は増幅されなかった（図 2b）。

3. 臨床検体による検出の確認

検体として安静時唾液 200 μL を用いてタブレット型培地で培養し、沈殿から抽出した DNA を用いて LAMP 法にて遺伝子増幅をした（図 3a）。また、この LAMP 産物をアガロース電気泳動した結果、陽性のものは *A.a* 遺伝子の増幅が 10^4CFU/μL 相当確認できた（図 3b）。

4. 心房細動患者での *A.a* の陽性率

心房細動患者 19 名の安静時唾液 200 μL をタブレット型培地で培養し、沈殿物から抽出した DNA を用いて LAMP 法にて *A.a* の検出（10^4 CFU/μL 相当）を行ったところ、10 名（52.6%）が陽性であった（図 4）。

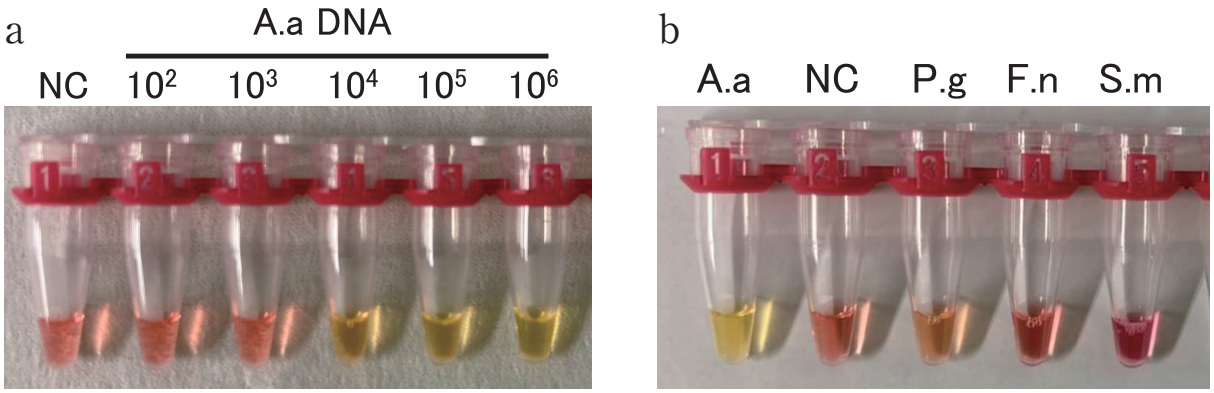

図 2　感度と特異度
a：*A.a* の感度の検討。試薬が黄色に 10^4CFU/μL 相当から変化し、*A.a* の検出が可能であった。
b：*A.a* の特異度の検討。*A.a*（10^4CFU/μL）以外の菌では試薬は黄色に変化せず、これらの菌は増幅されなかった。
P.g：*Porphyromonas gingivalis*、*F.n*：*Fusobacterium nucleatum*、*S.m*：*Streptococcus mutans*

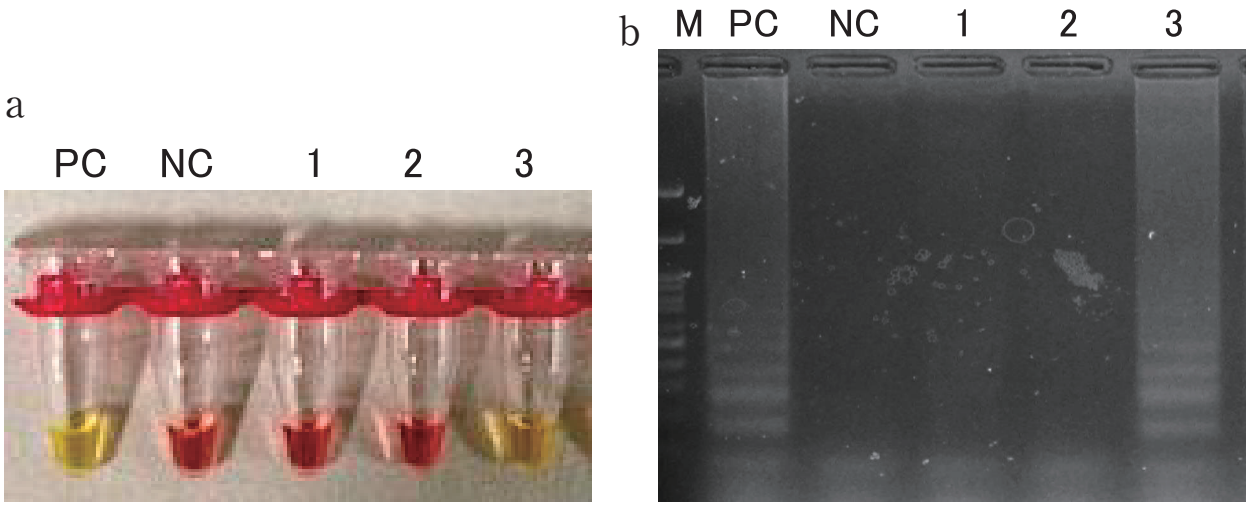

図 3　臨床検体による検出
a：臨床検体による検出の確認。検体として唾液を用いてタブレット型培地で培養し、沈殿から抽出した DNA を用いて LAMP 法にて遺伝子増幅を行ったところ、サンプル 3 のみ陽性となった。
b：増幅産物の電気泳動。サンプル 3 にのみラダーが確認された。

考　察

A.a は侵襲性歯周炎の原因菌として着目されているため、これまでにヒト口腔内における本菌の検出頻度を調査した研究は国内外問わず数多く報告されているが、研究によって検出頻度に大きな差を認め、一様な見解が得られていない。近年、特異的遺伝子を増幅させる PCR 法などによる微生物の検出手法が確立され、検出感度が飛躍的に向上し、これまでに試料中に微量で検出できなかった *A.a* の検出が可能となってきた。本研究で用いた LAMP 法は標的遺伝子の配列から 6 種類のプライマーを用いて遺伝子を増幅させる方法で、既に臨床において細菌やウイルス感染症の診断に応用されている。また、一定温度で反応させることが可能であるため、検体から容易に標的遺伝子を検出できる特徴を持っている[11,12]。そのため、本研究では歯科医院レベルで行える臨床検査の確立を目指し、従来の PCR 法やリアルタイム PCR と比較して設備や検査費用がかからず、簡便にスクリーニングや診断が実施できる LAMP 法は有用であると考えられる。

タブレット培地による唾液培養で通常よりも短い期間で *A.a* 特異的プライマー[10]で 10^4CFU/μL 相当の *A.a* 検出をし（図 2a）、*A.a* 以外の *P.g*、*Fn*、*Sm* は検出限界以下であった（図 2b）。また、培養後のチューブが濁っていたので菌の増殖が認められたと判断したが（図 1b）、*A.a* 以外の菌の増殖も起こっていることが想定できる。今後は *A.a*　Y4 株のみを培養した時の培地の変化を確

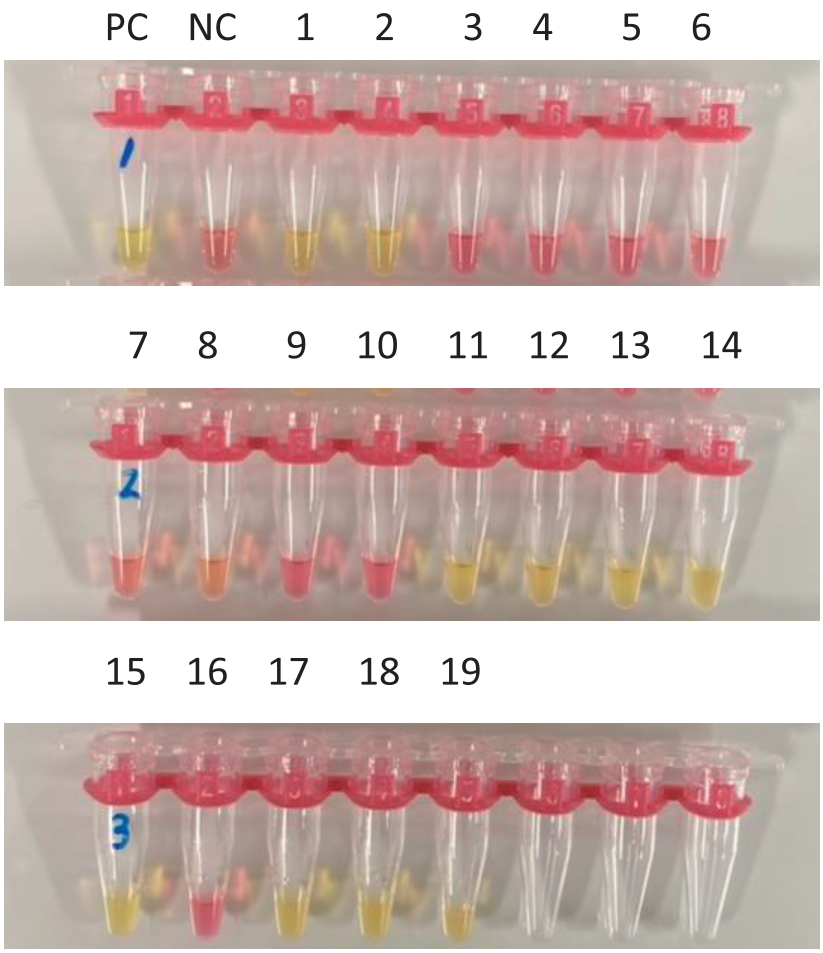

図 4　心房細動患者唾液での検出
19 名の検体から *A.a* の検出を行ったところ、10 名（52.6%）が陽性であった。
PC：positive control；*A.a* 10^4CFU/μL、NC：Negative control；distilled water

認し、培養条件のさらなる検討をする必要がある。また、タブレット型培地での培養では、培養チューブの蓋を閉めた状態で行っている。そのため、チューブ中の空気は大気の CO_2 濃度（0.04%）となっている。*A.a* が CO_2 濃度 5%で培養するのが適しているため、今回は至適濃度での培養となっていない。本法でも *A.a* の検出はできているが、検出感度についての検討は今後の課題である。

A.a の検出頻度はこれまでに、健常小児で約 20%、健常成人で約 36%、成人歯周炎患者で約 50%、若年性歯周炎患者では約 90%と報告されている[2]。日本人における保菌率も歯周健常者で 9.7%、慢性歯周炎患者で 28%との報告もある[13]。また、若年性歯周炎においては、*A.a* を保菌する親から伝播する垂直感染の頻度は高く、配偶者間で伝播する水平感染は 14 ～ 60%とこれまでの研究報告によって大きな差がある[5]。様々な保菌率が示されているが、歯周治療を行っても患者口腔内から根強く検出されるとの報告[14]もあるため、*A.a* 保菌歯周炎患者を正確に把握し、その患者に対して適切な治療や治療後の厳格なケアを実施することが重要となる。

A.a と全身疾患との関連に関する報告では、感染性心内膜炎、関節炎、菌血症、骨髄炎、皮膚感染症、尿路感染症および種々の膿瘍などの検体から *A.a* が分離されており、口腔細菌である本菌が全身感染症の起因微生物となり得ることが示唆されている[15]。特に、感染性心内膜炎では検体の 1.4 ～ 3%が *A.a* 陽性であり[16, 17]、心臓弁の運動でダメージを受けたために露出した組織に *A.a* が付着することによって、心臓弁への感染が成立すると考えられている。本研究においては、心疾患としての心房細動患者の唾液中 *A.a* の保菌率を調べた。心房細動とは、心房が小刻みに震えて痙攣し、機能しなくなる疾患である。心房細動の原因は、加齢、高血圧、心臓病等が挙げられている[18]。感染性心内膜炎では、*A.a* 感染が原因となっていることから心房細動においても *A.a* 感

染が生じている可能性がある。また、心房細動患者では、脳卒中の発症リスクが健常者に比較して5倍となることが報告されている。非弁膜症性心房細動の患者では、脳卒中発症の原因となる血栓の90％以上が心臓の左心耳内で形成されており[19]、血栓形成のリスク因子としては、現在まで、*A.a* と同様に歯周病原性細菌である *P.g* と心房細動との関連は報告されているが[20]、*A.a* と心房細動との関連を調査した報告は未だなく、また既存のPCR法などでは検出感度の問題から正確に調査するのは困難であると考えられた。

本研究では、タブレット型培地を用いた培養法と目視で判定可能なLAMP法を組み合わせた手法によって、唾液検体から *A.a* を簡易に検出可能な方法を確立した。本検出法を用いて、心房細動患者の唾液検体から *A.a* の検出を試みたところ、53%の検出率となり、既述の成人性歯周炎における検出率が約50%[7]との研究報告とほぼ同程度の検出頻度となった。心房細動患者の唾液検体における *A.a* 検出率は決して低くはなく、本菌が心房細動の発症や病態に影響する可能性も考えられるため、今後は検体数を増やして *A.a* 菌株（ATCC29523、JP2、SUNYab75）や他菌株（*P.g*、*Fn*、*Sm* など）との違いや健常者、心房細動の歯周病の有無による唾液中 *A.a* 検出率の比較も行っていく予定である。

結　論

唾液試料から侵襲性歯周炎の主な原因菌とされる *A.a* の感度・特異度ともに優れた簡易検出法を確立できた。培養法とLAMP法を組み合わせた本検出法は、従来の方法に比べて侵襲なく唾液試料の採取が可能であり、研究・臨床においても活用できるものであり、今後における *A.a* の病態解明に貢献できるものと考えられる。

謝　辞

本稿で取り上げた研究は、JSPS科研費JP23K092017（北川）、およびJP24K05588（長嶺）の助成を受けたものである。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文　献

1）Nørskov-Lauritsen N, Claesson R, Birkeholm Jensen A, Åberg CH, Haubek D: Aggregatibacter actinomycetemcomitans: Clinical significance of a pathobiont subjected to ample changes in classification and nomenclature, *Pathogens*, 8：243, 2019
2）Slots J, Reynolds HS, Genco RJ: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: A cross-sectional microbiological investigation, *Infect Immun*, 29：1013–1020, 1980
3）Preus HR, Zambon JJ, Dunford RG, Genco RJ: The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with established adult periodontitis, *J Periodontol*, 65：2–7, 1994
4）Asikainen S, Chen C, Slots J: Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porplyromonna gingivalis* in families with periodontitis, *Oral Microbiol Immunol*, 11：387–394, 1996
5）DiRienzo JM, Slots J, Sixou M, Sol MA, Harmon R, McKay TL: Specific genetic variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* correlate with disease and health in a regional population of families with localized juvenile periodontitis, *Infect Immun*, 62：3058–3065, 1994
6）Asikainen S, Chen C: Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*, *Periodontol 2000*, 20：65–81, 1999
7）Van Winkelhoff AJ, Boutaga K: Transmission of periodontal bacteria and models of infection, *J Clin Periodontol*, 32：16–27, 2005
8）Kitagawa M, Nagamine K, Oka H, Ouhara K, Ogawa I, Komatsuzawa H: Kurihara H. Rapid detection of the Streptococcus mutans cnm gene by loop-mediated isothermal amplification, *Anal Biochem*, 605：113812, 2020
9）Nagamine K, Kimura R, Kitagawa M: Genetic detection of oral bacteria using tablet medium, *The Journal of Japanese Society for Clinical Microbiology*, 33：25–29, 2023
10）Miyagawa J, Maeda H, Murauchi T, Kokeguchi S, Yamabe K, Tanimoto I, Nishimura F, Fukui K, Takashiba S: Rapid and simple detection of eight major periodontal pathogens by the loop-mediated isothermal amplification method, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 53：314–21, 2008
11）Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T: Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products, *Biochem Biophys Res Commun*, 290：1195–1198, 2002
12）Nagamine K, Hase T, Notomi T: Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers, *Mol Cell Probes*, 16：223–229, 2002
13）續橋　治、内堀聡史、渕上真奈、上里ちひろ、小峯千明、高橋佑次、小西賀美、小野良徳、深津　晶、福本雅彦：*Aggregativacter actinomycetemcomitans* 簡易検査キットの開発と臨床応用日本口腔検査学会雑誌、12：39–45、2020
14）Saarela MH, Doğan B. Alaluusua S, Asikainen S: Persistence of oral colonization by the same *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain(s), *J Periodontol*, 70：504–509, 1999
15）van Winkelhoff AJ, Slots J: Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in nonoral infections, *Periodontology 2000*, 20：122–135, 1999
16）Brouqui P, Raoult D: Endocarditis due to rare and fastidious bacteria, *Clin Microbiol Rev*, 14：177–207, 2001
17）Nørskov-Lauritsen N: Classification, identification, and clinical significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter species* with host specificity for humans, *Clin Microbiol Rev*, 27：214–240, 2014

18）JCS/JHRS 2020 Guideline on Pharmacotherapy of Cardiac Arrhythmia, *Circulation*, 141：e750–e772, 2020
19）Blackshear JL, Odell JA：Appendage obliteration to reduce stroke in cardiac surgical patients with atrial fibrillation, *Ann Thorac Surg*, 61：755–759, 1996
20）Miyauchi S, Tokuyama T, Shintani T, Nishi H, Hamamoto Y, Ouhara K, Furusho H, Miyauchi M, Komatsuzawa H, Nakano Y：Periodontitis and the outcome of atrial fibrillation ablation：Porphyromonas gingivalis is related to atrial fibrillation recurrence, *J Cardiovasc Electrophysiol*, 32：1240–1250, 2021