

論文の内容の要旨

氏名：野 口 博 康

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Comparison of *Candida* detection frequencies in exfoliative cytology samples between loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and conventional methods

（細胞診検体を用いた *Candida* 属検出における loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法と従来法との感度の比較）

Candida albicans は口腔常在菌であり、口腔カンジダ症の原因である。口腔内での *C. albicans* の日和見感染は、誤嚥性肺炎の危険因子としても知られている。口腔以外では、食道カンジダ症、カンジダ性肺炎および侵襲性カンジダ症などの原因となる。*Candida* 属の検出方法には培養法、PAS 染色、Grocott 染色、および real time PCR 法などがある。これらの方法は特殊な器材や装置を必要とする上に、時間と費用もかかる。そのため臨床では、検査結果を得る前に治療を開始するという事態が生じており、簡便かつ迅速な検査法が求められている。

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は、短時間で DNA の特異的な増幅を可能にするためにわが国で開発された遺伝子増幅法である。DNA 合成酵素による伸長反応中に、副産物として生成されるピロリン酸マグネシウムの白濁・白沈を Loopamp リアルタイム濁度測定装置；LA-200（テラメックス、京都）で測定することにより遺伝子発現の定量が行える。一方、擦過細胞診は、迅速・簡便かつ比較的安価な非侵襲的検査法で、口腔の前癌病変や口腔癌のスクリーニング検査として広く用いられている。

本研究では、LAMP 法を用いて擦過細胞診検体からの *C. albicans* 検出を試みるとともに、LAMP 法と従来法（培養法と PAS 染色）において *Candida* 属の検出感度を比較した。また、飲酒および喫煙習慣が *Candida* 属の検出率に与える影響についても検討した。

日本大学歯学部付属歯科病院口腔外科を受診し、擦過細胞診を施行した患者 53 名を対象とし、68 検体を実験に用いた。細胞診検体は、Papanicolaou 染色により細胞形態学的な分析を行った結果、Class II が 54 検体、Class III が 10 検体、Class V が 3 検体、Class I が 1 検体であった。また、53 名のうち、飲酒習慣のある患者は 61.8%、喫煙習慣のある患者は 20.1%であった。LAMP 法の陽性対照、および特異性と検出限界の評価に、*C. albicans* の標準菌株である ATCC 24433 を用いた。*C. albicans* DNA は DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, CA, USA) にて抽出後、得られた DNA を 1 ng/μL から 1 fg/μL まで連続的に希釈し、サンプル溶液とした。LAMP 法による分析は、特定微生物検査試薬キット「真菌カンジダ」（栄研化学、東京）を用いて行った。DNA の増幅反応は、LA-200 にて 65°C で 60 分間加熱し、60 分以内に濁度が 0.1 に達したものを陽性と判定とした。培養法による *Candida* 属の検索は、擦過細胞溶液を Vitalmedia Color Candida Agar（極東製薬、東京）に播種し、37°C で 48 時間培養した。PAS 染色では、顕微鏡下において仮性菌糸を認めた検体を *Candida* 属陽性とした。

はじめに、LAMP 法の検出限界と特異性に関して検討を行った結果、LAMP 法による *C. albicans* DNA の検出限界は 1 pg であった。また、増幅された DNA はアガロースゲル電気泳動で特徴的なラダーパターンとして観察された。DNA 量 1 pg は *C. albicans* 染色体の DNA 57 コピーに相当し、濁度 0.1 到達時間は DNA 1 ng で 28.8min、100 pg で 39.3min、10 pg で 42.1 min、1 pg で 47.3min と DNA 量依存的に短くなった。擦過細胞診検体における LAMP 法での *C. albicans* の検出率は 42.6%であった。Class 別の検出率は、Class II 症例で 44.4%、Class III 症例で 50.0%であったのに対し、Class I と Class V 症例

では0%であった。また、臨床診断別の *C. albicans* 検出率は、扁平苔癬 85.7%、口腔カンジダ症 66.7%、白板症 42.9%、線維腫・口内炎 50.0%、乳頭腫 33.3%、扁平上皮癌 26.3%およびその他の病変 20.0%であった。次に、LAMP 法で *C. albicans* が検出された症例において、培養法と PAS 染色を行った。その結果、培養法と PAS 染色における *Candida* 属の検出率はそれぞれ 32.4%と 29.4%であり、LAMP 法は一菌種のみを対象とした結果であるにも関わらず、調べた方法の中で最も高い検出率だった。

さらに、飲酒群と非飲酒群における *Candida* 属の検出率を比較した結果、LAMP 法、培養法、PAS 染色ともに、飲酒群の方が非飲酒群よりも高い値を示したが、両群に統計学的な有意差は認めなかった。喫煙群と非喫煙群についても同様の検討を行った結果、非喫煙群の *Candida* 属陽性率は、LAMP 法 43.8%、培養法 29.1%、PAS 染色 27.1%であったのに対し、喫煙群の *Candida* 属陽性率は LAMP 法と培養法はともに 38.9%、PAS 染色 33.3%であった。しかし、両者間で統計学的な有意差は認めなかった。

以上の結果から、LAMP 法は擦過細胞診で採取した検体から *C. albicans* を高感度かつ迅速に検出することが可能であることが示された。検査に要する時間は、DNA の抽出を含めても 90 分程度と従来法に比べ極めて短いため、LAMP 法の臨床応用は、口腔カンジダ症をはじめ *Candida* 属が原因となる様々な疾患の迅速診断に寄与する可能が示唆された。