

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21592271  
 研究課題名（和文） 迅速遺伝子解析による胆道閉鎖症細菌プロファイリングと胆管炎早期発見及び予後予測  
 研究課題名（英文） Effect of cholangitis after Kasai's portoenterostomy and prognostic factors on the molecular profiles of fecal bacterial flora in an infant with biliary atresia  
 研究代表者  
 岡田 忠雄 (OKADA TADAO)  
 北海道大学・北海道大学病院・講師  
 研究者番号：30344469

## 研究成果の概要（和文）：

胆道閉鎖症患児の初診時と葛西時糞便、先天性胆道拡張症根治術時糞便、各手術時の胆嚢胆汁を Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP 法) を用いて、今までに指摘されていない腸内細菌叢を検索して新たな腸内細菌プロファイルを作製し、分子生物学的手法による細菌プロファイルの作製(16S rRNA 遺伝子部分塩基配列 T-RFLP 解析)と T-RFLP 法解析による細菌クラスターの同定を行った。その結果、①乳児胆汁中に、難培養の細菌は存在しない、②胆道閉鎖症胆管炎例に糞便 T-RFLP 法解析細菌クラスターの変化があること、③胆道閉鎖症と先天性胆道拡張症の鑑別に糞便 T-RFLP 法解析細菌クラスターが使用できる可能性があることを得た。

## 研究成果の概要（英文）：

Molecular methods utilizing broad-range primers for 16S rDNA (ribosomal RNA gene) PCR and sequencing have been evaluated for their utility in diagnostic bacteriology. First, microbiota in fecal content from BA individual with recurrent cholangitis was compared using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). Second, microbiota in fecal content from choledochal cyst (CC) and biliary atresia (BA) individuals at the operation were compared using 16S rRNA gene libraries and T-RFLP. As the results, any bile microbiota (bacterial DNA) was not detected using PCR in CC and BA patients. Bacterial DNA showed marked differences in the composition of fecal microbiota in a BA infant with recurrent cholangitis. Molecular analysis of colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and T-RFLP might be useful to detect BA cholangitis more earlier. Bacterial DNA showed marked differences in the composition of fecal microbiota in CC and BA infants. The microbiota consisted of microbial communities of Bifidobacterium, Lactobacillales, Bacteroides, Prevotella, Clostridium clusters IV, XI, and XVIII, and Clostridium subcluster XI Va. The Bifidobacterium, Bacteroides, and Clostridium clusters were detected predominately in CC than BA group. Lactobacillales was most predominant group in BA feces. Molecular analysis of colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and T-RFLP might be useful to differentiate CC from BA.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：迅速遺伝子解析、細菌プロファイル、T-RFLP 法、16S-rRNA、胆道閉鎖症、胆管炎、糞便、バイオロジカル・マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症は出生 1 万人に 1 人の割合で発生し、本邦で年間約 80 人（胆道閉鎖症全国登録集計結果）が発症している。北海道大学では年間 3～5 人の胆道閉鎖症患児の手術（葛西術＝肝門部空腸吻合術）を施行しており、肝組織や閉塞胆道組織の蓄積保管や長期に渡る追跡予後調査も行い十分な臨床成績の蓄積がなされている。現在、胆道閉鎖症で主に問題とされている点は、①その病因の解明、②葛西術施行時の予後因子の推測と解明である。1957 年胆道閉鎖症に対して葛西術が施行されて約 50 年を経るが、ウイルス感染説、Ductal plate malformation 説、血行障害説、胆汁酸障害説、自己免疫説など多々あり未だ病因論が明確でない。そこで、我々は胆道閉鎖症葛西術施行時の肝外胆管の肝門部結合織と肝生検標本を用いて HE 染色による肝線維化の強度（T Okada et al. *Eur J Pediatr Surg* 16:28-33:2006）や CD56 免疫染色により胆管上皮での N-CAM（neural cell adhesion molecule）の出現の程度を検討することで、胆道閉鎖症患児における胆管細胞・細胞間や胆管細胞・基質間の接着分子の変化を病理組織学的に検討してきた。その結果、胆道閉鎖症患児の肝組織では HE 染色でグリソン鞘の架橋形成や肝硬変の頻度が高く、また CD56 免疫染色の染色強度や分布が胆管上皮で強く表現されており、胆道閉鎖症の肝病変では細胞間接着因子が強発現していることを報告し胆道閉鎖症発生に関して細胞病理学的検討をなし得た（T Okada et al. *Eur J Pediatr Surg* 17:6-11:2007）。

また、葛西術施行時の肝外胆管の肝門部結合織の CD56 免疫染色結果から、肝外胆管の肝門部結合織での CD56 染色強度が強いと有意差を持って肝臓移植に移行する確立が高いことを報告した（T Okada et al. *Turkish J Pediatr in press*）。本報告は、胆道閉鎖症初回手術の葛西術時に肝臓移植が将来必要となるかを推測する意味で、患児や家族にとっての意義は大きい。

このような研究結果を踏まえ、胆道閉鎖症の予後に大きな影響を与える胆管炎の早期治療、予後推測について、新たなバイオロジカル・マーカーを研究しようとの着想に至った。

本研究の第 1 の特色、独創性は、本研究の結果、胆管炎を早期に診断して、その治療を迅速に開始することが可能となり、胆管炎か

ら肝線維化への進行を軽減できる可能性が生まれる事である。現在、胆管炎の治療は糞便培養結果から推測して広域抗生剤を投与しているのが現状であり、ひいては難治性胆管炎に至り肝移植を必要とすることも少なくない。胆管炎起炎菌を早期に明らかにすることは、胆道閉鎖症患児にとって恩恵は非常に大きく、本研究の意義がある。

第 2 の特色は、胆道閉鎖症の予後に関連するバイオロジカル・マーカーに腸内細菌プロファイルを初めて臨床応用するという新しい発想に基づいている点である。本研究により個々の胆道閉鎖症患児の腸内細菌プロファイルを作製、集積してデータベースが構築されれば、肝硬変と非肝硬変群に分け、個々の胆道閉鎖症患児の腸内細菌プロファイルを検討することでバイオロジカル・マーカーとして臨床応用が推測される。よって、T-RFLP 法を用いた胆道閉鎖症患児の腸内細菌プロファイルの作製は、予後推測という臨床疫学面からみても大きな意義がある。

第 3 の特色は、胆道閉鎖症における進行性肝線維化の病態、病因論として未知の腸内細菌との関連を臨床検査学上世界で初めて検討する点である。迅速、簡便に遺伝子解析する T-RFLP 法で胆汁、糞便を解析することで、分子生物学的見地から検討した細菌学的病因説に新たに着目し、研究を行う計画は斬新かつ独創的である。

## 2. 研究の目的

葛西手術後約 50%に起こる胆管炎は、肝硬変の進展に対する大きな誘因の一つであり、ひいては肝臓移植（本邦年間約 40 例施行）が必要となり、患児や家族に対する身体的、経済的負担が大きくなる。それ故、葛西手術後胆管炎の早期発見と早期治療は重要である。このためには非侵襲的な胆管炎の診断方法が非常に重要となる。

臨床の場では、糞便培養検査や血液培養を施行することによって得られた菌を起炎菌の指標としているのが現状であるが、血液培養検査で陽性となることは約 20～40%と少なく、胆管炎治療としての抗生剤選択のエビデンスも乏しいのが現状である。一方、糞便検査に関しては、種々の嫌気性培養の工夫により腸内細菌の 20%は培養可能と言われていたが、残りの 80%は培養が困難であるか、またはその菌数が少数ゆえに難分離性の腸内細菌とされている。最近、この難培養、難

分離の腸内細菌の解析に、16S リボゾーム (r) RNA 遺伝子を指標とする分子生物学的手法が導入され、更に 16SrRNA 遺伝子を増幅するプライマーの 5'末端を蛍光標識し、制限酵素処理で得られた末端断片の多型を迅速、簡便に遺伝子解析する Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP 法) が応用可能となった。

そこで、我々は胆道閉鎖症患児の初診時糞便を採取し、また葛西手術時に胆汁を採取することで、糞便検体、胆嚢内胆汁検体を T-RFLP 法を用いて、今までに指摘されていない腸内細菌叢を検索して新たな腸内細菌プロファイルを作製し、①胆管炎の早期診断、②葛西術後の経過例を臨床的減黄例、非減黄例、肝硬変に伴う症状発症例 (消化管出血例、腹水例) に群別化し、新規腸内細菌の予後推測へのバイオリジカル・マーカーとしての関連、更に、③動物実験を含めた胆道閉鎖症病因に関する新規細菌感染の関与の検討、の 3 点を検討することを研究目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、北海道大学病院自主臨床研究 (自 011-0017) 「胆道閉鎖症患児の糞便と胆汁を用いた迅速遺伝子解析 T-RFLP 法による細菌プロファイリング作成—胆管炎早期発見及び予後予測への関与の研究—」で承認済である。

臨床検体の使用は検体採取前に患児の保護者に文書にて検体の研究使用の許可をとる。また、臨床検体や本研究の結果に対する個人情報の取り扱いには十分注意する。具体的には個人氏名の番号化や本研究結果は医局有鍵保管場所に保管する。研究成果を学問的理由で公表しなければならぬ時は、個人が特定できないように配慮する。

北海道大学病院で蓄積した葛西手術時の胆嚢胆汁と胆管炎時の糞便を用いて細菌 DNA を抽出し、以下に示す neighbor-joining method で系統型樹を求める。その後、制限酵素により切断し得られた 5'末端断片を T-RF 長としてアナライザーで計測し、T-RF パターンのピーク面積を測定し細菌叢を解析する (迅速遺伝子診断 T-RFLP 法)。本結果から葛西手術時の胆嚢胆汁中に存在する難培養・分離性の新規腸内細菌の同定、更に糞便検体から胆管炎起炎菌を検索する。また、臨床例で葛西術後の非減黄例、肝硬変例と関連して T-RFLP 法による新規腸内細菌プロファイル作製が予後推測へのバイオリジカル・マーカーとして有用か否か検討する。その後、胆道閉鎖症ラットモデルの胆嚢胆汁中に存在する細菌 DNA と蛋白レベルでの T-RFLP 解析結果を蓄積し、肝線維化の程度と比較検討することで、T-RFLP 法による新規腸内細菌

プロファイル作製が肝線維化面からみた予後推測へのバイオリジカル・マーカーとして有用か否かを検討する。

#### 1) 胆道閉鎖症患児での胆汁・糞便採取

①葛西手術時に胆嚢胆汁と新鮮糞便 (1g) を採取し、対照群として乳児総胆管拡張症例の胆嚢胆汁と新鮮糞便 (1g) を採取する。

②管炎疑い例及び発症例の新鮮糞便 (1g) を採取し、臨床的減黄例、非減黄例、肝硬変に伴う症状発症例 (消化管出血例、腹水例) に群別化する。

-80°C で保管する。胆汁も同様の手技で溶解し -80°C で保管する。

#### 2) 腸内細菌プロファイルの作製

##### ①DNA 抽出

胆汁、糞便サンプルから Soil DNA キット (Mo Bio Labo, Inc., Calif., USA) を用い、細菌 DNA を抽出する。16S ribosomal DNA をユニバーサルプライマーを用いて PCR 法により 16S ribosomal DNA 領域を増幅する。増幅 16S ribosomal DNA 断片を PCR で純化する。

##### ② DNA シークエンシング、系統型 (Phylotype) 作製

DNA アナライザーで DNA シークエンスを行い、neighbor-joining method で系統型樹 (phylogenetic tree) を求める。

##### ③T-RFLP 分析

27F と 1492R プライマーを使用し PCR 産物をポリエチレングリコールで純化し、制限酵素でそれらを切断し得られた 5'末端断片を T-RF 長としてアナライザーで計測する。T-RF パターンのピーク面積を測定し細菌叢を分析し T-RFLP 解析をおこなう。

#### 3) 臨床例での結果解析

胆道閉鎖症術後胆管炎児の糞便中細菌 DNA と蛋白レベルでの T-RFLP 解析結果を蓄積し、胆管炎の細菌プロファイルを確立して胆管炎の早期診断・治療に使用可能か否かを検討する。肝硬変、非肝硬変に群別し、迅速遺伝子診断による腸内細菌プロファイル作製が胆道閉鎖症予後推測へのマーカーとして有用か検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 乳児 11 例の胆汁 (先天性胆道拡張症 10 例、胆道拡張症 1 例) 中に、一般細菌培養と PCR 法で難培養の細菌は存在しなかった。よって、先天性胆道拡張症、胆道閉鎖症とも根治術前の、胆汁中には DNA レベルでも細菌クラスターが存在せず、無菌の状態であるとの成果を得た。

(2) 胆道閉鎖症根治術の葛西術時は T-RFLP 法で Bifidobacterium クラスターは陰性であり、Lactobacillales クラスターが陽性であった

が、胆管炎発症時には糞便 T-RFLP 法解析細菌クラスターが Bacteroides クラスターと Clostridium クラスターが優性の細菌叢に変化していた。よって、T-RFLP 法による糞便細菌プロファイル同定が、胆道閉鎖症術後の胆管炎の早期診断に使用できる可能性が推測された。この成果は、臨床で胆道閉鎖症術後胆管炎か否か判断に迷う際に抗生剤投与開始のエビデンスとして重要と考えられた。

(3)胆道閉鎖症 (7 糞便検体) と先天性胆道拡張症 (2 糞便検体) の根治術時に糞便 T-RFLP 法をおこない (抗生剤未使用域乾下)、Bifidobacterium クラスター、Lactobacillales クラスター、Bacteroides クラスター、Prevotella クラスター、Clostridium クラスター IV、XI、および XV III、Clostridium サブクラスター XI Va の細菌クラスターが胆道閉鎖症と先天性胆道拡張症の両群とも認められた。一方、Bifidobacterium クラスター、Bacteroides クラスター、および Clostridium クラスターが、胆道閉鎖症群に比較して先天性胆道拡張症群でより多く認められた。更に胆道閉鎖症群の中では Lactobacillales が多くを占めていた。よって、本研究結果から、先天性胆道拡張症と胆道閉鎖症の鑑別に糞便 T-RFLP 法解析細菌クラスターが使用できる可能性がある、の成果を得た。このことは、乳児期早期に黄疸、白色便で発症した乳児胆道系外科疾患の鑑別に開腹術中胆道造影によらない、非侵襲的診断法として応用できる可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

4th Congress of European Academy of Pediatric Surgeons  
2012. 10. 5-9. Istanbul  
に抄録(1)提出済

(1) T. Okada, S. Honda, H. Miyagi, A. Taketomi :  
Bacterial 16S rRNA genetic markers for fecal samples to differentiate choledochal cyst from biliary atresia.

4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition  
2012. 11. 14-18. Taipei

に抄録(2)(3)提出済

(2) T. Okada, S. Honda, H. Miyagi, A. Taketomi :  
Molecular analysis of bile microbiota using PCR and sequencing of independent genetic targets in pediatric biliary diseases.

(3) T. Okada, S. Honda, H. Miyagi, A. Taketomi :  
Effect of cholangitis after Kasai's portoenterostomy on the molecular profiles of fecal bacterial flora in an infant with biliary atresia.

[その他]

ホームページ等

北海道大学病院自主臨床研究 (自 011-0017)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岡田 忠雄 (OKADA TADAO)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号 : 30344469

##### (2) 研究分担者

佐々木 文章 (SASAKI FUMIAKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号 : 40178661

尾崎 倫孝 (OZAKI MICHITAKA)  
北海道大学・大学院医学研究科・特任教授  
研究者番号 : 80256510

##### (3) 連携研究者 なし