

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07013

研究課題名（和文）バイオフィルムを介した胆管ステント閉塞メカニズムの解明

研究課題名（英文）Relationship between biofilm and biliary stent occlusion.

研究代表者

炭山 和毅（Sumiyama, Kazuki）

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90385328

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、閉塞性黄疸患者8症例の閉塞した胆管ステントを回収し、胆管ステント内部の細菌とバイオフィルムに対し、細菌培養・メタゲノム解析・各種顕微鏡による構造解析を実施した。その結果、腸球菌の一部の菌株が、胆汁酸環境下でバイオフィルム形成を促進しており、胆管ステント閉塞の一因となっている可能性が示唆された。同時に、バイオフィルム抑制効果を持つ薬剤について探索を行い、候補物質Pが大腸菌・腸球菌・ブドウ球菌によるバイオフィルム形成の抑制効果をもつ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胆管ステントの閉塞という胆道治療上の課題に対し、閉塞のメカニズムに迫った。特に、バイオフィルムを透明化し可視化する手法を用いて閉塞した胆管ステントの表面を初めて観察し、胆管ステントの表面に実際にバイオフィルムが形成されていることを確認した。そして、閉塞物内には腸球菌が多く存在することを確認し、分離した腸球菌の一部は、二次胆汁酸の存在下で、バイオフィルム形成が促進されるという結果が得られた。さらに、ステント表面のバイオフィルム形成を阻害する物質について知見を得た。これらを臨床応用することで、胆管ステント閉塞という臨床課題解決に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we collected obstructed biliary stents from eight patients with obstructive jaundice and performed bacterial culture, metagenomic analysis, and structural analysis using various microscopes on the bacteria and biofilm inside the biliary stents. The results suggested that strains of enterococci promoted biofilm formation in a secondary bile acid environment, which may have contributed to the bile duct stent obstruction. We searched for agents with anti-biofilm effects, and suggested that candidate substance P may have inhibitory effects on biofilm formation by *E. coli*, Enterococci, and Staphylococci.

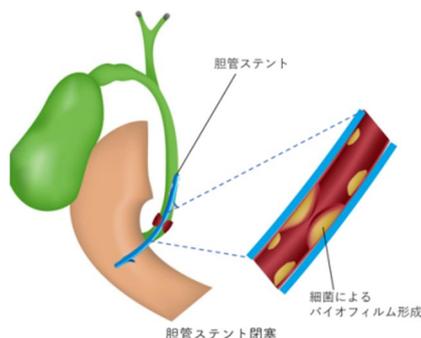
研究分野：消化器内視鏡と細菌叢

キーワード：胆管ステント バイオフィルム メタゲノム解析 閉塞性黄疸

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 腫瘍や結石が引き起こす閉塞性黄疸の病態

閉塞性黄疸は、胆汁の消化管への排出が滞り、胆汁中のビリルビンが体内に蓄積して皮膚・尿・眼球結膜の黄染を生じた状態である。胆管癌などの腫瘍や胆管結石等により、胆汁の排出経路の一部が物理的に障害され、体内にうっ滞すると、閉塞性黄疸と胆管炎を引き起こす。閉塞性黄疸の治療の第一選択は、内視鏡を用いた胆管ステントの挿入による胆道ドレナージである (Tsuyuguchi, et al. 2007)。近年、高齢化や肝胆膵癌の罹患患者数増加を背景に、胆管炎の予防と閉塞性黄疸の解除を目的とした内視鏡的胆管ステント挿入術の実施件数は、増加の一途をたどっている。



### (2) 現行の治療法の課題

内視鏡的胆管ステント挿入術には、プラスチックステントと金属ステントの2種類のステントが用いられる。このうち、プラスチックステントは比較的安価かつ挿入が簡便であることから、閉塞性黄疸と急性胆管炎を合併した病態に対する初期治療として最も頻用されている。

一方、プラスチックステントの最大の欠点は、開存期間が短く、80~120日程度で閉塞をきたすことである (Davids, et al. 1992)。

閉塞をきたすと、胆管炎や敗血症の再燃や化学療法中断の原因となるため、金属ステントへ交換するか、3ヶ月毎にプラスチックステントを定期的に交換することが推奨されている (Dumoncaeu, et al. 2012)。

定期的なプラスチックステント交換術は、その度に入院、点滴および透視下内視鏡治療を要するため、多額の治療費を費やし、医療費増加の一因となっている。

近年では、ステント素材の開発が行われ、ステント開存期間の延長を目指す試みがなされているが (Yamabe, et al. 2016)、現在のところステント閉塞を根本的に予防する方法は存在しない。

### (3) 胆管ステント閉塞のメカニズム

胆管ステント閉塞は、「胆泥」と呼ばれる有機物の集合体がステント内腔に形成されて生じる。「胆泥」は、複数の段階を経てステント内腔の表面に徐々に蓄積されていく。まず、ステント内腔に腸内細菌が付着し、バイオフィームが形成されると推定されている。次に、バイオフィームを足場に、ビリルビンカルシウム・コレステロール結晶・パルミチン酸・食物繊維等が析出する。さらに食物残渣等が十二指腸からステント内部へ逆流し、内腔に充満して閉塞に至る。このように腸内細菌が閉塞メカニズムの第一段階として関与が指摘されているものの、どのような細菌がステント内腔にバイオフィームを形成するのかはよく分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、閉塞性黄疸患者から閉塞した胆管ステントを摘出し、ステント内側の表面に形成されたバイオフィーム及び閉塞物に対して、16S rDNA 細菌叢プロファイル解析・細菌培養法・バイオフィーム構造解析の各観点から分析することで、胆管ステントの閉塞メカニズムに迫ることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究対象および検体採取・保存方法

胆管プラスチックステント挿入後に再閉塞に伴う黄疸をきたし来院した患者8名を研究対象とし、同意取得後、内視鏡的胆管ステント交換術時に閉塞ステントを内視鏡を用いて回収した。迅速に閉塞ステントを滅菌メスにて3分割し、液体窒素にて凍結保存した。



### (2) 実施した各解析方法

16S rDNA アンプリコンシーケンス (細菌叢解析)

凍結検体を氷上で解凍し、縦断分割したうえで、内部に充満した閉塞物を無菌下にて掻き出し、マイクロチューブ内に封入した。Lysozyme を用いた酵素法にて DNA 抽出を行い、

16S rDNA の V1-V2 領域を PCR で増幅、MiSeq を用いてシーケンスしたのち、NCBI のゲノムデータベースに参照して菌の同定を行った。

培養による菌の同定と分離

グラム染色および血液寒天培地にて培養した。各コロニーを分離し 16S 解析にて菌の同定を行った。

顕微鏡観察（組織透明化法）によるバイオフィルムの構造解析

1% グルタルアルデヒドで固定し、蛍光色素（WGA-Alexa647、FM1-43、DAPI）で染色した。バイオフィルム透明化法（Sugimoto, Kinjo Commun. Biol. 2023）を用いてバイオフィルムを透明化後、共焦点レーザー顕微鏡（LSM880）で観察した。

バイオフィルム形成能の評価

A. Glucose および NaCl 添加培地におけるバイオフィルム形成能の比較

②で分離に成功した菌を用いて、a) control 群、b) 1% Glucose 群、c) 3% NaCl 群の3群に分け、96-well plate にて 37°C で一晩インキュベートし、濁度測定を行った。また、Crystal Violet 染色のうえ吸光度を測定した。

B. 各種の胆汁酸添加培地におけるバイオフィルム形成能の比較

②で分離に成功した菌を用いて、a) DMSO 群、b) 250μM コール酸群、c) 3% NaCl 群の3群に分け、96-well plate にて 37°C で 48hr インキュベートし、濁度測定を行った。また、Crystal Violet 染色のうえ吸光度を測定した。

胆汁酸添加による菌の形態変化の観察

分離菌を BHI+1% Glucose 培地にて 37°C 24hr 培養し、FM1-43 染色のうえ走査型共焦点顕微鏡にて観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 16S rDNA アンプリコンシーケンス解析（細菌叢解析）

前段階の検討として、ステント内腔の材質の表面に存在する細菌と、閉塞物質自体に存在する細菌の種類に差があるかを比較したが、16S rDNA 解析結果に明らかな差はなかった。下表に全 8 症例の属レベルの細菌と相対的豊富度 (Relative abundance) を示す。Enterococcus、Klebsiella、Lactobacillus、Fusobacterium、Escherichia、Citrobacter、Pyramidobacter、Bifidobacterium が多くの症例で主要な属種として検出された。

KTS033	KTS034	KTS035	KTS036	KTS037	KTS038	KTS039	KTS040
Enterococcus 93.71%	Lactobacillus 72.37%	Pyramidobacter 35.16%	Pediococcus 64.96%	Fusobacterium 60.57%	Pyramidobacter 51.86%	Enterococcus 48.91%	Fusobacterium 36.69%
Klebsiella 2.46%	Enterococcus 14.85%	Enterococcus 28.31%	Klebsiella 28.58%	Escherichia 12.92%	Enterococcus 30.61%	Lactobacillus 17.47%	Klebsiella 22.93%
Veillonella 1.11%	Klebsiella 4.46%	Streptococcus 14.47%	Enterococcus 4.6%	Klebsiella 12%	Fusobacterium 9.7%	Bifidobacterium 11.65%	Bifidobacterium 16.72%
Staphylococcus 0.57%	Fusobacterium 3.7%	Lactobacillus 7.79%	Lactobacillus 0.8%	Streptococcus 7.9%	Paraclostridium 3.96%	Klebsiella 10.39%	Streptococcus 8.09%
Lactobacillus 0.47%	Bifidobacterium 0.98%	UNDEFINED 3.76%	Streptococcus 0.61%	Dialister 3.18%	Streptococcus 3.82%	Escherichia 1.73%	Escherichia 6.55%
Citrobacter 0.39%	UNDEFINED 0.87%	Klebsiella 3.49%	UNDEFINED 0.1%	Citrobacter 1.33%	Klebsiella 1.4%	Dialister 1.84%	Aggregatibacter 2.84%
Escherichia 0.38%	Escherichia 0.68%	Fusobacterium 2.45%	Schaalia 0.09%	Bifidobacterium 1.25%	Shigella 0.14%	Escherichia 1.06%	Veillonella 2.67%
Clostridium 0.38%	Bacteroides 0.64%	Bifidobacterium 2.35%	Campylobacter 0.07%	Haemophilus 0.28%	Campylobacter 0.12%	Proteus 0.82%	Dialister 2.3%
Streptococcus 0.23%	Citrobacter 0.57%	Bacteroides 0.58%	Lachnoanaerobaculum 0.05	Shigella 0.24%	Streptococcus 0.11%	Morganella 0.78%	Campylobacter 0.39%
Pyramidobacter 0.05%	Veillonella 0.25%	Citrobacter 0.4%	Granulicatella 0.04%	Enterococcus 0.08%	Veillonella 0.08%	Pyramidobacter 0.69%	Yokenella 0.26%
Fusobacterium 0.04%	Dialister 0.24%	Escherichia 0.27%	Veillonella 0.03%	Pyramidobacter 0.05%	Citrobacter 0.05%	Fusobacterium 0.63%	Shigella 0.15%
Dialister 0.04%	Campylobacter 0.12%	Actinomyces 0.22%	Actinomyces 0.02%	Lactobacillus 0.04%	Bifidobacterium 0.04%	Veillonella 0.35%	UNDEFINED 0.11%
Shigella 0.03%	Selenomonas 0.08%	Veillonella 0.13%	Prevotella 0.02%	Granulicatella 0.04%	Lactobacillus 0.02%	UNDEFINED 0.25%	Edwardella 0.06%
Paraclostridium 0.02%	Streptococcus 0.07%	Pediococcus 0.11%	Escherichia 0.01%	Campylobacter 0.03%	Yokenella 0.02%	Clostridium 0.25%	Shimwellia 0.06%
Yokenella 0.02%	Yokenella 0.03%	Haemophilus 0.09%	Solobacterium 0.01%	Yokenella 0.03%	UNDEFINED 0.02%	Yokenella 0.21%	Kosakonia 0.05%
Lactococcus 0.02%	Corynebacterium 0.02%	Dialister 0.07%	Parascardovia 0.01%	Pediococcus 0.02%	Prevotella 0.02%	Schaalia 0.17%	Raoultella 0.03%
Aeromonas 0.01%	Dialister 0.07%	Actinomyces 0.01%	UNDEFINED 0.01%	UNDEFINED 0.01%	Faecalibacterium 0.02%	Edwardella 0.12%	Enterobacter 0.02%
Bacteroides 0.01%	Schaalia 0.01%	Granulicatella 0.07%	Veillonella 0.01%	Haemophilus 0.01%	Bacillus 0.09%	Bacillus 0.09%	Pseudoescherichia 0.02%
Actinomyces 0.01%	Haemophilus 0.01%	Hafnia 0.04%	Clostridium 0.01%	Granulicatella 0.01%	Alloscardovia 0.08%	Alloscardovia 0.08%	Cronobacter 0.02%
Schaalia 0.01%	Granulicatella 0.01%	Propionibacterium 0.04%	Pseudomonas 0.01%	Actinomyces 0.01%	Citrobacter 0.07%	Citrobacter 0.07%	Citrobacter 0.01%
Hafnia 0.01%	Centipeda 0.01%	Campylobacter 0.03%		Bacteroides 0.01%	Enterobacter 0.05%	Enterobacter 0.05%	Bacteroides 0.01%
Rothia 0.01%	Leuconostoc 0.01%	Bacillus 0.02%		Neisseria 0.01%	Siccobacter 0.05%	Siccobacter 0.05%	Leclercia 0.01%
Blautia 0.01%	Abiotrophia 0.01%	Neisseria 0.02%		Leptotrichia 0.01%	Erwinia 0.05%	Erwinia 0.05%	Porphyromonas 0.01%
UNDEFINED 0.01%		Leptotrichia 0.02%		Gemella 0.01%	Selenomonas 0.04%	Selenomonas 0.04%	
		Centipeda 0.01%		Aeromonas 0.01%	Actinomyces 0.03%	Actinomyces 0.03%	
		Enterobacter 0.01%		Rothia 0.01%	Rothia 0.03%	Rothia 0.03%	
		Gemella 0.01%		Coprobacter 0.01%	Shigella 0.02%	Shigella 0.02%	
					Campylobacter 0.01%	Campylobacter 0.01%	
					Bacteroides 0.01%	Bacteroides 0.01%	
					Neisseria 0.01%	Neisseria 0.01%	
					Finexgolia 0.01%	Finexgolia 0.01%	
					Pseudoescherichia 0.01%	Pseudoescherichia 0.01%	
					Atopobium 0.01%	Atopobium 0.01%	
					Catenibacterium 0.01%	Catenibacterium 0.01%	
					Anaerostipes 0.01%	Anaerostipes 0.01%	

また、多様性に関する指標は、下表に示すとおりであり、OTU 数で 24~114 (範囲) Chao1 指数で 29.3~196.5 (範囲) と、一般的な便中および口腔内の腸内細菌叢の多様性の数値と比べて低い傾向にあった。

	KTS-033	KTS-034	KTS-035	KTS-036	KTS-037	KTS-038	KTS-039	KTS-040
observed_otus	47.0	56.0	93.0	48.0	24.0	61.0	114.0	68.0
chao1	72.5	89.0	167.4	186.0	29.3	196.3	196.5	95.0
ace	74.0	79.5	137.6	92.7	29.5	106.6	185.0	104.7
shannon	1.6	1.6	3.1	1.4	1.8	2.3	3.4	2.9

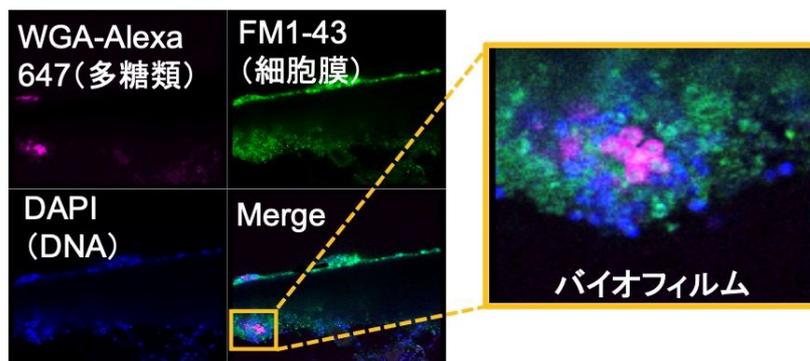
##### (2) 培養による菌の同定と分離

ステント表面の付着物を採取し、血液寒天培地（下図）に塗布して嫌気・好気培養を実施し、シングルコロニーアイソレーションを実施した。その結果、第一に Bacillus subtilis 株(8 例中 6 例)

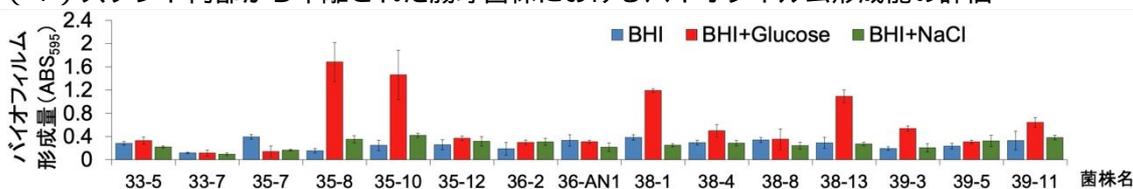
が、第二に *Enterococcus* spp. (8例中5例) が、第三に *Escherichia coli* (8例中3例) が主要な構成菌として検出された。分離が可能であった腸球菌株は(4)以降の実験で用いた。

### (3) 顕微鏡観察(組織透明化法)によるバイオフィルムの構造解析

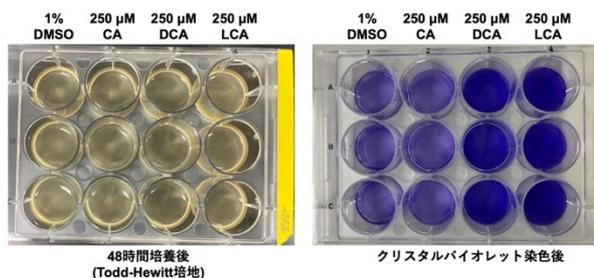
閉塞した胆管ステントを透明化イメージング法により3次元構造を観察した。その結果、ステント内腔の材質表面(右図)にグラム陽性球菌のバイオフィルム形成が認められた。また、同様に閉塞物の中心部においてもバイオフィルムが確認された。



### (4) ステント内部から単離された腸球菌株におけるバイオフィルム形成能の評価

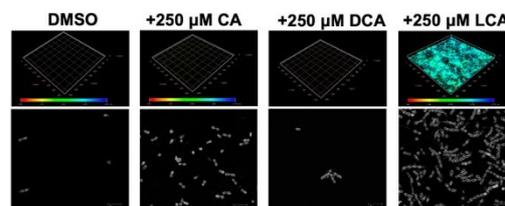


1% Glucose および 3% NaCl 添加 BHI 培地において、腸球菌全 15 株中 4 株において(上図) Glucose 添加によりバイオフィルム形成が有意に促進された。一方、NaCl 添加群には変化はなかった。このうち、Glucose でバイオフィルム形成能の促進が確認された 4 株を用いて、微生物の胆汁酸環境下におけるバイオフィルム形成能を評価した。3 種類の胆汁酸(コール酸(CA)、デオキシコール酸(DCA)、リトコール酸(LCA))の環境下でバイオフィルム形成能を観察したところ、*Enterococcus faecium* (KTS35-8 株)(右図)を含む 2 株は、リトコール酸の存在下でバイオフィルム形成が強く促進されることがわかった。一方、残る 2 株はバイオフィルム形成能を促進しなかった。



### (5) 胆汁酸添加による菌の形態変化の観察

リトコール酸の存在下でバイオフィルム形成が促進された腸球菌株を用いて、形態変化を共焦点レーザー顕微鏡で確認したところ、バイオフィルム形成の促進とともに、菌の連鎖も促進される様子が確認された。



### (6) バイオフィルム形成阻害物質の探索

ステント表面のバイオフィルム形成を阻害する物質について、既報から複数の候補物質を挙げ、バイオフィルム抑制効果について検討した。その結果、候補物質 P が、胆管ステントから分離された *Enterococcus faecalis* KTS-38-1 株のバイオフィルム形成能を濃度依存的に阻害することが確認された。

### (7) 結論

第一に、バイオフィルム透明化法を用いた顕微鏡観察により、閉塞した胆管ステントの表面と閉塞物の内部の両方において、バイオフィルム形成が初めて確認された。これは、ステント閉塞の一因としてバイオフィルム形成を指摘した既報の内容を支持する結果であった。第二に、胆管ステントから単離された一部の腸球菌株において、二次胆汁酸のリトコール酸存在下で、バイオフィルム形成が促進されるという興味深い結果が得られた。胆汁酸は脂質乳化作用があり、細菌の細胞膜脂質の乳化作用を通じて殺菌活性をもつと考えられてきたが、一部の菌株では逆にバイオフィルム形成が促進され、結果としてステント閉塞の一因となっている可能性がある。第三に、ステント表面のバイオフィルム形成を阻害する物質が存在する可能性がある。これらの臨床応用を検討することで、閉塞し難い薬剤溶出ステントの開発など、胆管ステント閉塞という長年の臨床課題の解決に貢献できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroto Furuhashi
2. 発表標題 Association of biliary stent obstruction with biofilm formation on the stent surface :An exploratory study based on 16S rRNA amplicon sequencing and microscopy-based biofilm structural analyses
3. 学会等名 END02022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	金城 雄樹 (Kinjo Yuki) (20570831)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授  (32651)	
研究分担者	須田 互 (Suda Wataru) (20590847)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー  (82401)	
研究分担者	杉本 真也 (Sugimoto Shinya) (60464393)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  (32651)	
研究分担者	高安 伶奈 (Takayasu Lena) (20814833)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教  (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 正之  (Kato Masayuki)  (00366220)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授    (32651)	
研究分担者	古橋 広人  (Furuhashi Hiroto)  (60909894)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教    (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関