2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 学　校　名 | **東 京 慈 恵 会 医 科 大 学** | 研究所名等 | 細　菌　学　講　座 | |
| 研 究 課 題 | バイオフィルムによる胆管ステント閉塞機構の解明と予防戦略<br>－胆汁酸による胆泥分離菌のバイオフィルム形成の誘導－ | | 研 究 分 野 | 医　　学 |
| キ ー ワ ー ド | ①胆管ステント ②バイオフィルム ③腸球菌 ④胆汁酸 | | | |

**〇研究代表者**

| 氏　　名 | 所　　属 | 職　　名 | 役　割　分　担 |
|---|---|---|---|
| 金　城　雄　樹 | 東京慈恵会医科大学<br>細　菌　学　講　座 | 教　　授 | 研究の統括 |

**〇研究分担者**

| 氏　　名 | 所　　属 | 職　　名 | 役　割　分　担 |
|---|---|---|---|
| 杉　本　真　也 | 東京慈恵会医科大学<br>細　菌　学　講　座 | 准　教　授 | 実験・論文作成 |
| 炭　山　和　毅 | 東京慈恵会医科大学<br>内 視 鏡 医 学 講 座 | 教　　授 | 臨床検体の収集に関する統括 |
| 加　藤　正　之 | 東京慈恵会医科大学<br>内 視 鏡 医 学 講 座 | 准　教　授 | 臨床検体の収集 |
| 一　志　公　夫 | 東京慈恵会医科大学<br>内 視 鏡 医 学 講 座 | 非常勤講師 | 臨床検体の収集 |
| 古　橋　広　人 | 東京慈恵会医科大学<br>内 視 鏡 医 学 講 座 | 非常勤講師 | 臨床検体の収集 |
| 小　貫　友　輝 | 東京慈恵会医科大学<br>附　属　病　院 | 初期研修医（基礎研究医育成プログラム） | FISH法の確立 |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

# バイオフィルムによる胆管ステント閉塞機構の解明と予防戦略
## －胆汁酸による胆泥分離菌のバイオフィルム形成の誘導－

### 1. 研究の目的
本研究は、腸内微生物叢が形成するバイオフィルムに着目し、閉塞性黄疸を繰り返す患者から回収した閉塞胆管ステント内に形成されたバイオフィルムの構造解析および、胆泥由来微生物の in vitro におけるバイオフィルム形成能の評価を通じて、胆管ステント閉塞の機序を解明することを目的とする。さらに、本研究成果を基盤として、胆管ステント閉塞に対する新たな予防戦略の確立を目指す。

### 2. 研究の計画
① バイオフィルム透明化法を用いた閉塞胆管ステント内部のバイオフィルムの可視化

これまでに得られた胆管ステント内微生物叢解析の結果をもとに、菌種特異的な蛍光 DNA プローブを作製し、まず浮遊菌を用いてその有効性を検証する。蛍光 DNA プローブは、優占菌種のリボソーム RNA（16S rRNA または 23S rRNA）を標的とする。また、蛍光プローブの浸透性向上を目的として、溶菌酵素処理条件の最適化を行う。

さらに、単一菌種および複合菌種からなるバイオフィルムを作製し、Fluorescence In Situ Hybridization（FISH）法を用いて、菌の三次元的分布を可視化する。最終的には、閉塞胆管ステント内部に形成されたバイオフィルムを対象として、本研究で確立する FISH 法と、申請者らが開発したバイオフィルム透明化技術（Sugimoto and Kinjo, Commun. Biol. 2023）を組み合わせることで、細菌およびヒト由来成分の空間配置を保持したまま観察を行う。

② 閉塞胆管ステント由来微生物のバイオフィルム形成能の評価

これまでの研究において、閉塞胆管ステント内の胆泥から、細菌および真菌を含む 17 菌種 31 株を分離・同定している。これらの分離株を用い、ビリルビンカルシウム、胆汁酸、パルミチン酸などを添加した、胆管ステント内環境を模擬した培地で培養を行う。形成されたバイオフィルムについては、ポリスチレンプレートおよびクリスタルバイオレット染色を用いた定量法（Sugimoto et al., Sci. Rep. 2018）により評価する。

### 3. 研究の成果
① バイオフィルム透明化法を用いた閉塞胆管ステント内部のバイオフィルムの可視化

これまでの研究において、閉塞胆管ステント内の微生物叢解析を実施した結果、Enterococcus faecalis や Enterococcus faecium を含む腸球菌属細菌が高頻度で分離されることを明らかにしている。そこで、既報（Wellinghausen et al., J. Clin. Microbiol. 2007）を参考にして E. faecalis および E. faecium に特異的な蛍光標識 DNA プローブ（ENF 191: Cy5-GAAAGCGCCTTTCACTCTT ATGC および ENU 1470: Cy5-GACTCCTTCAGACTTACTGCTTGG）を作製した。加えて、16S rDNA の配列に基づき、全細菌種を検出可能な蛍光標識 DNA プローブ（EUB 338: Cy3-GCTGCCTCCCG TAGGAGT）も作製した。

これらプローブの有効性を検証するために、E. faecalis、E. faecium、および大腸菌を用いて浮遊菌液を調製し、FISH 法による検出を行った。その結果、EUB338 では全菌種、ENF191 では E. faecalis のみ、ENU1470 では E. faecium のみを特異的に検出できることを確認した（次項図１）。

また、溶菌酵素 Lysozyme による前処理条件を検討した結果、腸球菌では菌体形態が大きく損なわれることが判明した。そのため、低濃度かつ短時間での処理、あるいは酵素処理を行わない条件の方が、アーティファクトの少ない観察結果が得られることが示唆された。

さらに、単一菌種由来バイオフィルムを用いて FISH 観察を実施したところ、厚みのあるバイオフィルム内部まで蛍光 DNA プローブが浸透し、菌の三次元的局在を可視化することに成功した。一方で、バイオフィルム内部では細胞ごとに蛍光強度が大きく異なることも確認された。

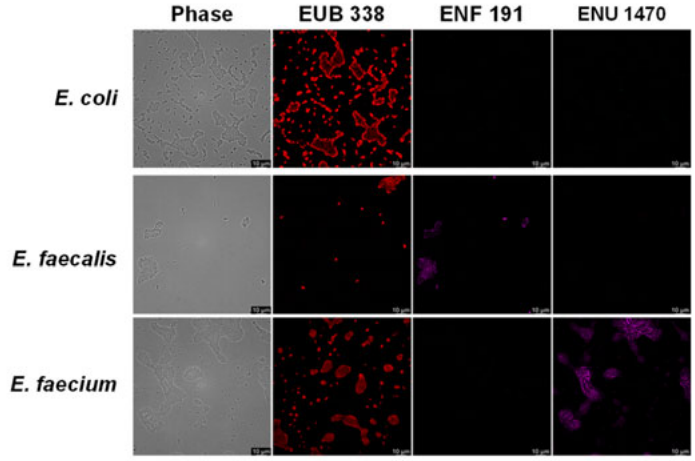



**図1. FISH法による各菌種の検出.**

② 閉塞胆管ステント由来微生物のバイオフィルム形成能の評価

閉塞胆管ステントから高頻度に分離された腸球菌について、胆管内容物が菌体凝集およびバイオフィルム形成に及ぼす影響を検討した。その結果、E. faecalis では、リトコール酸（LCA）およびパルミチン酸（PA）による菌体凝集の促進に加え、ケノデオキシコール酸（CDCA）、デオキシコール酸（DCA）、およびビリルビン（BIL）による生育阻害が認められた（図２a）。また、E. faecium では、CDCA および PA によるバイオフィルム形成の促進に加え、LCA、PA、BIL による菌体凝集の促進が観察された（図２b）。さらに、Enterococcus gallinarum においては、LCA および PA によるバイオフィルム形成の促進、ならびに LCA による菌体凝集の促進が認められた一方で、BIL による生育阻害も観察された（図２c）。

以上の結果から、胆管内容物が及ぼす影響は菌種あるいは菌株ごとに異なることが示唆された。また、菌体凝集能とポリスチレンプレート上でのバイオフィルム形成能との間に明確な相関は認められなかったものの、いずれの形質も胆管ステント閉塞に寄与する可能性が示された。

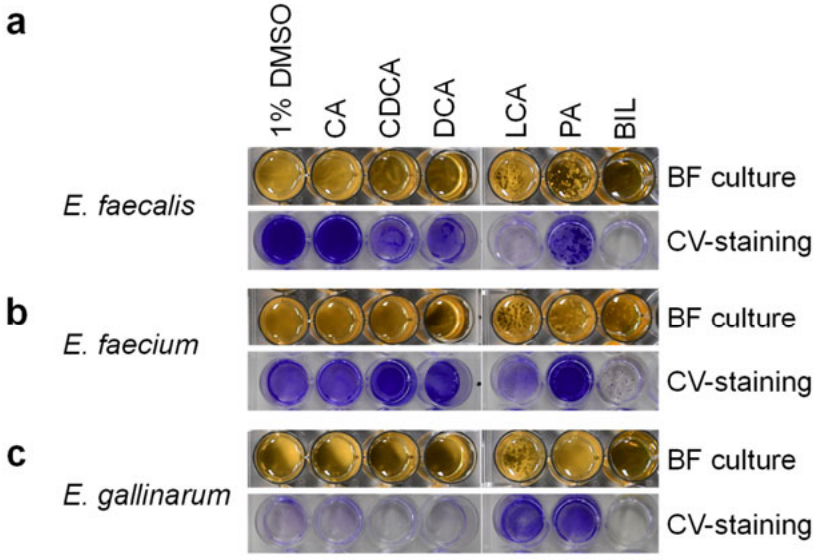



**図2. 閉塞胆管ステントから分離された腸球菌のバイオフィルム形成に与える胆管内容物の影響.**

## 4. 研究の反省・考察

本研究により、胆管ステント内バイオフィルムにおける各菌種の三次元的局在を可視化するための技術基盤を構築することができた。一方で、バイオフィルム内部において細菌細胞ごとに蛍光標識 DNA プローブの染色性にばらつきが認められた。その原因については、技術的要因によ

るものか、あるいは単一細胞ごとの rRNA 量の違いを反映した生理学的差異によるものか、現時点では明らかではない。DAPI などの核酸染色試薬を用いた場合にも同様の染色ムラが観察されることから、後者の可能性を考えているが、今後さらに慎重な検討が必要である。

また、胆汁酸やパルミチン酸による腸球菌の凝集形成誘導が確認されたものの、その分子機構については未解明である。今後は、申請者らが開発した菌体外マトリクス解析法（Chiba, Sugimoto et al., Microb. Biotechnol. 2015）や遺伝子発現解析を組み合わせることで、本現象の分子機序の解明を進める必要がある。

さらに、本研究では、閉塞胆管ステントから高頻度に分離された腸球菌に着目して解析を行ったが、今後は腸球菌以外の分離菌についても、FISH 法による特異的検出法の確立およびバイオフィルム形成能の評価を進める必要がある。

## 5. 研究発表

(1)学会誌等

①なし

(2)口頭発表

①杉本 真也，高泉　優，古橋 広人，一志 公夫，加藤 正之，炭山 和毅，〇金城 雄樹．閉塞胆管ステント由来腸球菌のバイオフィルム形成能の解析．第55回レンサ球菌研究会．2025年6月．東京．

(3)出版物

①なし