

論文内容の要旨

**THE EFFECT OF LACTOFERRIN AND PEPSIN-TREATED LACTOFERRIN  
ON IEC-6 CELL DAMAGE INDUCED BY CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXIN B**

クロストリディウムデフィシール産生のトキシン B によるラット腸上皮細胞障害に  
対するラクトフェリン及びペプシンによるラクトフェリン分解産物の効果

日本医科大学大学院医学研究科 侵襲生体管理学分野

大学院生 大嶽 康介

SHOCK 2017 年掲載予定

## 論文要旨

### [背景]

*Clostridium difficile* infection (以下 CDI) は昨今の抗菌薬頻回使用を背景に患者数が増加し、集中治療領域を中心として、大きな問題となっている。また、在院日数や医療コストの増加にも関係しており、今後、さらに病院全体で取り組む課題となる。欧米では劇症化・再発化する患者も増加している。*Clostridium difficile* (以下 CD) はグラム陽性桿菌の1つであり、主にトキシン A と B を産生することで腸粘膜障害を引き起こす。中でもトキシン B は細胞毒性が強い。CDI に対する治療法は、使用していた抗生剤の中止、治療薬としてのバンコマイシンやメトロニダゾールなどの投与などが標準であり、重症化した症例には腸切除などの外科手術も推奨されている。最近では、便移植を行い、腸内細菌叢の正常化を図ることで、CDI の発症を抑制する方法も報告されている。一方、ラクトフェリン (lactoferrin: 以下 LF) は哺乳類の乳汁成分に豊富に含まれる鉄親和性の高いタンパク質であり、抗炎症作用のみならず、抗ウイルス作用、抗酸化作用が証明されている。また、ペプシンによるラクトフェリン分解産物 (pepsin-treated lactoferrin: 以下 PLF) においてもその抗細菌作用が報告されている。今回、我々の研究では、IEC-6 細胞 (ラット小腸上皮細胞) を用いて、CD 産生のトキシン B による障害モデルを作成した。そこに LF 及び PLF を加え、障害抑制効果があるかを証明した。

### [方法]

まず IEC-6 細胞を 96-well プレートにおいて十分に培養した後、濃度別のトキシン B を加えることで、細胞傷害を引き起こした。さらに、一定濃度の LF 及び PLF を付加した群を作成した。その上で、ミトコンドリア機能活性の指標である WST-1 及び細胞膜障害の結果である LDH を測定することで、細胞活性及び細胞傷害を証明した。それに加えて、6-well プレートで培養した IEC-6 にトリパンブルー染色を用いて、細胞死そのものを光学顕微鏡にて観察した。

また、同じく 6-well プレート内で、培養した IEC-6 を一旦 scrape し、そこにトキシン B、LF、PLF を加えたモデルを作成した。その後の細胞傷害修復の過程を光学顕微鏡にて経時的に観察した (wound restitution test)。

さらに、トキシン B が細胞障害を起こす重要な過程として、細胞間の tight junction (TJ) を離開させることが言われており、本論文において、共焦点顕微鏡を用いることで、視覚的に TJ の評価を行った。また、その裏付けとして TJ の重要タンパク質である ZO-1 及び occludin をウエスタンブロット法にて定量的に評価し、トキシン B に対する LF 及び PLF の効果を探った。

#### [結果]

WST-1 において、トキシン B はその濃度依存性に細胞活性を低下させることが示され、LF 及び PLF をさらに加えることでトキシン B による障害を抑制した。また、LDH ではトキシン B が濃度依存性に細胞膜障害を引き起こすことが証明され、LF 及び PLF により、その障害が抑制された。Wound restitution test においては、トキシン B による障害を与えた後、6 時間後の時点では、有意な変化は無かったが、12 時間及び 24 時間後の時点では、LF 及び PLF がトキシン B による細胞障害後の修復過程に寄与していることが証明された。

TJ に焦点を移すと、共焦点顕微鏡画像及びウエスタンブロット法からはトキシン B が ZO-1 及び occludin タンパクを down-regulate しており、LF 及び PLF がその障害過程を抑制していることが示された。

#### [結論]

CD 産生のトキシン B は IEC-6 の TJ を構成する重要タンパクである ZO-1、occludin を down-regulate することで細胞障害を引き起こしている。LF 及び PLF はその過程を抑制することが示された。この結果、LF 及び PLF が CDI の抑制・予防効果を持つ可能性がある。