

## 論文審査の結果の要旨

### 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 外科系侵襲生体管理学分野  
大学院生 大嶽 康介  
SHOCK 2018 年掲載予定

*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、臨床的に問題となっている。*Clostridium difficile* (以下 CD) は主にトキシン A と B を産生するが、中でも B はその細胞毒性が強い。今回申請者が注目したラクトフェリン (lactoferrin: 以下 LF) は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、抗炎症作用など多彩な機能が証明されている。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注目されている。今回の研究では、申請者は 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、それらの障害抑制効果や作用機序解明を行った。

申請者は、IEC-6 細胞の培養を行った後、トキシン B (0.125~1.0 ng/mL) を加え、細胞傷害を引き起こした。さらに、LF 及び PLF (1mg/mL) を付加した群を作成した。その上で、WST-1 及び LDH を測定し、細胞活性及び細胞傷害を比較した。また、各群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。細胞増殖障害改善の過程についても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過程として、細胞間の tight junction (TJ) を離開させることが証明されているが、本研究では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。ウエスタンブロット法でも TJ 構成タンパクである ZO-1 及び occludin を定量的に評価した。

その結果、WST-1 及び LDH においてトキシン B はその濃度依存性に細胞障害を引き起こすことが示され、LF 及び PLF を加えることでその障害を抑制した。また、wound restitution test においては、トキシン B を加えて 12 時間後以降で、LF 及び PLF がトキシン B による細胞増殖障害を改善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。以上の結果より、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おり、LF 及び PLF はその過程を抑制することが示された。

二次審査では、結果の解釈や今後の応用も含め議論され、申請者よりの確かな回答を得た。本研究は臨床的にほぼ有害作用を認めない LF 及び PLF が CDI の発症予防及び治療効果において大きな可能性を持つという、画期的な知見を示すもので、学位論文として価値があるものと判断した。