

20103305/A

**厚生労働科学研究費補助金**

**食品の安心・安全確保推進研究事業**

**腸管粘膜免疫組織パイエル板上皮細胞バリアの分子基盤に立脚した迅速かつ  
簡便な食物アレルギー予測評価系の開発に関する研究**

**平成22年度 総括研究報告書**

**研究代表者 近藤 昌夫**

**平成23（2011）年 4月**

**厚生労働科学研究費補助金**

**食品の安心・安全確保推進研究事業**

**腸管粘膜免疫組織パリエル板上皮細胞バリアの分子基盤に立脚した迅速かつ  
簡便な食物アレルギー予測評価系の開発に関する研究**

**平成22年度 総括研究報告書**

**研究代表者 近藤 昌夫**

**平成23（2011）年 4月**

## 目 次

### I. 総括研究報告

腸管粘膜免疫組織パリエル板上皮細胞バリアの分子基盤に立脚した迅速かつ簡便な食物アレルギー予測評価系の開発に関する研究 \_\_\_\_\_ 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ 26

III. 研究成果の刊行物・別刷 \_\_\_\_\_ 28

「腸管粘膜免疫組織パイエル板上皮細胞バリアの分子基盤に立脚した迅速かつ簡便な食物アレルギー予測評価系の開発」

代表研究者 近藤 昌夫 大阪大学薬学研究科 准教授

研究要旨

周知のように、食品添加物は人類の食生活に多大な恩恵を齎しており、安心かつ安全な食生活を実現するうえで食品添加物の安全性確保は最重要課題となっている。しかしながら、食品添加物の安全性評価は一般毒性試験を中心に進められているのが現状であり、アレルギー性評価系すら皆無に等しい。腸管粘膜は生体内外を隔てるバリアとして機能し、腸管粘膜免疫組織パイエル板(PP)が細菌・微生物等の生体内侵入に対する防御網を構築している。PP は一層の上皮細胞層に覆われており、上皮細胞層の細胞間隙は密着結合(TJ)によってシールされ、通常食物未消化物が非特異的にPP内に侵入することはない。このTJシール機能の破綻は食物アレルギーの誘因となりうるものの、未だTJシール機能に着目した食物アレルギーリスク評価系の構築は皆無である。本研究は、TJの機能本体である claudin に着目し、claudin レポーター遺伝子を利用して TJ バリア機能を迅速かつ簡便に評価するという、PP 上皮細胞バリアを指標にした初めての食物アレルギーリスク評価系を構築することを目的とする。昨年度までに、作製した claudin-4 レポーター遺伝子が claudin-4 の発現量と関連したレポーター活性を示す事を明らかにし、本 claudin-4 レポーター遺伝子を安定的に発現した細胞株を複数単離することに成功した。

本年度は、作製した claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株を用いた claudin-4 発現モニタリングシステムを利用し、既に使用されている 88 種類の食品添加物について、claudin-4 バリア制御活性を解析し、potassium carbonate が claudin-4 mRNA およびタンパク質発現を抑制し腸管上皮細胞が形成する TJ バリア機能を低下させること、thiabendazol, carotene, curcumin が claudin-4 mRNA およびタンパク質発現を上昇させ TJ バリア機能を強化することを見出した。

これらの結果は、レポーター活性を指標にした claudin-4 発現モニタリングシステムが迅速かつ簡便な claudin バリア制御活性評価系として機能することを示唆している。現在、本パイロットスタディの成果を踏まえ、他の claudin についてもモニターシステムの構築に着手しており、claudin バリア制御活性情報の集積を図る予定である。また、claudin-4 バリア制御強化作用が観察された物質について、機能性食品としての応用の可否を検証するために動物レベルでの活性解析を鋭意進めていく。

A. 研究目的

本研究は、我が国において増加傾向にある食物アレルギーのリスクを回避し、国民の安心かつ安全な食生活を確保するため、腸管粘膜免疫組織パイエル板(PP)上皮細胞バリアを指標にした初めての食物アレルギーリスク評価系を構築することを目的とする。

我が国の食生活は、輸入食品の増加、食品添加物の開発、遺伝子組換え食品開発などのため大きく変化し、天然物のみならず人工合成した食品を摂取する機会

が急増しつつある。この腸管粘膜を取り巻く食環境の多様化・激変に伴い食物アレルギーが増加傾向にある。既に小児および成人の約 10 %が食物アレルギーに罹患しており、アトピー性皮膚炎・喘息の誘因になることも示されている。食物アレルギーの罹患期間は 2~20 年間の長期に渡ることや社会生活に支障を来すことから、食物アレルギーリスク評価は食品安全行政上の急務となっている。特に、食料の約 6 割を輸入に頼り、地産池消が困難な本邦の食糧供給体制を踏まえると、ほ

ば全ての食品に使用されている食品添加物の安全性確保は最重要課題と言える。実際、食品添加物のアレルギー性は、米国食品医薬品局の GRAS 再評価項目の特に留意すべき評価項目として位置づけられている。そのため、食品添加物の安全性評価が不可欠であるものの、マウスやラットを用いた毒性試験や繁殖試験、催奇形性試験などが行われているに過ぎず、食品添加物の安全性に関する基礎的知見は著しく不足し、アレルギー性評価系すらほとんど存在しないのが現状である。

腸管粘膜は生体内外を隔てるバリアとして機能し、腸管粘膜免疫組織パイエル板(PP)が細菌・微生物等の生体内侵入に対する防御網を構築している。PP は一層の上皮細胞層に覆われており、上皮細胞層の細胞間隙は密着結合(TJ)によってシールされ、通常食物未消化物が非特異的に PP 内に侵入することはない。この TJ シール機能の破綻は食物アレルギーの誘因となりうるものの、未だ TJ シール機能に着目した食物アレルギーリスク評価系の構築は皆無である。

そこで、我々は上皮細胞層が形成する TJ バリア機能を指標とした、迅速かつ簡便な新規食物アレルギー性予測評価系の開発を試みた。食物アレルギーに対する新たなリスク予測評価系が開発されれば、国民の安全・安心な食生活を確保することで国民生活向上に寄与するだけでなく、食物アレルギーリスク評価系等のレギュレトリーサイエンスの確立にも寄与し、社会面のみならず食品行政面においても多大な貢献が期待される。

前年度までに、腸管上皮組織における TJ バリアの機能本体である claudin-4 の発現変化とよく相関したレポーター活性を持った claudin-4 レポーター遺伝子を作製した。さらに、このレポーター遺伝子を安定的に発現させた細胞株を複数単離し、claudin-4 の発現変化をモニター可能な細胞株の選別に成功した。本年度はこれらの細胞株を利用し、88 種類の食品添加物について、claudin-4 バリア制御活性を解析した。

## B. 研究方法

### B. 1 食品添加物の毒性濃度の検討

#### B. 1. 1 食品添加物

本研究において使用する食品添加物は以下のものである (Fig. 1)。1. Tartrazine (黄色 4 号), 2. Potassium nitrate (硝酸カリウム), 3. Potassium carbonate (炭酸カリウム), 4. Sodium chlorous (亜塩素酸ナトリウム), 5. Zinc sulfate (硫酸亜鉛), 6. New Coccine (赤色 102 号), 7. Amaranth (Bordeaux S) (赤色 2 号), 8. Allura Red AC (赤色 40 号), 9. Sunset Yellow FCF (黄色 5 号), 10. Potassium hydroxide (水酸化カリウム), 11. L-ascorbic acid (アスコルビン酸 パルミチン酸エステル), 12. Sodium nitrite (亜硝酸ナトリウム), 13. Propionic acid (プロピオン酸), 14. Sodium carbonate (炭酸ナトリウム), 15. Zinc gluconate (グルコン酸亜鉛), 16. Benzoic acid (安息香酸), 17. Sorbic acid (ソルビン酸), 18. Aspartame (アスパルテーム), 19. Dibutylhydroxytoluene (ジブチルヒドロキシトルエン: BHT), 20. Allyl isothiocyanate (アリルイソチオシアネート), 21. Saccharin (サッカリン), 22. L-Ascorbyl Palmitate (アスコルビン酸 パルミチン酸エステル), 23. Hydroxy biphenyl, 24. Ammonium persulfate (過硫酸アンモニウム), 25. ミヨウバン, 26. L-Lysine (L-リシン), 27. Calcium pantothenate (パント酸カルシウム), 28. Carrageenin (カラギナン), 29. Tartaric acid (酒石酸), 30. Sodium acetate (酢酸ナトリウム), 31. Glycine (グリシン), 32. Sodium Alginate (アルギン酸ナトリウム), 33. Ammonium chloride (塩化アンモニウム), 34. Magnesium sulfate (硫酸マグネシウム), 35. 5-ribonucleotide (リボヌクレオチドナトリウム), 36. Calcium chloride (塩化カルシウム), 37. Valine (バリン), 38. Erythrosine (赤色 3 号), 39. Annatto (アナトー), 40. Maltitol (マルチトール), 41. Sodium Dehydroacetate (デヒドロ酢酸ナトリウム), 42. Nicotinic acid (ニコチン酸), 43. Isoleucine (イソロイシン), 44. Mannitol (マンニトール), 45. Vitamin C (ascorbic acid), 46. Phenylalanine (フェニルアラニン), 47. Gallic acid (没食子酸), 48. Erythorbic acid (エリソルビン酸), 49. Magnesium chloride (塩化マグネシウム), 50. Potassium metabisulfite (メタ重亜硫

酸カリウム), 51. Cochineal extract(コチニール), 52. Calcium Dihydrogen Pyrophosphate(酸性ピロリン酸カルシウム), 53. Calcium citrate(クエン酸カルシウム), 54. Polyvinyl acetate(ポリ酢酸ビニル), 55. Fumaric Acid(フマル酸), 56. Sodium methyl p-hydroxybenzoate(パラオキシ安息香酸メチルナトリウム), 57. Tocopherol(vitamin E), 58. Rennet(レンネット), 59. Ionone(イオノン), 60. Isoeugenol(イソオイゲノール), 61. Allyl isosulfocyanate(イソチオシアン酸アリル), 62. Propylene glycol(プロピレングリコール), 63. Ethyl isovalerate(イソ吉草酸エチル), 64. Pectin(ペクチン), 65. Cysteine(システイン), 66. Tragacanth gum(トラガントガム), 67. Thiamin(チアミン), 68. Gum arabic(アラビアガム), 69. Cellulose(セルロース), 70. Thiabendazole(TBZ: チアベンダゾール), 71. Isopropyl Citrate(クエン酸イソプロピル), 72.  $\gamma$ -oryzanol(オリザノール), 73. Calcium carbonate(炭酸カルシウム), 74. Propylene Glycol Alginate(アルギン酸プロピレングリコールエステル), 75. Chlorophyll(クロロフィル), 76. Sodium Chondroitin Sulfate(コンドロイチン硫酸ナトリウム), 77. Biphenyl(DP: ジフェニル), 78. Sodium cytidylic acid(シチジル酸ナトリウム), 79. Stevia rebaudiana(ステビア), 80. Calcium Stearoyl Lactylate(ステアaryl乳酸カルシウム), 81. Ferrous sulfate(硫酸第一鉄), 82. Calcium sulfate(硫酸カルシウム), 83. Benzoyl peroxide(過酸化ベンゾイル), 84. Dibenzoyl thiamine(ジベンゾイルチアミン), 85. Carotene(カロチン), 86. Guar Gum(グアーガム), 87. Xanthan gum(キサンタンガム), 88. Curcumin(クルクミン)。

### B. 1. 2 細胞

Claudin-4 レポーター遺伝子を安定的に発現させた細胞株である MPCP #35 は、10 % ウシ血清、NaHCO<sub>3</sub>、L-glutamine、penicillin/streptomycin を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, 日水製薬) で培養した。

### B. 1. 3 細胞毒性試験

MPCP #35 細胞を 96 well プレートに  $4 \times 10^4$

cells/well になるよう播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータにおいて培養した。翌日、各濃度 (1. Tartrazine (黄色 4 号) : 10, 1, 0.1 mM, 2. Potassium nitrate (硝酸カリウム) : 1, 0.1, 0.01 mM, 3. Potassium carbonate (炭酸カリウム) : 10, 1, 0.1 mM, 4. Sodium chlorous (亜塩素酸ナトリウム) : 10, 1, 0.1 mM, 5. Zinc sulfate (硫酸亜鉛) : 10, 1, 0.1 mM, 6. New Coccine (赤色 102 号) : 1, 0.1, 0.01 mM, 7. Amaranth (Bordeaux S) (赤色 2 号) : 1, 0.1, 0.01 mM, 8. Allura Red AC (赤色 40 号) : 1, 0.1, 0.01 mM, 9. Sunset Yellow FCF (黄色 5 号) : 1, 0.1, 0.01 mM, 10. Potassium hydroxide (水酸化カリウム) : 10, 1, 0.1 mM, 11. L-ascorbic acid (アスコルビン酸パルミチン酸エステル) : 1, 0.1, 0.01 mM, 12. Sodium nitrite (亜硝酸ナトリウム) : 10, 1, 0.1 mM, 13. Propionic acid (プロピオン酸) : 0.01, 0.001, 0.0001 %, 14. Sodium carbonate (炭酸ナトリウム) : 10, 1, 0.1 mM, 15. Zinc gluconate (グルコン酸亜鉛) : 0.01, 0.001, 0.0001 %, 16. Benzoic acid (安息香酸) : 1, 0.1, 0.01 mM, 17. Sorbic acid (ソルビン酸) : 1, 0.1, 0.01 mM, 18. Aspartame (アスパルテーム) : 1, 0.1, 0.01 mM, 19. Dibutylhydroxytoluene (ジブチルヒドロキシトルエン: BHT) : 1, 0.1, 0.01 mM, 20. Allyl isothiocyanate (アリルイソチオシアネート) : 0.01, 0.001, 0.0001 %, 21. Saccharin (サッカリン) : 1, 0.1, 0.01 mM, 22. L-Ascorbyl Palmitate (アスコルビン酸パルミチン酸エステル) : 1, 0.1, 0.01 mM, 23. Hydroxy biphenyl: 1, 0.1, 0.01 mM, 24. Ammonium persulfate (過硫酸アンモニウム) : 1, 0.1, 0.01 mM, 25. ミヨウバン: 1, 0.1, 0.01 mM, 26. L-Lysine (L-リシン) : 10, 1, 0.1 mM, 27. Calcium pantothenate (パテント酸カルシウム) : 10, 1, 0.1 mM, 28. Carrageenin (カラギナン) : 0.01, 0.001, 0.0001 mM, 29. Tartaric acid (酒石酸) : 10, 1, 0.1 mM, 30. Sodium acetate (酢酸ナトリウム) : 10, 1, 0.1 mM, 31. Glycine (グリシン) : 10, 1, 0.1 mM, 32. Sodium Alginate (ア



ルギン酸ナトリウム) : 10, 1, 0.1 mM, 33. Ammonium chloride (塩化アンモニウム) : 10, 1, 0.1 mM, 34. Magnesium sulfate (硫酸マグネシウム) : 10, 1, 0.1 mM, 35. 5-ribonucleotide (リボヌクレオチドナトリウム) : 1, 0.1, 0.01  $\mu$ M, 36. Calcium chloride (塩化カルシウム) : 10, 1, 0.1 mM, 37. Valine (バリン) : 1, 0.1, 0.01 mM, 38. Erythrosine (赤色3号) : 1, 0.1, 0.01 mM, 39. Annatto (アナトー) : 0.01, 0.001, 0.0001 mM, 40. Maltitol (マルチトール) : 10, 1, 0.1 mM, 41. Sodium Dehydroacetate (デヒドロ酢酸ナトリウム) : 10, 1, 0.1 mM, 42. Nicotinic acid (ニコチン酸) : 1, 0.1, 0.01 mM, 43. Isoleucine (イソロイシン) : 1, 0.1, 0.01 mM, 44. Mannitol (マンニトール) : 10, 1, 0.1 mM, 45. Vitamin C (ascorbic acid) : 10, 1, 0.1 mM, 46. Phenylalanine (フェニルアラニン) : 1, 0.1, 0.01 mM, 47. Gallic acid (没食子酸) : 1, 0.1, 0.01 mM, 48. Erythorbic acid (エリソルビン酸) : 1, 0.1, 0.01 mM, 49. Magnesium chloride (塩化マグネシウム) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 50. Potassium metabisulfite (メタ重亜硫酸カリウム) : 10, 1, 0.1 mM, 51. Cochineal extract (コチニール) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 52. Calcium Dihydrogen Pyrophosphate (酸性ピロリン酸カルシウム) : 1, 0.1, 0.01 mM, 53. Calcium citrate (クエン酸カルシウム) : 0.1, 0.01, 0.001 mM, 54. Polyvinyl acetate (ポリ酢酸ビニル) : 0.1, 0.01, 0.001 mM, 55. Fumaric Acid (フマル酸) : 1, 0.1, 0.01 mM, 56. Sodium methyl p-hydroxybenzoate (パラオキシ安息香酸メチルナトリウム) : 10, 1, 0.1 mM, 57. Tocopherol (vitamin E) : 0.001, 0.0001, 0.00001 %, 58. Rennet (レンネット) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 59. Ionone (イオノン) : 1, 0.1, 0.01 %, 60. Isoeugenol (イソオイゲノール) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 61. Allyl isosulfocyanate (イソチオシアン酸アリル) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 62. Propylene glycol (プロピレングリコール) : 1, 0.1, 0.01 %, 63. Ethyl isovalerate (イソ吉草

酸エチル) : 1, 0.1, 0.01 %, 64. Pectin (ペクチン) : 0.01, 0.001, 0.0001 %, 65. Cysteine (システイン) : 0.1, 0.01, 0.001 mM, 66. Tragacanth gum (トラガントガム) : 0.01, 0.001, 0.0001 %, 67. Thiamin (チアミン) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 68. Gum arabic (アラビアガム) : 0.01, 0.001, 0.0001 %, 69. Cellulose (セルロース) : 0.01, 0.001, 0.0001 %, 70. Thiabendazole (TBZ: チアベンダゾール) : 1, 0.1, 0.01  $\mu$ M, 71. Isopropyl Citrate (クエン酸イソプロピル) : 10, 1, 0.1 mM, 72.  $\gamma$ -oryzanol (オリザノール) : 0.01, 0.001, 0.0001 %, 73. Calcium carbonate (炭酸カルシウム) : 0.001, 0.0001, 0.00001 %, 74. Propylene Glycol Alginate (アルギン酸プロピレングリコールエステル) : 0.01, 0.001, 0.0001 %, 75. Chlorophyll (クロロフィル) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 76. Sodium Chondroitin Sulfate (コンドロイチン硫酸ナトリウム) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 77. Biphenyl (DP: ジフェニル) : 1, 0.1, 0.01 mM, 78. Sodium cytidylic acid (シチジル酸ナトリウム) : 1, 0.1, 0.01 mM, 79. Stevia rebaudiana (ステビア) : 0.01, 0.001, 0.0001 %, 80. Calcium Stearoyl Lactylate (ステアрил乳酸カルシウム) : 0.01, 0.001, 0.0001 %, 81. Ferrous sulfate (硫酸第一鉄) : 0.1, 0.01, 0.001 mM, 82. Calcium sulfate (硫酸カルシウム) : 0.1, 0.01, 0.001 mM, 83. Benzoyl peroxide (過酸化ベンゾイル) : 1, 0.1, 0.01 mM, 84. Dibenzoyl thiamine (ジベンゾイルチアミン) : 1, 0.1, 0.01 mM, 85. Carotene (カロチン) : 0.01, 0.001, 0.0001 %, 86. Guar Gum (グアーガム) : 0.001, 0.0001, 0.00001 %, 87. Xanthan gum (キサントガム) : 0.001, 0.0001, 0.00001 %, 88. Curcumin (クルクミン) : 0.1, 0.01, 0.001 mM) になるよう食品添加物を添加した。添加 24 時間後に生細胞数測定試薬 SF (ナカライテスク) を加え 1 時間培養後、Tristar LB 941 (ベルトールド) により 450nm の吸光度を測定した。食品添加物を加えていないコントロール (Water、DMSO、None) の吸光度を基準として、相対的な吸光度の値を求

めた。

## B. 2 Claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株の選定

### B. 2.1 細胞

Claudin-4 レポーター遺伝子を安定的に発現させた細胞株である MPCP #1、MPCP #8、MPCP #35、MPCP #b-24 は、10 % ウシ血清、NaHCO<sub>3</sub>、L-glutamine、penicillin/streptomycin を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, 日水製薬) で培養した。

### B. 2.2 ルシフェラーゼアッセイ

MPCP #1、MPCP #8、MPCP #35、MPCP #b-24 を 96 well プレートに  $4 \times 10^4$  cells/well になるよう播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータにおいて培養した。翌日、食品添加物である 1. Tartrazine (黄色4号), 2. Potassium nitrate (硝酸カリウム), 3. Potassium carbonate (炭酸カリウム), 4. Sodium chlorous (亜塩素酸ナトリウム), 5. Zinc sulfate (硫酸亜鉛), 6. New Coccine (赤色 102号), 7. Amaranth (Bordeaux S) (赤色2号), 8. Allura Red AC (赤色40号), 9. Sunset Yellow FCF (黄色5号), 10. Potassium hydroxide (水酸化カリウム), 11. L-ascorbic acid (アスコルビン酸 パルミチン酸エステル), 12. Sodium nitrite (亜硝酸ナトリウム), 13. Propionic acid (プロピオン酸), 14. Sodium carbonate (炭酸ナトリウム), 15. Zinc gluconate (グルコン酸亜鉛), 16. Benzoic acid (安息香酸), 17. Sorbic acid (ソルビン酸), 18. Aspartame (アスパルテム), 19. Dibutylhydroxytoluene (ジブチルヒドロキシトルエン: BHT), 20. Allyl isothiocyanate (アリルイソチオシアネート), 21. Saccharin (サッカリン), 22. L-Ascorbyl Palmitate (アスコルビン酸パルミチン酸エステル), 23. Hydroxy biphenyl, 24. Ammonium persulfate (過硫酸アンモニウム), 25. ミョウバンを細胞毒性が現れない濃度 (B. 1.3 細胞毒性試験) で添加した。24 時間の培養後、培養液を除去し、PBS 100  $\mu$ l で 2 回 wash した。Wash 後、ピッカジーン LT 2.0 (東洋インキ) を 100  $\mu$ l/well 加え、30 分間室温にて shaker にか

ールド) により測定した。

## B. 3 Claudin-4 レポーター活性に影響を及ぼす食品添加物の同定

### B. 3.1 1st スクリーニング

MPCP #35 細胞を 96 well プレートに  $4 \times 10^4$  cells/well になるよう播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータにおいて培養した。翌日、各種食品添加物を細胞毒性が現れない濃度 (B. 1.3 細胞毒性試験) で添加した。24 時間の培養後、培養液を除去し、PBS 100  $\mu$ l で 2 回 wash した。Wash 後、ピッカジーン LT 2.0 (東洋インキ) を 100  $\mu$ l/well 加え、30 分間室温にて shaker にかけた。その後、発光量を Tristar LB 941 (ベルトールド) により測定した。

### B. 3.2 2nd スクリーニング

B. 3.1 の 1st スクリーニングにおいて相対的なルシフェラーゼ活性を 0.7 以下に低下させた食品添加物、もしくは 1.5 以上に上昇させた食品添加物に関して、再度ルシフェラーゼアッセイを行った。新たに調製し直した食品添加物について、濃度を振って行った。

MPCP #35 細胞を 96 well プレートに  $4 \times 10^4$  cells/well になるよう播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータにおいて培養した。翌日、濃度を振った各種食品添加物 (3. Potassium carbonate (炭酸カリウム) : 10, 5, 1 mM, 4. Sodium chlorous (亜塩素酸ナトリウム) : 10, 5, 1 mM, 6. New Coccine (赤色 102号) : 1, 0.1, 0.01 mM, 10. Potassium hydroxide (水酸化カリウム) : 1, 0.5, 0.1 mM, 12. Sodium nitrite (亜硝酸ナトリウム) : 10, 1, 0.1 mM, 14. Sodium carbonate (炭酸ナトリウム) : 1, 0.5, 0.1 mM, 21. Saccharin (サッカリン) : 1, 0.5, 0.1 mM, 24. Ammonium persulfate (過硫酸アンモニウム) : 1, 0.5, 0.1 mM, 29. Tartaric acid (酒石酸) : 1, 0.1, 0.01 mM, 30. Sodium acetate (酢酸ナトリウム) : 1, 0.1, 0.01 mM, 50. Potassium metabisulfite (メタ亜硫酸カリウム) : 1, 0.5, 0.1 mM, 56. Sodium methyl p-hydroxybenzoate (パラオキシ安息香酸メチルナトリウム) : 1, 0.5, 0.1 mM, 57. Tocopherol



(vitamin E) : 0.01, 0.005, 0.001 %, 60. Isoeugenol (イソオイゲノール) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 61. Allyl isosulfocyanate (イソチオシアン酸アリル) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 70. Thiabendazole (TBZ: チアベンダゾール) : 0.1, 0.01, 0.001 mM, 72.  $\gamma$ -oryzanol (オリザノール) : 1, 0.1, 0.01 %, 75. Chlorophyll (クロロフィル) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 76. Sodium Chondroitin Sulfate (コンドロイチン硫酸ナトリウム) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 77. Biphenyl (DP: ジフェニル) : 0.1, 0.01, 0.001 mM, 84. Dibenzoyl thiamine (ジベンゾイルチアミン) : 1, 0.1, 0.01 mM, 85. Carotene (カロチン) : 0.1, 0.01, 0.001 %, 88. Curcumin (クルクミン) : 0.1, 0.01, 0.001 mM) により培養した。24 時間培養した後、培養液を除去し、PBS 100  $\mu$ l で 2 回 wash した。Wash 後、ピッカジーン LT 2.0 (東洋インキ) を 100  $\mu$ l/well 加え、30 分間室温にて shaker にかけた。その後、発光量を Tristar LB 941 (ベルトールド) により測定した。

### B. 3. 3 食品添加物による時間依存的なレポーター活性への影響

MPCP #35 細胞を 96 well プレートに  $4 \times 10^4$  cells/well になるよう播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータにおいて培養した。翌日、細胞毒性が現れない濃度の各種食品添加物を添加して培養した。培養 12 時間後、または 48 時間後に培養液を除去し、PBS 100  $\mu$ l で 2 回 wash した。Wash 後、ピッカジーン LT 2.0 (東洋インキ) を 100  $\mu$ l/well 加え、30 分間室温にて shaker にかけた。その後、発光量を Tristar LB 941 (ベルトールド) により測定した。

### B. 4 各種食品添加物による claudin-4 遺伝子発現への影響に関する検討

MPCP #35 細胞を 6 well プレートに播種し、培養した。翌日、食品添加物を 3. Potassium carbonate (炭酸カリウム) : 5 mM, 21. Saccharin (サッカリン) : 1 mM, 24. Ammonium persulfate (過

硫酸アンモニウム) : 1 mM, 50. Potassium metabisulfite (メタ重亜硫酸カリウム) : 1 mM, 56. Sodium methyl p-hydroxybenzoate (パラオキシ安息香酸メチルナトリウム) : 1 mM, 57. Tocopherol (vitamin E) : 0.01 %, 61. Allyl isosulfocyanate (イソチオシアン酸アリル) : 0.01 %, 70. Thiabendazole (TBZ: チアベンダゾール) : 0.05 mM, 85. Carotene (カロチン) : 0.2 mM, 88. Curcumin (クルクミン) : 0.01 mM になるように添加し、24 時間培養した。培養後、各細胞から Trizol (インビトロジェン) により Total RNA を回収した。回収した Total RNA から Superscript first strand 合成システム (インビトロジェン) を用いて cDNA を合成した。cDNA 溶液 1  $\mu$ l、10 x PCR buffer 2.5  $\mu$ l、dNTP mix 2  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 1  $\mu$ l、滅菌精製水 18.4  $\mu$ l、5 U/ml Takara ExTaq™ 0.1  $\mu$ l を混合して RT-PCR を行った。Claudin-4 の発現確認用プライマー配列は、Forward: 5' -CAACATTGTCACCTCGCA GACCATC-3' , Reverse: 5' -TATCACCATAAGGCCGG CCAACAG-3' とした。PCR の条件は、94 °C 5 min の後、94 °C 30 sec, 55 °C 15 sec, 72 °C 30 sec を 32 サイクル。内部コントロールとして GAPDH の発現量を確認した。cDNA 溶液 1  $\mu$ l、10 x PCR buffer 2.5  $\mu$ l、dNTP mix 2  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 1  $\mu$ l、滅菌精製水 18.4  $\mu$ l、5 U/ml Takara ExTaq™ 0.1  $\mu$ l を混合して RT-PCR を行った。GAPDH の発現確認用プライマー配列は、Forward: 5' -TCTTCACCACCATGGAGAAG-3' , Reverse: 5' -ACCACCTGGTGCTCAGTGTA-3' とした。PCR の条件は、94 °C 5 min の後、94 °C 30 sec, 55 °C 15 sec, 72 °C 1 min を 20 サイクル。PCR の後、1 % アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を分離し、エチジウムブロマイドで DNA を染色した。

### B. 5 各種食品添加物による claudin-4 タンパク質発現への影響に関する検討

MPCP #35 細胞を 6 well プレートに播種し、培養した。翌日、食品添加物を 3. Potassium carbonate (炭酸カリウム) : 5 mM, 24. Ammonium persulfate

(過硫酸アンモニウム) : 1 mM, 61. Allyl isosulfocyanate (イソチオシアン酸アリル) : 0.01, 0.001 %, 70. Thiabendazole (TBZ: チアベンダゾール) : 0.1, 0.01 mM, 85. Carotene (カロチン) : 0.2, 0.02 mM, 88. Curcumin (クルクミン) : 0.01 mM になるよう添加し、48 時間培養した。PBSによるwashを2回行った後、RIPA bufferにより細胞を溶解し cell lysate を得た。各 cell lysate (20  $\mu$ g) にサンプルバッファーを加え、100  $^{\circ}$ Cで5 min 熱変性を行った。その後、14 %アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。電気泳動後のゲルより、分離したタンパクをメンブレンにトランスファーした。TBSTにより2回washした後、2 % BSA TBSTにより1時間ブロッキングを行った。その後、1次抗体である anti-claudin-4 抗体 (2 % BSA TBST) を2時間反応させた。TBSTにより7 min, 2回washした後、2次抗体である anti-rabbit-IgG HRP (5 % スキムミルク TBST) を1時間反応させた。TBSTにより5 min, 3回washした後、発光試薬を反応させ、LAS3000 (FUJIFILM) で検出を行った。また、内部コントロールとして GAPDH の発現確認を行った。1次抗体として anti-GAPDH 抗体 (2 % BSA TBST) を2時間反応させた。TBSTにより7 min, 2回washした後、2次抗体である anti-rabbit-IgG HRP (5 % スキムミルク TBST) を1時間反応させた。TBSTにより5 min, 3回washした後、発光試薬を反応させ、LAS3000 で検出を行った。

#### B. 6 各種食品添加物による上皮バリア機能への影響に関する検討

Caco-2 による transepithelial electric resistance (TER) を測定するため、Caco-2 細胞  $4 \times 10^5$  cells/ml, 200  $\mu$ l/well を 6.5 mm Transwell (0.3  $\text{cm}^2$ , Corning) に播種し、培養した。2日1回の頻度で培地交換を行い、細胞の TJ 形成度合いを Millicell<sup>®</sup> -ERS (Millipore) による TER の測定により評価した。10~14 日の培養後、TER の安定を確認した。培養後、各種食品添加物を 3. Potassium carbonate (炭酸カリウム) :

10 mM, 70. Thiabendazole (TBZ: チアベンダゾール) : 0.05 mM, 85. Carotene (カロチン) : 0.2 mM, 88. Curcumin (クルクミン) : 0.01 mM になるように添加し、24、48 時間後の TER 値を測定した。

#### C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

#### D. 考察

##### D.1 食品添加物の毒性濃度の検討

食品添加物は品質を改良し、保存性を延長し、嗜好性を増加する目的で食品に添加される化学物質であり、近年、人類の食生活に多大な恩恵をもたらしてきた。現代の食環境の大きな変動と共に、食品添加物の開発も増加の一途を辿っていることから、食品添加物が誘発する食物アレルギーの問題が危惧されている。従って、食品添加物の安全性評価は国民における安全・安心な食生活の確保にとって重要課題であるが、安全性を評価する方法がほとんど存在しないのが現状である。そこで我々は、食品添加物のアレルギー性を評価する方法として、食物アレルギー発症に関わる腸管粘膜免疫組織パイエル板 (PP) を覆う上皮細胞による密着結合 (TJ) バリア機能に着目した。

腸管粘膜での上皮細胞層は生体内外を隔てるバリアとして機能し、食物未消化物などの非特異的な物質透過を防いでいる。そのため、このバリア機構が破綻すると様々な食物未消化物などが体内に侵入し、食物アレルギーを誘発してしまう恐れがある。実際に我々の研究から、腸管上皮細胞層のバリア機構を減弱させることにより腸管での物質透過性が亢進することが明らかとなっている。従って、腸管上皮細胞層におけるバリア機能をモニターすることは、食物アレルギーリスクを評価する方法として有効であると考えられる。

上皮細胞層のバリア機能を担う TJ は、様々な接着分子によって構成されている。その中でも腸管粘膜上皮細胞において発現が認められる claudin-4 は、腸管上皮細胞層での TJ において主要な分子として働いている。また、我々のこれまでの研究から、claudin-4 の機能阻害により腸管上皮細胞層での物質透過性が亢進することを明らかにしている。そのため、claudin-4 の発現を

指標とすることにより腸管上皮細胞層での TJ バリア機能を評価することが可能であると考え、前年度までの検討により、claudin-4 の発現変化とよく関連したレポーター活性を持った claudin-4 レポーター遺伝子を作製した。さらに、このレポーター遺伝子を安定的に発現させた細胞株を複数単離し、claudin-4 の発現変化をモニター可能な細胞株の選別に成功した。

これらの細胞株が食物アレルギーリスク評価系として機能するかどうかを確認するため、現在既に利用されている食品添加物の中から 88 種類の食品添加物 (Fig. 1) を選び、これらの食品添加物の中から食物アレルギー誘発候補物質のスクリーニングを行った。

最初に各種食品添加物の毒性濃度の検討を行った。昨年度作成した claudin-4 レポーター遺伝子を安定的に発現させた細胞株である MPCP #35 に各種濃度の食品添加物を添加し、24 時間後の細胞毒性について検討することにより、MPCP #35 に対する各種食品添加物の毒性濃度を明らかにした (Fig. 2)。

## D.2 Claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株の選定

現在のところ、腸管粘膜上皮細胞層におけるバリア機能の評価系は、単層膜にヒト腸管上皮細胞 Caco-2 を播種し、膜電気抵抗値を測定する系しか存在しない。本系は、細胞を播種後、2 週間程度培養する必要があること、アッセイ系に使用できる培養プレートは 24 well しかないことから、利便性が低く、スループット性に乏しい評価系である。そこで本研究では、TJ の本体である claudin の発現に着目し、claudin レポーター遺伝子を利用することで、迅速かつ簡便な TJ バリア機能の評価系構築を試みた。

昨年度までに、claudin-4 の発現とよく関連した claudin-4 レポーター活性をもつ claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株を 4 株 (MPCP #1、MPCP #8、MPCP #35、MPCP #b-24) 単離することに成功している。これらの細胞株の中からスクリーニングに用いる細胞株を選別するために、スクリーニング用の食品添加物の中から 25 種類を用い、4 株すべてにおいてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、MPCP #1, 8, 35 は各食品添加物間で比較的同様な活性変化を示した。一方、MPCP #b-24 はあまり活性変化が観察されなかった (Fig. 3)。

昨年度の検討から、MPCP #b-24 は snail、HRasV12 といった claudin-4 の発現変化を誘導する遺伝子、TGF- $\beta$ 、EGF といった claudin-4 の発現調節を行うサイトカインが誘導する発現変化と関連したレポーター活性を示すことが明らかとなっているが、MPCP #b-24 は他の 3 株と比較して既にルシフェラーゼ活性の高い細胞株である。本結果と併せて考えると MPCP #b-24 はルシフェラーゼ活性を上昇させる物質など、claudin-4 の発現に影響する多様な物質のスクリーニングには適さないと想定された。

MPCP #1, 8, 35 は各食品添加物に対して同様なレポーター活性を示し、ルシフェラーゼ活性が MPCP #b-24 ほど高くないことから、ルシフェラーゼ活性を上昇させる物質および低下させる物質の両方の同定が可能であると考えられた。中でも MPCP #35 は比較的レポーター活性が高く、細胞増殖能が高かったので以降のスクリーニングに用いることにした。

## D.3 Claudin-4 レポーター活性に影響を及ぼす食品添加物の同定

MPCP #35 を用い、88 種類の食品添加物の中からレポーター活性に影響を与える物質のスクリーニング (1st スクリーニング) を行った。その結果、各食品添加物において様々なレポーター活性の変動が観察された (Fig. 4)。中でも、ルシフェラーゼ活性を 1.5 倍以上に上昇させる食品添加物として、14. Sodium carbonate (炭酸ナトリウム)、21. Saccharin (サッカリン)、24. Ammonium persulfate (過硫酸アンモニウム)、29. Tartaric acid (酒石酸)、30. Sodium acetate (酢酸ナトリウム)、50. Potassium metabisulfite (メタ重亜硫酸カリウム)、56. Sodium methyl p-hydroxybenzoate (パラオキシ安息香酸メチルナトリウム)、57. Tocopherol (vitamin E)、60. Isoeugenol (イソオイゲノール)、70. Thiabendazole (TBZ: チアベンダゾール)、72.  $\gamma$ -oryzanol (オリザノール)、77. Biphenyl (DP: ジフェニル)、84. Dibenzoyl thiamine (ジベンゾイルチアミン)、85. Carotene (カロチン)、88. Curcumin (クルクミン)、ルシフェラーゼ活性 0.7 倍以下に低下させる食品添加物として、3. Potassium carbonate (炭酸カリウム)、4. Sodium chlorous (亜塩素酸ナトリウム)、6. New

Coccine(赤色 102 号), 10. Potassium hydroxide(水酸化カリウム), 12. Sodium nitrite(亜硝酸ナトリウム), 61. Allyl isosulfocyanate(イソチオシアン酸アリル), 75. Chlorophyll(クロロフィル), 76. Sodium Chondroitin Sulfate(コンドロイチン硫酸ナトリウム)を同定した。

1st スクリーニングにおいてルシフェラーゼ活性の変動を誘導した食品添加物に関して、2nd スクリーニングを行った。2nd スクリーニングでは、新たに食品添加物を調製し直し、濃度を振ってルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、1st スクリーニングと同様なルシフェラーゼ活性を低下させる食品添加物として、3. Potassium carbonate(炭酸カリウム)、ルシフェラーゼ活性を上昇させる食品添加物として、21. Saccharin(サッカリン), 24. Ammonium persulfate(過硫酸アンモニウム), 50. Potassium metabisulfite(メタ重亜硫酸カリウム), 56. Sodium methyl p-hydroxybenzoate(パラオキシ安息香酸メチルナトリウム), 57. Tocopherol(vitamin E), 61. Allyl isosulfocyanate(イソチオシアン酸アリル), 70. Thiabendazole(TBZ: チアベンダゾール), 85. Carotene(カロチン), 88. Curcumin(クルクミン)を同定した(Fig. 5)。

続いて、食品添加物における時間依存的なルシフェラーゼ活性への影響を検討するため、88 種類の食品添加物を添加した培地で 12 時間および 48 時間培養した際のルシフェラーゼ活性を測定した。まず、12 時間培養しルシフェラーゼ活性に影響を与えた食品添加物として、19. Dibutylhydroxytoluene(ジブチルヒドロキシトルエン: BHT), 56. Sodium methyl p-hydroxybenzoate(パラオキシ安息香酸メチルナトリウム), 70. Thiabendazole(TBZ: チアベンダゾール), 84. Dibenzoyl thiamine(ジベンゾイルチアミン), 85. Carotene(カロチン)がルシフェラーゼ活性を 1.5 倍以上に上昇させた(Fig. 6)。一方、12 時間の培養においてルシフェラーゼ活性を 0.7 倍以下に低下させる食品添加物は、細胞死が確認された 22. L-Ascorbyl Palmitate(アスコルビン酸パルミチン酸エステル)のみであった。次に、48 時間の培養によりルシフェラーゼ活性に影響を与えた食品添加物として、20. Allyl isothiocyanate(アリルイソチオシアネート),

24. Ammonium persulfate(過硫酸アンモニウム), 50. Potassium metabisulfite(メタ重亜硫酸カリウム), 61. Allyl isosulfocyanate(イソチオシアン酸アリル), 70. Thiabendazole(TBZ: チアベンダゾール), 84. Dibenzoyl thiamine(ジベンゾイルチアミン), 85. Carotene(カロチン), 88. Curcumin(クルクミン)がルシフェラーゼ活性を 1.5 倍以上に上昇させた(Fig. 7)。一方、12 時間の培養においてルシフェラーゼ活性を 0.7 倍以下に低下させる食品添加物は、細胞死が確認された 22. L-Ascorbyl Palmitate(アスコルビン酸パルミチン酸エステル)のみであった。

以上の結果、既存の食品添加物には claudin-4 の発現に影響を与えると想定されるものが複数存在することが分かった。これらの食品添加物は、時間に依存してルシフェラーゼ活性を変動させているが、中には12時間において既にルシフェラーゼ活性に影響を与え、24, 48 と持続して活性に影響を与えるもの(Thiabendazole, Carotene, Curcumin)もあった。時間依存的にルシフェラーゼ活性への影響が異なったことから、さらに早い段階での検討(6時間後)など、時間を振って検討を行えば、さらなる安全性情報が得られると考えられる。

#### D.4 各種食品添加物による claudin-4 遺伝子発現への影響に関する検討

D.3 において同定した食品添加物が、実際の claudin-4 発現を調節しているかを確認するため、RT-PCR 法により claudin-4 への発現影響を検討した。各種食品添加物(5 mM Potassium carbonate, 1 mM Saccharin, 1 mM Ammonium persulfate, 1 mM Potassium metabisulfite, 1 mM Sodium methyl p-hydroxybenzoate, 0.01 % Tocopherol, 0.01 % Allyl isosulfocyanate, 0.05 mM Thiabendazole, 0.2 mM Carotene, 0.01 mM Curcumin)を作用させ、24 時間後の claudin-4 mRNA の発現を RT-PCR により調べた。その結果、potassium carbonate (5 mM)において luciferase 活性低下と関連した claudin-4 の発現低下傾向が観察された。また、thiabendazol (0.1mM)、carotene (0.2 mM)、curcumin (0.01 mM)においても luciferase 活性と関連した claudin-4 の発現上昇が観察された(Fig.

8)。

以上の結果から、今回新たに作製した claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株を用いた claudin-4 発現モニタリングシステムは、実際の claudin-4 発現をモニター可能なシステムであることが明らかとなった。

#### D.5 各種食品添加物による claudin-4 タンパク質発現への影響に関する検討

Claudin-4 mRNA の発現に影響を与えた食品添加物等について、claudin-4 のタンパク質発現にも影響を与えるかどうか検討した。各種食品添加物 (5 mM Potassium carbonate, 1 mM Ammonium persulfate, 0.01 % Allyl isosulfocyanate, 0.001 % Allyl isosulfocyanate, 0.1 mM Thiabendazole, 0.01 mM Thiabendazole, 0.2 mM Carotene, 0.02 mM Carotene, 0.01 mM Curcumin, 5 mM Sodium butyrate, 1 mM Sodium butyrate) を作用させ、48 時間後の claudin-4 タンパク質の発現をウエスタンブロット法により調べた。Sodium butyrate は positive control として用いた。その結果、5 mM potassium carbonate においてルシフェラーゼ活性および mRNA 発現低下と関連した claudin-4 タンパク質の発現低下傾向が観察された。また、0.1 mM thiabendazol, 0.2 mM carotene, 0.01 mM curcumin においてもルシフェラーゼ活性と関連した claudin-4 タンパク質の発現上昇傾向が観察された (Fig. 9)。一方、1 mM Ammonium persulfate では claudin-4 mRNA の発現上昇は観察されなかったものの、タンパク質発現の上昇が観察された。以上の結果から、各種食品添加物が影響する claudin-4 遺伝子発現とほぼ関連した claudin-4 タンパク質発現の変動が観察された。

#### D.6 各種食品添加物による上皮バリア機能への影響に関する検討

Claudin-4 発現に影響を及ぼした食品添加物に関して、TJ バリア機能への関与を検討するため、TJ バリア機能の指標である膜電気抵抗値 (transcellular electrical resistance ; TER) を測定した。この方法は、単層膜にヒト腸管上皮細胞 Caco-2 を播種し、Caco-2 が形成する TJ バリア機能を TER により評価するものである。これまでの検討により claudin-4 modulator として

同定した potassium carbonate, thiabendazol, carotene, curcumin について、Caco-2 が形成する TJ バリア機能への影響を TER 測定により検討した。その結果、claudin-4 の発現減少を誘導する potassium carbonate (10 mM) を 48 時間作用させると、Caco-2 細胞の TJ バリア機能がコントロールと比較して 0.71 倍減少した (Fig. 10)。一方、claudin-4 の発現亢進を誘導する、thiabendazol (0.05 mM)、carotene (0.2 mM)、curcumin (0.01 mM) を 48 時間作用させると、TJ バリア機能がコントロールと比較してそれぞれ 1.5、1.24、1.34 倍増強した (Fig. 11)。以上の結果から、本スクリーニング系において同定した食品添加物は、TJ バリア機能を変化させる作用を示すことが明らかとなった。

本研究で作製した claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株を用いた迅速・簡便な claudin-4 発現モニタリングシステムは、実際の claudin-4 の発現をモニター可能であり、さらに本システムにより同定した食品添加物は、腸管上皮細胞の TJ バリア機能に影響を与えることが明らかとなった。以上の結果から、本 claudin-4 発現モニタリングシステムは食物アレルギーリスク評価系として有用なシステムと考えられる。

今回、TJ バリア機能を低下させる食品添加物として同定した potassium carbonate は、ラーメン製造時等にアルカリ剤として利用されている。従って、potassium carbonate は pH を上昇させることにより TJ バリア機能を低下させたのではないかと予想される。しかし、今回 TJ バリア低下が観察された濃度は 10 mM と高濃度時での現象のため、低濃度での利用では食物アレルギー誘発作用はないと考えられる。

また、今回 TJ バリア機能を上昇させる食品添加物として thiabendazol, carotene, curcumin を同定した。これらの食品添加物は食物アレルギーの誘発作用はなく、むしろ食物アレルギー抑制・予防作用があるのではないかと考えられる。今回使用した濃度はそれぞれ 0.05 mM、0.2 mM、0.01 mM であり、それぞれの LD50 が 2.4 g/kg、8 g/kg、2 g/kg であることから、安全な濃度範囲で TJ バリア機能を増強できることが明らかとなった。従って、本食物アレルギーリスク評価系は食物アレルギー抑制物質の同定にも役立つのではないかと考えられる。



## E. 結論

1. 複数ある claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株の中から、claudin-4 発現モニタリングシステムとして有用な細胞株を決定した。
2. 作製した claudin-4 発現モニタリングシステムを用い、88 種類の食品添加物から claudin-4 の発現低下を誘導する食品添加物として potassium carbonate を同定した。
3. 作製した claudin-4 発現モニタリングシステムを用い、88 種類の食品添加物から claudin-4 の発現上昇を誘導する食品添加物として thiabendazol、carotene、curcumin を同定した。
4. Claudin-4 の発現低下を誘導する potassium carbonate は TJ バリア機能低下作用を示すことが明らかとなった。
5. Claudin-4 の発上昇を誘導する thiabendazol、carotene、curcumin は TJ バリア機能強化作用を示すことが明らかとなった。
6. 作製した claudin-4 発現モニタリングシステムにより claudin-4 の発現に影響を与えるものとして同定した食品添加物は、実際の TJ バリア機能に影響を及ぼす添加物であったことから、本モニタリングシステムは食品添加物を対象とした食物アレルギーリスク評価系と有用であることが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

Suzuki H, Kakutani H, Kondoh M, Yagi K (2010) The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Pharmazie*, **65**, 766-769.

Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, Tamesada M, Yagi K (2010) Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl<sub>4</sub>-Induced Liver Injury. *Biol Pharm Bull*, **33**, 983-987.

Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Matsuhisa K, Takahashi A, Kakamu Y, Watari A, Yagi K (2010) A claudin-targeting molecule as a inhibitor of tumor metastasis. *J Pharmacol Exp Ther*, **334**, 576-582.

Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T, Yagi K (2010) Mucosal Vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials*, **31**, 5463-5471.

Yagi K, Kawase M, Isoda K, Kondoh M (2010) Development of novel culture system for regulation of hepatocyte function. *YAKUGAKU ZASSHI*, **130**, 537-543.

Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M, Watanabe Y, Mizuguchi H, Yagi K (2010) Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur J Pharm Biopharm*, **75**, 213-217.

Uchida H, Kondoh M, Hanada T, Takahashi A, Hamakubo T, Yagi K (2010) A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochem Pharmacol*, **79**, 1437-1444.

Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, Nakamura S, Kondoh M, Yagi K, Kawabata K, Mizuguchi H (2010) Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vector. *Journal of Controlled Release*, **142**, 4331-4337.



Saeki R, Kondoh M, Uchida H, Yagi K (2010) Potency of Claudin-targeting as Antitumor Therapy. *Molecular and Cellular Pharmacology*, **2**, 47-51.

Kondoh M, Saeki R, Kakutani H, Hamakubo T, Watari A, and Yagi K (2010) Preparation of a claudin-4-targeted anti-tumor molecule. *FASEB J*, **24**, 964.3.

Suzuki H, Kondoh M, Kakutani H, Hamakubo T, Watari A, and Yagi, K (2010) Development of a novel nasal vaccine using a claudin-4 binder. *FASEB J*, **24**, 773.4.

近藤 昌夫 (2010) 生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究 *薬剤学*, **70**, 309-313.

Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Saito Y, Yamaura T, Sakihama T, Hamakubo T, Yagi K (2011) A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS ONE*, **6**, e16611.

Takahashi A, Kondoh M, Suzuki H, Kodaka M, Yagi K (2011) Claudin as a target for drug development. *Curr Med Chem*, **18**, 1861-1865.

Suzuki H, Kondoh M, Yoshida T, Takahashi A, Matsuhisa K, Kakamu Y, Kodaka M, Isoda K, Yagi K (in press) A toxicological evaluation of a claudin modulator, C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, in mice. *Pharmazie*.

Takahashi A, Kondoh M, Kodaka M, Yagi K (in press) Peptides as tight junction modulators. *Curr Pharm Design*.

#### G-2 学会発表

渡利彰浩, 近藤昌夫, 八木清仁: Claudin 発現の迅速かつ簡便なモニタリングシステムの開発 日本薬学会第130年会 岡山 平成22年3月

渡利彰浩, 近藤昌夫, 八木清仁: 上皮細胞バリアに着目した食物アレルギーリスク評価 第37回日本トキ

シコロジ学会 平成22年6月 沖縄

渡利彰浩, 近藤昌夫, 八木清仁: Claudin 発現モニタリングシステムを用いた Tight junction 調節物質の検索 第131回日本薬学会 平成23年3月 静岡

松久幸司, 佐伯理恵, 角谷秀樹, 渡利彰浩, 近藤昌夫, 八木清仁: Claudin-4 を標的とした癌ターゲティング法の開発 日本薬剤学会第25年会 平成22年5月 徳島

鈴木英彦, 角谷秀樹, 深坂昌弘, 渡利彰浩, 近藤昌夫, 八木清仁: Claudin-4 binder を利用した粘膜ワクチンの開発 日本薬剤学会第25年会 平成22年5月 徳島

各務洋平, 内田博司, 花田雄志, 高橋梓, 山浦利章, 松久幸司, 近藤昌夫, 八木清仁: Claudin を利用したペプチド医薬品の非侵襲性投与技術の開発 日本薬剤学会第25年会 平成22年5月 徳島

鈴木英彦, 佐伯理恵, 角谷秀樹, 渡利彰浩, 近藤昌夫, 八木清仁: Claudin binder を利用した癌治療法の開発 第26回日本 DDS 学会 平成22年6月 大阪

松久幸司, 内田博司, 花田雄志, 高橋梓, 各務洋平, 近藤昌夫, 八木清仁: Claudin-4 modulator を利用したペプチド医薬品の粘膜吸収促進法の開発 第26回日本 DDS 学会学術集会 平成22年6月 大阪

高橋梓, 齊藤郁美子, 松久幸司, 渡利彰浩, 近藤昌夫, 八木清仁: *Clostridium perfringens* enterotoxin を利用した claudin-1 binder の創製 第26回日本 DDS 学会 平成22年6月 大阪

高橋梓, 松久幸司, 各務洋平, 内田博司, 花田雄志, 近藤昌夫, 八木清仁: *Clostridium perfringens* enterotoxin を利用した非侵襲性投与方法の開発 第57回トキシシンポジウム 平成22年7月 滋賀

高橋梓, 松久幸司, 各務洋平, 近藤昌夫, 八木清仁: Claudin を標的とした非侵襲性投与技術の開発 第60

回日本薬学会近畿支部総会・大会 平成22年10月 大阪

各務洋平、内田博司、花田雄志、高橋梓、近藤昌夫、八木清仁;高親和性 claudin binder の創製およびドラッグデリバリーシステムへの応用 BIA symposium 2010 平成22年7月 東京

各務洋平、高橋梓、松下恭平、松久幸司、近藤昌夫、八木清仁;新規 claudin modulator の創製およびドラッグデリバリーシステムへの応用 第9回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2010 平成22年10月 京都

松下恭平、高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁;Claudin modulator を利用した非侵襲的投与技術の開発 第9回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2010 平成22年10月 京都

Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A claudin modulator as a mucosal absorption-enhancer of a peptide drug 日本薬物動態学会第25回年会 平成22年10月 東京

鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁;Claudin-4 binder を標的とした新規粘膜ワクチンの創製 日本ワクチン学会第14年会 平成22年12月 東京

松下恭平、高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁;Claudin modulator を利用した非侵襲的投与技術の開発 第83回日本生化学会大会 平成22年12月 神戸

小高美樹、高橋梓、山浦利章、松久幸司、松下恭平、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁;ファージ抗体ライブラリを用いた新規 claudin binder スクリーニングシステムの構築 日本薬学会第131年会 平成23年3月 静岡

各務洋平、松下恭平、高橋梓、松久幸司、斉藤郁美子、

青山浩、宇野公之、近藤昌夫、八木清仁;新規 claudin binder C-CPEm19 の機能ドメイン解析 日本薬学会第131年会 平成23年3月 静岡

山根誠司、鈴木英彦、角谷秀樹、高橋梓、松久幸司、内田博司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁;新規 claudin binder の創製と粘膜ワクチンへの応用 日本薬学会第131年会 平成23年3月 静岡

高橋梓、近藤昌夫、八木清仁;Claudin binder を利用した創薬基盤研究 日本薬学会第131年会 平成23年3月 静岡

近藤昌夫、八木清仁;Claudin modulator を利用した粘膜吸収促進法の現状と課題;日本薬学会第131年会 平成23年3月 静岡

Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *Experimental Biology* 2010, Apr 24-28, Anaheim, CA, USA.

Hidehiko Suzuki, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Development of a novel nasal vaccine using a claudin-4 binder, *Experimental Biology* 2010, Apr, 2010, Anaheim, California, USA.

Masuo Kondoh, Rie Saeki, Hideki Kakutani, Yasuhiro Mochizuki, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Preparation of a claudin-4-targeted anti-tumor molecule. *Experimental Biology* 2010, Apr 24-28, 2010, Anaheim, CA, USA.

Hiroshi Uchida, Masuo Kondoh, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of peptide. *Experimental Biology* 2010, Apr 24-28, 2010, Anaheim, CA, USA.

Hidehiko Suzuki, Rie Saeki, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A novel strategy for cancer-targeting using claudin-4 binder. 37th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 10-14, 2010, Portland, OR, USA.

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a Mucosal Vaccine Using a Claudin-4 Binder. FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov 14-18, 2010, Louisiana, USA.

Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a non-invasive drug delivery system using a claudin modulator. FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov 14-18, 2010, Louisiana, USA.

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Takeshi Yoshida, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of mucosal vaccine using a claudin binder. 50th annual meeting of the American society for cell biology, Dec 11-15, Philadelphia, USA.

松下恭平 (薬学研究科 大学院生)  
山本美美 (薬学研究科 大学院生)  
鈴木英彦 (薬学研究科 大学院生)  
李相儒 (薬学研究科 大学院生)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H-1 特許取得

該当なし

### H-2 実用新案登録

該当なし

### H-3 その他

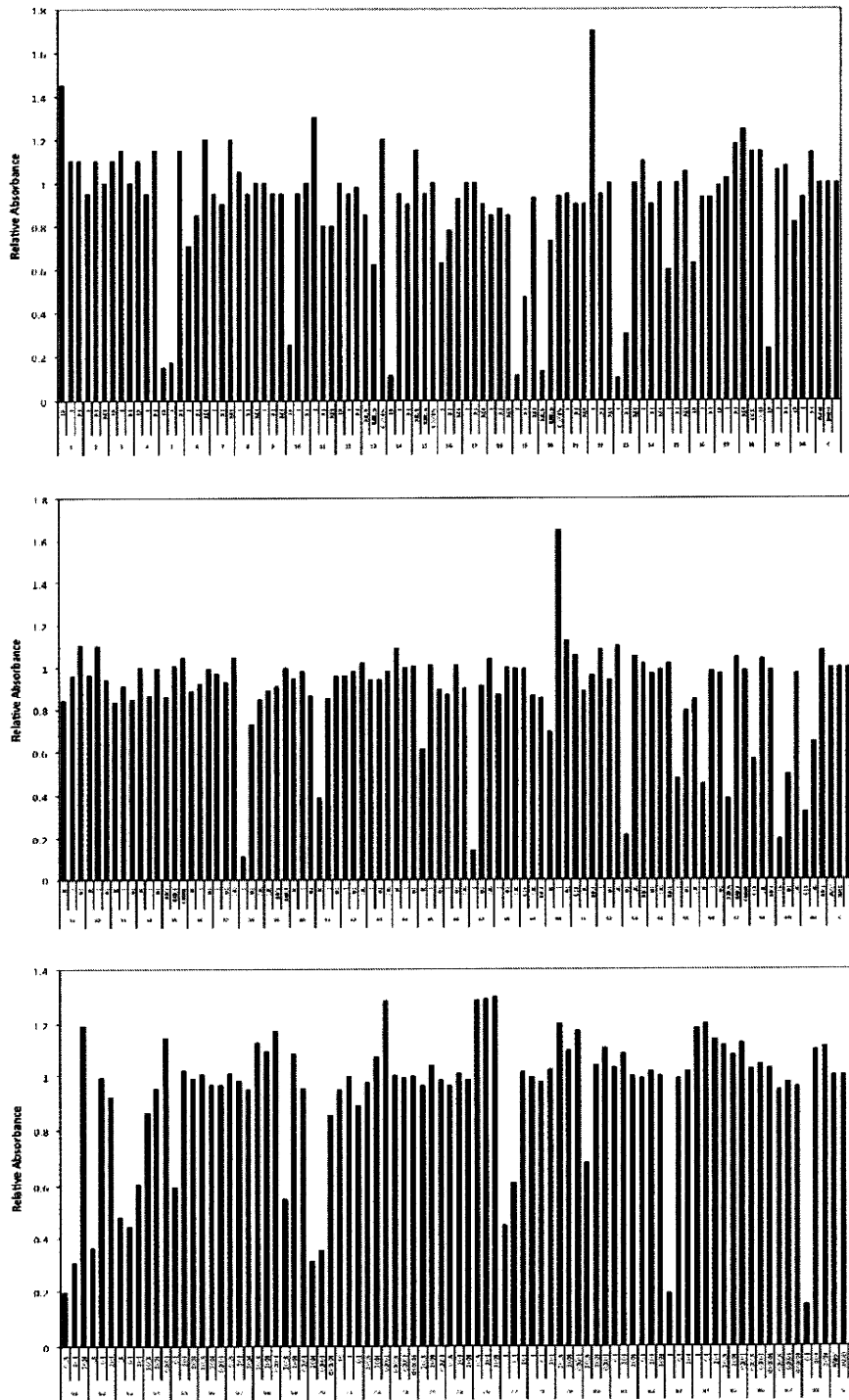
該当なし

## I. 研究協力者

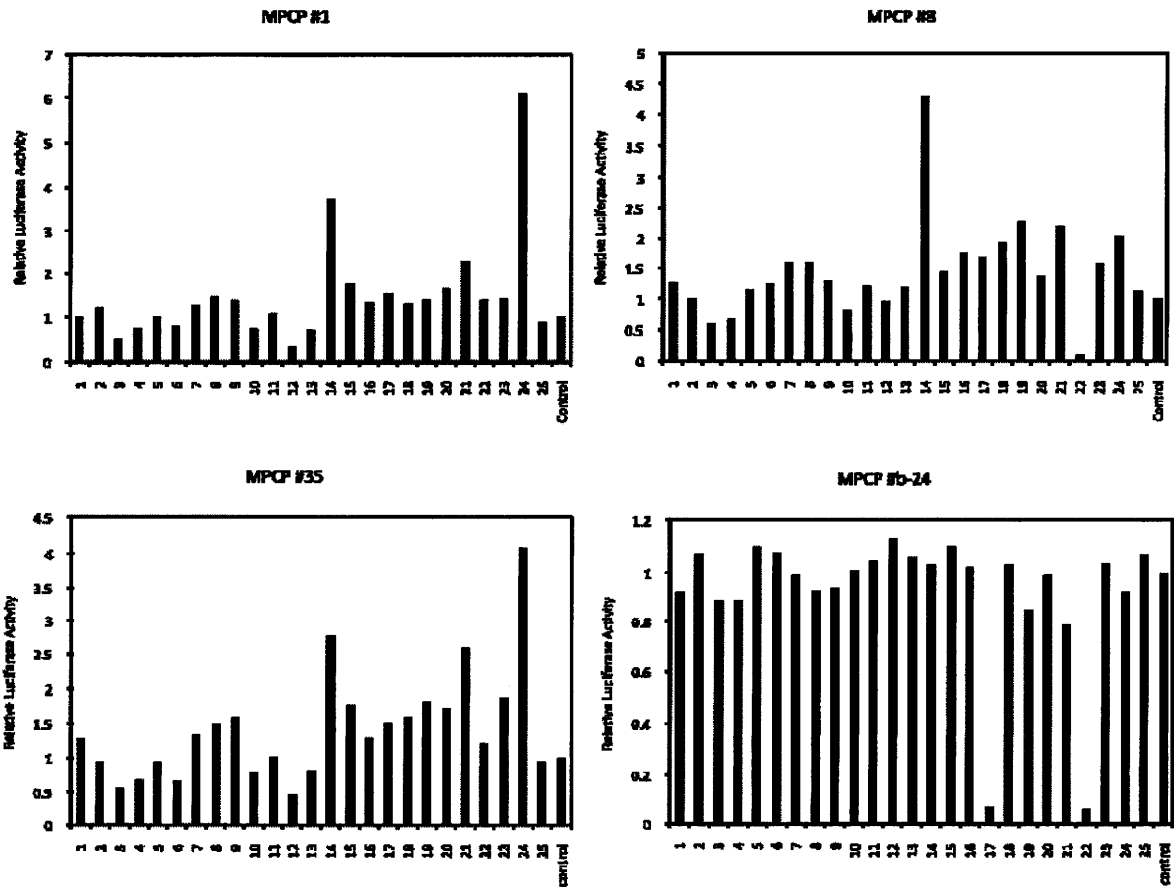
渡利 彰浩 (薬学研究科 助教)  
吉田猛史 (薬学研究科 大学院生)  
高橋梓 (薬学研究科 大学院生)  
松久幸司 (薬学研究科 大学院生)

サンプル番号	食品添加物名	用途	サンプル番号	食品添加物名	用途
1	Tartrazine(黄色4号)	合成着色料	51	Cochineal extract(コチニール)	合成着色料
2	Potassium nitrate(硝酸カリウム)	発色剤・発酵調整剤	52	Calcium Dihydrogen Pyrophosphate(酸性ピロリン酸カルシウム)	膨張剤・強化剤
3	Potassium carbonate(炭酸カリウム)	ラーメン製造用アルカリ剤	53	Calcium citrate(クエン酸カルシウム)	強化剤
4	Sodium chlorate(亜塩素酸ナトリウム)	漂白剤・小麦改良剤	54	Polyvinyl acetate(ポリ酢酸ビニル)	ガム基剤・皮膜剤
5	Zinc sulfate(硫酸亜鉛)	栄養強化剤	55	Fumaric Acid(フマル酸)	酸味料
6	New Coccine(赤色102号)	合成着色料	56	パラオキシ安息香酸メチルナトリウム	保存料
7	Amaranth(Bordeaux S)(赤色2号)	合成着色料	57	Tocopherol(vitamin E)	酸化防止剤
8	Allura Red AC(赤色40号)	合成着色料	58	Ranvat(レンネット)	酵素剤
9	Sunset Yellow FCF(黄色5号)	合成着色料	59	Ionone(イオノン)	香料剤
10	potassium hydroxide(水酸化カリウム)	硬化剤	60	Isoeugenol(イソイゲノール)	香料剤
11	L-ascorbic acid(アスコルビン酸バルミチン酸エステル)	栄養強化剤	61	Allyl isothiocyanate(イソチオシアン酸アリル)	臭香剤
12	Sodium nitrite(亜硝酸ナトリウム)	発色剤・防腐剤	62	Propylene glycol(プロピレングリコール)	品質改良剤
13	Propionic acid(プロピオン酸)	合成保存料・防カビ剤	63	Ethyl isovalerate(イソ吉草酸エチル)	香料剤
14	Sodium carbonate(炭酸ナトリウム)	膨張剤・結着剤	64	Pectin(ペクチン)	増粘安定剤
15	Zinc gluconate(グルコン酸亜鉛)	栄養強化剤	65	Cytosine(シチシン)	小麦品質改良剤
16	Benzoic acid(安息香酸)	保存料	66	Tragacanth gum(トラガントガム)	増粘安定剤
17	Sorbic acid(ソルビン酸)	保存料	67	Thiamin(チアミン)	乳化剤
18	Aspartame(アスパルターム)	合成甘味料	68	Gum arabic(アラビアガム)	増粘安定剤
19	Dibutylhydroxytoluene(ジブチルヒドロキシトルエンBHT)	酸化防止剤	69	Celulose(セルロース)	増粘安定剤
20	Allyl isothiocyanate(アリルイソチオシアネート)	臭香剤	70	Thiabendazole(TBZチアベンダゾール)	防カビ剤
21	Saccharin(サッカリン)	栄養強化剤	71	Isopropyl Citrate(クエン酸イソプロピル)	酸化防止剤
22	L-Ascorbyl Palmate(アスコルビン酸バルミチン酸エステル)	栄養強化剤	72	γ-oryzanol(オリザノール)	酸化防止剤
23	Hydroxy biphenyl	防カビ剤	73	Calcium carbonate(炭酸カルシウム)	栄養強化剤
24	Ammonium persulfate(過硫酸アンモニウム)	小麦改良剤	74	Propylene Glycol Alginate(アルギン酸プロピレングリコールエステル)	酸化防止剤・乳化安定剤
25	ミョウバン	膨張剤	75	Chlorophyll(クロロフィル)	着色料
26	L-Lysine(L-リジン)	栄養強化剤	76	Sodium Chondroitin Sulfate(コンドロイチン硫酸ナトリウム)	凝固剤
27	Calcium pantothenate(パント酸カルシウム)	栄養強化剤	77	Biohenyl(DP-ジフェニル)	防カビ剤
28	Carrageenin(カラギーナン)	増粘安定剤	78	Sodium cytidylic acid(シチジル酸ナトリウム)	調味料
29	Tartaric acid(酒石酸)	酸味料	79	Stevia rebaudiana(ステビア)	天然系甜味・乳化安定剤
30	Sodium acetate(酢酸ナトリウム)	酸味料・調味料・保存料	80	Calcium Stearoyl Lactylate(ステアрил乳酸カルシウム)	乳化剤・凝固剤
31	Glycine(グリシン)	調味料・保存料等	81	Ferrous sulfate(硫酸第一鉄)	栄養強化剤
32	Sodium Alginate(アルギン酸ナトリウム)	結着剤・安定剤	82	Calcium sulfate(硫酸カルシウム)	凝固剤・栄養強化剤
33	Ammonium chloride(塩化アンモニウム)	膨張剤	83	Benzoyl peroxide(過酸化ベンゾイル)	小麦改良剤
34	Magnesium sulfate(硫酸マグネシウム)	凝固剤	84	Di-benzoyl thiamine(ジベンゾイルチアミン)	栄養強化剤
35	γ-ribonucleotide(γ-リボヌクレオチドナトリウム)	核酸系科学調味料	85	Carotene(カロテン)	着色料・栄養強化剤
36	Calcium chloride(塩化カルシウム)	凝固剤	86	Guar Gum(グアーガム)	増粘安定剤
37	Valine(バリン)	香料剤	87	Xanthan gum(キサンタンガム)	増粘安定剤
38	Erythrosine(赤色3号)	合成着色料	88	Curcumin(クルクミン)	着色料
39	Anatto(アナート)	合成着色料	86	Guar Gum(グアーガム)	増粘安定剤
40	Maltitol(マルチトール)	合成甘味料	87	Xanthan gum(キサンタンガム)	増粘安定剤
41	Sodium Dehydroacetate(デヒドロ酢酸ナトリウム)	保存料	88	Curcumin(クルクミン)	着色料
42	Nicotinic acid(ニコチン酸)	強化剤			
43	Isoleucine(イソロイシン)	栄養強化剤			
44	Mannitol(マンニトール)	合成甘味料			
45	Vitamin C (ascorbic acid)	栄養強化剤			
46	Phenylalanine(フェニルアラニン)	合成甘味料			
47	Galic acid(没食子酸)	酸化防止剤			
48	Erythorbic acid(エリソルビン酸)	酸化防止剤			
49	Magnesium chloride(塩化マグネシウム)	凝固剤			
50	Potassium metabisulfite(メタ亜硫酸塩カリウム)	漂白剤			

Fig. 1 List of food additives used in this experiment.



**Fig. 2 Effect of food additives on viability of MPCP #35. After 24 hour incubation with different dose of food additives , cell viability was evaluated by MTT assay.**



**Fig. 3** Luciferase activity of various claudin-4 reporter cells treated with 24 food additives.

Claudin-4 reporter gene-expressing MCF7 cells, MPCP #1, MPCP #8, MPCP #35 and MPCP #b-24 treated with 24 food additives for 24 hour were lysed and the luciferase activity was measured.