

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590158

研究課題名（和文） 味蕾細胞を用いた味覚測定技術の開発と苦味マスキング設計への応用

研究課題名（英文） Application and the bitterness masking design of the taste measurement technology using the taste bud cell

研究代表者

吉田 都 (YOSHIDA MIYAKO)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号：20369028

研究成果の概要（和文）： 味蕾細胞を用いて、苦味受容体の細胞内シグナル伝達に着目し、分子生物学的手法による新規苦味測定技術を開発した。次に Linoleic acid を苦味抑制物質として用いた新規苦味マスキング剤の開発を行った。開発した苦味測定技術を駆使して Linoleic acid を苦味抑制物質としての可能性を検討し、新規苦味マスキング設計として、Linoleic acid 含有マイクロスフェアを含有させた製剤を作製することによって、Linoleic acid の口腔内での滞留性を向上させ、苦味抑制作用を持続化させた苦味マスキング製剤の開発を行った。

研究成果の概要（英文）： Using a taste bud cell, a new bitterness measurement technology related to the signal transmission in the cell of the bitterness receptor was developed by the molecular biologic technique. The new bitterness masking reagent which contained Linoleic acid for as a bitterness inhibitor was developed next. The retentivity in the oral cavity of Linoleic acid was improved by using of the bitterness measurement technology, and examining the possibility as the bitterness inhibitor in Linoleic acid, and manufacturing the preparation which incorporated Linoleic acid component microsphere as a new bitterness masking design and developed the bitterness masking preparation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 24 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：苦味評価

1. 研究開始当初の背景

医薬品の苦味は患者にとって苦痛であり、コンプライアンス、QOLの低下につながる。多くの製剤で医薬品の苦味を抑制する技術（苦味マスキング）が施されているが、苦味を抑制できていない製剤や、処方都合上、粉碎した医薬品を服用する場合などには強い苦味を伴うことになる。また、低含量製剤の

液剤化や小児用製剤、口腔内崩壊錠において、医薬品の苦味が問題になることがある。

苦味の測定に関しては、FDA (Food and Drug Administration; アメリカ食品医薬品局)が臨床試験でのプラセボとの味の盲検性について味覚センサの利用推進を提唱しており、国外、国内問わず、多くの製薬企業で味覚センサを導入している。研究代表者が所属

している武庫川女子大学薬学部臨床製剤学講座は、医薬品の苦味測定に関しては先駆的な存在であり、苦味を測定するための味覚センサが完備されており、測定技術が確立されている。しかしながら、現在のところ、味覚センサを用いることで全ての医薬品の苦味を測定できるというわけではない。苦味物質によっては、味覚センサに反応しにくい物質もあり、測定結果に関しては、ヒト官能試験との相関性を考慮することが必要となってくる。従って、麻薬性鎮痛薬や向精神薬などヒト官能試験を行い難い医薬品に関しては、苦味の評価が困難であるという問題がある。また、現在多くの施設に導入されている味覚センサは、味蕾細胞に見立てた細胞膜成分と苦味物質との結合を *in vitro* で評価した系であるため、味蕾細胞と苦味物質との結合性についての予測は出来るが、苦味と他の基本味（甘味、酸味または塩味）との相互作用に関しては、評価しにくい。

現在の苦味マスキング技術として、2つの技術が用いられている。すなわち、物理的マスキング（物理的に苦味物質をコーティングすることにより苦味を抑制する）、化学的マスキング（苦味物質に化学的修飾を施し、溶解度を上げることによって苦味を抑制する）および官能的マスキング（甘味、酸味などの矯味剤を添加することによって苦味を抑制する）である。味覚センサを用いてマスキングの評価をする場合には、上記の味覚センサの特徴上、物理的マスキングおよび化学的マスキングに関しては評価しやすいが、官能的マスキングに関しては評価しにくいという問題が生じているのが現状である。

2. 研究の目的

医薬品の苦味測定に関して官能的苦味マスキングの評価が可能となる新規苦味評価系の構築を行った。本研究では、マウスの味蕾細胞を用いて、苦味物質（塩酸キニーネ）による苦味受容体に対する応答性について検討した。苦味受容体は7回膜貫通Gタンパク共役型の受容体である。In vitro の結果について、*in vivo* での苦味に対する行動応答解析を行い、苦味に対する評価方法を構築した。更に、Linoleic acid が苦味を抑制し、甘味を増強することが報告され、Linoleic acid は味蕾細胞上のCD-36に結合することが報告された。そこで、本研究では、苦味物質（塩酸キニーネ）による苦味受容体に対する応答性へのLinoleic acidの影響について検討し、Linoleic acid が苦味マスキング剤の成分となる可能性を探った。また、構築した新規苦味評価系を用いて苦味マスキング剤の開発を目的とした検討を行った。そこで

本研究では、Linoleic acid のマイクロスフェアを含有させた苦味マスキング剤の開発を試みた。従来の味覚センサは前述の通り、味蕾細胞に見立てた細胞膜成分と苦味物質との結合を *in vitro* で評価した系であり、必ずしも口腔内の味覚の変化を再現している測定法ではないため、測定結果についてはヒト官能試験との相関性を考慮することが必要となる。したがって、ヒト官能試験を行い難い医薬品に関しては、苦味の評価が困難となる。また、苦味マスキングの測定の際、物理的マスキングや化学的マスキングについての評価を行うことはできるが、官能的苦味マスキングの評価を行うことができない。そこで本研究では、マウスの味蕾細胞を用いて、様々な条件下での苦味物質（キニーネ塩酸塩）による苦味受容体に対する応答性について検討し、口腔内環境を再現したモデルを用いた苦味測定方法の構築を目指した。本測定法が確立されることによって、官能的苦味マスキングの評価が可能となる。更にヒト官能試験との相関性が証明されれば、ヒト官能試験の代替法となる可能性があり、ヒト官能試験を行い難い医薬品に関する苦味の評価が可能となる。Linoleic acid のマイクロスフェアから持続的に Linoleic acid を放出させることによって、味蕾細胞上のCD-36との結合を持続させ、苦味抑制作用、甘味増強作用を持続させる。その剤の噴霧後に医薬品を服用しても、Linoleic acid による持続的な苦味抑制作用により、医薬品の苦味がマスキングされると考えられる。このマスキング剤を用いることにより、現在汎用されている医薬品の剤形を変更することなく苦味マスキングすることが出来、コンプライアンスの向上に繋がると考えた。

3. 研究の方法

(1) 味蕾細胞の単離方法の確立

マウスの舌の有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭から味蕾細胞を単離した。単離方法は、Yoshida らの方法を参考とした。マウスを、頸椎脱臼後、速やかに舌を採取し、舌の有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭に分けて、それぞれの味蕾細胞を単離した。

(2) 単離した味蕾細胞に発現する味受容体の確認

有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭から味蕾細胞に関して、RNAを抽出し、RT-PCR法にて、苦味受容体(T2R)、甘味受容体(T1R₂、T1R₃)の発現量を確認した。

(3) 単離した味蕾細胞の苦味応答解析方法の確立

苦味物質が苦味受容体に結合すると、phospholipase C が活性化され、細胞膜微量構成リン脂質のホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP2) が加水分解されて産生されるイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP3) により小胞体からのカルシウムイオンの遊離を引き起こす。味蕾細胞中の phospholipase C の活性測定 (測定キットを用いて吸光度測定) および細胞内カルシウム測定 (共焦点蛍光画像イメージング) をすることによって、苦味物質と苦味受容体との結合後のシグナル伝達を検討した。

(4) 単離した味蕾細胞に発現する脂肪酸の受容体 CD-36 の発現確認

有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭から味蕾細胞に関して、RNA を抽出し、RT-PCR 法にて、脂肪酸の受容体 CD-36 の発現量を確認した。

(5) 単離した味蕾細胞における Linoleic acid 添加時の苦味物質に対する苦味応答解析

Linoleic acid 添加時に苦味物質が苦味受容体に結合した際の苦味応答反応として、味蕾細胞中の phospholipase C の活性測定および細胞内カルシウム測定し、シグナル伝達の変化を検討した。

(6) Linoleic acid 含有マイクロスフェアの作製

Linoleic acid を持続的に放出する PLGA マイクロスフェアの作製を行った。

(7) 単離した味蕾細胞における Linoleic acid 含有マイクロスフェア添加時の苦味物質に対する苦味応答解析

Linoleic acid 含有マイクロスフェア 添加時に苦味物質が苦味受容体に結合した際の苦味応答反応として、味蕾細胞中の phospholipase C の活性測定および細胞内カルシウム測定し、シグナル伝達の持続時間の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 単離した味蕾細胞の苦味応答解析方法の確立

味蕾細胞中の phospholipase C の活性測定 (測定キットを用いて吸光度測定) および細胞内カルシウム測定 (共焦点蛍光画像イメージング) をすることによって、苦味物質と苦味受容体との結合後のシグナル伝達を検討した。苦味物質の用量依存的に味蕾細胞中の phospholipase C の活性が上がり、カルシウムの遊離が増加することが示された。この結果は味覚センサのセンサ出力値と相関性を示した。

(2) 単離した味蕾細胞における Linoleic acid 添加時の苦味物質に対する苦味応答解析

Linoleic acid 添加時に苦味物質が苦味受容体に結合した際の苦味応答反応として、味蕾細胞中の phospholipase C の活性測定および細胞内カルシウム測定し、シグナル伝達の変化を検討したところ、Linoleic acid の用量依存的に、phospholipase C の活性が低下し、カルシウムの遊離が減少した。この結果は味覚センサのセンサ出力値と相関性を示した。

(3) 単離した味蕾細胞における Linoleic acid 含有マイクロスフェア添加時の苦味物質に対する苦味応答解析

Linoleic acid 含有マイクロスフェア 添加時に苦味物質が苦味受容体に結合した際の苦味応答反応として、味蕾細胞中の phospholipase C の活性測定および細胞内カルシウム測定し、シグナル伝達の持続時間の変化を検討したところ、phospholipase C の活性の低下しおよびカルシウムの遊離が減少が持続した。この結果は味覚センサのセンサ出力値と相関性を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

① Bitterness prediction of

H1-antihistamines and prediction of masking effects of artificial sweeteners using an electronic tongue., Ito M, Ikehama K, Yoshida K, Haraguchi T, Yoshida M, Wada K, Uchida T.

Int. J. Pharm. 441, 121-127 (2013) 査読有

② Quantitative evaluation of bitterness

of H1-receptor antagonist and masking effect of acesulfame potassium, an artificial sweetener, using a taste sensor., Ito M, Wada K, Yoshida M, Hazeckawa M, Abe K, Chen R, Habara M, Ikezaki H, Uchida T.

Sensor and Materials, 25, 17-30 (2013) 査読有

③ アンブロキシソールドライシロップまたは

カルボシステインドライシロップとクラリスロマイシンドライシロップ同時服用時の

苦味強度の定量的評価., 内田 享弘, 櫛川 舞., Prog. Med., 32, 2245-2250 (2012) 査読有

④味覚センサを用いた医薬品の味評価
内田 享弘, 日本味と匂学会誌, 19(2), 13-18 (2012) 査読有

⑤Factors affecting the bitterness intensities of ten commercial formulations of ambroxol., Uchida T, Sugino Y, Hazekawa M, Yoshida M, Haraguchi T.
Chem. Pharm. Bull, 60(8), 949-954 (2012) 査読有

⑥Bitterness evaluation of H1-receptor antagonists using a taste sensor., Ito M, Yoshida M, Kobayashi Y, Hiraoka M, Ikezaki H, Uchida T., Sensors and Materials, 23(8), 483-492 (2011) 査読有

⑦クレメジン®細粒・後発品の製剤学的特性と服用性の評価., 内田 享弘, 吉田 都, 新薬と臨床 J. New Rem. & Clin, 60(8), 1548-1553 (2011) 査読有

⑧Synergistic effect of sour taste and low temperature in suppression the bitterness of Aminoleban® EN.
Haraguchi T, Yoshida M, Hazekawa M, Uchida T.
Chem. Pharm. Bull, 59, 536-540 (2011) 査読有

⑨ Influence of Swallowing Aids on the Adsorption and Palatability of Kremezin®
Yoshida M, Hazekawa M, Haraguchi T, Uchida T.
Chem. Pharm. Bull, 59, 434-437 (2011) 査読有

[学会発表] (計 16 件)

①口腔内崩壊錠用崩壊試験器および味認識

測定装置を組み合わせたファモチジン OD 錠 10 製剤の苦味予測

吉田 都, 櫛川 舞, 原口 珠実, 内田 享弘
日本薬学会第 133 年会 2013. 3. 27-30 (横浜)

②味覚センサによるムコスタ®点眼液 UD2%使用時の苦味軽減可能な飲食物の探索

宮崎 愛里, 原口 珠実, 吉田 都, 内田 享弘
日本薬学会第 133 年会 2013. 3. 27-30 (横浜)

③OD-mate と味覚センサを用いたエバスチン 口腔内崩壊錠の服用感評価

原口 珠実, 吉田 都, 櫛川 舞, 内田 享弘
日本薬学会第 133 年会 2013. 3. 27-30 (横浜)

④ゾピクロン錠 (アモバン錠®) とエスゾピクロン錠 (ルネスタ錠®) の苦味評価

宇田 篤史, 原口 珠実, 吉田 都, 向井 啓, 山本 和宏, 久米 学, 榎本 博雄, 平野 剛, 内田 享弘, 平井 みどり

第 22 回日本医療薬学会年会 2012. 10. 27-28 (新潟)

⑤味覚センサを用いたアンブロキシソール 10 製剤の苦味予測

内田 享弘, 櫛川 舞, 原口 珠実, 吉田 都
第 22 回日本医療薬学会年会 2012. 10. 27-28 (新潟)

⑥タンニン酸・唾液混合時の沈殿物生成に及ぼすソーマチンの影響

村井 友美, 中田 愛美, 北島 彩可, 横野 祐未, 原口 珠実, 櫛川 舞, 吉田 都, 内田 享弘

第 62 回日本薬学会近畿支部大会 2012. 10. 20 (武庫川女子大学)

⑦味覚センサーを使用した H₁ 受容体拮抗薬の定量的苦味評価

伊藤 正紀, 吉田 都, 和田 耕一, 池崎 秀和, 内田 享弘

第 62 回日本薬学会近畿支部大会 2012. 10. 20 (武庫川女子大学)

⑧Prediction of bitterness for 10 kinds of

orally disintegration tablets by taste sensor

Takahiro Uchida, Mai Hazekawa, Hidekazu Ikezaki, Makoto Teraoka, Miyako Yoshida, Tamami Haraguchi

AAPS annual meeting 2012. 10. 14-18 (Chicago, USA)

⑨分岐鎖アミノ酸を対象とした苦味及び苦味抑制効果の評価手法の検討

大杉 啓悟、田原 祐助、秋富 博紀、安浦 雅人、小林 義和、中野 美智江、池崎 秀和、原口 珠実、内田 享弘、都甲 潔

味と匂い学会第46回大会 2012. 10. 3-5(大阪)

⑩市販アンブロキシソール錠10製剤の服用性に関する因子の評価

内田 享弘、櫛川 舞、原口 珠実、吉田 都
医療薬学フォーラム 2012. 7. 14-15 (福岡)

⑪口腔内崩壊錠用崩壊試験器と味覚センサを組み合わせたアムロジピン OD 錠の苦味予測

吉田 都、櫛川 舞、原口 珠実、内田 享弘
医療薬学フォーラム 2012. 7. 14-15 (福岡)

⑫味覚センサを用いたベシケア®OD 錠の粉碎時の苦味評価

宮崎 愛里、原口 珠実、櫛川 舞、吉田 都、内田 享弘

第15回日本医薬品情報学会 2012. 7. 7-8 (大阪)

⑬クラリスロマイシンドライシロップ水懸濁液の苦味に及ぼす pH の影響

櫛川 舞、吉田 都、原口 珠実、内田 享弘
第15回日本医薬品情報学会 2012. 7. 7-8 (大阪)

⑭新規苦味センサを使用した H1 受容体拮抗薬の苦味評価

伊藤 正紀、吉田 都、和田 耕一、池崎 秀和、内田 享弘

日本薬学会第27年会 2012. 5. 24-26 (神戸)

⑮味覚センサを用いたベシケア®OD 錠粉碎時の苦味評価

原口 珠実、宮崎 愛里、櫛川 舞、吉田 都、内田 享弘

日本薬学会第27年会 2012. 5. 24-26 (神戸)

⑯口腔内崩壊錠用崩壊試験器および味覚センサを用いたアムロジピン OD 錠10製剤の苦味予測

吉田 都、櫛川 舞、原口 珠実、内田 享弘

日本薬学会第27年会 2012. 5. 24-26 (神戸)

[図書] (計3件)

①都甲潔監修、内田 享弘、吉田 都 分担執筆

食品・医薬品のおいしさと安全・安心の確保技術, 8-20, 109-118 シーエムシー出版 (2012)

②内田 享弘, 原田 努

口腔内崩壊錠の臨床評価

Pharm Tech Japan, 28(2), 245-251 (2012)

③大戸 茂弘編集, 内田 享弘、吉田 都 分担執筆

Perspective 薬剤学, 京都廣川書店, 565-573 (2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 都 (YOSHIDA MIYAKO)
武庫川女子大学・薬学部・講師
研究者番号: 20369028

(2) 研究分担者

内田 享弘 (UCHIDA TAKAHIRO)
武庫川女子大学・薬学部・教授
研究者番号: 70203536

(3) 連携研究者

櫛川 舞 (HAZEKAWA MAI)
武庫川女子大学・薬学部・助教
研究者番号: 10509186
原口 珠実 (HARAGUCHI TAMAMI)
武庫川女子大学・薬学部・助手
研究者番号: 10550741