

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460234

研究課題名(和文) IAsysを用いた医薬品の苦味予測法の確立と製剤設計への応用

研究課題名(英文) Estimation of bitterness intensity of drug using IAsys

研究代表者

吉田 都 (yoshida, miyako)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：20369028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの苦味受容体であるT2RをSPRNav(iAsysと類似した原理の測定装置)で苦味を呈する医薬品との親和性(affinity)を評価した。これは、苦味を呈する医薬品を口に含んだ時に感じる苦味強度として評価した。苦味の基準物質として苦味の官能試験時に教師用サンプル(基準サンプル)として用いるキニーネ塩酸塩を用いて定量的苦味受容反応の評価における濃度等の測定条件を確立しその他苦味を呈する医薬品について評価した。同時に官能試験も行い、本評価系と官能試験との定量性の相関を検討した。苦味を呈する医薬品の中でも疎水性の高いものについては、T2Rとの親和性が高く、強い苦味を呈することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The interaction of T2R which was a bitterness receptor of the Homo sapiens and bitter drugs was evaluated by SPRNavi. The affinity was evaluated as bitterness intensity of drug. At first, as a standard drug of the bitterness, quinine hydrochloride to use as a sample (standard sample) was used for establishment of quantitative bitterness measurement condition. Correlation between affinity and gustatory sensation test was also evaluated. Affinity with T2R14 was suggested to be high for the high hydrophobic drug and these drugs suggested to have strong bitterness.

研究分野：臨床製剤学

キーワード：bitterness intensity

## 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、処方の都合上、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。FDA (Food and Drug Administration; アメリカ食品医薬品局)は、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として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。

研究代表者は、これまでに味蕾細胞を用いた苦味評価方法を確立した。この方法を用いると、従来の細胞膜成分と苦味物質との結合を *in vitro* で評価した味覚センサと比べると感度が上がり、従来の味覚センサでは測定できなかった医薬品の苦味も測定可能となった。しかしながら、味覚味蕾細胞を用いる場合、動物から味蕾細胞を摘出し、培養し、苦味測定可能な状態とするまでに時間およびコストがかかり、汎用性が低いことが難点として挙げられる。

## 2. 研究の目的

IASys とは生体分子間相互作用解析装置と呼ばれ、専用のキュベットに受容体、抗体などの分子を固定し、一方でキュベットに加えた目的物質との特異的相互作用について画面を見ながらリアルタイムで定量する機器である。そこで本研究ではより簡便な味覚評価系の確立を目的として IAsys に類似した表面プラズモン共鳴法 (SPRNav) を用いた苦味の定量的評価を試みた。さらに、医薬品の

構造、溶解性、脂溶性等の物性と苦味受容体への結合性や親和性についてデータベース化することによって医薬品の苦味受容反応のパラメータを探索し、医薬品の苦味予測方法を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 苦味受容体の cDNA の作製

苦味受容体は、T2R であることが同定されている。この遺伝子に関してヒト腎臓 cDNA (クロンテック社) を鋳型に PCR にて全長鎖 cDNA を得た。

### (2) 苦味受容体の精製

上記で得た cDNA を HEK293 細胞に導入し、苦味受容体をそれぞれ強制発現した細胞系を作製する。苦味受容体をそれぞれ強制発現した細胞の細胞膜分画から苦味受容体を精製した。

### (3) SPRNav) を用いた苦味受容体と苦味を呈する医薬品との相互作用の検討

SPRNav) の金板に苦味受容体を結合させ、苦味受容体と苦味を呈する医薬品の親和性 (affinity) を評価した。また、各医薬品の物性と親和性および苦味強度との相関を検討した。

## 4. 研究成果

ヒトの苦味受容体である hTAS2Rs を SPRNav) (IASys と類似した原理の測定装置) で苦味を呈する医薬品との親和性 (affinity) を評価した。これは、苦味を呈する医薬品を口に含んだ時に感じる苦味強度として評価した。苦味の基準物質として苦味の官能試験時に教師用サンプル (基準サンプル) として用いるキニーネ塩酸塩を用いて定量的苦味受容反応の評価における濃度等の測定条件を確立しその他苦味を呈する医薬品について評価した。同時に官能試験も行い、本評価系と官能試験との定量性の相関を検討した。

ヒトの苦味受容体 (hTAS2Rs) には 25 種類のサブタイプが存在し、リガンドとしての医薬品は各々数種類の hTAS2Rs に作用することが知られている。まずは各種味覚センサ膜応答に相関性の高い hTAS2R サブタイプを見出すことを目的として検討を行った。苦味受容体と結合することが報告されている 22 種の各医薬品の hTAS2Rs 応答と味覚センサ脂質膜応答の相関性を評価した。22 種の医薬品として、アザチオプリン、アセトアミノフェン、エリスロマイシンエチルコハク酸塩、オフロキサシン、カフェイン、キニーネ塩酸塩、クロモリナトリウム、クロラムフェニコール、クロルフェニラミンマレイン酸塩、コルヒチン、ジフェニドール塩酸塩、ジフェンヒドラミン塩酸塩、ストリキニーネ硝酸塩、デキストロメトर्फアン臭化水素酸塩一水和物、ノ

スカピン、パパベリン塩酸塩、ハロペリドール、ヒドロコルチゾン、ファモチジン、フルフェナム酸、プロピルチオウラシル、メチマゾールを用いた。味認識装置 (SA402B) を用いて各医薬品の脂質膜センサ (BT0, AN0, C00, AE1) 応答性を評価し、hTAS2R1, 4, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 31, 38, 39, 40, 41, 43, 44, 46, 47, 49 応答との相関性を評価した。センサの脂質膜は、塩基性の苦味に反応する AC0, AN0, BT0、酸性の苦味に反応する C00、収斂味に反応する AE1 の 5 種を使用した。各医薬品 0.1mM の味覚センサ出力を測定したところ、キニーネ塩酸塩、クロルフェニラミンマレイン酸塩、ジフェニドール塩酸塩、ジフェンヒドラミン塩酸塩、デキストロメトルファン臭化水素酸塩一水和物、パパベリン塩酸塩、ハロペリドールは、BT0 膜によく反応し、強い苦味を呈することが予測された。また、アザチオプリン、アセトアミノフェン、エリスロマイシンエチルコハク酸塩、カフェイン、クロラムフェニコールもわずかに BT0 膜に反応した。クロモリナトリウム、コルヒチン、メチマゾール、プロピルチオウラシル、ストリキニーネ硝酸塩、ノスカピンは AN0 膜、AC0 膜に反応した。ファモチジンは AC0 膜、AN0 膜、C00 膜に反応し、フルフェナム酸、オフロキサシンは C00 膜、ヒドロコルチゾンはどのセンサにも反応がわずかであった。また、各センサ出力値を変数とし、主成分分析を行った。主成分 1 の負荷量が大きい変数は塩基性苦味膜、主成分 2 の負荷量が大きい変数は酸性苦味膜、収斂味膜の出力値であった。寄与率は主成分 1 が 46.31%、主成分 2 が 25.14% であった。

各医薬品の主成分得点のうち主成分 1 を x 軸、主成分 2 を y 軸とした主成分分析図において、右に行くほど塩基性苦味、上に行くほど酸性苦味、収斂味が強いことが予測された。

ジフェニドール塩酸塩、ジフェンヒドラミン塩酸塩、デキストロメトルファン臭化水素酸塩一水和物、パパベリン塩酸塩、ハロペリドールはかなり強い苦味を呈すること、また、クロルフェニラミンマレイン酸塩、フルフェナム酸は収斂味の強い医薬品であることが予測された。

22 種の医薬品が反応する苦味受容体サブタイプについて、各医薬品は 1 つまたは複数の苦味受容体に反応することが報告されている。

そこで、この医薬品の各受容体反応の有無と味覚センサ反応の有無の相関係数を算出した。味覚センサ反応性は、各センサ出力値の相対値が 10 以上、CPA 値が 2 以上であった場合を反応ありとした。塩基性苦味膜反応との相関係数が高い受容体は hTAS2R44、hTAS2R14、hTAS2R10、hTAS2R40 であった。酸性苦味膜反応の各受容体反応との相関係数は塩基性苦味膜と比較して低かった。さらに、相関係数より相関性が高いと予測された項目につい

て、2 乗検定を行った。その結果、hTAS2R10 と BT0、AN0 膜反応、hTAS2R14 と BT0 膜反応、hTAS2R44 と AN0 膜反応との間に有意な相関性が認められた。BT0 膜、AN0 膜はとくに hTAS2R10、hTAS2R14、hTAS2R44 に反応する医薬品の苦味評価に有用であることが示唆された。BT0 膜、AN0 膜は塩基性医薬品の苦味評価を行うために開発されたセンサ膜であり、様々な塩基性医薬品の苦味を評価出来ることが報告されている。また、hTAS2R10、hTAS2R14、hTAS2R44 は共通した特定の構造をもたない幅広いアゴニストをもつと報告されている。強い苦味を呈するため臨床上問題となる多くの塩基性医薬品の苦味反応は、主に苦味受容体 hTAS2R10、hTAS2R14、hTAS2R44 が関与する可能性が示唆された。

ヒトの苦味受容体である T2R と SPRNavi (IASys と類似した原理の測定装置) で苦味を呈する医薬品との親和性 (affinity) の評価においても同様に、苦味を呈する医薬品の中でも疎水性の高いものについては、hTAS2R14 との親和性が高く、強い苦味を呈することが示唆された。

## 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 5 件)

Suppression in bitterness intensity of bitter basic drug by chlorogenic acid.  
Shiraishi S, Haraguchi T, Nakamura S, Kojima H, Kawasaki I, Yoshida M, Uchida T.  
Chem. Pharm. Bull. 65(2): 151-156 (2017)

Usefulness and limitations of taste sensors in the evaluation of palatability and taste-masking in oral dosage forms.  
Haraguchi T, Yoshida M, Kojima H, Uchida T.  
Asian J Pharm. Sci. 11(4): 479-485 (2016)

The Ability of foods/drinks to reduce the bitterness intensity of topiramate as determined by taste sensor analysis.  
Haraguchi T, Uchida T, Hazekawa M, Yoshida M, Nakashima M, Sanda H, Hase T, Tomoda Y  
Chem Pharm Bull, 64(1), 14-20 (2016)

Bitterness evaluation of acidic pharmaceutical substances (NSAIDs) using a taste sensor  
Yoshida M, Haraguchi T, Uchida T  
Chem. Pharm. Bull. 62(12), 1252-1258 (2014)

Evaluation of palatability of 10 commercial amlodipine orally disintegrating tablets by gustatory sensation testing, OD-mate as a new disintegration apparatus and the artificial taste sensor  
Uchida T, Yoshida M, Hazekawa M, Haraguchi

T, Furuno H, Teraoka M, Ikezaki H  
J. Pharm. Pharmacol. 65(9), 1312-1320 (2013)

〔学会発表〕(計 11 件)

味覚センサと <sup>1</sup>H-NMR を用いたクロロゲン酸によるジフェンヒドラミン塩酸塩の苦味抑制に関する評価および機序の解明

小島穂菜美、白石早祐子、中村早貴、原口珠実、吉田都、内田享弘

日本薬学会第 137 年会 2017.3.25-27 東北大学(仙台)

Analysis the responses of human bitterness receptor agonists toward taste sensors

Tamami Haraguchi, Takahiro Uchida, Miyako Yoshida, Honami Kojima, Masaaki Habara, Hidekazu Ikezaki

CRS 2016.7.17-20 Seattle (USA)

Evaluation the effect of chlorogenic acid on bitter drugs using taste sensor system and surface plasmon resonance (SPR)

Tamami Haraguchi, Sayuko Shiraishi, Saki Nakamura, Honami Kojima, Miyako Yoshida, Takahiro Uchida

BIOSENSORS 2016.5.25-27 Gothenburg, (Sweden)

医薬品の苦味受容体 (hTAS2Rs) 応答と味覚センサ脂質膜応答の相関性評価

原口珠実、中村早貴、白石早祐子、小島穂菜美、吉田都、羽原正秋、池崎秀和、内田享弘

日本薬剤学会第 31 年会 2016.5.19-21 岐阜都ホテル(岐阜)

味覚センサを用いたゾピクロンおよびエスゾピクロンの苦味評価

吉田都、宇田篤史、原口珠実、樫川舞、内田享弘、山本和宏、平野剛、平井みどり

日本薬学会第 135 年会 2015.3.25-28 デザインクリエイティブセンター神戸(兵庫)

Bitterness classification system in active pharmaceutical ingredients using taste sensor

M. Yoshida, H. Ikezaki, M. HazeKawa, T. Haraguchi, T. Uchida

AAPS annual meeting 2014.11.2-6 San Diego, (USA)

味覚センサを用いた乳汁の味に及ぼすクリンダマイシンリン酸塩の影響に関する評価

吉田都、中井由佳、原口珠実、樫川舞、内田享弘

医療薬学会年会 2014.9.27-28 名古屋国際会議場(愛知)

味覚センサを用いた医薬品原末の Bitterness classification system の構築

吉田都、樫川舞、原口珠実、内田享弘

日本薬剤学会第 29 年会 2014.5.20-22 大宮ソニッ

クシティビル(埼玉)

味覚センサを用いた降圧薬間の味相互作用評価

吉田都、原口珠実、樫川舞、内田享弘

日本薬学会第 134 年会 2014.3.27-30 熊本大学(熊本)

味覚センサを用いた NSAIDs の苦味評価 苦味マスキング効果の評価への応用

吉田都、原口珠実、樫川舞、内田享弘

第 63 回日本薬学会近畿支部大会 2013.10.21 同志社女子大(京都)

Evaluation of palatability for 10 commercial famotidine orally disintegrating tablets by combination of disintegration apparatus for orally disintegrating tablet and taste sensor

Miyako Yoshida, Mai HazeKawa, Tamami Haraguchi, Takahiro Uchida

The 40 th Annual Meeting & Exposition of Controlled Release Society 2013.7.21-24 Hawaii (USA)

〔図書〕(計 1 件)

日本薬剤学出版委員会編集、内田享弘、吉田都分担執筆

薬剤学実験法必携マニュアル 物理薬剤学, 南江堂 (2014)

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・准教授

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

樫川舞 (HAZEKAW Mai)

福岡大学・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・助教

研究者番号: 10550741