

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590226

研究課題名(和文) 培養味蕾細胞と膜電位感受性色素を組み合わせたハイブリッド型味覚センサの開発

研究課題名(英文) Development of hybrid taste sensor system combined culture of taste bud with voltage sensitive dye

研究代表者

内田 享弘 (UCHIDA, Takahiro)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：70203536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：モデル薬剤のキニーネ、マクロライド系薬剤、フルボキサミンについて、発生した膜電位発生のプロファイルのパターン化についての基礎的検討を行うことを目的として一連の検討を行った。膜電位感受性色素入り培地に培養味蕾細胞を播種後、キニーネ等のアルカロイド、マクロライド系薬剤、抗精神薬など、多種類の構造が異なる基質を添加し、発生した膜電位を蛍光色素により定量化した。実験データについては、複数の薬物群ごとに、データベース化するとともに、膜電位変化と蛍光強度により膜電位変化を詳細に解析し、分子量、塩基性・酸性度に基づいて、変化パターン(増強パターン、減衰パターン)をグループ化できた。

研究成果の概要(英文)：Cultured taste cell system was developed to evaluate membrane potential-time profile caused by treatment of typical bitterness substance, quinine as an alkaloid, macrolides, and Fluvoxamine. The membrane potential time profiles were monitored for above model substances and its profile was classified. The pattern seemed to be clarified by molecular weight, acidity, and lipophilicity for the targeted substance. The duration of membrane potential suggest after -bitterness of the drug.

研究分野：医療系薬学

キーワード：味蕾細胞 キニーネ マクロライド パターン分析

1. 研究開始当初の背景

苦味のある医薬品や製剤を長期服用することは、患者にとって苦痛であり、特に、医薬品を服用する必要性が理解できない小児では、苦味がノンコンプライアンスを引き起こす原因ともなりうる。従来から行われてきた、パネラーと呼ばれる熟練者による医薬品の苦味の官能試験では、個人差や体調などにより再現性や客観性を得ることが困難である。また、安全性の確認されていない新規化合物の官能試験にはリスクが伴うことも事実である。

そこで我々は、このような問題を克服し、医薬品の苦味を客観的に評価するため、脂質膜より構成されるマルチチャンネル型味覚センサを用いて各種医薬品やアミノ酸の苦味強度の推定や、甘味料や苦味マスキング剤による苦味抑制効果の評価など、様々な苦味の定量化を行ってきた。しかしながら、カフェインのように医薬品の中には化合物自体が電荷をもたない薬剤も多く、このような化合物は従来の脂質膜を利用した味覚センサ系では評価が不可能であった。すなわち、味蕾細胞と化合物との間に生じる膜電位の強さを評価できる味覚センサの開発が望まれているが、実用化された例はなかった。

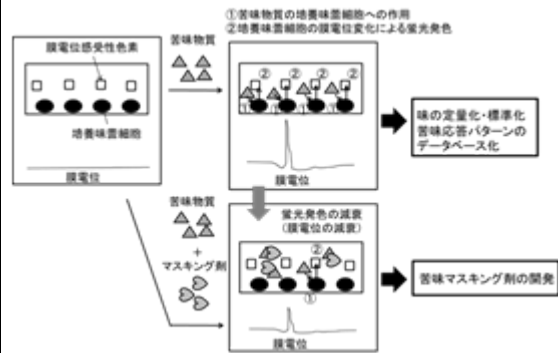
2. 研究の目的

本研究の目的は、培養味蕾細胞と膜電位感受性色素共存下で、培養細胞と薬物などの化学物質の間の相互作用により生じる膜電位を、定量的に評価し、従来の脂質膜センサでは評価できなかった味蕾細胞での興奮を定量化できるハイブリッド型の味覚センサシステムを開発することであった。本システムでは、外部から各種味物質を添加した場合の、膜電位の変化を定量的に評価することで、高感度、高選択性に医薬品の苦味評価や苦味抑制剤のスクリーニングが可能になることが期待される。培養味蕾細胞は、一つの化合物に対して単一の膜電位パターンを発生することが期待できる。

本研究では、味蕾細胞に苦味薬物などの化合物を添加した場合の、味蕾細胞と化合物の結合により発生する膜電位を、膜電位感受性色素により定量的に評価し、時間依存的な電位変化を捉え、その結果について多角的に解析し、データベース化することを目的とした。また、苦味マスキング剤による苦味抑制効果についても、膜電位感受性色素により定量的に評価しうることから、新規苦味マスキング剤のスクリーニング手段としての活用が期待できる。

始めに、味蕾細胞を培養し、膜電位を評価する最適条件を確立することを目的とし、次に、膜電位感受性色素存在培地中の培養細胞に各種苦味物質を添加し、膜電位感受性色素

の傾向発色を定量的なこととした。その後、味蕾細胞評価系で生じた膜電位強度を定量的に医薬品の苦味強度を相関させるシステムを構築し、化合物に対応する膜電位パターンのデータベース化を行うこととした。



味覚センサの概念図

3. 研究の方法

始めに、味蕾細胞を培養する技術の確立と、細胞の経時的な活性評価を行った。実験条件の確立については、味蕾細胞の活性の保持が実験の前提条件となる。すなわち、味蕾細胞をプレートに播種した時点から、細胞活性が95%保持される時間を確認し、本評価システムの実験継続時間とした。また、細胞保持のための成分の添加と、その成分の膜電位への影響の有無などを事前に確認し、実験条件を決定した。

各種味蕾細胞を膜電位感受性色素入りの培地プレートに播種後、代表的苦味物質であるキニーネ（いずれも0.1mM~3.0mM）を基質として添加し、発生した膜電位を蛍光色素により定量化した。膜電位を測定して膜電位感受性色素により得られた蛍光強度と乖離がないか確認した。

次に、膜電位感受性色素入り培地に培養味蕾細胞を播種後、マクロライド系薬剤、フルボキサミン、酸性薬剤(非ステロイド性抗炎症薬)(いずれも0.1mM~3.0mM)について、発生した膜電位発生のプロファイルのパターン化について一連の検討を行った。キニーネ、マクロライド系薬剤、抗精神薬溶液、非ステロイド性抗炎症薬の基質として添加し、発生した膜電位を蛍光色素により定量化した。発生した膜電位のプロファイルについて薬物ごとに、パターンを解析したが、膜電位変化と蛍光強度により膜電位変化を詳細に解析し、薬剤の分子量、塩基性・酸性度の強度と、変化パターン(増強パターン、減衰パターン)についての相関性を検討した。

4. 研究成果

味蕾細胞の活性の保持を考慮し、細胞活性が95%保持される時間、すなわち膜電位感受性色素入り培地に培養味蕾細胞を播種直後から90分以内の評価を実施した。

使用薬剤の分子量、塩基性・酸性度に基づいて、膜電位の変化パターン(増強パターン、減衰パターン)をグループ化することができた。とくに塩基性薬剤キニーネ、マクロライド系薬剤、フルボキサミンと酸性薬剤(非ステロイド性抗炎症薬)の時間的変化パターンに大きな差異が認められた。また塩基性薬剤群においても、キニーネ、マクロライド系薬剤、フルボキサミンでは増強、減衰の強度、持続時間が異なっており、パターン化を識別することが可能であった。

さらに必要最小限のヒト官能試験を実施し、それらと最も相関する味細胞系データベースを構築中である。さらに実験データについては、複数の薬物群ごとに、データベース化するとともに、膜電位変化に加えて蛍光強度変化も詳細に解析した。とくにキニーネ、マクロライド系薬剤のクラリスロマイシンにおいては膜電位変化、蛍光強度増強が初期から認められ、比較的強い蛍光強度が確認できた。一方、フルボキサミンについては、経時的に蛍光強度の増強が認められたが、持続時間は、キニーネやクラリスロマイシンに比較すると短かった。この事実は、キニーネ、クラリスロマイシン後味の苦味の強さがフルボキサミンのそれより大きい可能性を示唆する一つの実験結果と考えられる。非ステロイド性抗炎症薬においては、キニーネ、クラリスロマイシン、フルボキサミンの膜電位、蛍光強度より優位に低く、酸性医薬品は塩基性医薬品に比較して苦味強度が低い可能性が示唆された。解析の結果、分子量や疎水性、ならびに塩基性の強さが医薬品の苦味強度の違いの要因になっていると結論づけられた。

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4件)

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

M. Yoshida, M. Hazekawa, T. Haraguchi, T. Uchida, Evaluation of the palatability in 10 different famotidine orally disintegrating tablets by combination of disintegration device and taste sensor

Drug. Dev. Ind. Pharm. 査読有, Sep 8, 1-6, 2014.

T. Haraguchi, M. Yoshida, T. Uchida, Evaluation of ebastine-loaded orally disintegrating tablets using new apparatus of detecting disintegration time and e-tongue system., J. Drug Del. Sci. Tech. 査読有, 24, 684-688, 2014.

T. Uchida, M. Yoshida, M. Hazekawa, T. Haraguchi, H. Furuno, M. Teraoka, H. Ikezaki, 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., J. Pharm. Pharmacol. 査読有, 65, 1312-1320, 2013.

[学会発表](計1件)

T. Uchida, Screening of refreshments which suppress the bitterness of rebamipide contained in Mucosta ophthalmic suspension UD2% using taste sensor. AAPS annual meeting, 2013.11.10-14, San Antonio (USA)

[図書](計1件)

T. Uchida, M. Yoshida, Biochemical Sensors: Mimicking Gustatory and Olfactory Senses, Quantitative evaluation of bitterness of medicines. PAN STANFORD PUBLISHING, 40, 2013

[その他]

ホームページ等

臨床製剤学研究室ホームページ

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~rseizai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(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・助教

研究者番号：10550741