

神経細胞を用いた新規苦味評価系構築に関する研究

秋好健志

慶應義塾大学 薬学部 臨床薬学講座
〒105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30

DEVELOPMENT OF NOVEL EVALUATION SYSTEM FOR BITTER-TASTE USING CULTURED NEURONAL CELLS

Takeshi Akiyoshi

Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Keio University
1-5-30, Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

Abstract

As the proverb "A good medicine tastes bitter" becomes nominal now, for drug development in the 21st century, there is a growing need for development of medicine that can be taken easily and hence improves the quality of life in patients. The bitterness of the medicine is uncomfortable to the patient, which sometimes leads to non-compliance that results in reduced benefit of the drug treatment. Even though various bitterness-masking techniques have been designed, there have been few attempts to quantify the bitterness of the drug substance and to evaluate the bitterness-masking techniques that are useful for a theoretical design of taste-masking formulations. The gustatory sensation test by the expert who is called a panelist, has been the method used for evaluation of bitterness for the medicines or formulations, and is still the most common method. However, it is difficult to obtain reproducible and objective results due to panelist's individual difference and the physical condition, etc., and also safety and ethical issues needs to be considered as the test medicines sometimes have strong toxicity. Therefore, the establishment of a simple and reliable technique to evaluate the intensity of bitterness quantitatively using an objective standard has been strongly expected.

Taste buds (left) are composed of 50–150 Taste Receptor Cells -TRCs (depending on the species), distributed across different papillae. Circumvallate papillae are found at the very back of the tongue and contain hundreds (mice) to thousands (human) of taste buds. Foliate papillae are present at the posterior lateral edge of the tongue and contain a dozen to hundreds of taste buds. Fungiform papillae contain one or a few taste buds and are found in the anterior two-thirds of the tongue. TRCs project microvillae to the apical surface of the taste bud, where they form the 'taste pore'; this is the site of interaction with tastants. b, Recent molecular and functional data have revealed that, contrary to popular belief, there is no tongue 'map': responsiveness to the five basic modalities — bitter, sour, sweet, salty and umami — is present in all areas of the tongue.

Taste signals are first detected by the taste receptor cells (TRCs), which are located in taste buds existing in the tongue, soft palate, larynx and epiglottis. Taste receptor cells contact with the chemical compounds in oral cavity through the apical processes which protrude into the taste pore. Interaction between chemical compounds and the taste receptor produces activation of taste receptor cells directly or indirectly. Then the signals are transmitted to gustatory nerve fibers and higher order neurons.

Bitter taste is important to detect harmful compounds such as plant alkaloids. To elucidate these sensations, chemical compounds in foods and drinks are first monitored by taste receptor cells in the oral cavity. Bitter taste is mediated by a family of ~30 highly divergent GPCRs (the T2Rs). T2R

genes are selectively expressed in subsets of TRCs distinct from those containing sweet and umami receptors, and are clustered in regions of the genome genetically linked to bitter taste in humans and mice. A large number of T2Rs have been shown to function as bitter taste receptors in heterologous expression assays, and several have distinctive polymorphisms that are associated with significant variations in sensitivity to selective bitter tastants in mice, chimpanzees and humans.

A taste sensor was developed as a taste-measuring device, which imitates the mechanism of taste perception systems in human. The taste sensor consists of three parts; the electrode part consisting of the reference electrode and the artificial lipid/polymer film sensor which imitates lipid bilayer membranes, the robot arm, and the computer for data analysis. When the electrode part is soaked in the sample solution, the lipid membrane potential is changed by the electrostatic interaction of the lipid film with the medicine that is measured, and/or by the adsorption of the medicine to the surface of the lipid film. The difference between the electric potential of the each working electrode and the reference electrode becomes the output, and these signals are sent to the computer through the robot arm as the “taste information”. The taste sensor can install maximum number of 8 sensor electrodes and the electrodes are selected according to the sample that is measured. Human receives various taste stimuli via various receptors in the taste cell located in the taste bud. The sensor imitating the mechanism of human taste perception systems is also able to recognize and identify various taste from the various sensor response pattern received using various types of sensor electrodes with different lipid membrane composition.

In the present study, I aim to construct the highly accurate, new evaluation system for bitterness that was able to reflect a basic process of such a taste response, and to take the place of a human gustatory sensation test.

In Chapter 1, the purpose of this study was to quantify the degree of suppression of the perceived bitterness of quinine by various substances, including, Sucrose, aspartam phosphatidic acid (BMI-40) and to examine the mechanism of bitterness suppression. This mechanism was examined in a gustatory sensation test in human volunteers, a binding assay, and using an artificial taste sensor. In this examination, I adopted the taste sensor as an alternative of a human gustatory sensation test and proposed the method of evaluating the bitterness depression effect of the quinine by the BMI-40, bitterness-receptor antagonist, by using the decrease in the sensor output value.

Next, in chapters 2 and 3, we seek the new indicator which can show the momentary-excited changes and the signal transduction mechanisms in TRCs. We considered the following alternative methods. In Chapter 2, I focused intracellular calcium level on cultured neuronal cell line (Neuro-2a cells), as predictive indicator for bitterness-response. In the present study, we examined the effect of quinine on $[Ca^{2+}]_i$ levels in mouse neuroblastoma neuro-2a cells using fluorescence imaging. The usage of the neuro-2a has been reported in several articles which examined calcium regulation or signaling mechanism. We examined the possibility of $[Ca^{2+}]_i$ levels in neuro-2a as a quick and sensitive conventional physiological method for the evaluation of bitterness.

In chapter 2, we found that there are some voltage-dependent calcium channels which become depolarized with bitter taste stimuli. Therefore, the important thing might be an increase of the intracellular calcium level induced by the IP_3 -dependent cascade. It is necessary to clarify the relationship between these responses.

In Chapter 3, I focused, furthermore, on the membrane potential in which the excitement of the cell. Moreover, In the present study, we used the membrane potential-sensitive probe bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol [DiBAC₄(3)] and Calcium Green 1/AM to examine the effects of quinine on the membrane potential and the $[Ca^{2+}]_i$ levels in pheochromocytoma PC 12 cultures, which at the present time are now commonly being used in neuroscience research. We also examined the possibility of applying the present findings for the development of a bitter taste evaluation system.

The indicator in this study targeted the increasing intracellular calcium and the depolarization playing the most important role of them. These are the reflections of the excitement-release coupling of the bitterness response. And, as for the culture cell which we used for this study, it was possible for quantitative evaluation in the response. Therefore, as the responses using the cultured cell was suggested that a similar responses and transductions to the bitterness response is evaluated handily.

緒言

経口薬剤の苦味は患者にとって苦痛であり、時にノンコンプライアンスを引き起こし薬物治療の効果を大きく損なうため、製薬企業は種々の苦味マスキング手法に関する研究を行ってきた。理論的な苦味マスキング設計には薬物の苦味や苦味抑制効果を定量的に評価する方法が必要となる。苦味の評価はパネラーによる官能試験に頼ることが多い。しかし官能試験では再現性や客観性を得ることも困難であり、さらに毒性の強い医薬品の場合、安全性や倫理的な問題がある。このような観点から苦味を客観的かつ簡便に測定できる手法の確立が望まれてきた。

元来、味を知覚する味蕾は味細胞が蕾状に集まった構造をしており、呈味溶液が味細胞に接触すると脱分極性の電位変化が生じ神経伝達物質が放出され¹⁾、味神経に活動電位が発生し味覚野に伝達され、認識される。

本博士論文では、この味応答の基本的なプロセスを把握でき、ヒト官能試験に代わる高精度な新規苦味評価系の構築を最終目標とし以下の検討を行った。

第1章では、ヒト官能試験に代替できる方法として、味センサに着目した²⁾。味センサは、生体の脂質二分子膜を模した人工の脂質膜センサ電極からなり、測定物質と脂質膜との化学結合や静電相互作用、物理的吸着などにより脂質膜電位が変化し、参照電極とセンサ電極間の電位差がセンサ出力値となる。本検討では、苦味受容体遮断薬であるフォスファチジン酸 (BMI-40) の添加によるキニーネ溶液の苦味抑制効果をセンサ出力の低下を指標に評価する方法を提案した。

第2章では、味細胞での味応答の基本的なプロセスの詳細を把握できる生化学的で客観的評価を得るため、味細胞内のセカンドメッセンジャーである細胞内カルシウムに着目し、これを指標とし培養細胞を味細胞モデルとして用いた生化学的な苦味評価系の構築を試みた。

第3章では、さらに、新しい苦味評価の指標として、第2章での細胞内カルシウム(以下 $[Ca^{2+}]_i$)に加えて、細胞の興奮を表す細胞膜電位に着目した。また苦味特異性に言及し、これらを指標とした培養細胞の新規苦味評価系への応用の可能性について検討した。

第1章

苦味物質キニーネに対する苦味抑制物質の影響

苦味を抑制する物質として甘味料スクロース、人工甘味料アスパルテーム、NaCl、収斂剤タンニン酸 Tannic acid(TA)、市販の苦味抑制剤 Phosphatidic acid (PA) をキニーネ溶液に添加し、その苦味抑制効果を等価濃度試験法によるヒト官能試験(以下官能試験)で評価した。

さらに、苦味抑制機序について添加後の混合溶液中の吸着量を定量し、検証した。

また、ヒト官能試験に代替できる方法として味センサを用い、苦味抑制効果をセンサ出力の低下を指標に評価した。

第1節 ヒト等価濃度試験法

5段階の各濃度 (0.01, 0.03, 0.10, 0.30, 1.0 mM) の苦味の標準サンプル塩酸キニーネ溶液(以下キニーネ)について官能試験を行い、その苦味強度と対応するスコア (0, 1, 2, 3, 4)を記憶させ、苦味抑制剤を含む未知試料のスコア (官能値) 化を行わせた。

【結果】

各種苦味抑制剤はキニーネの官能値を改善し、特に PA は 0.1%(w/v)以上でキニーネ苦味強度 2.03 から 0.37 まで低下させた。(苦味強度:82%抑制)

一方、TA は 0.05%(w/v)添加で約 60%の苦味抑制効果を示したが、添加濃度が 0.05%(w/v)以上になると、逆に苦味や渋味は急激に増加し、その効果は限定的であった。(Fig.1A, B 共に左軸)

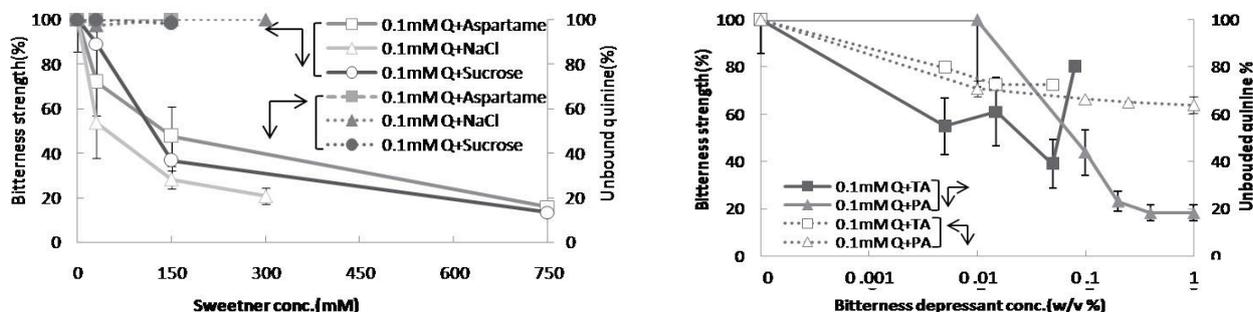


Fig.1. The Relationship between the Added Concentrations of (A) Sucrose, Aspartame, and NaCl, and (B) Phosphatidic Acid and Tannic Acid, and the Bitterness Strength Expressed as Equivalent Quinine Concentrations (Left Axis, Continuous Lines), or Unbound Ratios (%) of Quinine (Right Axis, Dotted Lines) The equivalent quinine concentrations are derived from human gustatory sensation data, while the unbound quinine ratios are derived from the binding study.

第2節 苦味抑制剤の吸着評価

キニーネを吸着することによる苦味抑制効果を評価するため PA、TA を各種濃度で混合・攪拌した試料について限外濾過を行い、得られたキニーネの未吸着率を示した。

【結果】

Sucrose、Aspartame、NaCl はキニーネとは結合せず、ほぼ非吸着分画として得られた。(Fig.1a 右軸)これは、これらの物質が親水性であり、キニーネ分子に吸着しなかったためと推測される。一方、1.0%PA は 36.1%、0.05%TA は 28%の吸着作用が認められた。(Fig.1B 右軸)

前節の結果と合わせると、1%PA が示す約 80%の苦味抑制効果は、キニーネへの吸着率が約 36.1%、苦味受容体の障害作用が 45.6%で、合計 81.7%の抑制作用を示しているとし唆される。(Fig.2)

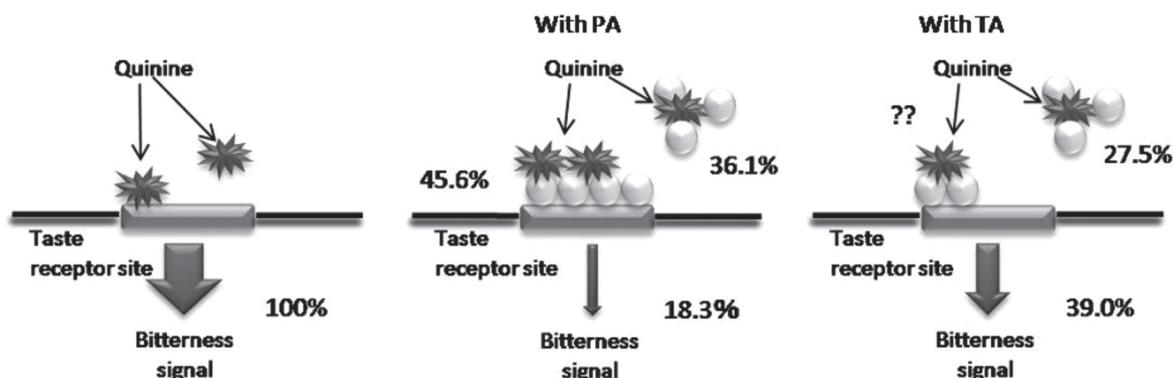


Fig. 2. Proposed Mechanism of Bitterness Suppression by Phosphatidic Acid (PA) and Tannic Acid (TA) in Human

また、0.05%TA が示す約 61%の苦味抑制効果のうち 28%はキニーネへの吸着作用であるとし唆されたが、0.15%で官能値を悪化させた。このことから苦味受容体への作用は限定的である可能性が示唆された。

第3節 味センサ値を指標とした苦味抑制評価 (Fig.3)

苦味抑制効果をセンサ出力の低下を指標に、1節の官能試験結果と比較検討した。なお、センサ出力値として苦味物質の後味に相当し、他の味に応答しない苦味物質特異的な CPA 値を用いた。(Chart.1)

Chart 1. Measuring Procedure in This Study

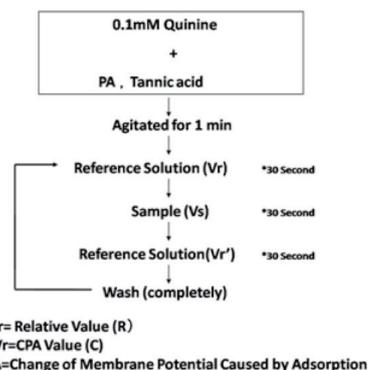
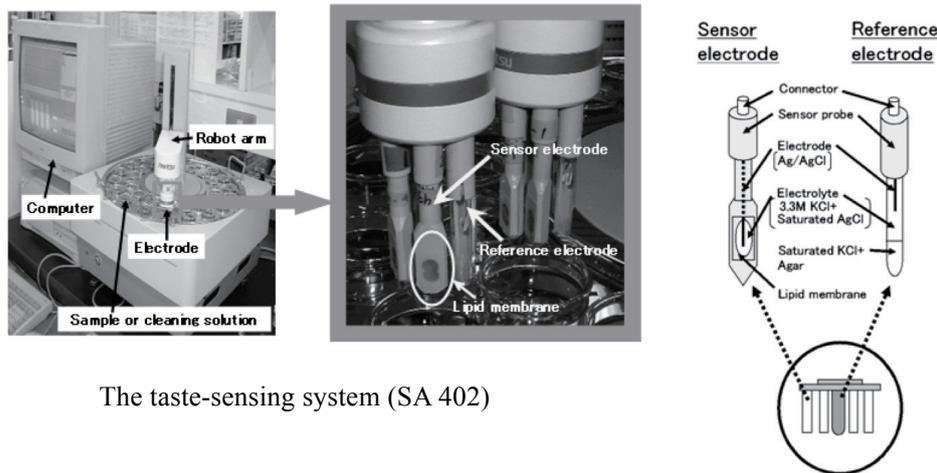


Fig. 3 The taste-sensing system (SA 402) and Structure of electrode.



The taste-sensing system (SA 402)

【結果】

Sucrose と Aspartame は官能値を改善するにもかかわらずセンサ測定値(CPA 値)は減少せず、センサ膜への吸着は認められなかった。このことより甘味料による苦味抑制効果を味センサでは評価できないことが明らかとなった。また、NaCl は CPA 値を 80%まで減少させたことより、NaCl による苦味抑制効果をセンサで評価できる可能性が示唆された。

苦味受容体遮断薬である PA は、官能値と同様の CPA 値の低下を示し、苦味抑制効果の定量的指標になる可能性が示唆された。

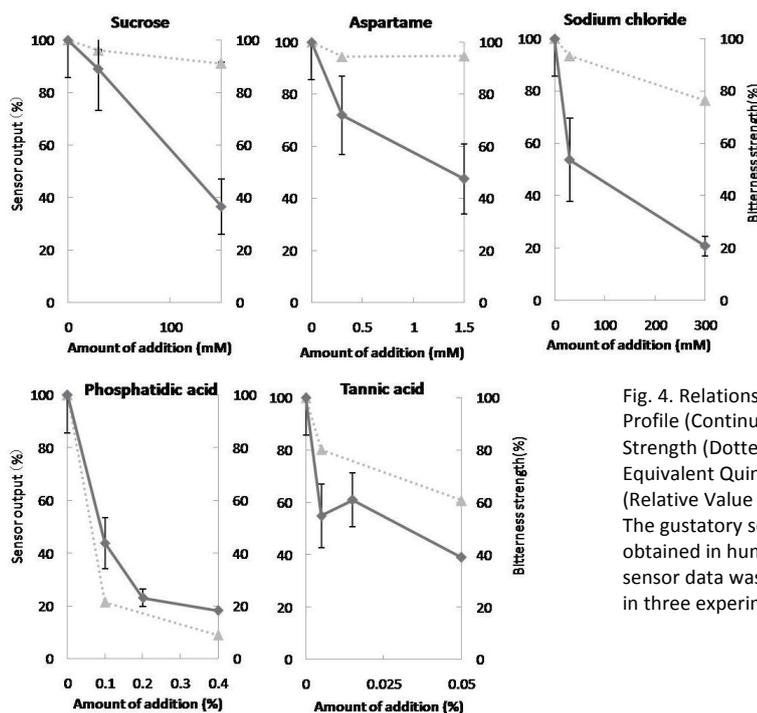


Fig. 4. Relationship between Sensory CPA Profile (Continuous Lines) and Bitterness Strength (Dotted Lines) Expressed as the Equivalent Quinine Concentration (Relative Value %)
The gustatory sensation data was obtained in human volunteers ($n=11$). The sensor data was the mean value obtained in three experiments.

【第1章 総括】

官能試験結果および吸着試験結果より Sucrose、Aspartame、NaCl はキニーネと吸着せず、その抑制効果は甘味受容体刺激や Na チャネルを介した効果であると推測された。

一方、PA は最も効果的な苦味抑制効果を示したが、その苦味抑制効果は、キニーネへの吸着率が約 36.1%、苦味受容体の阻害作用が 45.6%で、合計 81.7%の抑制作用を示していると示唆された。(Fig.2)

また、0.05%TA が示す約 61%の苦味抑制効果のうち 28%はキニーネへの吸着作用であると示唆されたが、0.15%で逆に官能値を悪化させたことから、苦味受容体への作用は限定的である可能性が示唆された。

さらに、味センサを用いて、苦味抑制効果を評価できるか否か検討した結果、PA についてのみ官能試験結果と類似するセンサ出力値を得ることができた。

よって、PA が苦味受容体に結合し競合拮抗すると仮定した場合、味センサ膜が苦味受容体膜に類似している可能性が示唆されるものの、苦味受容機構を詳細に把握できるより生化学的な評価系の構築が必要であると考えられる。

第2章

培養細胞 Neuro-2a の細胞内カルシウムレベルに対するキニーネの作用

本章では、ヒト官能試験に代わり、味応答の基本的なプロセスを把握できる生化学的な苦味評価系の構築を目標とした。

苦味物質により味細胞は興奮(脱分極)し、様々なセカンドメッセンジャーを介して、神経伝達物質を放出し、味神経の興奮を引き起こす¹⁾。そこで、本検討では新しい苦味評価の指標として、セカンドメッセンジャーの一つである細胞内カルシウム(以下 $[Ca^{2+}]_i$)に着目した。

一方、Kumazawa らは、培養神経細胞(N18)における電位変化をパッチクランプ法を用い苦味刺激との比較を行っている⁴⁾。その電位変化は苦味物質の閾値(ヒトが苦味を感じ始める)濃度と良好な相関が認められているが、手技が困難で、簡便性が求められる苦味評価には用い難い。しかし、この報告での培養細胞の利用は、様々な研究に汎用される手法である。そこで、新規苦味評価系として、 $[Ca^{2+}]_i$ レベルを指標とした培養細胞の応用の可能性について検討した。

【実験方法】

$[Ca^{2+}]_i$ レベルの測定実験

実験にはマウス脳神経細胞腫(以下 Neuro-2a)を用いた。標本に蛍光 calcium 指示薬 calcium green-1-AM を負荷し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて $[Ca^{2+}]_i$ レベルの変化を測定した⁵⁾。

本検討に用いた培養細胞 Neuro-2a は神経細胞であることから、味細胞に近い受容、興奮、伝達を行う機構を有しており、培養細胞としても確立(汎用)されている。

【第2章 結果・考察】

Neuro-2a の $[Ca^{2+}]_i$ レベルが苦味強度を予測する指標となるか検討した。

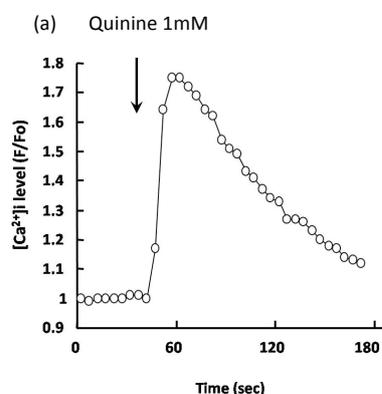
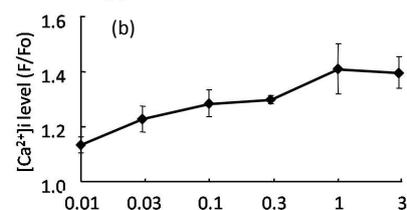


Fig. 5 Effect of 1 mmol/l Quinine on $[Ca^{2+}]_i$ Levels in Neuro-2a Cells
In graphs, the y-axis shows $[Ca^{2+}]_i$ levels (F/F_0).
 $[Ca^{2+}]_i$ levels in neuro-2a cells exposed to quinine (measured at 5-s intervals).

第1節 $[Ca^{2+}]_i$ レベルに対するキニーネの影響

キニーネは Neuro-2a の $[Ca^{2+}]_i$ レベルを濃度依存的に上昇させた(Fig.5(a)(b))。よって、キニーネによる $[Ca^{2+}]_i$ レベル変化は十分に測定可能であり、有用な指標となることが示唆された。

さらに、この上昇は伝達物質の遊離に直結する反応であると考えられ味細胞から味神経への応答の指標となるものであり、重要な苦味のシグナルであることが示唆された。



(b) Quinine concentration-response curve. Data are the mean of 8–12 measurements \pm S.E.M.

第2節 キニーネによる $[Ca^{2+}]_i$ レベル上昇機序に関する検討

苦味物質に応答を示すことが報告されているカエルにおいて、その細胞外 Ca^{2+} の存在が苦味応答の持続、増強に関与している⁶⁾。また、マッドパピー(両生類)における苦味応答に PLC/IP₃ 産生系の関与も報告されている⁷⁾。

そこで Neuro-2a における $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇機序について検討を行った。

キニーネによる Neuro-2a の $[Ca^{2+}]_i$ レベル上昇は、 Ca^{2+} free 及び細胞内 Ca^{2+} store 枯渇薬 thapsigargin で共に抑制された(Fig.6)。さらに、L 型電位依存性 Ca^{2+} Channel 阻害薬 nifedipine と N 型電位依存性 Ca^{2+} Channel 阻害薬 ω -conotoxin を用いた結果、nifedipine では抑制されず、 ω -conotoxin で有意に抑制された。また PLC 阻害薬 U-73122 を用いた結果、有意に抑制された(Fig.6)。以上より、Neuro-2a は N 型電位依存性 Ca^{2+} Channel を介した細胞外 Ca^{2+} の流入と PLC/IP₃ 産生系を介した Ca^{2+} store からの放出を同時に起こす機序を有することが示唆された。

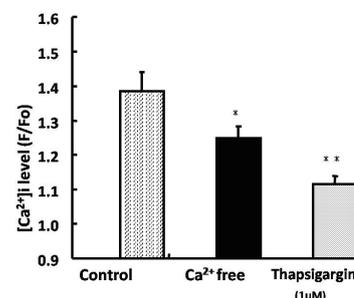
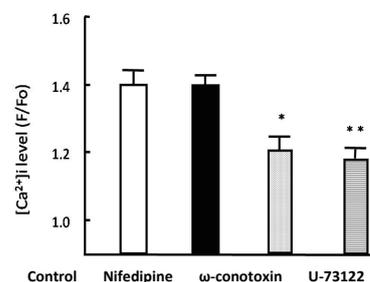


Fig. 6a. Effects of Calcium-Free Medium and 1 μ mol/l Thapsigargin on the Increase in $[Ca^{2+}]_i$ Levels Induced by 1 mmol/l Quinine in Neuro-2a Cells

Cells were incubated with Ca^{2+} -free medium and thapsigargin for 15 min prior to addition of quinine. Data are the mean of 8–12 measurements \pm S.E.M. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with control (h).

Fig. 6b. Effects of 10mmol/l Nifedipine , 1mmol/l w-Conotoxin and 10mmol/l U73122 on the Increase in $[Ca^{2+}]_i$ Levels Induced by 1 mmol/l Quinine in Neuro-2a Cells

Data are the mean of 8–12 measurements \pm S.E.M. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with control (h).



第3節 ヒト官能試験と Neuro-2a $[Ca^{2+}]_i$ レベルの関係

キニーネの官能試験と Fig.7 に示す Neuro-2a の $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇の間には相関係数 0.918 の有意な相関が認められた。

【第2章 総括】

キニーネは Neuro-2a の $[Ca^{2+}]_i$ レベルを有意に変化させ、その反応は十分に測定可能であり、さらにキニーネ官能値と良好な相関を示した。また、Neuro-2a はカエルまたはマッドパピーの苦味応答に関与する $[Ca^{2+}]_i$ レベル上昇機序をともに有することが示唆された。

よって Neuro-2a の興奮は苦味評価系の指標細胞として有用である可能性が示唆された。

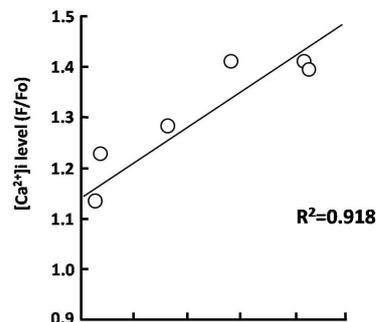


Fig. 7. Correlation between the Quinine Induced $[Ca^{2+}]_i$ Levels ($n=4-8$) in Neuro-2a Cells and Human Bitter Taste Responses ($n=9$)

For statistical analysis, we used URL addressed as follows:

第3章

培養細胞 PC12 の細胞内カルシウム及び細胞膜電位に対するキニーネの作用

味細胞は苦味物質によって興奮(脱分極)することで、セカンドメッセンジャーを介して、神経伝達物質を放出する¹⁾。そこで、本章では、第2章で有用性が示唆された細胞内カルシウムと細胞の興奮を直接表す細胞膜電位に着目した。さらに、より高精度に苦味応答を把握し、苦味受容機序を反映するため、本指標の苦味特異性についても検討した。

【実験方法】

1) 膜電位変化測定実験

実験にはラット副腎髄質褐色細胞腫(以下 PC12)と、カエル単離味蕾組織スライス標本を用いた。標本に膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)(1μM)を負荷し、第2章同様共焦点レーザー顕微鏡にて評価した。

2) [Ca²⁺]_i レベルの測定実験

第2章に準ずる。

【第3章 結果・考察】

I カエル味蕾組織に対するキニーネの作用

本研究に用いた方法で、細胞膜電位変化及び[Ca²⁺]_i レベル変化が検知できるか、実験的指標になるかを目的とした。

一般にキニーネは味細胞受容膜を脱分極させ、電位依存性 Ca²⁺Channel を活性化させ、細胞外 Ca²⁺の流入を引き起こし、味細胞から伝達物質が味神経線維末端に向かって放出させる⁵⁾ (Fig.8)。

そこで、実際に苦味刺激が細胞膜電位及び[Ca²⁺]_i レベルに影響を及ぼすか、苦味に敏感なカエル味蕾組織を用いて検討した。

1) カエル味蕾細胞の膜電位におけるキニーネの作用

カエル味蕾においてキニーネは著しく細胞膜を脱分極させた(Fig.9 (a)Control)。

次に、この脱分極に対する細胞内、外 Ca²⁺の影響を検討した結果、脱分極は、Ca²⁺ free により有意に抑制され、細胞内 Ca²⁺ store 枯渇薬 thapsigargin では抑制されなかった(Fig.9(a))。本結果より、カエル味蕾の脱分極に細胞外 Ca²⁺が一部関与していることが示唆された。

そこで、苦味刺激により[Ca²⁺]_i が上昇しているか検討した。

2) カエル味蕾[Ca²⁺]_i レベルにおけるキニーネの作用

カエル味蕾の[Ca²⁺]_i レベルはキニーネ濃度に依存して上昇した(Fig.9(b))。

本結果より、キニーネはカエル味蕾細胞膜を脱分極させ、電位依存性 Ca²⁺Channel を介して細胞外 Ca²⁺の流入を引き起こすことが示唆された。一方、マッドパピーにおける苦味応答に PLC/IP₃ 産生系を介した[Ca²⁺]_i の関与が報告されている⁷⁾。この報告と前項のカエル味蕾の結果から、苦味応答に Ca²⁺ store 由来の Ca²⁺が関与する可能性も推測される。

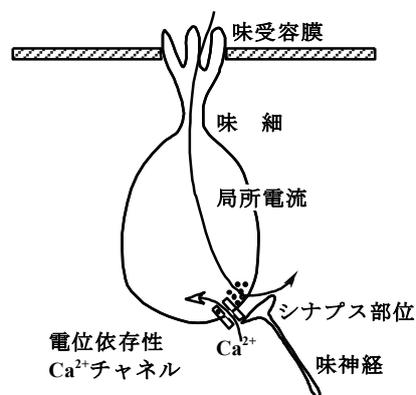


Fig.8 カエル味蕾細胞モデル図

また、本検討で用いた方法は、カエル味蕾の細胞膜電位及び $[Ca^{2+}]_i$ レベルを反応として十分測定でき、カエル味蕾での既報⁶⁾と一致した安定した反応であり技術的信頼性もある。よって、細胞膜電位及び $[Ca^{2+}]_i$ レベルは指標の候補として検討する価値があると示唆された。

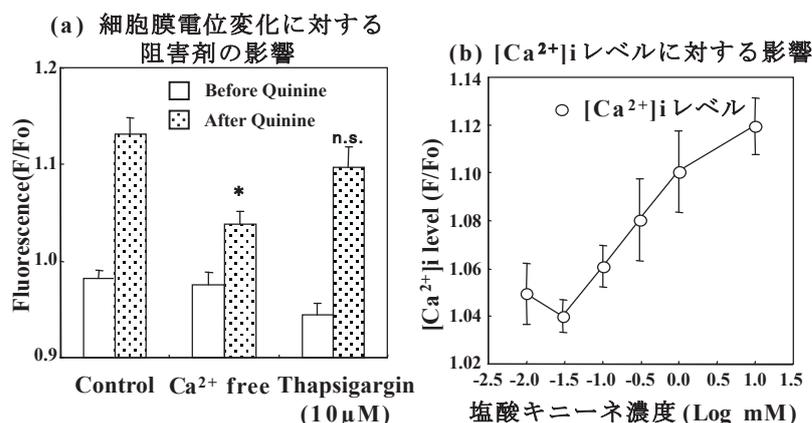


Fig.9 カエル単離味蕾スライス標本に対する塩酸キニーネの影響
Data are mean ± S.E. * p<0.05 vs Control

II 神経細胞に対するキニーネの作用

培養細胞 PC12 は神経細胞であることから、味細胞に近い受容、興奮、伝達を行う機構を有しており、培養細胞としても確立(汎用)されているため、本研究の指標細胞として用いた。また、前項で示唆されたカエル味蕾細胞膜電位変化及び $[Ca^{2+}]_i$ レベル変化が PC12 において有用な指標になるか否かを目的とし検討を行った。

1) 細胞膜電位変化及び $[Ca^{2+}]_i$ レベルに対するキニーネの作用

キニーネ(1mM)は PC12 細胞の膜電位を一過性に脱分極させ(Fig.10(a))さらに、 $[Ca^{2+}]_i$ レベルを濃度依存的に有意に上昇させた(Fig.10(a)(c))。よって、カエル味蕾と同様の変化が PC12 においても認められた。また、上記結果をもとに、カエル味蕾と PC12 の苦味応答の相同性を見出し指標細胞 PC12 の有用性を明らかにする為に、両標本の変化を経時的に比較した。

2) キニーネ作用時の PC12 とカエル味蕾の経時的比較検討

キニーネによる PC12 の脱分極は作用後約 5 秒で、 $[Ca^{2+}]_i$ レベルは約 18 秒で最高レベルに達した(Fig.10(a)(c))。一方、キニーネはカエル味蕾細胞膜を脱分極させ、作用後約 20 秒で最高レベルに達し、 $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇は、約 2 分で最高レベルに達した(Fig.10(b))。これらの結果を経

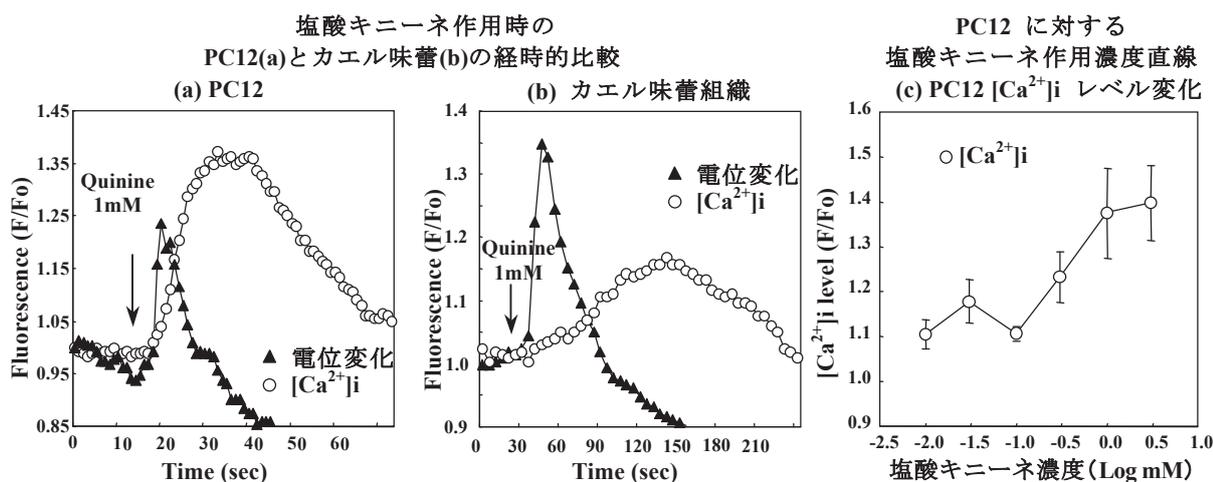


Fig.10 PC12 に対する塩酸キニーネの影響

時的に比較すると、両標本は、初めに脱分極の最高レベルに達し、その後再分極中に $[Ca^{2+}]_i$ レベルが最高値に達することが認められた(Fig10(a),(b))。

よって、キニーネによる PC12 の細胞膜電位変化及び $[Ca^{2+}]_i$ レベル変化は、十分に測定可能であり、PC12 においても有用な指標となることが示された。また、両標本の反応は経時的に類似し

ていた。さらに、細胞膜電位変化及び $[Ca^{2+}]_i$ レベル変化の経時的な二つのずれは興奮遊離関連の細胞内応答を反映し、そのうち $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇は伝達物質の遊離に直結する反応である考えられる。よって、この経時変化は味細胞から味神経への応答の指標となるものであり、重要な苦味のシグナルであることが示唆された。

III 苦味特異性及び薬理的性質に関する検討

これまで示された細胞膜電位変化に続く $[Ca^{2+}]_i$ レベル変化の苦味特異性と、PC12の興奮機序と味細胞の苦味応答発生機序との相同性を明らかにするためさらに検討を行った。

1) ヒト官能試験とPC12 $[Ca^{2+}]_i$ レベルの関係

第2章同様にキニーネの官能試験と Fig.10(c)に示すPC12の $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇の間には相関係数 0.905 の有意な相関が認められた。また、閾値濃度は両結果とも約 0.03mM となった。

2) 苦味抑制剤の影響

苦味抑制剤 BMI-40は、味細胞上にある疎水性の苦味受容体に BMI-40 の疎水基部分が結合しその作用を発揮し、苦味特異的にその味応答を抑制する⁶⁾⁸⁾。よってこの BMI-40⁸⁾を用いて、細胞膜電位変化と $[Ca^{2+}]_i$ レベル変化について検討を行った。

その結果、カエル味蕾およびPC12の細胞膜電位変化は、有意に抑制され(Fig.11(a),(b),(c))、PC12の興奮がより苦味特異的な反応であることが示唆された。

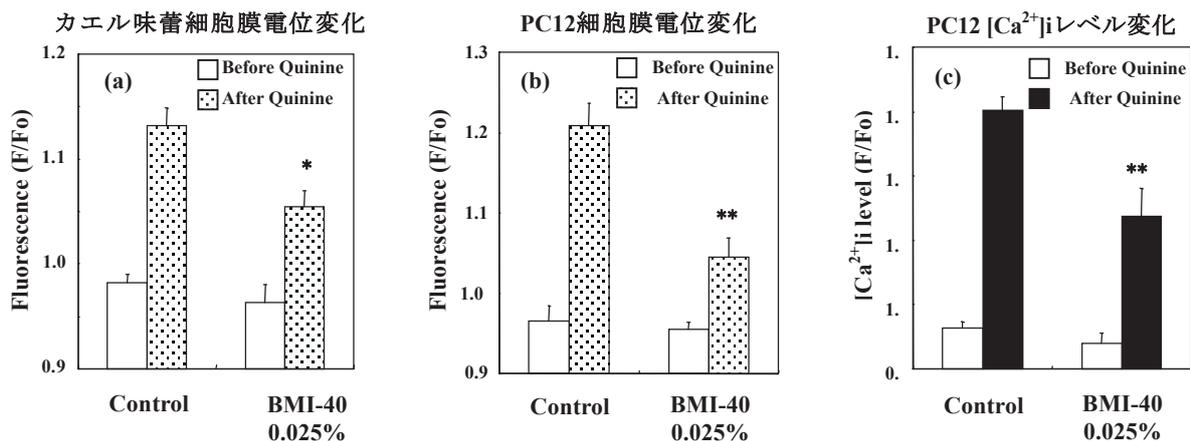


Fig.11 苦味抑制剤(BMI-40)の影響

Data are mean \pm S.E. * p<0.05 vs Control ** p<0.01 vs Control

3) キニーネによるPC12 $[Ca^{2+}]_i$ レベル上昇機序に関する検討

カエルやマッドパピーにおける細胞内外 Ca^{2+} の存在が苦味応答に関与している⁶⁾。併せて、これまでの結果で PC12 がカエル味蕾と類似する応答を起こすことが示唆されている点、結果 II-2)より脱分極後の再分極中に $[Ca^{2+}]_i$ レベルが最高レベルに達することから電位依存性 Ca^{2+} Channel を介した細胞外 Ca^{2+} の流入以外の系による $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇機序が存在する可能性がある点から、PC12での $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇機序について第2章同様に検討した。その結果、 $[Ca^{2+}]_i$ レベル上昇は、L型及びN型電位依存性 Ca^{2+} Channel を介した細胞外 Ca^{2+} の流入と PLC/IP₃ 産生系を介した Ca^{2+} store からの放出を同時に起こす機序を有することが示唆された。(Fig.12(a)(b))

【第3章 総括】

PC12 はヒト官能試験の閾値とほぼ同様の濃度で興奮が起こると考えられた。また、カエル及び PC12 の反応が、BMI-40 により有意に抑制されたことから、PC12 の興奮がより苦味特異的である

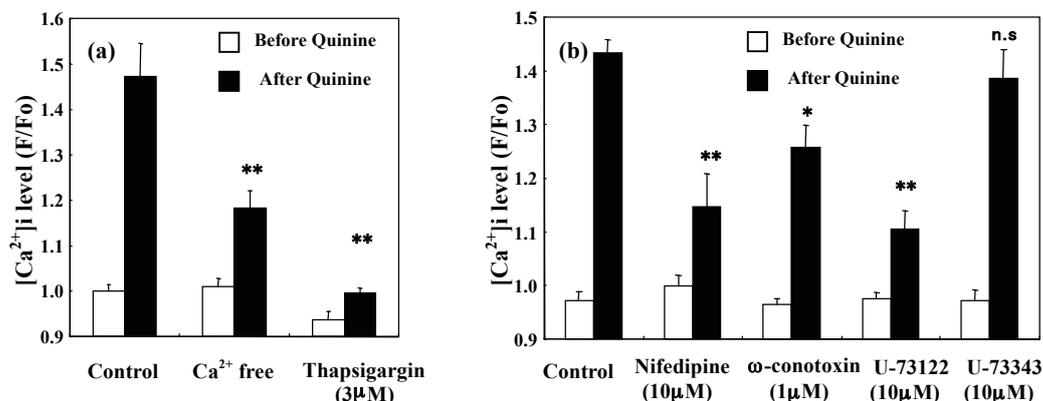


Fig.12 PC12 $[Ca^{2+}]_i$ レベルに対する塩酸キニーネの影響

Data are mean \pm S.E. * p<0.05 vs Control ** p<0.01 vs Control

可能性が示唆された。さらに、PC12 はカエルまたはマッドパピーの苦味応答に関与する $[Ca^{2+}]_i$ レベル上昇機序を共に有することが示唆され、苦味評価系の指標細胞として有用である可能性が示唆された。

総括

1. 苦味抑制剤を指標に、味センサ及び吸着実験を用いることで主観的な官能値に代わる客観的評価の有用性が示唆された。
2. 培養細胞 Neuro-2a の $[Ca^{2+}]_i$ レベルは、キニーネ応答の指標となる可能性が示唆され、培養細胞を用いた簡便な生化学的苦味評価の可能性を示唆した。
3. PC12 における細胞膜電位及び $[Ca^{2+}]_i$ レベルの反応は十分に測定可能であり、苦味特異的である可能性が示唆された。そして、細胞膜電位変化(脱分極)は味細胞の興奮を直接表し、 $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇は、味神経への伝達物質の遊離を起こす興奮遊離連関の最終的な反応であり、苦味評価に有用な指標となる可能性が示唆された。

引用文献

- 1) Nagahama S, Kobatake Y, Kurihara K: *J Gen Physiol.*, **80**,785(1982)
- 2) 内田享弘, ファームテックジャパン,**18**,133-146(2002); 3)
- 3) Nakamura T, Tanigake A, Miyanaga Y, Ogawa T, Akiyoshi T, Matsuyama K, Uchida T; *Chem. Pharm. Bull.* **50** (12) 1589-1593(2002)
- 4) Kumazawa T, Kashiwayanagi M, Kurihara K: *Brain Res*, **333**: 27-33 (1985)
- 5) Shinozuka K, Tanaka N, Kawasaki K, Mizuno H, Kubota Y, Nakamura K, Hashimoto M, Kunitomo M; *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*: 28, 799-803 (2001)
- 6) Kurihara K, Katsuragi Y, Matauoka I, Kashiwayanagi M, Kumazawa T, Shoji T; *Physio.Bihav* **56**. (6). 1125-1132. (1994)
- 7) Ogura T, S C.Kinnamon: *J Neurophysiol.*: **82**(5):2657-66. (1999)
- 8) Katsuragi Y, Yasumasu T, Kurihara K; *Brain Res* **713**: 240-245 (1996)

【謝辞】

本論文をまとめるにあたり、ご懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました福岡大学 薬学部 薬学疾患管理学教室 片岡 泰文 教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、本論文をまとめるにあたり、有益なご助言を賜りました福岡大学 薬学部 臨床疾患薬理学教室 岩崎 克典 教授ならびに、福岡大学病院 薬剤部 薬剤部長ならびに福岡大学 薬学部 実務薬剤学教室 二神 幸次郎 教授、福岡大学 薬学部 薬学疾患管理学教室 首藤 英樹 准教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜り、本論文をまとめるにあたり多大なるご指導を賜りました武庫川女子大学 薬学部 臨床製剤学講座 内田 享弘 教授に心より感謝いたします。

また、本研究に関して終始ご協力を賜り、細胞内カルシウムおよび細胞膜電位測定を行うにあたり数々の有益なご助言、ご指導を賜りました武庫川女子大学 薬学部 薬理学Ⅱ講座 篠塚 和正 教授、九州保健福祉大学 薬学部 薬理学講座 田中 直子 講師、(株)リニカル中村 智子 氏に深く感謝いたします。

また、培養細胞 Neuro-2a/PC12 をご提供いただき、数々のご助言を通してご協力を賜りました武庫川女子大学 薬学部 生化学Ⅰ講座 松野 純男 准教授に深く感謝いたします。

また、味センサ測定およびヒト官能試験を行うにあたり御指導頂きました大塚製薬株式会社 本村陽子博士に深く感謝いたします。

また、数々のご助言を通してご協力を賜りました武庫川女子大学 薬学部 臨床薬学講座 岡村昇 教授に深く感謝いたします。

また、多大なご支援を賜りました慶應義塾大学薬学部 臨床薬学講座 松山 賢治 教授に厚くお礼申し上げます。