

# 抗がん剤誘発性味覚障害に関する基礎的研究

2015 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

大石 晃弘

## 課程博士学位論文 内容の要旨

氏名 (英字名) 大石 晃弘 (Akihiro Ohishi)

学位論文題目 抗がん剤誘発性味覚障害に関する基礎的研究

味覚は、ヒトをはじめとする多くの生物が有する重要な感覚の一つである。味覚は甘味、苦味、うま味、塩味及び酸味の 5 基本味からなると考えられており、それらの味物質は舌の乳頭部位に集積している味蕾において受容される。味蕾は数十個の味細胞により構成されているがそれらは単一の細胞ではなく、形態的及び機能的特徴の異なる I 型から IV 型に分類される。5 基本味はこれら味細胞に発現する味受容体で受容され、味覚神経を介して脳へと伝達される。したがって、味受容から味覚中枢での知覚に至る味受容機構における異常は味覚障害に繋がると考えられる。

味覚障害は亜鉛欠乏や加齢などにより起こるが、薬剤によっても誘発され、なかでも抗がん剤使用患者では半数以上で味覚障害が起こる。ヒトにおいて、食事は単に栄養摂取としてのみならず、食事を通じたコミュニケーション、食物の味を楽しむなど、健康的な生活を送る上で重要な役割を持つため、この副作用の発症は患者 QOL の著しい低下を引き起こす。しかし、抗がん剤誘発性味覚障害は致命的な副作用ではないこと、治療成績に直接的な影響が及ばないことなどから軽視されがちである。そのため、患者の味覚障害の味特異性、薬剤特異性、さらにはその発症機構に関する研究報告は殆どなく、未だ有効な治療・対処法は確立されていないのが現状である。

一般的に、抗がん剤誘発性味覚障害は味細胞の分化・増殖の抑制に起因すると考えられており、それに対し促進的に作用する亜鉛製剤がその対処法として用いられているが、治療成績は不十分であり、患者間で治療効果の差が大きいことが報告されている。このことは、抗がん剤の味細胞を含めた味受容機構への影響が、がん細胞に対する増殖抑制作用機序と同様、薬剤ごとに異なることを示唆すると考えられる。

そこで本研究では、作用機序の異なる 2 種類の抗がん剤を投与したげっ歯類において、行動学的解析に加え、その味受容機構の変化の有無を精査し、それらの味覚感受性への影響について比較検討した。

### オキサリプラチン投与によるラット味覚感受性の変化

白金系抗がん剤であるオキサリプラチンの使用患者において味覚障害が起こることが報告されている。オキサリプラチンを 2 日間連日腹腔内投与 (4 mg/kg/day) したラット有郭乳頭部位における味受容体 T1R1、T1R2、T1R3、T2R107 及び mGluR4 の mRNA 発現量の継日的な変化を調べた結果、オキサリプラチン投与後 7 日目において、甘味受容体サブユニットの一つである T1R2 の発現量が増加していたが、14 日目ではコントロール群とほぼ同等であった。このときのタンパク質発現量を免疫組織染色により評価したところ、オキサリプラチン投与ラットの有郭乳頭における T1R2 の免疫活性は、その投与後 7 日目においてコントロール群の場合より有意に高かったのに対し、14 日目ではコントロール群と同等であった。これらの結果から、オキサリプラチン投与により T1R2 の発現が増大し、この変化は可逆的であることが示された。

次に、オキサリプラチン投与ラットにおける甘味感受性の変化の有無を brief-access test により検討した。本試験では、甘味に対する感受性の変化を鋭敏に感知するために甘味物質 (スクロース) と苦味物質 (キニーネ塩酸塩) の混合溶液を用い、ラットの味溶液を舐める回数 (lick 数) の水のそれに対する比である lick ratio を算出することで評価した。オキサリプラチン投与ラットの混合溶液に対する lick ratio は、投与後 3 及び 7 日目においてコントロール群のそれに比べ有意に小さかったが、14 日目では

はなかった。さらに、苦味感受性変化の有無を明確にするために、キニーネ塩酸塩水溶液のみを用いて **brief-access test** を行ったところ、オキサリプラチン投与ラットの苦味溶液に対する **lick ratio** に変化はなかった。これらの結果から、オキサリプラチンによりラットの甘味感受性が一過性に低下し、それは甘味受容体 **T1R2** の発現変動プロファイルと対応することが示された。

オキサリプラチンによるラットの甘味感受性の低下が、味細胞を含む味蕾の形態への影響に起因するか否かを調べるため、オキサリプラチン投与ラットの有郭乳頭部位を含む切片を **HE** 染色した。オキサリプラチン投与後 3 及び 7 日目において、味蕾の明らかな形態変化は認められなかった。さらに **T1R2** が発現する II 型味細胞、そしてその下流の情報伝達に寄与する III 型味細胞の味蕾あたりの数をそれぞれ味細胞マーカーに対する免疫組織染色により評価した。その結果、オキサリプラチン投与後 3 及び 7 日目において、II 型味細胞マーカーである **PLC-β2** 及び **α-gustducin**、並びに III 型味細胞マーカーである **AADC** 及び **5-HT** 陽性細胞数に変化はなかった。また、血漿及び唾液中亜鉛濃度を測定したところ、コントロール及びオキサリプラチン投与ラット間で差はなかった。

以上のことから、オキサリプラチン投与による甘味感受性の低下は、味細胞数や亜鉛レベルの変動ではなく、少なくとも一部甘味受容体である **T1R2** の発現量の増大に起因することが示された。

#### ボルテゾミブ投与によるマウス味覚感受性の変化

多発性骨髄腫の治療に用いられるボルテゾミブは、プロテアソームを特異的に阻害する分子標的薬の一つであり、味覚障害を誘発することが報告されている。ボルテゾミブを投与したマウスにおいて (1 mg/kg の投与量にて、1、4、8、11、15、18、22 及び 25 日目に皮下投与)、5 基本味の味溶液を用い **brief-access test** を行ったところ、酸味溶液であるクエン酸水溶液に対する **lick ratio** は、投与開始後 16 日目以降でコントロール群の場合と比べ明らかに小さかった。さらに、クエン酸水溶液及び塩酸水溶液を用いて酸味溶液に対するより詳細な **brief-access test** を行った結果、いずれの酸味溶液に対してもボルテゾミブ投与開始後 26 日目における **lick ratio** 及び **IC<sub>50</sub>** 値はコントロール群のそれらに比べ有意に小さかった。一方、これらボルテゾミブ投与マウスにおける酸味感受性は、その投与中止 3 日目以降においてコントロール群とほぼ同じであった。次に、ボルテゾミブによるマウスの味受容機構への影響を調べた。ボルテゾミブ投与マウスの味蕾の形態、酸味受容に関わる III 型味細胞数、酸味受容体である **PKD1L3**、**PKD2L1** 及び **TRPV1** の発現量は、コントロール群の場合と比較して変化はなかった。

これらのことから、ボルテゾミブは、マウスの味受容機構に明らかな変化を引き起こすことなく、酸味に対する味覚障害を誘発するが、それは一過性であり休薬によって速やかに回復することが示された。

本研究の遂行により、①オキサリプラチン投与により有郭乳頭における甘味受容体 **T1R2** の発現量が増大し、甘味感受性が低下すること、②ボルテゾミブの繰り返し投与により酸味感受性が増大すること、並びに③これら 2 種類の抗がん剤投与に起因する味覚障害は共に一過性であり、それらの投与中止により回復することが明らかとなった。これらの結果は、異なった薬理作用を有するオキサリプラチンとボルテゾミブがいずれも一過性の味覚障害を誘発するが、その味覚感受性に対する影響、そしてその発症機構は異なるものであることを示している。したがって、本成績はこれまで味細胞に対する細胞傷害性に起因すると考えられてきた抗がん剤の味覚障害の発症機構に新たな概念を提唱するものであり、その治療・対処法を確立していく上で有益な基礎的情報である。

## 目次

序 論.....	1
第1章 オキサリプラチン投与によるラット味覚感受性の変化.....	4
緒 言.....	4
実験材料及び方法.....	5
1. 試薬.....	5
2. 実験動物.....	5
3. 投与方法.....	5
4. mRNA 検出.....	5
5. 組織染色.....	6
6. Brief access test.....	7
7. 亜鉛及び白金量の測定.....	9
8. 統計学的処理.....	10
実験成績.....	11
1. 体重変化.....	11
2. 有郭乳頭部位における味受容体の発現変化.....	12
3. 甘味感受性の変化.....	14
4. 有郭乳頭部位における味蕾の形態及び味細胞数への影響.....	17
5. 血漿及び唾液中における亜鉛及び白金量の変化.....	18
考 察.....	20
第2章 ボルテゾミブ投与による味覚感受性の変化.....	22
緒 言.....	22
実験材料及び方法.....	23
1. 試薬.....	23
2. 実験動物.....	23
3. 投与方法.....	23
4. 生化学的検査値の測定.....	23
5. 血漿中亜鉛量の測定.....	23
6. Brief access test.....	24
7. mRNA 検出.....	26
8. 組織染色.....	26
9. ウェスタンブロット.....	27
10. 統計学的処理.....	27
実験成績.....	28

1. 体重、生化学的検査値及び血漿中亜鉛量への影響.....	28
2. 5 基本味感受性への影響.....	30
3. 有郭乳頭部位における味蕾の形態及び味細胞数への影響.....	33
4. PKD1L3、PKD2L1 及び TRPV1 発現量への影響.....	34
5. ボルテゾミブ投与中止による酸味感受性の変化.....	36
考 察.....	37
総 括.....	39
引用文献.....	41
研究業績目録.....	48

## 【略語表】

5-HT	5-hydroxytryptamine
AADC	aromatic acid decarboxylase
ALT	alanine transaminase
ALP	alkaline phosphatase
ASICs	acid-sensing ion channels
AST	aspartate aminotransferase
BSA	bovine serum albumin
BUN	blood urea nitrogen
Car4	carbonic anhydrase IV
CTACE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
DRG	dorsal root ganglion
HCl	hydrochloric acid
HCN	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel
HE	hematoxylin-Eosin
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry
MSG	monosodium glutamate
PLC-β2	phospholipase C-beta 2
PVDF	polyvinylidene difluoride
QHCl	quinine hydrochloride
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
S.D.	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
TRPV1	transient receptor potential cation channel subfamily V member 1

## 序 論

味覚は、ヒトやげっ歯類をはじめとする多くの生物が有する重要な感覚の一つである。味覚は甘味、苦味、うま味、塩味及び酸味の5基本味から構成されると考えられており、甘味、及びうま味は嗜好性、酸味及び苦味は嫌悪性の味として認識される。また塩味については低濃度の場合は嗜好性を示し、高濃度の場合は嫌悪性を示す (Oka *et al.*, 2013)。これは甘味及びうま味がそれぞれ糖質及びアミノ酸といった栄養成分、酸味及び苦味がそれぞれ腐敗物及び有毒物、そして塩味がミネラルの濃度センサーとして働き、食物中の成分を識別するために備わっていると考えられている (Chaudhari *et al.*, 2001)。

味物質は舌の茸状乳頭、葉状乳頭及び有郭乳頭などの部位に集積している味蕾において受容される。一つの味蕾は、数十個の味細胞により構成されており、それらは単一な細胞ではなく、形態的及び機能的特徴の異なるI型からIV型の味細胞に分類される (Pumplin *et al.*, 1997; Yee *et al.*, 2001)。これらの中で、II型味細胞は甘味受容体T1R2/T1R3、うま味受容体T1R1/T1R3及びmGluR4、及び苦味受容体T2Rを発現している (Chaudhari *et al.*, 1998; Adler *et al.*, 2000; Chandrashekar *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2002)。III型味細胞は酸味受容体PKD1L3/PKD2L1を発現することに加えて (Lopez-Jimenez *et al.*, 2006; Ishimaru *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Kataoka *et al.*, 2008)、神経終末との間にシナプス構造を形成することから甘味、うま味及び苦味刺激の情報伝達への関与が示唆されている (Murray *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 2009)。これらの味細胞で受容されたシグナルは、味覚神経を介して脳へと伝達される。したがって、この一連の経路に何らかの異常が生じることにより味覚障害が誘発されると考えられ、実際に苦味の感受性が低下した患者と苦味の自発性異常味覚を訴える患者においてそれぞれ苦味受容体T2Rsの発現低下及び増大が報告されている (Onoda *et al.*, 2011; Hirai *et al.*, 2012)。また、甘味及びうま味感受性の減少が認められた頭頸部癌患者 (シクロホスファミド及び5-FUを用いた化学療法及び放射線治療を施行) において、甘味及びうま味受容体サブユニットであるT1R3の発現量が減少していた (Tsutsumi *et al.*, 2015)。これらの報告より、味受容体タンパク質の発現量は、対応する味受容体の機能性と正の相関を示すことが示唆される。

味覚障害は、『味が薄い、味を感じにくい (味覚減退)』、『味を感じない (味覚消失及び無味症)』、『特定の味だけを感じない (解離性味覚障害)』、『醤油を苦く感じるというような本来とは異なる味を感じる (異味症・錯味症)』、『何を食べても嫌な味を感じる (悪味症)』、『味が濃く感じる (味覚過敏)』、『口の中に何も無いにも関わらず苦味や渋みを感じる (自発性異常味覚)』、『一側のみに見える味覚障害 (片側性味覚障害)』などの種々の症状に基づき分類されており (厚生労働省 重篤副作用疾患別対応マニュアル, 2011)、原因としては亜鉛欠乏、加齢、心因性、薬剤性等がある。

薬剤性味覚障害の中でも抗がん剤誘発性味覚障害はヒトにおいて67%の割合で起こるとの報告もあるように (Bernhardson *et al.*, 2008)、高い頻度で発症するが、この症状は使用薬剤の休薬により緩和されるため (Henkin, 1994; Minakata *et al.*, 2002)、有害事象共通用語規準

(CTACE; v4.0) において味覚障害は、Grade1 (味覚の変化はあるが食生活は変わらない) 及び Grade2 (食生活の変化を伴う味覚変化) のみの規定であり、重篤なグレードの規定はない。これらのことは、味覚障害が致命的な副作用として認識されていないことを示唆している。しかしながら、ヒトにとって食事は単なる栄養摂取のための手段としてのみならず、共同で飲食することでコミュニケーションを深めることや食物の味わいを楽しむことなど健康的な生活を送る上で重要な役割を持つ。それゆえに、化学療法による味覚感受性の変化は、患者から食事を味わう楽しみを奪うことや食欲低下によって栄養摂取を低下させることなどによりその QOL を低下させる (Holms *et al.*, 1993; Boltong *et al.*, 2012)。さらに、肺がんの分子標的治療薬であるクリゾチニブの使用患者において、塩味感受性の低下を始めとして甘味、うま味及び塩味感受性が消失し最終的に全ての食物で苦味を感じるようになった結果、食欲低下に伴う体重減少をきたし、その薬剤による治療継続が困難になった症例も報告されている (Koizumi *et al.*, 2015)。このように抗がん剤誘発性味覚障害は、臨床上軽視できない副作用の一つである。しかしながら、その特性や発症機序についての統一的な見解は得られていない。

従来、抗がん剤誘発性味覚障害はその薬理作用に基づき、味細胞の分化・増殖が影響を受けることによりその数が減少し発症すると考えられてきた。実際に、DNA アルキル化を作用機序としてもつ抗がん剤であるシクロホスファミド投与マウスにおいて、味細胞の細胞周期の遅延及び味細胞数の減少が起こることが示されている (Mukherjee and Delay, 2011; Mukherjee *et al.*, 2013)。このような所見は抗がん剤と共になん治療に適用される放射線照射によっても誘発されることが報告されている (Nguyen *et al.*, 2012)。

味細胞は 10-14 日間の細胞周期で新陳代謝しており (Beidler *et al.*, 1965; Farbman *et al.*, 1980)、必須微量元素である亜鉛の欠乏は細胞周期を遅延させ、味細胞数の減少などを来すため味覚感受性が減少する (Hambridge *et al.*, 1972; Beyersmann, 2002; Hamano *et al.*, 2006)。また、味覚障害患者の唾液中亜鉛量が減少していることも報告されている (Watanabe *et al.*, 2005)。ラットを用いた検討においても、慢性的な亜鉛欠乏による、味蕾の形態変化、味蕾中の味細胞数の減少及び味覚感受性の低下が報告されている (Kobayashi *et al.*, 1986; Komai *et al.*, 2000; Chou *et al.*, 2001; Goto *et al.*, 2001)。血中亜鉛を減少させる要因の一つとして、亜鉛キレート能を有する薬剤 (D-ペニシラミン等) の投与が指摘されている (Henkin and Bradley, 1970)。これらのことから、抗がん剤誘発性味覚障害への対応として亜鉛含有製剤の投与がなされているが、その治療効果は不十分であり個体差が大きいことが報告されている (Yoshida *et al.*, 1991; Yamagata *et al.*, 2003; Halyard *et al.*, 2007)。また、味覚障害は患者の主訴により診断される場合が非常に多く、濾紙ディスク法のような客観的な味覚機能の定量評価法に基づく診断は極めて少ない (エルプラット<sup>®</sup>添付文書、ベルケイド<sup>®</sup>添付文書、Ishikawa *et al.*, 2013)。そのため、ヒトにおける薬剤性味覚障害の特性、すなわち、5 基本味の中で異常を呈する味の表現型に関する研究報告は少なく、基礎的な検討においても、シクロホスファミド投与マウスにおいて味蕾の形態変化や味細胞数の減少が認められ、甘味及びうま味の感受性が低下することが報告されている (Mukherjee and Delay, 2011; Mukherjee *et al.*, 2013) のみであり、その他の薬剤についての報告は乏しく、未だ抗がん剤誘発性味覚障害に対する有効な治療法及び対処法に関する情報は少ないのが現状である。



以上のことより、抗がん剤の味細胞を含めた味受容機構への影響を評価し、薬剤特異性を明らかにすることは、未だ不明である抗がん剤誘発性の味覚障害に対する対応を考える上で重要である。そこで本研究では、作用機序の異なる抗がん剤であるオキサリプラチン及びボルテゾミブをげっ歯類に投与し、味覚機能の行動学的解析に加え、その味受容機構の変化の有無を精査し、それらの味覚感受性への影響について比較検討した。

## 第1章 オキサリプラチン投与によるラット味覚感受性の変化

### 緒言

オキサリプラチンは大腸がん、膵がん及び胃がんの治療に用いられる極めて重要な白金系抗がん剤の一つであり (de Gramont *et al.*, 2000)、DNA と架橋構造を形成し、その複製を阻害することで細胞増殖を抑制する (Raymond *et al.*, 1998, 2002)。この作用はがん細胞非特異的であり、末梢神経障害に起因する冷覚/痛覚過敏などの副作用を引き起こす (Sakurai *et al.*, 2009)。これに加え、オキサリプラチンは味覚障害を生じ、これを含む化学療法を受けた結果、甘味の感受性が増大した症例が報告されている (Boltong *et al.*, 2012)。さらに、日本人患者に対するアンケート調査において、オキサリプラチンを含むレジメンである FOLFOX6 (オキサリプラチン、5-FU) 及び XEROX (オキサリプラチン、カペシタビン) はそれぞれ 100% 及び 60% の患者で味覚障害が起きたことも報告されている (Ishikawa *et al.*, 2013)。しかし、オキサリプラチンによる味覚障害については未だ不明な点が多い。そこで本章では、オキサリプラチン投与ラットを用いた行動学的及び生化学的検討による味覚感受性及び味受容機構に対する影響を調べた。

## 実験材料及び方法

### 1. 試薬

コラゲナーゼ D 及び ディスパーゼ II は Roche Applied Science から購入した。トリプシン阻害剤及び ウシ胎児血清 (bovine serum albumin, BSA) は Sigma-Aldrich から購入した。その他の試薬は、いずれも特級若しくは、それ以上の規格のものを使用した。オキサリプラチンは、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 薬物動態制御学分野 石田 竜弘 教授より恵与された。

### 2. 実験動物

実験動物には雄性 Sprague-Dawley ラット (200-300 g; 日本 SLC) を用いた。なお、本実験プロトコールは、京都薬科大学動物実験委員会により承認され、「京都薬科大学動物実験実施規程」 に沿って実験を行った。

### 3. 投与方法

オキサリプラチンはその開裂体である dichloro(1,2diaminocyclohexane)platinum (II) 及び oxalate に解離する影響を考慮し、5% グルコース溶液に溶解した (Sakurai *et al.*, 2009)。

Sakurai ら (2009) の報告において、ラットへの投与により末梢神経障害の発症が報告されている投与方法を参考にし、オキサリプラチンは 2、4 又は 8 mg/kg (1 mL/kg) を 1 日投与量として 2 日間腹腔内投与により投与した (総投与量: 4、8 及び 16 mg/kg)。コントロール群には 1 mL/kg の 5% グルコース溶液を同様の投与スケジュールで腹腔内投与した。

### 4. mRNA 検出

#### 4-1. 舌上皮の剥離

ラットをペントバルビタール (ソムノペンチル、共立製薬) による麻酔下 (25 mg/kg、腹腔内投与) において生理食塩水にて灌流し、1.0 mg/mL コラゲナーゼ D、2.5 mg/mL ディスパーゼ II 及び 1.0 mg/mL トリプシン阻害剤を含有したタンパク質分解酵素カクテルを舌上皮下に注入し、30 分室温で酵素反応させ有郭乳頭を含む舌上皮組織を剥離した。剥離した組織は Total RNA を抽出するまで、RNA later<sup>®</sup> (Sigma) 中にて -20°C で保存した (Nishida *et al.*, 2013)。

#### 4-2. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

ラット舌上皮の total RNA は、NucleoSpin RNA<sup>®</sup> XS kit (Macherey-Nagel) を用いて抽出した後、PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent kit により逆転写し、cDNA を得た。得られた cDNA は SYBR<sup>®</sup> Premix EX Taq (TaKaRa) を用い、ABI PRISM 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) により real-time PCR を行った。各サンプルの mRNA 発現量は II 型味細胞マーカーである phospholipase C-beta 2 (PLC-β2) の mRNA 発現量にて補正した。なお、T1R1、T1R2、T1R3、T2R107、mGluR4 及び PLC-β2 の検出に用いたプライマーの塩基配列は Table 1 に示した。

**Table 1. Primers used for quantitative real-time PCR.**

Gene	Accession Number		Primer sequences	Product size
<i>Tas1r1</i> (T1R1)	NM_053305	Forward	5'-TGGTGACTGTCTGCAGGTGAG -3'	95 bp
		Reverse	5'-TGGCTTGGAAGAGGTGGTAG -3'	
<i>Tas1r2</i> (T1R2)	NM_001271266.1	Forward	5'-TGGACTTGCTGCTGTCTGTG -3'	125 bp
		Reverse	5'-GGAGATGGAGGAGGTGAAGG -3'	
<i>Tas1r3</i> (T1R3)	NM_130818.1	Forward	5'-TGTGCTGGCTGTCATTGG -3'	117 bp
		Reverse	5'-GTCACCTAGCCGATCCATGC -3'	
<i>Tas2r107</i> (T2R107)	NM_023995	Forward	5'-AGTGCAGCAGAAGGCATCC -3'	150 bp
		Reverse	5'-CGCCAAGCCAATGAGAATG -3'	
<i>Grm4</i> (mGluR4)	NM_022666.1	Forward	5'-GTCCAACAAGTTCACACAGAAGG -3'	131 bp
		Reverse	5'-AGATGGCATGGTTGGTGTAGG -3'	
<i>Plcb2</i> (PLC-β2)	NM_053478.1	Forward	5'-ATCTGGCTGCCGTTGTGTAG -3'	83 bp
		Reverse	5'-TAGTGAAGCCGTGGGTGATG -3'	
<i>Gnat3</i> (α-gustducin)	NM_173139.1	Forward	5'-CAGTAACACGTTGCAGTCCATCC -3'	139 bp
		Reverse	5'-CGTCATGTCACCATCTTCTAGTGT -3'	

## 5. 組織染色

### 5-1. 凍結切片の作成

ラットをペントバルビタールによる麻酔下 (25 mg/kg、腹腔内投与) において生理食塩水、続いて、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M Sorensen's リン酸緩衝液 (Sorensen's PB, 19 mM リン酸二水素ナトリウム二水和物, 81 mM リン酸水素二ナトリウム十二水和物, pH 7.4) にて灌流し、舌を摘出した。同溶液中で 4°C にて一晚追固定を行い、その後、30% sucrose 溶液で 4°C にて一晚以上漬浸し、ミクロトーム (Leica) にて有郭乳頭組織の凍結切片 (40 μm) を作製した。

### 5-2. ヘマトキシリン-エオジン (Hematoxylin- Eosin, HE) 染色

凍結切片を Sorensen's PB で洗浄後、載物して一晚以上風乾させた。プレパラートを超純水で 10 分間洗浄した後、ヘマトキシリン溶液 (Wako) に 10 分間浸した。その後、水道水で 10 分間鉄イオンとキレートさせ核を染色し、超純水で 3 回洗浄した。続いて、10%エオジン溶液 (Wako) で 2 分間細胞質を染色した。再び超純水で 3 回洗浄し、エタノール (70%、8 分間; 80% 及び 90%、3 分間; 100%、3 分間 2 回及び 5 分間 1 回) とキシレン (3 分間 3 回) に浸し、脱水を行い、EUKITT (O. Kindler) にて封入した。画像は moticam 1000 (Shimazu) により撮影した。

### 5-3. 免疫組織染色

凍結切片を Sorensen's PB 及び 0.02 M 免疫用リン酸緩衝生理食塩液 (免疫用 PBS, 130 mM

塩化ナトリウム, 8.6 mM リン酸水素二カリウム, 1.4 mM リン酸二水素カリウム, pH 7.6) で洗浄後、室温にて1時間または4°Cにて一晩 blocking を行った。ブロッキング緩衝液には1% ロバ血清、0.3% Triton-X 100 (ICN Biochemicals)、0.3% BSA 及び 0.05% アジ化ナトリウム (Wako) 含有免疫用 PBS を用いた。その後免疫用 PBS で洗浄し、一次抗体をブロッキング緩衝液で希釈し、4°Cにて一晩または3日間反応させた。その後免疫用 PBS で洗浄し、二次抗体及び Hoechst 33258 (10 µg/mL, Dojin) をブロッキング緩衝液で希釈し、4°Cにて一晩反応させた。その後免疫用 PBS で洗浄し、載物して一晩以上風乾させた後 ProLong<sup>®</sup> Antifade Kit (Life Technologies) を用いて封入した (Nishida *et al.*, 2008)。画像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 META (Carl Zeiss) により撮影した。得られた写真の蛍光強度は、Adobe Photoshop<sup>®</sup> を用いて数値化した。なお、使用した一次抗体及び二次抗体の詳細は Table 2 に示した。

**Table 2. Antibodies used for immunohistochemistry.**

Antigen	1 <sup>st</sup> Ab	2 <sup>nd</sup> Ab
T1R2	Rabbit anti-T1R2 Ab (1:200; OST00254W, Osenses)	Donkey anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 (1:1000; #A21206, Life Technologies)
NTPDase2	Sheep anti-NTPDase2 Ab (1:200; AF5797, R&D Systems)	Donkey anti-sheep IgG conjugated with Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 (1:1000; #A11016, Life Technologies)
α-gustducin	Rabbit anti-Gα-gust Ab (1:200; sc395, Santa Cruz Biotechnology)	Donkey anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 (1:1000; #A21206, Life Technologies)
PLC-β2	Rabbit anti-PLC-β2 Ab (1:1000; sc206, Santa Cruz Biotechnology)	Donkey anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 (1:1000; #A21206, Life Technologies)
AADC	Rabbit anti-AADC Ab (1:200; BML-AZ1030-0050, Enzo)	Donkey anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 (1:1000; #A21206, Life Technologies)
5-HT	Rabbit anti-5-HT Ab (1:50; S5545, Sigma-Aldrich)	Donkey anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 (1:1000; #A21206, Life Technologies)

## 6. Brief access test

### 6-1. 実験器具

試験用のケージとして給水孔 (縦 15 mm、横 10 mm) のある遮光性のケージ (幅 21.5 cm、奥行 36.5 cm、高さ 25.5 cm) を使い、その中にラットを1匹ずつ入れ、遮光性の蓋をし、給水孔から水もしくは味溶液を提示した。水及び味溶液は 15 mL ポリプロピレン製チューブ (IWAKI) に入れ、シリコン栓を貫通したボール付き給水先管 (夏目製作所) を通して飲水させた。給水先管の先端にリック回数計測装置 (DELICIOUS; INECK) のセンサーを設置し、ラットが給水先管を舐める際にレーザー光を遮断する回数を lick 数として計測した (Fig. 1A)。リック数はラットの飲水欲求やラットの個体差によって影響を受ける。この影響を補正するため、10秒間の味溶液に対する lick 数と10秒間の水に対する lick 数の比である lick ratio を算出し、味覚感受性の評価に用いた (Martin *et al.*, 2010)。

## 6-2. トレーニング方法

まず、ラットに給水孔からの飲水行動を学習させるためのトレーニングを 6 日間行った。トレーニング及び本試験はラットを 20 時間以上絶水条件下においた後、1 日の明暗周期のうち明期 (9:00-18:00) において行った。トレーニング初日はラットを試験用ケージに 1 匹ずつ入れ 15 分間、水を給水孔から自由摂取させた。2 日目は水を 10 秒間提示し、給水孔を 20 秒間シャッターで閉じるトレーニングを 10 分間繰り返した。3 日目は水を甘味溶液である 0.3 M スクロース水溶液に変更し同様の方法で行った。4 日目は 0.3 M スクロース水溶液及び苦味溶液である 1 mM キニーネ塩酸塩 (quinine hydrochloride, QHCl) 水溶液、それぞれの溶液の間に水を提示し、各溶液をラットが飲み分けているか否かを確認した。5 及び 6 日目は次項に示す本試験と同様の方法で味溶液及び水を提示し、そこで得られたデータを基礎値 (Base; Day 0) として用いた。なお、過度な絶水の影響を防ぐため、それぞれのトレーニング終了後、水を 1 時間自由摂取させた。

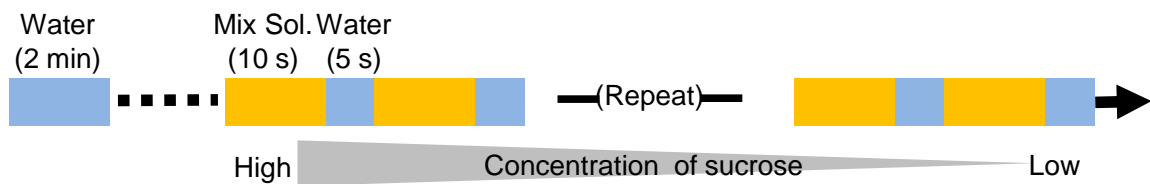
## 6-3. 本試験

オキサリプラチン投与後 3、7、10 及び 14 日目に本試験を実施した。本試験の際はトレーニングの場合と同様に、試験前日より 20 時間以上の絶水を行った。まず、絶水による過度な飲水を防ぐため、試験前に 2 分間、試験ケージの給水孔より自由に水を摂取させた。その後味溶液及び水をそれぞれ 10 及び 5 秒間ずつ交互に提示し、lick 数を計測した。スクロースは甘味を呈するため、通常はラットの lick 数は水の場合よりも高くなるが、本実験では絶水によってラットの飲水欲求を高めているため、水とスクロース水溶液 (0.01-1 M) に対する 10 秒間の lick 数はほぼ同等、すなわち lick ratio はほぼ 1 となる。そこで、スクロース濃度依存的な lick ratio を得るため、甘味溶液として、0、0.01、0.03、0.1、0.3、0.5 及び 1 M の濃度のスクロースと嫌悪性の苦味物質である 1 mM QHCl を添加した甘味/苦味混合溶液を用い、それをラットに対してスクロース濃度の高い順に提示した (Murata *et al.*, 2003; Boughter *et al.*, 2005) (Fig. 1B)。GraphPad Prism (GraphPad Software) を用いて、得られた lick ratio とスクロース濃度からシグモイド曲線を作図し、EC<sub>50</sub> 値を算出した。これらの値を基に甘味に対する感受性を解析した。苦味の感受性に対する試験においては、0.0001、0.01、0.1 及び 1 mM の QHCl 水溶液をそれらの濃度の低い順に提示した (Fig. 1C)。

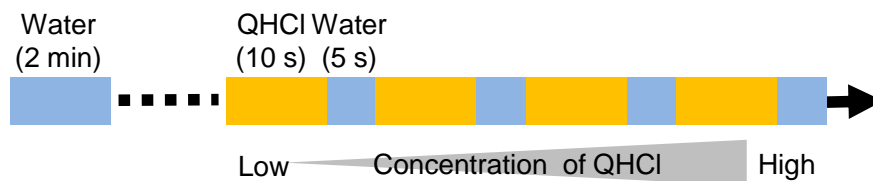
(A)



(B)



(C)



**Fig. 1. Protocol of a brief-access test in rats.**

## 7. 亜鉛及び白金量の測定

### 7-1. 血漿の採取

ラットをペントバルビタールによる麻酔下 (25 mg/kg、腹腔内投与) において予めヘパリンナトリウム (1 万単位/10mL; エイワイファーマ) 処置を施したシリンジを用い、心臓穿刺により採血後、4°C、10,500×g の条件下で 5 分間遠心分離を行い、得られた上清を血漿として用いた。

### 7-2. 唾液の採取

ラットをペントバルビタールによる麻酔下 (25 mg/kg、腹腔内投与) においてピロカルピン塩酸塩 (Wako, 1.25 mg/kg) を腹腔内投与し、腹臥位にて口唇部の下に 20 分間脱脂綿を当て唾液を吸収させることにより採取した。

### 7-3. 測定用ビーカーの取り扱い

検体中の亜鉛及び白金量の測定にあたり、一般的な方法で洗浄したビーカーを用いた場合それに由来する亜鉛及び白金の混入が問題となったため以下のように洗浄処理を行った。まず測定検体の灰化処理に用いるビーカーは、水道水で洗浄後、アルスコ洗剤（朝日ライフサイエンス）入り水道水にて1時間超音波洗浄を行い、水道水、蒸留水の順にすすいだ後、7.5%硝酸（試薬特級，Wako）に9時間以上浸け置きした。その後、水道水、超純水の順にすすぎ、風乾後、そのビーカーを200-250°C加熱条件下で硝酸（有害金属測定用，Wako）、過塩素酸（有害金属測定用，Wako）及び過酸化水素（原子吸光分析用，Wako）にて湿式灰化の操作を行い、高周波誘導結合プラズマ質量分析装置（Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer; ICP-MS; 7700 Series, Agilent Technologies）を用いて、測定用ビーカーのバックグラウンドを予め測定した。サンプル中の白金及び亜鉛量は白金標準液（Wako）及び多元素混合標準液 BM（Wako）をそれぞれの標準物質として、また内標準として1 ppm インジウム標準液（Wako）を最終濃度が0.2 ppbとなるようにサンプルに添加し、それぞれのサンプルのPt/In及びZn/In値の平均から、白金及び亜鉛標準液を添加していない3サンプルのPt/In及びZn/In値の平均を差し引いて $\Delta$ Pt/In及び $\Delta$ Zn/In値を算出した。 $\Delta$ Pt/In及び $\Delta$ Zn/Inの値が0.002未満のものを測定サンプルの灰化処理に用いることができる測定用ビーカーとし、次項に示す本測定の際に用いるビーカーを選定した。なお、本測定用ビーカーは選定後7.5%硝酸に9時間浸け置きした後、水道水、超純水の順にすすぎ、風乾させた。

### 7-4. 亜鉛及び白金量の測定

測定サンプルは、7-3項で選定した測定用ビーカーを用いて、200-250°C加熱条件下にて硝酸、過塩素酸及び過酸化水素を用いて湿式灰化を行い、その後、5%硝酸に溶解させた。その溶解液を試料として、ICP-MSを用いて亜鉛及び白金量を測定した。サンプル中の亜鉛及び白金量は7-3項に記載した方法と同様の手順により算出した。

## 8. 統計学的処理

得られた実験値は、平均値±標準偏差（S.D.）にて表示した。Nosratら（2012）及びKusuharaら（2013）の報告に基づき、母集団が正規分布を示し、母分散が等しいと仮定し、コントロール群及びオキサリプラチン投与群間の有意差検定のうちbrief-access testにおけるlick ratio及びEC<sub>50</sub>の比較は、Student's t testを、免疫組織染色における蛍光強度の比較は多群間比較にTukey's testを、免疫組織染色における味蕾あたりの味細胞数の多群間でのコントロール群とオキサリプラチン投与群の対比較の場合はDunnett's testを適用し、得られたp値が0.05未満（両側）の場合を有意差ありとした。



## 実験成績

### 1. 体重変化

オキサリプラチン投与開始時及び投与後 14 日目における体重を測定した。コントロール群及びオキサリプラチン投与群 (総投与量: 4-16 mg/kg) との間で明らかな体重の変動はなかった (Table 3)。また、いずれのオキサリプラチン投与群においても、コントロール群に比べて体毛や便の性状に明らかな変化はなかった。

オキサリプラチンの投与による身体所見の変化は認められなかったものの、これは Sakurai ら (2009) の報告と同様であり、これらオキサリプラチン投与ラットにおいてその毒性の評価は行うことができるものと判断した。

**Table 3. Body weight changes in control and oxaliplatin-administered rats.**

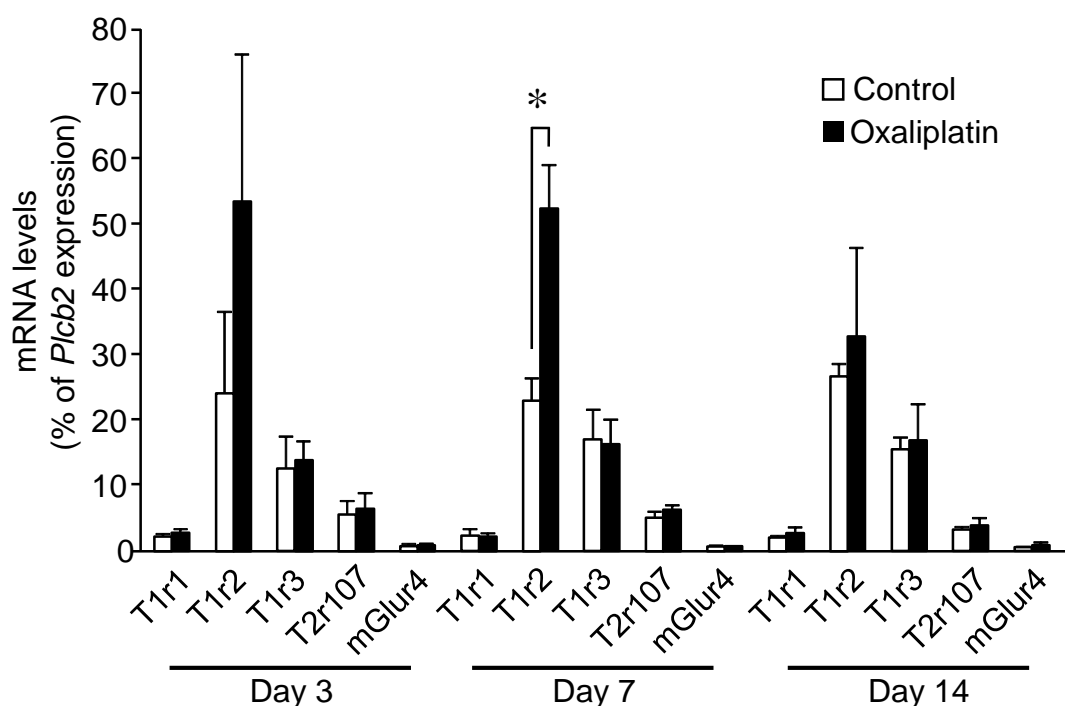
	Control	Oxaliplatin (mg/kg)		
		4	8	16
Day 1	242.6±7.2	243.8±5.1	235.0±10.2	243.8±5.3
Day 14	321.0±25.1	315.0±21.9	293.3±13.3	309.5±31.5

Each value represents the mean ± SD (N=4-5). This table was cited from Table 3 in *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 581, 2016.

## 2. 有郭乳頭部位における味受容体の発現変化

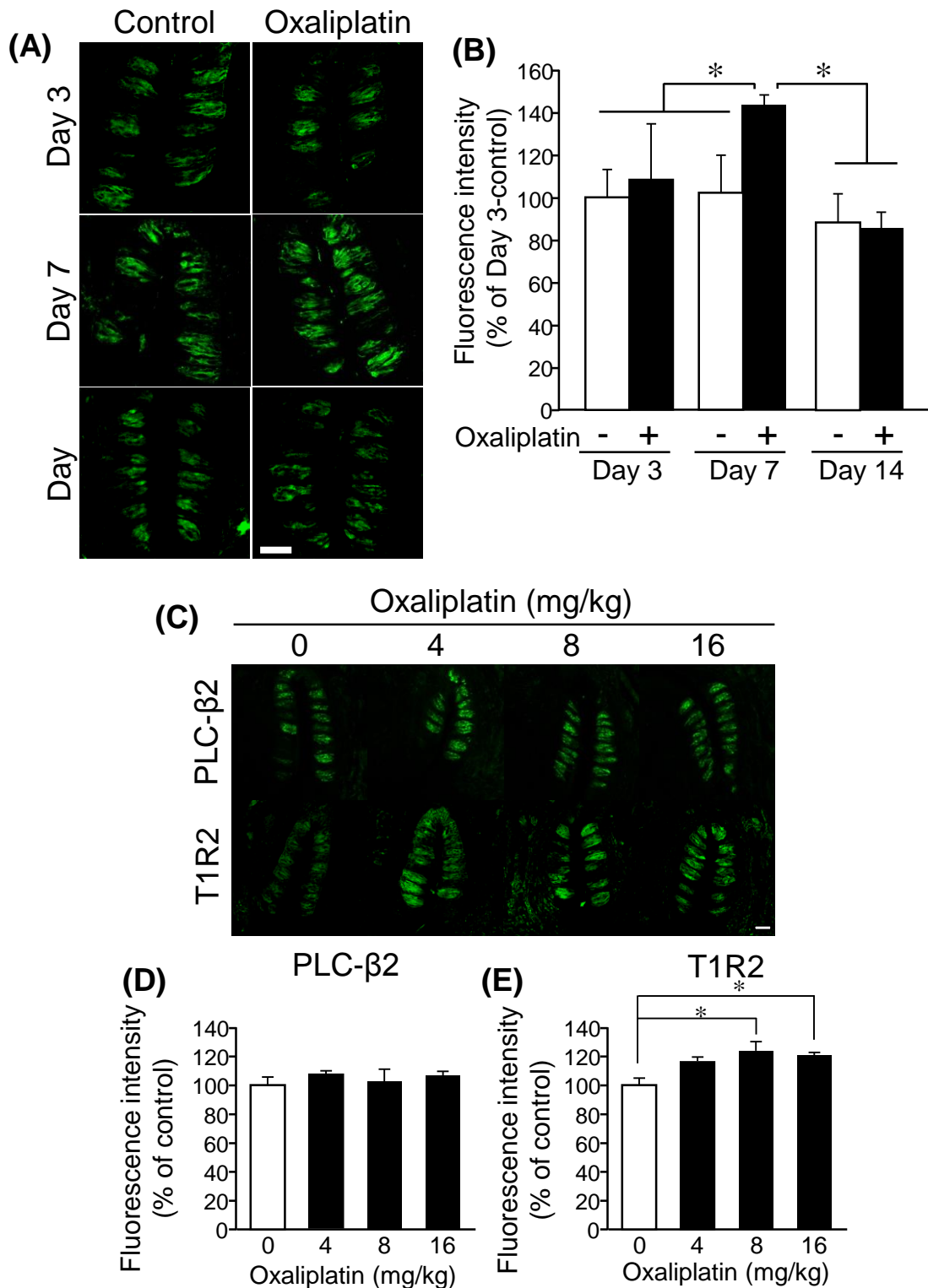
オキサリプラチン投与ラットの有郭乳頭における T1R1、T1R2、T1R3、T2R107 及び mGluR4 の各 mRNA 発現プロファイルを実時間 PCR 法により検討した。Fig. 2 に示すように、オキサリプラチン投与群における甘味受容体サブユニットの一つである T1R2 の mRNA 発現レベルは投与後 7 日目において、コントロール群に比べて有意に高かったが、投与後 14 日目ではコントロール群とほぼ同等であった。一方、その他の味受容体の mRNA 発現レベルについては、コントロール群とオキサリプラチン群の間で差はなかった。

オキサリプラチン投与ラットの有郭乳頭における T1R2 のタンパク質発現量について、免疫組織染色により検討した。オキサリプラチン投与後 7 日目の T1R2 の免疫活性に基づく蛍光強度は、3 及び 14 日目のコントロール及びオキサリプラチン投与群の場合よりも有意に大きかった (Fig. 3A, B)。この変化の用量依存性について検討するため 4-16 mg/kg のオキサリプラチンを投与したラットの有郭乳頭部位の切片を用い免疫組織染色を行ったところ用量依存性は認められなかったものの、8 及び 16 mg/kg の投与量群において T1R2 の発現が増大していた (Fig. 3C, E)。一方、II 型味細胞マーカータンパク質である PLC- $\beta$ 2 の有郭乳頭部位における蛍光強度はコントロール群とオキサリプラチン投与群との間で差はなかった (Fig. 3C, D)。これらの結果から、オキサリプラチン投与により有郭乳頭部位における T1R2 の発現量が増大し、この変化は可逆的であることが示された。



**Fig. 2. Effect of oxaliplatin on mRNA expression of taste receptors in rat circumvallate papillae (CP).**

After administration of oxaliplatin at the total dose of 8 mg/kg, tissues containing CP were removed on days 3, 7 and 14, and then used for quantification of the mRNA expression levels of T1R1, T1R2, T1R3, T2R107 and mGluR4 in the CP by real-time PCR. Data are given as % of PLC- $\beta$ 2 mRNA expression levels. Each bar represents the mean  $\pm$  SD (N=3-4). \*:  $p < 0.05$  vs. control. This figure was cited from Fig. 1 in *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 580, 2016.



**Fig. 3. Effect of oxaliplatin on protein expression of T1R2 in rat CP.**

(A, B) Expression of T1R2 in control and 8 mg/kg oxaliplatin-administered rat CP on days 3, 7 and 14. Panel A shows representative immunohistochemical images, the quantitative results being given in panel B. (C-E) Dose-dependent effects of oxaliplatin on expression of PLC-β2 and T1R2 in rat CP on day 7. Representative immunohistochemical images for PLC-β2 and T1R2 are shown in panel C, the quantification results being given in panels D and E, respectively. Scale bar = 50 μm. Each bar represents the mean ± SD (N=4). \*:  $p < 0.05$ . This figure was cited from Fig. 2 in *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 581, 2016.

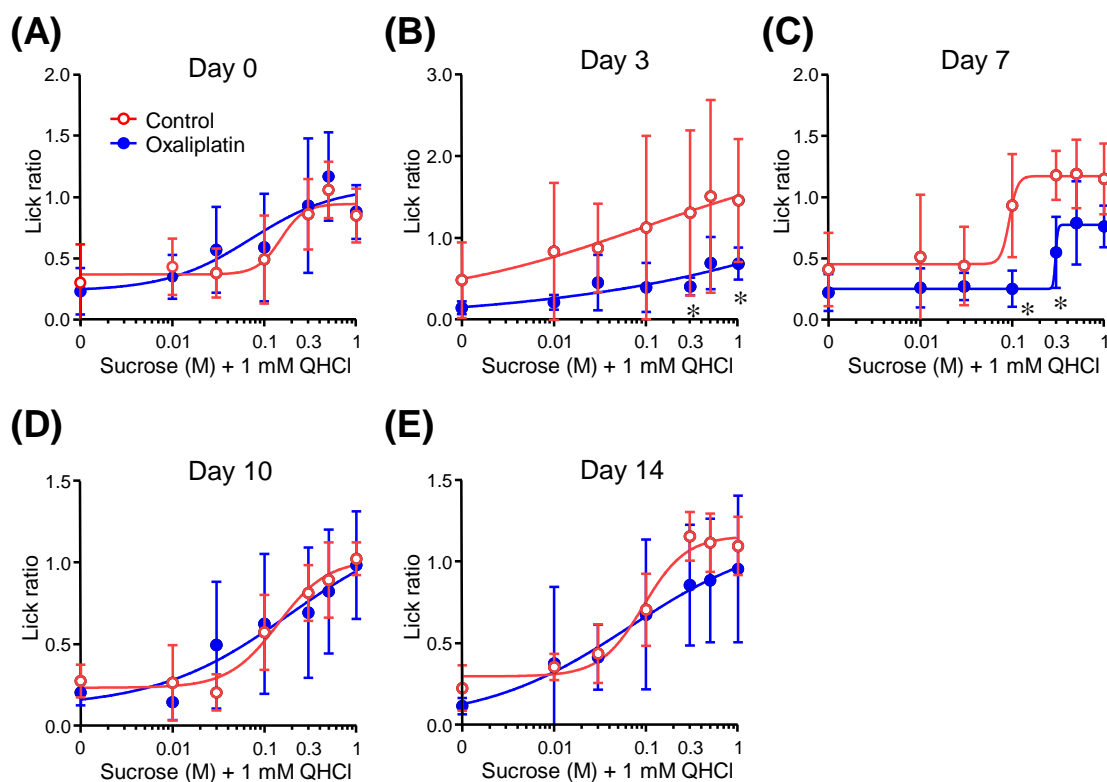
### 3. 甘味感受性の変化

オキサリプラチン投与により有郭乳頭において甘味受容体サブユニットの一つである T1R2 受容体の発現量が一過性に増大することが明らかとなったことから、オキサリプラチン投与による甘味感受性への影響を行動学的試験法である **brief-access test** により評価した。

スクロースと QHCl の混合溶液に対する **lick ratio** はスクロース濃度依存的に増大、すなわち甘味に対する嗜好性を示したことから、本実験系が成立していることが確認された。オキサリプラチン投与前において、コントロール群とオキサリプラチン投与群の間でスクロースと QHCl の混合溶液に対する **lick ratio** に差はなかったものの (Fig. 4A)、オキサリプラチン投与後 3 並びに 7 日目において、それぞれ 0.3 及び 1 M、並びに 0.1 及び 0.3 M の濃度のスクロースの混合溶液に対する **lick ratio** は、いずれもコントロール群のそれらより有意に小さかった (Fig. 4B, C)。これらの **lick ratio** の近似曲線は、オキサリプラチン投与後 7 日目においてコントロール群のその右側に移動し、算出された  $EC_{50}$  値はコントロール群に比べ、有意に大きかった (Table. 4)。一方、オキサリプラチン投与後 10 及び 14 日目における **lick ratio** はコントロール群のそれらとほぼ同値であった (Fig. 4D, E)。

本試験で用いている味溶液には QHCl が含まれており、オキサリプラチン投与ラットで認められたスクロースと QHCl の混合溶液に対する **lick ratio** の変化は、苦味感受性の変化に起因する可能性が考えられる。そこで、オキサリプラチン投与ラットにおける苦味感受性の変化の有無を検証したところ、スクロースと QHCl の混合溶液に対する **lick ratio** に変化の認められたオキサリプラチン投与後 3 及び 7 日目のいずれにおいても、QHCl 水溶液に対する **lick ratio** に明らかな変化はなかった (Fig. 5)。この結果から、オキサリプラチン投与後 3 及び 7 日目において苦味の感受性は変化しないと考えられる。

これらの結果から、オキサリプラチンの投与によって起こるスクロースと QHCl の混合溶液に対する **lick ratio** の低下は甘味感受性が一過性に減少することにより起こることが示された。また、この甘味感受性の減少は、オキサリプラチン投与ラットの有郭乳頭部位における T1R2 の発現増加と同様に、オキサリプラチン投与後 7 日目において起こったことから、オキサリプラチンによる甘味感受性の変化に対し T1R2 の発現増大が関与していることが示唆された。



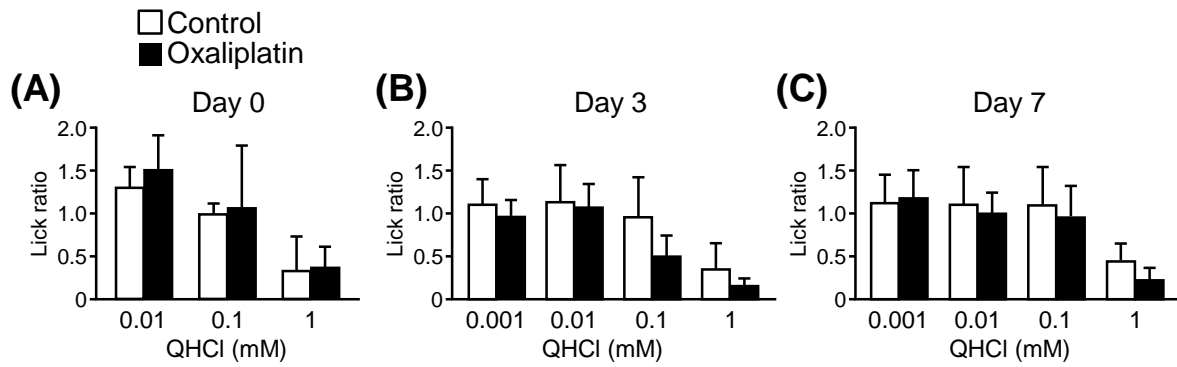
**Fig. 4. Effect of oxaliplatin on sensitivity to sweet/bitter taste solutions in rats.**

The lick ratios for 0.01-1.0 M sucrose with 1 mM QHCl and for 0.001-1.0 mM QHCl (F-H) were determined in control and oxaliplatin-administered rats on days 0, 3, 7, 10 or 14. Each point represents the mean  $\pm$  SD (N=4-6). \*:  $p < 0.05$  vs. control. This figure was cited from Fig. 3 in *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 582, 2016.

**Table 4. EC<sub>50</sub> values for the sweet/bitter taste solutions in control and oxaliplatin-administered rats.**

(mM sucrose)	Day 0	Day 3	Day 7	Day 10	Day 14
Control	0.22 $\pm$ 0.10	0.40 $\pm$ 0.52	0.07 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.41	0.06 $\pm$ 0.04
Oxaliplatin	0.16 $\pm$ 0.23	0.24 $\pm$ 0.11	0.27 $\pm$ 0.12*	0.26 $\pm$ 0.15	0.20 $\pm$ 0.24

Each value represents the mean  $\pm$  SD (N=4-5). \*:  $p < 0.05$  vs. control on the corresponding day.

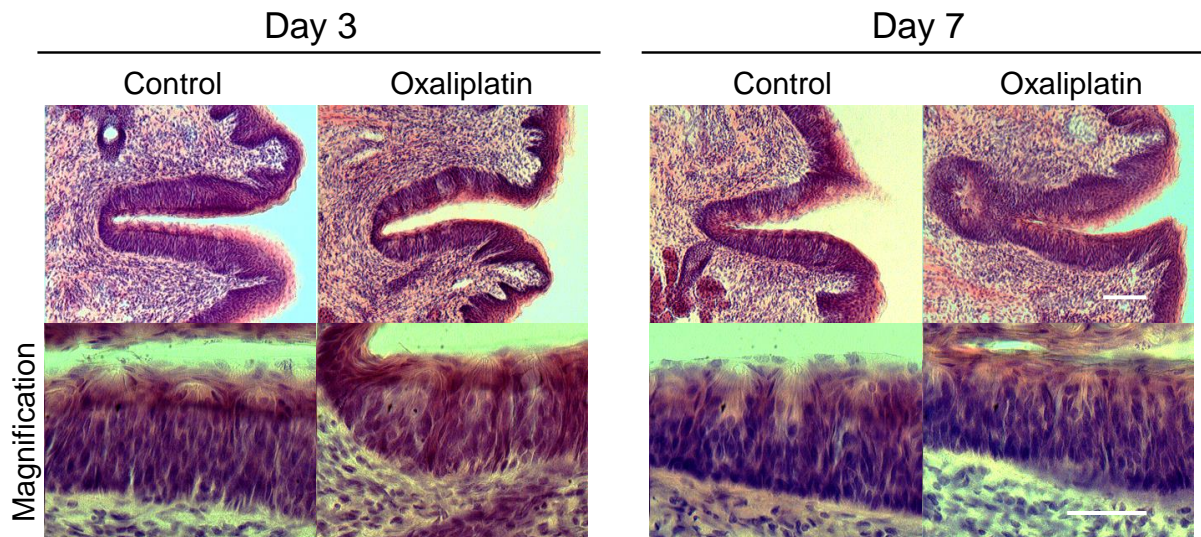


**Fig. 5. Effect of oxaliplatin on sensitivity to bitter taste solutions in rats.**

The lick ratios for 0.01-1.0 M sucrose with 1 mM QHCl and for 0.001-1.0 mM QHCl (F-H) were determined in control and oxaliplatin-administered rats on days 0, 3, 7, 10 or 14. Each bar represents the mean  $\pm$  SD (N=4-6). \*:  $p < 0.05$  vs. control. This figure was cited from Fig. 3 in *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 582, 2016.

#### 4. 有郭乳頭部位における味蕾の形態及び味細胞数への影響

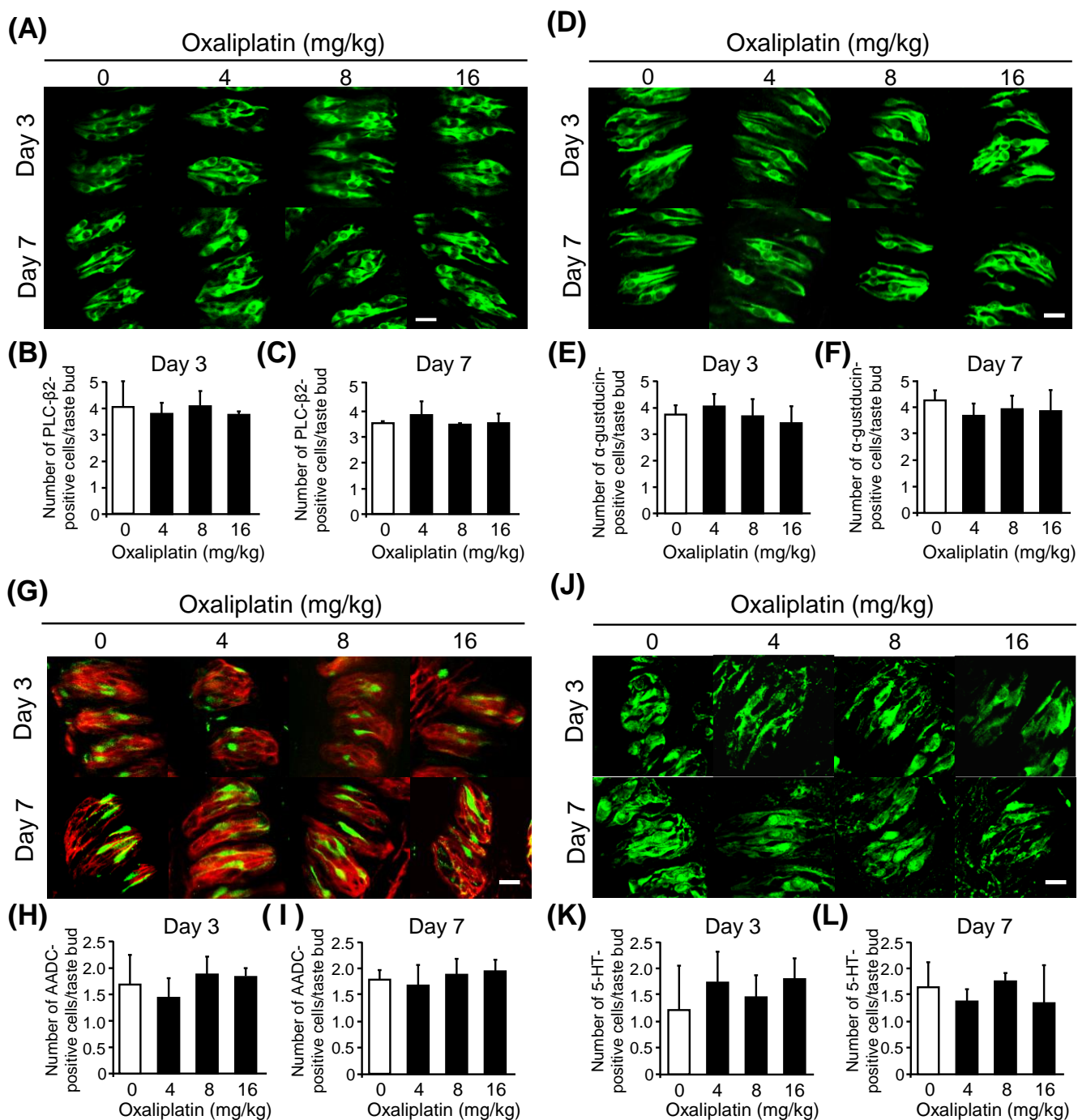
オキサリプラチン投与による有郭乳頭部位における味蕾の組織形態への影響を検討するために有郭乳頭を含む切片に対し HE 染色を行った。有郭乳頭の全体像及び味蕾の拡大写真において、コントロール及びオキサリプラチン投与ラットの切片における味蕾の形態、サイズ及び味蕾中の細胞の形態に明らかな差はなかった (Fig. 6)。



**Fig. 6. Effect of oxaliplatin on morphology of taste buds in rat CP.**

Representative photomicrographs of HE staining of rat CP from 8 mg/kg oxaliplatin-administered rats on days 3 and 7. Scale bar = 50  $\mu$ m. This figure was cited from Fig. 4 in *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 582, 2016.

次に、オキサリプラチン投与による有郭乳頭部位における味蕾内の味細胞数への影響を検討するために免疫組織染色を行った。II型味細胞マーカーとして PLC- $\beta$ 2 及び  $\alpha$ -gustducin (Clapp *et al.*, 2004; Miura *et al.*, 2007)、III型味細胞マーカーとして aromatic acid decarboxylase (AADC) 及び 5-hydroxytryptamine (5-HT) (Yee *et al.*, 2001; DeFazio *et al.*, 2006) をそれぞれ用い、1つの味蕾あたりの味細胞数を計数した。その結果、それぞれのマーカー陽性細胞数はコントロール及びオキサリプラチン投与群 (4-16 mg/kg) の間で差はなかった (Fig. 7)。これらの結果から、オキサリプラチン投与は有郭乳頭部位の組織形態及び味細胞数に明らかな影響を及ぼさないことが明らかとなった。



**Fig. 7. Effects of oxaliplatin on numbers of taste cells in rat CP.**

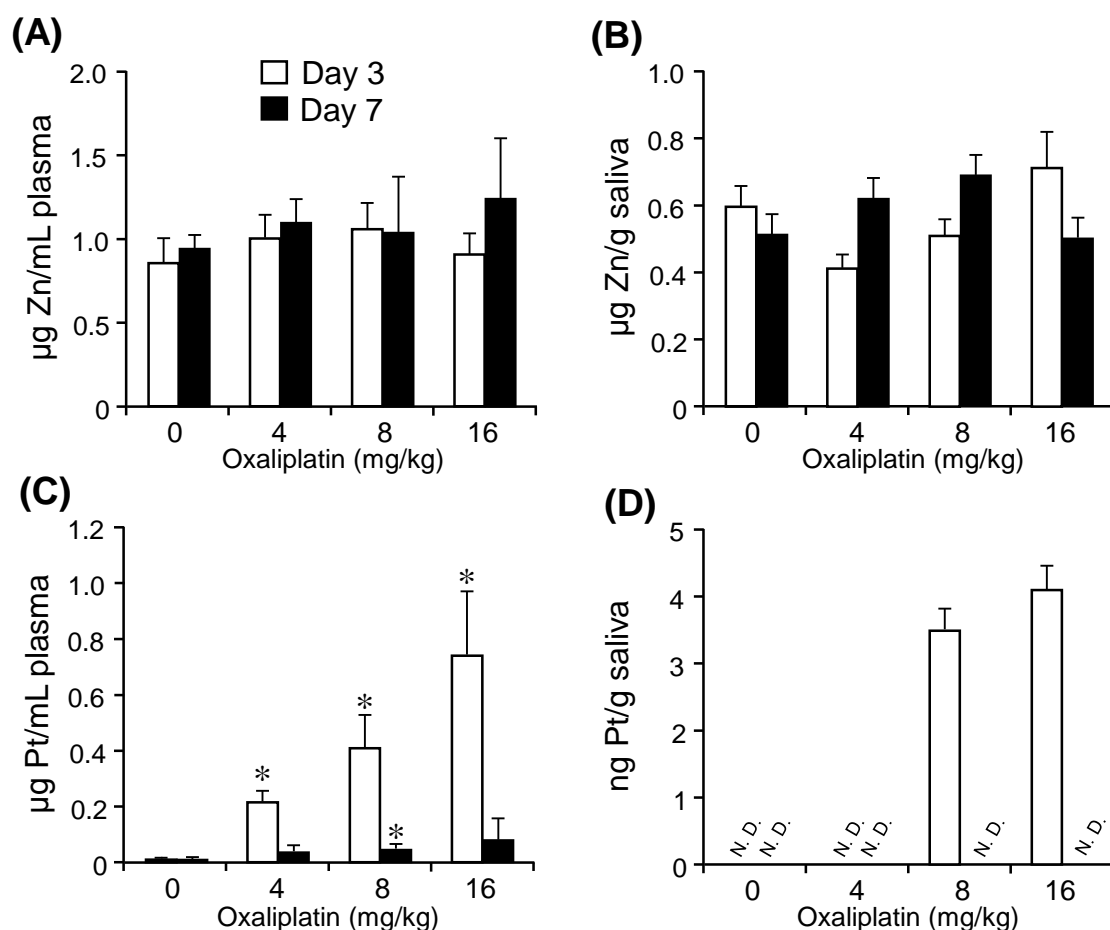
(A-F) Type II taste cells in control and oxaliplatin-administered rat CP. Panels A and D show representative immunohistochemical images for PLC-β2 and α-gustducin, respectively, the quantitative results being given in panels B and C, and E and F, respectively. (G-L) Type III taste cells in control and oxaliplatin-administered rat CP. Panels G and J show representative immunohistochemical images for AADC and 5-HT, respectively, the quantitative results being given in panels H and I, and K and L, respectively. NTPDase2 was used for detection of taste buds (red; G-I). Scale bar = 20 μm. Each bar represents the mean ± SD (N=3-4). This figure was cited from Fig. 5 in *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 583, 2016.



## 5. 血漿及び唾液における亜鉛及び白金量の変化

オキサリプラチン投与後3及び7日目における血漿及び唾液中の亜鉛及び白金量を ICP-MS により測定した。血漿及び唾液中の亜鉛量はオキサリプラチン投与後3及び7日目においてコントロール群とオキサリプラチン投与群でほぼ等しく、オキサリプラチンの投与量依存的な影響も認められなかった (Fig. 8A, B)。一方、血漿中白金量はオキサリプラチン投与後3日目において投与量依存的に増大し、投与後7日目において顕著に低下していたものの検出された (Fig. 8C)。一方、唾液中白金はオキサリプラチン投与後3日目において、8及び16 mg/kg 投与群で検出されたが4 mg/kg オキサリプラチン投与ラットのそれは検出限界以下であり、また、オキサリプラチン投与後7日目では、唾液中に白金は検出されなかった (Fig. 8D)。

これらのことから、オキサリプラチン投与による血漿中及び唾液中の亜鉛量に対する影響は測定したいずれの日においても認められないこと、そして唾液中へのオキサリプラチンの分泌は甘味感受性の変化が認められた投与後7日目においてほとんど生じないことが示された。



**Fig. 8. Zinc and platinum levels in plasma and saliva of oxaliplatin-administered rats.**

Concentrations of zinc (Zn) and platinum (Pt) in plasma (A, C) and saliva (B, D) on days 3 and 7 measured by ICP-MS. Each bar represents the mean  $\pm$  SD (N=3-4). \*:  $p < 0.05$  vs. 0 mg/kg. N.D.: Not detected. This figure was cited from Fig. 6 in *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 584, 2016.

## 考 察

本章では、DNA の複製及び転写の阻害を作用機序とし、味覚障害を引き起こす抗がん剤であるオキサリプラチンによる味覚感受性及び味受容機構に対する影響についてラットにおいて検討した。その結果、ラットへのオキサリプラチン投与により (1) 甘味受容体サブユニットの一つである T1R2 の発現が一過性に増加すること、(2) 甘味感受性が減少するがその変化は可逆的であること、並びに (3) 味蕾の形態や味細胞数は影響を受けないことが明らかとなった。

本検討において著者は、オキサリプラチン投与ラットにおいて甘味感受性は低下するものの、甘味受容体サブユニットの一つである T1R2 の発現は増大するという相反する結果を得た。このことは、味受容体はその受容に必要ではあるものの、その味覚感受性は必ずしもその発現量と対応するとは限らない可能性を示唆しており、これは化学療法と放射線療法を受けた患者において、苦味受容体 T2R5 の発現量は増大するものの、苦味感受性は変化しないことを示した Tsutsumi ら (2015) の報告によって支持されるものと考えられる。一方、T1R2 又は T1R3 のノックアウトマウスは野生型の場合と比較して、甘味感受性が低下することが報告されている。このことから、T1R2 又は T1R3 がそれぞれホモ二量体を形成した場合、それらは甘味受容体として機能するものの、その感受性は低いことが推察される。したがって、オキサリプラチン投与ラットの味細胞における T1R2 の発現量の増大は、感受性の低い T1R2 ホモ二量体の発現割合を大きくし、それにより甘味感受性が低下した可能性が考えられる。また、Boltong ら (2012) は、オキサリプラチンを含む化学療法を受けた患者において甘味感受性が増大したことを報告しており、著者が得た結果と矛盾するものである。これは、著者の結果がオキサリプラチンを単独でラットに投与したものであるのに対し、Boltong らの結果は多剤併用療法を受けた患者であることに起因する可能性が考えられる。また、ヒトとげっ歯類の味受容に関する分子群などは類似したものであるが、Jiang ら (2005) は、甘味物質に対する反応性においてヒトとマウスの間で甘味受容体のアミノ酸配列の違いに起因する種差があることを報告している。甘味受容体は T1R2 と T1R3 のヘテロ二量体から成るが、Shimizu ら (2014) は、ヒト T1R3 の細胞膜への移行に T1R2 の共発現が必要なものに対し、マウス T1R3 はそれを必要としないことを明らかにしている。したがって、このような T1R2 と T1R3 のタンパク質-タンパク質相互作用における種差が、オキサリプラチンによる甘味感受性の変化におけるラットとヒトとの相違を説明するかもしれないが、今後のより詳細な検討が望まれる。しかしながら、今回著者が認めたオキサリプラチンによる甘味感受性の変化における種差に関する結果と、先に述べた甘味感受性の変化が甘味受容体発現量の変化と対応しないという結果は、味覚の変化をその受容体発現量のみで予測することの危険性を明確に指摘している。

今回の検討において、オキサリプラチン投与により甘味の受容に関与する II 型及び III 型味細胞の数に変化はなかったことから、味細胞に対するオキサリプラチンの影響は、その細胞分裂の抑制を示さない程度であることが示唆された。オキサリプラチン投与による T1R2 の発現量の変化は投与後 14 日目、甘味感受性の低下は投与後 10 日目以降においてコントロー

ル群と同等のレベルまで回復した。これはラットの味細胞の細胞周期が 10–14 日間であるとする報告 (Beidler *et al.*, 1965; Farbman *et al.*, 1980) と対応しており、T1R2 の発現量が増大した味細胞が新生味細胞と入れ替わることで一過性の発現変化を示したと考えられる。このことは、オキサリプラチン投与ラットの血漿及び唾液中亜鉛濃度、味蕾の形態及び味細胞数に変化が認められなかったことから支持され、オキサリプラチン誘発性の味覚障害に対する細胞増殖の抑制や亜鉛欠乏の関与は小さいことが示唆される。

オキサリプラチンと同じ白金系抗がん剤の一つであるシスプラチンを含む化学療法を施行された患者は、その投与 2 週間後まで甘味感受性が減少し、投与から 4 週間後にその変化は投与前のレベルまで回復したことが報告されている (Tsutsumi *et al.*, 2015)。したがって、甘味感受性に対する一過性の変化は、白金系抗がん剤で共通する特性である可能性が示唆される。また、Boltong ら (2012) は、オキサリプラチン投与により金属味を感じるようになった患者の症例を報告している。この原因として、唾液中へのオキサリプラチンの分泌が考えられている。今回の検討において、オキサリプラチン投与後 3 日目の唾液中で白金が検出されたものの、7 日目では検出限界以下であったことから、投与後 7 日目で認められた甘味感受性の低下に対する寄与は小さいと考えられる。

オキサリプラチンの投与方法はオキサリプラチンにより誘発される手足の冷覚過敏や機械的アロディニアなどの末梢神経障害に関する研究でのそれ (Sakurai *et al.*, 2009) に準じた。オキサリプラチン投与患者において口唇部周囲の感覚異常が起こることが報告されている (Argyriou *et al.*, 2013)。口唇部周囲の感覚は第 V 脳神経である三叉神経及び第 IX 脳神経である舌咽神経によって支配されていることから、この口唇部感覚異常はそれらの障害に起因すると考えられる。舌咽神経は味知覚にも関与することから今回著者が認めたオキサリプラチンによる甘味感受性の変化は甘味受容体の発現変動に加え、舌咽神経などの味覚神経系に対する障害に起因する可能性が考えられる。したがって、オキサリプラチン誘発性味覚障害に対する神経機能の異常の関与についても今後の更なる検討が望まれる。

今回の検討において、オキサリプラチン投与によりラットの甘味感受性は低下したが完全には喪失していなかった。このことは、甘味受容体を標的として甘味の感受性を制御できる可能性を示唆している。ヒトにおいて甘味は温度によって感受性が変化し、温度が高いほうがより感じやすくなる (Bartoshuk *et al.*, 1982; Talavera *et al.*, 2005)。また、それぞれの甘味物質で甘味受容体への結合部位は異なり (Masuda *et al.*, 2012)、異なる味認識部位に結合する複数の味物質を作用させることで甘味シグナルは相乗的に増強される (Fujiwara *et al.*, 2012)。したがって、食物の温度の調節や、複数の甘味料を使用することにより甘味感受性の変化に対処し、これによって食事摂取低下に起因する低栄養状態などの患者 QOL の低下を緩和することができるのではないかと考えられる。

## 第2章 ボルテゾミブ投与による味覚感受性の変化

### 緒言

オキサリプラチンをはじめとする従来用いられてきた抗がん剤は、がん細胞だけでなく正常細胞に対しても毒性を示すため、様々な副作用を引き起こす。これに対し、近年、がん細胞に特異的なタンパク質及びシグナル伝達に対して作用する分子標的治療薬は比較的副作用発現が少ないとされ、その使用が増加している。しかし、それらの抗がん剤においても皮疹や高血圧等の様々な副作用が発現する (Liu and Kurzrock, 2014)。

それら分子標的治療薬の一つであるボルテゾミブは、本邦において多発性骨髄腫及びマントリン細胞リンパ腫の治療に用いられている (Richardson *et al.*, 2005; Robak *et al.*, 2015)。ボルテゾミブはタンパク質分解酵素複合体であるプロテアソーム阻害作用を有する (Williamson *et al.*, 2009)。プロテアソームはユビキチンにより標識されたタンパク質の分解に関与し、その阻害は細胞内におけるユビキチン化タンパク質を蓄積させることから (Fang *et al.*, 2012)、ボルテゾミブはがん細胞に対しアポトーシス誘導や増殖抑制作用を示すと考えられている。

ボルテゾミブ使用患者では悪心・嘔吐、末梢神経障害などの副作用を引き起こす他、味覚障害が起きることも報告されている (Fanucchi *et al.*, 2006; Voortman *et al.*, 2007)。しかし、その味覚障害の特性や発症機構は明らかになっていない。そこで本章ではボルテゾミブ投与マウスを用いて5基本味に対する味覚感受性の変化及び味受容部位における影響の有無について検討した。

## 実験材料及び方法

### 1. 試薬

ボルテゾミブは LC Laboratories から購入した。その他の試薬は、第 1 章実験材料及び方法 1 項におけるものと同様のものを用い、いずれも特級若しくは、それ以上の規格のものを使用した。

### 2. 実験動物

実験動物には雄性 C57BL/6NCrl マウス (25 週齢; チャールズリバー) を用いた。なお、本実験プロトコールは、京都薬科大学動物実験委員会により承認され、「京都薬科大学動物実験実施規定」に沿って実験を行った。

### 3. 投与方法

ボルテゾミブははじめに DMSO にて 20 mg/mL の溶液とし、これを生理食塩水にて希釈し終濃度 0.1 mg/mL の溶液とした。ボルテゾミブはヒトにおいて静脈内投与もしくは皮下投与により週に 2 回 2 週間 (1, 4, 8 及び 11 日目) 投与後、10 日間の休薬期間をはさみ繰り返し投与される (Fanucchi *et al.*, 2006)。マウスを用いたボルテゾミブの末梢神経障害に関する研究においては休薬期間を設けずに 1 mg/kg の投与量にて週 2 回繰り返し投与するスケジュールが用いられ、神経毒性に起因する電気生理学的及び行動学的な変化が投与開始後 4 週目以降で発現することが報告されている (Bruna *et al.*, 2010)。そこで本検討では、ボルテゾミブを 1 回投与量 1 mg/kg (10 mL/kg) にて週に 2 回 4 週間 (1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 及び 25 日目) 皮下投与により投与した (総投与量 8 mg/kg)。ボルテゾミブ溶液には終濃度として 0.5% の DMSO が含まれていることから、コントロール群には 0.5% DMSO 含有生理食塩水を 10 mL/kg の用量で皮下投与した。

### 4. 生化学的検査値の測定

血漿は第 1 章実験材料及び方法 7 項と同様の方法にて採取した。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase, AST) 及びアラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine transaminase, ALT) はトランスアミナーゼ CII-テストワコー (Wako) を、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase, ALP) はラボアッセイ<sup>TM</sup> ALP (Wako) を、アルブミン、総タンパク質及び A/G 比 (A/G) は A/G B-テストワコー (Wako) を、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen, BUN) は尿素窒素 B-テストワコー (Wako) を、creatinine はラボアッセイ<sup>TM</sup> クレアチニン (Wako) を用いて測定した。

### 5. 血漿中亜鉛量の測定

第 1 章実験材料及び方法 7 項の亜鉛量の測定と同様の方法にて行った。

## 6. Brief access test

### 6-1. 実験器具

試験用のケージとして給水孔 (縦 15 mm、横 10 mm) を開けた黒色遮光のケージ (奥行 24 cm、幅 17 cm、高さ 11.5 cm) を用い、その中にマウスを 1 匹ずつ入れ、黒色の蓋をし、給水孔から水もしくは味溶液を提示した (Fig. 9A)。水及び味溶液は第 1 章実験材料及び方法 6-1 項の実験器具と同様、15 mL ポリプロピレン製チューブとシリコン栓を用い提示したが、給水先管 (夏目製作所) はボール付きの場合、マウスがノズルを舐める範囲が広くなり、lick 行動がセンサーによって感知されないことがあるため、ボール付きではない給水先管を用いた。また、新品のシリコン栓と給水先管を使用した場合、マウスはノズルの匂いを嗅いで lick 行動をとらない傾向があったため、匂いを除去するためにそれらを 15% 炭酸水素ナトリウム (Wako) 水溶液中にて 15 分間沸騰させ、匂いを除去したものを使用した。Lick 数及び lick ratio は第 1 章実験材料及び方法 6-1 項の実験器具と同様の方法で測定及び算出した。

### 6-2. トレーニング方法

まず、マウスに給水孔からの飲水行動を学習させるためのトレーニングを 5 日間行った。トレーニング及び本試験は 1 日の明暗周期のうち、明期 (9:00-18:00) に行った。マウスは 36 時間絶水し、この絶水時間のうちトレーニング又は本試験開始 26 時間前に 2 時間自由飲水させ、その後再度トレーニング又は本試験まで絶水をした。トレーニング初日はマウスに試験環境に慣れさせるため、マウスを試験用ケージに 1 匹ずつ入れ、15 分間水を給水孔から自由摂取させた。2 日目は限られた時間内に lick することを学習させることを目的に、10 秒間水を提示した後 15 秒間給水孔をシャッターで閉じるトレーニングを 10 分間繰り返した。3 及び 4 日目は水を用いてその他は次項に示す本試験と同様の方法で行った。5 日目は本試験と同様の方法で味溶液及び水を提示し、そこで得られたデータを基準値 (Base; Day 0) として用いた。なお、過度な脱水を防ぐため、それぞれのトレーニング終了後、水を 1 時間自由摂取させた。

### 6-3. 5 基本味感受性の試験

ボルテゾミブ投与開始後 2、5、9、12、16、19、23 及び 26 日目に本試験を実施した。本試験の際はトレーニングと同様のスケジュールで予め絶水を行った。まず、マウスを 1 匹ずつ試験用ケージに入れ、水を提示し 10 秒間の lick 数を計測した後、給水孔のシャッターを 15 秒間閉じた。続いて味溶液を提示し 10 秒間の lick 数を計測し、その直後口腔内を洗浄するために水を 5 秒間 lick させ、シャッターを 15 秒間閉じた。この操作を繰り返し行い、甘味及びうま味 (閾値以上で嗜好性を示す味) 溶液は高濃度から、酸味、苦味及び塩味 (閾値以上で嫌悪性を示す味) 溶液は低濃度から順に提示した (Fig. 9B)。本試験では 2 種類の濃度 (低濃度及び高濃度) の味溶液を用いた。甘味として 50 及び 300 mM スクロース水溶液、酸味として 5 及び 10 mM クエン酸水溶液、苦味として 0.3 及び 1 mM QHCl 水溶液、塩味として 150 及び 500 mM 塩化ナトリウム水溶液、うま味として 10 及び 100 mM グルタミン酸ナトリウム

(monosodium glutamate, MSG) 水溶液を使用した。なお、第1章 6-3 項の brief-access test と同様に、水、スクロース水溶液 (50 及び 300 mM) 及び MSG 水溶液 (10 及び 100 mM) 溶液 に対する 10 秒間の lick 数はほぼ同等となり、lick ratio はほぼ 1 となる。そこで、スクロース 及び MSG 濃度依存的な lick ratio を得るため、Murata ら (2003) の報告に基づきそれぞれの溶液 に、0.3 mM QHCl を添加した混合溶液を使用した。また MSG 水溶液は Na を含むことから Na<sup>+</sup>に起因する塩味の影響を防ぐために、Yoshida ら (2010) の報告に基づき、うま味溶液には Na<sup>+</sup>チャンネルの阻害剤である 30 μM の濃度にてアミロライドを添加した。

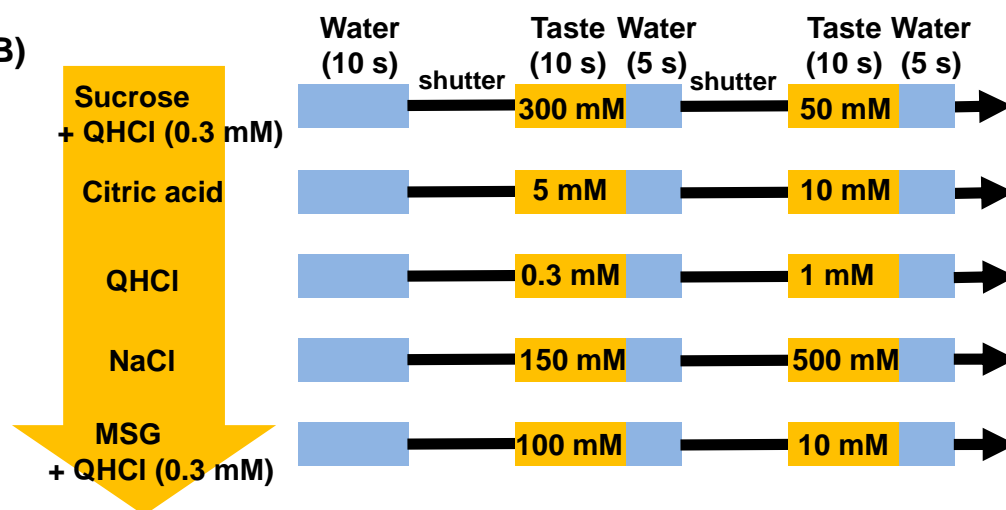
#### 6-4. 酸味感受性の試験

5 基本味感受性の試験と同様の試験スケジュールにて試験を実施した。酸味溶液として、 5、10、30 及び 100 mM のクエン酸及び 3.2、10、16 及び 32 mM の塩酸水溶液を低濃度の溶液から順に提示した (Fig. 9C)。GraphPad Prism を用いて試験より得られた lick ratio と酸味物質濃度からシグモイド曲線を作図し、そこから IC<sub>50</sub> 値を算出した。これらの値を基に酸味溶液に 対する感受性を解析した。

(A)



(B)



(C)

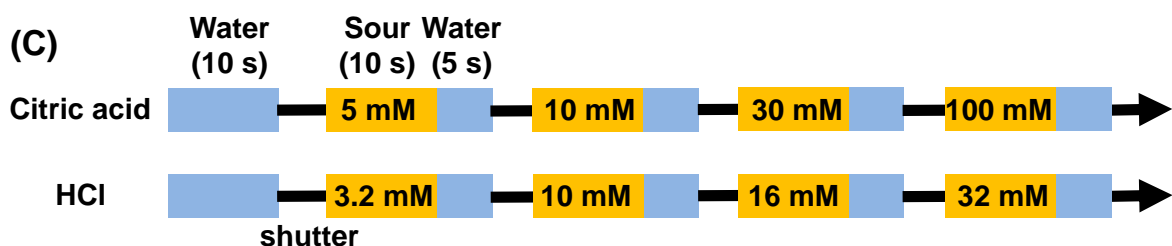


Fig. 9. Protocol of a brief-access test in mice.

## 7. mRNA 検出

第 1 章実験材料及び方法 4-1 項の舌上皮の剥離及び 4-2 項の real-time PCR と同様の方法にて行った。各サンプルの mRNA 発現量は III 型味細胞マーカーである炭酸脱水酵素 IV (carbonic anhydrase IV, Car4) の mRNA 発現量にて補正した。なお、酸味受容体である PKD1L3、PKD2L1 及び Car4 の検出に用いたプライマーの塩基配列は Table 5 に示した。

**Table 5. Primers used for quantitative real-time PCR.**

Gene	Accession Number	Primer sequences		Product size
<i>Pkd1l3</i> (PKD1L3)	NM_181544	Forward	5'-GCCTGTTTCAGATGGTTGAAGTG-3'	116 bp
		Reverse	5'-GCTGGTGGCTTGGTCTTTG-3'	
<i>Pkd2l1</i> (PKD2L1)	NM_181422	Forward	5'-TCATTGTGGGCTGTGAAGTTG-3'	96 bp
		Reverse	5'-TGAGGTAGCGAAGCCGATG-3'	
<i>Car4</i>	NM_007607	Forward	5'-GGTTCAGAGCACAGTATTGATGG-3'	146 bp
		Reverse	5'-CCCTTGTTACCTTGTCTCCTAC-3'	

## 8. 組織染色

### 8-1. 凍結切片の作成

第 1 章実験材料及び方法 5-1 項の凍結切片の作成と同様の方法にて行った。なお、凍結切片の厚さは 20  $\mu\text{m}$  とした。

### 8-2. HE 染色

エオジン染色までの操作は第 1 章実験材料及び方法 5-2 項の HE 染色と同様の方法にて行った。続いて、10% エオジン溶液で 4 分間細胞質を染色した後、再び超純水で 3 回洗浄し、エタノール (70%, 80%, 90% 及び 95%, 3 分間; 100% 3 分間 2 回及び 5 分間 1 回) とキシレン (3 分間 3 回) に浸し、脱水を行い、EUKITT にて封入した。画像は moticam 2000 (Shimazu) により撮影した。

### 8-3. 免疫組織染色

第 1 章実験材料及び方法 5-3 項の免疫組織染色と同様の方法にて行った。なお、使用した一次抗体及び二次抗体の詳細は Table 6 に示した。

**Table 6. Antibodies used for immunohistochemistry.**

Antigen	1 <sup>st</sup> Ab	2 <sup>nd</sup> Ab
AADC	Rabbit anti-AADC Ab (1:200; BML-AZ1030-0050, Enzo)	Donkey anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 (1:1000; A21206, Life Technologies)
Car4	Goat anti-Car4 Ab (1:100; AF2414, R&D Systems)	Donkey anti-goat IgG conjugated with Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 (1:1000; A11016, Life Technologies)
PKD2L1	Rabbit anti-PKD2L1 Ab (1:1000; OSP00055W, Osenses)	Donkey anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 (1:1000; A21206, Life Technologies)



## 9. ウェスタンブロット

### 9-1. タンパク質抽出

茸状乳頭を含むマウス舌上皮及びラット脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion, DRG) はタンパク質抽出用緩衝液 (320 mM スクロース, 0.1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル, 0.5 mM ジイソプロピルホスホロフルオリダート, 1 mM ジチオスレイトール, 10 µg/mL アプロチニン, 5 µg/mL ペプスタチン A, 5 µg/mL ロイペプチン, 5 mM ベンザミジン, 4 mM エチレングリコール四酢酸含有 10 mM HEPES 緩衝液, pH 7.4) 中でホモジナイザーにより破碎し、超音波処理をした。その懸濁液を 4°C、10,000×g の条件下で 10 分間の遠心分離を行い、上清を回収しタンパク質濃度を測定後 2 mg/mL の濃度に調製した。これに等量の Laemmli 緩衝液 (250 mM トリス-塩酸緩衝液, 2% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS), 30% グリセロール, 0.01% ブロモフェノールブルー, 10% 2-メルカプトエタノール, pH 6.8) を加え、1 mg/mL の濃度とし、95°C で 5 分間熱変性を行った。

### 9-2. ウェスタンブロット

9-1 項で抽出したサンプルを 7.5% ポリアクリルアミドに添加し、電気泳動用緩衝液 (25 mM トリス, 192 mM グリシン及び 0.1% SDS) 中で、20 mA/ゲルの定電流にて電気泳動を行った後、転写緩衝液 (100 mM トリス, 192 mM グリシン及び 5% メタノール) 中にて 100 mA の定電流を 120 分間流すことによりゲル内のタンパク質を PVDF 膜 (Millipore) 上へ転写した。転写後の PVDF 膜を TBS-T (20 mM トリス, 137 mM 塩化ナトリウム及び 0.1% Tween-20) にて洗浄し、室温にて 60 分間のブロッキングを行った。ブロッキング緩衝液は 5% スキムミルク (Becton Dickinson) 及び 0.05% アジ化ナトリウム含有 TBS-T を使用した。一次抗体は 5% スキムミルク及び 0.05% アジ化ナトリウム含有 TBS-T により希釈し、4°C にて一晩作用した。二次抗体は 5% スキムミルク含有 TBS-T により希釈し、室温にて 60 分間作用させた。使用した抗体は Table 7 に記す。シグナルは、Western Lightning<sup>®</sup>-ECL (Perkin Elmer) により検出し、感光の際には X 線フィルム (FUJIFILM) を用いた。また、得られたシグナルの強度は Image J software (NIH) により定量した。

**Table 7. Antibodies used for Western blotting.**

Antigen	1 <sup>st</sup> Ab	2 <sup>nd</sup> Ab
TRPV1	Rabbit anti-TRPV1 Ab (1:1000; ab31895, Abcam)	Goat anti-rabbit IgG HRP linked Ab (1:10000; PI-1000, Vector Laboratories)
GAPDH	Mouse anti-GAPDH Ab (1:10000; 016-25523, Wako)	Goat anti-mouse IgG HRP linked Ab (1:10000; PI-2000, Vector Laboratories)

## 10. 統計学的処理

第 1 章実験材料及び方法 8 項の統計学的処理と同様の方法にて処理を行った。

## 実験成績

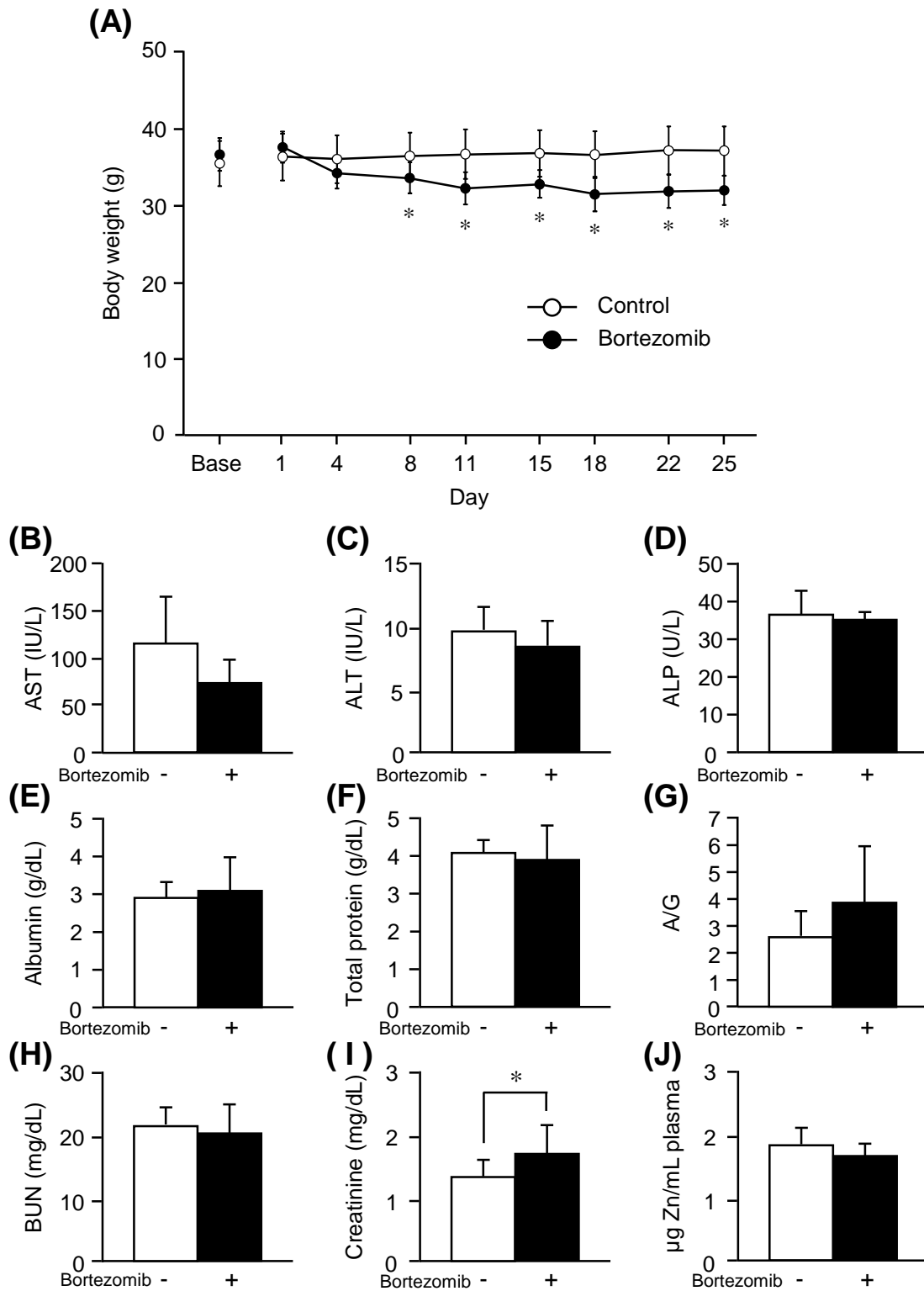
### 1. 体重、生化学的検査値及び血漿中亜鉛量への影響

ボルテゾミブ投与開始時及び投与開始後 1、4、8、11、15、18、22 及び 25 日目におけるマウスの体重変動を Fig. 10A に示す。コントロール群のマウスの体重は投与前から投与開始後 25 日目まで大きな変化はなかったが、ボルテゾミブ投与群の場合、投与開始後 8 日目以降において、コントロール群の場合より有意に小さかった。しかしながら、ボルテゾミブ投与マウスの体毛や便の性状には明らかな変化はなかった。

ボルテゾミブ投与開始後 29 日目における生化学的検査値を測定した結果を Fig. 10B に示す。コントロール群に比べ、ボルテゾミブ投与群において、クレアチニン濃度が有意に高かったが、それ以外の AST、ALT、ALP、アルブミン、総タンパク質、A/G 及び BUN の値に変化はなかった (Fig. 10B-I)。また、血漿中の亜鉛量を測定した結果、コントロール群とボルテゾミブ投与群との間に差異はなかった (Fig. 10J)。

ラットに 0.15 mg/kg のボルテゾミブを週に 3 回繰り返し投与した際にも投与開始後 10 日以内に有意な体重減少が起こることが報告されている (Meregalli *et al.*, 2010)。ボルテゾミブ投与群のマウス 1 匹あたりの摂餌量は、投与開始後 2 日目以降においてコントロール群に比べ有意に小さく (データは示さず)、これによりマウスの体重が減少したと考えられる。ボルテゾミブ投与患者において血中クレアチニン濃度が増加するが (ベルケイド®インタビューフォーム)、ヒトにおいて、ボルテゾミブの投与により、多発性骨髄腫の合併症として起こる腎機能障害が改善することが報告されていることから (Dimopoulos *et al.*, 2009)、今回確認された血漿中クレアチニン濃度の増大は、腎機能の低下によるものではないと考えられる。

これらの結果より、ボルテゾミブ投与により体重減少が起こること、血中クレアチニン濃度の増大が認められるものの、その他の影響は小さいことが示された。



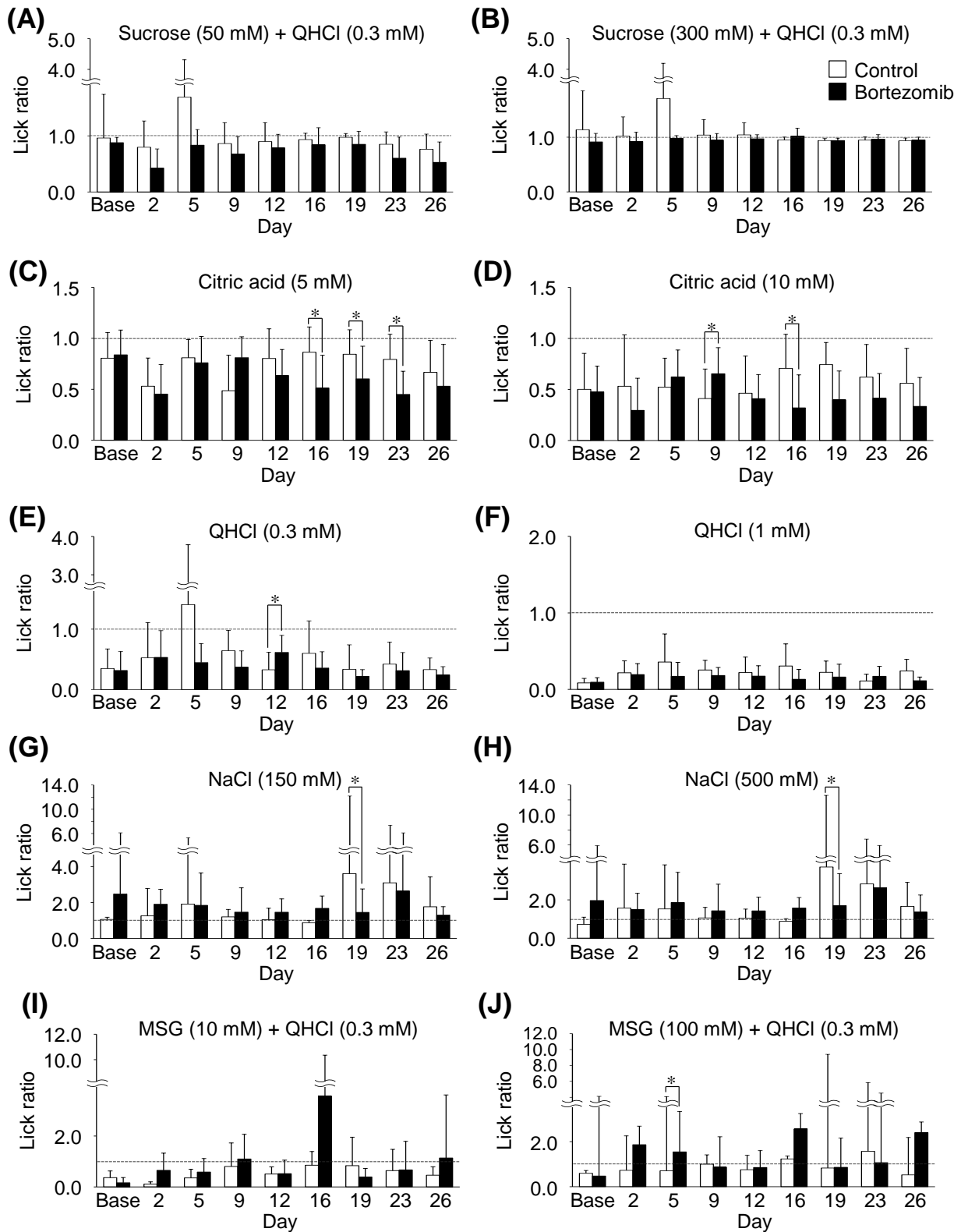
**Fig. 10. Effects of bortezomib on body weight, biochemical parameters and plasma zinc levels in mice.**

(A-I) General toxicity of bortezomib was assessed as body weight (N = 18-20), and AST, ALT, ALP, albumin, total protein, A/G, BUN and creatinine levels in blood plasma (N = 7-10). (J) Zinc levels in plasma were measured by ICP-MS (N = 6-10). Each point or bar represents the mean  $\pm$  SD. \*:  $p < 0.05$  v.s. control.

## 2. 5 基本味感受性への影響

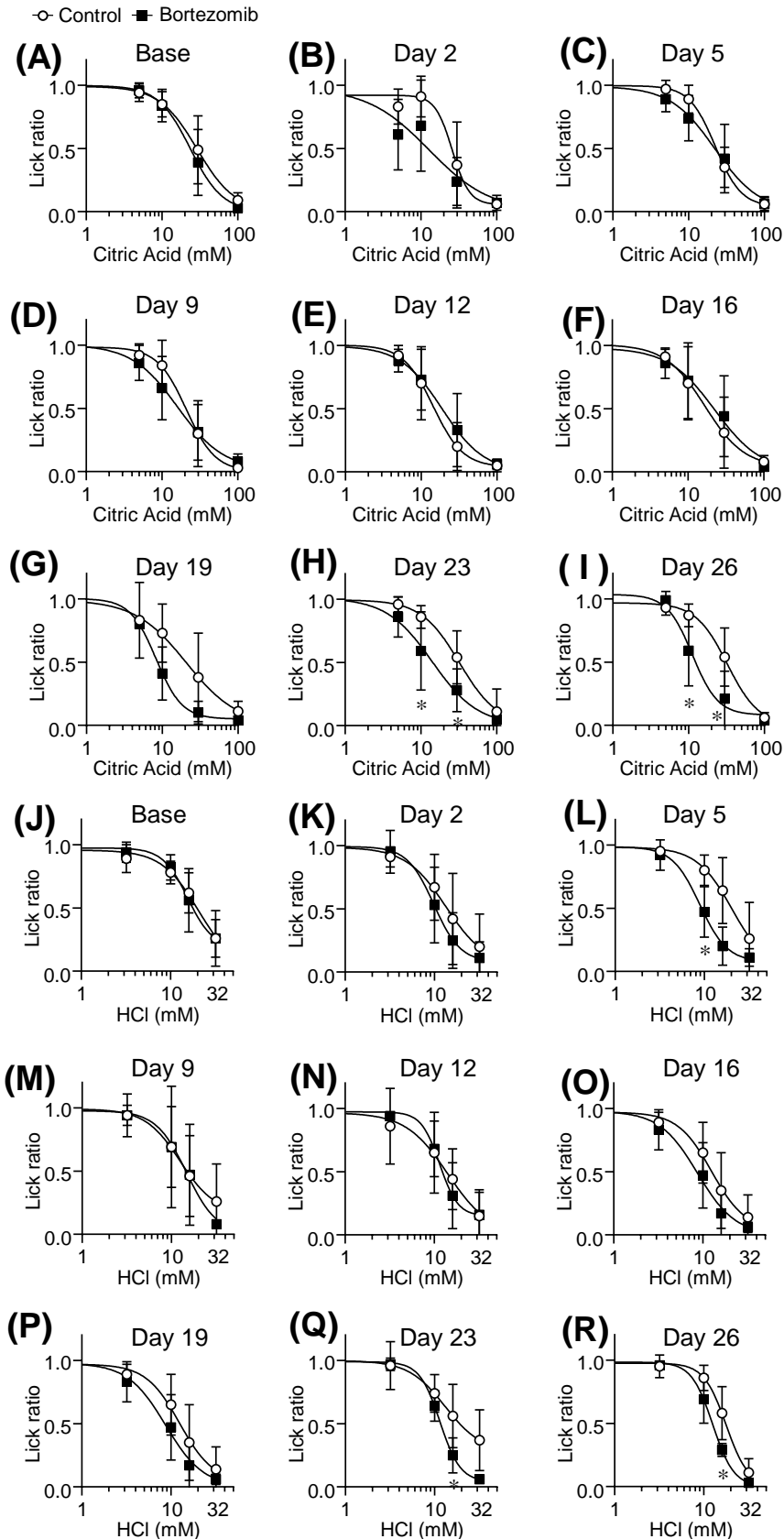
ボルテゾミブ投与の 5 基本味感受性への影響を評価するために **brief-access test** を行った (Fig. 11)。酸味溶液 (クエン酸水溶液) に対する **lick ratio** は、ボルテゾミブ投与群においてその投与開始後 16 日目以降に減少し、この傾向は継続的であった。ボルテゾミブ投与群の酸味溶液を除く各味溶液に対する **lick ratio** には一部で有意な変化が認められたものの継続的ではなかった。これらの結果から、ボルテゾミブ投与は酸味の感受性に影響を与えることが示唆された。

そこでボルテゾミブ投与マウスの酸味感受性についてより詳細に検討するため、2 種類の酸味物質 (クエン酸及び塩酸) の水溶液を用いた **brief-access test** を行った。その結果、いずれの酸味溶液に対しても **lick ratio** は酸味物質の濃度依存的に減少し、ボルテゾミブ投与開始後 23 及び 26 日目におけるボルテゾミブ投与群の 10 及び 30 mM クエン酸水溶液及び 16 mM 塩酸水溶液に対する **lick ratio** は、コントロール群に比べ有意に小さかった (Fig. 12H, I, Q, R)。これらボルテゾミブ群の **lick ratio** に関する近似曲線はコントロール群のそれと比較して左側に移動し、それらから算出される  $IC_{50}$  値はいずれの酸味溶液においてもボルテゾミブ投与開始後 26 日目において有意に小さかった (クエン酸水溶液: コントロール群  $16.5 \pm 3.0$  mM, ボルテゾミブ群:  $11.9 \pm 3.0$  mM; 塩酸水溶液: コントロール群  $17.5 \pm 4.4$  mM, ボルテゾミブ群:  $12.3 \pm 1.9$  mM,  $N = 4-9$ )。これらの結果から、ボルテゾミブの繰り返し投与により酸味感受性が増大することが示された。



**Fig. 11. Responses to five basic taste solutions in bortezomib-administered mice.**

The lick ratios for 50 and 300 mM sucrose with 0.3 mM QHCl (A, B), 5 and 10 mM citric acid (C, D), 0.3 and 1 mM QHCl (E, F), 150 and 500 mM NaCl (G, H), and 10 and 100 mM MSG with 0.3 mM QHCl and 30  $\mu$ M amiloride (I, J) were determined in control and bortezomib-administered mice on days 0 (Base), 2, 5, 9, 12, 16, 19, 23 and 26. Each bar represents the mean  $\pm$  SD (N = 6-10). \*:  $p < 0.05$  v.s. control.



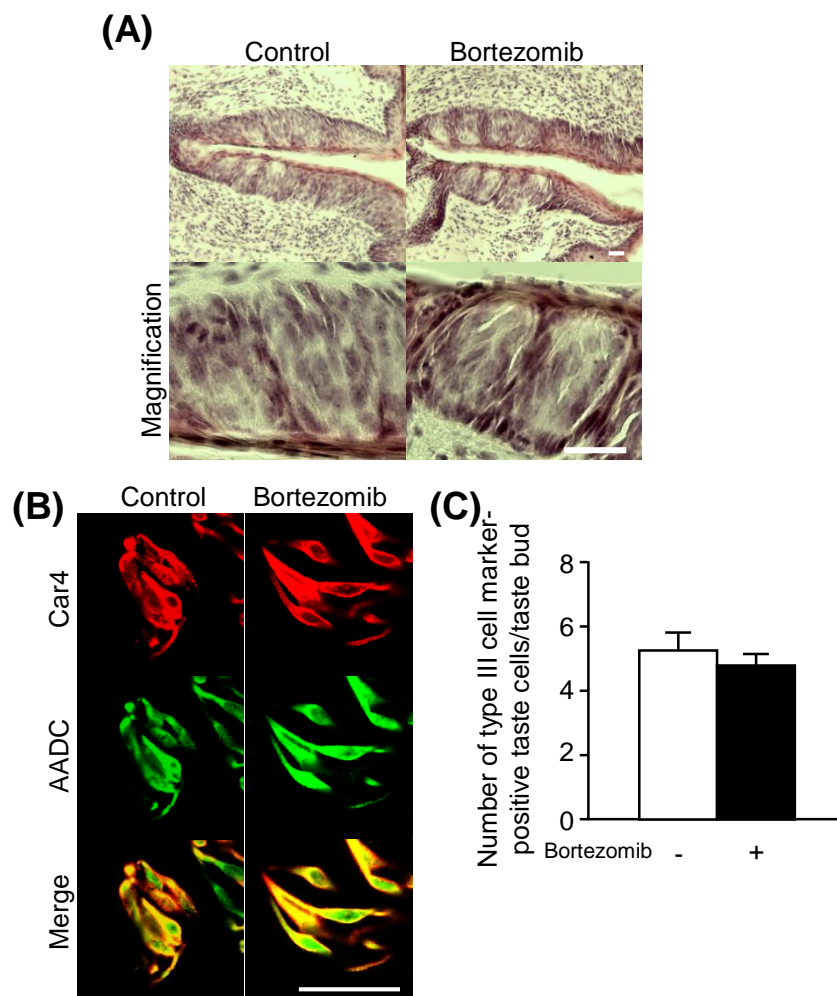
**Fig. 12. Responses to sour taste solutions in bortezomib-administered mice.**

The lick ratios for 5-100 mM citric acid (A-I) and 3.2-32 mM HCl (J-R) were determined in control and bortezomib-administered mice on days 0 (Base), 2, 5, 9, 12, 16, 19, 23 and 26. Each point represents the mean  $\pm$  SD (N = 4-12). \*:  $p < 0.05$  v.s. control. BTZ: bortezomib.

### 3. 有郭乳頭部位における味蕾の形態及び味細胞数への影響

味蕾の組織形態へのボルテゾミブ投与による影響を解析するために有郭乳頭を含む切片のHE染色を行った。ボルテゾミブ投与開始後29日目における有郭乳頭の全体像及び味蕾の拡大写真において、コントロール及びボルテゾミブ投与マウスの切片における味蕾の形態及びサイズ、味蕾中の細胞の形態に明らかな変化はなかった (Fig. 13A)。

酸味はⅢ型味細胞において受容されることから (Huang *et al.*, 2008)、ボルテゾミブ投与による有郭乳頭部位における味蕾内のⅢ型味細胞数への影響を検討した。Ⅲ型味細胞マーカーである Car4 及び AADC を用い、味蕾あたりのいずれかもしくは両マーカー陽性細胞味細胞数をそれらの免疫組織染色像を基に計数した結果、Ⅲ型味細胞マーカー陽性細胞数にコントロール及びボルテゾミブ投与群の間で差はなかった (Fig. 13B, C)。これらの結果から、ボルテゾミブ投与は有郭乳頭部位の組織形態及びⅢ型味細胞数に明らかな影響を及ぼさないことが示された。



**Fig. 13. Morphology of taste buds and number of type III taste cells in the CP of bortezomib-administered mice.**

(A) Representative photomicrographs of HE staining of the CP of control and bortezomib-administered mice on day 29. Scale bar = 50  $\mu$ m. (B, C) Type III taste cells in the CP of control and bortezomib-administered mice. Panel B shows representative immunohistochemical images for Car4 (red) and AADC (green), the quantitative results being given in panel C. Scale bar = 50  $\mu$ m. Each bar represents the mean  $\pm$  SD (N = 4-5).

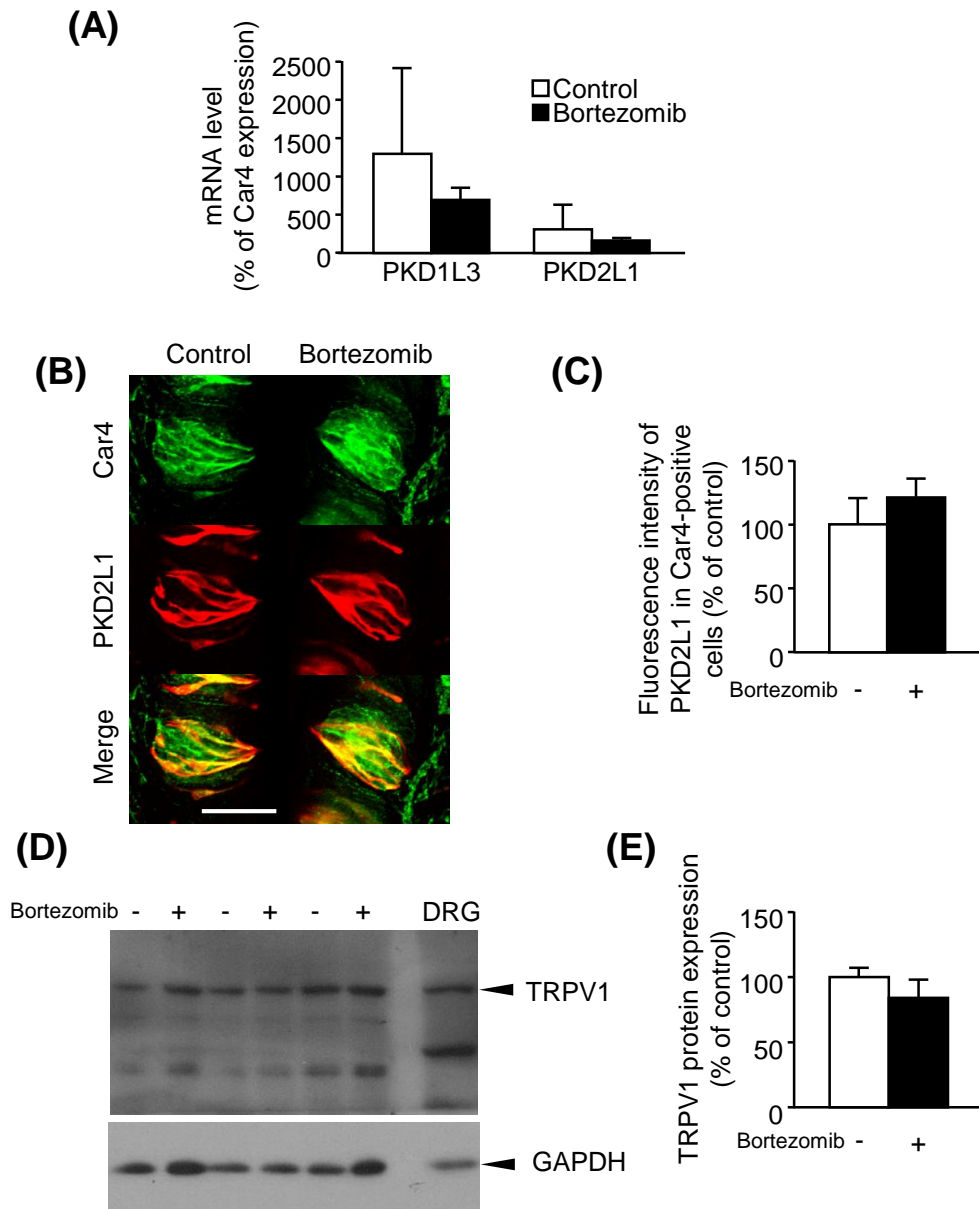
#### 4. PKD1L3、PKD2L1 及び TRPV1 発現量への影響

酸味はⅢ型味細胞に発現する酸味受容体 PKD1L3 及び PKD2L1 により受容される (Lopez-Jimenez *et al.*, 2006; Ishimaru *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006; Kataoka *et al.*, 2008; Horio *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012)。これまでの結果より、ボルテゾミブの繰り返し投与によりマウスの酸味感受性が増大したことから、この PKD1L3 及び PKD2L1 の発現量に対する影響を検討した。その結果、ボルテゾミブ投与後 29 日目において、有郭乳頭における PKD1L3 及び PKD2L1 の mRNA 発現量にコントロール群とボルテゾミブ投与群の間で明らかな差はなかった (Fig. 14A)。さらに、ボルテゾミブ投与マウスの有郭乳頭における PKD2L1 のタンパク質発現量について、免疫組織染色により検討した。Ⅲ型味細胞マーカー Car4 陽性Ⅲ型味細胞における PKD2L1 の免疫活性に由来する蛍光強度は、ボルテゾミブ投与開始後 29 日目においてコントロール群とボルテゾミブ投与群との間で差はなかった (Fig. 14B, C)。

舌上皮において transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) が発現しており (Ishida *et al.*, 2002; Kawashima *et al.*, 2012)、舌への酸味刺激に対する神経応答が TRPV1 のアンタゴニストである I-RTX の前処置により阻害されることから、酸味の受容には TRPV1 も関与することが示唆されている (Arai *et al.*, 2010)。さらに、ボルテゾミブの繰り返し投与によりラット DRG における TRPV1 の発現が増加することが報告されている (Quartu *et al.*, 2014)。そこで、ボルテゾミブ投与開始後 29 日目のマウス舌上皮における TRPV1 発現量をウェスタンブロットにより評価した。その結果、コントロール群及びボルテゾミブ投与群の間で TRPV1 の発現量に明らかな差はなかった (Fig. 14D, E)。

これらの結果から、ボルテゾミブ投与は酸味受容体 PKD1L3、PKD2L1 及び TRPV1 の発現に影響を及ぼさないことが示された。



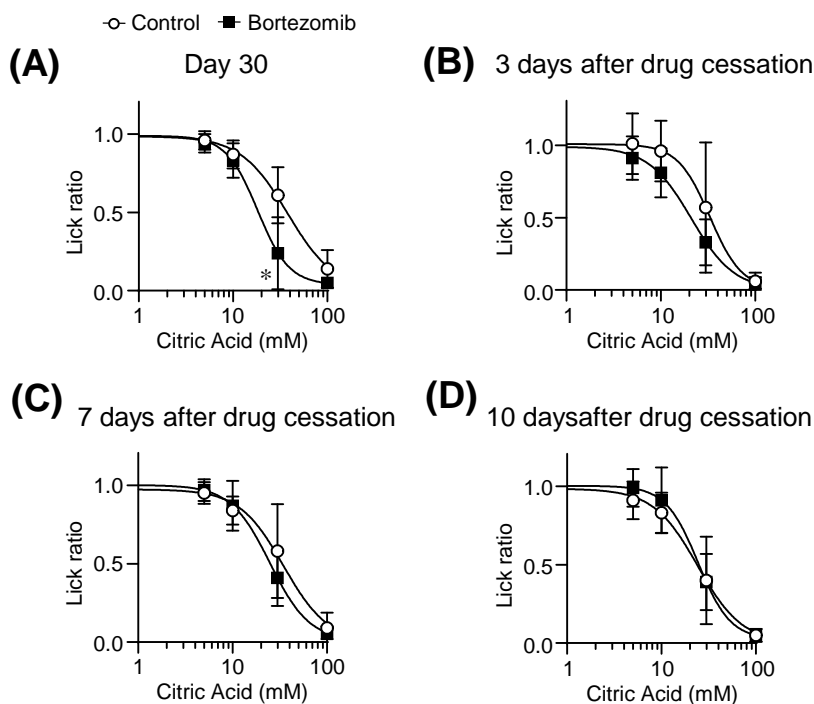


**Fig. 14. Expression levels of PKD1L3 and PKD2L1 in the CP and TRPV1 in the lingual epithelium of bortezomib-administered mice.**

(A) Quantification of the mRNA expression of PKD1L3 and PKD2L1 in the CP of control and bortezomib-administered mice on day 29 was performed by real-time PCR. Data are given as % of Car4 mRNA expression. Panel B shows representative immunohistochemical images for PKD2L1 (green) and Car4 (red) on day 29, the quantitative results of PKD2L1-fluorescent intensity in Car4 -positive cells being given in panel C. Scale bar = 50  $\mu$ m. (D) Representative image of Western blotting for TRPV1 in the mouse lingual epithelium on day 29. The quantified results are shown in panel E. Rat DRG was used as a positive control for TRPV1. Each bar represents the mean  $\pm$  SD (N = 3-5).

## 5. ボルテゾミブ投与中止による酸味感受性の変化

ボルテゾミブの繰り返し投与による酸味感受性の増大が可逆的であるか否かについて明らかにするため、ボルテゾミブの繰り返し投与後に休薬したマウスの酸味感受性の変化について **brief-access test** により検討した。ボルテゾミブの繰り返し投与によりマウスの 30 mM クエン酸水溶液に対する lick ratio はコントロール群のそれに比べ有意に低く、その  $IC_{50}$  値も有意に高かった (Fig. 15A, Table 8)。これらの差はボルテゾミブの繰り返し投与中止から 3 日目以降では認められなかった (Fig. 15B-D)。この結果から、ボルテゾミブの繰り返し投与による酸味感受性の増大は可逆的であることが示された。



**Fig. 15. Responses to citric acid solutions after the termination of multiple bortezomib administration in mice.**

Mice were administered bortezomib or the vehicle following the schedule described under Materials and Methods up to day 36, and a brief access test with 5-100 mM citric acid was performed on day 30, and 3, 7 and 10 days after the final bortezomib administration. Each point represents the mean  $\pm$  SD (N = 5-15). \*:  $p < 0.05$  v.s. control.

**Table 8.  $IC_{50}$  values for sour taste solutions after the termination of multiple bortezomib administration in mice.**

	Citric acid (mM)	
	Control	Bortezomib
Day 30	40.6 $\pm$ 22.4	22.1 $\pm$ 12.1*
3 days after drug cessation	28.9 $\pm$ 12.8	23.7 $\pm$ 9.5
7 days after drug cessation	35.5 $\pm$ 15.3	27.6 $\pm$ 10.1
10 days after drug cessation	29.2 $\pm$ 18.5	26.1 $\pm$ 10.0

Each value represents the mean  $\pm$  SD (N = 5-15). \*:  $p < 0.05$  vs. control on the corresponding day.

## 考 察

本章では、ボルテゾミブ投与による味覚感受性への影響についてマウスを用いて調べた。ボルテゾミブは (1) 酸味感受性を増大すること、(2) 変化した酸味感受性は休業により投与前のレベルまで回復すること、並びに (3) 酸味受容体の発現量の変化、味蕾の形態変化及び味細胞数の変化を引き起こさないことが明らかとなった。

シクロホスファミド投与マウスにおいて、味蕾の形態は投与後 12 日目以降で投与前の状態と同じレベルまで回復し、それとほぼ同時期に甘味及びうま味感受性も回復したことから、シクロホスファミドによる味覚感受性の低下は味蕾の組織が新陳代謝によって更新されることにより回復することが示唆される (Mukherjee and Delay., 2011; Mukherjee *et al.*, 2013)。一方、ボルテゾミブ繰り返し投与マウスにおいて、味蕾組織の形態に変化はなく、また酸味溶液に対する lick ratio の減少は投与中止後 3 日目でコントロール群と同等のレベルまで回復した。繰り返し投与時のボルテゾミブの血中濃度の半減期は 2-3 日であることから (ベルケイド® 添付文書)、酸味感受性の増加及びその回復は少なくとも血中ボルテゾミブ濃度依存的に起こることが示唆される。

ボルテゾミブの作用機序はユビキチン化タンパク質を分解する酵素複合体であるプロテアソームの阻害であり、ボルテゾミブ投与により細胞内にはユビキチン化タンパク質が蓄積する (Fang *et al.*, 2012)。ユビキチンは分解タンパク質の標識としての働きに加え、タンパク質の膜移行の制御 (Takeda *et al.*, 2014)、シグナル伝達 (Wu and Karin, 2015)、DNA 修復 (Kee and Huang, 2015) などの細胞内事象に関わることが報告されている。4 種類に分類される味細胞のうち、Ⅲ型味細胞には protein gene product 9.5 が特異的に発現しており (Yee *et al.*, 2001)、このタンパク質はユビキチン化タンパク質の脱ユビキチン化酵素としての機能を有する (Larsen *et al.*, 1996, 1998)。このことから、ボルテゾミブ投与によりⅢ型味細胞内でユビキチン化タンパク質が蓄積し、細胞内でのユビキチンの恒常性に異常が生じたために、セロトニンシグナリング (Larson *et al.*, 2015) 等の情報伝達系に異常が起こり、Ⅲ型味細胞が関与する味覚である酸味の感受性に異常をきたした可能性が考えられる。しかしながら、このことに関しては今後のより詳細な検討が望まれる。

ボルテゾミブ投与マウスにおいて、血漿中亜鉛濃度、味蕾の形態、Ⅲ型味細胞数及び酸味受容体発現量に変化は認められなかった。酸味受容に関わるタンパク質として PKD1L3、PKD2L1 及び TRPV1 が明らかにされているが、他にも acid-sensing ion channels (ASICs) (Ugawa *et al.*, 1998)、hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel 1 and 4 (Stevens *et al.*, 2001)、two pore domain K<sup>+</sup> channels (Lin *et al.*, 2004) などの分子の酸味受容への関与が議論されている。そのため、ボルテゾミブ投与によりこれらの酸味受容機構に変化が生じ、酸味感受性が変化した可能性も考えられる。これらのことから少なくとも、ボルテゾミブ誘発性味覚障害はシクロホスファミド及びオキサリプラチンとは異なるメカニズムによって発症していることが示唆される。

今回の検討において、マウスへのボルテゾミブ投与により 5 基本味のうち酸味の感受性に特に明らかな変化が認められた。酸味はヒト及びげっ歯類において嫌悪性の味として認識される。これは、腐敗した食品は乳酸発酵により酸性物質を生じることから、酸味を食物の腐敗のシグナルとして察知し、これによって有害物の摂取を回避するためであると考えられている (Chaudhari *et al.*, 2001)。今回、ボルテゾミブ投与マウスは酸味溶液に対して酸味を強く感じ、それによってより強い危険性を感じた結果、その摂取量が減少したと考えられる。一方、ヒトは 5 基本味を統合的に感じながら食物を摂取することから学習によって酸味を呈する食品を摂取することができるようになる。しかし、酸味の感受性が変化することによって、食物の味の感じ方に不調和が生じ、これまで嗜好していた食品に対しても嫌悪すること、それに伴って食欲が低下し、栄養摂取への影響が出現する可能性が考えられる。したがって、この副作用発現により低栄養状態をきたし治療継続に影響が出ることが考えられる。今回、ボルテゾミブ投与によって酸味感受性が亢進されるものの、それは酸味受容機構やⅢ型味細胞数の変化に起因する可能性は低いことが示された。しかしながら、Huang ら (2006) や Horio ら (2011) の報告に基づくと、酸味受容においては PKD1L3 及び PKD2L1 が数多くの分子の中で中心的な役割を果たしていることは容易に推測できる。Ishii ら (2012) は *in vitro* での検討で、カプサイシンの前処置が PKD1L3 及び PKD2L1 の酸刺激に対する応答を抑制したことを報告している。カプサイシンは刺激性があるため口腔内などの炎症所見がある患者への適用はよく考慮する必要があるものの、ボルテゾミブ使用患者において酸味感受性の増加が認められた場合、対処法の一つとして、予めカプサイシン含有食品を摂取することが亢進した酸味感受性の緩和に繋がり、これにより適切な 5 基本味の感受性のバランスが回復し、適切な栄養摂取に繋がる可能性が示唆される。

## 総括

本研究では、抗がん剤誘発性味覚障害の発症メカニズムの解明に繋がる知見を得ることを目的として詳細な検討を行い、以下の成績を得た。

第1章において、オキサリプラチン投与によりラットの甘味感受性が一過性に低下するとともに、これと並行して有郭乳頭において甘味受容体サブユニットの一つである T1R2 の発現量は一過性に増加した。一方、オキサリプラチン投与ラットでは味蕾の形態変化や味細胞数の変化並びに血漿中亜鉛量の変化は認められなかった。これらのことからオキサリプラチン誘発性味覚障害は少なくとも一部、味細胞における味受容体の発現量の増加により起こることが示された。

第2章では、ボルテゾミブの繰り返し投与により酸味の感受性が増大するが、これはボルテゾミブの投与中止により速やかにコントロールレベルまで回復することを明らかにした。ボルテゾミブ投与マウスにおいてもオキサリプラチンの場合と同様、味蕾の形態、味細胞数並びに血漿中亜鉛量に変化は認められず、これらとは異なる因子に対する影響により味覚障害が発症するものと考えられる。

一般的に、抗がん剤によって誘発される味覚障害は、その殺細胞性や細胞周期に対する影響を有することから、細胞の新陳代謝が盛んな部位である味蕾に対する細胞傷害性に起因すると考えられてきた。これに対して著者は、本研究において得られた成果に基づき、抗がん剤誘発性味覚障害は抗がん剤の持つ薬理的/薬物動態学的な特性により味覚感受性に対する影響やその発症機構は異なるという新たな概念を提唱する。

抗がん剤誘発性味覚障害はヒトにおいても可逆的であり、このことが臨床において軽視されがちで対処法が未確立である要因の一つであると考えられる。しかしながら、患者にとって、その回復するまでの期間が問題であり、本来の味覚感受性を取り戻すことを強く望んでいる。本研究において、オキサリプラチン投与はラットの甘味感受性を低下させることが示されたものの、甘味の感受性は残存していることが考えられる。また、ボルテゾミブ投与マウスでは酸味感受性の増加が認められた。これらのことは、いずれの薬剤も完全に味覚感受性を喪失させるわけではなく、少なくとも味受容体の機能は残存していることを示しており、オキサリプラチンとボルテゾミブによる味覚障害は、味受容体を標的として味覚感受性を制御することができる可能性を示唆するものである。これらと同様にその他の薬剤誘発性味覚障害の特徴や発症機構を明らかにすることができれば、その予防・治療法の開発のみならず、発症した患者への対応に繋がるものと期待される。したがって、本研究で得られた知見は、未だ明らかにされていない抗がん剤誘発性味覚障害の発症メカニズムを明らかにし、その対処法を確立していく上で有益な基礎的情報である。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、御懇篤なる御指導と御助言を賜りました恩師 京都薬科大学 衛生化学分野 長澤 一樹 教授ならびに藤本 貞樹 名誉教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に際し、直接の御指導と種々の有益なご助言を賜りました京都薬科大学 衛生化学分野 西田 健太郎 講師に深謝し、心より御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、御助言と御校閲を賜りました京都薬科大学 病態生理学分野 芦原 英司 教授ならびに病態生化学分野 秋葉 聡 教授に深謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、臨床研修の機会をご提供頂くとともに、臨床研究の御指導を賜りました滋賀医科大学医学部附属病院 薬剤部 寺田 智祐 教授、森田 真也 准教授、平 大樹 特任助教をはじめとする薬剤部の皆様に心より感謝申しあげます。

味覚感受性の行動学的試験法の確立に際し、多大なご助言及を賜りました独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 主任研究員 河合 崇行 博士に深謝申し上げます。

また、実験の一部に御協力いただきました山中 優里 学士、宮田 麻衣 学士、生川 晃子 学士、藪 美晴 学士、宮本 花凜 学部生、番匠 咲帆 学部生、今井 瑞香 学部生、中西 椋子 学部生、小林 恭子 学部生、林 亜希子 学部生をはじめとする衛生化学分野研究室員、卒業生の諸氏に深く御礼申し上げます。

研究生生活を送っていくにあたり、互いに叱咤激励しながら切磋琢磨し合いました 沢井製薬株式会社 製剤研究部 瀬川 将平 博士、京都薬科大学 衛生化学分野 古田 能裕 学士 ならびに臨床薬学教育研究センター 地寄 悠悟 学士をはじめとする大学院生の皆様に感謝の意を表すると共に益々のご活躍を祈念いたします。

最後に、研究生生活に理解を示し、様々な面で支えてくださったすべての皆様に深く感謝致します。

## 引用文献

- Adler E., Hoon M. A., Mueller K. L.: Chandrashekar J., Ryba N.J. and Zuker C.S., A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*, **100**, 693-702 (2000).
- Arai T., Ohkuri T., Yasumatsu K., Kaga T., Ninomiya Y.: The role of transient receptor potential vanilloid-1 on neural responses to acids by the chorda tympani, glossopharyngeal and superior laryngeal nerves in mice. *Neuroscience*, **165**, 1476-1489 (2010).
- Argyriou A. A., Cavaletti G., Briani C., Velasco R., Bruna J., Campagnolo M., Alberti P., Bergamo F., Cortinovis D., Cazzaniga M., Santos C., Papadimitriou K., Kalofonos H. P.: Clinical pattern and associations of oxaliplatin acute neurotoxicity: a prospective study in 170 patients with colorectal cancer. *Cancer*, **119**, 438-444 (2013).
- Bartoshuk L. M., Rennert K., Rodin J., Stevens J. C.: Effects of temperature on the perceived sweetness of sucrose. *Physiol. Behav.*, **28**, 905-910 (1982).
- Beidler L. M., Smallman R. L.: Renewal of cells within taste buds. *J. Cell Biol.*, **27**, 263-272 (1965).
- Beyersmann.: Homeostasis and Cellular Functions of Zinc. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, **33**, 764-769 (2002).
- Boltong A., Keast R., Aranda S.: Experiences and consequences of altered taste, flavour and food hedonics during chemotherapy treatment. *Support. Care Cancer*, **20**, 2765-2774 (2012).
- Boughter JD Jr., Raghov S., Nelson TM., Munger SD.: Inbred mouse strains C57BL/6J and DBA/2J vary in sensitivity to a subset of bitter stimuli. *BMC Genet.*, **6**, 36 (2005).
- Bruna J., Udina E., Alé A., Vilches J. J., Vynckier A., Monbaliu J., Silverman L., Navarro X.: Neurophysiological, histological and immunohistochemical characterization of bortezomib-induced neuropathy in mice.: *Exp. Neurol.*, **223**, 599-608 (2010).
- Chandrashekar J., Mueller K. L., Hoon M. A., Adler E., Feng L., Guo W., Zuker C. S., Ryba N. J.: T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, **100**, 703-711 (2000).
- Chaudhari N., Roper S. D.: Molecular and physiological evidence for glutamate (umami) taste transduction via a G protein-coupled receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **855**, 398-406 (1998).
- Chaudhari N., Roper S. D.: The cell biology of taste. *J. Cell Biol.*, **190**, 285-296 (2010).
- Chou H. C., Chien C. L., Huang H. L., Lu K. S.: Effects of zinc deficiency on the vallate papillae and taste buds in rats. *J. Formos. Med. Assoc.*, **100**, 326-335 (2001).
- Clapp TR., Yang R., Stoick CL., Kinnamon SC., Kinnamon JC.: Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway. *J. Comp. Neurol.*, **468**, 311-321 (2004).
- de Gramont A., Figer A., Seymour M., Homerin M., Hmissi A., Cassidy J., Boni C., Cortes-Funes H., Cervantes A., Freyer G., Papamichael D., Le Bail N., Louvet C., Hendler D., de Braud F., Wilson C., Morvan F., Bonetti A.: Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, **18**, 2938-2947 (2000).

- DeFazio R. A., Dvoryanchikov G., Maruyama Y., Kim J. W., Pereira E., Roper S. D., Chaudhari N.: Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *J. Neurosci.*, **26**, 3971-3980 (2006).
- Dimopoulos M. A., Roussou M., Gavriatopoulou M., Zagouri F., Migkou M., Matsouka C., Barbarousi D., Christoulas D., Primenou E., Grapsa I., Terpos E., Kastritis E.: Reversibility of renal impairment in patients with multiple myeloma treated with bortezomib-based regimens: identification of predictive factors. *Clin. Lymphoma Myeloma*, **9**, 302-306 (2009).
- Fang J., Rhyasen G., Bolanos L., Rasch C., Varney M., Wunderlich M., Goyama S., Jansen G., Cloos J., Rigolino C., Cortelezzi A., Mulloy J. C., Oliva E. N., Cuzzola M., Starczynowski D. T.: Cytotoxic effects of bortezomib in myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia depend on autophagy-mediated lysosomal degradation of TRAF6 and repression of PSMA1. *Blood*, **120**, 858-867 (2012).
- Fanucchi M. P., Fossella F. V., Belt R., Natale R., Fidias P., Carbone D. P., Govindan R., Raez L. E., Robert F., Ribeiro M., Akerley W., Kelly K., Limentani S. A., Crawford J., Reimers H. J., Axelrod R., Kashala O., Sheng S., Schiller J. H.: Randomized phase II study of bortezomib alone and bortezomib in combination with docetaxel in previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, **24**, 5025-5033 (2006).
- Farbman A. I. Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae.: *Cell Proliferation*, **13**, 349-357 (1980).
- Fujiwara S., Imada T., Nakagita T., Okada S., Nammoku T., Abe K., Misaka T.: Sweeteners interacting with the transmembrane domain of the human sweet-taste receptor induce sweet-taste synergisms in binary mixtures. *Food Chem.*, **130**, 561-568 (2012).
- Goto T., Komai M., Suzuki H., Furukawa Y.: Long-term zinc deficiency decreases taste sensitivity in rats. *J. Nutr.*, **131**, 305-310 (2001).
- Halyard M. Y., Jatoi A., Sloan J. A., Bearden J. D. 3<sup>rd</sup>., Vora S. A., Atherton P. J., Perez E. A., Soori G., Zalduendo A. C., Zhu A., Stella P. J., Loprinzi C. L.: Does zinc sulfate prevent therapy-induced taste alterations in head and neck cancer patients? Results of phase III double-blind, placebo-controlled trial from the North Central Cancer Treatment Group (N01C4). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **67**, 1318-1322 (2007).
- Hamano H., Yoshinaga K., Eta R., Emori Y., Kawasaki D., Iino Y., Sawada M., Kuroda H., Takei M.: Effect of polaprezinc on taste disorders in zinc-deficient rats. *Biofactors*, **28**, 185-193 (2006).
- Hambidge K. M., Hambidge C., Jacobs M., Baum J. D.: Low levels of zinc in hair, anorexia, poor growth, and hypogeusia in children. *Pediatr. Res.*, **6**, 868-874 (1972).
- Henkin R. I., Bradley D. F.: Hypogeusia corrected by Ni<sup>++</sup> and Zn<sup>++</sup>. *Life Sci.*, **9**, 701-709 (1970).
- Henkin R. I.: Drug-induced taste and smell disorders. Incidence, mechanisms and management related primarily to treatment of sensory receptor dysfunction. *Drug Saf.*, **11**, 318-377 (1994).
- Hirai R., Takao K., Onoda K., Kokubun S., Ikeda M.: Patients with phantogeusia show increased expression of T2R taste receptor genes in their tongues. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **121**, 113-118



(2012).

- Holmes S.: Food avoidance in patients undergoing cancer chemotherapy. *Support. Care Cancer*, **1**, 326-330 (1993).
- Horio N., Yoshida R., Yasumatsu K., Yanagawa Y., Ishimaru Y., Matsunami H., Ninomiya Y.: Sour taste responses in mice lacking PKD channels. *PLOS ONE*, **6**, e200007 (2011).
- Huang A. L., Chen X., Hoon M. A., Chandrashekar J., Guo W., Tränkner D., Ryba N. J. P., Zuker C. S.: The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*, **442**, 934-938 (2006).
- Huang Y. A., Maruyama Y., Stimac R., Roper S. D.: Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *J. Physiol.* **586**, 2903-2912 (2008).
- Huang Y. A., Dando R., Roper S. D.: Autocrine and paracrine roles for ATP and serotonin in mouse taste buds. *J. Neurosci.*, **29**, 13909-13918 (2009).
- Horio N., Yoshida R., Yasumatsu K., Yanagawa Y., Ishimaru Y., Matsunami H., Ninomiya Y.: Sour taste responses in mice lacking PKD channels. *PLOS ONE*, **6**, e20007 (2011).
- Ishida Y., Ugawa S., Ueda T., Murakami S., Shimada S.: Vanilloid receptor subtype-1 (VR1) is specifically localized to taste papillae. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **107**, 17-22 (2002).
- Ishii S., Kurokawa A., Kishi M., Yamagami K., Okada S., Ishimaru Y., Misaka T.: The response of PKD1L3/PKD2L1 to acid stimuli is inhibited by capsaicin and its pungent analogs. *FEBS J.*, **279**, 1857–1870 (2012).
- Ishikawa T., Morita J., Kawachi K., Tagashira H.: Incidence of dysgeusia associated with chemotherapy for cancer. *Jpn. J. Cancer Chemother.* **40**, 1049-1054 (2013).
- Ishimaru Y., Inada H., Kubota M., Zhuang H., Tominaga M., Matsunami H.: Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 12569–12574 (2006).
- Jiang P., Cui M., Zhao B., Snyder L. A., Benard L. M., Osman R., Max M., Margolskee R. F.: Identification of the cyclamate interaction site within the transmembrane domain of the human sweet taste receptor subunit T1R3. *J. Biol. Chem.*, **280**, 34296-34305 (2005).
- Kataoka S., Yang R., Ishimaru Y., Matsunami H., Sévigny J., Kinnamon J. C.: The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse. *Chem. Senses*, **33**, 243-254 (2008).
- Kawashima M., Imura K., Sato I.: Topographical organization of TRPV1-immunoreactive epithelium and CGRP-immunoreactive nerve terminals in rodent tongue. *Eur. J. Histochem.*, **56**, 129-134 (2012).
- Kee Y., Huang T. T.: The role of deubiquitinating enzymes in DNA repair. *Mol. Cell Biol.*, in press (2015).
- Kobayashi T., Tomita H.: Electron microscopic observation of vallate taste buds of zinc-deficient rats with taste disturbance. *Auris Nasus Larynx*, **13**, S25-31 (1986).
- Koizumi T., Fukushima T., Tatai T., Kobayashi T., Sekiguchi N., Sakamoto A., Sasaki S.: Successful treatment of crizotinib-induced dysgeusia by switching to alectinib in ALK-positive non-small cell

- lung cancer. *Lung Cancer*, **88**, 112-113 (2015).
- Komai M., Goto T., Suzuki H., Takeda T., Furukawa Y.: Zinc deficiency and taste dysfunction; contribution of carbonic anhydrase, a zinc-metalloenzyme, to normal taste sensation. *BioFactors*, **12**, 65-70 (2000).
- Kusuhara Y., Yoshida R., Ohkuri T., Yasumatsu K., Voigt A., Hübner S., Maeda K., Boehm U., Meyerhof W., Ninomiya Y.: Taste responses in mice lacking taste receptor subunit T1R1. *J. Physiol.*, **591**, 1967-1985 (2013).
- Larsen C. N., Price J. S., Wilkinson K. D.: Substrate binding and catalysis by ubiquitin C-terminal hydrolases: identification of two active site residues. *Biochemistry*, **35**, 6735-6744 (1996).
- Larsen C. N., Krantz B. A., Wilkinson K. D.: Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry*, **37**, 3358-3368 (1998).
- Larson E. D., Vandenbeuch A., Voigt A., Meyerhof W., Kinnamon S. C., Finger T. E.: The Role of 5-HT<sub>3</sub> Receptors in Signaling from Taste Buds to Nerves. *J. Neurosci.*, **35**, 15984-15995 (2015).
- Lin W., Burks C. A., Hansen D. R., Kinnamon S. C., Gilbertson T. A.: Taste receptor cells express pH-sensitive leak K<sup>+</sup> channels. *J. Neurophysiol.*, **92**, 2909-2919 (2004).
- Liu S., Kurzrock R.: Toxicity of targeted therapy: Implications for response and impact of genetic polymorphisms *Cancer Treat. Rev.*, **40**, 883-891 (2014).
- Lopez-Jimenez N. D., Cavenagh M. M., Sainz E., Cruz-Ithier M. A., Battey J. F., Sullivan S. L.: Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd113 and Pkd211, are co-expressed in a subset of taste receptor cells. *J. Neurochem.*, **98**, 68-77 (2006).
- Martin B., Shin Y. K., White C. M., Ji S., Kim W., Carlson O. D., Napora J. K., Chadwick W., Chapter M., Waschek J. A., Mattson M. P., Maudsley S., Egan J. M.: Vasoactive intestinal peptide-null mice demonstrate enhanced sweet taste preference, dysglycemia, and reduced taste bud leptin receptor expression. *Diabetes*, **59**, 1143-1152 (2010).
- Masuda K., Koizumi A., Nakajima K., Tanaka T., Abe K., Misaka T., Ishiguro M.: Characterization of the modes of binding between human sweet taste receptor and low-molecular-weight sweet compounds. *PLOS ONE*, **7**, e35380 (2012).
- Meregalli C., Canta A., Carozzi V. A., Chiorazzi A., Oggioni N., Gilardini A., Ceresa C., Avezza F., Crippa L., Marmiroli P., Cavaletti G.: Bortezomib-induced painful neuropathy in rats: A behavioral, neurophysiological and pathological study in rats. *Eur. J. Pain*, **14**, 343-350 (2010).
- Minakata Y., Yamagata T., Nakanishi H., Nishimoto T., Nakanishi M., Mune M., Yukawa S.: Severe gustatory disorder caused by cisplatin and etoposide. *Int. J. Clin. Oncol.*, **7**, 124-127 (2002).
- Miura H., Nakayama A., Shindo Y., Kusakabe Y., Tomonari H., Harada S.: Expression of gustducin overlaps with that of type III IP<sub>3</sub> receptor in taste buds of the rat soft palate. *Chem. Senses*, **32**, 689-696 (2007).
- Mukherjee N., Delay E. R.: Cyclophosphamide-induced disruption of umami taste functions and taste epithelium. *Neurosci.*, **192**, 732-745 (2011).
- Mukherjee N., Carroll B. L., Spees J. L., Delay E. R.: Pre-treatment with amifostine protects against

- cyclophosphamide-induced disruption of taste in mice. *PLOS ONE*, **8**, e61607 (2013).
- Murata Y., Nakashima K., Yamada A., Shigemura N., Sasamoto K., Ninomiya Y.: Gurmarin suppression of licking responses to sweetener-quinine mixtures in C57BL mice. *Chem. Senses*, **28**, 237-243 (2003).
- Murray R. G.: Mammalian taste bud type III cell: a critical analysis. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, **95**, 175-188 (1986).
- Nelson G., Hoon M. A., Chandrashekar J., Zhang Y., Ryba N. J., Zuker C. S.: Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, **106**, 381-390 (2001).
- Nelson G., Chandrashekar J., Hoon M. A., Feng L., Zhao G., Ryba N. J., Zuker C. S.: An amino-acid taste receptor. *Nature*, **416**, 199-202 (2002).
- Nguyen H. M., Reyland M. E., Barlow L. A.: Mechanisms of taste bud cell loss after head and neck irradiation. *J. Neurosci.*, **32**, 3474-3484 (2012).
- Nishida K., Kitada T., Kato J., Dohi Y., Nagasawa K.: Expression of equilibrative nucleoside transporter 1 in rat circumvallate papillae. *Neurosci. Lett.*, **533**, 104-108 (2013).
- Nishida K., Kuchiiwa S., Oiso S, Futagawa T., Masuda S., Takeda Y., Yamada K.: Up-regulation of matrix metalloproteinase-3 in the dorsal root ganglion of rats with paclitaxel-induced neuropathy. *Cancer Sci.*, **99**, 1618-1625 (2008).
- Nosrat I. V., Margolskee R. F., Nosrat C. A.: Targeted taste cell-specific overexpression of brain-derived neurotrophic factor in adult taste buds elevates phosphorylated TrkB protein levels in taste cells, increases taste bud size, and promotes gustatory innervation. *J. Biol. Chem.*, **287**, 16791-16800 (2012).
- Oka Y., Butnaru M., von Buchholtz L., Ryba N. J., Zuker C. S.: High salt recruits aversive taste pathways. *Nature*, **494**, 472-475 (2013).
- Onoda K., Hirai R., Takao K., Kokubun S., Ikeda M.: Patients with hypogeusia show changes in expression of T2R taste receptor genes in their tongues. *Laryngoscope*, **121**, 2592-2597 (2011).
- Pumplin D. W., Yu C., Smith D. V.: Light and dark cells of rat vallate taste buds are morphologically distinct cell types. *J. Comp. Neurol.*, **378**, 389-410 (1997).
- Quartu M., Carozzi V. A., Dorsey S. G., Serra M. P., Poddighe L., Picci C., Boi M., Melis T., Del Fiacco M., Meregalli C., Chiorazzi A., Renn C. L., Cavaletti G., Marmiroli P.: Bortezomib treatment produces nocifensive behavior and changes in the expression of TRPV1, CGRP, and substance P in the rat DRG, spinal cord, and sciatic nerve. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 180428 (2014).
- Raymond E., Faivre S., Woynarowski J. M., Chaney S. G.: Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin. Oncol.*, **25**, 4-12 (1998).
- Raymond E., Faivre S., Chaney S., Woynarowski J., Cvitkovic E.: Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol. Cancer Ther.*, **1**, 227-235 (2002).
- Richardson P. G., Sonneveld P., Schuster M. W., Irwin D., Stadtmauer E. A., Facon T., Harousseau J. L., Ben-Yehuda D., Lonial S., Goldschmidt H., Reece D., San-Miguel J. F., Bladé J., Boccadoro M., Cavenagh J., Dalton W. S., Boral A. L., Esseltine D. L., Porter J. B., Schenkein D., Anderson K.C.:

- Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators.: Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.*, **352**, 2487-2498 (2005).
- Robak T., Huang H., Jin J., Zhu J., Liu T., Samoilova O., Pylypenko H., Verhoef G., Siritanaratkul N., Osmanov E., Alexeeva J., Pereira J., Drach J., Mayer J., Hong X., Okamoto R., Pei L., Rooney B., van de Velde H., Cavalli F., LYM-3002 Investigators.: Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma., *N. Engl. J. Med.*, **372**, 944-953 (2015).
- Sakurai M., Egashira N., Kawashiri T., Yano T., Ikesue H., Oishi R.: Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain*, **147**, 165-174 (2009).
- Shimizu M., Goto M., Kawai T., Yamashita A., Kusakabe Y.: Distinct human and mouse membrane trafficking systems for sweet taste receptors T1r2 and T1r3. *PLOS ONE*, **9**, e100425 (2014).
- Stevens D. R., Seifert R., Bufe B., Müller F., Kremmer E., Gauss R., Meyerhof W., Kaupp U. B., Lindemann B.: Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature*, **413**, 631-635 (2001).
- Swartz TD., Savastano DM., Covasa M.: Reduced sensitivity to cholecystokinin in male rats fed a high-fat diet is reversible. *J. Nutr.*, **140**, 1698-1703 (2010).
- Talavera K., Yasumatsu K., Voets T., Droogmans G., Shigemura N., Ninomiya Y., Margolskee R. F., Nilius B.: Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature*, **438**, 1022-1025 (2005).
- Terada K., Horinouchi T., Fujioka Y., Higashi T., Nepal P., Horiguchi M., Karki S., Hatate C., Hoshi A., Harada T., Mai Y., Ohba Y., Miwa S.: Agonist-promoted ubiquitination differentially regulates receptor trafficking of endothelin type A and type B receptors. *J. Biol. Chem.*, **289**, 35283-35295 (2014).
- Tsutsumi R., Goda M., Fujimoto C., Kanno K., Nobe M., Kitamura Y., Abe K., Kawai M., Matsumoto H., Sakai T., Takeda N.: Effects of chemotherapy on gene expression of lingual taste receptors in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope*, in Press (2015).
- Ugawa S., Minami Y., Guo W., Saishin Y., Takatsuji K., Yamamoto T., Tohyama M., Shimada S.: Receptor that leaves a sour taste in the mouth. *Nature*, **395**, 555-556 (1998).
- Voortman J., Smit E. F., Honeywell R., Kuenen B. C., Peters G. J., van de Velde H., Giaccone G.: A parallel dose-escalation study of weekly and twice-weekly bortezomib in combination with gemcitabine and cisplatin in the first-line treatment of patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 3642-3651 (2007).
- Watanabe M., Asatsuma M., Ikui A., Ikeda M., Yamada Y., Nomura S., Igarashi A.: Measurements of several metallic elements and matrix metalloproteinases (MMPs) in saliva from patients with taste disorder. *Chem. Senses*, **30**, 121-125 (2005).
- Williamson M. J., Silva M. D., Terkelsen J., Robertson R., Yu L., Xia C., Hatsis P., Bannerman B., Babcock T., Cao Y., Kupperman E.: The relationship among tumor architecture, pharmacokinetics,

- pharmacodynamics, and efficacy of bortezomib in mouse xenograft models. *Mol. Cancer Ther.*, **8**, 3234-3243 (2009).
- Wu X., Karin M.: Emerging roles of Lys63-linked polyubiquitylation in immune responses. *Immunol. Rev.*, **266**, 161-174 (2015).
- Yamagata T., Nakamura Y., Yamagata Y., Nakanishi M., Matsunaga K., Nakanishi H. Nishimoto T., Minakata Y., Mune M., Yukawa S.: The pilot trial of the prevention of the increase in electrical taste thresholds by zinc containing fluid infusion during chemotherapy to treat primary lung cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **22**, 557-563 (2003).
- Yee C. L., Yang R., Böttger B., Finger T. E., Kinnamon J. C.: "Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J. Comp. Neurol.*, **440**, 97-108 (2001).
- Yoshida S., Endo S., Tomita H.: A double-blind study of the therapeutic efficacy of zinc gluconate on taste disorder. *Auris Nasus Larynx*, **18**, 153-161 (1991).
- Yoshida R., Ohkuri T., Jyotaki M., Yasuo T., Horio N., Yasumatsu K., Sanematsu K., Shigemura N., Yamamoto T., Margolske RF., Ninomiya Y.: Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 935-939 (2010).
- Yu Y., Ulbrich M. H., Li M. H., Dobbins S., Zhang W. K., Tong L., Isacoff E. Y., Yang J.: Molecular mechanism of the assembly of an acid-sensing receptor ion channel complex. *Nat. Commun.*, **3**, 1252 (2012).
- Zhao G. Q., Zhang Y., Hoon M. A., Chandrashekar J., Erlenbach I., Ryba N. J., Zuker C. S.: The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, **115**, 255-266 (2003).
- 株式会社ヤクルト, エルプラット®点滴静注液 50 mg 医薬品添付文書, 第9版 (2015).
- ヤンセンファーマ株式会社, ベルケイド®注射用 3 mg 医薬品添付文書, 第9版 (2015).
- ヤンセンファーマ株式会社, ベルケイド®注射用 3 mg 医薬品インタビューフォーム, 第10版 (2016).
- 厚生労働省, 重篤副作用疾患別対応マニュアル 薬物性味覚障害 (2011).

## 研究業績目録

学位論文の基礎となる報文及び該当する章

- 1) Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida, Yuri Yamanaka, Ai Miyata, Akiko Ikukawa, Miharuru Yabu, Karin Miyamoto, Saho Bansho and Kazuki Nagasawa, Oxaliplatin alters expression of T1R2 receptor and sensitivity to sweet taste in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 578-586 (2016). [第1章]

その他の原著論文

- 1) Kentaro Nishida, Tsunetoshi Nakatani, Akihiro Ohishi, Hiroto Okuda, Youichiro Higashi, Takaaki Matsuo, Sadaki Fujimoto and Kazuki Nagasawa: Mitochondrial dysfunction is involved in P2X7 receptor-mediated neuronal cell death. *J. Neurochem.*, **122**, 1118-1128 (2012).
- 2) Mina Yamamoto, Yosuke Kamatsuka, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida and Kazuki Nagasawa: P2X7 receptors regulate engulfing activity of non-stimulated resting astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **439**, 90-95 (2013).
- 3) Kentaro Nishida, Yukari Dohi, Yuri Yamanaka, Ai Miyata, Katsunobu Tsukamoto, Miharuru Yabu, Akihiro Ohishi and Kazuki Nagasawa: Expression of adenosine A2b receptor in rat type II and III taste cells. *Histochem. Cell Biol.*, **141**, 499-506 (2014).
- 4) Yuuka Kido, Chiyo Kawahara, Yasuko Terai, Akihiro Ohishi, Satoshi Kobayashi, Miki Hayakawa, Yosuke Kamatsuka, Kentaro Nishida and Kazuki Nagasawa: Regulation of activity of P2X7 receptor by its splice variants in cultured mouse astrocytes. *Glia*, **62**, 440-451 (2014).
- 5) Shohei Segawa, Makiko Shibamoto, Mikayo Ogawa, Saori Miyake, Kaho Mizumoto, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida and Kazuki Nagasawa: The effect of divalent metal cations on zinc uptake by mouse Zrt/Irt-like protein 1 (ZIP1). *Life Sci.*, **113**, 40-44 (2014).
- 6) Yosuke Kamatsuka, Manami Fukagawa, Takahiro Furuta, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida and Kazuki Nagasawa: Astrocytes, but not neurons, exhibit constitutive activation of P2X7R receptors in mouse acute slices under non-stimulated resting conditions. *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 1958-1962 (2014).
- 7) Shohei Segawa, Nao Tatsumi, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida and Kazuki Nagasawa: Characterization of zinc uptake by mouse primary cultured astrocytes and microglia. *Metallomics*, **7**, 1067-1077 (2015).
- 8) Akihiro Ohishi, Yugo Chisaki, Daiki Hira, Kazuki Nagasawa and Tomohiro Terada: Opioid analgesics increase incidence of somnolence and dizziness as adverse effects of pregabalin: a retrospective study. *J. Pharm. Health Care. Sci.*, **1**, 30 (2015).
- 9) Akihiro Ohishi, Yuka Keno, Ayaka Marumiya, Yugo Sudo, Yukako Uda, Kinuyo Matsuda, Yuki Morita, Takahiro Furuta, Kentaro Nishida and Kazuki Nagasawa: Expression level of P2X7 receptor is a determinant of ATP-induced death of mouse cultured neurons. *Neuroscience*, **319**, 35-45 (2016).

発表学会

- 1) 大石晃弘、吉川由希子、芝本真紀子、西田健太郎、長澤一樹：亜鉛トランスポータ ZIP1 強制発現系の構築とその機能評価。日本薬学会第 131 年会 (静岡), 2011. 3.
- 2) 大石晃弘、中谷庸寿、西田健太郎、長澤一樹：P2X7 受容体活性化を介したラット大脳皮質神経細胞死へのミトコンドリア機能異常の関与。生物分子システムに基づく創薬科学フロンティア研究成果発表会 (京都), 2012. 12.
- 3) 西田健太郎、加藤淳貴、久保田晃代、松本沙希、生川晃子、大石晃弘、松尾剛明、長澤一樹：ラット有郭乳頭における ATP 分解酵素の発現解析。日本味と匂学会 第 46 回大会 (大阪), 2012. 10.
- 4) 西田健太郎、中谷庸寿、大石晃弘、松尾剛明、長澤一樹：P2X7 受容体を介した神経細胞死におけるミトコンドリア機能異常の関与。第 62 回日本薬学会 近畿支部総会・大会 (兵庫), 2012. 10.
- 5) 大石晃弘、地寄悠吾、阪中美紀、須藤正朝、森井博朗、平 大樹、森田真也、長澤一樹、寺田智祐：中枢神経抑制薬の併用によりプレガバリンの副作用発現率は上昇する。日本薬学会第 133 年会 (神奈川), 2013. 3.
- 6) 西田健太郎、山中優里、宮田麻依、小西一誠、薮 美晴、塚本勝信、大石晃弘、長澤一樹：ラットの甘味感受性に対するオキサリプラチンの影響。Neuro2013 (京都), 2013. 6.
- 7) 西田健太郎、山中優里、宮田麻依、田中美早、番匠咲帆、宮本花凜、大石晃弘、長澤一樹：Oxaliplatin 投与ラットにおける甘味感受性の変化について。日本味と匂学会第 47 回大会 (宮城), 2013. 9.
- 8) 西田健太郎、山中優里、宮田麻依、小西一誠、薮美晴、生川晃子、田中美早、番匠咲帆、宮本花凜、大石晃弘、長澤一樹：Oxaliplatin による味覚障害発症機序の基礎的検討 ～味受容体の発現及び味細胞数への影響～。第 86 回日本生化学会大会 (神奈川), 2013. 9.
- 9) Nishida K, Ohishi A, Yamanaka Y, Miyata A, Yabu M, Konishi I, Nagasawa K: Sweet taste receptor expression is upregulated in oxaliplatin-administered rats. *The 11th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2013, AISCRIB 2013) (Fukuoka, Japan)*, 2013. 10.
- 10) 早川美紀、大石晃弘、小林哲、鎌塚洋祐、寺井易子、西田健太郎、長澤一樹：マウスアストロサイトに発現する P2X7 受容体はその splice variants 3 及び 4 によって制御される。第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都), 2013. 10.
- 11) 大石晃弘、西田健太郎、長澤一樹：味蕾の味覚情報伝達における ATP シグナリング制御機構の解明。第 3 回 4 大学連携研究フォーラム (京都工芸繊維大学、京都府立医科大学、京都府立大学、京都薬科大学) (京都), 2013. 12.
- 12) 番匠咲帆、宮田麻依、山中優里、宮本花凜、小西一誠、薮美晴、大石晃弘、西田健太郎、長澤一樹：Oxaliplatin 投与ラットにおける味覚機能の変化。日本薬学会第 134 年会 (熊本), 2014. 3.
- 13) 大石晃弘、久保田晃代、松本沙希、加藤淳貴、土肥由香里、西田健太郎、長澤一樹：ラット

- 味蕾における adenine nucleotide / nucleoside 味覚情報伝達機構の解明. 日本薬学会第 134 年会 (熊本), 2014. 3.
- 14) Nagasawa K, Yamamoto M, Kamatsuka Y, Furuta T, Ohishi A, Nishida K: P2X7 receptors regulate engulfing activity of non-stimulated resting astrocytes. Purine 2014, (Bonn, Germany), 2014. 7
  - 15) 宮本花凜、大石晃弘、番匠咲帆、今井瑞香、中西椋子、小西一誠、西田健太郎、長澤一樹：ボルテゾミブ投与はマウスの味覚感受性に影響を与える。第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都), 2014. 10.
  - 16) 西田健太郎、山中優里、宮田麻依、番匠咲帆、宮本花凜、大石晃弘、長澤一樹：Oxaliplatin 誘発性味覚障害発症メカニズムの解析 一味覚感受性、味受容体の発現及び味細胞数の統合的解析—。第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都), 2014. 10.
  - 17) 大石晃弘、宮本花凜、今井瑞香、中西椋子、小西一誠、西田健太郎、長澤一樹：ボルテゾミブ投与マウスにおける味覚感受性の変化。日本味と匂学会第 48 回大会 (静岡), 2014. 10.
  - 18) Nishida K, Ohishi A, Nagasawa K: Expression profile of ectonucleotidases and equilibrative nucleoside transporter in the rat circumvallate papillae. NEUROSCIENCE 2014 (Washington, DC), 2014. 11.
  - 19) 宮本花凜、大石晃弘、番匠咲帆、今井瑞香、中西椋子、西田健太郎、長澤一樹：Bortezomib 投与マウスにおける味覚感受性の変化。日本薬学会第 135 年会 (兵庫), 2015. 3.
  - 20) 大石晃弘、山中優里、宮本花凜、番匠咲帆、藪美晴、西田健太郎、長澤一樹：オキサリプラチンによるラット味覚感受性の変化。日本薬学会第 135 年会 (兵庫), 2015. 3.
  - 21) 大石晃弘、土居明日香、藪美晴、塚本勝信、小西一誠、西田健太郎、長澤一樹：ラット味蕾での細胞周期に対するオキサリプラチンの影響。日本味と匂学会第 49 回大会 (岐阜), 2015. 9.
  - 22) 中西椋子、大石晃弘、宮本花凜、今井瑞香、小林恭子、林亜希子、西田健太郎、長澤一樹：Bortezomib 投与によりマウス酸味感受性は増加する。第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (大阪), 2015. 10.
  - 23) 大石晃弘、宮本花凜、今井瑞香、中西椋子、小林恭子、林亜希子、西田健太郎、長澤一樹：ボルテゾミブ投与による味覚障害モデルマウスの味覚感受性の変化。第 25 回日本医療薬学会年会 (神奈川), 2015. 11.
  - 24) 西田健太郎、大石晃弘、宮本花凜、番匠咲帆、今井瑞香、中西椋子、小林恭子、林亜希子、長澤一樹：ボルテゾミブ誘発性味覚障害マウスでは酸味感受性が増大する。日本臨床腫瘍薬学会学術大会 2016 (鹿児島), 2016. 3.