

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04419

研究課題名(和文) 味覚受容体遺伝子解析による客観的味覚診断法の確立

研究課題名(英文) Objective taste diagnosis following expression of umami-taste-related genes in the tongue

研究代表者

笹野 高嗣 (sasano, takashi)

東北大学・歯学研究科・名誉教授

研究者番号：10125560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本で行われている味覚検査法は主観的検査であるために、認知症患者などでは評価できない。我々はPCRを用いて舌の味覚受容体の定量的測定法を試みた。免疫組織学的に舌検体中のgustducin存在を確認し、リアルタイムPCRで味覚受容体の遺伝子発現量を測定したが、検体量が微量で測定不能であったためデジタルPCRに変更し、現在プライマーの設計を繰り返している。

一方、我々はcyclophosphamide化学療法中を受けている患者の味覚変化を測定し、50%以上の患者に次の治療前に10%未満味覚の低下を確認した。化学療法による味覚変化の評価には客観的ならびに主観的評価が不可欠であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では、超高齢化や食生活の変化などを背景に味覚障害患者が急増している。味覚障害は単なる感覚障害に留まらず、高齢者では食欲不振から体重減少、さらに体調不良に陥る場合が多い。現在、臨床で行われている味覚検査法は、患者の主観に基づいた測定方法であり、高齢者に多くみられる認知症では検査ができない。今回我々が開発をめざしているPCRを用いた舌の味覚受容体定量測定法は、認知症患者などに、味覚の客観的評価法を可能にするものである。本方法の確立は、高齢者に潜在する味覚障害の発見を可能とし、健康長寿に寄与する。

研究成果の概要(英文)：In Japan, gustatory function is generally assessed using the electrogustometry and the filter paper disk method. However, these are not necessarily useful for patients who cannot express their taste sensation, because of subjective test. So, we investigated whether taste receptors can be quantitatively detected with digital polymerase chain reaction (PCR) analysis using human samples from tongue. Until now, immunocytochemistry staining of gustducin, a taste-cell specific G protein, and gene expression analysis by digital PCR of taste receptors were performed. But, each PCR product was not enough rate of identification, we are repeatedly devising primer designs.

We also studied about the effects of chemotherapy on taste alterations. Chemotherapy induced taste alterations in more than 50% of patients, which decreased to less than 10% immediately before the next chemotherapy cycle. A combination of objective and subjective assessments is essential to evaluate taste alterations.

研究分野：口腔診断学

キーワード：味覚障害 味覚遺伝子発現 客観的味覚測定法

1. 研究開始当初の背景

我が国では、超高齢化や食生活の変化などを背景に味覚障害患者が急増している。味覚障害は単なる感覚障害に留まらず、高齢者では食欲不振から体重減少、さらに体調不良に陥る場合が多い。現在、臨床で行われている味覚検査法は、障害を受けている味覚神経を同定する「電気味覚検査」：3つの異なる味覚神経支配領域毎に、電気刺激で生じる金属味を利用して、電気味覚が生じる閾値電流量を主観的に測定する。障害されている味質を同定する「濾紙ディスク法」：5つの基本味(甘味・塩味・酸味・うま味・苦味)に対して、濃度が異なる複数の味溶液を用いて、各味質に対する感受性が生じる閾値濃度を主観的に測定する。この2つの味覚検査法で行われている。しかしながら、これらの方法は患者の主観に基づいた測定方法である。従って、高齢者に多くみられる認知症など自分の感覚を正確に表現できない患者では検査ができない欠点があった。しかしながら、これまで認知症などを有する味覚障害患者の味覚を評価する客観的測定方法はなく、味覚障害から体調不良に陥る高齢者患者が問題になっていた。

2. 研究の目的

本研究は、これまでになかった味覚の客観的測定方法の開発を目的とする。具体的には、患者の舌粘膜に発現している「味覚受容体遺伝子」の量を、デジタル PCR を用いて定量的に測定し、その量に応じた味覚評価判定法を構築する。本研究は、さらに、低栄養のリスクである味覚障害を的確に診断し治療することを可能にし、高齢化社会の健康長寿に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

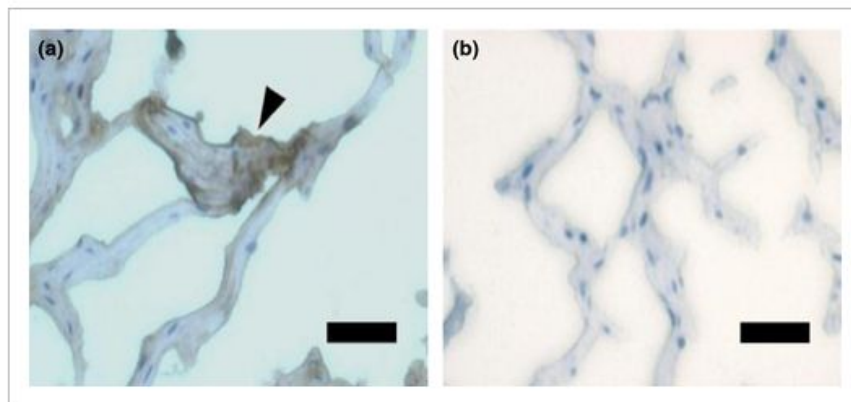
(1)まず、健常者の舌粘膜を非侵襲的に擦過し、舌粘膜検体を採取する。次に、採取した舌粘膜検体中に味細胞(味覚受容体遺伝子を有する細胞)が、実際に含まれているかを確認するために、味細胞の特異的 G 蛋白質であるガストデュエリンを用いた免疫組織染色を行う。免疫組織染色で味細胞の存在を確認した後に、リアルタイム PCR を用いて、味質種類毎に異なる味覚受容体に対して、それぞれの遺伝子発現量測定方法を確立する。具体的には、味質種類毎に別々に(甘味は T1R2/T1R3、うま味は T1R1/T1R2、苦味は T2Rs など)測定に必要なプライマーを設計する。次に設計したプライマーを用いて、舌粘膜検体中の各種味覚受容体遺伝子発現量を定量する。十分な量を定量できたか否か検討する。また、プライマー設計ではシーケンス解析を行い、適正なプライマーが作成されたか否かを確認する。

(2)実際の味覚障害患者において、デジタル PCR を用いて味覚受容体遺伝子発現量を測定し、従来の主観的味覚検査法との整合性を検討する。具体的には、化学療法中の患者(化学療法での薬剤投与後日数により、味覚障害程度が変動することが知られている)を対象に、薬剤投与後経時的に舌粘膜を非侵襲的に採取し、味覚受容体遺伝子発現量の変化を定量的に測定し、従来の味覚検査法と比較検討する。

4. 研究成果

(1)まず、健常者の舌粘膜擦過検体を用いて、免疫組織染色を行った。その結

果、検体中に味細胞の特異的 G 蛋白質であるガストデュージンに染まる細胞、すなわち味細胞の存在を確認することができた(図 1)。次に、リアルタイム PCR を用い、うま味と苦味のそれぞれのプライマーを設計して(シーケンス解析もクリアした) 健常者の舌粘膜検体中のそれぞれの味覚受容体遺伝子発現量を定量してみたが、擦過法で採取できる検体量はごく僅かであるために、定量は不十分な結果を繰り返した。そのため、微量な検体の測定が可能であるデジタル PCR に測定方法を変更することにした。デジタル PCR 用に、うま味と苦味のそれぞれのプライマーを設計したが、適正なプライマーがなかなか得られず実験を繰り返した。漸く、適正と思われるプライマーが設計できた時に、使用中のデジタル PCR の故障が判明し、研究を中断せざるを得なかった。残念ながら、現在、デジタル PCR を修理し研究を再開する準備中であつたが、新型コロナウイルス感染拡大のために部品の調達が遅れている。

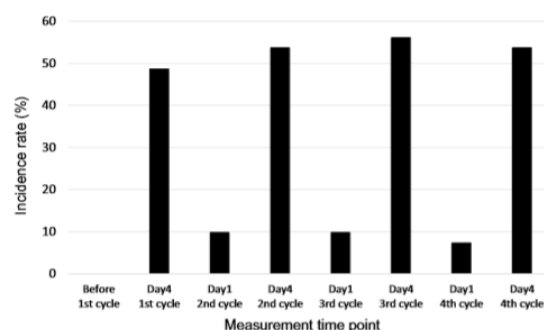


(図 1)

(2)実際の味覚障害患者において、PCR を用いた味覚受容体遺伝子発現量を測定し、従来の味覚検査法との比較を試みた。しかしながら、採取した患者の検体は、上記のデジタル PCR 法が中断しているため、味覚受容体遺伝子発現量を測定することはできなかつた(検体は冷凍庫に保管中)。そこで、遺伝子発現量測定を除いて、味覚障害患者で測定した従来の味覚検査法による測定結果を、患者自覚(味覚障害感)と比較し、論文を作成した。以下に、その結果を記す。

乳癌患者で 3 サイクルの cyclophosphamide 化学療法を受ける患者 41 名を対象とした。患者の味覚変化を、cyclophosphamide 化学療法を受けている治療期間中に継続的に測定し、化学療法が味覚変化に及ぼす影響について検討した。味覚は、問診票による患者の自覚的味覚変化のアンケート調査と、濾紙ディスク法(4 基本味はテストディスク法、うま味は我々が開発したうま味検査法)により 5 基本味の認知閾値を測定した。その結果、50%以上の患者に、化学療法前と比較して化学療法 1 サイクル 4 日目、化学療法 2 サイクル 4 日目、化学療法 3 サイクル 4 日目、化学療法 4 サイクル 4 日目に、自覚的味覚低下(Fig.1)および 5 基本全ての認知閾値の上

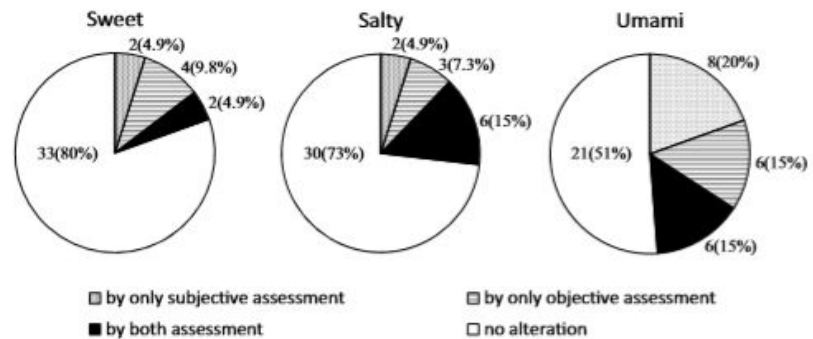
Fig. 1 Incidence of subjective taste alterations at each time point. Those at day 4 following anticancer drug administration in cycles 1-4 were 49%, 54%, 56%, and 54%, respectively



昇（味覚感受性の低下）がみられた。なお、濾紙ディスク法において、化学療法前と比較して有意差が得られた味質はうま味のみであった（Fig.1）。

また、患者の自覚的味覚低下感と、濾紙ディスク法による味覚障害（味覚感受性の低下）の関連は、両者ともに低下がみられるのみの者、自覚的味覚だけの低下がみられる者、濾紙ディスク法だけの低下がみられる者のそれぞれにみられた（Fig.3）。

Fig. 3 Differences of taste alteration detection between subjective and objective assessments. Pie charts demonstrated the proportion of 'taste alteration detected by only subjective assessment', 'taste alteration detected by only objective assessment', 'taste alteration detected by both subjective and objective assessment' and no detection on sweet, salty, and umami



この結果から、化学療法による味覚変化の評価には、患者の自覚評価と濾紙ディスク法による評価の両方が不可欠であることが判明した。

今後、デジタル PCR の開発をすすめ、患者から採取した検体（各サイクル毎に採取していた）の味覚受容体遺伝子発現量を測定し、化学療法中の味覚受容体発現量の変化と、従来の味覚検査法である濾紙ディスク法の変化との相関の有無について検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Satoh-Kuriwada S, Shoji N, Miyake H, Watanabe C, Sasano T.	4. 巻 Article ID 3847075
2. 論文標題 Effects and mechanisms of tastants on gustatory-salivary reflex in human minor salivary glands.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioMed Research International.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Trchootham D, satoh-kuriwada S, Lam-ubol A Promkam C, Chotechuang N, Sasano T, Shoji N.	4. 巻 43
2. 論文標題 Differences in taste perception and spicy preference: A Thai-Japanese cross-cultural study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Senses	6. 最初と最後の頁 65-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/chemse/bjx071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yakaki M, Saito H, Isono K, Goto T, Shirakawa H, Shoji N, Satoh-Kuriwada S, Sasano T, Okada R, Kudoh K, Motoi F, Unno M, Komai M.	4. 巻 63
2. 論文標題 Genotyping analysis of bitter-taste receptor gene TAS2R38 and TAS2R46 in Japanese patients with gastrointestinal cancers.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).	6. 最初と最後の頁 148-154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 笹野 高嗣	4. 巻 27
2. 論文標題 特集 口腔顎顔面に関する疾患とその治療の現状 「味覚とその異常」	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Calcium	6. 最初と最後の頁 27-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 笹野 高嗣	4. 巻 58
2. 論文標題 小唾液腺をターゲットとしたumamiによるドライマウス治療	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本唾液腺学会誌	6. 最初と最後の頁 53-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 笹野高嗣
2. 発表標題 Umamiによる味覚障害・ドライマウス治療
3. 学会等名 第21回日本病態栄養学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹野高嗣
2. 発表標題 味覚と健康 とくに「うま味」感覚の重要性
3. 学会等名 第21回日本病態栄養学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤しづ子
2. 発表標題 うま味によるヒト小唾液腺における味覚-唾液反射について
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 傳田祐也、庄司憲明、岡村卓朗、新倉直樹、徳田裕、佐藤しづ子、太田嘉英、笹野高嗣
2. 発表標題 乳がん薬物療法による味覚障害について
3. 学会等名 日本味と匂学会 第52回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sasano T, Satoh-Kuriwada S, Shoji N.
2. 発表標題 Smoking can affect bitter, sweet, umami taste receptors gene expression.
3. 学会等名 95th International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shoji N, Satoh-Kuriwada S, Sasano T.
2. 発表標題 Genetic diagnosis of umami taste based on receptor gene expression.
3. 学会等名 95th International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤しづ子、笹野高嗣	4. 発行年 2017年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 198
3. 書名 だしの科学 4.5 医療現場でのだしの活用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菅原 由美子 (sugawara yumiko) (30235866)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	佐藤 しづ子 (sato shizuko) (60225274)	東北大学・歯学研究科・助教 (11301)	
研究分担者	嶋田 雄介 (shimada yuusuke) (60789163)	東北大学・大学病院・医員 (11301)	
研究分担者	庄司 憲明 (shoji noriaki) (70250800)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	飯久保 正弘 (iikubo masahiro) (80302157)	東北大学・歯学研究科・講師 (11301)	