

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592465

研究課題名（和文） 高齢化社会における簡便迅速な唾液中炭酸脱水酵素を指標とした味覚障害評価法の実用化

研究課題名（英文） Fundamental Evaluation of taste dysfunction in the aging society as a New Rapid Diagnostic Method using Carbonic Anhydrase VI in Parotid Saliva

研究代表者

島崎 伸子（SHIMAZAKI NOBUKO）

岩手医科大学・歯学部・常任研究員

研究者番号：30337258

研究成果の概要（和文）：

味覚障害患者の約 70%に亜鉛内服治療が有効であるといわれている。唾液の中の亜鉛結合タンパク質である炭酸脱水酵素VI型が味覚機能に関与するとの報告に基づき、作製した抗体を用いて、迅速簡便なイムノクロマト法を用いた診断を血液検査の代わりに応用することを目的とし、反応性評価試験を行った。その結果、PBS（-）と陽性コントロール（合成ペプチド）において発色の差異が見られ、さらに希釈倍率した耳下腺唾液においては、濃度に依存して発色がみられた。従って、この方法を用いることにより、血液採取ではなく、唾液採取することにより、簡便迅速に味覚障害の診断法の確立が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It is known that more than 70% of patients with taste dysfunction have zinc deficiency. Carbonic anhydrase (CA) VI, zinc metallo-protein found in human saliva and is involved in taste dysfunction. Therefore, we developed a new quick and simple method of diagnosis using an immunochromatography assay to be used as an on-site test in substitution for a blood test. First, reactivity with a serum antibody was evaluated and compared to a control and detected with colloidal gold. A difference in color development was observed between samples of PBS (-) and the positive control (synthetic peptide). Furthermore, it was density dependent, and in serially diluted parotid gland saliva. The results suggest that an immunochromatography assay using this novel antibody can be used to quantitatively measure CA VI, which may be useful in the diagnosis of taste dysfunction caused by zinc deficiency.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：味覚、唾液、免疫クロマト法、ELISA 法、炭酸脱水酵素

## 1. 研究開始当初の背景

医療における QOL の最終目標は、患者様の生命の質と向上にある。高齢者の生活において、食は生きがいであり、美味しく食べて健康づくりをするためには、味覚は欠く事のできない生理機能といえる。近年味覚障害を訴える患者数は増加しており、いまや日本の国民病といえるまでのひろがりを見せ、そのピークは高齢者である。味覚障害患者数でいえば、2003 年の調査によると年間 24 万人と、1990 年の約 1.8 倍に増加している。その原因は多様であるが、およそ 7 割が亜鉛治療を必要とする。

味覚と亜鉛、そして唾液との関連について、Henkin らは味覚異常者の耳下腺唾液中亜鉛濃度が、正常者の約 1/5 であること (*J Lab Clin Med.* 86 ; 175-180, 1975) を報告した。次いで硫酸亜鉛投与による味覚異常症状の改善を報告し、亜鉛を含む 37 kDa のタンパク質を Gusitn と命名した。その後 Thatcher らは (*BioChem Biophys Res Commun.* 250 ; 635-641, 1998) このタンパク質のアミノ酸配列が、ヒト炭酸脱水酵素 (CA) VI 型と同一性があり、味蕾の成長や味覚機能に関与すると報告した。

申請者は、既知のヒト CAVI の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体を作製し、抗原抗体反応にて CAVI が亜鉛結合タンパク質と同一であることを確認した (島崎伸子、*奥羽大学歯学誌*, 25 : 215-224, 2000)。さらにその抗体を用いて構築した ELISA 法を応用した臨床データを蓄積してきた。しかし、解析に時間を要するため、迅速簡便な免疫クロマト法に発展させ、味覚障害の診断に対する臨床応用を試みた。

\*亜鉛：成長や味覚の生理作用を触媒・調節する微量元素

## 2. 研究の目的

亜鉛は現在のところ血清亜鉛値で臨床的評価される。しかし、正常値であっても、舌や唾液腺の組織レベルでの亜鉛濃度は低下している症例があるため、血清亜鉛値は必ずしも局所的な組織中濃度を反映していない。つまり現在のところ臨床的に亜鉛欠乏状態を示す確実な指標は少ない。それゆえ、申請者が作製した抗体を用いて、臨床応用することは独創的であり、低侵襲的かつ簡便な検査法として味覚異常の診断の一助となり意義深いものと考えられる。

味覚障害のスクリーニングへの応用を目的として、ELISA を用いた唾液中亜鉛結合タンパク質 CAVI (Gustin) の定量的検出を試み、正常味覚閾値者と比較して有意に濃度が 3 分の 1 程度と少なく、耳下腺に存在することが判明している。さらには簡便、かつ迅速化を図るために免疫クロマト法を開発し臨床応用を試みる。本免疫クロマトアッセイは Gustin = 炭酸脱水酵素 VI 型が一定レベル以上あるか無いかを判断する定性的分析法である。それにより、四基本味の濾紙ディスク法や電気味覚計等の自覚的味覚検査法や血清亜鉛値の測定結果を待つ前に診断が可能となる。すなわちインフルエンザ同様に 10 分程度で判定ができ、必要な亜鉛の投与が受けられる意味で革新的な結果を生むと判断される。

以下、具体的な目的を掲示する。

(1) 血清亜鉛値と炭酸脱水酵素 VI 型濃度の相関性の検討

(2) 亜鉛内服治療による味覚障害症状の変化と炭酸脱水酵素 VI 型濃度の推移の検討

(3) 唾液中亜鉛結合タンパク質 (炭酸脱水酵

## 素VI型) 検出イムノクロマト法の基礎的評価 反応性試験の施行

### 3. 研究の方法

#### (1) 血清亜鉛値と炭酸脱水酵素VI型濃度の相 関性の検討

本研究では、味覚障害患者から採取した耳下腺唾液サンプルより CAVI (Gustin) 濃度を測定し、血清亜鉛値、血清銅値、濾紙ディスク検査等の検査結果と比較検討した。

##### ① 被験者および実験条件

対象は、味覚障害を主訴として富田耳鼻咽喉科を訪れた患者 81 名とした (男性 25 名、女性 56 名、平均年齢 54.4±15.5 歳)。耳下腺唾液採取には、久保木式採唾器 YK-I を用いて、耳下腺開口部より酸味刺激下にて吸引採取した。また、詳細な問診とともに味覚閾値測定を四基本味の濾紙ディスク法にて施行し、あわせて血清亜鉛値、血清銅値等を測定した。被験者を、血清亜鉛値が 79ug/dl 以下の亜鉛欠乏群 (25 名) と 80ug/dl 以上の亜鉛正常群 (56 名) に分類した。(\*日本微量元素学会の血清亜鉛値の診断基準を用いた。)

##### ② ELISA 法による測定

採取した耳下腺唾液は、フィルターを通過させた後に分注し-60 度に凍結保存し、サンプルとした。はじめに、96 穴のマイクロプレートに、コーティングバッファーにて 3.125 ng/ml~3,200 ng/ml に希釈した CAVI の合成ペプチド (19 個のアミノ酸) および 8~128 倍に希釈した耳下腺唾液を加えて、静置した。その後、ブロッキングバッファーにて数時間~オーバーナイト放置した。500 倍に希釈した一次抗体 (ポリクローナル抗体) を加え 1 時間静置した。次いでヤギ抗ウサギビオチン化 IgG 抗体を二次抗体として加え 15 分静置した。Vectastain ABC-AP standard Kit II を用いて反応させた後、*p*-nitrophenylphosphate solution との反応

により発色させ、マイクロプレートリーダーを使用し、405 nm にて吸光度を測定した。

##### ③ 統計処理

亜鉛欠乏群と亜鉛正常群間における CAVI (Gustin) 濃度の差を Student' s t-test にて検定した。また、全被験者に対して、味覚閾値と CAVI (Gustin) 濃度の相関を調べた。

#### (2) 亜鉛内服治療による味覚障害症状の変化 と炭酸脱水酵素VI型濃度の推移の検討

本研究では、味覚障害診断のパラメータとしての Gustin 濃度測定の有効性を明確にすることを目的として、亜鉛内服治療による味覚障害の症状の変化と Gustin 濃度の推移を比較検討した。

##### ① 被験者および実験条件

対象は、味覚障害を主訴として富田耳鼻咽喉科を訪れた患者 11 名 (男性 2 名、女性 9 名、平均年齢 54.4±12.7 歳) の耳下腺唾液を吸引採取した。また、詳細な問診とともに亜鉛治療前後に味覚閾値測定を濾紙ディスク法にて施行し、あわせて血清亜鉛値を測定した。

##### ② ELISA 法による測定の施行

#### (3) 唾液中亜鉛結合タンパク質 (炭酸脱水酵素VI型) 検出イムノクロマト法の基礎的評価 反応性試験の施行

医療の現場において、簡便・迅速に早期の治療方針を決定・処置することが求められるが、血清亜鉛値の測定や ELISA は時間を要する。そこで、本研究では味覚障害患者に対して Point of Care Testing (POCT) としてイムノクロマト法を用いた診断をチェアサイドにて応用することを目的とし、その第一段階として基礎的反応性評価試験を行った。

#### ① イムノクロマト法による測定

久保木式採唾器 YK-I を用い、耳下腺開口部より酸味刺激下にて味覚障害のない成人の耳下腺唾液を吸引採取し、サンプルと供した。金コロイド溶液は 40 nm、メンブレンは Hi-Flow Plus120 (MILLIPORE)、テストライン用抗体はヒト CAVI の合成ペプチドに対して作製した抗体 (Rabbit-IgG)、コントロール用抗体は swine anti-rabbit IgG 抗体を用いた。ライン発色の定量にはイムノクロマトリーダ (C10066、浜松ホトニクス) を用いて測定した。

#### ② 至適唾液希釈濃度の検討

抗体感作金コロイド溶液を最終濃度 O.D.=1.5 となるよう加え、陽性コントロール溶液とし、PBS (-) に唾液サンプルを 2、4、8、・・・1000 倍希釈したものを 100  $\mu$ l 加え調整した。コントロールは PBS (-) とし、発色を確認した後、イムノクロマトリーダにて測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 血清亜鉛値と炭酸脱水酵素 VI 型濃度の相関性の検討

図1は亜鉛欠乏群と亜鉛正常群の耳下腺唾液中に含まれる CAVI (Gustin) 濃度の結果を示した。図から明らかなように亜鉛欠乏群における耳下腺唾液中の CAVI (Gustin) 濃度は、亜鉛正常群の約 2.5 分の 1 と有意 ( $p < 0.01$ ) に低い値を示した。また味覚閾値と CAVI (Gustin) 濃度との間には相関がみられなかった。亜鉛内服による耳下腺唾液中亜鉛値と血清亜鉛値に関しては、治療前に血清亜鉛値が低い症例では唾液中亜鉛値も低い症例が多く、また亜鉛内服によって血清亜鉛値および唾液中亜鉛値が上昇する (御子柴博文、*日大医誌*, 43 : 509-518, 1984) と述べている。

さらに CAVI (Gustin) 濃度が低い味覚障害症例で、亜鉛内服により症状の改善が見られた報告 (Henkin RI, *Am. J. Med. Sci.* 318 ; 392-405, 1999) がある。炭酸脱水素 (CA) は亜鉛を有する金属酵素で、CAVI は唯一唾液中に存在する分泌型の酵素である。本研究では日本微量元素学会の血清亜鉛値の診断基準値により 79  $\mu$ g/dl 以下を亜鉛欠乏群とし、CAVI (Gustin) 濃度との関連性を検討した。その結果、亜鉛正常群との間に有意差が認められたため、ELISA 法を用いた耳下腺唾液中亜鉛結合タンパク質の測定は、血清亜鉛値の測定と同様、亜鉛欠乏性味覚障害の診断の根拠になりうることが示唆された。

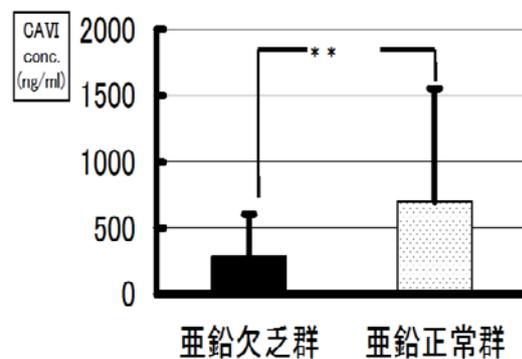


図1 耳下腺唾液の CAVI (Gustin) 濃度

#### (2) 亜鉛内服治療による味覚障害症状の変化と炭酸脱水酵素 VI 型濃度の推移の検討

対象症例の味覚障害の主訴は味覚低下が 7 名、自発性異常味覚が 4 名であり、その原因は亜鉛欠乏性が 5 名、食事性 (亜鉛値正常) が 3 名、薬剤性 (亜鉛欠乏) が 3 名であった。亜鉛内服治療の期間は 2 か月から 4 か月であり、11 名中 10 名が治癒した。治療方法として亜鉛剤 (プロマック R やグルコン酸亜鉛) の投与、食事療法を行ったところ、血清亜鉛値は初診時で  $80.4 \pm 23.5 \mu$ g/dl、治療後は  $91.91 \pm 14.3 \mu$ g/dl と上昇した。また、濾紙ディスクの結果も  $4.1 \pm 1.1$  から  $2.6 \pm 1.0$  と

正常化し(図2)、Gustin濃度は、379.9ng/mlから658.5ng/mlに増加した(図3)。

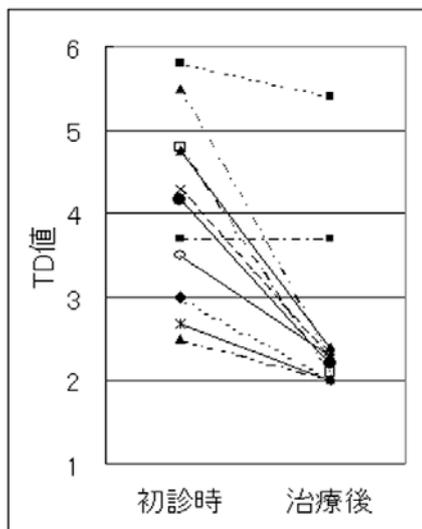


図2 濾紙ディスク値

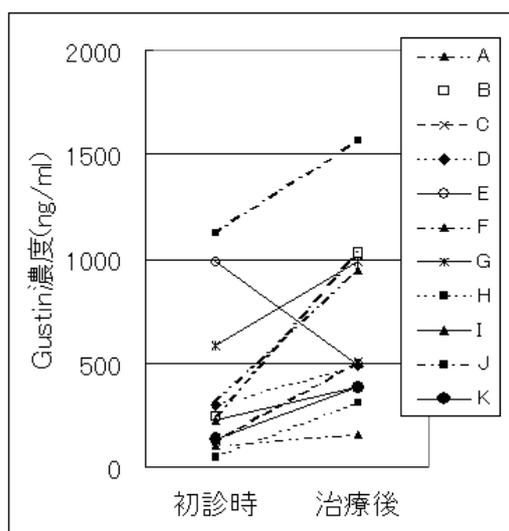


図3 Gustin濃度

御子柴らによると、亜鉛内服による耳下腺唾液中亜鉛値と血清亜鉛値の関連において、治療前に血清亜鉛値が低い症例では唾液中亜鉛値も低い症例が多く、また亜鉛内服によって血清亜鉛値および唾液中亜鉛値が上昇すると述べている。さらに CA-VI (Gustin) 濃度が低い味覚障害症例で、亜鉛内服により症状の改善が見られた報告 (Henkin) がある。

今回の結果も、味覚障害の改善に伴いGustin濃度も変動して高くなる傾向がみられた。従ってELISA法を用いた唾液中亜鉛結合タンパク質の測定は、血清亜鉛値の測定と同様、亜鉛欠乏性味覚障害の診断の根拠になりうることが示唆された。

### (3) 唾液中亜鉛結合タンパク質(炭酸脱水酵素VI型) 検出イムノクロマト法の基礎的評価 反応性試験の施行

唾液サンプル陽性コントロール(合成ペプチド)とPBS(-)において発色の差異が見られ、唾液希釈倍率は8倍から640倍の間で、濃度依存的に発色反応が認められた。図1はELISAにて測定したCAVIの濃度に換算した味覚障害のない正常者の唾液サンプルの一例である。従って、唾液サンプル中にCAVIが少ない場合は、発色反応が薄くなり、味覚障害の可能性が示唆された。

近年医療分野においては簡便で迅速に疾患などを早期発見できる体外診断薬が望まれており、その一例としてインフルエンザなどの診断に用いられているイムノクロマト法診断薬があげられる。イムノクロマト法は analyte が毛細管現象により多孔質支持体内を移動することを利用した方法で、検体に含まれる抗原の有無を10分程度でone stepで簡単に診断することが可能である。唾液サンプル中のCAVIと金コロイドで標識された感作抗ヒトCAVI抗体が反応し、結合物を作る。次にこの結合物が移動し、抗ヒトCAVI抗体に補足され、サンドイッチの結合物を作り、その結果コロイドが凝集し、テストライン部に赤紫色の線が表示される。つまり、唾液サンプル中にCAVIが少ない場合は、反応が薄くなり、すなわち味覚障害の可能性があると見える。従って今回作製したイムノクロマト法を

用いることにより味覚障害の診断法として確立が示唆された。

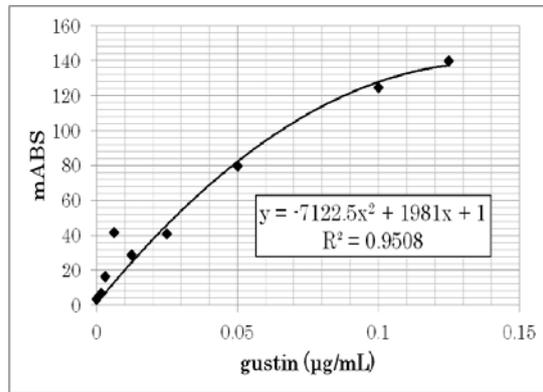
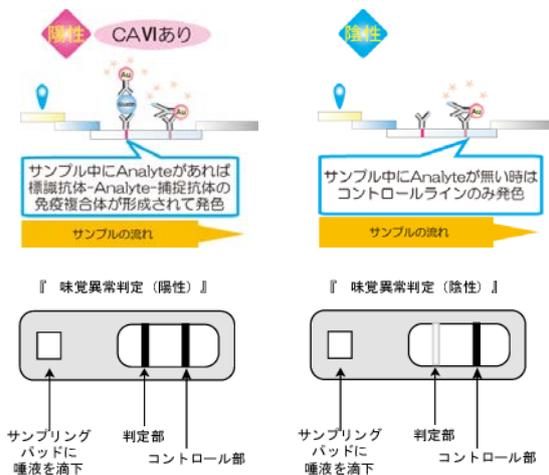
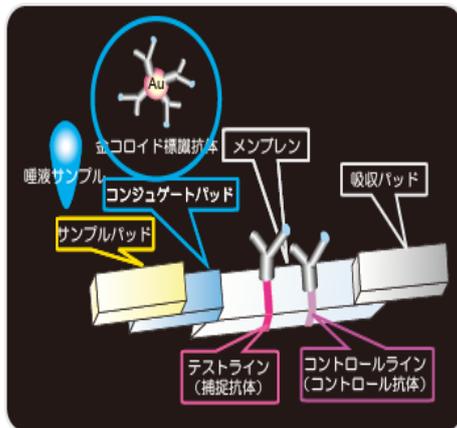


図4 味覚正常者の唾液サンプルの1例

【イムノクロマト法】



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① 島崎伸子、富田 寛、山森徹雄、石橋寛二、唾液中亜鉛結合タンパク質 (Gustin) による味覚障害の診断について、日本味と匂学会誌、査読有、16 巻 3 号、2009、469-470
- ② 島崎伸子、富田 寛、山森徹雄、石橋寛二、他 1 名、味覚障害患者の亜鉛内服治療前後における唾液中亜鉛結合タンパク質 (Gustin) 濃度について、日本味と匂学会誌、査読有、17 巻 3 号、2010、363-364
- ③ 島崎伸子、富田 寛、山森徹雄、石橋寛二、他 3 名、唾液中亜鉛結合タンパク質 (炭酸脱水酵素VI型) 検出イムノクロマト法の基礎的検討、日本味と匂学会誌、査読有、18 巻 3 号、2011、485-486
- ④ 八重嶋彩子、島崎伸子、山森徹雄、石橋寛二、他 4 名、顎口腔領域の腫瘍切除患者における味覚機能と口腔内環境との関連、日本味と匂学会誌、査読有、18 巻 3 号、2011、481-484

〔学会発表〕(計8件)

- ① 島崎伸子ら、心因性味覚障害の臨床統計、第 20 回日本老年歯科医学会、2009 年 6 月、横浜
- ② 島崎伸子ら、唾液中亜鉛結合タンパク質 (Gustin) による味覚障害の診断について、日本味と匂学会第 43 回大会、2009 年 9 月、旭川
- ③ Nobuko Shimazaki, Diagnosis of taste dysfunction using zinc-binding protein in parotid saliva, 88<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2010.7、Barcelona, Spain

- ④ 島崎伸子ら、味覚障害患者の亜鉛内服治療前後における唾液中亜鉛結合タンパク質 (Gustin) 濃度について、日本味と匂学会第 44 回大会、2010 年 9 月、北九州
- ⑤ 八重嶋彩子、島崎伸子ら、口腔腫瘍切除患者の口腔内環境と味覚機能に関する検討、第 28 回日本顎顔面補綴学会、2011 年 6 月、富山
- ⑥ 千田豪也、島崎伸子ら、顎義歯装着患者の味覚機能と口腔内環境に関する検討、平成 23 年度日本補綴歯科学会、東北・北海道支部、関越支部、東関東支部合同総会、2011 年 9 月、新潟
- ⑦ 島崎伸子ら、唾液中亜鉛結合タンパク質 (炭酸脱水酵素VI型) 検出イムノクロマト法の基礎的検討、日本味と匂学会第 45 回大会、2011 年 10 月、金沢
- ⑧ 八重嶋彩子、島崎伸子ら、顎口腔領域の腫瘍切除患者における味覚機能と口腔内環境との関連、日本味と匂学会第 45 回大会、2011 年 10 月、金沢

[図書] (計 1 件)

- ① 島崎伸子、富田 寛、山森徹雄、石橋寛二、中外医学社、Clinical Neuroscience、味覚と嗅覚 (心因性味覚障害)、2010、1280-1281

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 伸子 (SHIMAZAKI NOBUKO)  
 研究者番号：30337258

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

