

令和元年6月11日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11171

研究課題名(和文)健康長寿社会にむけて唾液を用いた簡便迅速な味覚障害スクリーニング法の臨床応用

研究課題名(英文) Screening of taste dysfunction using zinc-binding protein in parotid saliva for healthy longevity society

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：耳下腺唾液中亜鉛結合タンパク質である炭酸脱水酵素VI型(Gustin)が味覚機能に関与するとの報告に基づき、イムノクロマト試薬による味覚障害のスクリーニング法の開発を目的として、炭酸脱水酵素型抗体を用い、味覚障害患者に対してイムノクロマト試薬検査、4基本味によるテーストディスク値検査を行った。ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体によるイムノクロマト試薬測定値の間には、高い相関( $R=0.68$ )が認められ、モノクローナル抗体によるイムノクロマト試薬測定値と血清亜鉛値間には中等度の相関が認められた。従って、本法を用いることにより簡便迅速に味覚障害の診断法の確立する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味覚障害を訴える患者数は増加しており、そのピークは高齢者である。2003年の調査によると、年間24万人であり、1990年の約2倍に急増している。現在ではさらに数倍とみられている。そのおよそ70%が亜鉛欠乏(薬剤性、食事性)に起因し、亜鉛内服による治療を必要とすると報告されている(Tomita, 2011)。本研究は、亜鉛欠乏による味覚障害に対して迅速に対応するため、唾液タンパク質を用いた簡便で短時間で評価可能な“免疫学的測定法”を開発することを目的とした。すなわちインフルエンザウイルスや、妊娠判定同様に10分で目視判定が迅速に可能となり、必要な亜鉛投与が受けられる意味で意義深い結果を生む。

研究成果の概要(英文)：It is known that over 60% of patients with taste dysfunction are originally caused by zinc deficiency, and that zinc intake therapies are effective for these patients. But patients have to take blood tests with surgical stress to assay zinc deficiency. On the other hand, carbonic anhydrase (CA) 6 has significant relation to taste dysfunction. As it takes a long time to detect CA 6 by a previously established ELISA method, we have tried to develop a swift and simple new diagnostic method using the immunochromatographic analysis. We attempted to apply the CA 6 monoclonal antibody to the screening of the taste dysfunction, and to examine effects of zinc oral administration on the taste disc levels and the CA 6 values in parotid saliva. CA 6 values negatively correlated with taste disc levels. Those results suggest that the measurement of CA6 values in parotid saliva might be helpful to establish a new and rapid screening method for taste dysfunction caused by zinc deficiency.

研究分野：味覚

キーワード：味覚 唾液 亜鉛欠乏 炭酸脱水酵素 イムノクロマト法 高齢者 体外診断薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

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。さらに、コンビニの拡大によるジャンクフードや加工食品(ポリリン酸、フィチン酸：亜鉛を排出作用)、ダイエットによる偏食などにより若者にもその裾野を広げている。池田ら(Acta Otolaryngol, 2005)の2003年の調査によると、年間24万人であり、1990年の約2倍に急増している。そのうち、約7割が亜鉛による治療を必要とすると報告されている。

『味覚と亜鉛と唾液の関連』 【\*亜鉛：成長や味覚の生理作用を触媒・調節する微量元素】

✓Henkin：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(1975)

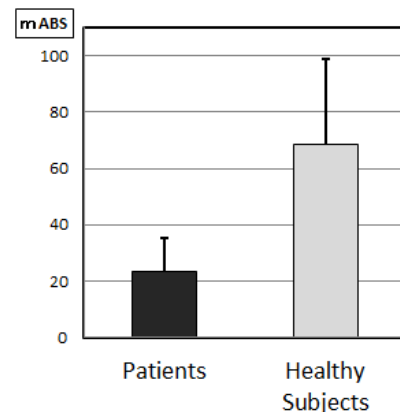
✓Henkin：硫酸亜鉛投与により味覚異常症状が改善し、亜鉛を含む唾液中の37 kDaのタンパク質をGustinと命名(1975)

✓Thatcher：このタンパク質のアミノ酸配列が、ヒト炭酸脱水酵素型(以後CA型)と相同性があり、味蕾の成長や味覚機能に関与すると報告している(1998)

上記の耳下腺唾液中37 kDa亜鉛結合タンパク質である炭酸脱水酵素(CA)型(Gustin)が味覚機能に関与する<sup>1,2)</sup>との報告に基づき、これまで報告者らは、既知のヒトCA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CAが亜鉛結合タンパク質と同一であることを確認した(奥羽大歯誌, 2000)。さらにその抗体を用いてELISA法を構築し、臨床データを蓄積してきた。味覚障害患者のGustin濃度は、健常者の3分の1であること(味と匂誌, 2007)、血清亜鉛値とGustin濃度との相関(味と匂誌, 2009)、亜鉛内服治療による味覚障害症状の変化とGustin濃度推移の比較検討(味と匂誌, 2010)も報告してきた。

しかし一方、医療現場ではチェアサイドにて早期の治療方針決定が求められるも、血清亜鉛値測定やELISAは時間を要する。そのため、味覚障害のスクリーニング法として、作製した炭酸脱水酵素型ポリクローナル抗体を用いたイムノクロマト試薬による簡便迅速な体外診断薬の開発を目的とし、次の段階へ移行した。

そして、味覚正常者の唾液における基礎的反応性評価試験を行った結果、1)陽性コントロール(合成ペプチド)と希釈バッファにおいて発色の差異が見られること、2)味覚障害者のCA濃度は、健常者より低い傾向が認められること(右グラフ)、3)イムノクロマト試薬測定値と血清亜鉛値との相関について報告してきた。



## 2. 研究の目的

味覚障害患者の約70%に亜鉛内服療法が有効である(富田, 2009)。味覚障害に対する一般的な診断法の血清亜鉛値の測定は、侵襲を伴い判定に時間を要する。そのため本研究では、唾液中亜鉛結合タンパク質を用い、簡便かつ、10分で判定できるイムノクロマト法の開発と臨床応用を目的とする。本研究では第1に、イムノクロマト法の基礎的反応性の検討を行う。つまり、味覚が正常であれば、亜鉛結合タンパク質が多いため、テストラインが発色し、味覚異常の場合は、発色がしないかもしくは薄い。続いて、イムノクロマトリーダにて定量化していく。

第2に味覚障害者の唾液を採取し、CA型に対して構築したELISA法と、イムノクロマト法および血清亜鉛値、炭酸脱水酵素の活性値との相関性を調べ、味覚障害診断のパラメータとすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象および実験条件

味覚障害を主訴として富田耳鼻咽喉科を訪れた患者26名(男性10名、女性16名)を対象とした。唾液採取の条件を一定にするため、採取2時間前の飲食、喫煙および激しい運動を禁じた。久保木式採唾器YK- を用い、耳下腺開口部より酸味刺激下にて耳下腺唾液を吸引採取し、サンプルに供した。また、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を測定した。被験者に対しては十分な説明を行い、インフォームドコンセントを得て、個人が特定できないよう配慮し研究を実地した。

対象とした26名のうち、治療経過に沿った詳細なデータ採取の承認が得られた10名(男性5名、女性5名)に対してモノクローナル抗体を用いたイムノクロマト試薬測定値とテストディスク値もしくは血清亜鉛値との関連を検索した。さらにテストディスク値およびモノクローナル抗体を用いたイムノクロマト試薬測定値について、亜鉛内服治療前後における比較を行った。味覚障害の主訴は10名中9名が味覚低下、1名が自発性異常味覚であり、その原因は亜鉛欠乏性が2名、食事性が7名、薬剤性が1名であった。治療として亜鉛剤の投与、食事療法を行った。亜鉛内服治療期間は2か月から5か月であり、10名中8名が治癒か、改善した。

#### (2) イムノクロマト値測定

CAポリクローナル抗体(抗原:93-111/New Zealand White)とLS-C196794/Mouse Anti-human Carbonic Anhydrase antibody (LSBi0)のモノクローナル抗体を用いた金コロイド標識抗体を作製した。金コロイド粒子は40nm(B.B.I.)、メンブレンはHi-Flow 135(MILLIPORE)、テストライン用抗体はヒトCA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Goat anti-mouse IgG抗体(ニッポンエンジニアリング)を用いた。

唾液サンプルは0.1%Tween-PBS(-)で2倍から10倍に調整した後、2種類の金コロイド標識抗体溶液と各々混合した。10分後に各々ライン発色の有無を確認した後、イムノクロマトリーダ(C10066、ニッポンエンジニアリング)にて測定した(図1)。

### 4. 研究成果

#### (1) ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体によるイムノクロマト試薬測定値

ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体によるイムノクロマト試薬測定値の間には、高い相関( $R=0.68$ )が認められた(図2)。

#### (2) モノクローナル抗体によるイムノクロマト試薬測定値と、血清亜鉛値およびテストディスク値

モノクローナル抗体によるイムノクロマト試薬測定値と血清亜鉛値間には中等度の相関が認められ( $R=0.64$ )(図3)、イムノクロマト試薬測定値とテストディスク値との間には低い相関が認められた( $R=0.36$ )(図4)。さらに各基本味について検討したところ、甘味では高い相関が認められ( $R=0.81$ )、苦味では中等度の相関が認められた( $R=0.46$ )。

#### (3) 亜鉛内服治療前後におけるテストディスク値およびイムノクロマト試薬測定値の比較

テストディスク値は $4.5 \pm 1.5$ から $3.7 \pm 1.2$ へと減少し(図5)、イムノクロマト試薬測定値は $138.1 \pm 93.4$ から $200.9 \pm 121.9$ mABSに増加した(図6)。

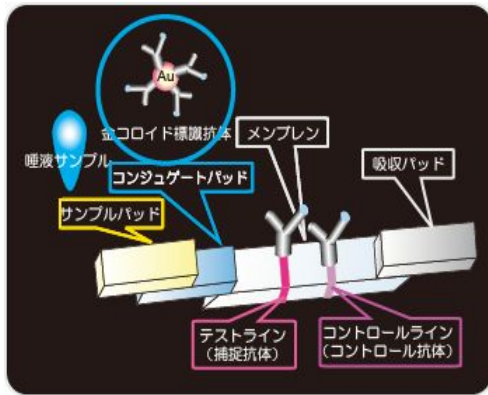


図1(左) イムノクロマト法のシェーマ

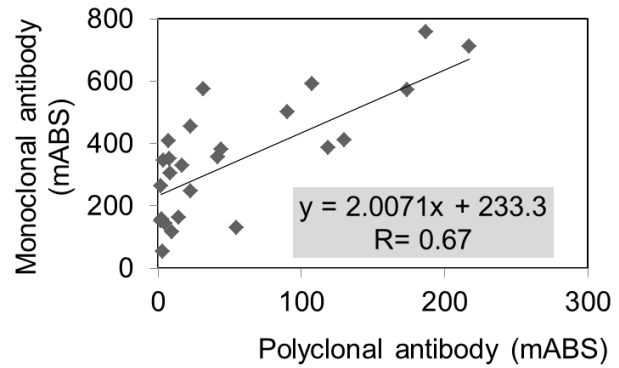


図2(右) ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いたイムノクロマト試薬測定値

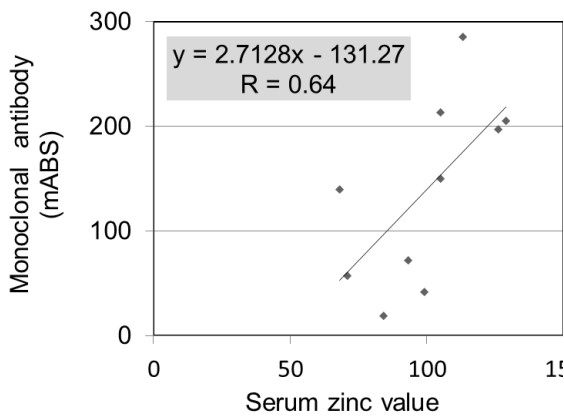


図3(左) モノクローナル抗体によるイムノクロマト試薬測定値と血清亜鉛値

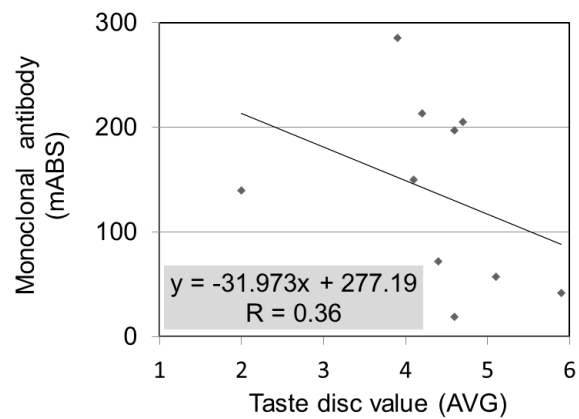


図4(右) モノクローナル抗体によるイムノクロマト試薬測定値とテストディスク値

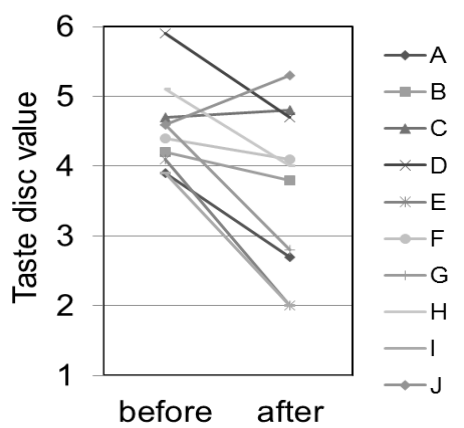


図5(左) 味覚治療前後のテストディスク値

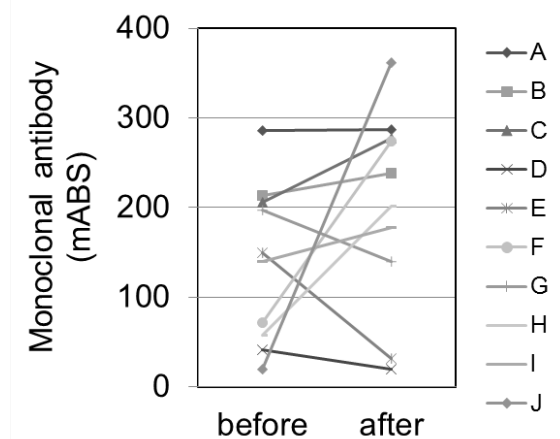


図6(右) 味覚治療前後のモノクローナル抗体によるイムノクロマト試薬測定値

#### (4) 考 察

味覚障害の原因は多様であるが、約 60%に亜鉛内服療法が有効である<sup>3)</sup>。我々は現在まで、唾液中の味覚障害患者の CA 濃度は、健常者の 3 分の 1 程度であることを示してきた。また、先に作製したポリクローナル抗体とモノクローナル抗体によるイムノクロマト試薬測定値間に高い相関が認められたため、モノクローナル抗体でも安定したデータが得られることが推察された。さらに、亜鉛治療効果を示す指標に

なることも今回検討された。しかしながら、CA の味覚に関する正確な機能的役割は未だに解明されていない。興味深いことに、近年の研究で、CA 遺伝子の多型がヒトの苦味知覚に関連していることが明らかとなった<sup>4)</sup>。また、CA のノックアウトマウスの味の嗜好に対し行動が変化するという報告もある<sup>5)</sup>。すなわち、低濃度においてキニーネ水溶液を好む傾向が観察されたため、CA 欠損は苦味知覚の異常につながる事が確認された。今回の結果からも、苦味とイムノクロマト値との相関が認められ、所見が一致していると思われる。しかしながら、甘味とも強い相関が認められ、塩味は相関が認められなかったため、さらに追究する必要がある。

今後は、簡便な耳下腺唾液採取方法を含め、モノクローナル抗体を用いたイムノクロマト試薬にて亜鉛欠乏性味覚障害の診断の根拠となりうる耳下腺唾液中 CA の測定法の構築を試み完成する予定である。

#### <引用文献>

- 1) Henkin RI, Lippoldt RE, Bilstad J and Edeljoch H: A zinc protein isolated from human parotid saliva. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 488-492 (1975)
- 2) 駒井三千夫, 後藤知子, 大日向耕作, 白川 仁: 味覚機能への亜鉛酵素「炭酸脱水酵素」の寄与. *Biomed Res Trace Elements* 21, 38-42 (2010)
- 3) 富田 寛: 味覚障害の全貌. 診断と治療社, 東京, pp.258-406 (2011)
- 4) Padiglia A, Zonza A, Atzori E, Chillotti C, Calo C, Tepper BJ, Barbarossa IT: Sensitivity to 6-n-propylthiouracil is associated with gustin (carbonic anhydrase VI) gene polymorphism, salivary zinc, and body mass index in humans. *Am J Clin Nutr* 92, 539-545 (2010)
- 5) Patrikaine M, Pan P, Kuleskaya N, Voikar V and Parkkila S: The role of carbonic anhydrase in bitter taste perception: evidence from the *Car6*<sup>-/-</sup> mouse model. *J Biomed Sci* 21,82, (2014)

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. 島崎伸子、山森徹雄、佐藤しづ子、笹野高嗣、後藤知子、駒井三千夫、近藤尚知、他 3 名、唾液中亜鉛結合タンパク質を用いた味覚障害のスクリーニング法 炭酸脱水酵素 6 型 抗体を用いたイムノクロマト試薬検査、日本味と匂学会誌、査読有、2017、75-78
2. Goto T, Shirakawa H, Komai M. Zinc deficiency causes to decrease plasma calcium and ionized calcium concentrations prior to an increase in the plasma parathyroid hormone concentration in rats. *Nano Biomedicine*, 8, 2016, 67-73 (査読有)
3. Shizuko Satoh-Kuriwada, Takashi Sasano, The important role of umami taste in oral and overall health. *Flavour* 2015, 4:10 doi: 10.1186/2044-7248-4-10 (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Nobuko Shimazaki, Tetsuo Yamamori, Shizuko Satoh-Kuriwada, Takashi Sasano, Jun Ito and Hisatomo Kondo, Screening of Taste Dysfunction using Zinc-binding Protein in Saliva, 96<sup>th</sup> International Association for Dental Research (IADR), London, 2018
2. 鈴木 綾、後藤知子、佐藤しづ子、笹野高嗣、島崎伸子、駒井三千夫、他 1 名、味覚障害の新規指標、日本味と匂学会第 52 回大会、大宮、2018 年

3. 島崎 伸子、山森 徹雄、佐藤 しづ子、笹野 高嗣、後藤 知子、駒井 三千夫、他 5 名、  
唾液中亜鉛結合タンパク質を用いた味覚障害のスクリーニング法 炭酸脱水酵素 6 型抗体を用いたイムノクロマト試薬検査、日本味と匂学会第 51 回大会、神戸、2017 年 9 月
4. 小島剛志、島崎 伸子、山森 徹雄、他 2 名、TAS2R 遺伝子発現に対するイオンの影響、日本味と匂学会第 51 回大会、神戸、2017 年 9 月
5. 鈴木 綾、後藤知子、島崎伸子、佐藤しづ子、笹野高嗣、駒井三千夫、他 2 名、味覚障害患者における唾液炭酸脱水酵素活性の解析、第 28 回日本微量元素学会、仙台、2017、7 月
6. Nobuko Shimazaki, Tetsuo Yamamori, Shizuko Satoh-Kuriwada, Takashi Sasano, 他 2 名, Screening of Taste Dysfunction using Zinc-binding Protein in Saliva. 94<sup>th</sup> International Association for Dental Research ( IADR ), Seoul , 2016
7. Nobuko Shimazaki, Tetsuo Yamamori, Shizuko Satoh-Kuriwada, Takashi Sasano, Tomoko Goto, Michio Komai, 他 4 名, Screening of Taste Dysfunction using Zinc-binding Protein (Carbonic Anhydrase ) in Parotid Saliva. 17<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT), Yokohama, 2016

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：笹野 高嗣

ローマ字氏名：SASANO TAKASHI

所属研究機関名：東北大学

部局名：歯学研究科

職名：名誉教授

研究者番号(8桁): 10125560

研究分担者氏名：佐藤 しづ子

ローマ字氏名：SATO SHIZUKO

所属研究機関名：東北大学

部局名：歯学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁): 60225274

研究分担者氏名：駒井 三千夫

ローマ字氏名：KOMAI MICHIO

所属研究機関名：東北大学

部局名：農学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 80143022

研究分担者氏名：後藤 知子

ローマ字氏名：GOTO TOMOKO

所属研究機関名：宮城学院女子大学

部局名：生活科学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 00342783