

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592928

研究課題名(和文)POCTとして唾液中亜鉛結合タンパク質を指標とした迅速な味覚障害評価法の臨床応用

研究課題名(英文)Screening of taste dysfunction using zinc-binding protein in saliva

## 研究代表者

島崎 伸子(Shimazaki, Nobuko)

岩手医科大学・歯学部・研究員

研究者番号：30337258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

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。唾液中の亜鉛結合タンパク質である炭酸脱水酵素型が味覚機能に関与するとの報告に基づき、抗体を用いたイムノクロマト法による診断を血液検査の代わりに応用することを目的とし、イムノクロマト測定値と血清亜鉛値との関連について検討したところ、有意な正の相関が認められた。さらに、モノクローナル抗体をイムノクロマト試薬に試みたところ、LS-C196794モノクローナル抗体が、過去に報告したポリクローナル抗体と同等の発色反応を示した。従って、本法を用いることにより、唾液により、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。

研究成果の概要(英文)：It is known that over 60% of patients with taste dysfunction are originally caused by zinc deficiency. Carbonic anhydrase (CA), identical to gustin as a zinc-binding metalloprotein in human saliva, has significant relation to taste dysfunction. We have developed a swift and simple new diagnostic method using the immunochromatographic analysis. In this experiment, we examined a relationship between CA6 value and serum zinc level by using parotid saliva of patients with taste dysfunction, measured by the immunochromatographic method. We recognized a slight positive correlation between immunochromatographic measurement value. Furthermore, we attempted to apply the monoclonal antibody. Only LS-C196794 monoclonal antibody indicated comparable chromogenic reaction to polyclonal antibody we previously presented. Those results suggest that the measurement of zinc-binding protein in parotid saliva might be helpful to establish newly rapid diagnosis of zinc deficiency taste dysfunction.

研究分野：味覚障害

キーワード：味覚 亜鉛欠乏 炭酸脱水酵素 イムノクロマト法 耳下腺唾液 味覚障害 体外診断薬

## 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。現在の統計報告はないものの、増加傾向にあることは間違いない。そして、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 Gustin 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) 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た。

申請者は、既知のヒト CA 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 CA 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。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迅速簡便な体外診断薬の開発を目的とし、次の段階へ移行した。

\*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 CA (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イムノクロマト法を開発し臨床応用を試みる。本イムノクロマトアッセイは Gustin = 炭酸脱水酵素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。

## 3. 研究の方法

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

本研究では、味覚障害患者と健常成人から採取した耳下腺唾液サンプルとして CA (Gustin) のイムノクロマト濃度を測定し、比較検討した。

#### (1) 被験者および実験条件

対象は、実験に同意の得られた健常成人 5 名と味覚障害を主訴として富田耳鼻咽喉科を訪れた患者 5 名とした。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吸引採取し、サンプルとした。また、味覚閾値測定を濾紙ディスク法にて施行した。

金コロイド溶液は 40nm、メンブレンは Hi-Flow Plus120 (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 Swine anti-rabbit IgG 抗体を用いた。またライン発色はイムノクロマトリーダ (C10066、浜松ホトニクス) にて測定した。

#### (2) 至適唾液希釈濃度の検討

陽性コントロールとして ELISA にて確認した唾液サンプルを PBS(-) で 10 倍から 1280 倍までの希釈系列に調整し、抗体感作金コロイド溶液 (O.D.=1.5) と混合しサンプル量を 100  $\mu$ l とした。また陰性コントロールには PBS(-) を用い、それぞれ発色を確認した後、イムノクロマトリーダにて測定した。

### 2) 血清亜鉛値とイムノクロマト測定値の相関性の検討

本研究では、唾液を検体としたイムノクロマト測定値と血清亜鉛値との関連について検討した。

#### (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 31 名とした。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、個人を特定できないよう配慮し研究を施行した。耳下腺唾液を吸引採取し、サンプルとした。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。測定方法は前述通り。

#### (2) 血清亜鉛値との比較

唾液サンプルを PBS(-) で 4 倍に調整し、抗体感作金コロイド溶液 (O.D.=1.5) と混合し、サンプル量を 100  $\mu$ l とした。それぞれ発色を確認した後、イムノクロマトリーダにて測定した後、イムノクロマト測定値 (mABS) と血清亜鉛値の相関を調べた。

### 3) 炭酸脱水酵素 型モノクローナル抗体応用の試み

医療現場では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体外診断薬の開発を目的とし、唾液に対する反応性試験、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。本研究ではより夾雑物の影響が少ないモノクローナル抗体をイムノクロマト試薬に試みた。

#### (1) 被験者および実験条件

健常成人の耳下腺唾液を吸引採取し、サンプルに供した。

#### (2) 金コロイド標識抗体

CA6 ポリクローナル抗体 (抗原: 93-111/New Zealand White)、LS-C196794/ Mouse Anti-human Carbonic Anhydrase antibody (LSBio)、CA (F-12): sc-166679/Mouse Anti-human Carbonic Anhydrase antibody (SANTA CRUZ)、MAB 2939/Mouse Anti-human Carbonic Anhydrase antibody (R&D Systems)、MAB 29391/Mouse Anti-human Carbonic Anhydrase antibody (R&D Systems) の計 5 種類の抗体を用い作製した。

#### (3) イムノクロマト値測定: 前述どおり。

#### 4. 研究成果

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

唾液希釈倍率は10倍から80倍の間で、濃度依存的にライン発色が認められたため、同範囲内で希釈し測定した。図1は味覚障害者と健常成人の発色反応を計測した結果である。味覚障害者のCA濃度は、健常者より低い傾向が認められた。

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。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応用した免疫測定方法で、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CAと金コロイドで標識された感作抗ヒトCA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CA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。すなわち、唾液サンプル中にCA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あると示唆された。

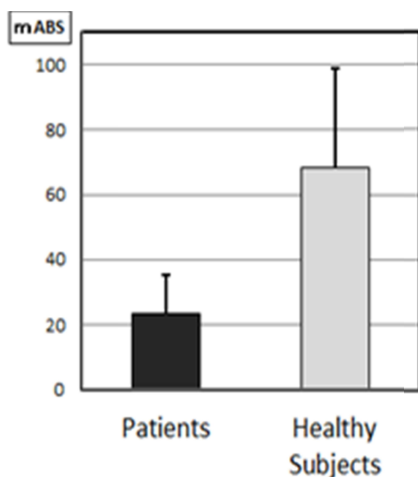


図1 味覚障害者と正常者の測定結果

##### 2) 血清亜鉛値とイムノクロマト測定値の相関性の検討

味覚障害者の発色反応を計測したイムノクロマト測定値と血清亜鉛値との間には、有意な正の相関 ( $R=0.398$ ,  $P<0.05$ ) が認められた (図2)。近年、簡便・迅速に検査結果を得るために、POCT (point of care testing) が急速に普及し、その役割が高まりつつある。しかし、医療現場において血清亜鉛値の測定やELISAは時間を要する。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応用した免疫測定方法で、検体に含まれる抗原の有無を10分程度で診断することが可能である。すなわち、唾液サンプル中にCA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あると示唆された。CAの味覚機能へ関与についての駒井らによる一連の報告があることから、耳下腺唾液中亜鉛結合タンパク質の測定は、亜鉛欠乏性味覚障害の診断の根拠になりうるものと考えられた。

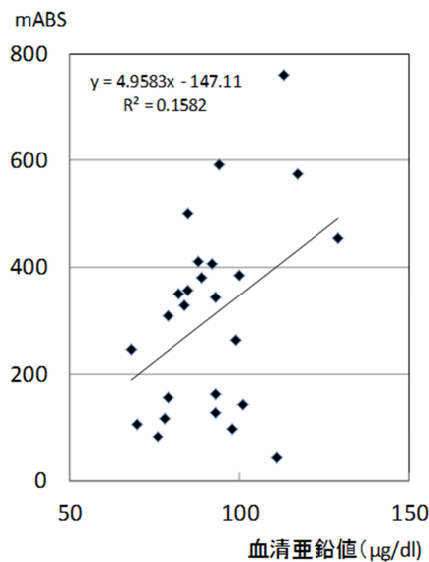


図2 イムノクロマト値と血清亜鉛値の相関性

### 3) 炭酸脱水酵素 型モノクローナル抗体応用の試み

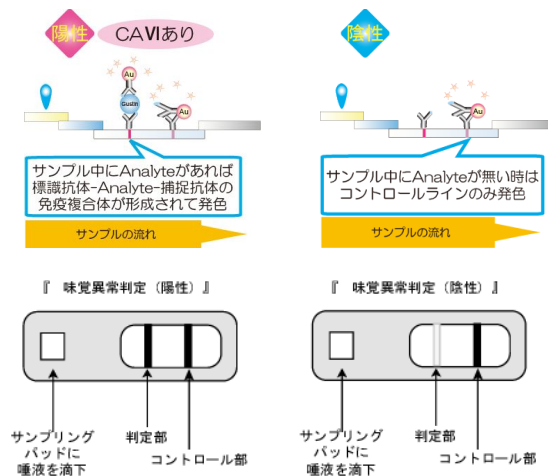
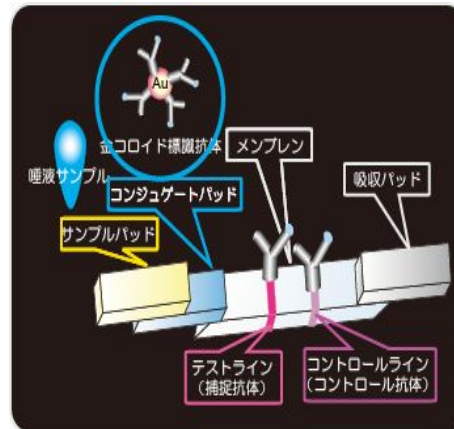
4種の抗体感作コンジュゲートのうち、LS-C196794/ Mouse Anti-human Carbonic Anhydrase antibody モノクローナル抗体が、過去に報告したポリクローナル抗体と同等の発色反応を示した。しかし、コンジュゲートに凝集傾向がみとめられた残り3種の抗体では発色反応が認められにくかった。また、唾液サンプルの入っていないコントロールでは発色反応を示さず、非特異反応が明らかに抑制されていることが確認された(図3)。

我々が作製したポリクローナル抗体は、ウエスタンブロット法にて確認したところワンスポットのみの発色反応であったが、一般的にポリクローナル抗体では、モノクローナル抗体と比較して複数種の抗体が混在するため、予期せぬ抗原と交叉反応を起こす確率が高くなる。今後は、発色反応が認められた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亜鉛結合タンパク質の測定法を構築する。

		1/2希釈	1/10希釈	コントロール
ポリクローナル抗体		32.7	110.1	1.0
モノクローナル抗体	LS-C196794	35.7	113.0	0.8
	SC-166679	1.7	11.1	0.7
	MAB2939	1.2	1.5	0.6
	MAB29391	1.5	1.0	0.7
測定単位:mABS				

図3 モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の唾液に対するイムノクロマト測定値

### 【イムノクロマト法】



### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

島崎伸子、富田 寛、山森徹雄、田崎智子、川村憲一、豊田勝彦、武部 純、近藤尚知、味覚障害診断のためのイムノクロマトを用いた唾液中亜鉛結合タンパク質の検出法について、日本味と匂学会誌、査読有、19巻3号、2012、493-494

武部 純、古川良俊、伊藤茂樹、島崎伸子、八重嶋彩子、千田豪也、石岡道久、伊藤創造、塩山 司、石橋寛二、岩手医科大学附属病院歯科医療センター顎顔面補綴外来における臨床調査、顎顔面補綴、査読有、35 巻 1 号、2012、1-7

島崎伸子、富田 寛、山森徹雄、田崎智子、川村憲一、豊田勝彦、武部 純、近藤尚知、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 - イムノクロマト測定値と血清亜鉛値との関連 - 、日本味と匂学会誌、査読有、20 巻 3 号、2013、345-346

島崎伸子、山森徹雄、田崎智子、川村憲一、豊田勝彦、武部 純、近藤尚知、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 - 炭酸脱水酵素型モノクローナル抗体の試み - 、日本味と匂学会誌、査読有、21 巻 3 号、2014、383-384

伊藤 隼、小島剛志、前田豊信、加藤靖正、島崎伸子、山森徹雄、苦味受容体遺伝子発現量の比較、日本味と匂学会誌、査読有、21 巻 3 号、2014、263-264

〔学会発表〕(計 6 件)

島崎伸子、伊藤茂樹、八重嶋彩子、千田豪也、古川良俊、武部 純、山森徹雄、石橋寛二、顎口腔領域の腫瘍切除患者の味覚機能に関する検討 - 口腔内環境、血清亜鉛値との関連 - 、第 29 回日本顎顔面補綴学会学術大会、2012 年 6 月、名古屋

島崎伸子、富田 寛、山森徹雄、田崎智子、川村憲一、豊田勝彦、武部 純、近藤尚知、味覚障害診断のためのイムノクロマトを用いた唾液中亜

鉛結合タンパク質の検出法について、日本味と匂学会第 46 回大会、2012 年 9 月、大阪

島崎伸子、富田 寛、山森徹雄、田崎智子、川村憲一、豊田勝彦、武部 純、近藤尚知、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 - イムノクロマト測定値と血清亜鉛値との関連 - 、日本味と匂学会第 47 回大会、2013 年 9 月、仙台

島崎伸子、山森徹雄、田崎智子、川村憲一、豊田勝彦、武部 純、近藤尚知、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 - 炭酸脱水酵素型モノクローナル抗体の試み - 、日本味と匂学会第 48 回大会、2014 年 10 月、静岡

伊藤 隼、小島剛志、前田豊信、加藤靖正、島崎伸子、山森徹雄、苦味受容体遺伝子発現量の比較、日本味と匂学会第 48 回大会、2014 年 10 月、静岡

ヒト唾液における炭酸脱水酵素活性の解析、相澤正浩、後藤知子、白川仁、島崎伸子、駒井三千夫、ヒト唾液における炭酸脱水酵素活性の解析、日本味と匂学会第 48 回大会、2014 年 10 月、静岡

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 伸子 (SHIMAZAKI NOBUKO)  
岩手医科大学 歯学部 研究員  
研究者番号 : 30337258