

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10764

研究課題名（和文）非侵襲的検体採取法による直腸肛門粘膜からの炎症性サイトカインの検出

研究課題名（英文）Development of detection of inflammatory cytokine levels in anal Mucosa by noninvasive specimen collection

研究代表者

田中 真琴（Tanaka, Makoto）

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・教授

研究者番号：50431763

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は炎症性腸疾患（IBD）の疾患活動度を客観的に評価可能な簡便な方法の開発を目指し、直腸肛門粘膜から非侵襲的に採取した検体から、極性を有するニトロセルロースメンブレンを使って炎症性サイトカインを検出する方法の有用性・実施可能性を検討した。結果、検体採取が被検者に委ねられるため、採取の標準化が困難なこと、輝度解析による量的評価は、さらなる妥当性検討が必要であることが明らかになった。

また、IBD疾患管理においては重要な患者の主観に基づくアウトカム評価（Patient Reported Outcome Measures: PROMs）開発を行い、国際比較可能な尺度を開発し、信頼性妥当性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IBD患者の腸管炎症の評価は、現在のところ内視鏡評価がゴールドスタンダードであるが、下部消化管内視鏡は患者の負担が大きいと、疾患の悪化の判断は、症状、便検査、血液検査によって把握されている。症状以外の指標では便検査が非侵襲的な評価方法ではあるが、手間があり、患者にとって簡便で身体的・心理的負担を出来る限り低減させた検査が求められている。ニトロセルロースメンブレンを使って炎症性サイトカインを検出する方法の有用性・実施可能性を検討により、検体採取が被検者に委ねられるため、採取の標準化が困難という克服すべき課題を発見した。今後の研究に向け課題を明確にできた点が意義深い。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a simple method capable of objectively assessing disease activity in inflammatory bowel disease (IBD), and investigated the usefulness and feasibility of a method to detect inflammatory cytokines using a nitrocellulose membrane from specimens collected non-invasively from the rectoanal mucosa. The results showed that specimen collection is left to the examinee, making standardisation of collection difficult, and that quantitative evaluation by luminance analysis requires further validation.

In addition, Patient Reported Outcome Measures (PROMs) were developed, which are important in IBD disease management, and internationally comparable scales were developed and tested for reliability and validity.

研究分野：Nursing

キーワード：炎症性腸疾患 クロウン病 潰瘍性大腸炎 モニタリング 非侵襲

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) は、主に腸管に原因不明の炎症を起こす慢性疾患の総称で、いずれも厚生労働省の定める指定難病である潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) とクローン病 (Crohn's disease: CD) の2疾患を指す。両疾患ともに比較的若年で発症し、その後、再燃と寛解を繰り返すため、働き盛りの年代の人々の社会生活に大きく影響を及ぼす。患者数は増加の一途をたどっており、支援体制の確立が急がれる疾患である。疾患管理においては、炎症の状態に応じた適切な治療を行うことが重要であるが、過敏性腸症候群も併存している場合も多く¹⁾、症状悪化が必ずしも IBD の再燃とは限らないため、腸管炎症の評価が非常に重要となる。

また、我々の先行研究では、症状悪化時、一部の患者の受診判断遅れの可能性が明らかになり、症状悪化時の適切な対処と受診判断について支援することの重要性が示唆された^{2,3)}。適切な受診や対処には、客観的指標にもとづくモニタリングの必要性も明らかとなった²⁾。

IBD 患者の腸管炎症の評価は、現在のところ内視鏡評価がゴールドスタンダードであるが、下部消化管内視鏡は患者の負担が大きいため、疾患の悪化の判断は、症状、便検査、血液検査によって把握されている。症状以外の指標では便検査 (便潜血やカルプロテクチン^{*1} が非侵襲的な評価方法ではあるが、採便の準備や片付けの手間があり、患者にとって簡便な方法とは言い難い。IBD は小児も多いため¹⁾、身体的・心理的負担を出来る限り低減させた検査が求められている。

一方、看護師が活用可能な非侵襲的アセスメントの手法に関して、近年、スキンプロテイングというアセスメント手法が峰松らにより試みられている⁴⁻⁷⁾。その手法とは、極性を有するニトロセルロースメンブレンを皮膚や創表面に貼付し、皮膚組織内の可溶性因子を非侵襲的に抽出するもので、この方法で抽出可能な可溶性因子としては、TNF- α をはじめとする代表的な炎症性サイトカインが含まれる。抽出された因子の定性的・定量的評価によって、非侵襲的に皮膚の状態を知ることができる新しい技術として、動物実験や臨床調査において評価されている⁴⁻⁷⁾。腸管炎症の評価に関する研究では、疾患活動度と比例して、腸管粘膜から TNF- α 、INF- γ 、IL-8、IL-17A 等といった炎症性サイトカイン^{*2} が発現していることが生検で採取した組織を用いた研究で分かっている⁸⁾。そこで、腸管炎症の評価にニトロセルロースメンブレンを用いた炎症性サイトカインの検出が応用可能ではないかと考えた。患者自身が座薬を入れるような要領で肛門からニトロセルロースメンブレン付き手袋を装着した指で直腸肛門粘膜に触る等の方法で、検体採取できれば、採便の準備や片付けといった手間がなく簡便であり、患者のメリットが大きい。

*1 カルプロテクチン：カルシウム・亜鉛結合蛋白で好中球内に貯蔵されており、好中球のターンオーバーを示すマーカー。

腸管炎症の指標として、便中カルプロテクチンの有用性が確認され、2017年6月より潰瘍性大腸炎で原則3ヵ月に1度の測定が保険診療で認められている。

*2 炎症性サイトカイン：サイトカインは、細胞間の伝達において重要な低分子タンパク質 (~20kDa) であり、多様な細胞により産生されている。異なる機能をもつ様々なサイトカインがあるが、炎症反応を促進する方向に関与するものを炎症性サイトカインと呼び、代表的なものに腫瘍壊死因子 (略記: TNF)、インターフェロン (略記: INF)、インターロイキン (略記: IL) などがある。

2. 研究の目的

本研究は IBD の疾患活動度を客観的に評価可能な簡便な方法を開発することを目指し、直腸肛門粘膜から非侵襲的に採取した検体から、極性を有するニトロセルロースメンブレンを使って炎症性サイトカインを検出する方法の有用性・実施可能性を検討することを目的とした。これは、皮膚の評価法として開発された手法の腸粘膜への応用可能性を検討するものである。

また、IBD 疾患管理においては患者の主観に基づくアウトカム評価 (Patient Reported Outcome Measures: PROMs) の開発も喫緊の課題であり、国際比較可能な尺度開発も本研究の目的とした。

3. 研究の方法

<健常人ボランティアを対象としたパイロットスタディ>

皮膚での技術の応用であるため、パイロットスタディでは、直腸肛門粘膜からの検体で、ニトロセルロース膜にサイトカインが定量的に結合するかについて検証し、確実に検体を採取できる可能性が高い方法を検討し、健常人のサイトカイン値の分布を把握することを目指し以下の実験を行った。なお TNF- α は、健常人の血中において 0.75~1.66 pg/mL 存在する⁹⁾ことから、健常人の肛門粘膜からも検出されると考えられ、健常人でパイロットスタディを実施した。

ターゲットとするタンパク質の検出には、抗体を用いて組織標本中の抗原を検出する免疫染

法を用いる。抗原抗体反応を可視化するために、抗体に酵素 (Horse Radish Peroxidase など) を標識しておき、抗原抗体反応の後で化学発光基質を反応させ、蛍光顕微鏡で観察する蛍光抗体法を用いていた。異なる実験条件下のタンパク質量を半定量 (比較定量) する際、結果を標準化するため内在性コントロール (発現量が一定で普遍的に存在するタンパク質) として、今回アルブミンを使用した。

分析は、ブロッキング→Alb 抗体反応→蛍光顕微鏡撮影→TNF- α 抗体反応→蛍光顕微鏡撮影→画像データ輝度解析と進めた。ブロッキングには、吸引式免疫反応システム SNAP i. d. 2.0 system (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) を使用し、撮影には科学発光検出専用撮影装置 LumiCube (Liponics, Tokyo, Japan) を使用した。

実験 1 : 2 つの方法 (図 1) で採取 (3 名 6 検体)

① ニトロセルロースメンブレン付き手袋を装着した指で直腸肛門粘膜に触る検査紙のついた手袋を着用し、検査紙を肛門粘膜に約 10 秒間あてる。座薬を入れるような要領で、指先が肛門の内側の粘膜に触れるように実施。

② 綿棒 綿棒を肛門から 1 ~ 2 cm 程度 (綿のついた部分が入る程度) 挿入し、抜き取る。検査紙の中央に、肛門から出した綿棒を 10 秒押し当てる。

1. Direct touch (10 Sec) 2. Cotton swab to membrane (10 Sec)



Tried 3 samples

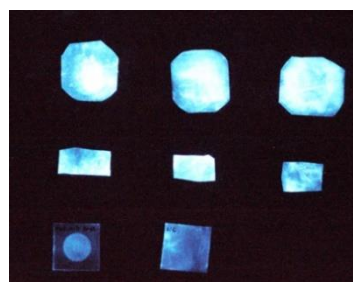


図 2 : 実験 1 結果

図 1 : 実験 1 に用いた 2 とおりの採取方法

受容性の評価において、手袋の方法は、3 名中 2 名より痛みを伴い困難との評価あり。写真 (実験 1 結果) は、アルブミン検出の結果である。上段が②綿棒によるメンブレン、中段が①直接接触のメンブレン、下段右がポジティブコントロール、下段左がネガティブコントロールであるが、3 検体とも検体量過剰で輝度分析に不適であるため、方法変更が必要となった。

実験 2 : 2 つの方法 (図 3) で採取 (5 名 10 検体)

カテーテルの先にメンブレンを取付け直腸肛門粘膜に 10 秒接触させる。挿入時痛緩和のためグリセリンの使用ありと無しで受容性と検体検出への影響を検討した。

結果として、カテーテルが曲がり扱いにくいという評価があること、メンブレンをカテーテルに巻き付けることによる物理的作用により、ブロッキング剤が浸みない箇所が生じ方法変更が必要となった。また、検体量過剰由来と考えられるブロッキング、抗体反応プロセスにおけるネガティブコントロールの汚染も問題となり、検体量のコントロールが課題となった。



Insert membrane-wrapped catheter with/without glycerin

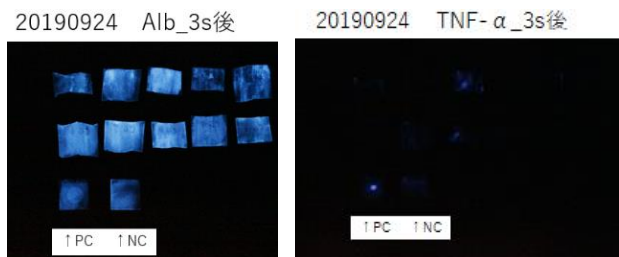


図 4 : 実験 2 結果

図 3 : 実験 2 に用いた 2 とおりの採取方法

実験3：実験2の採取方法で同一対象が5日連続して採取(2名10検体)
 検体保存時間、個体間サイトカインレベルの違い、採取方法の違い(グリセリン使用有無)等の検討のため実験3を実施したが、個体差・検体採取方法の差より、測定ごとの違いが大きいためという結果となった。検体採取が被検者に委ねられるため、採取の標準化が困難なこと、輝度解析による量的評価は、さらなる妥当性検討が必要である。

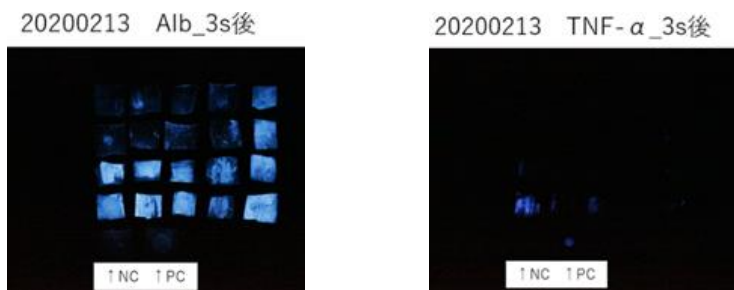


図5：実験3結果

<IBD患者の病状悪化の認識と対処に関するPROMs開発研究>

IBD診療において豊富な経験を有する医師およびIBD患者へのケアに精通した看護師の専従配置があるIBD専門施設に通院中のIBD患者及び、オンラインでリクルーティングしたIBD患者を対象に質問形式調査を行い、

- 1) IBDの自己管理に関するセルフエフィカシーを測定する尺度の日本語版を開発、
- 2) 調査結果の比較により、様々な医療機関に通院する患者のセルフエフィカシー及び日常生活困難感に関して検討した。結果の概要については、成果の項に示す。

4. 研究成果

(1) 108回日本消化器病学会(2022年)臨床的寛解期にあるIBD患者の日常生活における困難感の実態

【目的】潰瘍性大腸炎(UC)およびクローン病(CD)は、炎症性腸疾患(IBD)と総称され、ともに腹部症状等から日常生活で困難に直面するが、寛解期にも困難を感じていることが指摘されている。そこで本研究は、臨床的寛解期にあるUCおよびCD患者の日常生活における困難感の実態を明らかにした。

【方法】IBD専門施設に通うIBD患者及びオンラインでリクルートしたIBD患者を対象に調査を行った。日常生活における困難感は[社会生活上の困難感][排便に関する困難感][活力・活気の低下]の18項目3下位尺度からなる日常生活困難感尺度(DLS)を用いた。各項目は5段階順序尺度「1.まったく困らなかった」から「5.非常に困った」で評価され、疾患別にDLS各項目の回答分布および「3.少しは困った」以上の困難あり割合を算出した。2群の比較はWilcoxon順位検定あるいはt検定を行った。臨床的寛解期の定義は、専門施設ではCDAI<150またはpMayo=0とし、オンラインでは、便回数正常、血便なし、体温正常のすべてを満たす場合とした。

【結果】全体で534名、専門施設から353名(UC, 93, CD, 260)、オンラインから181名(UC, 109, CD, 72)の有効回答が得られた。DLS得点は、両疾患とも[活力・活気の低下の困難感]が他の下位尺度に比べ項目平均得点が高く(UC, 2.4, CD, 2.5, p=0.43)、[社会生活上の困難感](UC, 1.6, CD, 1.8, p=0.01)、[排便に関する困難感](UC, 1.7, CD, 2.0, p<0.001)の下位尺度において、CDがUCに比べ困難が高く、[活力・活気の低下]は有意差がなかった。UCとCDで困難ありの割合の差が最も大きかった項目は「トイレが近くにないと安心できない」でUC, 21%, CD, 40%であり、困難ありの割合が最も高かった項目は「何をするにも非常に疲れやすい」でUC, 51%, CD, 48%であった。

【結論】IBD患者は寛解期においても活力・活気の低下に困難感を抱いており、困難感は概してCD患者がUC患者よりも高かった。

(2) The 17th Europe Crohn's and Colitis Organization (2022)

Development and validation of a 13-item short version of the IBD self-efficacy scale

【Background】The IBD-Self-Efficacy Scale (IBD-SES) is an outcome measurement scale used in various countries, with psychometric properties that predicted psychological distress and showed moderate correlation with QOL. Although the 29-item IBD-SES is useful, a shorter instrument would increase the likelihood of usage. In this study, we aimed to develop a substantially shorter, but still as valid version of IBD-SES.

【Method】A total of 919 patients, 482 from a specialized IBD clinic (UC: 184, CD: 298) and 437 online (UC: 255, CD: 182), were used for psychometric assessment. The original 29-item IBD-SES was reduced using three major analytic steps (assessed ceiling or floor effect, correlation between items, test-retest reliability). The shorter version was

evaluated on construct validity by confirmatory factor analysis, criterion validity by Pearson's correlation coefficients with original version, and internal consistency by Cronbach's alpha coefficient.

【Results】 In the item reduction process, the following items were removed: 2 items due to a ceiling effect, 12 additional items due to high correlation, 2 more items due to a low intraclass correlation coefficient (ICC). The short version was confirmed to consist of the same 4 subscales as the original version, [Managing Stress and Emotions], [Managing Medical Care], [Managing Symptoms and Disease] and [Maintaining Remission] and was validated by confirmatory factor analysis. The fit indices were as follows: Normed $\chi^2 = 7.18$ ($p < 0.001$), comparative fit index (CFI) = 0.94, goodness-of-fit index (GFI) = 0.93, adjusted goodness-of-fit index (AGFI) = 0.89, parsimony goodness-of-fit index (PGFI) = 0.60, and the root mean square error of approximation (RMSEA) = 0.084. Correlation with the original IBD-SES in each subscale was high (0.97-0.98). Cronbach's alpha for each subscale ranged from 0.68 to 0.86.

【Conclusion】 The study showed that the revised scale has improved psychometric properties and demonstrated the reliability and validity of the IBD-SES13. The revised scale could provide clinical usefulness with the possibility of higher response rates.

<引用文献>

- 1) 日本消化器病学会 (編) クロウン病診療ガイドライン. 南江堂 2010
- 2) Tanaka M, Kawakami A, Iwao Y, et al. Gastroenterology Research. 2013;6 (2):49-55.
- 3) 梶井万里絵, 田中真琴, 斎藤凡, 他. 日本慢性看護学会誌. 2015 ; 9(1) 2-9.
- 4) Minematsu T, Horii M, Oe M, et al. Skin Blotting. Advances in Skin and Wound Care. 27: 272-279, 2014.
- 5) Kishi C, Minematsu T, Huang L, et al. Biological Research for Nursing. 17: 135-141, 2015.
- 6) Koyano Y, Nakagami G, Iizaka S, et al.. International Wound Journal. 13: 189-197, 2016.
- 7) Ogai K, Matsumoto M, Aoki M, et al. 1 Journal of Cosmetic Science, 2016, 38, 462-469
- 8) Scaldaferrri F, et al. (2010). World Journal of Gastroenterology 16(21): 2616-2625
- 9) ファルコバイオシステムズ臨床検査案内サイト
<http://www.falco.co.jp/rinsyo/detail/060853.html>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Makoto Tanaka, Aki Kawakami, Kayoko Sakagami, Tomoko Terai, Jovelle Fernandez, Laurie Keefer, Hiroaki Ito.
2. 発表標題 Development and validation of a 13-item short version of the IBD self-efficacy scale.
3. 学会等名 The 17th Europe Crohn's and Colitis Organization (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中真琴, 川上明希, 阪上佳誉子, 寺井朋子, Jovelle Fernandez, 伊藤裕章
2. 発表標題 臨床的寛解期にあるIBD患者の日常生活における困難感の実態
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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	峰松 健夫 (Minematsu Takeo) (00398752)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授 (12601)	
研究分担者	川上 明希 (Kawakami Aki) (00734021)	東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・准教授 (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	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	真田 弘美 (Sanada Hiromi) (50143920)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関