

# 研究計画書

## 学生の腸内細菌叢と肝障害についての検討

研究責任者：齊藤 朋子

千葉県稲毛区弥生町 1-33 千葉大学総合安全衛生管理機構

電話番号：043-290-2214

FAX 番号：043-290-2220

E-mail アドレス：info-hsc@office.chiba-u.jp

緊急連絡先：千葉大学総合安全衛生管理機構

臨床研究実施予定期間：2020 年承認後から 2023 年 3 月 31 日

作成日・承認日・改訂日：

2020 年 10 月 28 日 計画書案第 1 版作成

2020 年 11 月 20 日 計画書案第 2 版作成

2021 年 1 月 15 日 計画書案第 3 版作成

2021 年 6 月 6 日 計画書案第 4 版作成

## 研究実施計画書 目次

1. 研究の背景と目的
2. 研究対象者の選定
3. 研究の方法および研究の科学的合理性の根拠
4. 研究実施期間
5. 予期される利益と不利益
6. インフォームド・コンセントを受ける手続き
7. 健康被害発生時の対処方法
8. 個人情報等の保護方法
9. 研究資金および利益相反
10. 試料・情報の2次利用および他研究機関への提供の可能性
11. 研究組織
12. 記録等の保管
13. 研究成果の発表方法
14. 研究対象者等の経済的負担又は謝礼
15. 参考資料・文献リスト

## 1. 研究の背景と目的

わが国では食習慣の欧米化や運動量の低下などライフスタイルの変化に伴い肥満人口が増加したことから、非飲酒者に生じた脂肪性肝疾患全体を示す非アルコール性脂肪性肝疾患（non-alcoholic fatty liver disease ; NAFLD）は肝疾患の中で最も頻度が高く、成人検診におけるNAFLD合併率は男性の20～30%、女性の10～20%にも上るほどCommon Diseaseとなっている。NAFLDはその一部で肝に炎症・線維化を起こした非アルコール性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis; NASH）の状態に至り、さらにその一部で肝硬変・肝癌に進展しうることが知られている。ウイルス肝炎の治療が飛躍的に進歩し、NASH/NAFLDのようにウイルス肝炎を原因としない肝細胞癌の割合が増加しているとともに、その絶対数も増加しており対策が急務となっている。

さらに、若年者においても肥満およびNAFLDの増加が全世界的に問題となっている。NASH/NAFLDの病態機序としてはインスリン抵抗性をもとに、PNPLA3 に代表される遺伝的背景、サイトカイン、エンドトキシン、腸内細菌、酸化ストレスなど様々な要因・病態が関与して肝臓に惹起される炎症が脂肪化と同時あるいは先行して起こることで、NAFLDを進展させるという“multiple parallel hits hypothesis”が近年提唱されており精力的に研究されている<sup>1)</sup>。

中でも近年特定の腸内細菌が腸以外の臓器の炎症性疾患に関与することが報告されている。NASH/NAFLDに関しても、腸内細菌叢の変化が発症および増悪に関与することが示唆されている。

肝臓はその血流の多くを腸管由来の門脈から供給されており、菌体成分や代謝産物（短鎖脂肪酸や二次胆汁酸など）などの腸内細菌由来の様々な因子に暴露されている。健常時には、これらの因子の肝臓への流入はごくわずかであるが、腸管の炎症や腸内細菌叢の変化などによって腸管のバリア機能が破綻すると、腸管透過性亢進による腸内細菌由来因子の肝臓への流入が増加し、過剰な免疫応答や直接的な毒性によって肝障害が惹起されるというものである。

肥満者において腸内細菌叢が健常者と異なっており腸内細菌の遺伝子パターンが変化していることが明らかにされている。NAFLDの場合も腸内細菌由来のエンドトキシンの門脈血流への流入に伴い肝マクロファージであるKupffer細胞の活性化が生じ、肝障害進展に寄与していることが想定されている。最も新しい研究の1つにおいては、NAFLD患者で高頻度に見られるアルコール高産生肺炎桿菌（high-alcohol-producing *Klebsiella pneumoniae*）をSPFマウス（specific pathogen-freeマウス）に摂取させるという実験系でマウスNAFLDの進展が報告されている<sup>2)</sup>。

さらに肥満の指標としてBMIが知られているが、BMIを越えて体脂肪量・体脂肪率や骨格筋量などの「体組成」と肝疾患の関連性も指摘されている。脂肪組織や骨格筋はインスリンの重要な標的臓器であり、とりわけサルコペニア（骨格筋肉量の減少）はNAFLDの危険因子である。この他にも脂肪細胞から分泌される生理活性分子の総称であるアディポカインとしてレプチン、アディポネクチンなどがあるがこれらが肥満における脂肪組織由来の慢性炎症としての病態生理的意義が注目されている<sup>3)</sup>。

しかしながら肥満歴が相対的に短いと考えられる若年者において上記のような知見があてはまるのかという研究自体がなされていないのが現状である。若年者であってもNASHへの進展リスクを既に有する集団とそうでない集団に分けられる可能性があり、本研究はこの差異を明らかにすることでNAFLDの詳細な病態理解と治療法の創出につなげることを目標にする。

そこで、本研究においては、NAFLD患者の糞便や血液検体を用い、若年肥満者の肝障害あるいは肝線維化に関与しうる腸内細菌を同定することを目的とする。最終的にはNASH発症の高リスク群の同定による若年者NASH予備軍サーベイランス法の開発や、腸内細菌制御による

予防に寄与することを目標とする。具体的には、肥満学生および非肥満学生の糞便および末梢血を採取し、糞便中の腸内細菌を網羅的に測定し、血液検査上の肝障害がある群で、もしくは脂肪肝が見られる群で特異的に変化している腸内細菌および代謝産物を同定する。

## 2. 研究対象者の選定

2023年3月31日までに、本研究についての同意が得られた18歳以上25歳未満の学生。

総合安全衛生管理機構で血液検査を行い、糞便は採便容器を対象者に配布し、学内あるいは自宅で採取し提出してもらう。

目標症例数：約100名

### (1) 選択基準：

- 1) 18歳以上25歳未満の者
- 2) 研究の趣旨を理解し同意した者（未成年者は保護者の署名を取得）

### (2) 除外基準：

- 1) 持病があり内服治療を受けている者
- 2) 医師が安全面を考慮した結果不相当であると判断した者

## 3. 研究の方法および研究の科学的合理性の根拠

○観察研究デザイン：前向きコホート研究

○方法

対象者に同意説明文書を渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、対象者の自由

意思による同意を文書で得る。

同意が得られた者について、匿名化したデータ（臨床情報 [年齢、性別、飲酒量等]、血液検査所見 [AST 値、ALT 値、血小板数等]）を入力した Excel ファイルを、作成しセキュリティに配慮して保存・解析する。

試料提供の同意が得られた後に、採便管を配布し糞便検体を自己で採取してもらう。血液の採取は総合安全衛生管理機構にて行う。

糞便試料は、個人情報特定できない状態で外部の解析会社に送付され、腸内細菌のゲノム DNA 抽出に用いられる。血液試料は、個人情報特定できない状態で外部の検査会社に送付され、測定に用いられる。

#### 〈研究スケジュール〉

- ① 医師からの研究説明、同意書記入、身体測定、腹部超音波検査、病歴記入（40 分程度）
- ② 糞便提出、血液検査結果説明（15 分程度）

#### ○検討項目：

（1）臨床情報：年齢、性別、身長、体重、体組成、飲酒量、既往歴、内服薬、家族歴、生活習慣などの情報

（2）臨床検査：AST、ALT、ALP、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン値、血清アルブミン値、血清クレアチニン値、プロトロンビン時間、総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪、ヘモグロビン A1c、総胆汁酸量、フェリチン値、白血球数、ヘ

モグロビン値、血小板数、HBs 抗原、HCV 抗体、腫瘍マーカー（AFP）、肝線維化マーカー（4 型コラーゲン 7s）、アディポカイン（レプチン、アディポネクチン）、エンドトキシンなど。

（3）腸内細菌叢解析：糞便から腸内細菌のゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、細菌 16S rRNA を解析し、腸内細菌を同定する。

（4）統計学的手法：カイ二乗検定・t 検定・U 検定などの医学研究における基本的解析手法を用いて解析する。

#### 4. 研究実施期間

2020 年承認後から 2023 年 3 月 31 日

研究実施責任者が、1 年に 1 回以上、提供された試料の数、研究結果・進行状況、問題発生の有無などについて、千葉大学総合安全衛生管理機構長に報告を行うものとする。

#### 5. 予期される利益と不利益

##### ○利益：

本研究により被験者がすぐに受けられる利益は無いが、本研究によって解明された結果が社会へ還元されることにより、将来的に被験者も最善の医療を享受できる可能性がある。また、血液検査での肝炎ウイルス感染や腹部超音波検査での異常所見が判明した場合に研究代表医師・分担医師の判断で外部医療機関に紹介し円滑な医療につなげることが出来る。

##### ○不利益：

糞便は排泄物であるため、検体採取に際して不利益は発生しない。

採血量は、健康上支障ない量であると考えられる。万が一、採血時に気分が悪くなった

被験者については、すぐに採血を中止し、担当医師が適切な対応を取る。

## 6. 同意を受ける手続き

千葉大学総合安全衛生管理機構倫理審査委員会で承認の得られた同意説明文書を試料提供者に配布し、文書及び口答による十分な説明を行い、試料提供者の自由意志による同意を文書で得る。代諾者による同意は認めない。ただし、未成年の場合は本人に加えて保護者の同意（署名）を得る。

患者の同意に影響を及ぼすと考えられる有効性や安全性等の情報が得られたときや、患者の同意に影響を及ぼすような実施計画等の変更が行われるときは、速やかに患者に情報提供し、研究等に参加するか否かについて患者の意思を予め確認するとともに、事前に倫理審査委員会の承認を得て同意説明文書等の改訂を行い、患者の再同意を得る。

一度同意を得た場合でも、試料提供者が文書を持って同意撤回の意思を表示した場合には、同意を撤回することができる。ただし、同意撤回の文書を提出した時点ですでに研究結果が学会や論文等で報告されていた場合など、解析結果を廃棄することが困難な場合には同意を撤回することはできない。

## 7. 健康被害発生時の対処方法

本研究は、被験者に介入を行う研究ではないため、研究による健康被害は原則として発生しないものと考えており、特別な補償は設けない。

糞便は排泄物であるため、検体採取に際して健康被害は発生しない。

被験者から通常診療相当の採血量（5-20ml）よりやや多い、30ml程度の採血を行うが、健康上支障ない量であると考えられる。万が一、採血時に気分が悪くなった被験者につい

ては、すぐに採血を中止し、担当医師が適切な対応を取る。

## 8. 個人情報等の保護方法

患者データは匿名化された上でデータ処理を行うため、個人が特定されるデータは用いない。匿名化されたデータは、総合安全衛生管理機構において集積・管理し、研究実施期間が終了した際は廃棄する。

糞便および血液試料は外部検査機関へ送付されるが、この際にも個人が特定されるデータが用いられることは無い。

この試験で得られた結果を学会や学術雑誌に発表する際にも、患者の個人に関する情報が公表されることはない。

同意撤回後は、血液検体、糞便検体および患者データは個人名が特定出来ない状態で破棄する。ただし、研究結果が学会や論文等で報告されていた場合に当該者のみの解析結果を廃棄することが困難な場合には同意を撤回することはできない。

匿名化の照合表は診療用パソコン上でパスワードによるアクセス制限をかけて管理し、千葉大学総合安全衛生管理機構内の施錠可能な部屋の施錠可能なキャビネットに、保管する。

## 9. 研究資金

本研究は主に、科研費を使用する。

## 10. 試料・情報の2次利用および他研究機関への提供の可能性

本研究で得られた試料・情報は、2次利用や他研究機関への提供を行う事はない。



## 1 1. 研究組織

### 研究代表者

千葉大学総合安全衛生管理機構

助教	齊藤 朋子	被験者への説明と同意の取得、臨床情報・診療データの取得 取得したデータの総合安全衛生管理機構における管理
----	-------	---

### 研究分担者

千葉大学総合安全衛生管理機構

機構長	今関 文夫	被験者への説明と同意の取得、臨床情報・診療データの取得、研究についての指導
-----	-------	---------------------------------------

助教	高田 護	データ解析、取得したデータの総合安全衛生管理機構における管理
----	------	--------------------------------

千葉大学大学院医学研究院消化器内科学

教授	加藤 直也	研究についての指導
----	-------	-----------

千葉大学医学部附属病院 臨床開発推進センター

特任講師	小笠原 定久	データ解析、取得したデータの亥鼻地区における管理
------	--------	--------------------------

千葉大学医学部附属病院 腫瘍内科

医員	對田 尚	データ解析、取得したデータの亥鼻地区における管理
----	------	--------------------------

千葉大学総合安全衛生管理機構

看護師	生稻 直美	臨床情報の取得
看護師	鈴木 のり子	臨床情報の取得（退職の為 2021 年 4 月 23 日まで）
看護師	岩倉 かおり	臨床情報の取得
看護師	田中 麻由	臨床情報の取得
看護師	鍋田 満代	臨床情報の取得
看護師	横地 紀子	臨床情報の取得、情報の整理、検体の送付作業
臨床検査技師	寺山 多栄子	臨床情報の取得
技術職員	北橋美由紀	被験者の予約取得、被験者リクルート活動の補助

## 1 2. 記録等の保管

### (1) 試験等に係る文書等の保管

試験等の実施に関わる必須文書は、研究代表者を保管責任者とし、千葉大学総合安全衛生管理機構内の施錠可能な部屋の施錠可能なキャビネットに保管する。研究期間終了後には、シュレッダーにかけるなど個人情報が入らない状態に処理した上で廃棄する。

### (2) 試験等に係る試料の保管

生体試料は、外部検査機関での検査・測定に用いるのみで、千葉大学内での保管は行わ

ない。

### 1 3. 研究成果の発表方法

本研究で得られた研究成果は、学会や学術誌、データベース上などで発表する。発表する際には、患者の個人に関する情報が公表されることはない。

### 1 4. 研究対象者等の経済的負担又は謝礼

本研究にかかる費用は科研費を主として供出され研究対象者に経済的負担は発生しない。また研究参加への謝礼として血液・糞便・臨床情報の全てを提供した被験者1名につき、クオカード3000円分を進呈する。交通費は支給しない。のちに同意を撤回した場合でも謝金の返還は求めない。

### 1 5. 参考資料・文献リスト

1. Fernando Bessone, María Valeria Razori, Marcelo G Roma Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cell Mol Life Sci.*2019;76:99-128.
2. Jing Yuan, Chen Chen, Jinghua Cui, Jing Lu, Chao Yan, Xiao Wei, Xiangna Zhao, NanNan Li, Shaoli Li, Guanhua Xue, Weiwei Cheng, Boxing Li, Huan Li, Weishi Lin, Changyu Tian, Jiangtao Zhao, Juqiang Han, Daizhi An, Qiong Zhang, Hong Wei, Minghua Zheng, Xuejun Ma, Wei Li, Xiao Chen, Zheng Zhang, Hui Zeng, Sun Ying, JianXin Wu, Ruifu Yang, Di Liu et al. Fatty Liver Disease Caused by High-Alcohol-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Cell Metab.* 2019;30:1172.
3. Stergios A. Polyzos, Jannis Kountouras, Christos S. Mantzoros. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *METABOLISM CLINICAL AND EXPERIMENTAL* 2016;65:1062-1079