

2) ヒト介入試験の実際

女子栄養大学 鈴木 平光

はじめに

食品の機能性を評価する方法として、①培養細胞を用いる *in vitro* 法、②小動物(マウスやラット)を用いる動物実験法、③地域等での食事調査と健康との関係を調べる疫学的手法、④健康なヒトに食品を摂取してもらい、その効果を確認するヒト試験法¹⁾、⑤患者に食品を摂取してもらい、その有効性を明らかにする臨床試験法等がある。一般に、①の培養細胞を用いる方法では、ある食品成分が消化吸収されて、そのままの化学形態で標的臓器に到達することが明らかなものについてのみ有効と考えられる。また、②の動物実験では動物とヒトとの違いを十分考慮し、摂取量や摂取期間、動物種や齢の選択等を適切に行えば、かなり有効な知見が得られる。また、これらの試験法は、ヒト試験ではむずかしいメカニズム(作用機構)の解明にも役立つものである。③の疫学研究では、いかに交絡因子を排除するかがポイントである。これらの①から③の試験法の場合、得られた成果は食品の機能性解明のためのヒントであり、有効である可能性を示すものである。一方、④や⑤の健康なヒトまたは患者をボランティアとして募集し、試験食を摂取する研究では、③の疫学調査と同様、交絡因子を排除した集団を用いること等、適切な方法で実施することにより、決定的な結論を得ることが可能である。

従来から、医薬品については、ヒト介入試験により、明確な薬効や安全性についての治験が十分得られなければ、医薬品として認可されない。食品についても、医薬品に準じたデータが必要な場合もあるが、一般に、常食としているものであれば、長期に摂取した場合でも医薬品よりも副作用が出にくいと考えられている。このことは逆に、短期間では医薬品のように強い効果は期待できないことを示している。

ここでは、筆者が食品または食品成分の機能性を評価するために行っているヒト介入試験の経験^{2~5)}から、1日当りの摂取量等を設定する試験計画の方法、ボランティア集団の特徴をつかみ、交絡因子を排除する方法、倫理的な問題を解決する方法等の実際を紹介する。

プロトコール

1. 試験計画の立案

- 1) 1日当りの摂取量を決定する。
- 2) 摂取方法及び供給体制を確立する。
- 3) 摂取期間及び実施場所を決定する。

2. 倫理委員会の承認

- 1) ヘルシンキ宣言に基づいた人権擁護を明記する。
- 2) 試験参加者（ボランティア）への説明文書を作成する。
- 3) インフォームド・コンセント(同意書)の書式を作成する。

3. 試験参加者の募集

- 1) ポスターを作成する。
- 2) 研究計画を説明する。
- 3) 個人情報についてのアンケート調査を実施する。

4. 摂取試験の実施

- 1) 二重盲検法による摂取試験を行う。
- 2) 日誌による食事調査を行い，試験食の摂取を確認する。

5. 身体状況等の測定

- 1) 測定日を決定する。
- 2) 測定についての注意を喚起する。
- 3) 測定場所・時間及び測定者を決定する。

6. データの解析

- 1) 各測定項目についての平均値・バラツキ・有意差を算出する。
- 2) アンケート調査結果及び日誌を解析する。

7. ボランティアへの負担軽減費（謝礼）等

- 1) ボランティアに負担軽減費を支払う。
- 2) プラセボ食品摂取者にアフターケアを行う。

プロトコールのポイント，注意点等

1. 試験食品または食品成分の 1 日当たりの摂取量を決定する際には，毎日ある程度摂取しているものか，または，ほとんど摂取していないものかにより，設定の仕方が異なってくる。毎日摂取している食品または食品成分である場合には，一般に，その摂取量と同量（摂取量は 2 倍になる）から，多くても 2 倍量（摂取量は 3 倍になる）までならば，比較的安全性が保てる量と考えられ，長期摂取による大きな問題は生じないと思われる。しかし，通常ほとんど摂取してい

ない成分が含まれている場合には、その成分の NOAEL（最大無毒性量）以内の摂取としなければならない（実際には、NOAEL に 10 倍の安全率をかけることが多い）。特に、この場合には慎重に摂取量を決定する必要がある。

摂取方法については、食事前、食事とともに、または食事後、さらには何時でも可という中からいずれかを選択する。また摂取形態についても、ある成分を含有した食品、ソフトカプセルに詰めたもの、錠剤化したもの等、いろいろあるが、毎日確実に摂取してもらうことが重要である。ソフトカプセルや錠剤になっているものであれば、水とともに飲用することができ容易であるが、含有食品の場合には、毎日摂取しても飽きが来ないように工夫しなければならない。また、ソフトカプセルや錠剤であれば、試験開始時に終了時までのサンプルを供給することができるが、含有食品の場合には、その消費または賞味期限を考慮した供給体制を確立する必要がある。

摂取期間については、その目的とする機能性により異なる。例えばメタボリックシンドローム予防食品を想定しているのであれば、3 ヶ月程度必要である。また、脳神経系に対する機能を想定しているのであれば、少なくとも 3~6 ヶ月の摂取試験が必要となる。さらに、実施場所については、試験への参加者すべてが同じ食事をしている施設で行えれば理想的である。現在考えられる施設としては特別養護老人ホーム、病院、刑務所等がある。この場合には、比較的少ない人数（試験開始時に 50 名程度は必要）でも有意な結果が出やすい。しかし、ある地域の住民や学生、事業所職員等を対象とした場合には、その地域の特徴や個々人の食生活の違い、さらには四季や行事（正月等）による食生活の変化があるため、施設で試験するときよりも多くの人数が必要である。

2. 倫理委員会は、大学、研究所、病院等の機関で開催されており、ヒト介入試験を実施する上でその承認は必要不可欠なものとなっている。その書式及び内容は各機関の倫理委員会で若干異なるが、試験の課題名、研究者、実施場所、実施機関、試験研究の概要、試験対象者、倫理的配慮等についての審議が行われる。特に倫理的配慮においては、ヘルシンキ宣言に基づき、試験参加者の個人情報の漏洩を防ぐために、個人データの管理を個人名が同定できないように ID 番号でのみで扱い、個人名 ID と各測定データは別途保管する必要がある。

試験の参加者には、先ず始めに、試験内容等の説明を十分に行う必要がある。このための文書（例えば、「試験研究へのご協力を申し出いただきました皆様へ」）を作成する。この文書は、なるべくわかり易く、誰でもが理解できるように記述する。また、この文書中に必ず、“本試験に参加を同意された後でも、辞退されることに何ら不都合はありません”との一言を明記することが望まれる。

インフォームド・コンセント（同意書）については、各機関の倫理委員会で所定の様式がある場合が多い。ここでは、一般には（成人の場合）、参加者本人に署名及び捺印を御願います。しかし、参加者が未成年、認知症の高齢者、神経系疾患患者などでは本人と保護者（後見人）の2名の署名・捺印が必要となる。さらに、倫理委員会での承認を得るためには、試験により生じる個人及び社会への不利益や危険性がないこと、さらに学術上の貢献が予測できることを明記する。

3. 試験参加者（ボランティア）の募集に際しては、試験の概要が良くわかる、楽しそうなポスター作成する（図1）。また、前述の「試験研究へのご協力を申し出ていただきました皆様へ」を用いて、研究計画等を説明し、質問を受け付ける。さらに、年齢、性別、既往症、飲酒習慣の有無、喫煙の有無、家族病歴等、個人情報についてのアンケート調査を実施する（図2）。これは、後日、測定データを解析する上で、大変重要な情報となる。



被験者募集!!

DHAヨーグルトで集中力UP!?

DHAを含む魚油には、心血管系疾患予防効果、脳神経系の発達及び維持向上効果があることが知られています。

そこで、DHAを含む魚油を添加したヨーグルトを食べていただき、女子学生の**集中力UP**や生活習慣病予防効果について検証したいと考えております。よって、下記の試験の被験者を募集いたします。

この実験は身体所見、血液性化学検査、問診、日誌からの評価となり、これらの情報は個人情報保護法に基づき管理いたします。なお、本研究に参加を同意された後でも、辞退されることに何ら不都合はありませんので申し添え致します。

- 研究内容：DHA含有ヨーグルトの集中力向上、生活習慣病予防効果に関する研究
- 被験者：20歳以上の女子学生（学内ボランティア）**50名**
毎日ヨーグルトを食べていただきます。
試験責任者が本試験に参加することを適当とした方
- 研究期間：計15週間（内12週間は被験食品の摂取期とする）
- 謝礼：あり
- 募集〆切：平成 年 月 日（ ）

詳しい実験内容について知りたい方、この実験に参加希望の方は下記までご連絡ください。
食品生産科学研究室（2号館4階）
担当：〇〇〇〇（Tel:XXXXXXXX、E-mail:XXXXXXXXXXXXXXXXXX）



図1 参加者募集のためのポスターの例

アンケートにご協力をお願いします

私たち女子栄養大学 食品生産科学研究室では
 糖尿病予防機能についてこれから研究していこうとしています。
 そこで今回皆さんに下記のアンケートに
 答えていただきたく思い、作成しました。
 あてはまるものに○をつけ、()は記入してください。

・ 身体状況についてお聞きします。
 わかる範囲で結構ですのでお答えください。

問10、身長 (cm) 体重 (kg)
 問11、空腹時血糖 (mg/dl)

問12、糖尿病と診断を受けたことがありますか?
 ①はい ②いいえ

問13、その他に今までにかかったことのある病気があれば教えてください。
 ()

問14、ご家族の中に認知症の方はいらっしゃいますか?
 ①はい ②いいえ

問15、問14で①はいと答えた方にお聞きします。
 その方の年齢とあなたとの関係を教えてください。
 【例：87歳、実母】
 ()

・ あなた自身についてお聞きします。

問1、性別 ①男性 ②女性

問2、年齢 (歳)

問3、職業 ①自営業 () ②会社員 ③公務員
 ④パート・アルバイト ⑤学生 ⑥専業主婦
 ⑦無職 ⑧その他 ()

問4、あなたは独身ですか? ①はい ②いいえ

問5、問4で②いいえと答えた方にお聞きします。
 家族構成を教えてください。
 ()

問6、あなたは今お住まいの場所にいつ頃から住んでいますか?
 ①生まれたときから ②約 () 年前から
 ③その他 ()

・ 食生活についてお聞きします。

問7、毎日の食事の中でメインとなるおかずは何が多いですか?
一番多いと思うもの一つをお答えください。
 ①肉 ②魚 ③卵 ④豆

問8、魚を週何回くらい食べますか?
 ①全く食べない ②1～2回
 ③3～4回 ④5～6回 ⑤7回以上

問9、よく食べると思う魚の種類を3つ挙げてください。
 ()

ご協力ありがとうございました

今回お書きいただいたデータを参考にし
 研究を進めていきたいと思っております。
 本当にありがとうございました。

図2 アンケート調査の例

4. 摂取試験の実施に当たっては、試験したい食品成分を含んでないプラセボ食品も作製・準備し、無作為割付をした後、二重盲検法により行うことが国際的には求められている。二重盲検法とは、被験者及び測定者等が試験食品かプラセボ食品かのどちらを摂取しているかまたは摂取している人なのかがわからないようにして行う試験法である。この情報は試験が終了するまで、研究主任者と一部の者のみを知るものである。この方法の利点は、被験者及び測定者のプラセボ効果や先入観を排除し、より客観的なデータを得ることができることである。

全食給仕される施設で摂取試験を行う場合は、その施設の管理栄養士により、その全食のメニュー情報を明らかにすることができるが、そうでない場合には日誌による調査を行っておく必要がある。日誌では、試験食品またはプラセボ食品を規定どおり摂取したのかどうかについてのチェックを行うようにする。また、食事内容の調査法としては24時間思い出し法、食事歴法、食物摂取頻度調査法(FFQ)、食事記録法、陰膳法等があるが、前3法は比較的容易であり、被験者の負担が少ないものである。この他、日誌では運動の強度や医薬品の使用についても記述できるようにしておく必要がある。そして、日誌は毎日記入することから1日当たりA5用紙1枚におさまるように作成すると良い(図3)。

日付 ○月 ×日 (月)								
排便 1回								
食事内容	朝食		昼食		夕食		間食	
	内容	概量	内容	概量	内容	概量	内容	概量
食事内容	ご飯	1杯	ご飯	1杯	ご飯	1杯	クッキー	3枚
	味噌汁(豆腐)	1杯	豚の生姜焼き	1食	鮭のムニエル	1食	アイスクリーム	1つ
食事内容	納豆	1パック	付け合せ (キャベツ)	50g	付け合せ (トマト)	3切れ		
			お茶	1杯	お茶	1杯		
				りんご	1/2			
	ヨーグルトの摂取 有・無		生活活動強度指数 I・II・III・IV		医薬品等の利用 内容:風邪薬(毎食後1錠)			
メモ	1週間に1回体重を測って下さい。体調不良なども書いてください。 ※体調について以外でもOK							

図3 日誌の記入例

5. 身体状況等の測定日については、試験計画作成時に決定すべきものである。例えば、3ヶ月の摂取試験では、少なくとも摂取前、1ヶ月、2ヶ月、3ヵ月後には測定が必要である。6ヶ月の長期摂取試験の場合には、少なくとも、摂取前、3ヵ月後、6ヵ月後には測定しなければならない。

測定についての注意喚起は、その測定項目により異なってくる。例えば、メタボリックシンドローム予防食品を想定しているのであれば、通常行っている健康診断と同様に採血を行うので、その前日午後9時以降の水以外の飲食は慎むようにする必要がある。間違っても朝食を摂取してしまっても採血・測定した場合には、血糖値や中性脂肪濃度が高い値を示すことになる。

特に採血については、午前中に実施し、採血終了後に朝食をとるようにする。また、測定場所については、病院や保健室、または、衛生上問題がない会議室を利用する。そして、測定者は、病院の場合、医師立合いのもと院内の健診センター等の看護師や検査技師が行い、病院以外の場合も同様に巡回健診スタッフによる測定が可能である。測定時に得られた血液は、臨床検査機関(有料検査会社)にて、中性脂肪等の測定を行い、後日、そのデータと残りの血液サンプルを返却してもらうと良い。なお、この血液成分の測定にかかる経費は比較的安価である。

6. 各測定項目については、各群での平均値、バラツキ(標準偏差、標準誤差)、群間の有意差検定を行う必要がある。簡単な方法としては、試験食品摂取群とプ

ラセボ食品摂取群との間の差の検定として **Student t-test** や **Welch t-test** を用いるが、場合によっては、**Wilcoxon** の順位和検定、フィッシャーの正確確率検定または、多重検定などが必要となる。

アンケート調査結果や日誌を解析することにより、試験への参加者の食生活等を層別化することも可能である。また、この日誌の解析から、参加者の食生活、運動量、体調に変化がなかったかを明らかにすることができる。

7. 参加者となってくれた人には、その負担の大小に応じた負担軽減費（謝礼）を支払う必要がある。3 ヶ月間の摂取試験で 1 人当たり 1～3 万円は必要と思われる。プラセボ食品摂取者に対しては、試験終了後希望があれば、ある一定期間、試験食品を供給することも配慮すべきである。さらに、ボランティア本人がデータの開示を求めた場合には、本人のみのデータを通知するべきである。

おわりに

ヒト介入試験は多額の経費がかかると言われている。経費として見込んでおかなければならないのは、試験食品及びプラセボ食品製作費、その運搬費用、その成分分析費用、実施における人件費（参加者への食品配布作業や巡回健康診断）、検査費用、参加者の負担軽減費（謝礼）、学会発表及び学術雑誌への掲載費用等である。例えば、50 名規模の介入試験を 3 ヶ月間実施し、それぞれの参加者が 4 回の採血を行う場合には、500～1000 万円程度は準備しておく必要がある。

また、ヒト介入試験の実施において一番むずかしいことは、参加者の募集である。一般のヒトを対象に募集すると、女性の参加者が多くなる傾向にある。働き盛りの男性では、多忙なためや面倒なことであるとして敬遠されることが多い。したがって、男性のデータを得にくいのが現状である。

今後は、50 名程度のヒト介入試験から、さらに大規模な介入試験の実施が求められるようになると思われる。その際、本稿が少しでもお役に立つことができれば幸いである。

参考文献

- 1) 鈴木平光，和田 俊，三浦理代編著，「水産食品栄養学－基礎からヒトへ－」，（技報堂出版，東京），341-344(2004)。
- 2) 鈴木平光，森川洋一，高齢者の知的機能に及ぼす魚油及び緑茶抽出物摂取の影響：特別養護老人ホームにおける 6 ヶ月の試験結果，脂質栄養学，**14**, 155 (2005)。
- 3) 鈴木平光，樋口智之，西塔正孝，白井展也，土橋裕美子，森川洋一，高齢者の知的機能に及ぼす魚油及び緑茶抽出物含有食品摂取の影響：特別養護老人ホームに

おける 6 ヶ月の試験結果，脂質栄養学，**15**, 160 (2006)。

- 4) 鈴木平光，樋口智之，西塔正孝，白井展也，土橋裕美子，森川洋一，川島 勝，田村 豊，高齢者の知的機能に及ぼす DHA 含有ヨーグルト摂取の影響：特別養護老人ホームにおける 6 ヶ月の試験結果，脂質栄養学，**16**, 156 (2007)。
- 5) 鈴木平光，西塔正孝，樋口智之，ボインドグルン金花，松沼ちなつ，斎藤美香，吉田亜由美，白井展也，田村 豊，川島 勝，女子大生の心理状態及び視力に及ぼす DHA ヨーグルト摂取の影響，脂質栄養学，**17**, 158 (2008)。