

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	血中アミノ酸濃度モニタリングによる低栄養児に対する効果的栄養補給方法の研究
Title(English)	
著者(和文)	佐藤和
Author(English)	Wataru Sato
出典(和文)	学位:博士(学術), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:乙第4202号, 授与年月日:2022年9月30日, 学位の種別:論文博士, 審査員:一瀬 宏,山本 直之,林 宣宏,白木 伸明,折原 芳波
Citation(English)	Degree:Doctor (Academic), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:乙第4202号, Conferred date:2022/9/30, Degree Type:Thesis doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

令和4年度

血中アミノ酸濃度モニタリングによる  
低栄養児に対する効果的栄養補給方法の研究

佐藤 和

指導教員 一瀬 宏 教授

## 目次

目次 .....	2
略語表 .....	5
【第一章 背景】.....	7
【第二章 アミノ酸強化 RUTF による消耗症治療介入試験】.....	11
1. 緒言 .....	11
2. 方法 .....	16
2.1. 試験デザイン.....	16
2.2. 参加者 .....	17
2.2.1. セッティング .....	17
2.2.2. リクルート.....	17
2.2.3. 倫理審査、同意取得.....	20
2.3. 介入 .....	21
2.3.1. RUTF の栄養組成.....	21
2.3.2. RUTF による治療介入.....	27
2.4. アウトカム .....	28
2.4.1. 回復率 .....	28
2.4.2. 血液標本の採取.....	28
2.4.3. 血液標本の測定 .....	29
2.5. 症例数 .....	31
2.6. ランダム化 .....	33
2.7. 統計解析 .....	34
2.7.1. サブグループ .....	34
2.7.2. 非劣性マージン.....	34
2.7.3. 背景情報の解析 .....	35
2.7.4. 介入が血中指標に与えた影響の解析 .....	35
2.7.5. 血中指標の相関解析 .....	37
2.7.6. ソフトウェア .....	37
3. 結果 .....	38

3.1. 背景情報 .....	38
3.2. 血中アミノ酸濃度 .....	40
3.3. 研究対象として注目したアミノ酸の非劣性検定 .....	47
3.4. 血中キヌレニン濃度 .....	51
3.5. 回復率 .....	55
3.6. 病態のサブグループ解析 .....	56
3.6.1. 背景情報 .....	56
3.6.2. 血中アミノ酸濃度 .....	58
3.6.3. 研究対象として注目したアミノ酸の非劣性検定 .....	63
3.6.4. 血中キヌレニン濃度 .....	68
3.6.5. 回復率 .....	71
3.7. 血中指標の相関解析 .....	72
4. 考察 .....	75
【第三章 離乳食用栄養強化サプリメントによる発育障害予防介入試験】 .....	84
1. 緒言 .....	84
2. 方法 .....	88
2.1. 試験デザイン .....	88
2.2. 参加者 .....	89
2.2.1. セッティング・リクルート .....	89
2.2.2. 倫理審査、同意取得 .....	89
2.3. 介入 .....	91
2.3.1. 補完食サプリメントの栄養組成 .....	91
2.3.2. 治療介入 .....	93
2.4. アウトカム .....	94
2.4.1. 血液標本の採取 .....	94
2.4.2. 血液標本の測定 .....	95
2.5. 症例数 .....	97
2.6. ランダム化 .....	99
2.7. 統計解析 .....	100

2.7.1. 背景情報の解析.....	100
2.7.2. 介入が血中指標に与えた影響の解析.....	100
2.7.3. サプリメントの使用量と血中アミノ酸濃度、HAZとの関係の推定.....	101
2.7.4. 血中アミノ酸濃度と成長指標の変化量（エンドポイント-ベースライン）の相関.....	103
2.7.5. ソフトウェア.....	104
3. 結果.....	105
3.1. 背景情報.....	105
3.2. コンプライアンス.....	105
3.3. 血中アミノ酸濃度.....	107
3.4. IGF-1とコルチゾールの血中濃度.....	111
3.5. サプリメントの使用量と血中アミノ酸濃度の関係.....	112
3.6. サプリメントの使用量とHAZの関係.....	117
3.7. 血中アミノ酸濃度と成長指標の変化量（エンドポイント-ベースライン）の相関.....	118
4. 考察.....	120
<b>【第四章 総括・展望】</b> .....	127
謝辞.....	128
論文目録.....	129
引用文献.....	130

## 略語表

Met	Methionine, メチオニン
Lys	Lysine, リジン
Val	Valine, バリン
Leu	Leucine, ロイシン
Ile	Isoleucine, イソロイシン
Phe	Phenylalanine, フェニルアラニン
Trp	Tryptophan, トリプトファン
Thr	Threonine, スレオニン
His	Histidine, ヒスチジン
Ala	Alanine, アラニン
Arg	Arginine, アルギニン
Asp	Aspartic acid, アスパラギン酸
Asn	Asparagine, アスパラギン
Glu	Glutamic acid, グルタミン酸
Gln	Glutamine, グルタミン
Pro	Proline, プロリン
Tyr	Tyrosine, チロシン
Gly	Glycine, グリシン
Ser	Serine, セリン
Cys2	Cystine, シスチン(システイン 2 量体)
EAA	Essential amino acid, 必須アミノ酸
BCAA	Branched chain amino acid, 分岐差アミノ酸
F-ratio	Fischer ratio, フィッシャー比
NEAA	Non-essential amino acid, 非必須アミノ酸
WHO	World health organization, 世界保健機関
SAM	Severe acute malnutrition, 重度低栄養
MUAC	Mid-upper arm circumference, 上腕部周囲径
RUTF	Ready-to-use therapeutic food,
PM-RUTF	Peanut milk RUTF
SMS-RUTF	Soya-maize-sorghum RUTF
FSMS-RUTF	Amino acid-enriched milk-free SMS-RUTF
MSMS-RUTF	Amino acid-enriched low-milk SMS-RUTF
DRC	Democratic Republic of Congo, コンゴ民主共和国
CMAM	Community-based management of acute malnutrition
KP	KOKO Plus
MN	Micronutrient
NE	Nutrition education
IAAO 法	Indicator amino acid oxidation technique、指標アミノ酸酸化法
mTOR	Mammalian target of rapamycin

PDCAAS	Protein digestibility-corrected amino acid score, タンパク質消化吸収率補正アミノ酸スコア
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
GSH	Glutathione, グルタチオン
Kyn	Kynurenine, キヌレニン
KTR	Kynurenine Tryptophan ratio, キヌレニントリプトファン比
WAZ	Weight-for-age z score
HAZ	Height-for-age z score
WHZ	Weight-for-height z score
SD	Standard deviation
SE	Standard error

## 【第一章 背景】

### 子供における栄養課題

適切な栄養状態は子供の生命と健全な発育に極めて重要である。子供における栄養不良の形態は Stunting（発育阻害）、Wasting（消耗症）、Overweight（過体重）の3つに分類される。2019年時点で全世界の5歳未満人口6億7,600万人のうち、1億4,400万人（21.3%）が発育阻害、4,700万人（6.9%）が消耗症、3,800万人（5.6%）が過体重と推計されており、非常に深刻かつ社会的影響の大きい問題となっている[1]。子供の適切な成長と社会活動への参加、延いては持続的な社会の形成において、これらの栄養不良を解決することが強く求められている。

### 途上国の栄養課題サイクル

栄養不良の形態は低栄養の問題である発育阻害、消耗症と、過栄養の問題である過体重に大別することが出来る。世界銀行による区分法に基づき一人あたりのGDP（Gross domestic product）値から4グループ（低所得国 1,026ドル以下、中低所得国 1,026～3,995ドル、中高所得国 3,996～12,375ドル、高所得国 12,375ドル以上）に分類した場合、1億4,400万人の発育阻害の子供のうち91%が低所得または中低所得グループの国に居住しており、4,700万人の消耗症の子供のうち92%が低所得または中低所得グループの国に居住していることが報告されている[1]。このように、低栄養の課題は特に開発途上国において深刻である。低栄養に苦しむ子どもたちは、身体的成長が劣るうえに、脳機能の発達遅延も示唆されており、結果として成人してからの収入が少くなるなど様々なハンディキャップを背負って人生を送ることになる[2]。さらに、低栄養状態で成長した親から生まれた子供は同様の低栄養課題を抱えるリスクが高いことが知られており、低栄養状態が世代を超えて引き継がれることで固定化してしまうことが大きな課題と認識されている[2]。

## 国際機関による低栄養改善に向けた目標設定

このような開発途上国の低栄養課題に対して 2015 年「国連持続可能な開発サミット」が開催され「持続可能な開発目標 (Sustainable Development Goals)」として 17 の目標が設定され、貧困をなくす、飢餓をゼロにする、全ての人に健康、福祉を、という目標に代表されるように、低栄養の負の連鎖を解消し、平等で持続的に発展できる世界を目指そうという大きな社会的気運が高まっている[3]。さらに、これらの目標設定と呼応して World health organization (WHO) により Global Nutrition Target が設定され 2025 年までに発育阻害を今より 40% 減らす[4]、消耗症を 5%以下に減らす[5]という具体的な行動目標が示され、開発途上国の低栄養課題解決に向けた取り組みが進められている。

## アミノ酸栄養の重要性

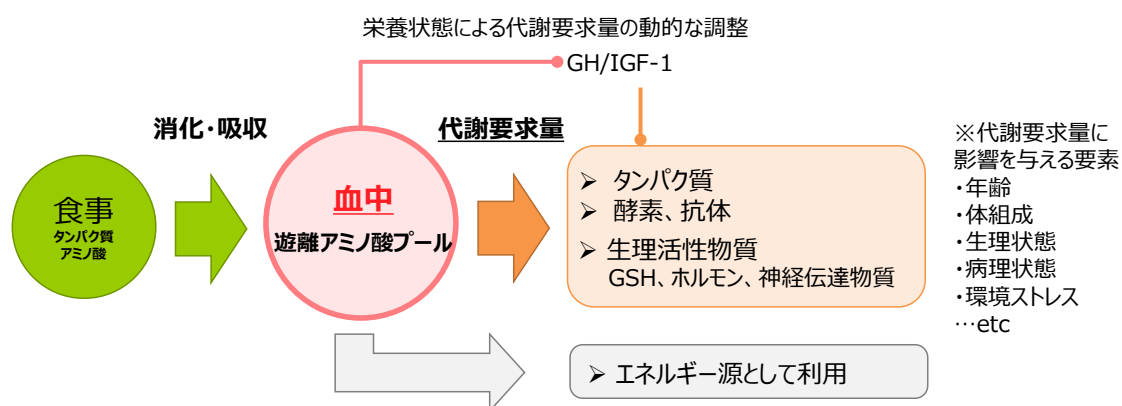
タンパク質はヒトの体において重量換算で約 15~20%を占め、水の次に多い構成成分であり、外部から適切な量のタンパク質・アミノ酸栄養を摂取する事が必要不可欠である。食事中のタンパク質必要量についての一般的なモデルは、生体が必要とする量(代謝要求量)と、利用効率を考慮したうえで代謝要求量を満たすのに必要な摂取量であり「食事必要量 = 代謝要求量/利用効率」で表すことが出来る。代謝要求量のアミノ酸パターンは年齢、体組成、生理的、病理的状态または環境ストレスなど様々な要因の影響を受けることが知られている[6]。乳幼児期には、身長と体重の増加、各種臓器の発達、機能の成熟に伴い代謝要求量が成人の基礎状態と異なる。例えば、細胞外タンパク質、DNA、RNA、細胞膜、クレアチン、ヘムタンパク質など、乳幼児期に蓄積する物質に見合ったアミノ酸パターンが必要である。代謝要求量を満たすのに必要なアミノ酸パターンは指標アミノ酸酸化 (indicator amino acid oxidation, IAAO) 法[7]と呼ばれる  $^{13}\text{C}$  指標アミノ酸を摂取し呼気中の  $^{13}\text{C}$  を測定するトレーサー実験により決定することが出来る。しかし試験プロトコルの倫理的な課題(定常状

態を維持するために  $^{13}\text{C}$  指標アミノ酸の静脈投与、または  $^{13}\text{C}$  指標アミノ酸を含有した試験食を一定間隔での摂取を強制する事) や、乳幼児での呼気回収を厳密に行うことの難しさなどの実験的な制約から乳幼児での実施例はなく、乳幼児期の代謝要求量を満たすのに必要なアミノ酸パターンの詳細は未だに不明のままである。このため、低栄養状態の乳幼児の代謝要求量も不明であり、低栄養状態の子供に対してどのようなアミノ酸パターンに基づく栄養補給を行うことが最適なのか解明されていない。

### アミノ酸モニタリングによる最適な栄養設計の可能性

食事中から摂取したタンパク質・アミノ酸は消化管から吸収され血中に乗り遊離アミノ酸のプールを形成する。この遊離アミノ酸プールから、タンパク質合成が行われる。また、タンパク質合成以外の生理活性物質の合成材料や、エネルギーとしてのアミノ酸の利用も血中遊離アミノ酸プールを介して行われる[6]。このため血中アミノ酸濃度は消化吸收したアミノ酸栄養と、代謝要求量の均衡状態が反映された指標として考えることが可能であり、血中遊離アミノ酸をモニタリングすることで、IAAO 法のような精密な方法を用いずとも様々な要因の影響を受け代謝要求量に変化した結果をある程度の精度で捉えることが可能である(図 1)。

図 1 消化・吸収した栄養と代謝要求量の均衡状態を表す指標としての血中アミノ酸



低栄養状態の子供という健康成人と比較して複雑に代謝要求量に変化している場合でも、血中遊離アミノ酸のモニタリングによって、どのように代謝要求量に変化しているのかを知ることで、適切なタンパク質・アミノ酸栄養補給による介入方法を決定する事が可能である。同様に、介入後の血中遊離アミノ酸のモニタリングによって代謝要求量が満たされたのかを検証することも可能である。

### **アミノ酸モニタリングによる治療食品の設計と検証の実施**

そこで、本研究では代謝要求量の変化を血中アミノ酸値のモニタリングで代替して、低栄養状態の子供に対してどのようなアミノ酸パターンに基づく栄養補給が最適なのかを探索と検証により考察することを目的として、消耗症と発育阻害の2つの低栄養課題に対しアミノ酸強化食品を設計し介入試験を実施した。回復率や身体測定値など医学的に意味のある評価指標と血中アミノ酸濃度を同時に評価することで、血中アミノ酸のモニタリングによって代謝要求量の把握と、それに基づく栄養設計がどの程度妥当であったか考察したので以下に報告する。

## 【第二章 アミノ酸強化 RUTF による消耗症治療介入試験】

### 1. 緒言

#### Severe Acute Malnutrition の定義

重度の消耗症である Severe Acute Malnutrition(SAM) は生命の危険を伴う非常に深刻な栄養状態である。2011 年の調査では 1900 万人以上の子供たちが SAM に苦しんでおり、特に 5 歳未満の子供たちの総死亡数において SAM による死因が 7.3%を占めている[8]。SAM は、著しい体重の低下(WHO の定めた身長に対する体重の標準成長曲線より 3 標準偏差以上乖離している場合)かつ両側性の浮腫が認められる場合、または著しい体重の低下かつ上腕中央部の周囲径 (Mid-Upper Arm Circumference, MUAC) が 115mm 未満 (生後 6~59 か月の乳幼児) の場合と定義されている[9]。上記定義により SAM と診断されると Ready-to-Use Therapeutic Food (RUTF) と呼ばれるエネルギー密度の高いペースト状の完全栄養食により治療が行われる。

#### SAM の病態

SAM は臨床症状からクワシオルコル(kwashiorkor)とマラスムス(marasmus)の 2 つ病態に分けられる。マラスムスはエネルギーとタンパク質の欠乏による重度の消耗を臨床的な特徴とし、クワシオルコルは両側性の浮腫、毛髪等の色素低下、皮膚病変、低アルブミン血症、脂肪肝等の症状を臨床的な特徴とする。クワシオルコルとマラスムス、どちらの病態にもタンパク質栄養の欠乏が関連していることは知られているが[10]、発症メカニズムの違いについては未解明の部分が多い[11]。メカニズムの違いに関し、先行研究からグルタチオン (Glutathione, GSH) の血中濃度がクワシオルコルでより低い[12]ことや、過酸化脂質やアミノ酸の酸化体濃度がクワシオルコルで上昇するといった報告[13, 14]があり、クワシオルコルの発症に関してはフリーラジカル仮説が強く支持されている。また、クワシオルコルはマ

ラasmusと代謝状態が異なっていることや、重度の代謝異常になりやすいことも報告されている[15]。これらの先行研究から、クワシオルコルとマラasmusは異なる発症メカニズムを持っていると考えられているが、途上国でのSAMの治療において2つの病態に合わせたRUTFを開発することは治療の実効性とコストの面から現実的ではなく、どちらの病態に対しても有効なRUTFが求められている。

### タンパク質源のアミノ酸組成を考慮したRUTF開発の必要性

RUTFに関しこれまでに多く栄養組成の改良と、有効性の検証試験が実施されており、SAMからの回復、身長や体重の回復に肯定的な結果が得られている[16,17]。しかし、これらの多くはRUTFの微量栄養素組成に焦点が当てられており、血中ヘモグロビン値等の改善を評価するものがほとんどであった[18]。このため、タンパク質栄養の質を決定するタンパク質源のアミノ酸組成に着目したRUTFの改良や、それらの改良が血中アミノ酸プロファイルに与える影響に着目した研究はほとんど行われてこなかった。

アミノ酸は生体内での代謝において中心的な役割を担っており、体タンパク質の構成や、エネルギー代謝に重要な役割を果たすことが知られている。例えば、必須アミノ酸(Essential Amino Acid, EAA)は食事からの摂取が必須であるため、特に、成長過程の子供では重要になる。血中EAA濃度が増加すると筋肉タンパク質合成も増加し、血中EAA濃度が減少すると筋肉タンパク質合成も減少することが報告されており[19]、成長過程の子供で血中EAA濃度を維持することは非常に重要である。また、ロイシンはmammalian target of rapamycin (mTOR) シグナリング経路を介したタンパク質合成の活性化因子としても重要である[20,21]。さらに、クワシオルコルではGSH濃度が低下しているなど、利用可能な抗酸化能力と活性酸素種の生成の間に不均衡があるという報告がある[22]。GSHは、グルタミン酸、グリシン、システインからなるトリペプチドで、合成の律速はシステイン、およびシステインの前駆体であるメチオニンの利用可能量に依存している[23]のでGSH濃度が低下

している際はこれらの含硫アミノ酸の血中濃度維持が重要になる。このように、アミノ酸は生体内で幅広い役割を果たしており、これらの役割を安定的に発揮するためには栄養供給と代謝要求の均衡である生体内のアミノ酸プール、つまり血中のアミノ酸濃度を一定に維持する事が重要となる。一方、SAMに伴う血中アミノ酸値の変動[15, 24]は、消化吸収により供給されるアミノ酸栄養と、SAMによる代謝要求量の変化の両者の影響によりアミノ酸プールの均衡が変化した結果を反映していると考えられる。このため、RUTFを改良する場合においても、治療の有効性と同時にRUTFによる治療介入が栄養による供給と要求量の均衡をどのように変えたかを血中アミノ酸濃度プロファイルを指標としてモニターすることが、治療の有効性と最適なアミノ酸栄養の関係を考察する上で非常に重要である。

#### 既存の RUTF の課題：タンパク質源の代替

現在世界中で広く使用されている RUTF はピーナッツとミルクを主原料とした RUTF (peanut milk RUTF, PM-RUTF) であり、先行研究から適切な使用条件においては非常に効果的であることが示されている[25]。しかし、開発途上国では高品質の粉乳（乾燥させた牛乳）やピーナッツペーストを現地調達することが難しく、PM-RUTFの原料の大部分を輸入に頼っているため製品コストが高くなっていることが大きな課題で持続的な治療実現の阻害要因となっている。このため、粉乳とピーナッツペーストを現地調達可能な植物性タンパク質原料に代替し、製品コストを抑えることで持続可能なコスト構造とすることが強く求められている。一方で、RUTFの治療有効性の観点からタンパク質源として植物性のタンパク質よりも粉乳が望ましいとする報告も存在する[26, 27]。これらの報告では

- ・植物性タンパク質と、粉乳の“タンパク質消化吸収率”が異なる
- ・乳幼児の代謝要求量を満たすには母乳のアミノ酸組成に比較的近い粉乳のアミノ酸組成が最適である

2点の主張により粉乳が望ましいとしている。食品素材ごとのタンパク質消化吸収率の補正

方法は WHO が提唱した Protein digestibility-corrected amino acid score(PDCAAS)[28]が用いられており、植物性のタンパク質も PDCAAS による補正を行うことで消化吸収率を考慮したアミノ酸組成を計算上では知ることが出来る。しかし、PDCAAS の計算特性上、粉乳等の高品質のタンパク質源を過小評価してしまう点や、回腸消化性が過小または過大に評価される可能性がある点、など複数の問題点が指摘されており[27]、粉乳を適切に植物性タンパク質原料で代替するためには実際の消化吸収率の把握が必要である。食事中から摂取したタンパク質・アミノ酸は消化管から吸収され血中に乗り遊離アミノ酸のプールを形成するため[6]、血中アミノ酸濃度を測定することで、より実態に近い消化吸収されたアミノ酸の影響を把握する事が可能である(図 1)。このため、上記に挙げた「実際の消化吸収率を把握しながら植物性タンパク質による代替の検討を進める必要がある」という課題点に対し新たなアプローチとして、血中アミノ酸濃度の測定を行いながら RUTF の開発を行うこととした。また、そもそも乳幼児の正確な代謝要求量は不明なので、血中アミノ酸濃度を測定し消化吸収した栄養と代謝要求量の均衡を見ながら、乳幼児における治療の有効性について同時に評価し、最適な RUTF のタンパク質・アミノ酸組成を考察するという事は乳幼児の代謝要求量を理解するのに有意義である。

#### 血中アミノ酸濃度測定による植物性タンパク質源 RUTF の開発

そこで、我々は RUTF の治療性能は維持しつつ、動物性のタンパク質源を植物性のタンパク質源で代替することを目標に設定し、血中アミノ酸濃度を中間指標として使用しながら RUTF の栄養設計、及び治療効果の検証を行うという新しい手法で開発を実施した。

まずは、開発途上国で入手可能な原料である大豆、トウモロコシ、ソルガム (soya-maize-sorghum, SMS) をベースにした粉乳、ピーナッツペーストを原料に含まない SMS-RUTF を開発し、コンゴ民主共和国 (Democratic Republic of Congo, DRC) において治療有効性と血中アミノ酸濃度の測定を目的とした介入試験を実施した[29]。DRC での試験の結果、SMS-

RUTF は PM-RUTF と比べ一部の性能で非劣性が示されず、同時に実施した血中アミノ酸濃度測定では、PM-RUTF 治療に比べ SMS-RUTF 治療ではシステイン（実際はシスチンとして測定）などの血中アミノ酸濃度が低下していた[29]。このため、生体内でのアミノ酸の代謝要求量を十分に満たすことが出来ずに、治療の有効性が示されなかった可能性が示唆された。そこで、DRC 試験での結果、及び動物での低栄養期における要求アミノ酸のエビデンス[30]をもとに、タンパク質源のアミノ酸組成を改良し、アミノ酸強化ミルクフリーSMS-RUTF (amino acid-enriched milk-**free** SMS-RUTF, **FSMS**-RUTF) と、9.3% (w/w) のミルクを含むアミノ酸強化 SMS-RUTF (amino acid-enriched low-**milk** SMS-RUTF, **MSMS**-RUTF) を開発し、マラウイ共和国にて介入試験を実施し良好な結果を得ることに成功した[31]。

本章では、マラウイ共和国にて良好な成績を収めた植物性のタンパク質源の FSMS-RUTF 及び MSMS-RUTF が血中アミノ酸プロファイルに与えた影響を分析し、動物性のタンパク質源の PM-RUTF による介入との比較検討を実施したので以下に報告する。

## 2. 方法

### 2.1. 試験デザイン

本試験は3群の非盲検ランダム化並行群間比較試験で、6～23か月齢と24～59か月齢の子供のサブグループを対象に、FSMS-RUTF、MSMS-RUTFとPM-RUTFを用いたSAM治療の有効性を比較した試験で、副次評価項目として血中アミノ酸濃度の測定を行っている。

本試験の主目的はPM-RUTFと同等の治療効果を発揮するが、より費用対効果が高く、開発途上国で容易に入手可能な原料で製造できる植物性タンパク質源のRUTFを開発することである。副次評価項目の血中アミノ酸濃度の測定は、新たに開発した植物性タンパク質源RUTFの治療効果のメカニズムを理解する上で、治療介入によって“研究対象として注目したアミノ酸”の血中濃度を維持できたか評価することを目的としている。このため、FSMS-RUTF、MSMS-RUTFによる介入群はPM-RUTFによる介入群と比較し“研究対象として注目したアミノ酸”の血中濃度が劣っていないという仮説を立て、介入期間の終了時点において、非劣性検定を実施した。“研究対象として注目したアミノ酸”はRUTFのアミノ酸栄養組成を決定する際に維持が重要と仮定したメチオニン、システイン、リジンと、血中濃度とタンパク質合成との関連性が報告されているtotal EAA、ロイシンを用いた。

本試験は、Pan African Clinical Trials Registryに試験番号PACTR201505001101224として登録済である。

## 2.2. 参加者

### 2.2.1. セッティング

本試験は、マラウイの中央地域にある3つの医療圏で、Community-based management of acute malnutrition(CMAM) [32]と呼ばれる治療プログラムにより実施された。3つの医療圏は複数の行政区で分割されており、そのうち21の行政区を本試験の実施地域として選定し、CMAMプログラムのDay-care feeding centerをそれぞれの行政区に設置して治療介入を実施した。

感染症等の合併症のない子供は、自宅からFeeding centerを訪問しRUTF治療を受けた。RUTF治療の介入期間中に何らかの合併症を発症した子供は、近隣の治療センターで適切な治療を受け、治療が完了した時点で元の割り付けられた研究グループに戻り引き続きFeeding centerを受診しRUTF治療を継続した。医師によって入院施設での治療が必要と判断されたにもかかわらず、保護者や介護者が子供を治療センターに入院させずFeeding centerでのRUTF治療を続けることを選択した場合、当該参加者を試験対象者から除外した。なお、合併症の有無は”WHO CMAM and Integrated Management of Childhood Illnesses standard definitions” [33, 34]による基準を用いて決定した。治療センターでの栄養治療はガーナ共和国保健省のガイドラインに従い、必要に応じてF-75およびF-100組成の治療用ミルクも使用している。

本試験の参加者リクルートは2015年9月に開始し、2016年6月に終了した。RUTF治療のフォローアップは2016年8月に終了した。

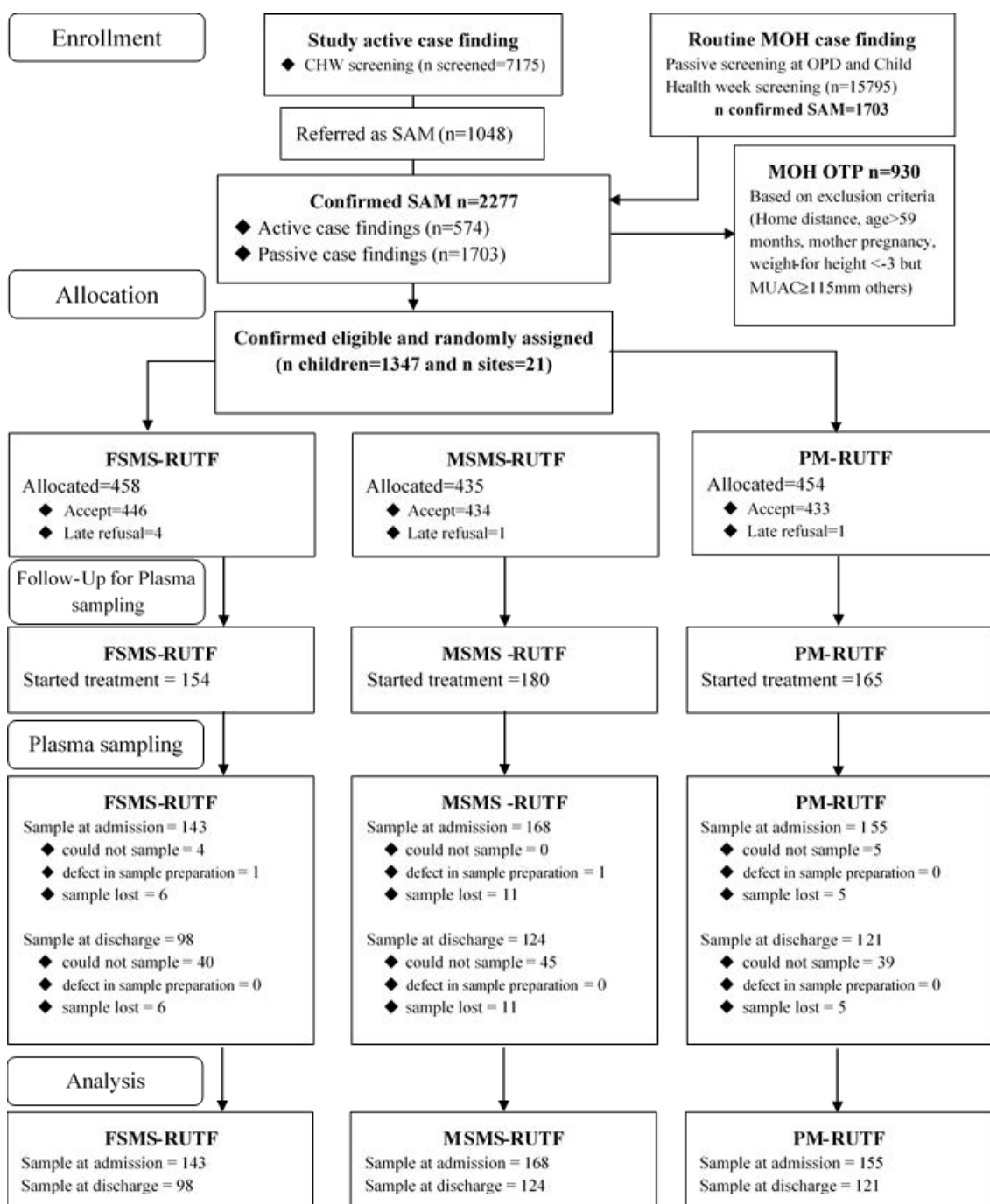
### 2.2.2. リクルート

身長に対する体重の標準成長曲線より3標準偏差以上乖離している場合で、MUAC <115mm または両側性の浮腫の有無によりSAMと判断され[9]、マラウイ保健省が運営するCMAMプログラムに参加することになった6~59カ月のすべての子供に対し2次スク

リーニングによる参加者選定を行った。2次スクリーニングとして専門医による再診を行い、再診でSAMと診断されなかった子供は試験から除外した。さらに、成長に影響を与える先天性または後天性の障害が認められた場合、食物アレルギーまたは不耐性の病歴が認められた場合、または過去3カ月以内にSAMの治療歴が認められた場合は試験から除外した。

介入試験開始時点から48時間以内に採血が可能だった参加者を採血対象者として、試験計画で決定した標本数（n=499）に達するまで組み入れを行った。採血対象者の選抜フローチャートを図2に示す。

図 2 採血対象者の選抜フローチャート



CHW, community health worker; MOH, Ministry of Health; OPD, outpatient department; OTP, outpatient programme; MUAC, mid-upper arm circumference

### 2.2.3. 倫理審査、同意取得

本介入研究の試験計画はマラウイ共和国保健省（approved on 23rd March 2015）、及び味の素株式会社の倫理委員会(Ref no. 2014-021)にて承認を受けた。また、リクルート時に子供の親もしくは介護者に本試験の目的を説明し、参加者である子供の診療情報が研究目的で使用されることについて口頭および書面で同意を取得した。

本試験は介入期間が短いため、中間解析は計画しなかった。このため、試験停止の基準も定義されていない。また、試験期間を通して重篤な副作用は検出されず、研究を中断する深刻な理由は発生しなかった。

## 2.3. 介入

### 2.3.1. RUTF の栄養組成

本試験で用いた RUTF のアミノ酸組成値を表 1、PM-RUTF のアミノ酸組成値との比較を図 3、母乳のアミノ酸組成値との比較を図 4 に示す。今回新たに開発した FSMS-RUTF と MSMS-RUTF は以下の 3 つの観点から SMS-RUTF のアミノ酸組成を改良したものである。

#### 1. PM-RUTF 治療に比べ SMS-RUTF 治療で血中濃度が低下していたアミノ酸の強化

DRC で実施したパイロット試験では PM-RUTF 治療と比較し SMS-RUTF 治療では治療効果が十分ではなかった[29]ことから、実際の消化吸収において SMS-RUTF に不足しているアミノ酸があったと仮定した。パイロット試験の介入終了時点における血中アミノ酸濃度を図 5 に示す。PM-RUTF 治療と比べ SMS-RUTF 治療で血中濃度が低下していた主なアミノ酸は、シスチン(29%低下)、トリプトファン(19%低下)、チロシン(15%低下)であり (図 6)、統計的にはシスチンに有意差が認められた。そこで、システイン (実際の測定としてはシスチン) の供給量を高めるために、システインの前駆体で、必須アミノ酸であるメチオニンを添加することでアミノ酸組成を改良した(表 1、図 3)。

#### 2. 乳幼児の代謝要求量を満たす最適なアミノ酸組成にするためのアミノ酸の強化

乳幼児期の代謝要求量を満たす理想的なアミノ酸組成は IAAO 法等で実験的に決定されてはいないが、経験的に母乳のアミノ酸組成が最も適した組成と考えられており、WHO も母乳組成を推奨している[6]。そこで、理想的なアミノ酸組成との比較という観点から母乳と SMS-RUTF のアミノ酸組成を比較したところ、全ての必須アミノ酸において SMS-RUTF でアミノ酸含有量が低くなっていた(表 1 図 4)。このため、成長指標と血中アミノ酸濃度変化の相関を解析した動物モデルによる研究データから強化するアミノ酸の優先順位付けを行い、成長指標と血中濃度の変化が最も関連した必須アミノ酸であるリジン[30]が乳幼児期において最も要求性の高まるアミノ酸と仮定し、母乳組成と同等になるまで添加し

てアミノ酸組成を改良した(表 1 図 4)。

### 3. コスト的に許容出来る範囲で PM-RUTF の酸組成に近づけるようにアミノ酸の強化

最後にコスト的に許容出来る範囲で PM-RUTF の酸組成に近づける目的で、プロリンとグルタミンを PM-RUTF 組成と同等になるまで添加してアミノ酸組成を改良した(表 1 図 3)。

本試験で用いた RUTF のアミノ酸以外の栄養組成の分析値を表 2 に示す。

表 1 開発した RUTF のタンパク質源のアミノ酸組成

A. アミノ酸組成の分析値と消化吸収率補正值

Amino acid	加水分解アミノ酸分析値 [g] 100gあたり			タンパク質消化吸収率補正 アミノ酸値 [g] 100gあたり		
	FSMS- RUTF	MSMS- RUTF	PM- RUTF	FSMS- RUTF	MSMS- RUTF	PM- RUTF
Met	0.27	0.29	0.27	0.25	0.25	0.25
Lys	1.30	1.22	0.99	1.16	1.11	0.94
Val	0.82	0.80	0.75	0.70	0.70	0.72
Leu	1.37	1.32	1.27	1.17	1.15	1.21
Ile	0.77	0.73	0.64	0.66	0.64	0.60
Phe	0.89	0.79	0.76	0.76	0.69	0.73
Trp	0.21	0.19	0.21	0.18	0.17	0.20
Thr	0.65	0.62	0.57	0.55	0.54	0.54
His	0.47	0.44	0.39	0.40	0.38	0.37
Ala	0.77	0.68	0.55	0.66	0.59	0.52
Arg	1.21	0.97	1.07	1.03	0.85	1.02
Asp+Asn	1.94	1.65	1.48	1.65	1.44	1.40
Glu+Gln	3.62	3.37	3.19	3.16	2.99	3.03
Pro	1.38	1.35	1.14	1.25	1.23	1.08
Tyr	0.53	0.51	0.59	0.45	0.45	0.56
Gly	0.71	0.65	0.56	0.61	0.58	0.53
Ser	0.85	0.79	0.87	0.73	0.69	0.83
Cys2	0.20	0.17	0.19	0.17	0.15	0.18
Total	17.96	16.52	15.50	15.54	14.58	14.73

B. 各 RUTF と母乳のタンパク質・アミノ酸組成の比較

Amino acid	アミノ酸含有量 [g] 100gあたり					アミノ酸含有量の比 [%] (PM-RUTF組成を基準)					アミノ酸含有量の比 [%] (Breast milk組成を基準)				
	FSMS- RUTF	MSMS- RUTF	PM- RUTF	<sup>1</sup> SMS- RUTF	<sup>1</sup> Breast milk	FSMS- RUTF	MSMS- RUTF	PM- RUTF	SMS- RUTF	Breast milk	FSMS- RUTF	MSMS- RUTF	PM- RUTF	SMS- RUTF	Breast milk
Met	0.25	0.25	0.25	0.17	0.37	100%	100%	100%	68%	148%	68%	68%	68%	46%	100%
Lys	1.16	1.11	0.94	0.78	1.18	123%	118%	100%	83%	126%	98%	94%	80%	66%	100%
Val	0.70	0.70	0.72	0.62	0.99	97%	97%	100%	86%	138%	71%	71%	73%	63%	100%
Leu	1.17	1.15	1.21	1.05	1.45	97%	95%	100%	87%	120%	81%	79%	83%	72%	100%
Ile	0.66	0.64	0.60	0.59	0.90	110%	107%	100%	98%	150%	73%	71%	67%	66%	100%
Phe	0.76	0.69	0.73	0.64	0.72	104%	95%	100%	88%	99%	106%	96%	101%	89%	100%
Trp	0.18	0.17	0.20	0.18	0.21	90%	85%	100%	90%	105%	86%	81%	95%	86%	100%
Thr	0.55	0.54	0.54	0.53	0.67	102%	100%	100%	98%	124%	82%	81%	81%	79%	100%
His	0.40	0.38	0.37	0.33	0.40	108%	103%	100%	89%	108%	100%	95%	93%	83%	100%
Ala	0.66	0.59	0.52	0.62	0.51	127%	113%	100%	119%	98%	129%	116%	102%	122%	100%
Arg	1.03	0.85	1.02	0.92	0.54	101%	83%	100%	90%	53%	191%	157%	189%	170%	100%
Asp+Asn	1.65	1.44	1.40	1.50	1.12	118%	103%	100%	107%	80%	147%	129%	125%	134%	100%
Glu+Gln	3.16	2.99	3.03	2.41	3.10	104%	99%	100%	80%	102%	102%	96%	98%	78%	100%
Pro	1.25	1.23	1.08	0.74	1.44	116%	114%	100%	69%	133%	87%	85%	75%	51%	100%
Tyr	0.45	0.45	0.56	0.46	0.72	80%	80%	100%	82%	129%	63%	63%	78%	64%	100%
Gly	0.61	0.58	0.53	0.56	0.31	115%	109%	100%	106%	58%	197%	187%	171%	181%	100%
Ser	0.73	0.69	0.83	0.70	0.81	88%	83%	100%	84%	98%	90%	85%	102%	86%	100%
Cys2	0.17	0.15	0.18	0.20	0.14	94%	83%	100%	111%	78%	121%	107%	129%	143%	100%
Total	15.54	14.58	14.73	13.00	15.58	105%	99%	100%	88%	106%	100%	94%	95%	83%	100%

<sup>1</sup> SMS-RUTF, Breast milk のアミノ酸含有量は計算値

図 3 各 RUTF のアミノ酸含有量の比(%) (PM-RUTF 組成を 100%)

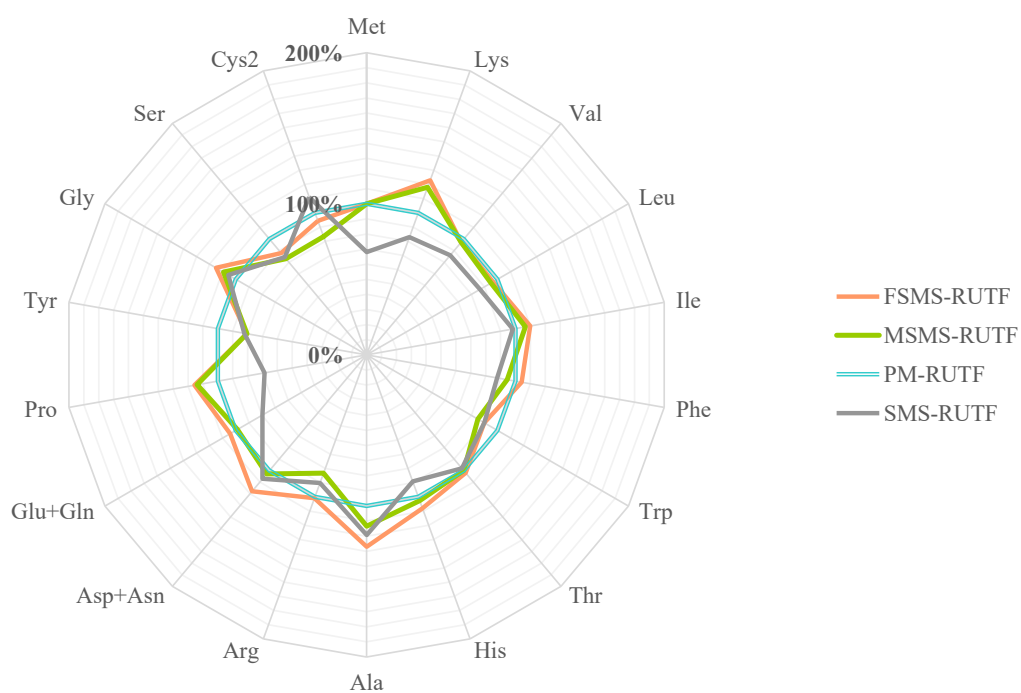


図 4 各 RUTF のアミノ酸含有量の比(%) (母乳組成を 100%)

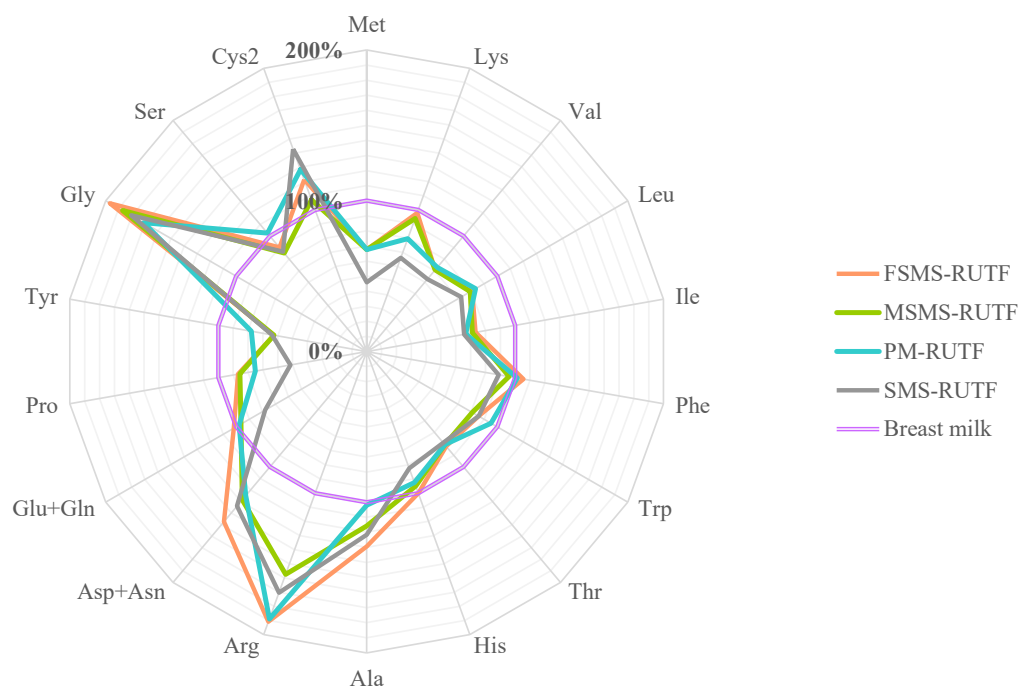
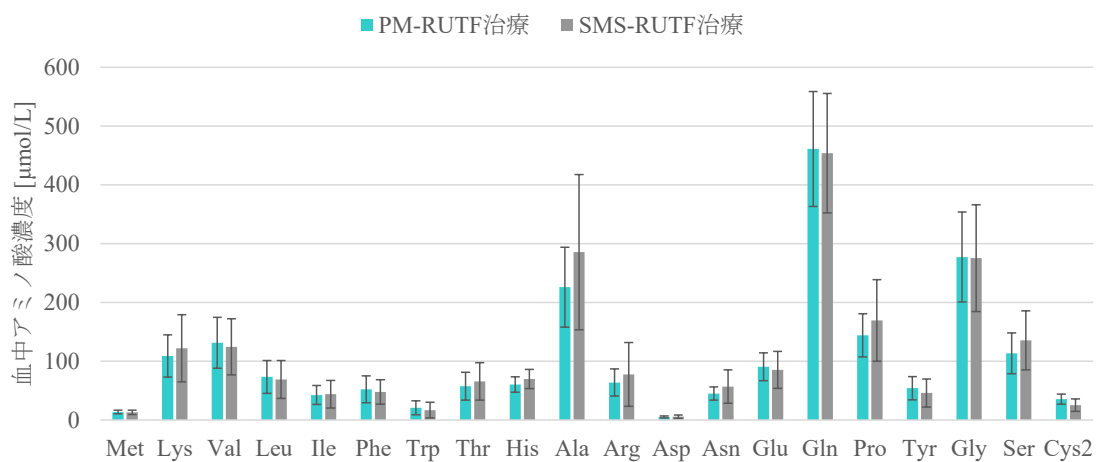


図 5 DRC 試験 介入終了時点の血中アミノ酸濃度



(平均, 標準偏差)

図 6 DRC 試験での介入終了時点の血中アミノ酸濃度比較(%) (PM 治療を 100%)

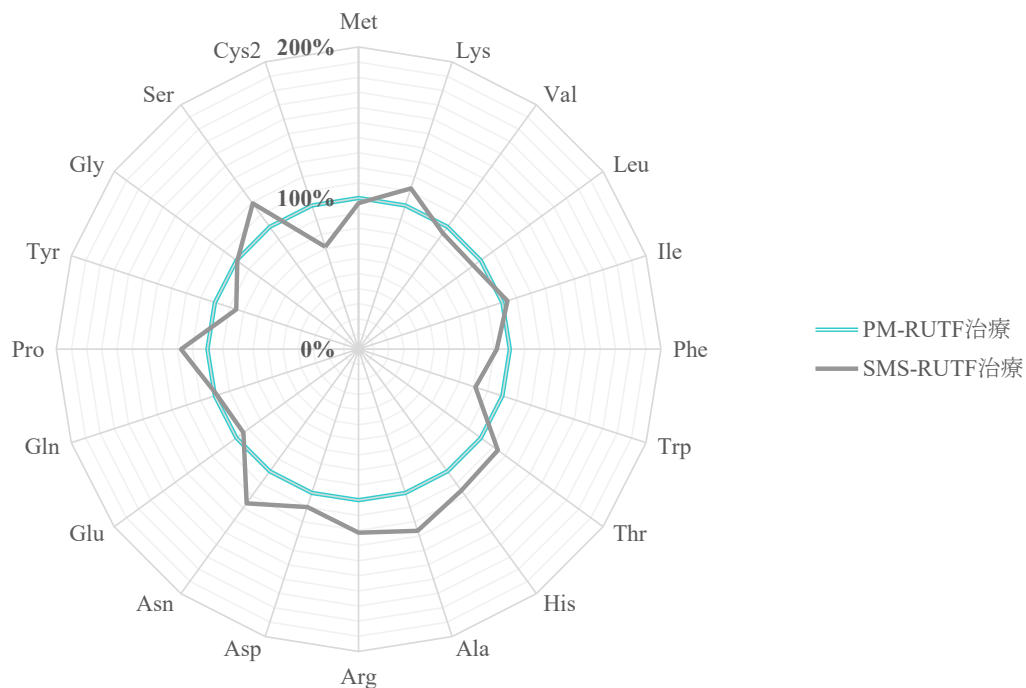


表 2 開発した RUTF の栄養組成の分析値

<sup>1</sup> Component	Actual or analytic value/100 g		
	FSMS-RUTF	MSMS-RUTF	PM-RUTF
Water, g	2.2	2.9	1.1
Energy, kcal	532	544	545
Protein, g	18.4	16.6	15.6
Fat, g	34.2	36	33.8
Ash, g	3.9	3.8	3.9
Carbohydrate, g	41.3	40.7	45
Added sugar, g	22.5	20.5	25
Fiber, g	7.1	4.8	1.9
Sodium, mg	87.3	52.2	131.4
Potassium, mg	991	1070	1125
Calcium, mg	571	399	434
Phosphorus, mg	503	493	351
Magnesium, mg	104	119	97
Iron, mg	35.1	31.6	10.5
Zinc, mg	19.5	19.9	11.1
Copper, mg	1.48	1.5	1.6
Selenium	26	25	27
Manganese, mg	1.71	1.35	—
Iodine, mg	100	100	85
Vitamin A, mg RE	1.25	1.16	1.18
Vitamin D, mg	19.2	17.8	18.7
Vitamin E, mg	39	39	35
Vitamin K, mg	26	12	22
Thiamin, mg	1.28	1.12	0.97
Riboflavin, mg	1.63	1.97	3.2
Vitamin C, mg	323	306	87
Vitamin B-6, mg	0.99	0.93	0.66
Vitamin B-12, mg	2.5	2.6	3.2
Folate, mg	210	200	268
Niacin, mg	7.54	7.94	7.6
Pantothenic acid, mg	5.36	4.73	4.5
Biotin, mg	86	81	80
Choline, mg	90	70	—
n-3 Fatty acids, % TE	0.43	0.18	0.5
n-6 Fatty acids, % TE	5.15	3.91	5.01
SFAs, g	13.5	15.5	11
MUFAs, g	11.1	12.6	18.2
PUFAs, g	5.58	4.09	3.16
trans Fat, g	0.16	0.18	—
Phytic acid, g	0.465	0.333	0.251
Molar ratio			
Phytic acid:iron	1.12	0.89	2.02
Phytic acid:zinc	2.36	1.66	2.24
Ascorbic acid:iron	2.93	3.08	2.64
Weight ratio			
Ascorbic acid:iron	9.2	9.68	8.29
Calcium:phosphorus	1.14	0.81	1.24
Zinc:copper	13.18	13.27	6.94
Zinc:iron	0.56	0.63	1.06

<sup>1</sup>RE, retinol equivalent; TE, total energy; SFs, saturated fatty acids; MUFAs, monounsaturated fatty acids; PUFAs, polyunsaturated fatty acids.

### 2.3.2. RUTF による治療介入

治療は CMAM プログラムに基づいて行われ、参加者の子供は毎日 Feeding center を受診し午前 8 時から午後 4 時まで滞在し RUTF 治療を受けた。治療に用いられる RUTF は FSMS、MSMS、PM からランダムに 1 つが割り付けられ、総摂取エネルギー量が 200 kcal / 体重 1kg / 1 日 となるように調整して提供された。本試験における治療期間は最大 12 週間とした。

## 2.4. アウトカム

### 2.4.1. 回復率

治療介入後に以下の3つの回復基準をすべて満たしている場合“回復した参加者”として治療介入を終了した。

回復基準

- ① MUAC $\geq$ 12.5cm
- ② 14日間連続して浮腫が認められない
- ③ 生死にかかわる重篤な感染症が認められない

本試験の最大介入期間（12週間）を超えて回復基準を満たさなかった参加者は“回復基準を満たさなかった参加者”として回復率は以下の式で求めた。なお、試験期間中に脱落扱いとなった参加者は“回復した参加者”“回復基準を満たさなかった参加者”いずれにも含めなかった。

$$\text{回復率} = \frac{\text{回復した参加者}}{\text{回復した参加者} + \text{回復基準を満たさなかった参加者}}$$

### 2.4.2. 血液標本の採取

採血は試験開始時点と試験終了時点の2回で、全て午前中の時間帯に実施した。十分な訓練を受けた小児領域の Phlebotomist(採血を専門とする医療従事者)が静脈から血液標本の採取を行った。採血管内で抗凝固剤を転倒混和したのちに、速やかにキューブクーラー（フォルテ グロウ メディカル）で4°Cに冷却し、現地のセントラルラボに輸送した。抗凝固剤にはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム2水和物（CAS：6381-92-6）を用いた。

採血から24時間以内にセントラルラボで徐タンパクの操作を行った。内部標準としてS-(2-アミノエチル)-L-システイン塩酸塩（CAS：4099-35-8, Sigma-Aldrich）を希釈した5%（w/w）トリクロロ酢酸を調整した。採取した血液標本を遠心分離（4°C、14分、3000×g）し

上清から血漿を採取した。血漿標本と調整した 5% (w/w) トリクロロ酢酸を 2 倍量混合し、遠心分離 (4°C、20 分、8000×g) により除タンパクを行った。除タンパクした血漿標本は分析のために日本に輸送するまで -80°C のディープフリーザーで保管した。血漿標本の日本への輸送はクーラーボックスにドライアイスを入れ凍結状態を維持しながら行った。輸送中の標本の温度変化のログを取り -80°C 以上に温度が上昇しなかったことを確認した。

### 2.4.3. 血液標本の測定

#### アミノ酸濃度測定

アミノ酸の濃度は自動アミノ酸分析装置 (L-8800; 日立ハイテクノロジーズ) を用いてポストカラムニンヒドリン法により測定した。分析カラムには陽イオン交換樹脂カラム (#2622PF; 4.6 mm I.D x 60 mm, 粒径 3 μm, 日立ハイテクノロジーズ) を使用し、移動相はクエン酸ナトリウム緩衝液とクエン酸リチウム緩衝液 (富士フィルム和光純薬) のグラジエントとした。分離後、反応温度 135°C でニンヒドリン試薬 (富士フィルム和光純薬) と反応させ、可視光波長 570 nm で吸光度検出により測定を行った[35]。

検量線用標準物質としてアミノ酸混合標準液 (富士フィルム和光純薬)、アスパラギン一水和物 (富士フィルム和光純薬)、グルタミン (富士フィルム和光純薬)、トリプトファン (富士フィルム和光純薬) 混合溶液を使用し血漿標本と同様に測定を行った。

総分枝鎖アミノ酸 (total Branched Chain Amino Acids: total BCAA; ロイシン、バリン、イソロイシン) と総必須アミノ酸 (total Essential Amino Acids: total EAA; メチオニン、ロイシン、バリン、イソロイシン、リジン、フェニルアラニン、トリプトファン、スレオニン、ヒスチジン) の濃度は、それぞれ total BCAA、total EAA に分類される個別のアミノ酸濃度を合計することで算出した。断りが無い場合アミノ酸濃度は μmol/L (μM) 単位で表す。Fischer 比は単位血漿中の total BCAA(μmol)とチロシン・フェニルアラニン(μmol)のモル比 (BCAA / チロシン・フェニルアラニン) から計算した。

## キヌレニン濃度測定

徐タンパクした血漿に内部標準として L-Kynurenine-<sup>13</sup>C4-<sup>15</sup>N (TCL Pharmaceutical Standards) を添加し UF-Amino Station(島津製作所)で誘導体化および測定を行った。誘導体化には APDS タグワコー(富士フィルム和光純薬)を使用した。分析カラムには Inertsil ODS-3 (2.1 mm I.D x 100 mm, 粒径 2 μm, GL サイエンス) を使用し、移動相は APDS タグワコー用溶離液(25 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 富士フィルム和光純薬) およびアセトニトリル(富士フィルム和光純薬) のグラジエントとした。イオン化法は Electrospray ionization、検出は正イオン検出で Selected ion monitoring で行った[36]。

検量線用標準物質として L-キヌレニン硫酸塩 (SIGMA)、トリプトファン (富士フィルム和光純薬) 混合溶液の希釈系列を使用し、血漿標本と同様に誘導体化および測定を行った。

キヌレニンとトリプトファンの比 (Kynurenine Tryptophan Ratio, KTR) は単位血漿中のキヌレニン(μmol)とトリプトファン(mmol)のモル比 (キヌレニン / トリプトファン) から計算した。

## 2.5. 症例数

必要症例数は、2015年にDRCで実施した試験[29]の血中アミノ酸濃度データを用い“研究対象として注目したアミノ酸”メチオニン、システイン、リジン、total EAA、ロイシンに関して非劣性の検定を行う場合の必要例数から計算した。

非劣性マージンとする変化率を-25% (2.7.2. 非劣性マージンに詳細を記載) に設定し、メチオニン、システイン、リジン、total EAA、ロイシンの非劣性マージンと標準偏差をそれぞれ計算した。第一種の過誤確率( $\alpha$ )を5%に設定し、検出力( $1 - \beta$ )が80%となるよう以下の式[37]を用いて必要例数を計算した (表 3 必要症例数)。

$$n = 2f(\alpha, \beta) \times \frac{\text{Sigma}^2}{\text{Margin}^2}$$

$$f(\alpha, \beta) = [\Phi_{\alpha}^{-1} + \Phi_{\beta}^{-1}]^2$$

ただし、 $\Phi^{-1}$ は標準正規分布の累積密度関数、 $\alpha$ は非劣性検定のため片側確率

さらに、DRC試験に基づいて、20%の脱落を想定し、必要リクルート数を計算したところ最も多かったのはロイシンで43人/1群であった (表 3 必要リクルート数)。

表 3 必要症例数の計算

研究対象として 注目した血中アミノ酸	②	①	③ = (②×①)		Alpha [%]	Power [%]	④ 必要症例数 <sup>3</sup> [人/群]	⑤ 想定 脱落率 <sup>4</sup> [%]	⑥ = ④/{(100-⑤)/100} 必要リクルート数 <sup>5</sup> [人/群]
	血中アミノ 濃度平均値 <sup>1</sup> [uM]	非劣性マージ ンの変化率 <sup>2</sup> [%]	Margin [uM]	Sigma <sup>1</sup>					
Met	13.7	-25	-3.4	3.3	5	80	12	20	15
Cys2	35.5	-25	-8.9	9.5	5	80	15	20	19
Lys	109.1	-25	-27.3	35.8	5	80	22	20	28
total EAA	561.6	-25	-140.4	198.3	5	80	25	20	32
Leu	73.4	-25	-18.3	30.2	5	80	34	20	43

1 DRC試験 PM-RUTF治療群の治療介入終了時点の血中アミノ酸値から集計

2 先行研究から日内変動の変化率を設定

3 設定したAlpha、Powerで検定を実施するために必要となる1群当たりの症例数

4 DRC試験での脱落率の実績値から決定

5 症例数に脱落率を考慮した1群当たりの必要リクルート数

以上から、本試験全体における必要リクルート数は 43人×3群 (FSMS、MSMS、PM)

×2 サブグループ（年齢別）より最小 258 人以上となるが、この研究は、必要例数 1299 人の有効性評価試験[31]の一部として実施され、介入試験開始時点から 48 時間以内に採血が可能だった参加者を採血対象者として、試験計画で決定した標本数（n=499）に達するまで組み入れを行ったため、上記で計算した非劣性検定に必要な最小例数を十分確保している。

## 2.6. ランダム化

本試験では、21 の行政区それぞれで FSMS : MSMS : PM = 1 : 1 : 1 の比率が維持されるよう単純ランダム化により介入 RUTF の割り付けを行った。

具体的には、割付担当者が介入する RUTF の種類の対応した連番のランダム化リストを作成し、各施設の試験コーディネーターに送付した。各施設の試験コーディネーターは、参加者が研究に参加する基準を満たしていることを確認した後、ランダム化リストを用い封筒法により FSMS-RUTF、MSMS-RUTF、PM-RUTF 治療を受ける子供をランダムに割り当てた。

## 2.7. 統計解析

特に断りがない場合 Intention-to-treat で解析を実施した。Per-protocol set による解析を実施した場合はその旨を明記する。

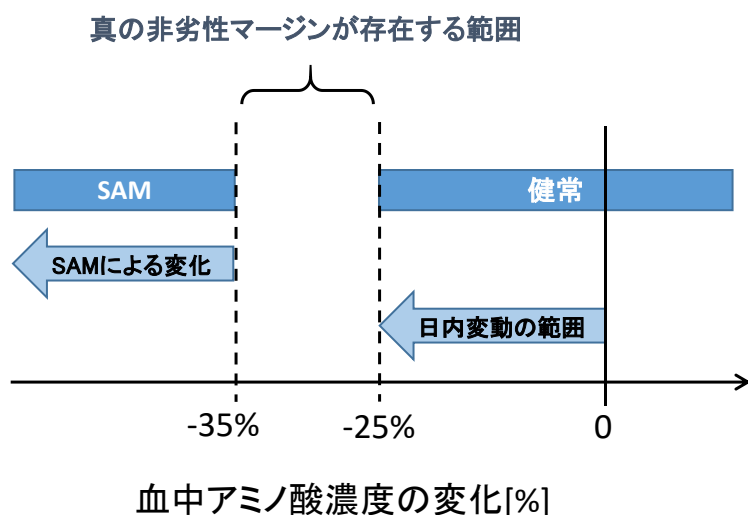
### 2.7.1. サブグループ

集団の不均一性を調整するために、研究計画で事前に決定した 2 つのサブグループ（6～23 ヶ月齢と 24～59 ヶ月齢のサブグループ）に分けて解析を行った。また、追加解析として SAM の病態（クワシオルコルとマラスムス）のサブグループでも解析を実施した。SAM の病態は、浮腫を伴う SAM をクワシオルコル、浮腫を伴わない SAM をマラスムスのサブグループに分類した。

### 2.7.2. 非劣性マージン

非劣性マージン（これ以上の変化は臨床的な意味があると判断する血中アミノ酸値の変化量）は“血中アミノ酸の日内変動値”と“健康な子供と、SAM の子供の血中アミノ酸濃度の差”に関する先行研究を用いて決定した。先行研究から、血中アミノ酸濃度は、1 日で 25%以上変動することが示されている[6, 38, 39]ことから、臨床的に許容できる血中アミノ酸濃度の変化は少なくとも-25%を超えていることを示唆している。また、健康な子供と SAM の子供の血中アミノ酸濃度の差は 35%以上[40]であることから、臨床的に許容できる血中アミノ酸濃度の変化は-35%よりも小さいことを示唆している。これらの事実から真に臨床的な意味がある血中アミノ酸値の変化は-35%～-25%の範囲に存在すると考え（図 7）、上記範囲内で最も保守的となるよう非劣性マージンをコントロール（PM-RUTF 群）の-25%とした。

図 7 非劣性マージンの考え方



### 2.7.3. 背景情報の解析

連続値の場合は平均±SD または標準誤差 (SE)、二値データの場合は比率、95%信頼区間 (CI) で表記した。背景情報の群間比較は、連続値の場合はテューキーの多重比較検定、確率の場合はフィッシャーの直接確率検定を使用した。

### 2.7.4. 介入が血中指標に与えた影響の解析

血中指標の分析では下記 2 つの側面から線形混合モデルを用いた解析を選択した。

#### “1. データ構造”

CMAM プログラムの特性上、参加者がクラスター (21 の行政区) にネストされているマルチレベルのデータ構造となっているため、介入による影響を正しく評価するためには解析上クラスターのバラつき要因を適切に取り扱う必要がある。

#### “2. 欠損データ”

欠損が多いデータを処理する上でモデルベースの解析は効果的であり、全米研究評議会が作成した声明 “The prevention and treatment of missing data in clinical trials.” [41]で推奨さ

れている。

以上の 2 つの観点から、本試験での解析において線形混合モデルによる解析を選択する事が妥当であると判断し、試験開始時点と試験終了時点の血中指標の解析を行った。解析に用いたモデルは、血中指標を目的変数とし、説明変数は介入条件、採血時点およびそれらの相互作用とした。さらに、試験開始時点の値を共変量としてモデルに加え調整を行い、変量効果としてランダム切片にクラスター(CMAM 実施の 21 行政区)を指定した。ランダム傾き (random slope) は指定しなかった。最終的に以下のモデル式を解析に用いた。

$$Y_{ijkl} = \beta_{0k} + \beta_1 * T_{il} + \beta_2 * S_{jl} + \beta_3 * TS_{ijl} + \beta_4 * b_l + R_{ijkl}$$

$$\beta_{0k} = r_{00} + U_{0k}$$

$Y_{ijkl}$  介入条件 i、採血時点 j におけるクラスター k の個人 l の血中指標

$\beta_{1-4}$  各説明変数の係数 (傾き)

$T_{il}$  介入条件 i、個人 l の説明変数(カテゴリー: FSMS、MSMS、PM)

$S_{jl}$  採血時点 j、個人 l の説明変数(カテゴリー: 開始時点、終了時点)

$TS_{ijl}$  介入条件 i、採血時点 j 交互作用の個人 l の説明変数 (カテゴリー: FSMS 開始時点、FSMS 終了時点、MSMS 開始時点、MSMS 終了時点、PM 開始時点、PM 終了時点)

$b_l$  個人 l の試験開始時点の血中指標

$R_{ijkl}$  介入条件 i、採血時点 j のクラスター k、個人 l の個人特有の誤差項

$\beta_{0k}$  クラスター k におけるクラスター特有の切片

$r_{00}$  全クラスターの平均切片

$U_{0k}$  クラスター k における  $r_{00}$  からの逸脱

各血中指標データに対して制限付き最尤法によりモデル式のパラメータ ( $\beta$ ) を決定した。パラメータの計算には R の lme4 (ver.1.1.13) パッケージを使用した[42]。制限付き最尤法により決定した係数は、血中指標の推定値計算、もしくは非劣性検定に使用した。

モデルにより推定した試験終了時点の血中指標を用いて、FSMS-RUTF、MSMS-RUTF 治療群の血中指標が PM-RUTF 治療群の血中指標に劣らないという仮説の検定を行った。非劣性検定時の FSMS-RUTF と PM-RUTF 治療群間の血中指標の差、及び MSMS-RUTF と PM-RUTF 治療群間の血中指標の差は、PM-RUTF 治療群の血中指標を 100%とした際の相対値として表した。血中指標の検定は同一の評価項目に対し検定の多重性を考慮し計算した。計算には R の multcomp (バージョン 1.4.6) パッケージを使用した[43]。

### 2.7.5. 血中指標の相関解析

試験終了時点の参加者の血中アミノ酸濃度の実測値を用いて、アミノ酸間の相関係数（ピアソンの積率相関係数）を計算した。 $\mathbf{x}$ アミノ酸の各参加者の血中濃度を $(x_1, \dots, x_n)$ 、 $\mathbf{y}$ アミノ酸の各参加者の血中濃度を $(y_1, \dots, y_n)$ とした場合の積率相関係数は下記式で計算される。

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}, \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

算出した相関行列から、距離 = (1 - 相関係数) と定義してウォード法により階層クラスタリングを行った。

### 2.7.6. ソフトウェア

解析及び図表作成は R ver. 3.5.3 (R Foundation for Statistics Computing)、GraphPad Prism v8.4.3 (GraphPad Software Inc.)、および Excel 365 (Microsoft) で実施した。

### 3. 結果

#### 3.1. 背景情報

表 4 に 6-23 ヶ月齢、24-59 ヶ月齢の各サブグループの背景情報を示す。6-23 ヶ月齢のサブグループではマラスムス（非浮腫性 SAM）の占める割合が 67.0~71.1%と主な病態であった。一方 24-59 ヶ月齢のサブグループではクワシオルコル（浮腫性 SAM）の占める割合が 57.7~73.2%と主な病態であった。

24-59 ヶ月齢のサブグループで、MSMS-RUTF 群と PM-RUTF 群間で性別比率が、FSMS-RUTF 群と PM-RUTF 群間で身長(Hight)と MUAC に有意な差が認められた。どちらの月齢サブグループにおいても、上記以外の背景情報の群間差は認められなかった。また、離乳していない子供の比率は、どちらの月齢サブグループにおいても群間差は認められなかった。

表 4 背景情報 (6-23 ヶ月齢、24-59 ヶ月齢サブグループ)

	6~23ヶ月齢			24~59ヶ月齢		
	FSMS-RUTF	MSMS-RUTF	PM-RUTF	FSMS-RUTF	MSMS-RUTF	PM-RUTF
被験者数, n	91	112	114	52	56	41
全被験者						
Male sex, n	45 ( 49.5% )	50 ( 44.6% )	51 ( 44.7% )	27 ( 51.9% )	25 ( 44.6% )	30 ( 73.2% )
Age, mo	13.5 ± 4.6	14.2 ± 5.9	13.9 ± 4.9	30.4 ± 5.6	31.9 ± 7.2	33.7 ± 8.3
MUAC, mm	111 ± 9	114 ± 9	113 ± 9	120 ± 14	128 ± 16	128 ± 16
Weight, kg	6.3 ± 1.1	6.6 ± 1.4	6.5 ± 1.2	8.8 ± 2.0	9.8 ± 1.9	9.6 ± 2.4
Height, cm	67.3 ± 6.1	68.3 ± 6.3	67.7 ± 5.9	78.1 ± 6.1	81.9 ± 6.5	81.5 ± 6.6
Bilateral pitting edema	30 ( 33.0% )	42 ( 37.5% )	33 ( 28.9% )	30 ( 57.7% )	44 ( 78.6% )	30 ( 73.2% )
Weight-for-age z score	-3.5 ± 1.3	-3.2 ± 1.2	-3.4 ± 1.2	-3.4 ± 1.5	-2.6 ± 1.5	-3.1 ± 1.6
Height-for-age z score	-3.4 ± 1.7	-3.2 ± 1.4	-3.4 ± 1.6	-3.8 ± 1.4	-2.9 ± 1.7	-3.4 ± 1.5
Weight-for-height z score	-2.3 ± 1.3	-2.0 ± 1.2	-2.1 ± 1.2	-1.9 ± 1.5	-1.4 ± 1.4	-1.9 ± 1.8
非浮腫性SAMの被験者						
	61	70	81	22	12	11
Male sex, n	31 ( 50.8% )	35 ( 50.0% )	36 ( 44.4% )	9 ( 40.9% )	4 ( 33.3% )	9 ( 81.8% )
Age, mo	12.2 ± 4.7	12.8 ± 5.6	13.1 ± 4.5	29.1 ± 5.6	31.9 ± 6.3	32.0 ± 7.4
MUAC, mm	108 ± 7	109 ± 6	110 ± 5	110 ± 4	108 ± 7	110 ± 4
Weight, kg	5.9 ± 0.9	6.0 ± 1.0	6.1 ± 1.0	7.3 ± 0.9	8.0 ± 1.0	7.7 ± 1.2
Height, cm	65.4 ± 5.9	66.0 ± 5.4	66.6 ± 5.6	74.6 ± 4.5	78.7 ± 5.0	77.5 ± 5.3
Weight-for-age z score	-3.8 ± 1.2	-3.8 ± 1.0	-3.6 ± 1.1	-4.5 ± 0.7	-4.0 ± 0.9	-4.5 ± 0.9
Height-for-age z score	-3.6 ± 1.9	-3.6 ± 1.4	-3.5 ± 1.6	-4.6 ± 1.1	-3.8 ± 1.3	-4.3 ± 1.4
Weight-for-height z score	-2.4 ± 1.2	-2.4 ± 1.1	-2.3 ± 1.1	-3.0 ± 1.0	-2.8 ± 0.9	-3.4 ± 0.9
浮腫性SAMの被験者						
	30	42	33	30	44	30
Male sex, n	14 ( 46.7% )	15 ( 35.7% )	15 ( 45.5% )	18 ( 60.0% )	21 ( 47.7% )	21 ( 70.0% )
Age, mo	16.1 ± 3.2	16.4 ± 5.7	15.9 ± 5.1	31.3 ± 5.5	32.0 ± 7.5	34.4 ± 8.7
MUAC, mm	118 ± 10	121 ± 9	120 ± 11	128 ± 13	134 ± 13	134 ± 14
Weight, kg	7.2 ± 1.2	7.7 ± 1.2	7.2 ± 1.3	9.8 ± 1.9	10.2 ± 1.8	10.3 ± 2.4
Height, cm	71.2 ± 4.3	72.1 ± 6.0	70.3 ± 5.8	80.7 ± 5.8	82.7 ± 6.6	83.0 ± 6.5
Weight-for-age z score	-3.1 ± 1.3	-2.4 ± 1.0	-2.9 ± 1.3	-2.6 ± 1.4	-2.2 ± 1.4	-2.6 ± 1.5
Height-for-age z score	-3.0 ± 1.1	-2.6 ± 1.1	-3.1 ± 1.5	-3.3 ± 1.3	-2.7 ± 1.8	-3.1 ± 1.4
Weight-for-height z score	-2.1 ± 1.4	-1.4 ± 1.1	-1.7 ± 1.1	-1.1 ± 1.3	-1.0 ± 1.3	-1.3 ± 1.7

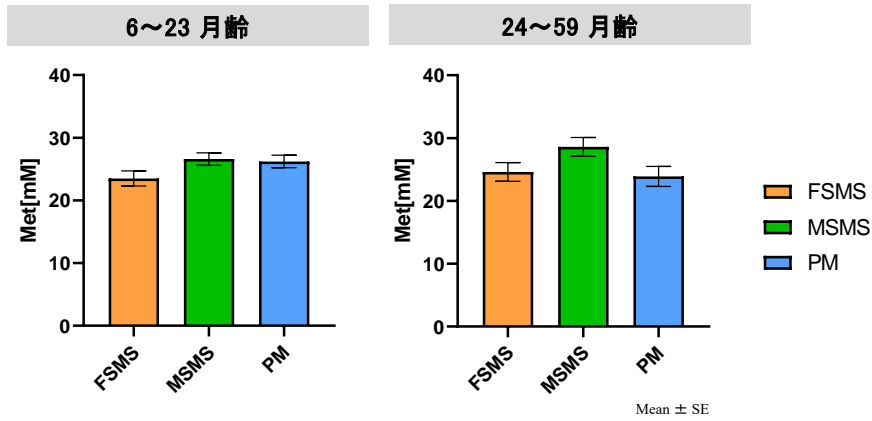
### 3.2. 血中アミノ酸濃度

図 8 に研究対象として注目したメチオニン (図 8 A)、シスチン (図 8 B)、リジン (図 8 C)、total EAA (図 8 D)、ロイシン (図 8 E) の 6-23 ヶ月齢、24-59 ヶ月齢のサブグループの試験終了時点(Discharge)の血中アミノ酸濃度の推定値を示す。また、すべてのアミノ酸について表 5 に 6-23 ヶ月齢のサブグループ、表 7 に 24-59 ヶ月齢のサブグループの試験開始時点(Admission)と試験終了時点(Discharge)の血中アミノ酸濃度の推定値、及びフィッシャー比(F-ratio)を示す。すべてのアミノ酸について試験開始時点での各群 (FSMS、MSMS、および PM) 間に差は認められなかった。このため、適切なランダム化が実施されていたこと、血中アミノ酸濃度について介入群間での比較可能性が担保されていることが確認された。

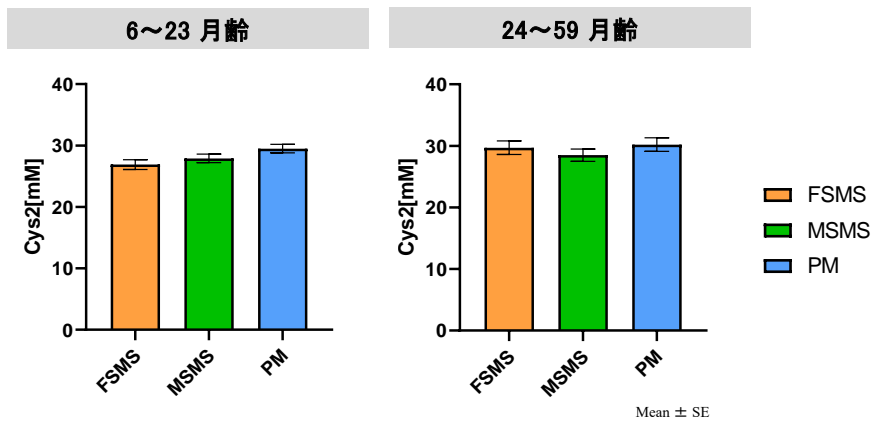
表 6 に 6-23 ヶ月齢のサブグループ、表 8 に 24-59 ヶ月齢のサブグループの試験開始時点から試験終了時点までの血中アミノ酸濃度の変化の推定値、及びフィッシャー比の変化値を示す。6-23 ヶ月齢のサブグループでは研究対象として注目したアミノ酸 (メチオニン、シスチン、リジン、total EAA、ロイシン) のうち血中のメチオニン、及びシスチンの濃度が PM-RUTF 治療介入によって有意に上昇した。24-59 ヶ月齢のサブグループでは研究対象として注目したアミノ酸のうち血中のシスチンの濃度が PM-RUTF 治療介入によって有意に上昇したことが確認された。

図 8 研究対象として注目したアミノ酸の試験終了時点(Discharge)における血中濃度

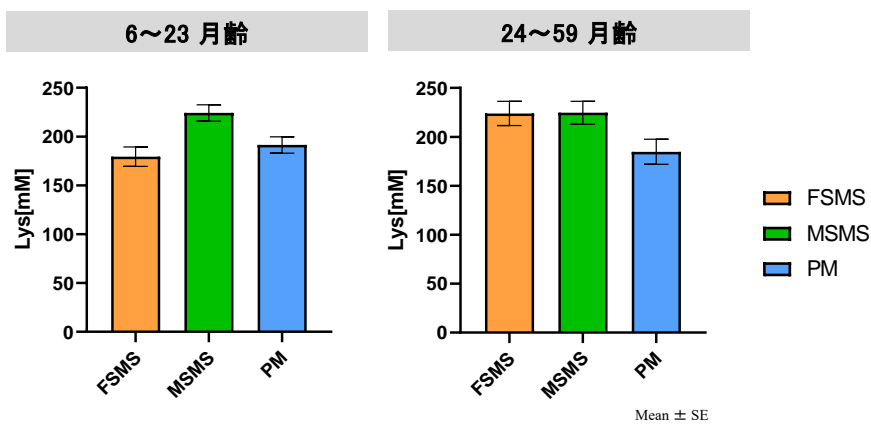
A 試験終了時点における血中メチオニン濃度



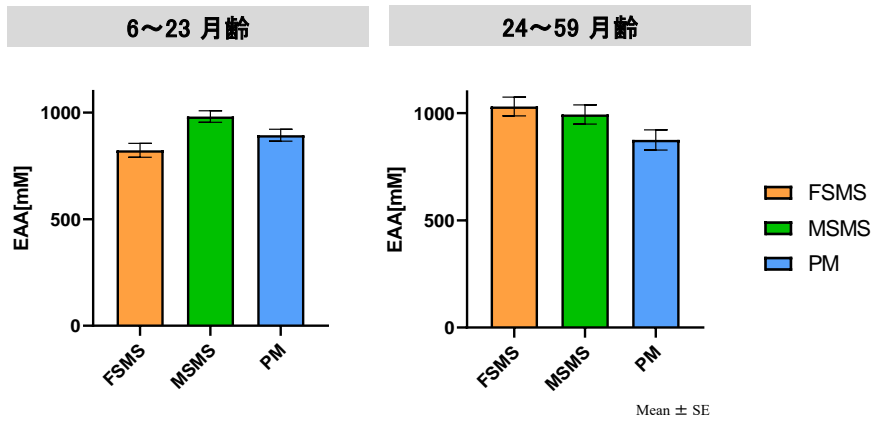
B 試験終了時点における血中シスチン濃度



C 試験終了時点における血中リジン濃度



D 試験終了時点における血中総必須アミノ酸濃度



E 試験終了時点における血中ロイシン濃度

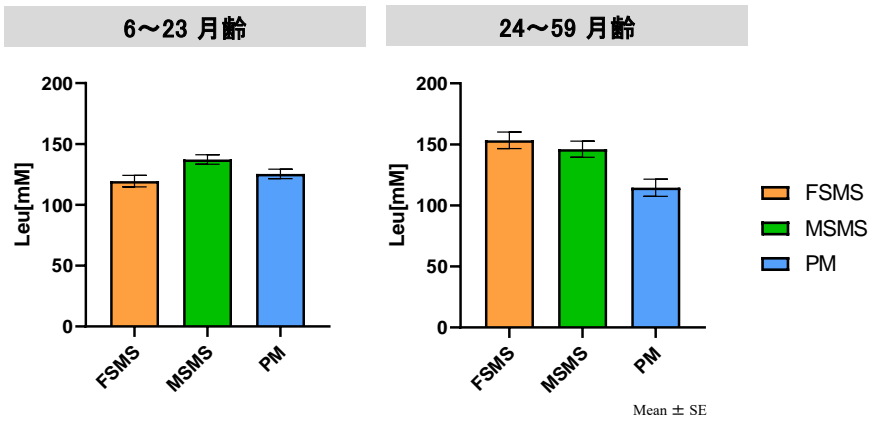


表 5 血中アミノ酸濃度 (6-23 ヶ月齢)

Amino acids		6~23ヶ月齢																	
		FSMS-RUTF				MSMS-RUTF				PM-RUTF									
		Admission		Discharge		Admission		Discharge		Admission		Discharge							
EAA	Met	22.5	±	1.0	23.5	±	1.2	23.3	±	0.9	26.6	±	1.0	22.8	±	0.9	26.2	±	1.0
	Lys	188.2	±	8.0	179.4	±	10.0	186.7	±	7.3	224.2	±	8.4	175.6	±	7.2	191.4	±	8.4
	Val	175.3	±	6.2	179.7	±	7.9	174.5	±	5.6	215.2	±	6.5	183.0	±	5.6	210.6	±	6.6
	Leu	112.4	±	3.7	119.5	±	4.7	112.2	±	3.3	137.3	±	3.9	116.0	±	3.3	125.4	±	3.9
	Ile	74.8	±	2.7	70.8	±	3.4	73.4	±	2.4	84.6	±	2.8	74.0	±	2.4	77.8	±	2.9
	Phe	74.4	±	2.2	66.1	±	2.8	73.0	±	2.0	76.7	±	2.4	74.3	±	2.0	77.4	±	2.4
	Trp	24.4	±	1.1	25.6	±	1.4	23.8	±	1.0	31.9	±	1.2	25.3	±	1.0	29.7	±	1.2
	Thr	87.1	±	3.2	82.9	±	4.0	87.0	±	2.9	91.7	±	3.3	91.6	±	2.8	95.2	±	3.4
	His	70.6	±	1.7	69.0	±	2.1	70.6	±	1.5	73.8	±	1.8	71.8	±	1.5	73.2	±	1.8
NEAA	Ala	419.5	±	17.4	397.4	±	22.0	422.7	±	15.7	456.0	±	18.2	455.7	±	15.6	454.0	±	18.4
	Arg	86.8	±	4.1	88.2	±	5.2	84.3	±	3.7	109.9	±	4.3	82.4	±	3.7	95.9	±	4.3
	Asp	8.6	±	0.3	8.2	±	0.4	8.4	±	0.3	8.9	±	0.3	8.3	±	0.3	8.6	±	0.3
	Asn	79.2	±	2.3	65.8	±	2.9	77.5	±	2.2	74.5	±	2.5	78.4	±	2.1	72.3	±	2.5
	Glu	84.6	±	2.7	87.0	±	3.4	85.1	±	2.5	92.3	±	2.9	84.3	±	2.4	93.6	±	2.9
	Gln	602.5	±	13.8	577.5	±	17.5	598.7	±	12.5	563.7	±	14.5	607.4	±	12.3	563.2	±	14.6
	Pro	345.9	±	11.2	301.3	±	14.1	348.3	±	10.1	324.2	±	11.7	346.6	±	10.0	325.6	±	11.8
	Tyr	82.4	±	3.5	84.9	±	4.4	81.2	±	3.1	102.1	±	3.7	88.3	±	3.1	100.9	±	3.7
	Gly	236.7	±	6.7	210.6	±	8.3	234.8	±	6.2	225.3	±	7.1	234.9	±	6.1	243.7	±	7.1
	Ser	155.8	±	4.0	119.0	±	5.0	150.6	±	3.7	135.7	±	4.2	154.1	±	3.6	132.8	±	4.2
	Cys2	22.6	±	0.6	26.9	±	0.8	22.5	±	0.6	27.9	±	0.7	24.1	±	0.6	29.5	±	0.7
total BCAA		362.6	±	12.4	370.0	±	15.6	360.1	±	11.1	437.1	±	12.9	373.0	±	11.1	413.7	±	13.1
total EAA		841.5	±	26.3	823.1	±	32.9	834.7	±	23.3	981.6	±	27.2	848.4	±	23.2	893.6	±	27.6
total NEAA		2126.3	±	54.6	1966.7	±	68.7	2111.8	±	50.0	2133.2	±	58.0	2162.0	±	49.0	2115.6	±	57.9
F-ratio		2.34	±	0.04	2.49	±	0.05	2.37	±	0.03	2.47	±	0.04	2.35	±	0.03	2.37	±	0.04

mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てμmol/L, 線形混合モデルによる推定値

表 6 血中アミノ酸濃度の変化量 (6-23 ヶ月齢)

Amino acids		6~23ヶ月齢					
		FSMS-RUTF		MSMS-RUTF		PM-RUTF	
		Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>
EAA	Met	1.1 ± 1.6	1.00	3.3 ± 1.3	0.038 *	3.4 ± 1.3	0.034 *
	Lys	-8.8 ± 12.5	1.00	37.5 ± 10.7	0.001 **	15.8 ± 10.7	0.43
	Val	4.4 ± 10.1	1.00	40.7 ± 8.6	<0.001 ***	27.5 ± 8.6	0.004 **
	Leu	7.0 ± 6.0	0.71	25.0 ± 5.1	<0.001 ***	9.4 ± 5.1	0.20
	Ile	-4.0 ± 4.4	1.00	11.3 ± 3.7	0.008 **	3.8 ± 3.7	0.93
	Phe	-8.3 ± 3.6	0.06	3.8 ± 3.0	0.65	3.2 ± 3.0	0.88
	Trp	1.3 ± 1.8	1.00	8.2 ± 1.6	<0.001 ***	4.4 ± 1.6	0.016 *
	Thr	-4.2 ± 5.1	1.00	4.7 ± 4.4	0.85	3.7 ± 4.4	1.00
	His	-1.6 ± 2.7	1.00	3.2 ± 2.3	0.50	1.4 ± 2.3	1.00
NEAA	Ala	-22.1 ± 28.0	1.00	33.3 ± 24.0	0.50	-1.7 ± 24.0	1.00
	Arg	1.4 ± 6.5	1.00	25.6 ± 5.6	<0.001 ***	13.5 ± 5.6	0.048 *
	Asp	-0.4 ± 0.4	1.00	0.5 ± 0.4	0.60	0.2 ± 0.4	1.00
	Asn	-13.4 ± 3.6	<0.001 ***	-3.0 ± 3.1	0.99	-6.1 ± 3.1	0.14
	Glu	2.4 ± 4.2	1.00	7.2 ± 3.6	0.14	9.3 ± 3.6	0.031 *
	Gln	-24.9 ± 22.3	0.79	-35.0 ± 19.1	0.20	-44.2 ± 19.1	0.06
	Pro	-44.6 ± 18.0	0.040 *	-24.1 ± 15.4	0.35	-20.9 ± 15.4	0.52
	Tyr	2.5 ± 5.6	1.00	20.8 ± 4.8	<0.001 ***	12.6 ± 4.8	0.026 *
	Gly	-26.0 ± 10.1	0.030 *	-9.6 ± 8.6	0.80	8.8 ± 8.6	0.93
	Ser	-36.7 ± 6.2	<0.001 ***	-15.0 ± 5.3	0.015 *	-21.3 ± 5.3	<0.001 ***
	Cys2	4.3 ± 1.0	<0.001 ***	5.3 ± 0.9	<0.001 ***	5.5 ± 0.9	<0.001 ***
total BCAA	7.4 ± 19.9	1.00	77.0 ± 17.1	<0.001 ***	40.7 ± 17.1	0.05	
total EAA	-18.4 ± 42.1	1.00	147.0 ± 35.8	<0.001 ***	45.2 ± 36.0	0.63	
total NEAA	-159.6 ± 86.6	0.20	21.4 ± 75.1	1.00	-46.3 ± 74.5	1.00	
F-ratio	0.14 ± 0.06	0.05	0.11 ± 0.05	0.12	0.02 ± 0.05	1.00	

mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てμmol/L, 線形混合モデルによる推定値

1. H<sub>0</sub>: 変化量=0 に対する仮説検定のp値(同一評価項目での検定の繰り返しについてボンフェローニ法で調整)

表 7 血中アミノ酸濃度 (24-59 ヶ月齢)

Amino acids		24~59ヶ月齢																	
		FSMS-RUTF			MSMS-RUTF			PM-RUTF											
		Admission	Discharge		Admission	Discharge		Admission	Discharge										
EAA	Met	22.9	±	1.3	24.6	±	1.5	21.6	±	1.2	28.6	±	1.5	22.2	±	1.5	23.9	±	1.6
	Lys	187.9	±	10.4	223.9	±	12.4	175.7	±	9.9	224.6	±	11.8	172.3	±	11.7	184.8	±	12.8
	Val	168.5	±	9.4	230.7	±	11.2	158.0	±	9.1	224.6	±	10.8	167.5	±	10.5	185.3	±	11.6
	Leu	109.2	±	5.7	153.3	±	6.8	104.2	±	5.5	146.0	±	6.6	108.5	±	6.4	114.5	±	7.0
	Ile	75.9	±	4.2	90.9	±	5.0	68.9	±	4.0	88.2	±	4.7	71.3	±	4.6	69.8	±	5.1
	Phe	80.1	±	3.6	82.5	±	4.3	74.7	±	3.5	89.2	±	4.1	74.9	±	4.1	76.6	±	4.5
	Trp	17.9	±	1.6	27.4	±	1.9	15.8	±	1.6	28.9	±	1.9	15.9	±	1.8	26.9	±	2.1
	Thr	84.1	±	4.3	94.5	±	5.2	77.6	±	4.2	88.4	±	5.0	84.5	±	4.9	85.2	±	5.4
	His	75.8	±	2.4	80.6	±	2.9	74.5	±	2.4	76.2	±	2.8	78.2	±	2.8	65.9	±	3.0
NEAA	Ala	447.7	±	25.9	492.2	±	31.2	420.7	±	25.3	497.9	±	29.8	513.9	±	29.9	371.2	±	32.7
	Arg	91.2	±	5.7	117.4	±	6.7	81.2	±	5.4	117.9	±	6.4	84.8	±	6.3	98.2	±	6.9
	Asp	7.5	±	0.3	8.3	±	0.4	6.8	±	0.3	7.4	±	0.4	7.0	±	0.4	6.9	±	0.4
	Asn	91.3	±	3.5	84.7	±	4.2	84.0	±	3.4	86.0	±	4.0	91.0	±	3.9	68.8	±	4.3
	Glu	71.7	±	3.2	88.0	±	3.9	65.8	±	3.1	87.3	±	3.7	69.6	±	3.6	79.2	±	4.0
	Gln	526.9	±	17.5	537.1	±	20.9	498.7	±	16.8	519.9	±	19.8	510.2	±	19.6	510.3	±	21.5
	Pro	392.3	±	19.9	314.9	±	23.9	369.8	±	19.2	396.0	±	22.7	383.7	±	22.3	303.9	±	24.5
	Tyr	74.4	±	4.5	100.3	±	5.4	68.5	±	4.3	101.9	±	5.1	72.4	±	5.0	90.3	±	5.5
	Gly	299.3	±	12.3	275.6	±	14.7	277.8	±	11.9	279.2	±	14.0	300.3	±	13.8	258.2	±	15.1
	Ser	156.5	±	5.6	141.4	±	6.7	145.8	±	5.4	149.6	±	6.4	160.0	±	6.3	123.7	±	6.9
	Cys2	20.5	±	0.9	29.7	±	1.1	19.7	±	0.9	28.5	±	1.0	20.7	±	1.0	30.2	±	1.1
total BCAA		353.4	±	18.7	474.9	±	22.4	331.2	±	18.1	459.1	±	21.5	347.1	±	21.0	369.4	±	23.0
total EAA		864.6	±	37.4	1030.4	±	43.6	812.5	±	36.5	993.7	±	44.6	825.2	±	41.2	874.8	±	47.2
total NEAA		2184.8	±	83.5	2193.7	±	100.1	2037.8	±	81.2	2271.0	±	95.7	2206.2	±	94.2	1934.3	±	103.3
F-ratio		2.34	±	0.06	2.66	±	0.08	2.33	±	0.06	2.37	±	0.07	2.41	±	0.07	2.17	±	0.08

mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てμmol/L, 線形混合モデルによる推定値

表 8 血中アミノ酸濃度の変化量 (24-59 ヶ月齢)

		24～59ヶ月齢					
		FSMS-RUTF		MSMS-RUTF		PM-RUTF	
Amino acids		Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>
EAA	Met	1.8 ± 2.0	1.00	7.0 ± 1.9	<0.001 ***	1.7 ± 2.2	1.00
	Lys	36.0 ± 16.1	0.08 .	48.9 ± 15.4	0.004 **	12.5 ± 17.2	1.00
	Val	62.2 ± 14.6	<0.001 ***	66.6 ± 14.0	<0.001 ***	17.8 ± 15.6	0.76
	Leu	44.1 ± 8.9	<0.001 ***	41.9 ± 8.5	<0.001 ***	6.0 ± 9.5	1.00
	Ile	15.1 ± 6.4	0.06 .	19.3 ± 6.1	0.005 **	-1.5 ± 6.9	1.00
	Phe	2.4 ± 5.6	1.00	14.5 ± 5.4	0.021 *	1.8 ± 6.0	1.00
	Trp	9.5 ± 2.4	<0.001 ***	13.1 ± 2.4	<0.001 ***	11.0 ± 2.7	<0.001 ***
	Thr	10.4 ± 6.8	0.37	10.8 ± 6.4	0.28	0.7 ± 7.2	1.00
	His	4.8 ± 3.8	0.62	1.7 ± 3.6	1.00	-12.3 ± 4.1	0.008 **
NEAA	Ala	44.5 ± 40.5	0.82	77.2 ± 38.7	0.14	-142.7 ± 43.4	0.003 **
	Arg	26.3 ± 8.7	0.008 **	36.7 ± 8.3	<0.001 ***	13.5 ± 9.3	0.44
	Asp	0.9 ± 0.5	0.26	0.6 ± 0.5	0.62	-0.1 ± 0.5	1.00
	Asn	-6.6 ± 5.4	0.67	1.9 ± 5.2	1.00	-22.2 ± 5.8	<0.001 ***
	Glu	16.3 ± 5.0	<0.001 **	21.6 ± 4.8	<0.001 ***	9.7 ± 5.3	0.21
	Gln	10.2 ± 27.1	1.00	21.2 ± 25.9	1.00	0.1 ± 29.0	1.00
	Pro	-77.4 ± 31.0	0.038 *	26.1 ± 29.6	1.00	-79.7 ± 33.2	0.049 *
	Tyr	25.9 ± 7.0	<0.001 ***	33.5 ± 6.6	<0.001 ***	17.9 ± 7.4	0.049 *
	Gly	-23.7 ± 18.9	0.63	1.4 ± 18.1	1.00	-42.1 ± 20.2	0.11
	Ser	-15.1 ± 8.7	0.25	3.9 ± 8.3	1.00	-36.3 ± 9.3	<0.001 ***
	Cys2	9.1 ± 1.4	<0.001 ***	8.8 ± 1.3	<0.001 ***	9.6 ± 1.5	<0.001 ***
total BCAA	121.5 ± 29.1	<0.001 ***	127.9 ± 27.8	<0.001 ***	22.3 ± 31.1	1.00	
total EAA	165.8 ± 57.3	0.012 *	181.2 ± 57.2	0.005 **	49.6 ± 62.6	1.00	
total NEAA	8.9 ± 130.1	1.00	233.1 ± 124.2	0.18	-272.0 ± 139.2	0.15	
F-ratio	0.32 ± 0.10	0.004 **	0.03 ± 0.09	1.00	-0.24 ± 0.11	0.07 .	

mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てμmol/L, 線形混合モデルによる推定値

1. H<sub>0</sub>: 変化量=0 に対する仮説検定のp値(同一評価項目での検定の繰り返しについてボンフェローニ法で調整)

### 3.3. 研究対象として注目したアミノ酸の非劣性検定

研究対象として注目したアミノ酸であるメチオニン、システイン、リジン、total EAA、ロイシンの血中濃度について、6-23 ヶ月齢、24-59 ヶ月齢それぞれのサブグループで PM-RUTF 治療群に対する非劣性検定を実施した。なお、全ての群間差は試験終了時点の PM-RUTF 群の平均値を 100%とした場合の相対値として示す。

試験終了時点の PM 群と FSMS 群の血中メチオニン濃度差 (95%CI) は 6-23 ヶ月齢で -10.1%(-23.6, 3.3)、24-59 ヶ月齢で 3.1%(-17.3, 23.6)であり、いずれのサブグループでも 95%信頼区間の下限が非劣性マージンを下回らないことから、FSMS 群の血中メチオニン濃度は PM 群に対し劣っていないことが示された(図 9 A)。

試験終了時点の PM 群と FSMS 群の血中シスチン濃度差 (95%CI) は 6-23 ヶ月齢で -9.0%(-16.9, -1.1)、24-59 ヶ月齢で -1.8%(-12.8, 9.2)であり、いずれのサブグループでも 95%信頼区間の下限が非劣性マージンを下回らないことから、FSMS 群の血中シスチン濃度は PM 群に対し劣っていないことが示された(図 9 B)。

試験終了時点の PM 群と FSMS 群の血中リジン濃度差 (95%CI) は 6-23 ヶ月齢で -6.3%(-21.2, 8.6)、24-59 ヶ月齢で 21.2%(-0.2, 42.5)であり、いずれのサブグループでも 95%信頼区間の下限が非劣性マージンを下回らないことから、FSMS 群の血中リジン濃度は PM 群に対し劣っていないことが示された(図 9 C)。

試験終了時点の PM 群と FSMS 群の血中 total EAA 濃度差 (95%CI) は 6-23 ヶ月齢で -7.9%(-18.6, 2.8)、24-59 ヶ月齢で 17.8%(1.6, 34.1)であり、いずれのサブグループでも 95%信頼区間の下限が非劣性マージンを下回らないことから、FSMS 群の血中 total EAA 濃度は PM 群に対し劣っていないことが示された(図 9 D)。

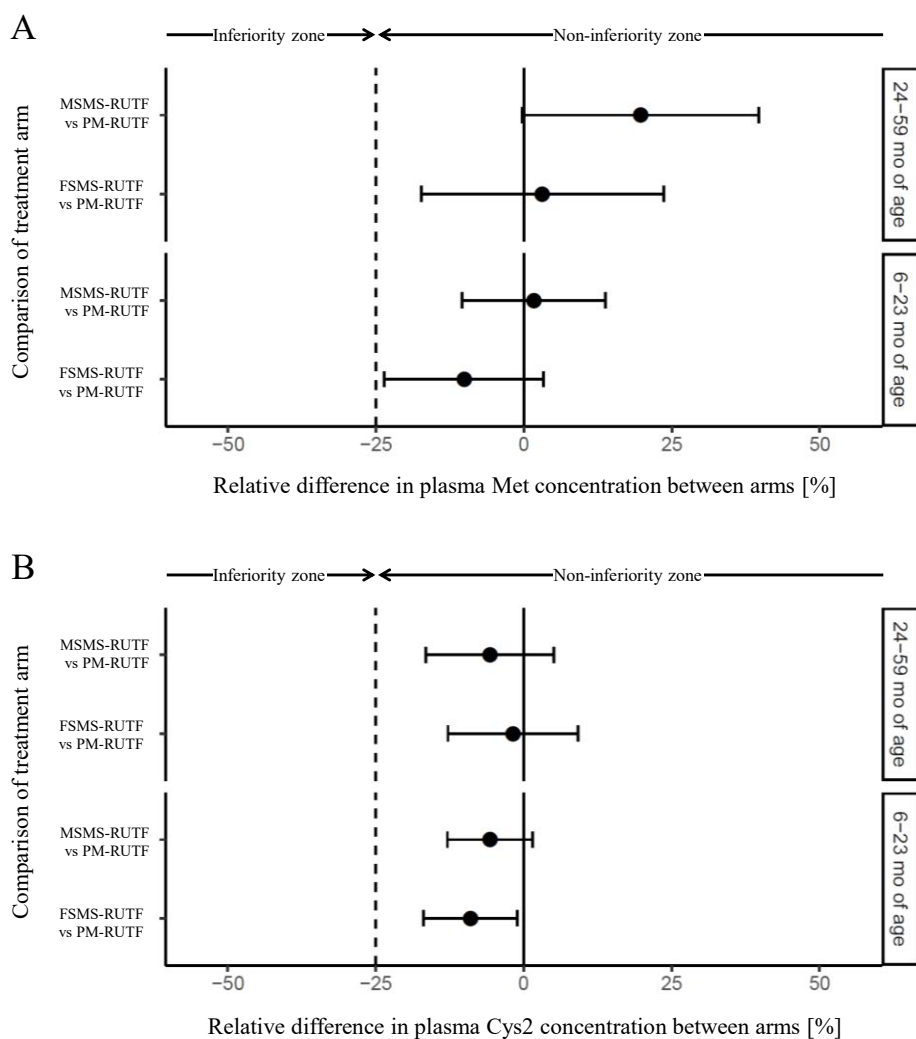
試験終了時点の PM 群と FSMS 群の血中ロイシン濃度差 (95%CI) は 6-23 ヶ月齢で -4.7%(-15.5, 6.0)、24-59 ヶ月齢で 33.9%(14.9, 52.9)であり、いずれのサブグループでも 95%信頼区間の下限が非劣性マージンを下回らないことから、FSMS 群の血中ロイシン濃度は PM

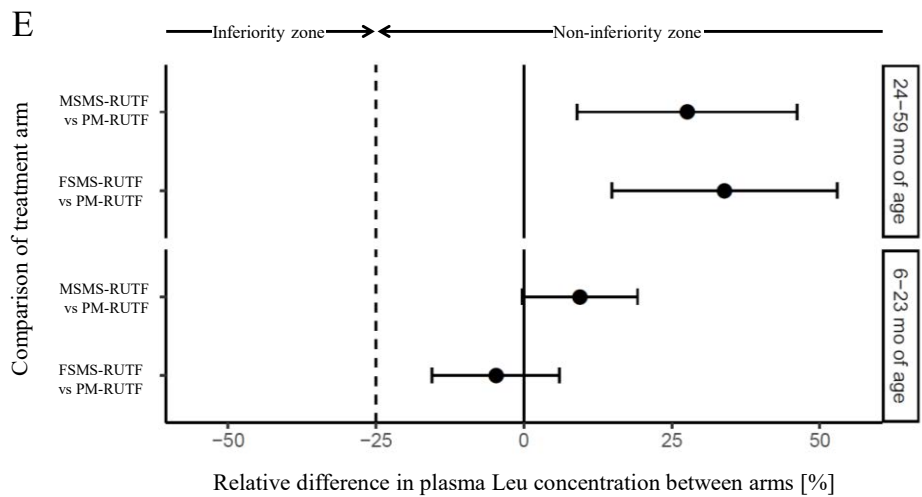
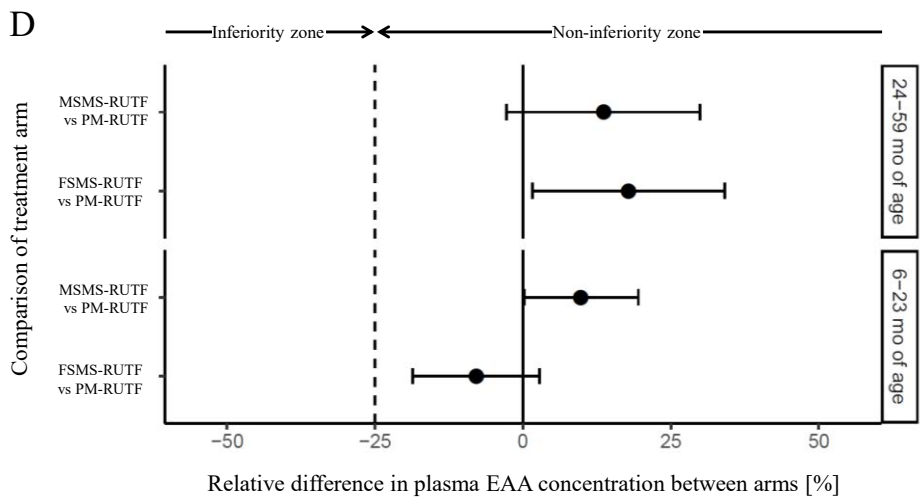
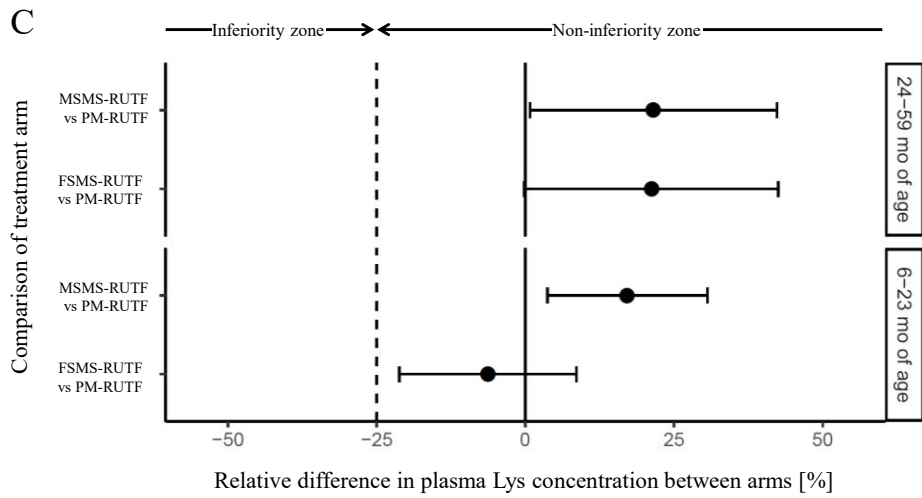
群に対し劣っていないことが示された(図 9 E)。

MSMS 群のメチオニン、シスチン、リジン、total EAA、ロイシンそれぞれの血中濃度についても試験終了時点で PM 群に対し劣っていないことが確認された(図 9 A-E)。

さらに、total EAA の内訳として研究対象として注目したアミノ酸には含まれていない個別の EAA (バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、スレオニン、ヒスチジン)に関するの非劣性検定の結果も表 9 に示す。個別の EAA では、6-23 ヶ月齢でバリン、フェニルアラニン、トリプトファン、スレオニンの試験終了時点での PM 群と FSMS 群の血中濃度差の 95%信頼区間の下限が非劣性マージンを下回った。

図 9 研究対象として注目したアミノ酸の非劣性検定





FSMS - PMはFSMS群からPM群の血中アミノ酸濃度を引いた値を、MSMS - PMはMSMS群からPM群の血中アミノ酸濃度を引いた値を示す。各値はPM-RUTF治療群の試験終了時点における血中アミノ酸濃度を100%とした場合の相対値を示す。黒丸は群間差の点推定を、バーは95%CIを、点線は非劣性マージン(-25%)を示す。

表 9 血中アミノ酸濃度の非劣性検定

Amino acids			6～23ヶ月齢		24～59ヶ月齢	
			Difference <sup>1</sup> [%]	(95% CI) <sup>2</sup>	Difference <sup>1</sup> [%]	(95% CI) <sup>2</sup>
EAA	Met	FSMS - PM	-10.1	( -23.6 , 3.3 )	3.1	( -17.3 , 23.6 )
		MSMS - PM	1.7	( -10.5 , 13.8 )	19.7	( -0.3 , 39.7 )
	Lys	FSMS - PM	-6.3	( -21.2 , 8.6 )	21.2	( -0.2 , 42.5 )
		MSMS - PM	17.1	( 3.7 , 30.6 )	21.5	( 0.8 , 42.3 )
	Val	FSMS - PM	-14.7	( -25.5 , -3.8 )	24.5	( 5.3 , 43.7 )
		MSMS - PM	2.2	( -7.6 , 12.0 )	21.3	( 2.3 , 40.2 )
	Leu	FSMS - PM	-4.7	( -15.5 , 6.0 )	33.9	( 14.9 , 52.9 )
		MSMS - PM	9.5	( -0.3 , 19.2 )	27.6	( 9.0 , 46.2 )
	Ile	FSMS - PM	-9.0	( -21.7 , 3.7 )	30.2	( 7.7 , 52.7 )
		MSMS - PM	8.8	( -2.7 , 20.3 )	26.4	( 4.4 , 48.3 )
	Phe	FSMS - PM	-14.7	( -25.1 , -4.3 )	7.7	( -10.2 , 25.6 )
		MSMS - PM	-0.9	( -10.3 , 8.4 )	16.4	( -1.0 , 33.9 )
	Trp	FSMS - PM	-13.6	( -27.6 , 0.4 )	1.9	( -20.7 , 24.4 )
		MSMS - PM	7.5	( -5.3 , 20.2 )	7.6	( -15.1 , 30.3 )
	Thr	FSMS - PM	-12.9	( -25.1 , -0.8 )	11.0	( -8.3 , 30.4 )
		MSMS - PM	-3.7	( -14.7 , 7.3 )	3.8	( -15.2 , 22.8 )
	His	FSMS - PM	-5.7	( -14.1 , 2.7 )	22.3	( 8.2 , 36.4 )
		MSMS - PM	0.9	( -6.7 , 8.5 )	15.6	( 1.8 , 29.6 )
total BCAA		FSMS - PM	-10.6	( -21.5 , 0.3 )	28.5	( 9.4 , 47.6 )
		MSMS - PM	5.6	( -4.2 , 15.5 )	24.3	( 5.4 , 43.0 )
total EAA		FSMS - PM	-7.9	( -18.6 , 2.8 )	17.8	( 1.6 , 34.1 )
		MSMS - PM	9.8	( 0.2 , 19.5 )	13.6	( -2.8 , 29.9 )
NEAA	Cys2	FSMS - PM	-9.0	( -16.9 , -1.1 )	-1.8	( -12.8 , 9.2 )
		MSMS - PM	-5.7	( -12.9 , 1.5 )	-5.7	( -16.5 , 5.1 )

1 FSMS - PMはFSMS群からPM群の血中アミノ酸濃度を引いた値を、MSMS - PMはMSMS群からPM群の血中アミノ酸濃度を引いた値を示す。各値はPM-RUTF治療群の試験終了時点における血中アミノ酸濃度を100%とした場合の相対値で示す。

2 血中アミノ酸濃度の非劣性検定におけるマージンを25%と設定しているためCIの下限が-25%を上回った場合は非劣性が示されたとみなす。

### 3.4. 血中キヌレニン濃度

図 10 に 6-23 ヶ月齢、24-59 ヶ月齢のサブグループのキヌレニン/トリプトファン比の推定値を図示する。また表 10 に 6-23 ヶ月齢のサブグループ、表 11 に 24-59 ヶ月齢のサブグループの試験開始時点(Admission)と試験終了時点(Discharge)の血中キヌレニン濃度の推定値、試験開始時点から試験終了時点までの血中キヌレニン濃度の変化量の推定値、キヌレニン/トリプトファン比の結果を示す。

6-23 ヶ月齢、24-59 ヶ月齢いずれのサブグループにおいても治療介入によってキヌレニン/トリプトファン比は有意に低下したことが確認された。低下幅 ( $\pm$ SE) は、6-23 ヶ月齢で FSMS 群が  $-21.2 \pm 8.7$ 、MSMS 群が  $-37.7 \pm 7.4$ 、PM 群が  $-35.0 \pm 7.4$  であり、FSMS 群のキヌレニン/トリプトファン比の低下幅は MSMS 群、PM 群に比べ相対的に小さかった(表 10)。24-59 ヶ月齢で治療介入によって低下したキヌレニン/トリプトファン比は FSMS 群が  $-65.5 \pm 19.5$ 、MSMS 群が  $-75.8 \pm 18.5$ 、PM 群が  $-72.5 \pm 20.3$  であり 24-59 ヶ月齢のサブグループの方が 6-23 ヶ月齢に比べキヌレニン/トリプトファン比の低下幅が大きいことが確認できた(表 11)。

6-23 ヶ月齢、24-59 ヶ月齢いずれのサブグループにおいても試験開始時点のキヌレニン/トリプトファン比に介入群間の差は認められなかった。

図 10 血中キヌレニン/トリプトファン比

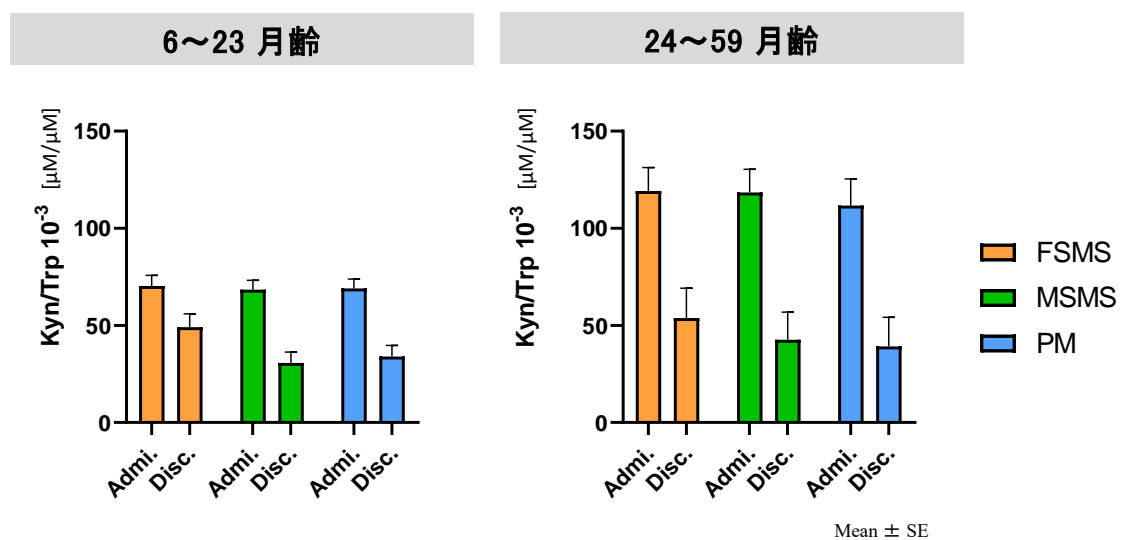


表 10 血中キヌレニン濃度と変化量 (6-23 ヶ月齢)

	6~23ヶ月齢									
	FSMS-RUTF		MSMS-RUTF				PM-RUTF			
	Admission	Discharge	Admission	Discharge	Admission	Discharge	Admission	Discharge		
Kyn (MS) ,uM	1.027 ± 0.060	0.740 ± 0.075	0.981 ± 0.055	0.522 ± 0.063	1.046 ± 0.054	0.597 ± 0.063				
Trp (MS) ,uM	21.3 ± 1.0	21.3 ± 1.3	21.0 ± 0.9	23.9 ± 1.0	22.3 ± 0.9	25.5 ± 1.1				
Kyn / Trp × 10 <sup>-3</sup>	70.3 ± 5.4	49.1 ± 6.8	68.4 ± 4.8	30.7 ± 5.6	69.0 ± 4.8	34.0 ± 5.7				

mean ± SE で記載, 線形混合モデルによる推定値

	6~23ヶ月齢					
	FSMS-RUTF		MSMS-RUTF		PM-RUTF	
	Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>
Kyn (MS) [uM]	-0.288 ± 0.093	0.006 **	-0.458 ± 0.079	<0.001 ***	-0.45 ± 0.079	<0.001 ***
Trp (MS) [uM]	0.0 ± 1.6	1.00	2.9 ± 1.4	0.11	3.2 ± 1.4	0.06 .
Kyn / Trp × 10 <sup>-3</sup>	-21.2 ± 8.7	0.043 *	-37.7 ± 7.4	<0.001 ***	-35.0 ± 7.4	<0.001 ***

mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てμmol/L, 線形混合モデルによる推定値

1. H<sub>0</sub>: 変化量=0 に対する仮説検定のp値(同一評価項目での検定の繰り返しについてボンフェローニ法で調整)

表 11 血中キヌレニン濃度と変化量 (24-59 ヶ月齢)

	24～59ヶ月齢							
	FSMS-RUTF		MSMS-RUTF				PM-RUTF	
	Admission	Discharge	Admission	Discharge	Admission	Discharge		
Kyn (MS) ,uM	1.019 ± 0.073	1.087 ± 0.092	0.917 ± 0.073	0.507 ± 0.086	0.951 ± 0.082	0.607 ± 0.089		
Trp (MS) ,uM	15.8 ± 1.3	22.3 ± 1.6	13.8 ± 1.3	21.2 ± 1.5	14.2 ± 1.5	21.8 ± 1.6		
Kyn / Trp × 10 <sup>-3</sup>	119.2 ± 12.1	53.8 ± 15.3	118.5 ± 11.9	42.6 ± 14.2	111.7 ± 13.7	39.2 ± 15.0		

mean ± SE で記載, 線形混合モデルによる推定値

	24～59ヶ月齢					
	FSMS-RUTF		MSMS-RUTF		PM-RUTF	
	Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>
Kyn (MS) [uM]	0.068 ± 0.114	1.00	-0.410 ± 0.108	<0.001 ***	-0.344 ± 0.118	0.011 *
Trp (MS) [uM]	6.6 ± 2.1	0.004 **	7.4 ± 2.0	<0.001 ***	7.5 ± 2.2	0.002 **
Kyn / Trp × 10 <sup>-3</sup>	-65.5 ± 19.5	0.002 **	-75.8 ± 18.5	<0.001 ***	-72.5 ± 20.3	<0.001 **

mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てμmol/L, 線形混合モデルによる推定値

1. H<sub>0</sub>: 変化量=0 に対する仮説検定のp値(同一評価項目での検定の繰り返しについてボンフェローニ法で調整)

### 3.5. 回復率

6-23 ヶ月齢、24-59 ヶ月齢のサブグループにおける回復率の結果は Bahwere らによって報告されている[31]ため、その結果を引用する。本解析では per protocol set 解析も実施している。

回復率の算出は採血を行っていない参加者も含め解析を行った。本試験における各 RUTF 治療群の回復率を表 12 に示す。試験終了時に回復基準を満たした参加者の割合が、6-23 ヶ月齢のサブグループでは、FSMS-RUTF 群で 74.8% (196/262)、MSMS-RUTF 群で 73.5% (186/253)、PM-RUTF 群で 75.0% (210/280) となった。24-59 ヶ月齢のサブグループでは、FSMS-RUTF 群で 84.2% (144/171)、MSMS-RUTF 群で 86.2% (144/167)、PM-RUTF 群で 86.1% (143/166) であった。

回復率の非劣性マージンとして一般的に用いられる 10%を本試験でも非劣性マージンとして設定し、回復率の非劣性検定を行ったところ、いずれの月齢サブグループにおいても、FSMS-RUTF 群、MSMS-RUTF 群の回復率は PM-RUTF 群の回復率に劣らないことが示された(表 12 difference vs PM-RUTF 列)。

表 12 各 RUTF による回復率と非劣性検定結果 (月齢別)

表XX\_各RUTFによる回復率と非劣性検定結果

Variable	6~23ヶ月齢				24~59ヶ月齢			
	discharge [n]	recovered [n]	recovery rate [% (95% CI)]	difference vs PM-RUTF [% (95% CI)]	discharge [n]	recovered [n]	recovery rate [% (95% CI)]	difference vs PM-RUTF [% (95% CI)]
ITT analysis								
FSMS-RUTF	262	196	74.8 (67.5, 81.3)	-0.2 (-7.5, 7.1)	171	144	84.2 (78.7, 89.7)	-1.9 (-9.5, 5.6)
MSMS-RUTF	253	186	73.5 (70.5, 77.7)	-1.5 (-8.9, 5.6)	167	144	86.2 (81.0, 91.4)	0 (-7.3, 7.4)
PM-RUTF	280	210	75.0 (70.5, 81.3)		166	143	86.1 (80.9, 91.4)	
PPS analysis								
FSMS-RUTF	211	194	91.9 (88.3, 95.6)	1.1 (-4.1, 6.3)	149	142	95.3 (91.3, 99.2)	0.6 (-4.3, 5.5)
MSMS-RUTF	205	185	90.2 (86.3, 94.1)	-0.6 (-6.6, 4.5)	150	144	96.0 (93.0, 99.0)	1.3 (-3.4, 6.0)
PM-RUTF	229	208	90.8 (87.1, 94.6)		151	142	94.7 (91.1, 99.4)	

本結果は Bahwere et. al., AJCN 2017 からの引用  
非劣性マージンは -10%に設定

### 3.6. 病態のサブグループ解析

追加解析として SAM の病態（クワシオルコルとマラスムス）のサブグループで解析を実施した。浮腫性の SAM をクワシオルコル、非浮腫性の SAM をマラスムスと定義しサブグループに分類している。

#### 3.6.1. 背景情報

表 13 にクワシオルコル、マラスムスの各サブグループの背景情報を示す。本試験では、クワシオルコルのサブグループに比べマラスムスのサブグループの平均年齢がより低くなっていた。さらに年齢によって標準化した体重スコア（Weight-for-age z score, WAZ）、年齢によって標準化した身長スコア（Height-for-age z score, HAZ）、および身長によって標準化した体重スコア（Weight-for-height z score, WHZ）についても、クワシオルコルのサブグループに比べマラスムスのサブグループで低下していた。

同一サブグループ内では PM 群と MSMS、FSMS 群間で性別比、年齢、体重、身長、MUAC、WAZ、HAZ、WHZ の全ての項目に関し有意な差は認められなかった。また、離乳していない子供の比率はいずれの群間にも差は認められなかった。

表 13 背景情報 (病態サブグループ)

	クワシオルコル(浮腫性SAM)				マラスムス(非浮腫性SAM)			
	All	FSMS-RUTF	MSMS-RUTF	PM-RUTF	All	FSMS-RUTF	MSMS-RUTF	PM-RUTF
被験者数, n	233	65	98	70	266	89	82	95
Male sex, n	115 ( 49.4% )	33 ( 50.8% )	43 ( 43.9% )	39 ( 55.7% )	127 ( 47.7% )	43 ( 48.3% )	39 ( 47.6% )	45 ( 47.4% )
Age, mo	24.8 ± 10.3	23.9 ± 9.2	25.4 ± 10.2	24.7 ± 11.4	16.2 ± 9.0	17.3 ± 9.8	15.6 ± 8.9	15.7 ± 8.2
Weight, kg	8.9 ± 2.1	8.5 ± 2.1	9.2 ± 2.0	8.7 ± 2.4	6.3 ± 1.2	6.3 ± 1.2	6.3 ± 1.3	6.4 ± 1.2
Height, cm	77.0 ± 7.9	75.8 ± 7.1	78.0 ± 7.9	76.6 ± 8.5	68.1 ± 7.0	68.4 ± 7.4	67.9 ± 7.0	68.1 ± 6.6
MUAC, mm	126.7 ± 14.0	123.7 ± 13.3	128.5 ± 13.7	127.1 ± 14.8	109.2 ± 5.7	108.8 ± 6.1	109.0 ± 6.2	109.8 ± 4.9
Weight-for-age z score	-2.6 ± 1.3	-2.8 ± 1.3	-2.3 ± 1.2	-2.7 ± 1.4	-3.8 ± 1.1	-4.0 ± 1.1	-3.8 ± 1.0	-3.7 ± 1.1
Height-for-age z score	-2.9 ± 1.4	-3.2 ± 1.2	-2.7 ± 1.4	-3.0 ± 1.4	-3.7 ± 1.6	-3.8 ± 1.7	-3.6 ± 1.4	-3.6 ± 1.6
Weight-for-height z score	-1.3 ± 1.4	-1.5 ± 1.4	-1.1 ± 1.2	-1.5 ± 1.4	-2.5 ± 1.1	-2.7 ± 1.2	-2.5 ± 1.0	-2.4 ± 1.2

n (%) または mean ± SD で記載

### 3.6.2. 血中アミノ酸濃度

表 14 にクワシオルコル、表 16 にマラスムスのサブグループの試験開始時点 (Admission) と試験終了時点 (Discharge) の血中アミノ酸濃度の推定値、及びフィッシャー比 (F-ratio) を示す。すべてのアミノ酸について試験開始時点での各群 (FSMS、MSMS、および PM) 間に差は認められなかった。このため、血中アミノ酸濃度について介入群間での比較可能性が担保されていることが確認された。

表 15 にクワシオルコル、表 17 にマラスムスのサブグループの試験開始時点から試験終了時点までの血中アミノ酸濃度の変化の推定値、及びフィッシャー比の変化値を示す。クワシオルコルのサブグループでは研究対象として注目したアミノ酸 (メチオニン、システイン、リジン、total EAA、ロイシン) の全てで血中濃度が PM-RUTF 治療介入によって有意に上昇した。マラスムスのサブグループでは血中のシステインの濃度 (実際にはシスチンで測定) が PM-RUTF 治療介入によって有意に上昇したことが確認された。

表 14 血中アミノ酸濃度 (クワシオルコル)

Amino acids		クワシオルコル											
		FSMS-RUTF				MSMS-RUTF				PM-RUTF			
		Admission		Discharge		Admission		Discharge		Admission		Discharge	
EAA	Met	21.3	± 1.4	23.3	± 1.6	21.4	± 1.2	27.8	± 1.3	20.9	± 1.3	26.2	± 1.4
	Lys	171.9	± 9.8	208.1	± 11.5	165.3	± 8.2	221.0	± 9.3	156.5	± 9.6	194.6	± 10.4
	Val	156.6	± 7.9	194.9	± 9.4	148.9	± 6.6	204.9	± 7.6	157.4	± 7.7	207.4	± 8.5
	Leu	102.6	± 4.9	129.8	± 5.8	97.4	± 4.1	134.1	± 4.7	102.6	± 4.8	121.4	± 5.3
	Ile	70.4	± 3.6	77.7	± 4.2	64.4	± 3.0	81.5	± 3.4	66.0	± 3.4	76.2	± 3.7
	Phe	73.2	± 3.1	74.5	± 3.7	72.0	± 2.6	79.5	± 3.0	72.4	± 3.1	83.7	± 3.3
	Trp	17.0	± 1.5	24.6	± 1.7	15.7	± 1.2	28.6	± 1.4	16.1	± 1.5	29.0	± 1.6
	Thr	77.4	± 3.7	86.9	± 4.4	76.2	± 3.1	81.1	± 3.6	80.1	± 3.6	89.6	± 4.0
	His	70.4	± 2.3	71.6	± 2.7	70.4	± 1.9	74.6	± 2.2	71.4	± 2.3	72.3	± 2.5
NEAA	Ala	399.1	± 22.9	472.1	± 27.0	408.0	± 19.1	464.6	± 21.8	445.7	± 22.5	424.3	± 24.6
	Arg	78.0	± 4.9	101.6	± 5.8	72.5	± 4.1	109.9	± 4.7	73.2	± 4.8	97.1	± 5.2
	Asp	7.2	± 0.4	8.1	± 0.4	6.7	± 0.3	7.6	± 0.3	6.7	± 0.3	7.5	± 0.4
	Asn	81.3	± 3.1	75.3	± 3.7	78.4	± 2.6	79.3	± 3.0	80.2	± 3.0	72.5	± 3.3
	Glu	70.3	± 3.1	88.2	± 3.6	67.0	± 2.6	85.5	± 2.9	67.7	± 3.0	88.7	± 3.3
	Gln	537.8	± 17.2	531.3	± 20.3	527.9	± 14.4	516.8	± 16.4	533.6	± 16.7	516.8	± 18.2
	Pro	355.3	± 16.8	313.2	± 19.8	354.8	± 14.0	359.4	± 16.0	349.8	± 16.4	326.3	± 17.8
	Tyr	69.1	± 4.6	93.4	± 5.3	67.2	± 4.1	97.7	± 4.5	71.1	± 4.5	99.7	± 4.9
	Gly	269.3	± 11.0	240.5	± 12.4	266.6	± 9.9	256.7	± 10.8	270.9	± 10.8	250.2	± 11.5
	Ser	146.0	± 5.0	132.2	± 5.9	142.0	± 4.2	141.5	± 4.8	147.1	± 4.9	128.9	± 5.4
	Cys2	19.0	± 0.8	27.0	± 0.9	18.9	± 0.7	25.7	± 0.8	20.1	± 0.8	29.5	± 0.9
total BCAA		329.6	± 15.9	402.5	± 18.9	310.7	± 13.3	420.4	± 15.2	325.7	± 15.5	404.7	± 16.9
total EAA		810.0	± 37.1	890.3	± 42.1	768.7	± 30.9	967.4	± 35.0	778.3	± 35.3	920.1	± 39.6
F-ratio		2.35	± 0.05	2.51	± 0.06	2.31	± 0.04	2.41	± 0.05	2.38	± 0.05	2.25	± 0.05

mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てμmol/L, 線形混合モデルによる推定値

表 15 血中アミノ酸濃度の変化量 (クワシオルコル)

Amino acids		クワシオルコル					
		FSMS-RUTF		MSMS-RUTF		PM-RUTF	
		Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>
EAA	Met	2.0 ± 1.9	0.87	6.3 ± 1.6	<0.001 ***	5.2 ± 1.8	0.010 *
	Lys	36.2 ± 14.8	0.044 *	55.7 ± 12.2	<0.001 ***	38.1 ± 13.8	0.018 *
	Val	38.4 ± 12.3	0.005 **	56.0 ± 10.0	<0.001 ***	50.0 ± 11.4	<0.001 ***
	Leu	27.2 ± 7.6	0.001 **	36.7 ± 6.2	<0.001 ***	18.7 ± 7.1	0.025 *
	Ile	7.3 ± 5.4	0.53	17.1 ± 4.4	<0.001 ***	10.2 ± 5.0	0.12
	Phe	1.2 ± 4.9	1.00	7.5 ± 4.0	0.18	11.4 ± 4.5	0.037 *
	Trp	7.5 ± 2.3	0.003 **	12.9 ± 1.9	<0.001 ***	12.9 ± 2.2	<0.001 ***
	Thr	9.4 ± 5.8	0.31	4.8 ± 4.8	0.93	9.5 ± 5.4	0.24
	His	1.3 ± 3.6	1.00	4.2 ± 2.9	0.46	0.9 ± 3.3	1.00
NEAA	Ala	73.0 ± 35.3	0.12	56.6 ± 28.9	0.15	-21.4 ± 33.0	1.00
	Arg	23.6 ± 7.6	0.005 **	37.4 ± 6.2	<0.001 ***	24.0 ± 7.0	0.002 **
	Asp	0.9 ± 0.5	0.27	0.9 ± 0.5	0.15	0.8 ± 0.5	0.40
	Asn	-6.0 ± 4.8	0.63	0.9 ± 4.0	1.00	-7.7 ± 4.5	0.26
	Glu	17.9 ± 4.7	<0.001 ***	18.5 ± 3.9	<0.001 ***	21.0 ± 4.4	<0.001 ***
	Gln	-6.5 ± 26.4	1.00	-11.1 ± 21.6	1.00	-16.7 ± 24.6	1.00
	Pro	-42.1 ± 26.0	0.31	4.6 ± 21.3	1.00	-23.5 ± 24.2	1.00
	Tyr	24.4 ± 6.5	<0.001 ***	30.5 ± 5.3	<0.001 ***	28.6 ± 6.1	<0.001 ***
	Gly	-28.8 ± 14.0	0.12	-9.9 ± 11.5	1.00	-20.7 ± 13.0	0.34
	Ser	-13.7 ± 7.7	0.22	-0.5 ± 6.3	1.00	-18.2 ± 7.2	0.034 *
Cys2	8.0 ± 1.2	<0.001 ***	6.7 ± 1.0	<0.001 ***	9.4 ± 1.1	<0.001 ***	
total BCAA	72.8 ± 24.6	0.009 **	109.8 ± 20.1	<0.001 ***	79.0 ± 22.9	0.002 **	
total EAA	80.4 ± 54.3	0.42	198.7 ± 44.6	<0.001 ***	141.8 ± 51.5	0.018 *	
F-ratio	0.16 ± 0.08	0.13	0.10 ± 0.06	0.40	-0.13 ± 0.07	0.22	

mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全て μmol/L, 線形混合モデルによる推定値

1. H<sub>0</sub>: 変化量=0 に対する仮説検定のp値(同一評価項目での検定の繰り返しについてボンフェローニ法で調整)

表 16 血中アミノ酸濃度 (マラスムス)

Amino acids		マラスムス																	
		FSMS-RUTF				MSMS-RUTF				PM-RUTF									
		Admission		Discharge		Admission		Discharge		Admission		Discharge		Admission		Discharge			
EAA	Met	24.0	±	1.0	24.8	±	1.2	24.1	±	1.0	27.0	±	1.2	24.2	±	0.9	25.1	±	1.1
	Lys	201.5	±	8.1	185.9	±	10.4	197.2	±	8.2	225.8	±	9.8	188.4	±	7.8	182.6	±	9.4
	Val	187.0	±	7.0	204.0	±	9.0	186.2	±	7.1	229.9	±	8.5	194.0	±	6.7	196.4	±	8.1
	Leu	118.8	±	4.1	135.3	±	5.3	119.6	±	4.1	144.8	±	5.0	121.8	±	3.9	120.6	±	4.7
	Ile	79.4	±	3.0	79.3	±	3.9	78.1	±	3.1	89.3	±	3.7	78.5	±	2.9	73.5	±	3.5
	Phe	78.6	±	2.4	70.3	±	3.1	74.6	±	2.4	82.5	±	2.9	76.6	±	2.2	71.9	±	2.7
	Trp	26.3	±	1.2	28.3	±	1.5	25.6	±	1.2	32.5	±	1.5	26.9	±	1.1	28.2	±	1.4
	Thr	92.9	±	3.4	88.0	±	4.4	90.2	±	3.5	101.1	±	4.2	96.4	±	3.3	93.3	±	4.0
	His	73.7	±	1.7	74.4	±	2.2	72.6	±	1.7	74.7	±	2.1	75.1	±	1.6	69.9	±	2.0
NEAA	Ala	452.1	±	18.7	398.9	±	24.1	429.8	±	19.1	472.9	±	22.9	490.0	±	18.1	433.0	±	21.8
	Arg	96.6	±	4.4	96.9	±	5.7	92.0	±	4.5	113.7	±	5.4	90.8	±	4.2	94.3	±	5.1
	Asp	9.0	±	0.3	8.5	±	0.3	8.9	±	0.3	9.2	±	0.3	8.8	±	0.2	8.3	±	0.3
	Asn	84.6	±	2.4	70.0	±	3.1	80.0	±	2.4	77.3	±	2.9	83.3	±	2.3	70.3	±	2.8
	Glu	88.4	±	2.7	88.0	±	3.5	89.4	±	2.8	94.4	±	3.3	88.9	±	2.6	88.1	±	3.1
	Gln	608.8	±	14.0	593.6	±	18.0	598.1	±	14.2	582.0	±	17.0	611.9	±	13.4	566.4	±	16.2
	Pro	366.5	±	12.1	297.8	±	15.6	352.9	±	12.3	333.9	±	14.7	362.2	±	11.5	312.2	±	14.0
	Tyr	89.4	±	3.6	90.1	±	4.6	87.1	±	3.6	106.7	±	4.3	94.0	±	3.4	95.1	±	4.1
	Gly	251.1	±	7.7	230.1	±	9.8	237.1	±	7.8	236.2	±	9.3	243.1	±	7.3	252.6	±	8.8
	Ser	163.4	±	4.1	123.0	±	5.3	154.2	±	4.2	137.6	±	5.0	161.5	±	3.9	130.6	±	4.7
	Cys2	24.4	±	0.7	29.0	±	0.9	24.0	±	0.7	30.6	±	0.8	25.4	±	0.7	29.8	±	0.8
total BCAA		385.2	±	13.8	418.7	±	17.7	383.9	±	13.9	464.1	±	16.8	394.2	±	13.2	390.5	±	16.0
total EAA		882.8	±	26.4	913.6	±	34.0	872.6	±	26.6	1000.2	±	32.7	884.4	±	25.1	856.9	±	30.4
F-ratio		2.33	±	0.04	2.58	±	0.06	2.40	±	0.04	2.47	±	0.05	2.34	±	0.04	2.36	±	0.05

mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全て  $\mu\text{mol/L}$ , 線形混合モデルによる推定値

表 17 血中アミノ酸濃度の変化量 (マラスムス)

Amino acids		マラスムス								
		FSMS-RUTF			MSMS-RUTF			PM-RUTF		
		Changes	Adj.p <sup>1</sup>		Changes	Adj.p <sup>1</sup>		Changes	Adj.p <sup>1</sup>	
EAA	Met	0.8 ± 1.6	1.00	2.9 ± 1.5	0.17		0.9 ± 1.4	1.00		
	Lys	-15.6 ± 13.2	0.71	28.6 ± 12.8	0.08	.	-5.8 ± 12.1	1.00		
	Val	17.1 ± 11.4	0.40	43.7 ± 11.1	<0.001 ***		2.4 ± 10.5	1.00		
	Leu	16.5 ± 6.7	0.039 *	25.3 ± 6.5	<0.001 ***		-1.2 ± 6.1	1.00		
	Ile	-0.1 ± 4.9	1.00	11.3 ± 4.8	0.06	.	-5.0 ± 4.5	0.82		
	Phe	-8.3 ± 3.9	0.10	7.9 ± 3.7	0.10		-4.7 ± 3.5	0.55		
	Trp	2.0 ± 1.9	0.87	6.9 ± 1.9	<0.001 ***		1.3 ± 1.7	1.00		
	Thr	-4.9 ± 5.6	1.00	10.9 ± 5.5	0.14		-3.1 ± 5.2	1.00		
	His	0.7 ± 2.8	1.00	2.1 ± 2.7	1.00		-5.1 ± 2.5	0.13		
NEAA	Ala	-53.2 ± 30.5	0.25	43.1 ± 29.6	0.44		-57.0 ± 28.1	0.13		
	Arg	0.3 ± 7.2	1.00	21.8 ± 7.0	0.006 **		3.5 ± 6.6	1.00		
	Asp	-0.6 ± 0.4	0.53	0.2 ± 0.4	1.00		-0.5 ± 0.4	0.62		
	Asn	-14.6 ± 3.9	<0.001 ***	-2.7 ± 3.8	1.00		-13.0 ± 3.6	<0.001 ***		
	Glu	-0.4 ± 4.4	1.00	5.0 ± 4.3	0.73		-0.9 ± 4.1	1.00		
	Gln	-15.2 ± 22.8	1.00	-16.1 ± 22.2	1.00		-45.5 ± 21.0	0.09		
	Pro	-68.7 ± 19.7	0.002 **	-19.0 ± 19.1	0.96		-50.0 ± 18.1	0.017 *		
	Tyr	0.7 ± 5.8	1.00	19.6 ± 5.6	0.001 **		1.2 ± 5.3	1.00		
	Gly	-21.0 ± 12.5	0.28	-1.0 ± 12.1	1.00		9.5 ± 11.5	1.00		
	Ser	-40.5 ± 6.7	<0.001 ***	-16.6 ± 6.5	0.032 *		-30.9 ± 6.2	<0.001 ***		
Cys2	4.7 ± 1.1	<0.001 ***	6.6 ± 1.1	<0.001 ***		4.4 ± 1.0	<0.001 ***			
total BCAA		33.4 ± 22.5	0.41	80.2 ± 21.8	<0.001 ***		-3.8 ± 20.7	1.00		
total EAA		30.8 ± 43.0	1.00	127.6 ± 42.1	0.007 **		-27.5 ± 39.4	1.00		
F-ratio		0.25 ± 0.07	0.001 **	0.07 ± 0.07	0.87		0.02 ± 0.06	1.00		

mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てμmol/L, 線形混合モデルによる推定値

1. H<sub>0</sub>: 変化量=0 に対する仮説検定のp値(同一評価項目での検定の繰り返しについてボンフェローニ法で調整)

### 3.6.3. 研究対象として注目したアミノ酸の非劣性検定

研究対象として注目したアミノ酸であるメチオニン、システイン、リジン、total EAA、ロイシンの血中濃度について、クワシオルコル、マラスムスそれぞれのサブグループで PM-RUTF 治療群に対する非劣性検定を実施した。なお、全ての群間差は試験終了時点の PM-RUTF 群の平均値を 100%とした場合の相対値として示す。

試験終了時点の PM 群と FSMS 群の血中メチオニン濃度差 (95%CI) はクワシオルコルで-10.9% (-27.6, 5.9)、マラスムスで-0.9% (-15.6, 13.7)であった。クワシオルコルでは 95%信頼区間の下限が非劣性マージンを下回ったことから検定による結果の判断が保留された。マラスムスのサブグループでは 95%信頼区間の下限が非劣性マージンを下回らないことから、FSMS 群の血中メチオニン濃度は PM 群に対し劣っていないことが示された(図 11 A)。

試験終了時点の PM 群と FSMS 群の血中シスチン濃度差 (95%CI) はクワシオルコルで-8.5% (-17.7, 0.8)、マラスムスで-2.6% (-11.6, 6.3)であり、いずれのサブグループでも 95%信頼区間の下限が非劣性マージンを下回らないことから、FSMS 群の血中シスチン濃度は PM 群に対し劣っていないことが示された(図 11 B)。

試験終了時点の PM 群と FSMS 群の血中リジン濃度差 (95%CI) はクワシオルコルで 6.9% (-10.6, 24.5)、マラスムスで 1.8% (-15.2, 18.8)であり、いずれのサブグループでも 95%信頼区間の下限が非劣性マージンを下回らないことから、FSMS 群の血中リジン濃度は PM 群に対し劣っていないことが示された(図 11 C)。

試験終了時点の PM 群と FSMS 群の血中 total EAA 濃度差 (95%CI) はクワシオルコルで-3.2% (-16.8, 10.3)、マラスムスで 6.6% (-5.2, 18.4)であり、いずれのサブグループでも 95%信頼区間の下限が非劣性マージンを下回らないことから、FSMS 群の血中 total EAA 濃度は PM 群に対し劣っていないことが示された(図 11 D)。

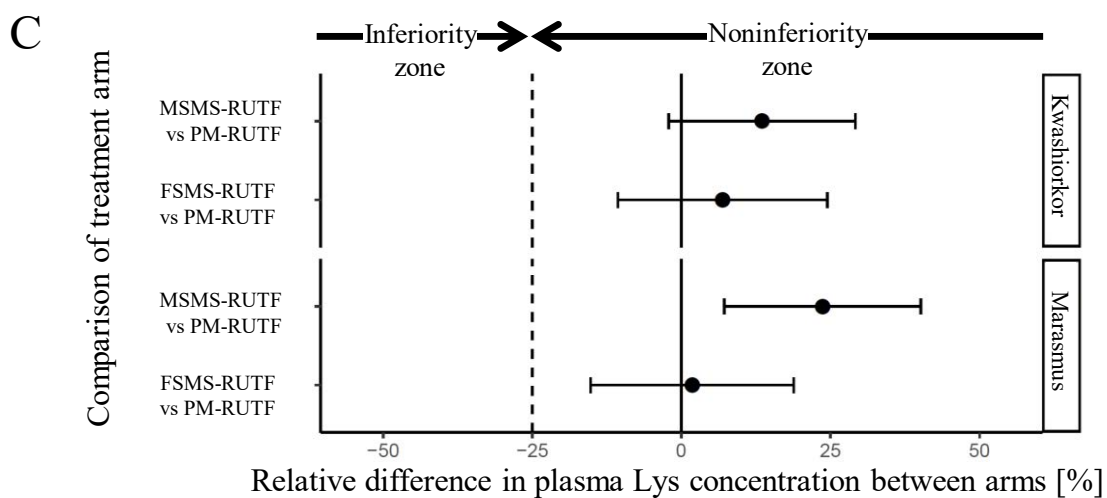
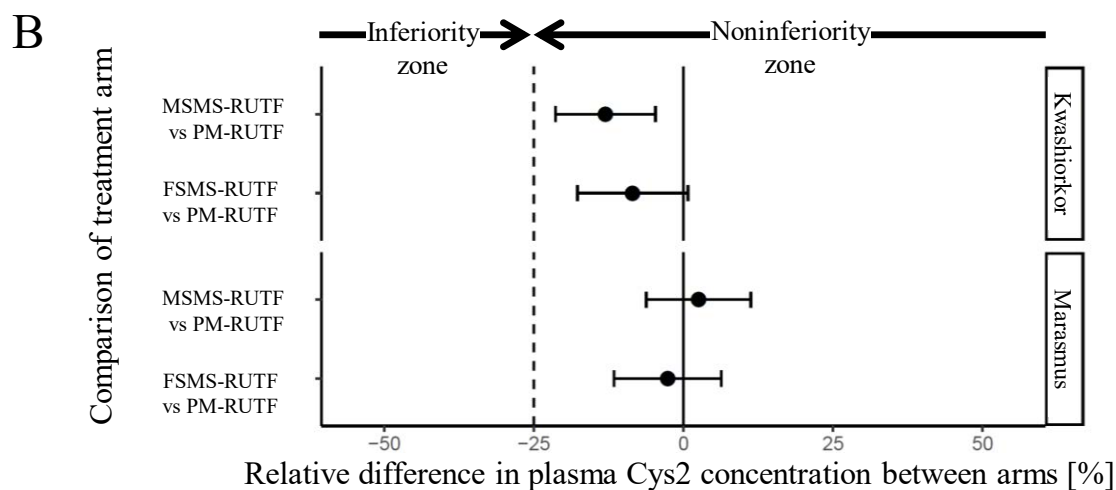
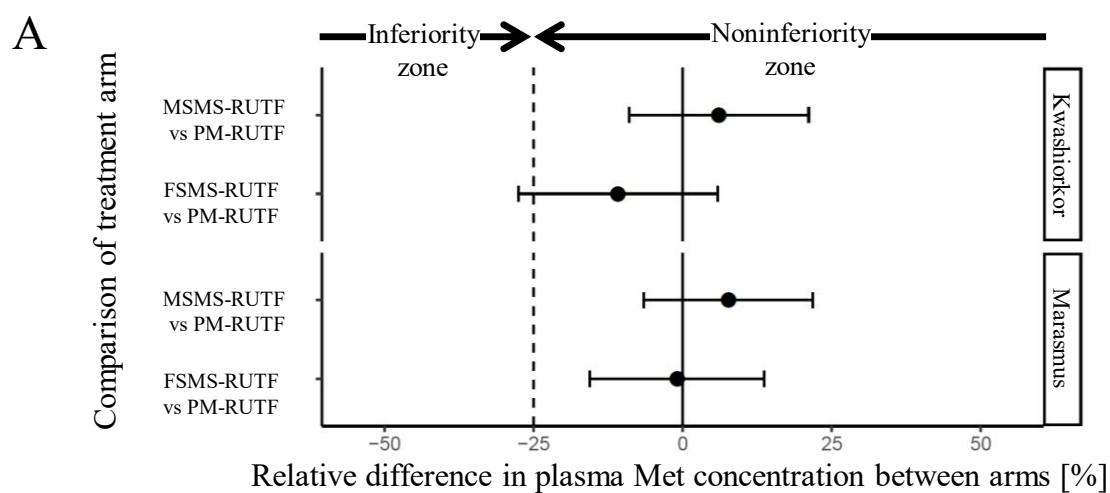
試験終了時点の PM 群と FSMS 群の血中ロイシン濃度差 (95%CI) はクワシオルコルで 6.9% (-7.3, 21.2)、マラスムスで 12.2% (-0.8, 25.2)であり、いずれのサブグループでも 95%信

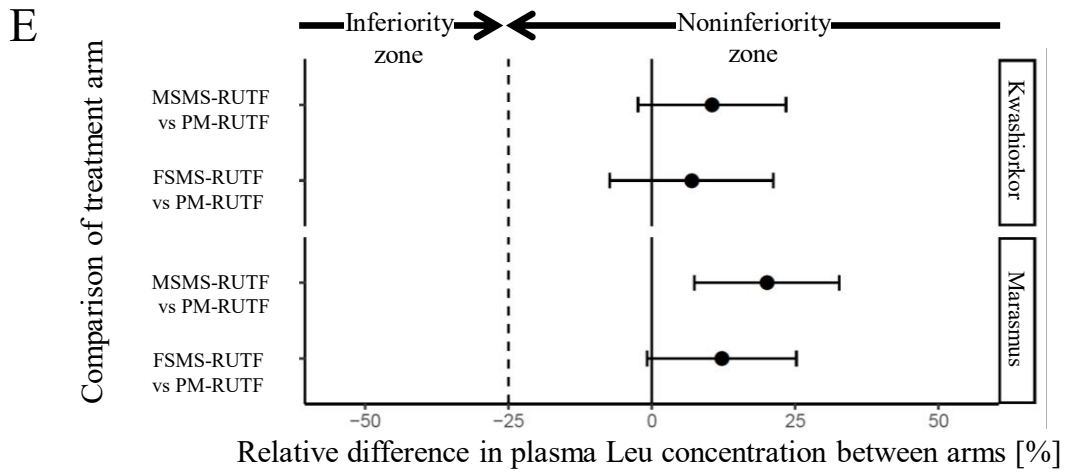
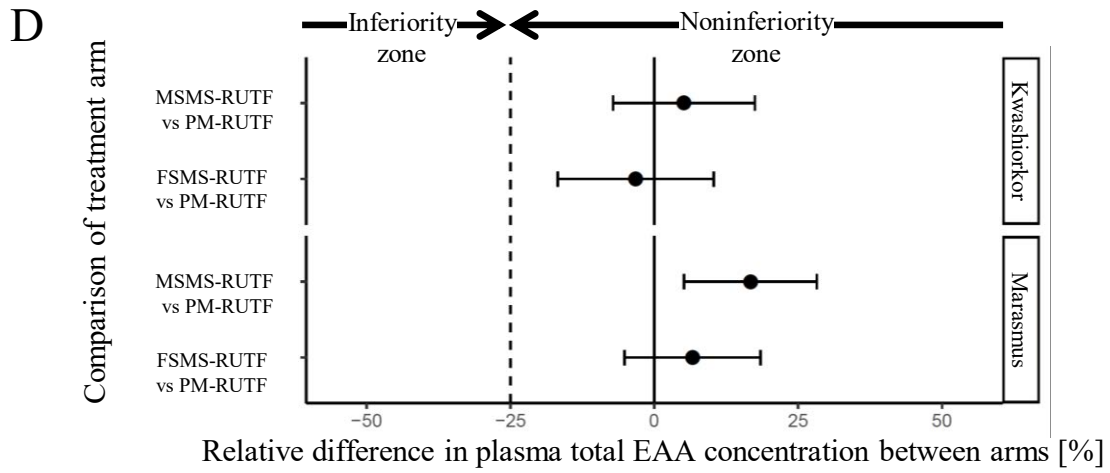
頼区間の下限が非劣性マージンを下回らないことから、FSMS 群の血中ロイシン濃度は PM 群に対し劣っていないことが示された(図 11 E)。

MSMS 群のメチオニン、シスチン、リジン、total EAA、ロイシンそれぞれの血中濃度についても試験終了時点で PM 群に対し劣っていないことが確認された(図 11 A-E)。

さらに、total EAA の内訳として研究対象として注目したアミノ酸には含まれていない個別の EAA に関する非劣性検定の結果も表 18 に示す。個別の EAA では、クワシオルコルでトリプトファンの試験終了時点での PM 群と FSMS 群の血中濃度差の 95%信頼区間の下限が非劣性マージンを下回った。

図 11 研究対象として注目したアミノ酸の非劣性検定 (病態サブグループ)





FSMS - PMはFSMS群からPM群の血中アミノ酸濃度を引いた値を、MSMS - PMはMSMS群からPM群の血中アミノ酸濃度を引いた値を示す。各値はPM-RUTF治療群の試験終了時点における血中アミノ酸濃度を100%とした場合の相対値で示す。黒丸は群間差の点推定を、バーは95%CIを、点線は非劣性マージン(-25%)を示す。

表 18 血中アミノ酸濃度の非劣性検定 (病態サブグループ)

Amino acids	クワシオルコル		マラスムス			
	Difference <sup>1</sup> [%]	(95% CI) <sup>2</sup>	Difference <sup>1</sup> [%]	(95% CI) <sup>2</sup>		
EAA	Met	FSMS - PM	-10.9	( -27.6 , 5.9 )	-0.9	( -15.6 , 13.7 )
		MSMS - PM	6.1	( -9.0 , 21.1 )	7.7	( -6.5 , 21.8 )
	Lys	FSMS - PM	6.9	( -10.6 , 24.5 )	1.8	( -15.2 , 18.8 )
		MSMS - PM	13.5	( -2.1 , 29.2 )	23.7	( 7.2 , 40.1 )
	Val	FSMS - PM	-6.0	( -19.4 , 7.4 )	3.9	( -9.8 , 17.6 )
		MSMS - PM	-1.2	( -13.3 , 10.9 )	17.1	( 3.7 , 30.3 )
	Leu	FSMS - PM	6.9	( -7.3 , 21.2 )	12.2	( -0.8 , 25.2 )
		MSMS - PM	10.5	( -2.4 , 23.4 )	20.1	( 7.4 , 32.7 )
	Ile	FSMS - PM	1.9	( -14.3 , 18.1 )	7.9	( -7.9 , 23.7 )
		MSMS - PM	6.9	( -7.6 , 21.4 )	21.6	( 6.2 , 36.9 )
	Phe	FSMS - PM	-11.0	( -24.2 , 2.2 )	-2.1	( -14.8 , 10.5 )
		MSMS - PM	-5.0	( -16.8 , 6.8 )	14.8	( 2.6 , 27.0 )
	Trp	FSMS - PM	-15.4	( -33.5 , 2.7 )	0.3	( -15.5 , 16.0 )
		MSMS - PM	-1.6	( -18.0 , 14.8 )	15.2	( -0.4 , 30.7 )
	Thr	FSMS - PM	-3.0	( -17.8 , 11.7 )	-5.7	( -19.9 , 8.5 )
		MSMS - PM	-9.5	( -22.8 , 3.8 )	8.4	( -5.5 , 22.2 )
	His	FSMS - PM	-1.0	( -12.2 , 10.3 )	6.4	( -2.9 , 15.7 )
		MSMS - PM	3.1	( -7.0 , 13.2 )	6.8	( -2.2 , 15.9 )
total BCAA		FSMS - PM	-0.6	( -14.4 , 13.3 )	7.2	( -6.3 , 20.8 )
		MSMS - PM	3.9	( -8.6 , 16.4 )	18.8	( 5.7 , 32.0 )
total EAA		FSMS - PM	-3.2	( -16.8 , 10.3 )	6.6	( -5.2 , 18.4 )
		MSMS - PM	5.1	( -7.2 , 17.5 )	16.7	( 5.2 , 28.2 )
NEAA	Cys2	FSMS - PM	-8.5	( -17.7 , 0.8 )	-2.6	( -11.6 , 6.3 )
		MSMS - PM	-13.0	( -21.4 , -4.7 )	2.5	( -6.2 , 11.3 )

1 FSMS - PMはFSMS群からPM群の血中アミノ酸濃度を引いた値を、MSMS - PMはMSMS群からPM群の血中アミノ酸濃度を引いた値を示す。各値はPM-RUTF治療群の試験終了時点における血中アミノ酸濃度を100%とした場合の相対値で示す。

2 血中アミノ酸濃度の非劣性検定におけるマージンを25%と設定しているのでCIの下限が-25%を上回った場合は非劣性が示されたとみなす。

#### 3.6.4. 血中キヌレニン濃度

表 19 にクワシオルコルのサブグループ、表 20 にマラスムスのサブグループの試験開始時点(Admission)と試験終了時点(Discharge)の血中キヌレニン濃度の推定値、試験開始時点から試験終了時点までの血中キヌレニン濃度の変化量の推定値、キヌレニン/トリプトファン比の結果を示す。

治療介入によるキヌレニン/トリプトファン比の低下幅は、クワシオルコルで FSMS 介入群が  $-70.8 \pm 16.0$ 、MSMS 介入群が  $-55.2 \pm 13.2$ 、PM 介入群が  $-60.7 \pm 14.8$ 。マラスムスで治療介入によって低下したキヌレニン/トリプトファン比は FSMS 介入群が  $-7.9 \pm 8.7$ 、MSMS 介入群が  $-44.2 \pm 8.3$ 、PM 介入群が  $-34.7 \pm 7.8$  であった。マラスムスの FSMS 治療介入群でのみキヌレニン/トリプトファン比に有意な低下が認められなかった (表 20)。それ以外の治療介入群ではキヌレニン/トリプトファン比は有意に低下したことが確認された。

クワシオルコル、マラスムスいずれのサブグループにおいても試験開始時点のキヌレニン/トリプトファン比に介入群間の差は認められなかった。

表 19 血中キヌレニン濃度と変化量 (クワシオルコル)

	クワシオルコル					
	FSMS-RUTF		MSMS-RUTF		PM-RUTF	
	Admission	Discharge	Admission	Discharge	Admission	Discharge
Kyn (MS) ,uM	0.879 ± 0.074	0.682 ± 0.087	0.817 ± 0.064	0.472 ± 0.072	0.822 ± 0.072	0.502 ± 0.078
Trp (MS) ,uM	14.8 ± 1.3	19.9 ± 1.5	14.1 ± 1.1	21.1 ± 1.2	14.6 ± 1.2	23.5 ± 1.3
Kyn / Trp × 10 <sup>-3</sup>	104.1 ± 10.3	33.2 ± 12.3	97.7 ± 8.7	42.5 ± 10.0	94.7 ± 10.0	34.1 ± 11.0

mean ± SE で記載, 線形混合モデルによる推定値

	クワシオルコル					
	FSMS-RUTF		MSMS-RUTF		PM-RUTF	
	Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>
Kyn (MS) [uM]	-0.1971 ± 0.109	0.22	-0.345 ± 0.09	<0.001 ***	-0.32 ± 0.101	0.005 **
Trp (MS) [uM]	5.1 ± 2.0	0.029 *	7.0 ± 1.6	<0.001 ***	8.9 ± 1.8	<0.001 ***
Kyn / Trp × 10 <sup>-3</sup>	-70.8 ± 16.0	<0.001 ***	-55.2 ± 13.2	<0.001 ***	-60.7 ± 14.8	<0.001 ***

mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てμmol/L, 線形混合モデルによる推定値

1. H<sub>0</sub>: 変化量=0 に対する仮説検定のp値(同一評価項目での検定の繰り返しについてボンフェローニ法で調整)

表 20 血中キヌレニン濃度と変化量 (マラスムス)

	マラスムス											
	FSMS-RUTF			MSMS-RUTF				PM-RUTF				
	Admission		Discharge	Admission		Discharge	Admission		Discharge			
Kyn (MS) ,uM	1.153	± 0.064	1.036	± 0.081	1.111	± 0.066	0.560	± 0.077	1.169	± 0.062	0.671	± 0.073
Trp (MS) ,uM	23.3	± 1.0	23.6	± 1.3	22.6	± 1.0	24.5	± 1.2	23.8	± 1.0	25.0	± 1.2
Kyn / Trp × 10 <sup>-3</sup>	74.0	± 5.2	66.2	± 6.9	73.0	± 5.3	28.7	± 6.4	72.6	± 5.0	37.9	± 6.1

mean ± SE で記載, 線形混合モデルによる推定値

	マラスムス									
	FSMS-RUTF		MSMS-RUTF		PM-RUTF					
	Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>	Changes	Adj.p <sup>1</sup>				
Kyn (MS) [uM]	-0.117	± 0.094	0.64		-0.550	± 0.090	<0.001 ***	-0.498	± 0.085	<0.001 ***
Trp (MS) [uM]	0.3	± 1.7	1.00		1.9	± 1.6	0.67	1.1	± 1.5	1.00
Kyn / Trp × 10 <sup>-3</sup>	-7.9	± 8.7	1.00		-44.2	± 8.3	<0.001 ***	-34.7	± 7.8	<0.001 ***

mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てμmol/L, 線形混合モデルによる推定値

1. H<sub>0</sub>: 変化量=0 に対する仮説検定のp値(同一評価項目での検定の繰り返しについてボンフェローニ法で調整)

### 3.6.5. 回復率

SAM 病態サブグループの回復率は採血を行っていない参加者も含めて per protocol set 解析を実施した。本試験における各 RUTF 治療群の回復率を表 21 に示す。クワシオルコルのサブグループでは試験終了時に回復基準を満たした参加者の割合が、FSMS-RUTF 群で 94.1% (190/202)、MSMS-RUTF 群で 94.4% (201/213)、PM-RUTF 群で 94.4% (202/214) となった。マラスムスのサブグループでは試験終了時に回復基準を満たした参加者の割合が、FSMS-RUTF 群で 88.8% (135/152)、MSMS-RUTF 群で 89.9% (124/138)、PM-RUTF 群で 90.0% (144/160) であった。

月齢のサブグループ解析と同様に回復率の非劣性マージンを 10%に設定し、回復率の非劣性検定を行ったところ、いずれの病態サブグループにおいても、FSMS-RUTF 群、MSMS-RUTF 群の回復率は PM-RUTF 群の回復率に劣らないことが示された(表 21 difference vs PM-RUTF 列)。

表 21 各 RUTF による回復率と非劣性検定結果 (病態別)

Variable	クワシオルコル				マラスムス			
	discharge [n]	recovered [n]	recovery rate [% (95% CI)]	difference vs PM-RUTF [% (95% CI)]	discharge [n]	recovered [n]	recovery rate [% (95% CI)]	difference vs PM-RUTF [% (95% CI)]
PPS analysis								
FSMS-RUTF	202	190	94.1 (90.9, 97.3)	-0.3(-4.8, 4.1)	152	135	88.8 (83.8, 93.8)	-1.2(-8.0, 5.6)
MSMS-RUTF	213	201	94.4 (91.3, 97.5)	0.0(-4.4, 4.3)	138	124	89.9 (84.9, 94.9)	-0.1(-7.0, 6.7)
PM-RUTF	214	202	94.4 (91.3, 97.5)		160	144	90.0 (85.4, 94.6)	

非劣性マージンは -10%に設定

### 3.7. 血中指標の相関解析

表 22 に試験終了時点における全参加者の血中アミノ酸濃度実測値の相関係数を示す。いずれのアミノ酸間においても負の相関関係は認められなかった。

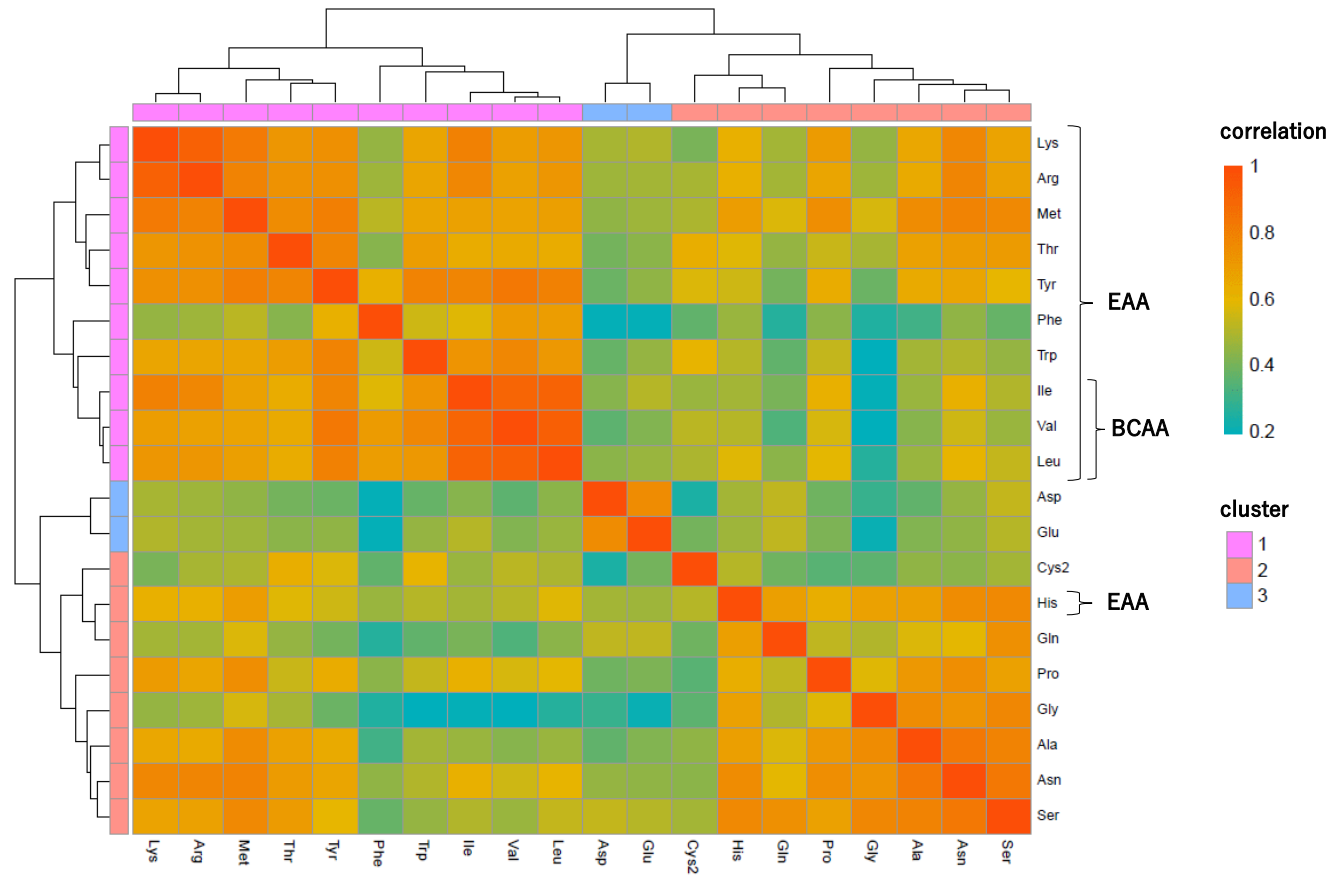
図 12 に試験終了時点のアミノ酸間の相関係数のヒートマップと、相関係数から算出した距離を用いて各アミノ酸の階層クラスタリングを行った結果を示す。クラスター数を 3 に指定した場合、クラスター1 に Lys、Arg、Met、Thr、Tyr、Phe、Trp、Ile、Val、Leu、クラスター2 に Asp、Glu、クラスター3 に Cys、His、Gln、Pro、Gly、Ala、Asn、Ser に分類された(図 12)。クラスター1 に分類された 10 種のアミノ酸のうち 8 種は EAA であった。一方クラスター3 に分類された 8 種のアミノ酸のうち 7 種は非必須アミノ酸(NEAA)であった。

表 22 試験終了時の血中アミノ酸濃度の相関係数

	Lys	Arg	Met	Thr	Tyr	Phe	Trp	Ile	Val	Leu	Asp	Glu	Cys2	His	Gln	Pro	Gly	Ala	Asn	Ser	
<b>Lys</b>	1																				
<b>Arg</b>	0.92	1																			
<b>Met</b>	0.82	0.80	1																		
<b>Thr</b>	0.72	0.74	0.76	1																	
<b>Tyr</b>	0.74	0.75	0.81	0.78	1																
<b>Phe</b>	0.46	0.47	0.52	0.43	0.62	1															
<b>Trp</b>	0.67	0.67	0.67	0.69	0.80	0.55	1														
<b>Ile</b>	0.80	0.78	0.68	0.64	0.79	0.59	0.73	1													
<b>Val</b>	0.70	0.68	0.67	0.65	0.84	0.71	0.78	0.91	1												
<b>Leu</b>	0.72	0.72	0.69	0.64	0.80	0.69	0.71	0.91	0.93	1											
<b>Asp</b>	0.48	0.47	0.45	0.39	0.38	0.21	0.38	0.43	0.35	0.43	1										
<b>Glu</b>	0.50	0.48	0.47	0.43	0.44	0.20	0.46	0.51	0.42	0.46	0.76	1									
<b>Cys2</b>	0.41	0.49	0.50	0.63	0.57	0.36	0.61	0.46	0.52	0.49	0.24	0.40	1								
<b>His</b>	0.62	0.62	0.70	0.59	0.55	0.46	0.51	0.48	0.51	0.58	0.48	0.47	0.51	1							
<b>Gln</b>	0.48	0.48	0.58	0.45	0.40	0.26	0.37	0.40	0.33	0.44	0.53	0.53	0.39	0.69	1						
<b>Pro</b>	0.70	0.67	0.75	0.54	0.64	0.44	0.54	0.62	0.57	0.59	0.39	0.41	0.35	0.63	0.52	1					
<b>Gly</b>	0.45	0.47	0.57	0.48	0.38	0.25	0.19	0.20	0.20	0.26	0.30	0.21	0.36	0.68	0.50	0.59	1				
<b>Ala</b>	0.66	0.65	0.76	0.68	0.65	0.31	0.48	0.46	0.43	0.46	0.36	0.42	0.45	0.69	0.58	0.72	0.76	1			
<b>Asn</b>	0.78	0.78	0.79	0.70	0.67	0.44	0.50	0.62	0.55	0.61	0.45	0.44	0.44	0.76	0.59	0.75	0.73	0.84	1		
<b>Ser</b>	0.67	0.68	0.77	0.70	0.60	0.37	0.45	0.50	0.46	0.53	0.54	0.51	0.48	0.77	0.75	0.68	0.78	0.79	0.83	1	

ピアソンの積率相関係数

図 12 試験終了時の血中アミノ酸濃度の相関関係とクラスタリング



相関はピアソンの積率相関係数で算出、距離 = (1 - 相関係数) と定義しウォード法により階層クラスタリングを実施

## 4. 考察

### 既存 RUTF に対し性能の劣らない穀物ベースの RUTF 開発

RUTF に求められる性能のうち最も重要な指標は SAM からの回復率である。SAM からの回復率は、いずれの月齢サブグループ、いずれの病態サブグループにおいてもタンパク質源のアミノ酸組成を改良した FSMS-RUTF、MSMS-RUTF による介入群で既存品の PM-RUTF による介入群に劣らないことが示された（表 12、表 21）。本研究では、血中アミノ酸モニタリングによる低栄養児に対する効率的な栄養補給方法を探索するという新たなコンセプトに基づき

- ・ PM-RUTF 治療に比べ SMS-RUTF 治療で血中濃度が低下していたアミノ酸の強化
- ・ 乳幼児の代謝要求量を満たす最適なアミノ酸組成にするためのアミノ酸の強化

という 2 つのアプローチでタンパク質源のアミノ酸組成を改良したが、新規開発した FSMS-RUTF、MSMS-RUTF による治療成績が劣らなかったという事実は、上記のコンセプト、及びアプローチが十分機能した結果であると考えられる。

本結果は、血中アミノ酸濃度を“消化吸収したアミノ酸栄養と、代謝要求量の均衡状態が反映された指標”として捉え、血中遊離アミノ酸をモニタリングすることで、IAAO 法のような精密な方法を用いずとも様々な要因の影響を受け代謝要求量に変化した結果をある程度の精度で捉えることが出来ることを示唆している。IAAO 法により代謝要求量を決定し、それを満たすような栄養組成になるよう設計する従来の治療食開発の方法に加え、血中アミノ酸濃度をモニタリングしながら栄養組成の調整を繰り返し最適化していくという治療食開発の方法も有効であると考えられる。

### 研究対象として注目したアミノ酸 Met Cys<sup>2</sup>

本試験でタンパク質源のアミノ酸組成を決定した 1 つ目のアプローチ“PM-RUTF 治療に比べ SMS-RUTF 治療で血中濃度が低下していたアミノ酸の強化”は、植物性タンパク質

源から実際に消化吸収した栄養と、生体内の要求量の均衡が崩れることでシステインに関し血中濃度が低下していたという事実から、システインの供給を高めるためにメチオニンを添加してタンパク質源のアミノ酸組成を改良したというものである。

アミノ酸組成を改良した RUTF を用いた治療介入群のメチオニン、システインの血中濃度（実際はシスチンとして測定）はいずれの月齢サブグループにおいても PM-RUTF 治療介入群に劣らないことが確認された（図 9 A B）。年齢別の要求量という点では、今回のメチオニン添加によるアミノ酸組成の改良が SAM からの回復において要求量を十分満たしていたと考えられ、その結果回復率においても PM-RUTF 治療に劣らない結果となったと考えられる。

病態サブグループによる解析では、システインの血中濃度（実際はシスチンとして測定）はいずれの病態サブグループにおいても PM-RUTF 治療介入群に劣らないことが確認された（図 11 B）が、クワシオルコルサブグループにおいて FSMS-RUTF 治療群の血中メチオニン濃度が PM-RUTF 治療群に劣らないという結論は保留された（図 11 A）。“結論保留”という結果ではあるが、血中メチオニン濃度の FSMS-RUTF 治療群と PM-RUTF 治療群間の差の点推定値は-10.9%（表 18）と非劣性マージンの-25%を下回っていないので、サンプルサイズが増えれば非劣性が示される可能性が高く、結論を出すためにより大きなサンプルサイズが必要であることを意味しているものである。このため、SAM の治療において FSMS-RUTF が PM-RUTF より血中メチオニン濃度を維持する能力が劣っていることを意味するものではない。実際に病態サブグループによる解析でも回復率という点では FSMS-RUTF 治療群は PM-RUTF 治療群に劣っていないことが確認されている（表 21）。ただし、本試験では RUTF の性能を重要度という観点から回復率と定義し評価したが、それ以外のより敏感な性能指標である体重増加率等でみると FSMS-RUTF が PM-RUTF と比べて十分な性能が出るかは不明である。

先行研究から GSH の血中濃度がクワシオルコルでより低い[12]ことや、過酸化脂質やアミノ酸の酸化体濃度がクワシオルコルで上昇するといった報告[13, 14]があり、クワシオルコルの発症に関してはフリーラジカル仮説が強く支持されている。GSH は生体内で最も豊富に存在する抗酸化物質であり、GSH レドックスサイクルが全身における抗酸化作用の主要な構成要素を担っている。このため GSH は、特にクワシオルコルにおいて、栄養失調からの回復に重要な役割を果たすことが知られている。GSH は、グルタミン酸、グリシン、システインからなるトリペプチドで、GSH 合成の律速はシステイン、およびシステインの前駆体であるメチオニンの利用可能量に依存している[23]。このため、クワシオルコルにおいて特にシステイン、メチオニンの要求量が高まっていることが想定される。上記でも述べたように、回復率の非劣性という側面のみで見ると今回開発した FSMS-RUTF のアミノ酸組成で十分であると考えられる。一方、それ以外のより敏感な性能指標である体重増加率等においても PM-RUTF に劣らない性能を期待する場合は、クワシオルコルというシステイン、メチオニンの要求量が高まっている可能性の高い病態においてはさらにシステイン、メチオニンを強化したアミノ酸組成が有効である可能性も考えられる。

#### 研究対象として注目したアミノ酸 Lys

本試験でタンパク質源のアミノ酸組成を決定した 2 つ目のアプローチ“乳幼児の代謝要求量を満たす最適なアミノ酸組成にするためのアミノ酸の強化”は、成長指標と血中アミノ酸濃度変化の相関を解析した動物モデルによる研究データから強化するアミノ酸の優先順位付けを行い、成長指標と血中濃度の変化が最も相関した必須アミノ酸であるリジン[30]が乳幼児期において最も要求性の高まるアミノ酸と仮定し、母乳組成と同等になるまで添加してアミノ酸組成を改良したというものである。

アミノ酸組成を改良した RUTF を用いた治療介入群のリジンの血中濃度はいずれの月齢サブグループ、病態サブグループにおいても既存の PM-RUTF 治療介入群に劣らないこ

とが確認された（図 9 C、図 11 C）。年齢別、病態別いずれの要求量という点でも、今回のリジン添加によるアミノ酸組成の改良が SAM からの回復において要求量を十分満たしていたと考えられ、その結果回復率も PM-RUTF 治療に劣らない結果となったと考えられる。

### SAM からの回復における各アミノ酸間の相関

SAM から回復した状況で各アミノ酸間の血中濃度がどの程度連動しているのか把握する目的で試験終了時点における各アミノ酸間の相関解析とクラスタリングを実施した。今回の試験ではいずれの RUTF 治療においても治療効果（回復率）が異なっていなかったことから全ての RUTF 治療群を統合し解析を実施した。特に異化代謝の律速段階となる酵素反応が共通の酵素によって行われる[44]事が知られている BCAA 間では Val と Leu の相関係数が 0.93、Val と Ile の相関係数が 0.91、Leu と Ile の相関係数が 0.91 といずれも非常に強い相関関係が認められた（表 22）。相関関係が近いアミノ酸をクラスタリングすると EAA の大部分が分類されるクラスターと、NEAA の大部分が分類されるクラスターに分かれることが確認された（図 12）。本結果は、それぞれの EAA の血中濃度が連動することを強く示唆している。

生体内でのタンパク質合成のための要求量を考えると、特定の 1 つのアミノ酸のみ要求量が高まるわけではなく、合成したいタンパク質の組成に必要な比率で各アミノ酸の要求量が高まる。血中アミノ酸濃度を消化吸収したアミノ酸栄養と、代謝要求量の均衡状態が反映された指標として考え研究を進めてきたが、適切な比率で各アミノ酸栄養が共有されていなければ要求量は満たされず均衡状態は崩れたままとなる。血中のアミノ酸濃度のモニタリング等の手段により、相対的に最も均衡状態が崩れているアミノ酸（制限アミノ酸）を特定し、インバランスを解消することで制限アミノ酸以外の血中アミノ酸濃度の維持、上昇につながるということが、本相関解析の結果からも改めて確認されたものと考えられる。

## 研究対象として注目したアミノ酸 total EAA, Leu

タンパク質合成のスピードは子供で高く、成長すると低下する事が知られている[45-47]。このパターンは、WHO の設定した 1 日当たり摂取が必要なタンパク質量にも反映されており、6 ヶ月齢が最も高く 1.12g タンパク質/kg 体重、3 歳で 0.73g タンパク質/kg 体重を摂取する必要があるとしている[6]。このように、特にタンパク質合成速度と必要量が高い乳幼児期では、適切なアミノ酸組成のタンパク質栄養が十分に供給されないと、筋組織やアルブミンの合成が阻害される可能性がある。なお、SAM の特徴とされている浮腫はアルブミン合成低下による保水力の低下に起因するものと言われている。相関解析の結果からも示されたように個別の EAA の血中濃度は相互に連動する (図 12)。このため、RUTF の設計時に積極的に添加することでアミノ酸組成の改良は行わなかったが、血中濃度とタンパク質合成との関連性が報告されている total EAA[19]、ロイシン[20, 21]の血中濃度が今回のアミノ酸組成を改良によりどのように影響を受けるかは、いずれの月齢サブグループにおいても回復率が劣らなかった結果を考察する上で有意義である。そこで total EAA、ロイシンに関しても、アミノ酸組成を改良した RUTF を用いた介入により血中濃度型が維持されていたかを検証的な位置付で注目した。

アミノ酸組成を改良した RUTF を用いた治療介入群の total EAA、ロイシンの血中濃度はいずれの月齢サブグループ、病態サブグループにおいても既存の PM-RUTF 治療介入群に劣らないことが確認された (図 9 DE、図 11 DE)。適切なアミノ酸組成のタンパク質栄養が十分に供給されたことで total EAA、ロイシンの血中濃度が維持され、筋合成やアルブミン合成も適切に進んだ可能性があり、SAM からの回復の臨床基準である MUAC の改善や、両側性の浮腫の消失に寄与した可能性が考えられる。

## アミノ酸組成を改良した RUTF の炎症への影響

キヌレニン<sup>1</sup>は免疫活性化時に炎症性サイトカインによって誘導される Indolamine 2,3-dioxygenase(IDO)によってトリプトファンから代謝される物質で、IDO の活性度合いを示すキヌレニン/トリプトファン比は炎症状態を評価する指標として用いることが出来る。低栄養の子供を対象とした研究でキヌレニン/トリプトファン比の増加が C-reactive protein の値と正相関する事が報告されている [48]。低栄養は多くの場合下痢や腸の炎症の症状も併発しており、これらの症状は低栄養児の症状を悪化させ死亡率を上げることが知られている [49]。本試験では、アミノ酸組成を改良した RUTF を用いた治療介入群の回復率が PM-RUTF 群に対し劣っていなかったことから炎症状態を反映する指標であるキヌレニン/トリプトファン比も全ての種類の RUTF 治療群で低下している結果を想定した。実際に、いずれの月齢サブグループにおいても、MSMS-RUTF、FSMS-RUTF、PM-RUTF 治療群のキヌレニン/トリプトファン比は試験開始時点に比べ試験終了時点において有意に低下していた (表 10、表 11)、さらにクワシオルコルサブグループにおいても同様の結果が認められた (表 19)。クワシオルコルサブグループでは FSMS-RUTF 治療群の PM-RUTF 治療群に対する血中メチオニン濃度の非劣性が保留されていることから、回復率より敏感な性能指標において PM-RUTF に劣らない性能を期待する場合はさらなるアミノ酸組成の改良が有効である可能性を述べたが、少なくとも低栄養と併発する下痢等による炎症は FSMS-RUTF の組成による治療で十分改善されている可能性が示唆された。

一方で、マラスムスサブグループにおいて、FSMS-RUTF 治療群のみ試験開始時点から試験終了時点のキヌレニン/トリプトファン比で有意な低下が認められなかった (表 20)。FSMS-RUTF 治療群のキヌレニン/トリプトファン比の変化量 ( $\pm$ SE) は  $-7.9 \times 10^{-3} \pm 8.7 \times 10^{-3}$  で点推定値は低下方向であるが、MSMS-RUTF、PM-RUTF と比べると低下幅は相対的に小さい。マラスムスサブグループの解析では FSMS-RUTF 治療群の回復率、全ての血中アミノ酸濃度が PM-RUTF 治療群に対し劣っていなかったことからタンパク質源のアミ

ノ酸組成とは異なる要因で起こった事象と考えられるため現時点では原因は特定できていない。本現象が再現するか注意しながら、今後の研究を進めていきたい。

### 研究対象として注目したアミノ酸以外の必須アミノ酸の濃度

本研究で 2 つのアプローチによりタンパク質源のアミノ酸組成のうち特にメチオニンとリジンを優先して強化し、それ以外の必須アミノ酸は積極的に強化しなかった。その結果、6-23 ヶ月齢サブグループにおいて FSMS-RUTF 治療群のバリン、フェニルアラニン、トリプトファン、スレオニンの血中濃度について非劣性が保留され (表 9)、クワシオルコルサブグループにおいて FSMS-RUTF 治療群のトリプトファンの血中濃度について非劣性が保留された (表 18)。既に述べたが、全てのアミノ酸において FSMS-RUTF 治療群と PM-RUTF 治療群間の差の点推定値は非劣性マージンを下回っていないので (表 9 表 18)、サンプルサイズが増えれば非劣性が示される可能性が高く、今回の“結論保留”という結果はより大きなサンプルサイズが必要であることを意味しているものである。このため、SAM の治療において FSMS-RUTF が PM-RUTF よりこれらの血中アミノ酸濃度を維持する能力が劣っていることを意味するものではない。実際に病態サブグループによる解析でも回復率という点では FSMS-RUTF 治療群は PM-RUTF 治療群に劣っていないことが確認されている (表 21)。本試験において新規開発した RUTF の治療成績が劣らなかったという事実から、少なくともメチオニンとリジン以外の必須アミノ酸に関しては SAM からの回復という観点では既に要求量を十分に満たしていたと解釈する事が妥当と考えられる。一方、本試験では RUTF の性能を重要度という観点から回復率と定義し評価したが、それ以外のより敏感な性能指標である体重増加率等でみると FSMS-RUTF が PM-RUTF と比べて十分な性能が出るかは不明であり、今後臨床現場で使用される中で FSMS-RUTF と PM-RUTF 間で回復率以外の性能の違いが認められた場合は今回測定した血中アミノ酸濃度の違いも考慮しさらなる改良を検討する必要がある。

## 本研究の限界と一般化可能性

本研究の主な限界は、参加者の食事時間を制御したうえで採血を行うことが出来なかった点である。血中アミノ酸濃度は食事による影響を強く受けることが知られている[50]。このため、理想的な採血条件は、食事間隔を十分に空けた絶食時の採血で、この条件であれば食事の影響を受けていない定常状態となった血中アミノ酸濃度を測定する事が可能である。しかし、低月齢の研究参加者は大部分が授乳期のため、摂食の頻度が高い事、そもそも本研究の参加者は重度の低栄養状態である事から、倫理的に採血前の絶食を強制しなかった。採血前の絶食条件を設けなかったことは本研究の大きな制約である。ただし、試験開始時点における母乳育児の割合は、FSMS 介入群、MSMS 介入群 PM 介入群のいずれの群間でも有意な差は認められなかった。このため、食事による影響はいずれの介入群で等しく受けることとなり、ばらつきは大きくなるが依然として群間の比較可能性は担保されていると考えられる。さらに、大部分が離乳している 24 ヶ月齢を基準にサブグループによる解析を実施している。したがって、研究参加者の大部分が授乳期で、採血前の絶食条件を設けなかった場合でも、結果は一般化可能性があると考えている。

本研究のもう 1 つの大きな制限は、試験終了時点で血液標本が脱落、死亡等により欠測している点である。脱落による欠測データの割合は FSMS 群で 15.9%、MSMS 群で 15.0%、PM 群で 14.3%、死亡による欠測データの割合は FSMS 群で 2.5%、MSMS 群で 1.7% PM 群で 1.3%で、欠測データの大部分は脱落によるものである。脱落は、コミュニティワーカーが 2 回自宅訪問し治療再開を促しても、参加者と保護者が 5 日間連続して治療施設を訪問せず、本試験への参加の意思がないとみなされた状態を脱落と定義している。本定義による脱落は介入条件によらずランダムに発生するため、脱落による影響も血中アミノ酸濃度にランダムに影響すると考えられる。このようにデータが欠損しているメカニズムの大部分が完全にランダムな欠測 (missing completely at random, MCAR) と考えられ、本研究の評価項目で

ある回復率や、血中アミノ酸濃度に影響を与えるものではない。全米研究評議会は声明で MCAR による欠測データはモデルによる解析で正しく推定することが出来るとし、モデルによる解析を推奨している[41]。したがって、本研究における、試験終了時点で血液標本の欠測は、モデルによる推定を行うことで一般化可能性があると考えている。

## 結論

本試験の主目的は PM-RUTF と同等の治療効果を発揮するが、より費用対効果が高く、開発途上国で容易に入手可能な原料で製造できる植物性タンパク質源の RUTF を開発することであり、副次評価項目である血中アミノ酸濃度の測定は、新たに開発した植物性タンパク質源 RUTF の治療効果のメカニズムを理解する上で、治療介入によって“研究対象として注目したアミノ酸”の血中濃度を維持できたか評価することを目的としていた。

今回の試験で、PM-RUTF で治療された群と比較して、FSMS-RUTF、MSMS-RUTF 治療群の回復率、および研究対象として注目したアミノ酸（メチオニン、リジン等）の非劣性が示された事により、十分な性能を持つ植物性タンパク質源の RUTF の開発が、アミノ酸強化によるタンパク質源のアミノ酸組成の改良によって達成可能であることを示している。

## 【第三章 離乳食用栄養強化サプリメントによる発育阻害

### 予防介入試験】

#### 1. 緒言

##### 栄養課題における Stunting（発育阻害）の位置付け

適切な栄養状態は子供の生存と健全な発育に極めて重要である。子供における栄養不良の形態は Stunting（発育阻害）、Wasting（消耗症）、Overweight（過体重）の3つに分類される。発育阻害は成長が著しく阻害されている状態で、WHO の定めた年齢に対する身長標準成長曲線（height-for-age z-score, HAZ）より下に2標準偏差以上乖離した場合として定義されている[51]。発育阻害の子供は2019年時点で全世界の5歳未満人口6億7,600万人のうち、1億4,400万人（21.3%）と推定されており、3つの栄養不良の形態の中でも最も該当する子供が多い主要な課題である[1, 8]。

##### 発育阻害の特徴と早期の栄養介入の必要性

発育阻害に特有の問題として、一度発育阻害の状態になってしまうとその後の回復が極めて困難になるという課題がある。発育阻害の状態になると、継続して身体的発達の遅れ、及び知能発達の遅延が認められ、それらに伴う成人後の生産性の低下といった影響に苦しむことになる[52]、このため早い段階からの栄養改善による発育阻害の予防が必要になる。特に新生児期、乳児期は発育阻害になりやすく、この時期に低栄養状態の子供は出生後早期に HAZ が低下しはじめ、生後24ヶ月まで継続して低下し続けることが知られている[53]。このため、妊娠から生後24ヶ月齢までの最初の1000日に適切な栄養状態を保つことが非常に重要という認識が一般的となっている[54]。生後24ヶ月齢までの期間は主に母乳による栄養補給が行われるが、Complementary food（補完食）による栄養補給の質、量についても適切な栄養状態を保つという観点から重要である。

## 発育阻害におけるタンパク質栄養の重要性

近年の報告では、補完食のタンパク質栄養の質、及び量の両方の重要性が指摘されている[55]。例えばマラウイ共和国の1歳から6歳の子供を対象とした横断研究では、BCAAを含むすべてのEAAの血中濃度と発育阻害の間に強い負の相関関係があることが報告されている[56]。EAAは食事からの摂取が必須であるため、特に、成長過程の子供で重要な栄養素である。血中EAA濃度が増加すると筋肉タンパク質合成も増加し、血中EAA濃度が減少すると筋肉タンパク質合成も減少することも報告されており[19]、成長過程の子供で血中EAA濃度を維持することはとても重要である。また、ロイシンはmTORシグナリング経路を介したタンパク質合成の活性化因子としても重要である[20, 21]。さらに、別の縦断研究では、乳児期のアルギニンとリジンが多い食品の摂取は、その後の線形成長と関連しているという報告や[57]、乳児期のタンパク質摂取量が幼児期の身長、体重と正の相関関係があると報告されている[58]。これらの事実から、発育阻害の予防において生後24ヶ月齢までの早期の段階でタンパク質栄養の質が高い補完食を適切な量摂取し、栄養状態を維持する事が重要であると考えられるが、生後24ヶ月齢までの早期の段階で補完食のタンパク質栄養が線形成長に与える影響について調べた研究はほとんど存在しない。

## ガーナ共和国における発育阻害と補完食の現状

ガーナ共和国では大都市が集中する南部に比べ農村地帯の多い北部地域で栄養失調による発育阻害が報告されており、発育阻害は依然として大きな課題である。2014年のガーナ人口保健統計によると、24～35ヶ月齢の子供を対象とした調査では約28%が発育阻害の状態であると報告されている[59]。ガーナでは授乳期、離乳期の初期は穀類ベースのkokoという食品が補完食として用いられているが[59]、穀類のタンパク質源のアミノ酸組成は極端にリジンが不足しており、PDCASSから利用可能なタンパク質量を計算すると、標準的な摂

取量 koko 60g 中の総タンパク質は 4.5g であるのに対し利用可能タンパク質量は 2.1g と非常に低い[60]。このため、母乳と補完食を合わせたタンパク質栄養の質及び量が不足から線形成長が悪化し、最終的に発育阻害の状態となっている可能性が考えられる。近年エチオピアで実施された試験では、線形成長において重要な因子である Insulin-like growth factor 1(IGF-1)及びトランスサイレチンの血中レベルと、食事中のトリプトファン、総タンパク質及びエネルギーの摂取量が正の相関関係にあることが報告されており[61]、ガーナにおいても補完食のタンパク質栄養の質と量の改善が発育阻害を予防する可能性を示唆している。

### 離乳食用栄養強化サプリメントの開発と血中アミノ酸濃度に与える影響の評価

このような背景の元、我々はガーナの伝統的な補完食の koko に添加して使う、タンパク質栄養の質と量、および微量栄養を強化する補完食サプリメント KOKO Plus (KP) を開発し、ガーナでランダム化比較試験を行い、性能評価を行った。試験の結果 KP は用量依存的に線形成長を改善させる効果が確認された[62]。しかし、依然として KP によるタンパク質栄養の強化が生体内においてどのように作用したかの詳細は明らかとなっていない。

食事中から摂取したタンパク質・アミノ酸は消化管から吸収され血中に乗り遊離アミノ酸のプールを形成する。この遊離アミノ酸プールから、タンパク質合成が行われる。また、タンパク質合成以外の生理活性物質の合成材料や、エネルギーとしてのアミノ酸の利用も血中遊離アミノ酸プールを介して行われる[6]。このため血中遊離アミノ酸をモニタリングすることは、様々な要因の影響を受け代謝要求量に変化した最終的な結果をある程度の精度で捉えることが可能である(図 1)。乳幼児期の低栄養状態の子供という複雑に代謝要求量に変化している場合でも、タンパク質・アミノ酸栄養補給による介入後の血中遊離アミノ酸のモニタリングによって代謝要求量が満たされたのかをある程度検証することも可能である。

そこで、本章では、ガーナで実施した有効性試験において血中アミノ酸濃度析がどのよ

うに推移したか解析し乳幼児期の低栄養状態の子供に対して **KP** のアミノ酸組成に基づく栄養補給がどのような影響をもたらしたか考察することを目的とした。特にタンパク質栄養の質改善の目的として **KP** に添加したアミノ酸であるリジン、及びタンパク質合成との関連性が報告されているロイシン、total BCAA、及び total EAA を中心に比較を行ったので報告する。

## 2. 方法

### 2.1. 試験デザイン

本試験は3群の単盲検クラスターランダム化並行群間比較試験で、生後6~18か月齢の子供を対象に、タンパク質栄養および微量栄養素のサプリメント（KOKO Plus, KP）、微量栄養素のサプリメント（micronutrient, MN）、母親への栄養教育(nutrition education, NE)による介入を行い成長に対する有効性を比較した試験で、副次的な評価項目として血中アミノ酸濃度の測定を実施した。

試験の主目的は新たに開発した乳幼児期の線形成長を改善する補完食のサプリメント KOKO Plus の有効性評価であり、別報[62]により既に有効性の報告を行っている。今回報告する、副次評価項目の血中アミノ酸濃度は、新たに開発した KOKO Plus の線形成長改善効果のメカニズムを理解する上で、KP、MN の治療介入によって“研究対象として注目したアミノ酸”の血中濃度がどのように変化したか比較することを目的としている。このため、KP による介入群は MN による介入群と比較し“研究対象として注目したアミノ酸”の血中濃度が高いという仮説を立て、介入期間の中間時点、終了時点において、有意差検定を実施した。“研究対象として注目したアミノ酸”はタンパク質栄養の質改善の目的として KP に添加したアミノ酸であるリジン、及びタンパク質合成との関連性が報告されているロイシン、total BCAA、及び total EAA を用いた。

本試験は、ClinicalTrials.gov に試験番号 NCT03181178 として登録済である。

## 2.2. 参加者

### 2.2.1. セッティング・リクルート

ガーナ中央部の3つの地区で1コミュニティの世帯数が1000世帯を超える38コミュニティで試験を実施した。当該地域は、中等度から重度の低栄養の発生率が最も高い地区である。

各コミュニティでボランティアによって実施される出産後の母子を支援するイベントに参加した0~3ヶ月齢の新生児を持つ母子をリクルートの対象とした。リクルート対象者が6ヶ月齢になった時点で介入対象者として試験に登録した。

リクルート時の選択基準は1.単胎出産でかつ母乳育児を行っている、2.両親が12ヶ月間同一のコミュニティに居住する計画がある、3.研究期間を通して参加の意思がある、4.書面によるインフォームドコンセントが取得されている、全ての条件を満たした母子とした。除外基準は、重度の貧血（血中ヘモグロビン値 < 70 g/l）または severe acute malnutrition (MUAC < 110 mm) とした[63, 64]。介入対象者は、ベースライン（介入開始時点で、介入対象者は6ヶ月齢）、ミッドポイント（介入開始6ヶ月時点で、介入対象者は12ヶ月齢）、エンドポイント（介入開始12ヶ月時で、介入対象者は18ヶ月齢）で重度の貧血と severe acute malnutrition について評価され、診断された場合はコミュニティの医療機関に紹介され、試験から除外した。

本研究の参加者リクルートは2013年2月に開始した。各介入条件による治療のフォローアップは2015年2月に終了した。

### 2.2.2. 倫理審査、同意取得

本介入研究の試験計画はガーナ保健省（Ghana Health Service）とガーナ大学野口記念医学研究所の倫理委員会にて審査を受け承認された（承認番号 NMIMR-IRB CPN 039/11-12）。本研究に関与していないガーナ大学の教員で構成されたデータ安全性モニタリング委員会

が試験の進行状況をモニタリングした。リクルート時に子供の親もしくは介護者に本研究の目的を説明し、参加者である子供の診療情報が研究目的で使用されることについて書面で同意を取得した。本試験では中間解析は計画しなかった。また、試験期間を通して重篤な副作用は検出されず、研究を中断する深刻な理由は発生しなかった。

## 2.3. 介入

### 2.3.1. 補完食サプリメントの栄養組成

KP、MN の両サプリメントは、1 日 1 袋を補完食に添加して使用することを想定して設計した。KP 1 袋の栄養組成は WHO 補完食ガイドラインで定められた標準的な母乳育児を行った場合の生後 6-18 ヶ月の子供が補完食から摂取すべき栄養を参考に[65]、補完食に koko を用いた場合に不足する栄養素を計算し決定した。KP 1 袋には WHO 補完食ガイドラインで推奨される 1 日当たりのエネルギーの 30%、総タンパク質の 60%、総アミノ酸の 35～55%、総脂肪の 40%、及びユニセフにより推奨される 1 日当たりの微量栄養素摂取量の 50～150%が含まれる[66]。MN 組成は KP の微量栄養素組成と同様である。本試験で用いた KP と MN の配合と栄養素組成を表 23、表 24 に示す。

koko を補完食として用いた場合、アミノ酸組成は極端にリジンが不足しており、PDCASS から利用可能なタンパク質量を計算すると、標準的な摂取量において koko 中の利用可能タンパク質量は 2.1g（総タンパク質は 4.5g）と WHO 補完食ガイドライン推奨値の 49.4%である。一方標準的な KP 使用状況では補完食中の利用可能タンパク質量は 4.7g（総タンパク質は 7.5g）と WHO 補完食ガイドライン推奨値の 110.6%である(表 25)。

表 23 サプリメントの配合

Ingredients	KOKO Plus (KP)		Micronutrient (MN)	
	Amount (g per sachet)	w/w (%)	Amount (g per sachet)	w/w (%)
Soyabeans	7.31	48.8		
Palm oil	0.98	6.5		
Sugar	5.6	37.3		
Lysine	0.11	0.75		
Micronutrient premix	1	6.7	1	100
Total	15	100	1	100

表 24 KOKO Plus の栄養組成

Components	KP amount per sachet 15g			
	Amount	w/w (%)		RNI* % Met
Total energy (kcal)	66.5			220 30
Protein (g)	2.9	19		
Utilisable protein <sup>1</sup> (g)	2.6	17		4.25 62
Carbohydrate (g)	8	53		
Fat (g)	2.6	17		6.4 41
PUFA				
n-6	0.9	12		
n-3	0.1	2		
Proportion of n-6 to n-3		8.12		
Micronutrient <sup>2</sup> (g)	0.5	3.3		
<b>1 Utilisable protein Amino acid composition</b>	<b>Amount</b>	<b>mg/g Utilisable protein (%)</b>	<b>Amino acid score</b>	<b>RNI* % Met</b>
Tryptophan (g)	0.04	16.2	2.19	0.08 54
Threonine (g)	0.13	48.4	1.79	0.29 45
Isoleucine (g)	0.14	54.01	1.74	0.32 45
Leucine (g)	0.24	90.68	1.44	0.64 38
Lysine (g) (with added lysine)	0.31	116.59	2.24	0.55 56
Sulfur amino acids (methionine + cysteine)	0.09	32.94	1.27	0.27 33
Histidine (g)	0.08	30.06	1.67	0.19 43
Valine (g)	0.15	55.6	1.32	0.43 35
<b>2 Micronutrient composition<sup>†</sup></b>	<b>Amount</b>			<b>RNI* % Met</b>
Vitamin A (µg retinol equivalents)	200.1			400 50
Folic acid (µg)	45			90 50
Niacin (mg)	3.1			6 52
Riboflavin (mg)	0.3			0.5 63
Thiamin (mg)	0.3			0.5 63
Vitamin B6 (mg)	0.3			0.5 56
Vitamin B12 (µg)	0.5			0.9 50
Vitamin C (mg)	30.4			30 101
Ca (mg)	220.3			500 44
Fe (mg)	7			11.6 60
P (mg)	154.5			100 154
Zn (mg)	2.4			4.1 59
Choline (mg)	62.5			45.9 136
Vitamin D (µg)	2.5			5 50
Vitamin E (mg)	2.7			5 54
Iodide (mg)	0			0.1 50
Vitamin K (µg)	11			15 73

\* recommended nutrient intakes (RNI) はWHOが定めた6-24ヶ月齢におけるの補完食からの1日の摂取推奨値を使用

† Micronutrientの栄養組成と同じ

表 25 KOKO Plus の標準的な使用状況でのタンパク質栄養の改善の見積もり

Ingredients	koko		Cereal + KP		
	Amount	Amount	Amount	Amount	
Cereal (g)	48		48		
Sugar (g)	12				
KP (g)			15		
Components	RNI*	Amount	% Met	Amount	% Met
Protein (g)		4.5		7.5	
Utilizable protein (g)	4.25	2.1	49.4	4.7	110.6

\*RNI はWHOが定めた6-24ヶ月齢における補完食からの1日の摂取推奨値を使用

### 2.3.2. 治療介入

治療介入はガーナ大学が統括して実施した。介入期間は12ヶ月間とし、参加者が生後6ヶ月になった時点で介入を開始し、生後18ヶ月の時点で介入を終了した。試験期間中のコンタミネーションを防ぐために、コミュニティーごとに同一の介入条件（クラスターランダムイズ）で実施した。

KP、MN 群のサプリメントは、それぞれ割り当てられたコミュニティーの母親に1週間ごとに7袋配布し、毎日1袋ずつ消費するように指示した。使用量の確認は毎週使用済の空袋を回収することで実施した。配布は現地のNGOと各コミュニティーの健康ボランティアで実施した。NGOのサプリメント配布チームが1週間ごとに各コミュニティーを訪問し、各コミュニティーの健康ボランティアに必要な分のサプリメントを配布し、健康ボランティアから母親に配布した。

NE 群の教育コンテンツは2009年から2013年に実施された米国国際開発庁の行動変容プロジェクトである“GoodLife Campaign”から栄養に関する項目を選択して採用した。

## 2.4. アウトカム

### 2.4.1. 血液標本の採取

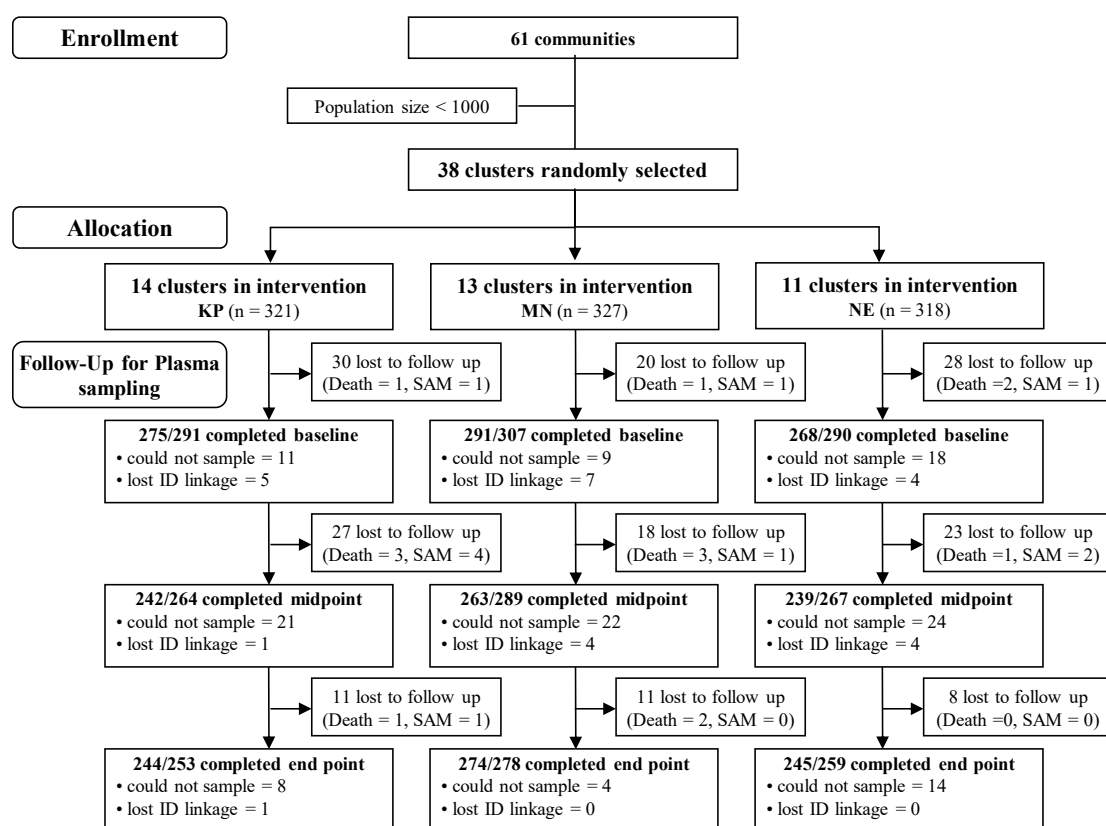
採血はベースライン（6ヶ月齢）、ミッドポイント（12ヶ月齢）、エンドポイント（18ヶ月齢）の3回で、いずれも午前中の時間帯に実施したが倫理的な観点から採血前の絶食は指示していない。最後の授乳または食事から採血時点まで間隔は採血時にヒアリングを行い記録した。採血した参加者の研究フロー及びフォローアップ期間中の脱落数と脱落理由の内訳を図 13 に示す。

十分な訓練を受けた小児領域の Phlebotomist が静脈から血液標本の採取を行った。アミノ酸濃度測定用の血液標本は、採血管内でエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 2 水和物（CAS : 6381-92-6）と転倒混和したのちに、速やかにキューブクーラー（フォルテ グロウメディカル）で 4°C に冷却した。IGF-1、コルチゾール測定用の血液標本は室温で 30 分間静置した後に 3,000×g、25° C で 15 分間遠心分離し血清をエッペンドルフチューブに分注し 4°C に冷却した。いずれの血液標本も 5 時間以内に現地のセントラルラボに輸送した。

IGF-1、コルチゾール測定用の血液標本はセントラルラボに到着後凍結融解を防ぐため分注され測定まで -30°C で保管した。

アミノ酸濃度測定用の血液標本はセントラルラボに到着次第速やかに徐タンパクの操作を行った。3,000×g、4° C で 14 分間遠心分離し、血漿をエッペンドルフチューブに分注した。調整した 5% (w/w) トリクロロ酢酸を 2 倍量混合し、遠心分離（4°C、20 分、8000×g）により除タンパクを行った。除タンパクした血漿標本は分析のために日本に輸送するまで -80°C のディープフリーザーで保管した。血漿標本の日本への輸送はクーラーボックスにドライアイスを入れ凍結状態を維持しながら行った。輸送中の標本の温度変化のログを取り -80°C 以上に温度が上昇しなかったことを確認した。

図 13 採血した参加者のフローチャート



## 2.4.2. 血液標本の測定

### アミノ酸濃度測定

アミノ酸の濃度は自動アミノ酸分析装置 (L-8800;日立ハイテクノロジーズ) を用いてポストカラムニンヒドリン法により測定した。分析カラムには陽イオン交換樹脂カラム (#2622PF; 4.6 mm I.D x 60 mm, 粒径 3  $\mu\text{m}$ , 日立ハイテクノロジーズ) を使用し、移動相はクエン酸ナトリウム緩衝液とクエン酸リチウム緩衝液 (富士フィルム和光純薬) のグラジエントとした。分離後、反応温度 135°C でニンヒドリン試薬 (富士フィルム和光純薬) と反応させ、可視光波長 570 nm で吸光度検出により測定を行った[35]。

検量線用標準物質としてアミノ酸混合標準液 (富士フィルム和光純薬)、アスパラギン一水和物 (富士フィルム和光純薬)、グルタミン (富士フィルム和光純薬)、トリプトファン

(富士フィルム和光純薬) 混合溶液を使用し血漿標本と同様に測定を行った。

総分枝鎖アミノ酸 (total BCAA; ロイシン、バリン、イソロイシン) と総必須アミノ酸 (total EAA; メチオニン、ロイシン、バリン、イソロイシン、リジン、フェニルアラニン、トリプトファン、スレオニン、ヒスチジン) の濃度は、それぞれ total BCAA、total EAA に分類される個別のアミノ酸濃度を合計することで算出した。断りが無い場合アミノ酸濃度は  $\mu\text{mol/L}$  ( $\mu\text{M}$ ) 単位で表す。Fischer 比は単位血漿中の total BCAA( $\mu\text{mol}$ )とチロシン・フェニルアラニン( $\mu\text{mol}$ )のモル比 (BCAA / チロシン・フェニルアラニン) から計算した。

サンプルは、日本のラボに到着したバッチごとに分析を行った。分析は 2014 年 9 月に開始し、2015 年 11 月に完了した。

#### **IGF-1、コルチゾール濃度測定**

血清中の IGF-1、コルチゾール濃度は ELISA キット(DRG 社)を用いガーナのセントラルラボで実施した。

## 2.5. 症例数

必要症例数は、研究対象として特に注目したリジン、ロイシン、total BCAA、total EAAの血中濃度について治療グループ間の濃度の差が5%以上あった場合に検出可能な例数から計算した。

途上国の子供で測定された血中アミノ酸濃度の値[67]から5%変化の値（表26②）とSigmaを決定し、検出するために必要なサンプルサイズを第一種の過誤確率( $\alpha$ )を5%、検出力( $1 - \beta$ )が90%となるよう以下の式[37]を用いて計算した（表26④必要症例数）。

$$n = 2f(\alpha, \beta) \times \frac{\text{Sigma}^2}{\text{Margin}^2}$$

$$f(\alpha, \beta) = [\Phi_{\alpha}^{-1} + \Phi_{\beta}^{-1}]^2$$

ただし、 $\Phi^{-1}$ は標準正規分布の累積密度関数

1クラスターあたりの参加者を23人、クラスター内相関係数0.03と仮定するとクラスターランダム化試験のデザインエフェクトは1.66と見積もった。脱落率を15%と想定し、1群あたりの必要リクルート数を計算したところ最も必要例数が多いリジンは262人と計算された（表26⑦）。

表26 必要症例数の計算

研究対象として注目した血中アミノ酸	① 血中アミノ濃度平均値 <sup>1</sup> [uM]	② 検出したい群間の差 [%]	③ = (①×②) 検出したい群間の差 [uM]	Sigma <sup>1</sup>	Alpha [%]	Power [%]	④ 必要症例数 <sup>2</sup> [人/群]	⑤ デザインエフェクト <sup>3</sup>	⑥ 想定脱落率 [%]	⑦=④×⑤ / {(100-⑥)/100} 必要リクルート数 <sup>4</sup> [人/群]
Lys	125.6	5	6.3	15.8	5	90	134	1.66	15	262
Leu	115.3	5	5.8	11.9	5	90	90	1.66	15	176
total BCAA	380.0	5	19.0	32.7	5	90	63	1.66	15	123
total EAA	857.2	5	42.9	44.3	5	90	23	1.66	15	45

1 CYRIL O. ENWONWU et al., Am. J. Trop. Med. Hyg., 60(2), 1999の血中アミノ酸値から集計

2 設定したAlpha、Powerで検定を実施するために必要となる1群当たりの症例数

3 1クラスターあたりの参加者を23人、クラスター内相関係数0.03と仮定した場合のクラスターランダム化試験のデザインエフェクト

4 デザインエフェクト、脱落率を考慮した1群当たりの必要リクルート数

本研究は、1群あたり約300のサンプルサイズを必要とする主要評価項目の評価試験

[62]の一部として計画されており、副次評価項目であるの血中アミノ酸濃度分析のために必要な最小例数が確保されていた。

## 2.6. ランダム化

ガーナ中央部地域で 1 コミュニティーの世帯数が 1000 世帯を超える 39 コミュニティーに対し Microsoft Excel のランダム番号関数 (RAND) を用いてブロックランダム化により介入条件の割り付けを行った。ブロックランダム化時のブロックサイズは 4 とした。

試験期間中に各コミュニティが均一な性質で保たれているかモニタリングを実施し最終的に KP 群のコミュニティの 1 つを 2 つの異なるコミュニティとして分割し、NE 群の 4 つのコミュニティを 2 つに統合した。このため、介入試験を実施したコミュニティの総数は最終的に 39 から 38 に修正された。内訳は、KP 介入群が 14 コミュニティー、MN 介入群が 13 コミュニティー、NE 介入群が 11 コミュニティーであった。

## 2.7. 統計解析

### 2.7.1. 背景情報の解析

連続値の場合は平均±SD または標準誤差 (SE)、二値データの場合は比率、95%信頼区間 (CI) で表記した。背景情報の群間比較は、連続値の場合はテューキーの多重比較検定、確率の場合はフィッシャーの直接確率検定を使用した。

### 2.7.2. 介入が血中指標に与えた影響の解析

クラスターランダム化試験の試験デザインの特性上、参加者が38のコミュニティにネストされたデータ構造となっている。このため、介入による影響を正しく評価するためにマルチレベルのデータ構造に対応した線形混合モデルを用いて解析を実施した。解析に用いたモデルは、血中指標を目的変数とし、説明変数は介入条件、採血時点およびそれらの相互作用とした。さらに、ベースラインの値を共変量としてモデルに加え調整を行い、変量効果としてランダム切片にクラスター(38のコミュニティ)を指定した。ランダム傾き(random slope)は指定しなかった。最終的に以下のモデル式を解析に用いた。

$$Y_{ijkl} = \beta_{0k} + \beta_1 * T_{il} + \beta_2 * S_{jl} + \beta_3 * TS_{ijl} + \beta_4 * b_l + R_{ijkl}$$

$$\beta_{0k} = r_{00} + U_{0k}$$

$Y_{ijkl}$  介入条件 i、採血時点 j におけるコミュニティ k の個人 l の血中指標の値

$\beta_{1-4}$  各説明変数の係数

$T_{il}$  介入条件 i、個人 l の説明変数(カテゴリー: KP、MN、NE)

$S_{jl}$  採血時点 j、個人 l の説明変数(カテゴリー: ベースライン(B)、ミッドポイント(M)、エンドポイント(E))

$TS_{ijl}$  介入条件 i、採血時点 j 相互作用の個人 l の説明変数 (カテゴリー: 介入条件 i と採血時点 j の組み合わせ)

$b_l$  個人 l のベースライン時点の血中指標の値

$R_{ijkl}$  介入条件  $i$ 、採血時点  $j$  のコミュニティ  $k$ 、個人  $l$  の個人特有の誤差項

$\beta_{0k}$  コミュニティ  $k$  におけるコミュニティ特有の切片

$r_{00}$  全コミュニティの平均切片

$U_{0k}$  コミュニティ  $k$  における  $r_{00}$  からの逸脱

各血中指標データに対して制限付き最尤法によりモデル式のパラメータ ( $\beta$ ) を決定した。パラメータの計算には R の lme4 (ver.1.1.13) パッケージを使用した[42]。制限付き最尤法により決定した係数は、血中指標の推定値計算、及び介入条件間の差の検定に使用した。

モデルにより推定したパラメータを用いて、各介入条件 (KP、MN、NE) 間の血中指標に与える影響に差はないという(帰無)仮説の検定を行った。同一の評価項目に対し、検定の多重性を考慮し  $p$  値を調整した。検定には R の multcomp (バージョン 1.4.6) パッケージを使用した[43]。

### 2.7.3. サプリメントの使用量と血中アミノ酸濃度、HAZ との関係の推定

本研究では、KP、MN の介入群ともに 1 日 1 袋を使用するという条件で介入が実施されていた。しかし試験終了後報告されたサプリメントの使用率は想定外の要因によって低いものだった。そこで試験終了後に計画された追加解析としてサプリメントの使用量と血中アミノ酸濃度の関係を回帰モデルから推定し、サプリメントの使用量が 100 袋/年、200 袋/年、300 袋/年だった場合の KP 群と MN 群の血中アミノ酸濃度を推定し比較した。推定した血中アミノ酸濃度は“研究対象として注目したアミノ酸”のリジン、ロイシン、total BCAA、及び total EAA とした。

回帰に用いたモデルは、血中アミノ酸濃度を目的変数とし、説明変数は介入条件、採血時点、サプリメント使用量、およびそれらの相互作用とした。さらに、ベースラインの値を共変量としてモデルに加え調整を行い、変量効果としてランダム切片にクラスター(38 のコ

コミュニティ)を指定した。ランダム傾き (random slope) は指定しなかった。最終的に以下のモデル式を回帰モデルの計算に用いた。

$$Y_{ijmkl} = \beta_{0k} + \beta_1 * T_{il} + \beta_2 * S_{jl} + \beta_3 * C_{ml} + \beta_4 * TS_{ijl} + \beta_5 * TC_{iml} + \beta_6 * SC_{jml} + \beta_7 * TSC_{ijml} + \beta_8 * b_l + R_{ijmkl}$$

$$\beta_{0k} = r_{00} + U_{0k}$$

$Y_{ijmkl}$  介入条件 i、採血時点 j、サプリメント使用量 m におけるコミュニティ k の個人 1 の血中アミノ酸濃度

$\beta_{1-8}$  各説明変数の係数

$T_{il}$  介入条件 i、個人 1 の説明変数(カテゴリー: KP、MN、NE)

$S_{jl}$  採血時点 j、個人 1 の説明変数(カテゴリー: ベースライン(B)、ミッドポイント(M)、エンドポイント(E))

$C_{ml}$  サプリメント使用量 m、個人 1 の説明変数(連続値: 0~365)

$TS_{ijl}$  介入条件 i、採血時点 j 交互作用の個人 1 の説明変数 (カテゴリー: 介入条件 i と採血時点 j の組み合わせ)

$TC_{iml}$  介入条件 i、サプリメント使用量 m 交互作用の個人 1 の説明変数 (介入条件 i とサプリメント使用量 m の組み合わせ)

$SC_{jml}$  採血時点 j、サプリメント使用量 m 交互作用の個人 1 の説明変数 (採血時点 j とサプリメント使用量 m の組み合わせ)

$TSC_{ijml}$  介入条件 i、採血時点 j、サプリメント使用量 m 交互作用の個人 1 の説明変数 (介入条件 i と採血時点 j とサプリメント使用量 m の組み合わせ)

$b_l$  個人 1 のベースライン時点の血中アミノ酸濃度

$R_{ijmkl}$  介入条件 i、採血時点 j、サプリメント使用量 m のコミュニティ k、個人 1 の

個人特有の誤差項

$\beta_{0k}$  コミュニティー k におけるコミュニティー特有の切片

$r_{00}$  全コミュニティーの平均切片

$U_{0k}$  コミュニティー k における  $r_{00}$  からの逸脱

各血中アミノ酸濃度データに対して制限付き最尤法によりモデル式のパラメータ( $\beta$ )を決定した。パラメータの計算には R の lme4 (ver.1.1.13) パッケージを使用した[42]。制限付き最尤法により決定した係数からサプリメントの使用量が 100 袋/年、200 袋/年、300 袋/年だった場合の KP 群と MN 群の血中アミノ酸濃度を推定し、介入条件間の差の検定を実施した。検定には R の multcomp (バージョン 1.4.6) パッケージを使用した[43]。

サプリメントの使用量と HAZ の関連についても同様の方法で推定を実施した。

#### 2.7.4. 血中アミノ酸濃度と成長指標の変化量（エンドポイント-ベースライン）の相関

追加解析として、介入条件に関わらず血中アミノ酸濃度の変化と成長指標の変化の関連を確認する目的で、ベースラインからエンドポイントまでの血中アミノ酸濃度の変化量と成長指標の変化量を用いて相関係数（ピアソンの積率相関係数）を計算した。なお本試験はクラスターランダムイズデザインのため、コミュニティー内相関による相関関係の過大評価を防ぐため、相関係数の算出にはベースラインからエンドポイントまでの参加者の変化の実測値のコミュニティー平均を用いた。計算対象は、研究対象として注目したアミノ酸、リジン、ロイシン、total BCAA、total EAA 及び、成長指標は HAZ、IGF-1、コルチゾールとした。

$\mathbf{x}$  血中アミノ酸濃度の変化の各コミュニティー平均を  $(x_1, \dots, x_{38})$ 、 $\mathbf{y}$  成長指標の変化の各コミュニティー平均を  $(y_1, \dots, y_{38})$  とした場合の積率相関係数は下記式で計算される。

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}, \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

### 2.7.5. ソフトウェア

解析及び図表作成は R ver. 3.5.3 (R Foundation for Statistics Computing)、GraphPad Prism v8.4.3 (GraphPad Software Inc.)、および Excel 365 (Microsoft) で実施した。

### 3. 結果

#### 3.1. 背景情報

表 27 に採血を行った参加者のベースライン時点での背景情報を示す。ベースライン時点ではいずれの項目に関してもグループ間に有意な差は認められなかった。

表 27 背景情報

variables	KP	MN	NE
Participants, n	275	291	268
Male sex, n	139 ( 50.5% )	139 ( 47.8% )	136 ( 50.7% )
Age, mo	6.1 ± 0.6	6.2 ± 0.5	6.2 ± 0.7
Anthropometric markers			
Height, cm	65.1 ± 2.7	65.2 ± 2.5	65.5 ± 2.6
Weight, kg	7.1 ± 1.0	7.1 ± 1.0	7.2 ± 1.0
MUAC, cm	14.0 ± 1.2	14.0 ± 1.1	14.1 ± 1.1
Height-for-age z score	-0.76 ± 1.03	-0.74 ± 0.96	-0.65 ± 1.08
Weight-for-age z score	-0.72 ± 1.16	-0.69 ± 1.09	-0.67 ± 1.11
Biochemical markers			
Ferritin, µg/l	49.3 ± 50.4	49.5 ± 47.0	44.2 ± 47.5
Hemoglobin, g/l	113.3 ± 25.4	113.8 ± 20.8	113.1 ± 21.8
Inflammation markers			
C-reactive protein, mg/l	3.8 ± 10.4	3.2 ± 7.0	3.2 ± 6.9
α1-acid glycoprotein, g/l	0.89 ± 0.69	0.91 ± 0.57	0.92 ± 0.65

n (%) または mean ± SD で記載

#### 3.2. コンプライアンス

表 28 に実際に配送された KP、MN サプリメントの数と、参加者のサプリメント使用率を示す。本研究では、KP、MN の介入群ともに 1 日 1 袋を使用するという条件で介入が実施されており、試験期間を通じて 365 袋が配送される計画となっていた。しかし実際の試験では物流上の問題から各コミュニティには平均 225 袋しか配送されなかった。実際に配送されたサプリメントにおける使用率は KP 群で 86.2% (196 袋)、と MN 群で 88.4% (202 袋) と良好だった。

表 28 サプリメントの配送数と使用率

	KP				MN			
	Mean	SD	Median	%	Mean	SD	Median	%
被験者に配送されたサプリメントの数 (袋)	225.1	77.6	238	–	225.9	79.5	231	–
試験計画(365袋)中の配送されたサプリメントの割合 (%)	–	–	65.2	61.7	–	–	63.3	61.9
被験者のサプリメントの使用数 (袋)	196.1	81.9	207	–	201.9	81.7	201	–
実際に配送されたサプリメントの使用率 (%)	–	–	93.3	86.2	–	–	93.6	88.4

### 3.3. 血中アミノ酸濃度

表 29 にベースライン時点（生後 6 ヶ月齢）での血中アミノ酸濃度の混合モデルによる推定値、及びフィッシャー比(F-ratio)を示す。研究対象として注目したアミノ酸（リジン、ロイシン、total BCAA、total EAA）を含むすべてのアミノ酸で各群（KP、MN、およびNE）間に差は認められなかった。このため、適切なランダム化が実施されていたこと、血中アミノ酸濃度について介入群間での比較可能性が担保されていることが確認された。

表 30 にミッドポイント（介入開始から 6 ヶ月時点、生後 12 ヶ月齢）における血中アミノ酸濃度の混合モデルによる推定値、及びフィッシャー比を示す。研究対象として注目したアミノ酸のうち、血中リジン濃度は KP 群で MN 群に対し有意（ $p=0.004$ ）に上昇し、NE 群に対しては上昇傾向（ $p=0.07$ ）が認められた。KP 群の血中ロイシン、total BCAA、total EAA 濃度は MN 群に対して有意な上昇（全て  $p<0.0001$ ）が認められた一方で NE 群に対しては有意な差は認められなかった。

表 31 にエンドポイント（介入開始から 12 ヶ月時点、生後 18 ヶ月齢）における血中アミノ酸濃度の混合モデルによる推定値、及びフィッシャー比を示す。研究対象として注目したアミノ酸のうち、血中リジン濃度は KP 群と MN 群間、KP 群と NE 群間に有意な差は認められなかった。KP 群の血中ロイシン、total BCAA、total EAA 濃度は MN 群に対して有意な上昇（ロイシン  $p=0.005$ 、total BCAA  $p=0.003$ 、total EAA  $p=0.02$ ）が認められた一方で NE 群に対しては有意な差は認められなかった。

表 29 血中アミノ酸濃度 (ベースライン)

		Baseline						
		Concentration <sup>1</sup>			Adj.p <sup>2</sup>			
Amino acids		KP	MN	NE	KP vs MN	KP vs NE	MN vs NE	
EAA	Lys	119.5 ± 2.0	121.4 ± 2.0	120.7 ± 2.1	1	1	1	
	Leu	85.9 ± 1.4	87.2 ± 1.4	87.8 ± 1.5	1	1	1	
	Val	133.0 ± 2.1	134.5 ± 2.1	135.8 ± 2.2	1	1	1	
	Ile	46.5 ± 0.8	47.4 ± 0.7	47.8 ± 0.8	1	0.72	1	
	Phe	36.9 ± 0.7	37.2 ± 0.7	37.5 ± 0.8	1	1	1	
	Trp	34.0 ± 0.8	35.3 ± 0.7	34.2 ± 0.8	0.6	1	0.88	
	Thr	100.7 ± 1.8	99.9 ± 1.8	101.4 ± 1.9	1	1	1	
	His	59.2 ± 0.8	60.1 ± 0.8	59.7 ± 0.8	1	1	1	
	Met	17.6 ± 0.3	17.8 ± 0.3	17.5 ± 0.3	1	1	1	
NEAA	Ala	324.7 ± 6.0	325.6 ± 5.9	321.8 ± 6.2	1	1	1	
	Arg	70.1 ± 1.3	70.9 ± 1.2	70.5 ± 1.3	1	1	1	
	Asp	7.1 ± 0.2	7.3 ± 0.2	7.0 ± 0.2	1	1	1	
	Asn	44.5 ± 0.7	44.7 ± 0.7	45.2 ± 0.7	1	1	1	
	Glu	77.5 ± 1.1	78.8 ± 1.1	77.9 ± 1.1	1	1	1	
	Gln	671.1 ± 6.8	674.9 ± 6.6	665.8 ± 6.9	1	1	1	
	Pro	194.3 ± 2.8	194.0 ± 2.7	192.9 ± 2.8	1	1	1	
	Tyr	64.0 ± 0.9	64.5 ± 0.9	64.6 ± 0.9	1	1	1	
	Gly	167.5 ± 2.7	167.4 ± 2.6	166.6 ± 2.8	1	1	1	
	Ser	131.4 ± 1.6	131.3 ± 1.5	131.8 ± 1.6	1	1	1	
	Cys2	33.5 ± 0.4	33.6 ± 0.4	33.4 ± 0.4	1	1	1	
	total BCAA	265.5 ± 4.0	269.2 ± 3.9	271.5 ± 4.1	1	0.89	1	
total EAA	633.5 ± 8.1	641.0 ± 7.9	642.7 ± 8.3	1	1	1		
total NEAA	1786.5 ± 17.9	1792.6 ± 17.5	1776.9 ± 18.2	1	1	1		
F-ratio	2.66 ± 0.02	2.67 ± 0.02	2.68 ± 0.02	1	1	1		

1. mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てμmol/L, 線形混合モデルによる推定値

2. H<sub>0</sub>: 群間の差=0 に対する仮説検定のp値

(同一評価項目での検定の繰り返しについてボンフェローニ法で調整)

表 30 血中アミノ酸濃度 (ミッドポイント)

Amino acids	Midpoint									
	Concentration <sup>1</sup>						Adj.p <sup>2</sup>			
	KP		MN		NE		KP vs MN	KP vs NE	MN vs NE	
EAA	Lys	121.5	± 2.2	111.8	± 2.1	114.4	± 2.3	<b>0.004</b>	0.07	1
	Leu	88.4	± 1.5	79.3	± 1.5	87.3	± 1.6	<b>&lt;0.001</b>	1	<b>&lt;0.001</b>
	Val	145.8	± 2.2	134.5	± 2.2	142.8	± 2.3	<b>&lt;0.001</b>	1	<b>0.03</b>
	Ile	49.4	± 0.8	43.5	± 0.8	47.2	± 0.8	<b>&lt;0.001</b>	0.18	<b>0.004</b>
	Phe	45.7	± 0.8	43.6	± 0.8	45.0	± 0.8	0.16	1	0.67
	Trp	40.4	± 0.8	36.9	± 0.8	37.5	± 0.8	<b>0.006</b>	<b>0.04</b>	1
	Thr	87.1	± 2.0	77.9	± 1.9	85.1	± 2.0	<b>0.002</b>	1	<b>0.03</b>
	His	66.7	± 0.9	61.7	± 0.8	64.3	± 0.9	<b>&lt;0.001</b>	0.15	0.11
	Met	18.4	± 0.3	17.0	± 0.3	18.1	± 0.3	<b>0.004</b>	1	<b>0.04</b>
NEAA	Ala	375.8	± 6.6	362.7	± 6.3	366.0	± 6.7	0.45	0.89	1
	Arg	75.8	± 1.4	70.8	± 1.3	72.9	± 1.4	<b>0.03</b>	0.41	0.83
	Asp	8.0	± 0.2	7.7	± 0.2	7.9	± 0.2	1	1	1
	Asn	51.5	± 0.7	47.0	± 0.7	50.4	± 0.8	<b>&lt;0.001</b>	0.81	<b>0.003</b>
	Glu	85.6	± 1.2	82.1	± 1.1	82.4	± 1.2	0.10	0.18	1
	Gln	671.4	± 7.4	634.1	± 7.1	660.8	± 7.5	<b>&lt;0.001</b>	0.95	<b>0.03</b>
	Pro	214.3	± 3.0	198.9	± 2.9	207.2	± 3.0	<b>&lt;0.001</b>	0.29	0.14
	Tyr	62.8	± 1.0	59.5	± 0.9	62.5	± 1.0	<b>0.04</b>	1	0.07
	Gly	202.1	± 2.9	194.5	± 2.8	197.2	± 3.0	0.18	0.72	1
	Ser	141.9	± 1.7	131.3	± 1.6	138.8	± 1.7	<b>&lt;0.001</b>	0.62	<b>0.005</b>
	Cys2	32.0	± 0.4	31.2	± 0.4	31.7	± 0.4	0.46	1	1
total BCAA		283.7	± 4.3	257.2	± 4.2	277.4	± 4.4	<b>&lt;0.001</b>	0.92	<b>0.003</b>
total EAA		664.3	± 8.8	606.6	± 8.5	643.3	± 9.1	<b>&lt;0.001</b>	0.29	<b>0.009</b>
total NEAA		1921.7	± 19.5	1819.8	± 18.7	1877.2	± 19.7	<b>&lt;0.001</b>	0.33	0.10
F-ratio		2.63	± 0.03	2.52	± 0.02	2.60	± 0.03	<b>0.006</b>	1	0.10

1. mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てμmol/L, 線形混合モデルによる推定値

2. H<sub>0</sub>: 群間の差=0 に対する仮説検定のp値

(同一評価項目での検定の繰り返しについてボンフェローニ法で調整)

表 31 血中アミノ酸濃度 (エンドポイント)

Amino acids	End point									
	Concentration <sup>1</sup>						Adj.p <sup>2</sup>			
	KP		MN		NE		KP vs MN	KP vs NE	MN vs NE	
EAA	Lys	111.8	± 2.2	107.1	± 2.1	107.8	± 2.2	0.36	0.61	1
	Leu	86.6	± 1.5	79.9	± 1.5	89.4	± 1.6	<b>0.005</b>	0.62	<b>&lt;0.001</b>
	Val	150.0	± 2.2	141.5	± 2.2	152.4	± 2.3	<b>0.02</b>	1	<b>0.002</b>
	Ile	47.6	± 0.8	43.0	± 0.8	47.2	± 0.8	<b>&lt;0.001</b>	1	<b>&lt;0.001</b>
	Phe	48.5	± 0.8	45.6	± 0.7	50.4	± 0.8	<b>0.02</b>	0.27	<b>&lt;0.001</b>
	Trp	29.3	± 0.8	27.5	± 0.8	30.3	± 0.8	0.31	1	<b>0.04</b>
	Thr	77.6	± 2.0	74.0	± 1.9	77.1	± 2.0	0.55	1	0.78
	His	63.7	± 0.9	62.3	± 0.8	64.8	± 0.9	0.656	1	0.10
	Met	17.0	± 0.3	16.6	± 0.3	17.3	± 0.3	0.99	1	0.29
NEAA	Ala	372.2	± 6.6	365.0	± 6.2	358.6	± 6.6	1	0.43	1
	Arg	75.4	± 1.4	74.3	± 1.3	73.4	± 1.4	1	0.86	1
	Asp	6.2	± 0.2	6.1	± 0.2	6.4	± 0.2	1	1	0.63
	Asn	51.0	± 0.7	49.0	± 0.7	51.9	± 0.8	0.14	1	<b>0.01</b>
	Glu	73.8	± 1.2	73.5	± 1.1	73.6	± 1.2	1	1	1
	Gln	546.6	± 7.4	537.1	± 7.0	555.8	± 7.5	1	1	0.20
	Pro	205.6	± 3.0	194.5	± 2.8	206.1	± 3.0	<b>0.02</b>	1	<b>0.02</b>
	Tyr	59.5	± 1.0	57.1	± 0.9	61.0	± 1.0	0.20	0.83	<b>0.01</b>
	Gly	212.2	± 2.9	210.4	± 2.8	215.0	± 3.0	1	1	0.77
	Ser	126.9	± 1.7	123.7	± 1.6	129.6	± 1.7	0.49	0.78	<b>0.03</b>
	Cys2	31.9	± 0.4	32.1	± 0.4	31.9	± 0.4	1	1	1
total BCAA		284.2	± 4.3	264.4	± 4.1	289.1	± 4.4	<b>0.003</b>	1	<b>&lt;0.001</b>
total EAA		631.3	± 8.8	598.6	± 8.3	639.0	± 8.9	<b>0.02</b>	1	<b>0.003</b>
total NEAA		1762.2	± 19.5	1723.6	± 18.4	1763.0	± 19.6	0.45	1	0.43
F-ratio		2.64	± 0.03	2.58	± 0.02	2.62	± 0.03	0.28	1	1

1. mean ± SE で記載, アミノ酸濃度の単位は全てµmol/L, 線形混合モデルによる推定値

2. H<sub>0</sub>: 群間の差=0 に対する仮説検定のp値

(同一評価項目での検定の繰り返しのについてボンフェローニ法で調整)

### 3.4. IGF-1 とコルチゾールの血中濃度

表 32 に各採血時点における血中の IGF-1、コルチゾール濃度の混合モデルによる推定値を示す。

エンドポイントにおける血中 IGF-1 濃度(±SE)は KP 群で 39.1±1.4 ng/ml、MN 群で 38.4±1.3 ng/ml、NE 群で 36.1±1.4 ng/ml で、点推定値は KP 群が最も高かったが、いずれの群間においても統計的に有意な差は認められなかった。

エンドポイントにおける血中コルチゾール濃度(±SE)は KP 群で 78.9±2.6 ng/ml、MN 群で 83.7±2.4 ng/ml、NE 群で 76.9±2.6 ng/ml で、点推定値は MN 群が最も高かったが、いずれの群間においても統計的に有意な差は認められなかった。

表 32 IGF-1 とコルチゾールの血中濃度

Markers	Timepoint	Concentration <sup>1</sup>			Adj.p <sup>2</sup>		
		KP	MN	NE	KP vs MN	KP vs NE	MN vs NE
IGF-1, ng/ml	Baseline	63.4 ± 1.3	61.4 ± 1.3	64.5 ± 1.3	0.79	1	0.26
	Midpoint	37.4 ± 1.4	39.1 ± 1.4	36.8 ± 1.4	1	1	0.74
	End point	39.1 ± 1.4	38.4 ± 1.3	36.1 ± 1.4	1	0.41	0.72
Cortisol, ng/ml	Baseline	65.5 ± 2.4	65.0 ± 2.3	64.7 ± 2.4	1	1	1
	Midpoint	67.3 ± 2.6	70.0 ± 2.4	66.8 ± 2.6	1	1	1
	End point	78.9 ± 2.6	83.7 ± 2.4	76.9 ± 2.6	0.52	1	0.15

1. mean ± SE で記載, 線形混合モデルによる推定値

2. H<sub>0</sub>: 群間の差=0 に対する仮説検定のp値  
(同一評価項目での検定の繰り返しについてボンフェローニ法で調整)

### 3.5. サプリメントの使用量と血中アミノ酸濃度の関係

研究対象として注目したアミノ酸、リジン、ロイシン、total BCAA、total EAA に関し、制限付き最尤法により推定したモデル式に、年間のサプリメント使用量 100 袋（使用率 27.4%）、200 袋（使用率 54.8%）、300 袋（使用率 82.2%）を代入して、それぞれのサプリメントの使用量における血中アミノ酸濃度を計算した(表 33)。各結果についてのグラフ化したものを図 14（リジン: 図 14A、ロイシン: 図 14B、total BCAA: 図 14C、total EAA: 図 14D）に示す。

エンドポイントの KP 群の血中リジン濃度 ( $\pm$ SE) はサプリメント 100、200、300 袋/年の使用条件でそれぞれ  $103.5 \pm 3.3$ 、 $112 \pm 2.1$ 、 $120.5 \pm 3.4 \mu\text{M}$  であった(表 33、図 14A)。一方、MN 群の血中リジン濃度 ( $\pm$ SE) はサプリメント 100、200、300 袋/年の使用条件でそれぞれ  $108.3 \pm 3.3$ 、 $107.1 \pm 2.0$ 、 $106 \pm 3.1 \mu\text{M}$  となり、サプリメント 300 袋/年以上の使用条件で MN 群に比べ KP 群の血中リジン濃度が高値を示す可能性が示唆された(表 33、図 14A)。

エンドポイントの KP 群の血中ロイシン濃度 ( $\pm$ SE) はサプリメント 100、200、300 袋/年の使用条件でそれぞれ  $81.7 \pm 2.3$ 、 $86.7 \pm 1.5$ 、 $91.6 \pm 2.3 \mu\text{M}$  であった(表 33、図 14B)。一方、MN 群の血中ロイシン濃度 ( $\pm$ SE) はサプリメント 100、200、300 袋/年の使用条件でそれぞれ  $82.4 \pm 2.2$ 、 $80.0 \pm 1.4$ 、 $77.7 \pm 2.1 \mu\text{M}$  となり、サプリメント 200 袋/年以上の使用条件で MN 群に比べ KP 群の血中ロイシン濃度が高値を示す可能性が示唆された(表 33、図 14B)。

エンドポイントの KP 群の血中 total BCAA 濃度 ( $\pm$ SE) はサプリメント 100、200、300 袋/年の使用条件でそれぞれ  $270.2 \pm 6.4$ 、 $284.5 \pm 4.2$ 、 $298.8 \pm 6.6 \mu\text{M}$  であった(表 33、図 14C)。一方、MN 群の血中 total BCAA 濃度 ( $\pm$ SE) はサプリメント 100、200、300 袋/年の使用条件でそれぞれ  $269 \pm 6.4$ 、 $264.6 \pm 4$ 、 $260.3 \pm 6.1 \mu\text{M}$  となり、サプリメント 200 袋/年以上の使用条件で MN 群に比べ KP 群の血中 total BCAA 濃度が高値を示す可能性が示唆された(表 33、図 14C)。

エンドポイントの KP 群の血中 total EAA 濃度 ( $\pm$ SE) はサプリメント 100、200、300 袋/年の使用条件でそれぞれ  $597.1 \pm 13$ 、 $632.3 \pm 8.34$ 、 $667.6 \pm 13.4 \mu\text{M}$  であった(表 33、図 14D)。一方、MN 群の血中 total EAA 濃度 ( $\pm$ SE) はサプリメント 100、200、300 袋/年の使用条件でそれぞれ  $606.2 \pm 12.8$ 、 $599 \pm 7.8$ 、 $591.8 \pm 12.3 \mu\text{M}$  となり、サプリメント 200 袋/年以上の使用条件で MN 群に比べ KP 群の血中 total BCAA 濃度が高値を示す可能性が示唆された(表 33、図 14D)。

KP 群はサプリメントの使用量依存的に血中リジン、ロイシン、total BCAA、total EAA 濃度の増加を示した、一方 MN 群では使用量依存的な増加は認められなかった。300 袋/年以上の使用率で研究対象として注目したアミノ酸全てがエンドポイントにおいて MN 群に比べ KP 群で高値を示す可能性が示唆された(表 33)。

表 33 年間のサプリメント使用量 100 袋、200 袋、300 袋における血中アミノ酸濃度の推定値

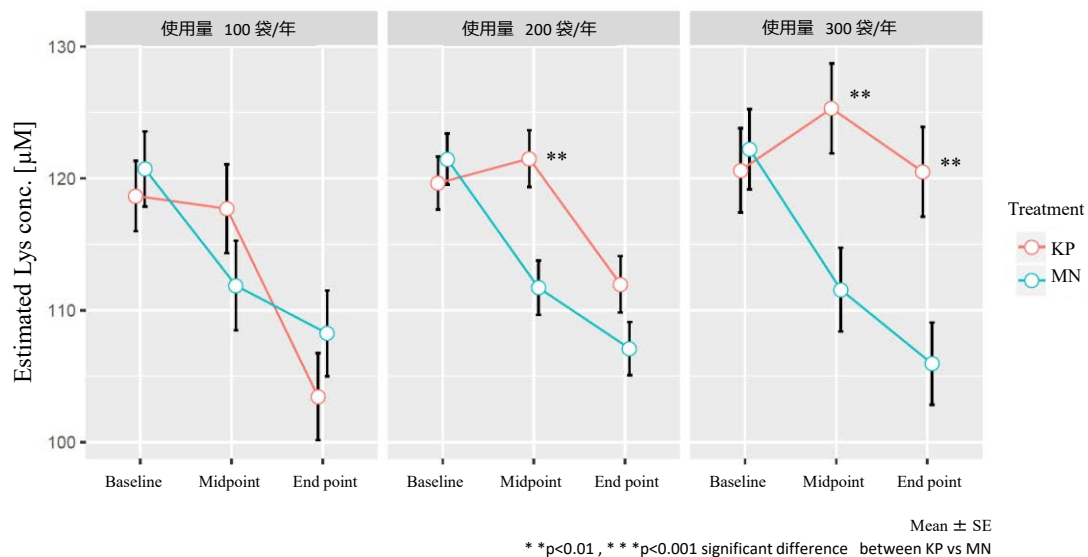
Amino acids	Supplement consumed	Compliance rate (%)	Baseline			Midpoint			End point		
			Concentration <sup>1</sup>		Adj.p <sup>2</sup>	Concentration <sup>1</sup>		Adj.p <sup>2</sup>	Concentration <sup>1</sup>		Adj.p <sup>2</sup>
			KP	MN	KP vs MN	KP	MN	KP vs MN	KP	MN	KP vs MN
Lys	100	27.4	118.7 ± 2.7	120.7 ± 2.9	1	117.7 ± 3.4	111.9 ± 3.4	0.67	103.5 ± 3.3	108.3 ± 3.3	0.90
Lys	200	54.8	119.7 ± 2.0	121.5 ± 1.9	1	121.5 ± 2.1	111.7 ± 2.1	<b>0.003</b>	112.0 ± 2.1	107.1 ± 2.0	0.29
Lys	300	82.2	120.6 ± 3.2	122.2 ± 3.0	1	125.3 ± 3.4	111.6 ± 3.2	<b>0.0094</b>	120.5 ± 3.4	106.0 ± 3.1	<b>0.0048</b>
Leu	100	27.4	85.4 ± 1.8	87.1 ± 2.0	1	84.2 ± 2.3	81.7 ± 2.3	1	81.7 ± 2.3	82.4 ± 2.2	1
Leu	200	54.8	85.9 ± 1.4	87.3 ± 1.3	1	88.4 ± 1.5	79.4 ± 1.4	< <b>0.001</b>	86.7 ± 1.5	80.0 ± 1.4	< <b>0.001</b>
Leu	300	82.2	86.5 ± 2.2	87.5 ± 2.1	1	92.6 ± 2.3	77.2 ± 2.2	< <b>0.001</b>	91.6 ± 2.3	77.7 ± 2.1	< <b>0.001</b>
total BCAA	100	27.4	264.0 ± 5.2	268.8 ± 5.6	1	274.6 ± 6.5	261.7 ± 6.6	0.500	270.2 ± 6.4	269.0 ± 6.4	1
total BCAA	200	54.8	265.6 ± 3.9	269.3 ± 3.8	1	283.6 ± 4.2	257.5 ± 4.0	< <b>0.001</b>	284.5 ± 4.2	264.6 ± 4.0	<b>0.002</b>
total BCAA	300	82.2	267.3 ± 6.2	269.9 ± 5.9	1	292.7 ± 6.6	253.3 ± 6.1	< <b>0.001</b>	298.8 ± 6.6	260.3 ± 6.1	< <b>0.001</b>
total EAA	100	27.4	629.4 ± 10.5	637.9 ± 11.1	1	644.4 ± 13.2	613.9 ± 13.3	0.31	597.1 ± 13.0	606.2 ± 12.8	1
total EAA	200	54.8	634.6 ± 7.8	641.4 ± 7.5	1	664.5 ± 8.4	607.1 ± 8.0	< <b>0.001</b>	632.3 ± 8.3	599.0 ± 7.8	<b>0.011</b>
total EAA	300	82.2	639.8 ± 12.7	644.9 ± 12.0	1	684.6 ± 13.4	600.2 ± 12.5	< <b>0.001</b>	667.6 ± 13.4	591.8 ± 12.3	< <b>0.001</b>

1. mean ± SE で記載, 単位は全て μmol/L, 推定したモデル式にサプリメント使用量(100袋、200袋、300袋)を代入して計算

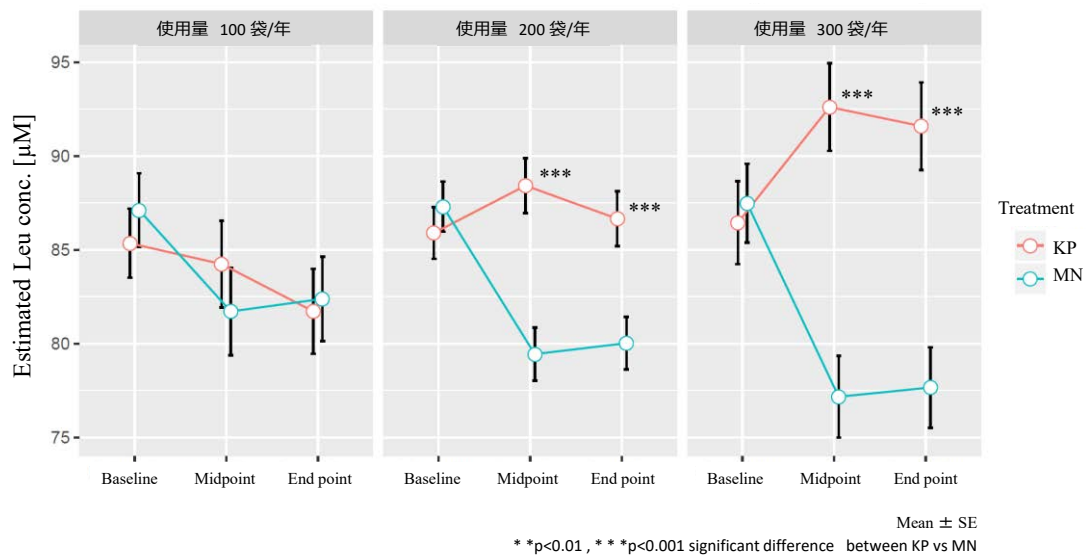
2. H<sub>0</sub>: 群間の差=0 に対する仮説検定のp値(同一評価項目での検定の繰り返しについてボンフェローニ法で調整)

図 14 年間のサプリメント使用量 100 袋、200 袋、300 袋における血中アミノ酸濃度の推定値

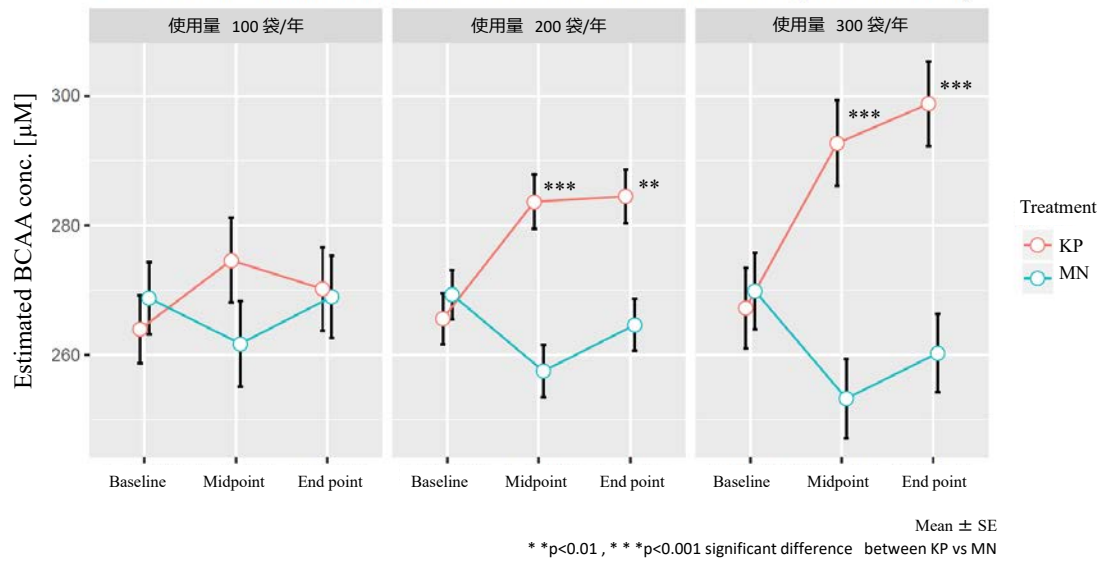
A 年間のサプリメント使用量100袋、200袋、300袋における血中リジン濃度の推定値



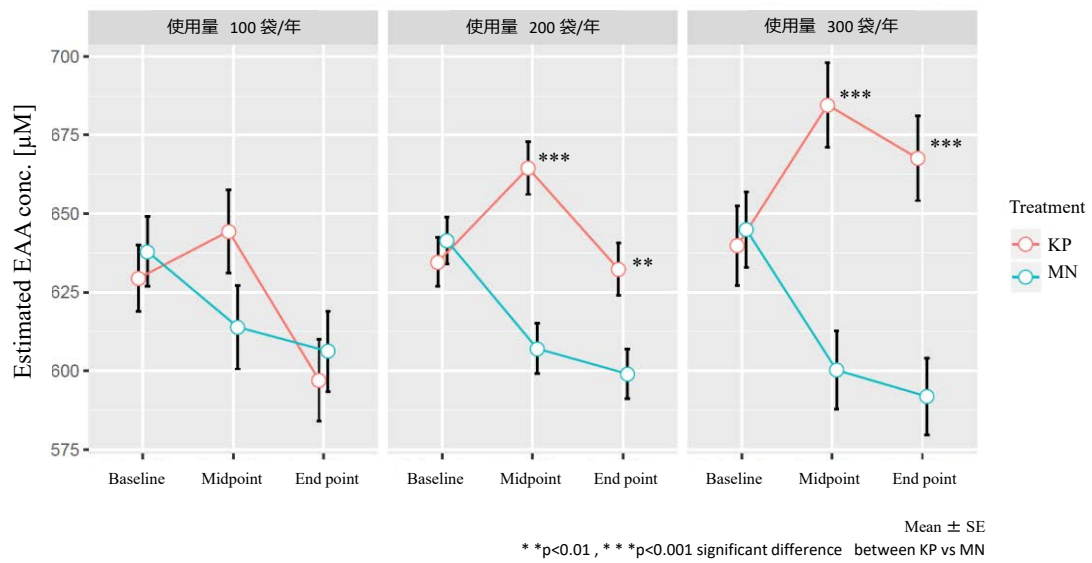
B 年間のサプリメント使用量100袋、200袋、300袋における血中ロイシン濃度の推定値



C 年間のサプリメント使用量100袋、200袋、300袋における血中総分岐鎖アミノ酸濃度の推定値



D 年間のサプリメント使用量100袋、200袋、300袋における血中総必須アミノ酸濃度の推定値



### 3.6. サプリメントの使用量と HAZ の関係

サプリメント使用量が 314 袋 (3.2. コンプライアンスの結果をもとに配送に問題が無く、年間 365 袋配送された場合に想定される年間使用量を計算) の場合において、エンドポイントの HAZ は MN 群と比べて KP 群が有意に高値を示す ( $p=0.002$ ) ことは既に Ghosh らによって報告されている[62]が、改めて本研究で測定したアミノ酸濃度との関連を考察するために Ghosh らの報告した解析対象者のうち採血を実施した参加者のみで年間のサプリメント使用量 300 袋 (使用率 82.2%) の場合の HAZ を計算した(表 34)。エンドポイントにおいて KP 群の HAZ の推定値( $\pm$ SE)は $-1.03 \pm 0.05$  であり、MN 群の HAZ の推定値  $-1.23 \pm 0.05$  に比べ有意に高値を示すことが確認された。

表 34 年間のサプリメント使用量 300 袋における HAZ の推定値

	Timepoint	KP		MN		<i>Adj.p</i> <sup>1</sup>
						KP vs MN
HAZ	Baseline	-0.71	$\pm 0.05$	-0.72	$\pm 0.05$	1
	Midpoint	-0.90	$\pm 0.05$	-1.00	$\pm 0.05$	0.37
	End point	-1.03	$\pm 0.05$	-1.23	$\pm 0.05$	<b>0.011</b>

mean  $\pm$  SE

推定したモデル式にサプリメント使用量(300袋)を代入して計算

1. ボンフェローニ法による調整済

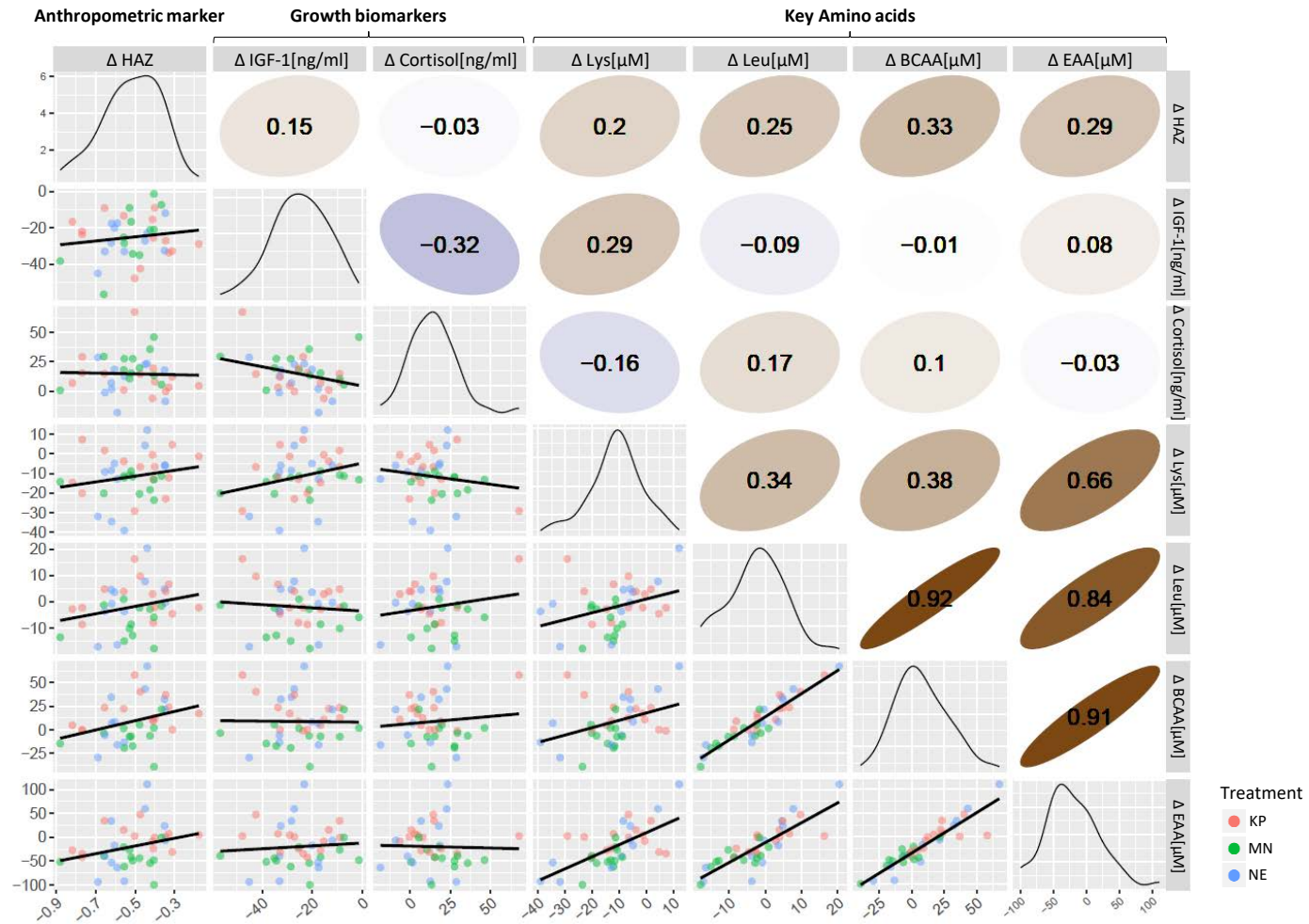
### 3.7. 血中アミノ酸濃度と成長指標の変化量(エンドポイント-ベースライン)の 相関

研究対象として注目したアミノ酸であるリジン、ロイシン、total BCAA、total EAAと、成長指標 HAZ、IGF-1、コルチゾールについてベースラインからエンドポイントまでの変化値 ( $\Delta$ ) のコミュニティ平均について散布図の描写 (図 15 左斜め下) と、ピアソンの積率相関係数の算出結果 (図 15 右斜め上)、及び各値の密度分布を示す (図 15 対角線上)。

研究対象として注目したアミノ酸間では  $\Delta$ Leu と  $\Delta$ total BCAA、 $\Delta$ Leu と  $\Delta$ total EAA、及び  $\Delta$ total BCAA と  $\Delta$ total EAA はそれぞれ相関係数が  $r=0.92$  ( $p<0.001$ )、 $r=0.84$  ( $p<0.001$ )、 $r=0.91$  ( $p<0.001$ ) と非常に強い正の相関関係が認められた。一方  $\Delta$ Lys と  $\Delta$ Leu、 $\Delta$ Lys と  $\Delta$ total BCAA はそれぞれ相関係数が  $r=0.34$  ( $p=0.039$ )、 $r=0.38$  ( $p=0.020$ ) と弱い正の相関関係を示し、 $\Delta$ Lys と  $\Delta$ total EAA は相関係数が  $r=0.66$  ( $p<0.001$ ) と正の相関関係を示した (図 15 右斜め上)。

成長指標に注目すると  $\Delta$ HAZ と  $\Delta$ total BCAA の相関係数は  $r=0.33$  ( $p=0.048$ ) と弱い正の相関関係が認められ、 $\Delta$ HAZ と  $\Delta$ total EAA  $r=0.29$  ( $p=0.078$ ) は正の相関傾向を示した。 $\Delta$ IGF-1 と  $\Delta$ Lys は相関係数  $r=0.29$  ( $p=0.078$ ) と正の相関傾向を示し、 $\Delta$ IGF-1 と  $\Delta$ Cortisol は相関係数  $r=-0.32$  ( $p=0.057$ ) と負の相関傾向を示した (図 15 右斜め上)。

図 15 血中アミノ酸濃度と成長指標の変化量（エンドポイント-ベースライン）の相関



散布図（左斜め下）：各点は変化量（エンドポイント-ベースライン）のコミュニティ平均、実線は回帰直線、相関（右斜め上）：ピアソンの積率相関係数で算出

## 4. 考察

### 研究対象として注目したアミノ酸 Lys の KP、MN 群間の比較

ガーナで補完食として一般的に用いられる koko は穀類を主原料としており[59]、タンパク質源のアミノ酸組成は極端にリジンが不足していた。PDCASS から利用可能なタンパク質量を計算すると、koko の 1 回の標準的な摂取量 60g 中の総タンパク質は 4.5g であるのに対し利用可能タンパク質量は 2.1g と半分以下と見積もられた[60]。このため、本研究では特にタンパク質源のアミノ酸組成のうちリジンを強化することで利用可能タンパク質を増やすとともに、追加のタンパク質源として大豆粉末を加えることで WHO 補完食ガイドラインで推奨されている利用可能タンパク質量に到達するように KP を設計した。その結果、KP 群の血中リジン濃度はミッドポイントで MN 群に比べ有意に高値を示し、エンドポイントでは統計的有意差は認められなかったが、点推定値は MN 群より高い値を示した（表 30、表 31）。

本試験では試験期間を通じて 365 袋が配送される計画となっていたが、物流上の問題から各コミュニティには平均 225 袋しか配送されていなかった。そこでサプリメントの使用量と血中リジン濃度の関係を回帰モデルから推定したところ、サプリメントの使用量が 300 袋/年でエンドポイントにおける血中リジン濃度は MN 群に比べ KP 群が有意に高値を示すことが確認された。さらに KP 群ではサプリメントの使用量依存的に血中のリジン濃度が上昇する事が確認された(表 33、図 14A)。これらの結果から、栄養による摂取と、要求量の均衡が崩れていると想定されるリジンに対し、KP による介入によってある程度の要求量は満たすことが出来たと考えられる。

### 研究対象として注目したアミノ酸 Leu, total BCAA, total EAA の KP、MN 群間の比較

血中ロイシン、total BCAA、total EAA の濃度はミッドポイント、エンドポイントどちらの採血タイミングにおいても MN 群に比べ有意に高値を示した（表 30、表 31）。さらに、

サプリメントの使用量とこれらの血中アミノ酸濃度の関係を回帰モデルから推定したところ、サプリメントの使用量が 200 袋/年でエンドポイントにおけるロイシン、total BCAA、total EAA の血中濃度は MN 群に比べ KP 群が有意に高値を示すことが確認され、サプリメントの使用量依存的な血中濃度の上昇も確認された(表 33、図 14BCD)。本結果から、KP の使用量が 200 袋/年 以上でこれらのアミノ酸の要求量を満たすと考えられる。

本試験ではサプリメントによる成長改善効果を HAZ で評価しており、十分なサプリメント使用条件下で KP 群は MN 群に比べ HAZ が有意に高値を示したことから成長改善の有効性が確認されている (表 34)。血中の total BCAA、total EAA は筋組織の同化反応を促進する主要なメディエーターであり、成長時の筋合成や骨形成に影響を与える事が知られている[68]。また、血中 total EAA 濃度が増加すると筋肉タンパク質合成も増加し、血中 EAA 濃度が減少すると筋肉タンパク質合成も減少することも報告されている[19]。さらに、ロイシンは mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナリング経路を介したタンパク質合成の活性化因子としても重要である[20,21]。これらの事実から、KP 群で成長改善の有効性が確認されたメカニズムの一部として、KP 群でロイシン、total BCAA、total EAA の血中濃度が MN 群と比べ有意に高値を維持したこと、すなわち代謝要求量が満たされていたことが寄与したと考えられる。

#### 研究対象として注目したアミノ酸の NE 群との比較

本試験で研究対象として注目したアミノ酸であるリジン、ロイシン、total BCAA、total EAA のエンドポイントにおける血中濃度について NE 群との比較を行うと、リジンはいずれの群間にも差が認められず、ロイシン、total BCAA、total EAA は KP 群と NE 群間に統計的な有意差は認められず、MN 群は NE 群に比べ有意に血中濃度が低くなることが確認された (表 31)。本結果は物流上の問題からサプリメントの配送が行われなかった影響を受けている可能性がある。このため、サプリメントが 300 袋/年使用された場合の KP

群、MN 群の血中アミノ酸濃度（表 33）と NE 群の血中アミノ酸濃度（表 31）について比較したところ、興味深いことにリジン、ロイシン、total BCAA、total EAA いずれの血中濃度も KP 群（サプリメントが 300 袋/年使用）> NE 群 > MN 群（サプリメントが 300 袋/年使用）という順序関係が維持されることが確認された。微量栄養素はタンパク質合成に関わる酵素の重要な補因子であることが知られており[66, 69]、亜鉛などの微量栄養素の欠乏は、動物実験においてタンパク質合成を抑制する事が知られており、ヒト試験でも成長を制限することが報告されている[70, 71]。これらの事実から、微量栄養素単独摂取

（MN 群）では微量栄養素は十分あるためタンパク質合成を進めようとしてアミノ酸の要求量が高まっているが、原料となるアミノ酸の供給が不足しているため、供給と要求量の均衡が崩れ血中アミノ酸濃度が低値になっている可能性が考えられる。このような現象が血中アミノ酸濃度の KP 群 > NE 群 > MN 群という順序関係で現れたのではないかと推測される。このため、サプリメント使用量を考慮しない場合にリジン、ロイシン、total BCAA、total EAA のエンドポイントにおける血中濃度について KP 群と NE 群間で統計的な有意差が認められなかった結果（表 31）は、単純に血中アミノ酸濃度に差が無いわけではなく、KP 群は微量栄養素摂取による、アミノ酸要求量の動的な変化に対し、アミノ酸栄養の供給が増えたと均衡状態となった血中濃度であると考えられ、NE 群とは質が異なっていると考えられる。

#### IGF-1 とコルチゾールの血中濃度の結果

アミノ酸栄養の改善は、短期的には生体内のアミノ酸要求量を満たすことで体タンパク質や各種生理活性物質の合成が進むことにより低栄養状態からの改善に寄与する。一方で、長期的にはタンパク質・アミノ酸栄養の充足によって動的に要求量の変化が起こる事が知られており、この動的な要求量の変化は成長ホルモン/IGF-1 を介したシグナルや[72-75]、IGF 結合タンパク質による IGF-1 シグナルの調整によって行われる[75-77]。今回の研究では

1年間という比較的長期間タンパク質・アミノ酸栄養による介入を行ったことから IGF-1 を介した動的なアミノ酸要求量の変化が起こることを想定し血中 IGF-1 濃度を測定した。各群の血中 IGF-1 濃度(±SE)は、KP 群が 39.1±1.4 ng/ml、MN 群が 38.4±1.3 ng/ml、NE 群が 36.1±1.4 ng/ml となっており (表 32)、統計的な有意差は認められなかったが KP 群 > MN 群 > NE 群という順序関係は確認されたことから、タンパク質・アミノ酸栄養の改善により IGF-1 シグナル介した動的な要求量の変化が起こっている可能性が示唆された。

本研究では胎児発育遅延の研究やクッシング病のメカニズム研究から成長抑制との関連が報告されているコルチゾール[78, 79]の血中濃度も同時に測定を行った。エンドポイントの血中コルチゾール濃度はいずれの群間でも有意差は認められなかったが、点推定値は MN 群が最も高値であった (表 32)。本結果は上記考察でも述べた、MN 群では微量栄養素は十分あるためタンパク質合成を進めようとしてアミノ酸の要求量が高まっているが、同時に原料となるアミノ酸の供給は不足しているので体タンパク質合成を抑制する方向にも働きかける必要があり、MN 群のエンドポイントの血中コルチゾール濃度はこのような状況を捉えている可能性がある。

#### アミノ酸と HAZ、IGF-1 とコルチゾールの血中濃度 の相関

今回の試験では物流上の問題から予定していたサプリメントの一部が配送されず、介入による影響もコミュニティーごとに濃淡があったと想定される。そこで、介入条件ではなく、ベースラインからエンドポイントまでの実際の血中アミノ酸濃度の変化 ( $\Delta$  血中アミノ酸濃度) と、IGF、成長指標の変化 ( $\Delta$  IGF、 $\Delta$  HAZ 等) がどの程度関連しているのかについて相関解析により評価した。

$\Delta$  血中リジン濃度と、 $\Delta$  IGF-1 は相関係数  $r=0.29$  ( $p=0.078$ ) と弱い正の相関傾向を示した (図 15)。ガーナでは一般的に補完食として koko が用いられていることから[59]ガーナの乳幼児で最も栄養と代謝要求量の均衡が崩れているアミノ酸はリジンである可能性が高

い。このため、 $\Delta$ リジン濃度と、 $\Delta$ IGF-1の正の相関関係は、第1制限アミノ酸の要求量が充足し利用可能タンパク質量が増えた参加者の栄養状態改善を反映し、成長ホルモン/IGF-1の分泌が亢進した状況をとらえたものと推測される。

一方、血中の $\Delta$ total BCAA濃度と $\Delta$ HAZの相関係数は $r = 0.33$  ( $p = 0.048$ )と弱い正の相関が認められ、 $\Delta$ total EAA濃度と $\Delta$ HAZの相関係数は $r = 0.29$  ( $p = 0.078$ )と弱い正の相関傾向を示した(図15)。マラウイの12~59か月の子供を対象とした横断研究で、発育障害と血中EAA濃度の間に関係があることが報告されており[56]、本結果は先行研究の内容を裏付けるものである。本結果は第1制限アミノ酸だけでなく、BCAA、EAA全体の血中濃度が高く維持されることで体タンパク質合成が促進し、成長指標が上昇した現象を捉えたものと考えられる。

$\Delta$ IGF-1と、 $\Delta$ コルチゾールは相関係数 $r = -0.32$  ( $p = 0.057$ )と弱い負の関係傾向を示した(図15)。先行研究からもIGF-1は成長促進へ、コルチゾールは抑制へと働くことが報告されており負の相関は先行研究の結果を再現したと考えられる。

### 本研究の限界と一般化可能性

本研究には2つの制限がある。3.2コンプライアンスで記述した通り、サプリメントの配送における問題により各コミュニティには当初計画していた60%程度しか配送されなかった(表28)。一方で、配送されたサプリメントの使用率はKP群が84.9%、MN群が87.2%と比較的良好であった。今後配送網が整備された場合のサプリメント使用率も84.9~87.2%程度になる可能性が高い。このため線形モデルにより、サプリメントの使用量が200袋/年、300袋/年の場合の血中指標を推定した。推定に用いた元データ中には300袋/年の使用量を超えた参加者が10%程度含まれており外挿性は問題が無いことを確認している。しかし、あくまでも線形モデルによる推定値を用いていることから一般化という点では一部制約が残ると考えられる。KOKO Plusは既にガーナ共和国において市販されているので、

今後の市販後調査などで成長指標や血中指標に与える影響の検証を行っていく事も必要である。

本研究の 2 つ目の限界は、参加者の食事時間を制御したうえで採血を行うことが出来なかった点である。血中アミノ酸濃度は食事による影響を強く受けることが知られている [50]。食後血中アミノ酸濃度は上昇し、5 時間程度で定常状態へ戻ることが知られている。このため、理想的な採血条件は、食事間隔を十分に空けた絶食時の採血で、この条件であれば食事の影響を受けていない定常状態となった血中アミノ酸濃度を測定する事が可能である。しかし、本研究の参加者は大部分が授乳期のため採血前の絶食条件を設けることは困難であった。このため採血時に参加者の保護者から最終摂食時刻をヒアリングし集計することでどの程度影響を受ける可能性があるか評価した。採血前の平均絶食間隔は、ベースラインからエンドポイント（6 ヶ月齢から 18 ヶ月月齢）で約 50.2~135.9 分の範囲であった（表 35）。このため本研究の血中アミノ酸濃度値は、空腹時の定常状態になった血中濃度だけでなく、食後の一時的な血中濃度上昇の影響も反映されている可能性がある。ただし、全ての採血時点における平均絶食間隔はいずれの群間でも有意な差は認められなかった。このため、食事による影響はいずれの介入群で等しく受けることとなり、ばらつきは大きくなるが依然として群間の比較可能性は担保されていると考えられる。したがって、研究参加者の大部分が授乳期で、採血前の絶食条件を設けなかった場合でも、群間の比較結果は一般化可能性があると考えられる。

表 35 採血前の平均絶食間隔

Time point	Interval [min]			<i>P</i> <sup>1</sup>		
	KP	MN	NE	KP vs MN	KP vs NE	MN vs NE
Baseline	60.3 ± 9.8	50.2 ± 7.3	61.2 ± 7.7	0.54	1.00	0.49
Midpoint	94.7 ± 6.1	81.4 ± 6.7	83.1 ± 5.8	0.38	0.50	0.98
End point	128.8 ± 5.1	133.6 ± 6.7	135.9 ± 5.7	0.88	0.77	0.97

mean ± SE

1. テューキーの多重比較検定のp値

## 結論

新たに開発した KOKO Plus の線形成長改善効果のメカニズムを理解する上で、KOKO Plus による治療介入によって“研究対象として注目したアミノ酸”の血中濃度がどのように変化したか比較することを目的として試験を実施した。想定した研究仮説通り、KOKO Plus による介入群の血中リジン、ロイシン、total BCAA、total EAA 濃度は MN 群に比べ相対的に維持されていた。さらに KOKO Plus による介入群の HAZ が MN 群に比べ改善したことから、KOKO Plus による適切なタンパク質・アミノ酸栄養の供給は血中リジン、ロイシン、total BCAA、total EAA の要求量を満たし、血中濃度を維持する事で HAZ の改善に寄与した可能性が強く示された。

## 【第四章 総括・展望】

本稿にて記載した研究では、血中アミノ酸濃度を“消化吸収したアミノ酸栄養と、代謝要求量の均衡状態が反映された指標”として考え、血中遊離アミノ酸をモニタリングすることで様々な要因の影響を受け代謝要求量が増加した結果を IAAO 法等の精密な方法を用いずともある程度の精度で捉えることが出来る事、さらに均衡状態が崩れたアミノ酸を補うことで低栄養児に対する効果的な栄養補給が可能であることを示すことが出来た。これらの成果はどのような栄養組成が要求量を満たすか未知の状況においても血中アミノ酸濃度をモニタリングしながら栄養組成の調整を繰り返し最適化していくことで目的とした栄養治療食品の開発が達成できるという非常に汎用性の高い開発方法の可能性を示すものである。

本研究において適切なアミノ酸組成のタンパク質栄養がどのようなメカニズムを介して急性の低栄養状態からの回復や、成長障害の予防に寄与しているかについて、要求量を満たすように血中のアミノ酸濃度を適切に維持する作用点を示すことが出来た。短期的には要求量を満たすことでタンパク質・アミノ酸栄養が体タンパク質や各種生理活性物質の原料となり低栄養状態からの改善に寄与したと考えられる。一方で長期的にはタンパク質・アミノ酸栄養の充足によって動的に要求量の変化が起こる事が知られており、この動的な要求量の変化は成長ホルモン/IGF-1 を介したシグナルや[72-75]、IGF 結合タンパク質による IGF-1 シグナルの調整によって行われる[75-77]が今回の研究ではこれらの分子メカニズムに関し影響を評価することが出来ていない。分子メカニズムの解明はタンパク質・アミノ酸栄養改善による効果の個人最適化や、他の栄養素材との併用による有用性の仮説構築に資するものである。途上国における臨床研究という使用実態に近い条件でタンパク質・アミノ酸栄養改善の効果を検証していく一方で、細胞等を用いた実験モデルによるメカニズム研究を並行して進めてく必要がある。

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、多大なご指導・ご鞭撻を賜り、更に論文審査委員をお引き受け下さいました東京工業大学生命理工学院生命理工学系生命理工学コース一瀬宏教授に深く敬意を表し、感謝致します。

アミノ酸強化 RUTF の介入試験で多くのご助言を賜りました Paluku Bahwere 博士、Peter Akomo 研究員、Steve Collins 博士をはじめとする Valid Nutrition 社及び Valid International 社の関係者の皆様、試験実施に尽力いただきました Ministry of Health Malawi の関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

離乳食用栄養強化サプリメント介入試験で多くのご助言を賜りました Shibani A. Ghosh 教授、Devika J. Suri 博士をはじめとする Nevin Scrimshaw International Nutrition Foundation 及び Tufts University の関係者の皆様、試験実施に尽力いただきました University of Ghana の関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

本論文は筆者が味の素株式会社にて実施した研究の成果をまとめたものです。私に研究の機会を与えて下さり、多くのご助言を賜りました味の素株式会社の村上仁志グループ長、古田千恵主任研究員をはじめ、本研究にご尽力いただいた同僚の皆様に心より感謝と御礼を申し上げます。

最後に、家族の協力が無ければ本研究をまとめることは出来ませんでした。私の研究活動のよき理解者として様々な面で支援いただいた妻と、2人の息子達、両親と義父母に心から感謝いたします。

## 論文目録

Wataru Sato, Chie Furuta, Keiko Matsunaga, Paluku Bahwere, Steve Collins, Kate Sadler, Peter Akomo, Chrissy Banda, Elizabeth Maganga, Sylvester Kathumba & Hitoshi Murakami

Amino-acid-enriched cereals ready-to-use therapeutic foods (RUTF) are as effective as milk-based RUTF in recovering essential amino acid during the treatment of severe acute malnutrition in children:

An individually randomized control trial in Malawi

PLOS ONE. volume 13(8), Article number: e0201686 (2018)

doi: 10.1371/journal.pone.0201686 PubMed PMID: 30096200

Wataru Sato, Chie Furuta, Peter Akomo, Paluku Bahwere, Steve Collins, Kate Sadler, Chrissy Banda, Elizabeth Maganga, Sylvester Kathumba & Hitoshi Murakami

Amino acid-enriched plant-based RUTF treatment was not inferior to peanut-milk RUTF treatment in restoring plasma amino acid levels among patients with oedematous or non-oedematous malnutrition

Scientific Reports. volume 11, Article number: 12582 (2021)

doi: 10.1038/s41598-021-91807-x PubMed PMID: 34131186

Chie Furuta\*, Wataru Sato\*, Hitoshi Murakami, Devika J. Suri, Gloria E. Otoo, Kwaku Tano-Debrah & Shibani A. Ghosh

Changes of Plasma Amino Acid Profiles in Infants With a Nutrient-Fortified Complementary Food Supplement: Evidence From a 12-Month Single-Blind Cluster-Randomized Controlled Trial

Frontiers in Nutrition. volume 8, Article number: 606002 (2021)

doi: 10.3389/fnut.2021.606002 PubMed PMID: 34660654

\*contributed equally to this work

## 引用文献

1. United Nations Children's Fund, World Health Organization, World Bank. Levels and trends in child malnutrition: UNICEF / WHO / The World Bank Group joint child malnutrition estimates: key findings of the 2020 edition. Geneva: World Health Organization; 2020.
2. United Nations. Administrative committee on coordination. Subcommittee on nutrition, International Food Policy Research Institute. Fourth Report on the World Nutrition Situation: Nutrition Throughout the Life Cycle: ACC/SCN; 2000.
3. UN General Assembly. Transforming our world : the 2030 Agenda for Sustainable Development 2015.
4. World Health Organization. Global nutrition targets 2025: Stunting policy brief. World Health Organization, 2014.
5. World Health Organization. Global nutrition targets 2025: wasting policy brief. World Health Organization, 2014.
6. Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition, Food Agriculture Organization, World Health Organization, United Nations University. Protein and amino acid requirements in human nutrition : report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva: World Health Organization, 2007 9241209356.
7. Elango R, Ball RO, Pencharz PB. Indicator amino acid oxidation: concept and application. *J Nutr.* 2008;138(2):243-6. doi: 10.1093/jn/138.2.243. PubMed PMID: 18203885.
8. Black RE, Victora CG, Walker SP, Bhutta ZA, Christian P, de Onis M, et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet.* 2013;382(9890):427-51. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60937-X. PubMed PMID: 23746772.
9. Collins S, Dent N, Binns P, Bahwere P, Sadler K, Hallam A. Management of severe acute malnutrition in children. *Lancet.* 2006;368(9551):1992-2000. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69443-9. PubMed PMID: 17141707.
10. Muller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ.* 2005;173(3):279-86. doi: 10.1503/cmaj.050342. PubMed PMID: 16076825; PubMed Central PMCID: PMC1180662.
11. André Briend. Kwashiorkor: still an enigma – the search must go on 2014 31/12/2014 00:00:00; (0):[0 p.]. Available from: <https://www.ennonline.net/kwashiorkorstillanenigma>.
12. Jackson AA. Blood glutathione in severe malnutrition in childhood. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986;80(6):911-3. doi: 10.1016/0035-9203(86)90256-7. PubMed PMID: 3111027.
13. Lenhartz H, Ndasi R, Anninos A, Botticher D, Mayatepek E, Tetanye E, et al. The clinical manifestation of the kwashiorkor syndrome is related to increased lipid peroxidation. *J Pediatr.* 1998;132(5):879-81. doi: 10.1016/s0022-3476(98)70324-5. PubMed PMID: 9602206.
14. Manary MJ, Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Increased oxidative stress in kwashiorkor. *J Pediatr.* 2000;137(3):421-4. doi: 10.1067/mpd.2000.107512. PubMed PMID: 10969271.
15. Di Giovanni V, Bourdon C, Wang DX, Seshadri S, Senga E, Versloot CJ, et al. Metabolomic Changes in Serum of Children with Different Clinical Diagnoses of Malnutrition. *J Nutr.* 2016;146(12):2436-44. doi: 10.3945/jn.116.239145. PubMed PMID: 27807038; PubMed Central PMCID: PMC5118769.
16. Collins S, Sadler K. Outpatient care for severely malnourished children in emergency relief programmes: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2002;360(9348):1824-30. doi: 10.1016/S0140-6736(02)11770-3. PubMed PMID: 12480359.

17. Briend A, Akomo P, Bahwere P, De Pee S, Dibari F, Golden MH, et al. Developing food supplements for moderately malnourished children: lessons learned from ready-to-use therapeutic foods. *Food Nutr Bull.* 2015;36(1 Suppl):S53-8. doi: 10.1177/15648265150361S109. PubMed PMID: 25902615.
18. Nackers F, Broillet F, Oumarou D, Djibo A, Gaboulaud V, Guerin PJ, et al. Effectiveness of ready-to-use therapeutic food compared to a corn/soy-blend-based pre-mix for the treatment of childhood moderate acute malnutrition in Niger. *J Trop Pediatr.* 2010;56(6):407-13. doi: 10.1093/tropej/fmq019. PubMed PMID: 20332221.
19. Bohe J, Low A, Wolfe RR, Rennie MJ. Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose-response study. *J Physiol.* 2003;552(Pt 1):315-24. doi: 10.1113/jphysiol.2003.050674. PubMed PMID: 12909668; PubMed Central PMCID: PMCPMC2343318.
20. Dreyer HC, Drummond MJ, Pennings B, Fujita S, Glynn EL, Chinkes DL, et al. Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(2):E392-400. doi: 10.1152/ajpendo.00582.2007. PubMed PMID: 18056791; PubMed Central PMCID: PMCPMC2706121.
21. Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr.* 2000;130(10):2413-9. doi: 10.1093/jn/130.10.2413. PubMed PMID: 11015466.
22. Golden MH, Ramdath D. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. *Proc Nutr Soc.* 1987;46(1):53-68. doi: 10.1079/pns19870008. PubMed PMID: 3575323.
23. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):42-59. doi: 10.1016/j.mam.2008.05.005. PubMed PMID: 18601945; PubMed Central PMCID: PMCPMC2704241.
24. McMillan A, Orimadegun AE, Sumarah MW, Renaud J, da Encarnacao MM, Gloor GB, et al. Metabolic derangements identified through untargeted metabolomics in a cross-sectional study of Nigerian children with severe acute malnutrition. *Metabolomics.* 2016;13(2):13. doi: 10.1007/s11306-016-1150-2.
25. Briend A, Lacsala R, Prudhon C, Mounier B, Grellety Y, Golden MH. Ready-to-use therapeutic food for treatment of marasmus. *Lancet.* 1999;353(9166):1767-8. doi: 10.1016/S0140-6736(99)01078-8. PubMed PMID: 10347999.
26. Oakley E, Reinking J, Sandige H, Trehan I, Kennedy G, Maleta K, et al. A ready-to-use therapeutic food containing 10% milk is less effective than one with 25% milk in the treatment of severely malnourished children. *J Nutr.* 2010;140(12):2248-52. doi: 10.3945/jn.110.123828. PubMed PMID: 20980648; PubMed Central PMCID: PMCPMC2981006.
27. Manary M, Callaghan M, Singh L, Briend A. Protein Quality and Growth in Malnourished Children. *Food Nutr Bull.* 2016;37 Suppl 1:S29-36. doi: 10.1177/0379572116629023. PubMed PMID: 26857118.
28. Schaafsma G. The protein digestibility-corrected amino acid score. *J Nutr.* 2000;130(7):1865S-7S. doi: 10.1093/jn/130.7.1865S. PubMed PMID: 10867064.
29. Bahwere P, Balaluka B, Wells JC, Mbiribindi CN, Sadler K, Akomo P, et al. Cereals and pulse-based ready-to-use therapeutic food as an alternative to the standard milk- and peanut paste-based formulation for treating severe acute malnutrition: a noninferiority, individually randomized controlled efficacy clinical trial. *Am J Clin Nutr.* 2016;103(4):1145-61. doi: 10.3945/ajcn.115.119537. PubMed PMID: 26984485.
30. Furuta C, Murakami H. A Novel Concept of Amino Acid Supplementation to Improve the Growth of Young Malnourished Male Rats. *Ann Nutr Metab.* 2018;72(3):231-40. doi:

10.1159/000487603. PubMed PMID: 29518784.

31. Bahwere P, Akomo P, Mwale M, Murakami H, Banda C, Kathumba S, et al. Soya, maize, and sorghum-based ready-to-use therapeutic food with amino acid is as efficacious as the standard milk and peanut paste-based formulation for the treatment of severe acute malnutrition in children: a noninferiority individually randomized controlled efficacy clinical trial in Malawi. *Am J Clin Nutr*. 2017;106(4):1100-12. doi: 10.3945/ajcn.117.156653. PubMed PMID: 28814393.
32. Collins S. Community-based therapeutic care: a new paradigm for selective feeding in nutritional crises. Overseas Development Institute (ODI), 2004.
33. World Health Organization. Guideline: updates on the management of severe acute malnutrition in infants and children: World Health Organization; 2013.
34. Nicoll A. Integrated management of childhood illness in resource-poor countries: an initiative from the World Health Organization. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(1):9-11. doi: 10.1016/s0035-9203(00)90418-8. PubMed PMID: 10748887.
35. Moore S, Spackman DH, Stein WH. Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved System. *Analytical Chemistry*. 1958;30(7):1185-90. doi: 10.1021/ac60139a005.
36. Karakawa S, Nishimoto R, Harada M, Arashida N, Nakayama A. Simultaneous Analysis of Tryptophan and Its Metabolites in Human Plasma Using Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *CHROMATOGRAPHY*. 2019;40(3):127-33. doi: 10.15583/jpchrom.2019.010.
37. Julious SA. Sample sizes for clinical trials with normal data. *Stat Med*. 2004;23(12):1921-86. doi: 10.1002/sim.1783. PubMed PMID: 15195324.
38. Feigin RD, Haymond MW. Circadian periodicity of blood amino acids in the neonate. *Pediatrics*. 1970;45(5):782-91. PubMed PMID: 5444400.
39. Kasukawa T, Sugimoto M, Hida A, Minami Y, Mori M, Honma S, et al. Human blood metabolite timetable indicates internal body time. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(37):15036-41. doi: 10.1073/pnas.1207768109. PubMed PMID: 22927403; PubMed Central PMCID: PMC3443163.
40. Ghisolfi J, Charlet P, Ser N, Salvayre R, Thouvenot JP, Duole C. Plasma free amino acids in normal children and in patients with proteinocaloric malnutrition: fasting and infection. *Pediatr Res*. 1978;12(9):912-7. doi: 10.1203/00006450-197809000-00006. PubMed PMID: 101961.
41. National Research Council (U.S.). Panel on Handling Missing Data in Clinical Trials., National Research Council (U.S.). Committee on National Statistics., National Academies Press (U.S.). The prevention and treatment of missing data in clinical trials. Washington, D.C.: National Academies Press; 2010. xv, 144 p. p.
42. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*. 2015;67(1):1 - 48. doi: 10.18637/jss.v067.i01.
43. Hothorn T, Bretz F, Westfall P. Simultaneous inference in general parametric models. *Biom J*. 2008;50(3):346-63. doi: 10.1002/bimj.200810425. PubMed PMID: 18481363.
44. Hutson SM, Sweatt AJ, Lanoue KF. Branched-chain [corrected] amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes. *J Nutr*. 2005;135(6 Suppl):1557S-64S. doi: 10.1093/jn/135.6.1557S. PubMed PMID: 15930469.
45. Davis TA, Fiorotto ML, Nguyen HV, Reeds PJ. Protein turnover in skeletal muscle of suckling rats. *Am J Physiol*. 1989;257(5 Pt 2):R1141-6. doi: 10.1152/ajpregu.1989.257.5.R1141. PubMed PMID: 2480066.
46. Davis TA, Fiorotto ML. Regulation of muscle growth in neonates. *Curr Opin Clin Nutr Metab*

- Care. 2009;12(1):78-85. doi: 10.1097/MCO.0b013e32831cef9f. PubMed PMID: 19057192; PubMed Central PMCID: PMCPMC2653196.
47. Balagopal P, Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, Nair KS. Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am J Physiol.* 1997;273(4):E790-800. doi: 10.1152/ajpendo.1997.273.4.E790. PubMed PMID: 9357810.
  48. Guerrant RL, Leite AM, Pinkerton R, Medeiros PH, Cavalcante PA, DeBoer M, et al. Biomarkers of Environmental Enteropathy, Inflammation, Stunting, and Impaired Growth in Children in Northeast Brazil. *PLoS One.* 2016;11(9):e0158772. doi: 10.1371/journal.pone.0158772. PubMed PMID: 27690129; PubMed Central PMCID: PMCPMC5045163.
  49. Weisstaub G, Araya M. Acute malnutrition in Latin America: the challenge of ending avoidable deaths. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47 Suppl 1:S10-4. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181818e78. PubMed PMID: 18667909.
  50. Elia M, Folmer P, Schlatmann A, Goren A, Austin S. Amino acid metabolism in muscle and in the whole body of man before and after ingestion of a single mixed meal. *Am J Clin Nutr.* 1989;49(6):1203-10. doi: 10.1093/ajcn/49.6.1203. PubMed PMID: 2729157.
  51. World Health Organization. Global reference list of 100 core health indicators. Geneva: World Health Organization, 2015 Contract No.: WHO/HIS/HSI/2015.3.
  52. Victora CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell R, Richter L, et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet.* 2008;371(9609):340-57. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61692-4. PubMed PMID: 18206223; PubMed Central PMCID: PMCPMC2258311.
  53. Shrimpton R, Victora CG, de Onis M, Lima RC, Blossner M, Clugston G. Worldwide timing of growth faltering: implications for nutritional interventions. *Pediatrics.* 2001;107(5):E75. doi: 10.1542/peds.107.5.e75. PubMed PMID: 11331725.
  54. Schwarzenberg SJ, Georgieff MK, Committee On N. Advocacy for Improving Nutrition in the First 1000 Days to Support Childhood Development and Adult Health. *Pediatrics.* 2018;141(2). doi: 10.1542/peds.2017-3716. PubMed PMID: 29358479.
  55. Shivakumar N, Kashyap S, Kishore S, Thomas T, Varkey A, Devi S, et al. Protein-quality evaluation of complementary foods in Indian children. *Am J Clin Nutr.* 2019;109(5):1319-27. doi: 10.1093/ajcn/nqy265. PubMed PMID: 30920607; PubMed Central PMCID: PMCPMC6499502.
  56. Semba RD, Shardell M, Sakr Ashour FA, Moaddel R, Trehan I, Maleta KM, et al. Child Stunting is Associated with Low Circulating Essential Amino Acids. *EBioMedicine.* 2016;6:246-52. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.02.030. PubMed PMID: 27211567; PubMed Central PMCID: PMCPMC4856740.
  57. van Vught AJ, Heitmann BL, Nieuwenhuizen AG, Veldhorst MA, Andersen LB, Hasselstrom H, et al. Association between intake of dietary protein and 3-year-change in body growth among normal and overweight 6-year-old boys and girls (CoSCIS). *Public Health Nutr.* 2010;13(5):647-53. doi: 10.1017/S1368980009991510. PubMed PMID: 19758483.
  58. Hoppe C, Molgaard C, Thomsen BL, Juul A, Michaelsen KF. Protein intake at 9 mo of age is associated with body size but not with body fat in 10-y-old Danish children. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(3):494-501. doi: 10.1093/ajcn/79.3.494. PubMed PMID: 14985227.
  59. Ghana Statistical Service, Ghana Health Service, ICF International. Ghana demographic and health survey 2014. GSS, GHS, and ICF International. 2015.
  60. Suri DJ, Tano-Debrah K, Ghosh SA. Optimization of the nutrient content and protein quality of cereal-legume blends for use as complementary foods in Ghana. *Food Nutr Bull.* 2014;35(3):372-81. doi: 10.1177/156482651403500309. PubMed PMID: 25902596.

61. Tessema M, Gunaratna NS, Brouwer ID, Donato K, Cohen JL, McConnell M, et al. Associations among High-Quality Protein and Energy Intake, Serum Transthyretin, Serum Amino Acids and Linear Growth of Children in Ethiopia. *Nutrients*. 2018;10(11). doi: 10.3390/nu10111776. PubMed PMID: 30453477; PubMed Central PMCID: PMC6266228.
62. Ghosh SA, Strutt NR, Otoo GE, Suri DJ, Ankrah J, Johnson T, et al. A macro- and micronutrient-fortified complementary food supplement reduced acute infection, improved haemoglobin and showed a dose-response effect in improving linear growth: a 12-month cluster randomised trial. *J Nutr Sci*. 2019;8:e22. doi: 10.1017/jns.2019.18. PubMed PMID: 31275576; PubMed Central PMCID: PMC6598226.
63. World Health Organization. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Geneva: World Health Organization, 2011 Contract No.: WHO/NMH/NHD/MNM/11.1.
64. World Health Organization, United Nations Children's Fund. WHO child growth standards and the identification of severe acute malnutrition in infants and children : joint statement by the World Health Organization and the United Nations Children's Fund. Geneva: World Health Organization, 2009 9789241598163.
65. Lutter CK, Dewey KG. Proposed nutrient composition for fortified complementary foods. *J Nutr*. 2003;133(9):3011S-20S. doi: 10.1093/jn/133.9.3011S. PubMed PMID: 12949402.
66. World Health Organization. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Geneva: World Health Organization, 2005 9241546123.
67. Enwonwu CO, Falkler WA, Jr., Idigbe EO, Afolabi BM, Ibrahim M, Onwujekwe D, et al. Pathogenesis of cancrum oris (noma): confounding interactions of malnutrition with infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60(2):223-32. doi: 10.4269/ajtmh.1999.60.223. PubMed PMID: 10072140.
68. Millward DJ. A protein-stat mechanism for regulation of growth and maintenance of the lean body mass. *Nutr Res Rev*. 1995;8(1):93-120. doi: 10.1079/NRR19950008. PubMed PMID: 19094281.
69. World Health Organization, International Atomic Energy Agency, Food Agriculture Organization of the United Nations. Trace elements in human nutrition and health. Geneva: World Health Organization; 1996.
70. Kimball SR, Chen SJ, Risica R, Jefferson LS, Leure-duPree AE. Effects of zinc deficiency on protein synthesis and expression of specific mRNAs in rat liver. *Metabolism*. 1995;44(1):126-33. doi: 10.1016/0026-0495(95)90299-6. PubMed PMID: 7854157.
71. Hambidge M. Human zinc deficiency. *J Nutr*. 2000;130(5S Suppl):1344S-9S. doi: 10.1093/jn/130.5.1344S. PubMed PMID: 10801941.
72. Levine ME, Suarez JA, Brandhorst S, Balasubramanian P, Cheng CW, Madia F, et al. Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. *Cell Metab*. 2014;19(3):407-17. doi: 10.1016/j.cmet.2014.02.006. PubMed PMID: 24606898; PubMed Central PMCID: PMC3988204.
73. Fleddermann M, Demmelmair H, Grote V, Bidlingmaier M, Grimminger P, Bieloheby M, et al. Role of selected amino acids on plasma IGF-I concentration in infants. *Eur J Nutr*. 2017;56(2):613-20. doi: 10.1007/s00394-015-1105-9. PubMed PMID: 26621633.
74. Sawa R, Nishida H, Yamamoto Y, Wake I, Kai N, Kikkawa U, et al. Growth hormone and Insulin-like growth factor-I (IGF-I) modulate the expression of L-type amino acid transporters in the muscles of spontaneous dwarf rats and L6 and C2C12 myocytes. *Growth Horm IGF Res*. 2018;42-43:66-73. doi: 10.1016/j.ghir.2018.09.002. PubMed PMID: 30273774.

75. Caputo M, Pigni S, Agosti E, Daffara T, Ferrero A, Filigheddu N, et al. Regulation of GH and GH Signaling by Nutrients. *Cells*. 2021;10(6). doi: 10.3390/cells10061376. PubMed PMID: 34199514; PubMed Central PMCID: PMC8227158.
76. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev*. 1997;18(6):801-31. doi: 10.1210/edrv.18.6.0321. PubMed PMID: 9408744.
77. Blum WF, Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Ranke MB. Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76(6):1610-6. doi: 10.1210/jcem.76.6.7684744. PubMed PMID: 7684744.
78. Cianfarani S, Geremia C, Scott CD, Germani D. Growth, IGF system, and cortisol in children with intrauterine growth retardation: is catch-up growth affected by reprogramming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Pediatr Res*. 2002;51(1):94-9. doi: 10.1203/00006450-200201000-00017. PubMed PMID: 11756646.
79. Tritos NA, Biller BM, Swearingen B. Management of Cushing disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(5):279-89. doi: 10.1038/nrendo.2011.12. PubMed PMID: 21301487.