

平成 30 年度 博士論文

アミノ酸混合物と身体活動の併用が
脂質代謝および体脂肪に及ぼす影響

筑波大学大学院

人間総合科学研究科 スポーツ医学専攻

201730393

上田 啓輔

目次

関連論文	4
I. 緒言	5
II. 文献研究	10
1. 肥満の評価指標	10
2. 身体活動による肥満予防効果	11
3. 運動とホルモン	12
4. 脂肪分解の作用機序	13
5. 脂肪燃焼の作用機序	13
6. ミトコンドリアと PGC1- α	14
7. 食品成分による体脂肪低減効果	15
8. タンパク質、アミノ酸の摂取とグルカゴン、インスリンの分泌	18
9. A-mix による脂肪燃焼効果	19
III. 研究課題の設定	22
IV. 研究課題 1	23
健常者を対象としたアミノ酸混合物の単回摂取と運動実践 が脂質代謝に及ぼす影響	
1. 緒言	23
2. 方法	24
3. 結果	29
4. 考察	38
V. 研究課題 2	42

運動習慣のない中年過体重者を対象としたアミノ酸混合物 の単回摂取と運動実践が脂質代謝に及ぼす影響	
1. 緒言	42
2. 方法	43
3. 結果	48
4. 考察	57
VI. 研究課題 3	60
過体重者を対象としたアミノ酸混合物と身体活動実践が 脂質代謝に及ぼす効果量を推定するための予備的 RCT	
1. 緒言	60
2. 方法	61
3. 結果	68
4. 考察	78
VII. 研究課題 4	81
過体重者を対象としたアミノ酸混合物と身体活動実践が 脂質代謝に及ぼす有効性を検証するための検証的 RCT	
1. 緒言	81
2. 方法	81
3. 結果	87
4. 考察	105
VIII. 総合考察	109
IX. 謝辞	114
X. 参考文献	116

関連論文

本論文は、以下に示した論文に未発表の研究結果を加えてまとめた。

Ueda K, Sanbongi C, Ikegami S. An arginine, alanine, and phenylalanine mixture increases synthesis of ketone bodies during low-intensity exercise via stimulating glucagon secretion in men with obesity. *J Phys Fit Sports Med* 6(5): 325–333, 2017.

Ueda K, Sanbongi C, Takai S, Ikegami S, Fujita S. Combination of aerobic exercise and an arginine, alanine, and phenylalanine mixture increases fat mobilization and ketone body synthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 81(7): 1417–1424, 2017.

*Sasai H, ***Ueda K**, Tsujimoto T, Kobayashi H, Sanbongi C, Ikegami S, Nakata Y. Dose-ranging pilot randomized trial of amino acid mixture combined with physical activity promotion for reducing abdominal fat in overweight adults. *Diabetes Metab Syndr Obes* 10: 297–309, 2017.

*These authors contributed equally to this work.

Ueda K, Sasai H, Tsujimoto T, Sanbongi C, Ikegami S, Kobayashi H, Shioya N, Suzuki S, Nakata Y. Randomized trial of amino acid mixture combined with physical activity promotion for abdominal fat reduction in overweight adults. *Diabetes Metab Syndr Obes* 11: 23–33, 2018.

I. 諸言

肥満者の増加は、全世界で深刻な社会問題となっている。1980年から2013年にかけて、全世界における肥満者数は8億8500万人から21億人と約2.5倍にまで増加したことが報告されている (Ng et al., 2014)。平成28年におけるわが国での肥満者 (body mass index [BMI] $\geq 25.0 \text{ kg/m}^2$) の割合は、男性31.3%、女性20.6%と報告されており (厚生労働省, 2016)、特に20~60代の成人男性での増加が顕著である (平成18年の29.7%から平成28年の31.2%)。肥満が問題となる理由は、高血圧 (Jayedi et al., 2018) や糖尿病 (Tirosh et al., 2011) などの慢性疾患を惹起しやすく、心血管疾患の罹患やそれによる死亡リスクを有意に高めること (Kivimäki et al., 2017) が明らかにされているからである。また、高BMIにより総死亡のリスクが高まることも報告されている (Global BMI Mortality Collaboration, 2016)。さらに、わが国における30歳以上の15万人を対象にしたコホート研究 (吉池他, 2000) では、高血圧、高トリグリセライド (triglyceride: TG) 血症、低高密度リポタンパク質 (high-density lipoprotein: HDL) コレステロール血症を発症するオッズ比 (odds ratio: OR) が、BMI 26~27.9 kg/m^2 の群で普通体重群 ($20 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 24 \text{ kg/m}^2$) の2倍以上になると報告されており (高血圧 OR = 2.32; 95%信頼区間 [95% confidence interval: 95%CI] 2.22-2.42、高TG血症 OR = 2.64; 95%CI 2.53-2.74、低HDLコレステロール血症 OR = 2.52; 95%CI 2.38-2.67)、日本人は軽度の肥満でも健康障害につながりやすいことが示されている。これらのことから、肥満および肥満に関連する疾患は、日本人にとっても重要な社会問題であると考えられる。

肥満の予防の基本は食事と身体活動・運動である。食事については近年、肥

満に対する食事の一つとして、低炭水化物食が有用であるとの報告がある (Hashimoto et al., 2016)。短期的には体重、体脂肪を含めた改善効果が期待できると考えられているが、長期的な低炭水化物食は全死因死亡率を高める可能性が指摘されている (Noto et al., 2013)。また、タンパク質摂取量を増やすことで脂肪減少に効果があるとの報告がある (Wirunsawanya et al., 2018) が、長期的な高タンパク質食は肥満および心臓血管疾患に有益でも有害でもないとの報告もあり (Schwingshackl & Hoffmann, 2013)、その効果については不明なままである。このように、食事については現状統一した見解が未だ得られていない。一方、運動の効果としては、1) エネルギー消費量の増大、2) インスリン応答等の代謝機能の改善、3) 基礎代謝の増大などが挙げられ、肥満をはじめとする生活習慣病を予防する重要な方法の一つである (Jensen et al., 2014)。アメリカスポーツ医学会は、2009 年に「成人期における減量と体重増加予防のための適切な身体活動介入戦略」と題する声明を公表した (Donnelly et al., 2009)。その内容は、1) 体重増加を予防するために推奨される身体活動量としては中程度での身体活動を週 150~250 分、2) 減量のための身体活動として、週 150~250 分では体重減少量はわずかであり、週 250 分以上の中高強度身体活動を行うか食事改善を併用する、3) 減量後の体重維持のためには週 200~300 分を推奨している。このように、運動の習慣化による身体活動の増加は、体重維持や肥満に関連する疾患の予防に強く関与することが示唆されている。

食事・身体活動の他に、肥満の予防に役立つ可能性が期待されるものとして、機能性食品 (サプリメント等) が挙げられる。機能性食品は、長年の喫食実績からその安全性が担保されており、機能面での研究成果が伴う場合、その有用性・汎用性は高いと考えられる。近年、食品の 3 次機能 (疾病予防・健康増進

作用)をベースとした、「特定保健用食品」制度(1991年発足)や、「機能性表示食品」制度(2015年発足)が運用され、食品の機能性研究に注目が集まっている。しかしながら、これまでに行われている機能性食品による減量効果を調査したメタ解析(Manore, 2012)によると、顕著な効果(>2 kg)が期待できる食品はなく、軽微な効果(<2 kgの体重減少)が、茶カテキン、食物繊維、およびカルシウムサプリメントにおいて認められているのみである。近年、アミノ酸を素材とした機能性食品の研究が精力的に進められているが、その摂取が脂肪減少に効果的であるとシステマティックレビューにおいて報告されているものはない。対象者を過体重者や肥満者に限定したランダム化比較試験

(randomized controlled trial: RCT)では、分岐鎖アミノ酸(blanched amino acids: BCAA)を含む多成分栄養補助食品(Ormsbee et al., 2014)、L-グルタミン(Laviano et al., 2014)、L-ヒスチジン(Feng et al., 2013)、L-アルギニン(Bogdanski et al., 2012)等の報告がある。しかしながら、その研究デザインがRCTであっても、検証的RCTにより効果が確認されているのは、Feng et al. (2013)の報告のみである。また、Feng et al. (2013)の報告についても、対象者は女性のみであることから、その試験結果は注意深く解釈する必要があると考えられる。このように、機能性食品の中には肥満予防に寄与する可能性のある素材があるが、その効果は軽微であり、機能性食品を摂取するだけで肥満および肥満に関連する疾患を予防する十分な効果が期待できるとは考えにくい。

アミノ酸は、サプリメントとして運動と併用しながら摂取することで、肥満予防効果が期待されている。Table 1に、対象者を過体重者や肥満者に限定したRCTにおける、アミノ酸摂取と運動を組み合わせた際の体組成への影響について、それらの研究デザインと主な結果をまとめた。Kim et al. (2016)の研究で

は、L-ロイシン高含有アミノ酸混合物の摂取と 60 分の運動教室を週 2 回 12 週間実施した結果、体脂肪率の低下に有意差が認められたと報告している。Sasai et al. (2011) の研究では 17 種類のアミノ酸混合物の摂取と 90 分の運動教室を週 2 回 12 週間実施したが腹部内臓脂肪面積の減少量に有意差は認められなかったと報告している。Lucotti et al. (2006) の研究では L-アルギニンの摂取と 45 分の運動教室を 1 日 2 回週 5 回 3 週間実施した結果、脂肪の減少量に有意差が認められたと報告している。このように、アミノ酸摂取と運動を組み合わせた際の体組成への影響については、RCT の報告があるものの、実験的 RCT が多く検証的 RCT により効果が確認されているものは少ない。

Table 1. Previous studies on the effects of amino acid supplementation combined with exercise on abdominal fat reduction in overweight or obese participants.

Authors	Participants	Test food Intervention	Exercise intervention	Outcomes	Results
Kim et al. (2016)	139 elderly women with sarcopenic obesity	L-leucine enriched essential amino acid 3.0 g/day	60 min session of resistance and weight-bearing exercise 2 times/week for 12 weeks	Percent change of total body fat mass	Ex + N: -5.5% # Ex : -4.9 % N : -2.9 % HE : -2.2%
Sasai et al. (2011)	24 older women	17 amino acids mixture 3.0 g/day	90 min session of aerobic exercise 2 times/week for 12 weeks	ΔIntra-abdominal fat area	n.s. (A: -18.7cm ² P : -9.5cm ²)
Lucotti et al. (2006)	25 women, and 8 men Type 2 diabetic patients	L-arginine 8.3 g/day	45 min twice a day session of whole body exercise 5 times/week for 3 weeks	ΔFat mass	A: -3.0 kg* P: -2.1 kg

A: arginine treatment, Ex: exercise, HE: health education, N: nutrition, n.s.; not significant, P: placebo treatment
#: P < 0.05 compared with HE, *: P < 0.05 compared with P

これらのことから、アミノ酸を素材とし、運動を組み合わせた際の体組成への影響を、ヒトを対象として体系的に評価することは、研究の新規性が高いと考えた。またその際、実験的 RCT に加えて、身体活動の啓発を併用する条件下で検証的 RCT を実施することで、実用性、汎用性が高く、かつ質の高いエビデ

ンスが得られるものと考えた。

本博士論文に先立ち、運動時の脂質代謝を促進するアミノ酸の研究を行ってきており、動物を用いた疑似運動モデル系にて、体を構成するアミノ酸 20 種類について、脂肪分解能を評価している (上田他, 2015)。その結果、L-アルギニン、L-アラニン、L-フェニルアラニンに他のアミノ酸より運動時の脂肪分解効果が高いことを見出した。さらに先行知見として、健常男性を対象とした試験において、L-フェニルアラニンの摂取が運動時の脂質代謝を促進することを見出した (Ueda et al., 2017a)。健常男性を対象とした別の試験においても、L-アラニン、L-アルギニン、L-フェニルアラニンを高含有した 17 種類のアミノ酸混合物が、運動時の脂質代謝を促進することを報告している (Ueda et al., 2016)。これらの知見より、L-アラニン、L-アルギニン、L-フェニルアラニンの 3 つの混合物は、新規の脂質代謝促進アミノ酸混合物として、効果が期待できるものと考えた。そこで、これらの組合せ配合比を動物試験により検討し、実用化に最適な混合比として、L-アラニン 38% (mol/mol)、L-アルギニン 20% (mol/mol)、L-フェニルアラニン 42% (mol/mol) で混合したアミノ酸混合物 (A-mix) を作成するに至った。A-mix の先行知見としては、C57BL6/J マウスを用いた食餌誘発性肥満モデルでの評価において、A-mix の継続投与と運動の併用に、体重増加抑制、および蓄積脂肪抑制効果があることを報告している (Ueda et al., 2017b)。しかしながら、ヒトを対象とした A-mix 摂取と運動を併用した試験において、運動時の脂質代謝を促進するか否かの知見はない。また、過体重者を対象とした知見はなく、ヒトを対象とした明確なエビデンスが得られていない。そこで、本博士論文では、健常者および過体重者を対象とした際の A-mix に関する明確なエビデンスを得るために、複数の課題を設定して、研究に取り組んだ。

II. 文献研究

1. 肥満の評価指標

肥満の判定基準については、わが国をはじめ国際的にも、体重 (kg) ÷ 身長² (m²) で算出される BMI が用いられている (NCD Risk Factor Collaboration, 2016)。BMI は水分や骨、筋肉量などを反映するため、浮腫やサルコペニアなど病態によっては正確な体脂肪量を反映しないという問題はあるが、身長と体重から求められるという簡便さが利点である。BMI は、除脂肪体重との相関よりも体脂肪量との相関が高く (Gallagher et al., 1996)、ウエスト周囲長との相関 (Pischoen et al., 2008) や、後述する二重エネルギー X 線吸収法 (dual energy X-ray absorptiometry: DXA) の体脂肪指標との相関も示されている (Goulding et al., 1996)。

体脂肪量測定ゴールドスタンダードは、解剖により組織内の脂肪量を直接測定する直接法である。直接法との相関性が高く、より正確に体脂肪量を測定するための方法 (シルバースタンダード) として、水中体重秤量法、空気置換法、DXA 等があるが、これらは大掛かりな測定装置が必要であり、簡便ではない。生体電気インピーダンス法 (bioelectrical impedance analysis: BIA) は DXA 等を妥当基準とした方法であり、ブロンズスタンダードと位置付けられている。BIA は体内の水分により測定誤差が生じるが、放射線非被曝の検査法として、臨床現場においても有用な方法と期待されている (日本肥満学会, 2016)。

全身の体脂肪量に加え、腹部の脂肪蓄積 (腹部肥満) は、肥満に関連する健康リスクとなる可能性が示唆されている (Després et al., 2008; Ritchie & Connell, 2007)。わが国でもメタボリックシンドロームの構成因子として、腹部肥満はそ

の上流に位置付けられている。その評価方法としては、臍レベル断面でのコンピュータ断層 X 線撮影 (computed tomography: CT) や磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging: MRI) が用いられている。MRI は CT に比べ、被曝の問題はないが時間や費用がかかることから、わが国では一般に CT が用いられている (Yoshizumi et al., 1999)。消費者庁が定める「特定保健用食品申請に係る申請書作成上の留意事項」においても、体脂肪関係の評価指標について、「原則として、CT、インピーダンス法による腹部脂肪面積、BMI および腹囲が考えられる。ただし、インピーダンス法による腹部脂肪面積を測定する場合は、CT による測定と相関があることが確認された機器であること」と記載されている。これらのことから、本博士論文における肥満の指標としては BMI、腹部肥満の指標としては CT による腹部面積の測定を用いることが妥当と考えられた。

2. 身体活動による肥満予防効果

多くの横断的観察研究では、身体活動量と肥満度との間に負の関連を認めている。例えば、日本人成人男女約 1,000 人の検討において、日本の身体活動基準 2013 (厚生労働省, 2013) で定められた 3 metabolic equivalent (METs) 以上の強度の身体活動を 23 METs・時/週実施している者は、BMI およびウエスト周囲長が非実施者に比べ有意に低いことが報告されている (川上他, 2014)。また、縦断的コホート研究においても、身体活動量の増加は体重減少と関連すると報告されている (Koh-Banerjee et al., 2003)。さらに、Smith & Zachwieja (1999) や、Ross & Janssen (2001) の介入研究を対象としたメタ解析では、身体活動量の増加による内臓脂肪面積の減少が報告されている。日本人を対象とした介入研究では、Miyatake et al. (2002) が 31 名の中年肥満男性を対象に、日常生活で歩数を積極

的に増やすよう指導し、1年間継続させたところ、エネルギー摂取量は変化せず、内臓脂肪の変化量と歩数の変化量との間には有意な相関があった ($r^2 = 0.18$, $P = 0.03$) と報告している。また、Ohkawara et al. (2007) は、系統的レビューとメタ解析の結果、約 27 週間にわたって 10 METs・h/週の運動を実践することで、大きな体重減少は見込まれないが、10%の内臓脂肪面積減少は見込まれると報告している。このように、身体活動には、体重の減少を伴う場合と伴わない場合があるが、腹部脂肪面積を減少させることが可能であることが示唆されている。

3. 運動とホルモン

内分泌腺やそれから分泌されるホルモンは、身体の恒常性を維持するために多くの機能を担っている。運動によりその分泌が亢進するホルモンとしては、成長ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン（高強度運動および低強度の長時間運動で亢進）、プロラクチン、エンドルフィン（長時間運動で亢進）、バソプレッシン、コルチゾル（高強度運動のみで亢進）、アルドステロン、エピネフリン（高強度のみで亢進）、ノルエピネフリン、チロキシン、インスリン（血糖値が上昇する高い運動強度の運動で亢進、低強度運動では低下）、グルカゴン、エストロゲン、テストステロン、レニンが挙げられる（田畑他, 2002）。この中でも脂肪の分解を促進するホルモンは、成長ホルモン(Thomas et al., 2013)、ノルエピネフリン (Wahrenberg et al., 1991)、コルチゾル (Hansen et al., 2012)、グルカゴン (Tsiloulis & Watt, 2015) であると報告されている。したがって、これらのホルモンの分泌を効率よく促進させることができれば、身体活動や運動時の脂質代謝が効率よく亢進する可能性がある。

4. 脂肪分解の作用機序

脂肪細胞はエネルギーを貯蔵する最大の組織であり、代謝恒常性とインスリン抵抗性を制御するホルモンやアディポカインを放出する (Apostolopoulou et al., 2012; Fruhbeck, 2008; Large et al., 2004)。過剰量の中性脂肪が脂肪細胞に蓄積されることで、肥満が引き起こされる (Ahmadian et al., 2007)。中性脂肪は脂質液滴中に貯蔵され、脂肪分解によって脂肪酸およびグリセロールに加水分解される (Ahmadian et al., 2010)。脂肪細胞での脂肪分解は、ホルモン、神経伝達物質、および他の調整因子により制御されている (Ahmadian et al., 2010; Holm, 2003)。脂肪分解の経路において、最も公知となっているのが cyclic adenosine monophosphate (cAMP) を介する経路である。また、cAMP レベルが上昇すると、cAMP-dependent protein kinase A (PKA) が活性化する。この経路では、ホルモン感受性リパーゼ (hormone sensitive lipase, HSL) が PKA によってリン酸化され、次に細胞質から脂質液滴に移行し、ペリリピン A と相互作用し、その結果として遊離脂肪酸が次々に放出される (Carmen & Victor, 2006; Holm, 2003)。HSL は脂肪分解におけるもっとも重要なリパーゼであり、ホルモンの規制を受ける (Rayalam et al., 2008)。HSL に加え、adipose triglyceride lipase は主に脂肪組織で発現され、脂肪細胞における希少な脂肪分解酵素であると考えられている (Haemmerle et al., 2006; Zechner et al., 2005)。

5. 脂肪燃焼の作用機序

遊離脂肪酸は細胞内に入るとエステル化され、脂質セカンドメッセンジャーに代謝された後、ミトコンドリアで β 酸化されアセチル CoA に代謝される (Serra et al., 2013)。最終的には、酸化的リン酸化 (Tseng et al., 2010) として知られて

いるプロセスにおいて、トリカルボン酸サイクルおよび電子伝達系を介し、adenosine triphosphate を産生する。一方、mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) は、酸化リン酸化のエネルギー生成の前に、膜間のプロトン勾配を浪費し、エネルギーを主に熱として散逸させる働きがある (Mailloux & Harper, 2011)。UCPs には UCP1、2、3 が存在することが知られており、UCP1 は褐色脂肪細胞にのみ存在し、UCP2 は白色脂肪細胞、免疫系細胞、神経細胞などに認められ、UCP3 は主に骨格筋、心臓などの筋組織において多く存在する (Mailloux & Harper, 2011)。

6. ミトコンドリアと PGC1- α

上述の通り、脂肪燃焼を促進するには、ミトコンドリアを増やし、エネルギー産生を増加させる必要がある。Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) は、ミトコンドリア機能および酸化能力の調節で中心的役割を果たす転写共活性化因子である (Ventura-Clapier et al., 2008)。骨格筋中の PGC1- α の発現抑制は、エネルギー摂取量の増加と関連し (Morino et al., 2005, 2006)、肥満、糖尿病、および代謝性疾患の発症に関連していると報告されている (Summermatter & Handschin, 2012)。また、運動は PGC-1 α の発現増加と関連しており、ミトコンドリアの生合成、生体エネルギー、および酸化能力を含めた、骨格筋中のミトコンドリアの適応を促進することが示されている (Baar et al., 2002; Fealy et al., 2014)。このように、ミトコンドリアの新生を引き起こすことが示されている PGC1- α を、運動やサプリメントの摂取で増加させることで、脂肪燃焼効果を促進する可能性が期待されている。

7. 食品成分による体脂肪低減効果

上述した HSL による脂肪分解促進作用、あるいは PGC1- α を介した脂肪燃焼促進を、食品成分により活性化させるための研究が、動物試験レベルでは数多く報告されている。以下は一例になるが、ケルセチン配糖体による HSL の活性化 (立石他, 2009)、魚油 (エイコサペンタエン酸/ドコサヘキサエン酸) (Rossignoli et al., 2018)、ティラコイド (Stenkula et al., 2017)、レスベラトロール (Wang et al., 2015)、およびケルセチン (Henagan et al., 2014) による PGC1- α の活性化等が報告されている。しかしながら、これらの食品成分による体脂肪低減効果を、ヒトにおいて体系的に評価している素材は少ない。

タンパク質は、アミノ酸と同じく、サプリメントとして運動と併用しながら摂取することで、肥満予防効果が期待されている。Morton et al. (2018) によるメタ解析では、タンパク質サプリメントとレジスタンストレーニングとの併用による、除脂肪体重、脂肪量への影響を評価した。6 週間以上の RCT を対象とした解析の結果、タンパク質サプリメントによる除脂肪体重の変化量は 0.30 kg (95%CI 0.09–0.52 kg)、脂肪量の変化量は -0.41 kg (95%CI -0.70–-0.13 kg) であり、有意差が認められた。Bergia et al. (2018) によるメタ解析では、女性におけるエネルギー制限とレジスタンス運動の併用時、非併用時の体重、除脂肪量、脂肪量の変化に対するホエイタンパク質の影響を評価した。サブ解析として行ったエネルギー制限を行わずレジスタンストレーニングのみを併用した研究においては、除脂肪量の変化量 0.22 kg (95%CI -0.19–0.64 kg)、脂肪量の変化量 0.08 kg (95%CI -0.46–0.62 kg) であり、有意差は認められなかった。このように、タンパク質サプリメントについては、いくつかの RCT では効果が認められているものの、システマティックレビューでは統一した見解が得られていない。

食品成分による体脂肪低減効果を検討した RCT として、日本人を対象とした試験が多数行われている。Table 2 にそれらの研究デザインと主な結果についてまとめた。その多くは、主要評価項目として臍位の腹部脂肪面積が用いられており、食事制限や運動の推奨は行わず、生活を変えないように指示した条件下で実施されている。具体的な素材としては、熟成ホップ由来苦味酸

(Morimoto-Kobayashi et al., 2016)、ケルセチン配糖体 (齋藤他, 2015)、ローズヒップエキス (Nagatomo et al., 2015)、ガセリ菌配合ヨーグルト (高野他, 2013)、葛の花抽出物 (神谷他, 2012)、ウーロンホモビスフラバン B (前川他, 2011)、クロロゲン酸 (長尾他, 2009)、茶カテキン (土田他, 2002) が挙げられる。しかしながら、これらの RCT では、対象者数が十分でないケースが少なくなく、プログラム遵守度が低く、脱落例の多い報告が散見される。

Morimoto-Kobayashi et al. (2016) の試験では、511 名に対して適確性検査を実施し、200 名をランダム化、各群 100 名に割り付け試験を開始した。各群 6 名が試験中に脱落しており、さらに 10 名を解析対象から除外し、Active 群 91 名、Placebo 群 87 名の計 178 名にて解析を実施している。その結果、腹部内臓脂肪面積変化量および腹部全脂肪面積変化量で有意差が認められているが、体重変化量では有意差は認められていない。さらに、摂取エネルギー量、歩数についても群間および各群の介入前後で有意差は認められなかったと報告している。齋藤他 (2015) の試験では、354 名に対して適確性検査を実施し、200 名をランダム化、各群 100 名に割り付け試験を開始した。計 7 名が試験中に脱落しており、さらに 26 名 (うち 13 名は CT 解析不適格として除外) を解析対象から除外し、Active 群 86 名、Placebo 群 82 名の計 168 名にて解析を実施している。その結果、腹部内臓脂肪面積変化量、腹部皮下脂肪面積変化量、および腹部全脂肪面積変

化量で有意差が認められているが、体重変化量では有意差は認められていない。さらに、摂取エネルギー量、歩数についても群間および各群の介入前後で有意差は認められなかったと報告している。Nagatomo et al. (2015) の試験では、152名に対して適確性検査を実施し、32名をランダム化、各群16名に割り付け試験を開始した。その結果、腹部内臓脂肪面積変化量、腹部皮下脂肪面積変化量、および腹部全脂肪面積変化量で有意差が認められおり、体重変化量でも有意差は認められている。一方で、摂取エネルギー量、歩数については、群間および各群の介入前後で有意差は認められなかったと報告している。高野他 (2013) の試験では、適確性検査を実施した人数の記載がなく、108名をランダム化、各群54名に割り付け試験を開始した。計3名が試験中に脱落しており、さらに4名を解析対象から除外し、Active群52名、Placebo群49名の計101名にて解析を実施している。その結果、腹部内臓脂肪面積変化量で有意差が認められている。一方で、腹部皮下脂肪面積変化量、腹部全脂肪面積変化量、および体重変化量で有意差は認められておらず、摂取エネルギー量、歩数については、群間および各群の介入前後で有意差は認められなかったと報告している。神谷他 (2012) の試験では、適確性検査を実施した人数の記載がなく、130名をランダム化、各群65名に割り付け試験を開始した。計30名が試験中に脱落しており、さらに3名を解析対象から除外し、Active群50名、Placebo群47名の計97名にて解析を実施している。その結果、腹部内臓脂肪面積変化量、腹部皮下脂肪面積変化量、腹部全脂肪面積変化量、および体重変化量で有意差が認められている。一方で、摂取エネルギー量、歩数については、群間および各群の介入前後で有意差は認められなかったと報告している。これらの結果から、研究デザインが RCT であっても、脱落例が多かった場合のように、その結果が必ずしも信

頼できるとは言えず、注意深く解釈する必要がある。また、身体活動量の増加、すなわち歩数増加の啓発と食品摂取とを組み合わせさせた試験として、高濃度茶カテキン飲料摂取との併用試験（宮崎他, 2010）があるが、プラセボ摂取との比較で腹部脂肪量に有意差は認められていない。

以上より、身体活動と特定の食品成分摂取には、腹部脂肪を減少させる可能性があるが、それらの併用効果についてのエビデンスを質の高い RCT により示している素材は少ないと考えられる。

Table 2. Previous studies on the effects of ingestion of food ingredients on abdominal fat reduction.

Authors	Participants	Test food intervention	Statistical method, sample size	ΔBody weight (kg)	ΔAbdominal fat area (cm ²)
Morimoto-Kobayashi et al., 2016	200 overweight adults	Matured hop extract, 35 mg	PPB, n = 178 (A: 91, P: 87)	A: -0.47 P: -0.02	A: -17* P: -10
Saito et al., 2015 (in Japanese)	200 overweight adults	Quercetin glucoside, 110 mg	PPB, n = 178 (A: 82, P: 86)	A: -0.32 P: -0.15	A: -6.09* P: +5.93
Nagatomo et al., 2015.	32 overweight adults	Rosehip extract, 100 mg	PPB, n = 32 (A: 16, P: 16)	A: -1.40 P: -0.26	A: -18.48* P: 2.09
Takano et al., 2013 (in Japanese)	108 overweight adults	<i>Lactobacillus gasseri</i> SBT2055, 107 cfu/g	PPB, n = 101 (A: 52, P: 49)	A: 0.1 P: -0.1	A: -9.57* P: -0.45
Kamiya et al., 2012 (in Japanese)	100 overweight adults	Pueraria flower extract, 34.9 mg	PPB, n = 97 (A: 50, P: 47)	A: -1.1 P: -0.1	A: -35* P: -15
Maekawa et al., 2011 (in Japanese)	300 overweight adults	Dimeric flavan-3-ols, oolonghomobisflavan B, 70 mg	PPB, n = 281 (A: 141, P: 140)	A: -1.49 P: -0.07	A: -11.32* P: -3.13
Nagao et al., 2009 (in Japanese)	125 overweight adults	Chlorogenic acids, 297 mg	PPB, n = 109 (A: 53, P: 56)	A: -1.5 P: -0.3	A: -9.3* P: 7.2*
Tsuchita et al., 2002 (in Japanese)	80 overweight adults	Tea catechin, 540 mg	PPB, n = 80 (A: 39, P: 41)	A: -1.69 P: -0.44	A: -26.37* P: -1.86

A: active sample treatment, P: placebo sample treatment, PPB: per protocol based analysis

* : P < 0.05 compared with placebo group

8. タンパク質、アミノ酸の摂取とグルカゴン、インスリンの分泌

日常の食事はグルカゴンやインスリンなどのホルモンの分泌に影響する。タンパク質食を摂取すると血糖値は上昇せず、血中インスリン濃度および血中グルカゴン濃度は増加することが報告されている（Muller et al., 1970）。糖尿病患者を対象とした試験においても、タンパク質を摂取すると、血中 α アミノ窒素濃

度、血中グルカゴン濃度、血中インスリン濃度は上昇することが報告されている (Gannon et al., 2001)。グルカゴンは主に膵臓 α 細胞から分泌されるペプチドホルモンであり、生体での主な役割は肝グリコーゲン分解を促進して、血中にグルコースを放出することにある。逆に、主に膵臓 β 細胞から分泌されるインスリンは組織へのグルコースの取込みを促進する。このように、グルカゴンとインスリンの両ホルモンが相反的に働くことで、血糖値は一定範囲内に維持されている (Röder et al., 2016)。脂質代謝に関しても、グルカゴンはインスリンと相反的に作用し、脂肪組織の脂肪分解を促進して血中の遊離脂肪酸を増加させる働きがある (Campbell & Drucker, 2015)。一般に血中アミノ酸はグルカゴン分泌の調節因子として作用するが (Marroqui et al., 2014)、その作用はアミノ酸の種類により異なることが知られている。Gannon & Nattall (2010) の研究レビューによると、その摂取においてグルカゴンの分泌を強く刺激するアミノ酸として、グリシン、L-アルギニン、L-フェニルアラニン、L-アラニン、L-リジンが挙げられている。一方、その摂取においてインスリンの分泌を強く刺激するアミノ酸として、L-フェニルアラニン、グリシンが挙げられている。

9. A-mix による脂肪燃焼効果

L-アラニン、L-アルギニン、L-フェニルアラニンを混合し、新規のアミノ酸混合物である A-mix の作成に至った経緯は、緒言で述べた通りである。A-mix による脂肪燃焼効果の作用機序には上述したグルカゴン分泌促進作用が関わっていると考えられる。その他の作用機序として、運動時の脂質代謝促進効果について、各アミノ酸に期待される効果を概説する。L-アラニンは、ピルピン酸を経由しオキサロ酢酸を供給することで、糖を消費することなく遊離脂肪酸の酸

化を促進すると考えられている (Koeslag et al.,1985)。L-フェニルアラニンは、一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 合成酵素による NO 合成に必須の因子であることが報告されている (Wu, 2009)。L-アルギニンは、NO 合成酵素による基質となることが報告されている (Wu & Morris, 1998)。さらに、L-アルギニンと L-フェニルアラニンは、グアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼ I の発現および活性を増加させることで、NO 合成に寄与するテトラヒドロビオプテリンの利用効率を上げ、芳香族アミノ酸の加水分解効率を上げることが報告されている (Shi et al., 2004)。このように、L-フェニルアラニンと L-アルギニンは、NO 産生を誘導し、脂肪分解に関わるホルモン感受性リパーゼやペリリピンのリン酸化を促進すると考えられている (Jobgen et al., 2006)。

本博士論文に先行し、C57BL6/J マウスを用いた食餌誘発性肥満モデルでの評価において、A-mix の継続投与と運動の併用に、体重増加抑制および蓄積脂肪抑制効果があることを報告している (Ueda et al., 2017b)。また、同試験におけるマウスの褐色脂肪組織中の PGC1- α を測定したところ、A-mix 投与群で対照群と比較し、有意な上昇が認められた。これらのことから、A-mix を摂取しながら運動することで、蓄積脂肪の抑制、およびそれに伴う肥満の予防が期待され、そのメカニズムとして PGC1- α の発現上昇を介したミトコンドリア機能の活性化が期待された。このように、各アミノ酸の作用機序に関する先行知見や、先行して実施した動物試験の結果より、A-mix の摂取は脂質の代謝を促進することが期待された。

しかしながら、A-mix 摂取と運動を併用した際のヒトにおける代謝応答は確認できておらず、長期摂取の際の効果量や、長期摂取と併用する実現可能性の高い身体活動の強度については、不明であった。そこで、本博士論文では、A-mix

摂取と身体活動・運動を併用することによる脂質代謝に及ぼす影響を基礎研究により明らかにするとともに、過体重者を対象とした **RCT** によって、その有効性を証明することを目的とした。

Ⅲ. 研究課題の設定

緒言および文献研究を踏まえ、以下の3点を現状の問題点として挙げる。

1. ヒトを対象とし、アミノ酸摂取と身体活動あるいは運動を併用し、体組成への影響を評価した RCT はいくつか報告されている。しかしながら、その有効性について明確なエビデンスが得られているものは少ない。
2. アミノ酸などのサプリメント摂取と併用されている身体活動あるいは運動は、高頻度あるいは高強度負荷の運動が主であり、広く国民に一般化する上で限界がある。
3. L-アラニン、L-アルギニン、L-フェニルアラニンを特定の比率で配合した A-mix について、先行して動物における知見を報告してきたが、ヒトを対象とした試験、特に過体重者を対象とした知見がなく、その有効性に関する明確なエビデンスは得られていない。

以上の問題点を考慮し、本博士論文では、以下の4つの研究課題を設定した。

【研究課題 1】 A-mix の単回摂取と運動実践が脂質代謝に及ぼす影響を、健常者を対象として検討する。

【研究課題 2】 A-mix の単回摂取と運動実践が脂質代謝に及ぼす影響を、過体重者を対象として検討する。

【研究課題 3】 A-mix の長期摂取と身体活動実践が脂質代謝に及ぼす影響の効果を推定するための予備的 RCT を、過体重者を対象として実施する。

【研究課題 4】 A-mix の長期摂取と身体活動実践が脂質代謝に及ぼす有効性を証明するための検証的 RCT を、過体重者を対象として実施する。

IV. 研究課題 1

1. 諸言

これまでの先行研究 (Ueda et al., 2017b) により、A-mix の長期継続摂取と運動の併用は、抗肥満作用、抗脂肪蓄積作用があることを、マウスを用いた高脂肪食給餌モデルにおいて明らかにした。しかしながら、ヒトを対象として、A-mix の単回摂取と運動実践が脂質代謝に及ぼす影響、あるいは A-mix の長期摂取と身体活動の併用が体脂肪に及ぼす影響を検討した研究は行われていない。

そこで、本研究課題 1 の目的は、長期摂取によるエビデンスを取得する前に、短期的な試験系によって A-mix の効果を検討することとした。すなわち、運動習慣のある健常な男子大学生を対象とし、A-mix の単回摂取と運動を組み合わせることによる脂質代謝応答を検討した。

運動時の糖質あるいは脂質のエネルギー供給率は、運動強度や運動の継続時間により変化することが先行知見により報告されている (Romijn et al., 1993)。具体的には、運動強度が低いほど脂質からのエネルギー供給率が高く、運動強度が高くなると徐々に糖質からのエネルギー供給が高くなる。これらのことから、運動によるエネルギー消費量を確保し、脂質からのエネルギー供給量が高い、40~60% VO₂max の低~中強度運動が体脂肪を減らすには最適であると考えられている (Achten and Jeukendrup, 2003, Stisen et al., 2006)。また、American College of Sports Medicine のガイドライン (Mitchell et al., 2006) で推奨されている運動処方によると、肥満の人々において十分なエネルギー消費量を確保するためには、45~60 分の運動を目標とすべきと説明されている。そこで、本試験では、運動強度を中強度運動に相当する VO₂max50% 強度と設定し、運動時間を

60 分間とし、試験を実施した。

2. 方法

(1) 試験デザイン

本研究課題 1 は、プラセボ対照ランダム化二重盲検クロスオーバー比較試験である。チヨダパラメディカルケアクリニック（東京）にて、2015 年 2～3 月に実施した。本研究課題 1 は、明治臨床試験倫理審査委員会の審査承認後、チヨダパラメディカルケアクリニック臨床試験審査委員会での審査承認を得た試験計画書に基づいて実施した。また、試験参加者に対しては、試験に先立ち研究の趣旨について説明し、同意後でも同意撤回が可能である旨の文書を渡すなど、倫理的配慮のもとに実施した。

(2) 試験参加者

サッカー部に所属する健常で 20 歳以上の男子大学生を対象とし、計 20 名を募集した。対象者に対して事前検査（Visit 1）を実施し、下記の除外基準のいずれの項目も満たさない者 10 名を、本研究課題 1 の参加者とした。

除外基準は以下の 4 項目である。1) 事前アンケートの回答結果から試験参加者として不適と判断された者。例として運動負荷に適さない心疾患患者、運動誘発性アレルギー等の既往歴を持つ者、試験に影響する医薬品・健康食品を常用している者、本研究課題 1 の直前に過度な運動あるいは通常より過少な活動期間（けがによる休養など）があった者。2) 直近 6 ヶ月以内に献血を行った者。3) フェニルケトン尿症の者。4) その他、事前の一般血液検査と尿検査結果より、試験責任医師の判断によって試験参加者として不適と判断された者。

(3) ランダム化および盲検性の維持

体重を層別因子とし、試験参加者を A-mix 先行群あるいはプラセボ先行群の 2 群にランダムかつ 1 : 1 に割り付けた。具体的には、試験参加者の平均体重である 65.6 kg 以上/未満で層別した。割付責任者は、現場スタッフや試験参加者と直接関わらない者とし、パーソナルコンピューターで割付表を作成した。割付表は、試験参加者に試験食品を送付する責任者によって保管され、その責任者は計画、登録、評価、および調査に関与しなかった。試験参加者、介入者、現場スタッフは割付に関わっておらず、盲検性が維持されていた。割付表は、最終データが固定された後に開封された。

(4) 介入内容

(i) 試験食品

株式会社 明治研究所内にて、L-アラニン、L-アルギニン、L-フェニルアラニンを混合し、A-mix を作製した。この A-mix をカプセルに封入した食品（被験食品）と、デキストリンをカプセルに封入した食品（プラセボ食品）を試験食品として用いた。本研究課題 1 で使用したすべてのアミノ酸は、協和発酵バイオ株式会社（東京）で製造された食品添加物を用いた。デキストリンは、松谷化学工業株式会社（兵庫）で製造された食品を用いた。カプセルに封入する A-mix、デキストリンは各々 3 g であり、試験食品から摂取可能なエネルギー量は 12 kcal であった。試験食品は試験当日、自転車運動開始 30 分前に、50 mL の水で 1 回、かまずに摂取させた。

(ii) 試験スケジュールおよび測定内容

本研究課題 1 のスケジュールを Figure 1 に示した。来院は計 3 回であった。

Visit 1 では試験の説明と同意の取得後、身長計 (AD-6351, 株式会社エー・アンド・デイ, 東京) および体重計 (Lookin'Body 3.2, バイオスペース, ソウル, 韓国) を用いて、身長と体重を測定した。また、医師の間診後に採血、採尿を実施した。さらに、エルゴメータ (STB-3400, オージー技研株式会社, 岡山)、呼気分析器 (エアロモニタ AE310s, ミナト医科学株式会社, 大阪)、および心拍測定器 (運動負荷心電図測定装置 STS-2100, 日本光電工業株式会社, 東京) を用い、漸増 (15 W/分) 自転車運動を実施し、疲労困憊までの時間と最大酸素摂取量 (maximal oxygen uptake: VO_{2max}) の測定を実施した。なお、疲労困憊の基準としては、以下の判定基準の中の 2 つ以上を満たしたものとし、直ちにクーリングダウンを開始し、直前に得られた最大の酸素摂取量を VO_{2max} とした。1) 酸素摂取量の増加がプラトーになった、2) 呼吸交換比 (volume CO_2 : VCO_2/VO_2) が 1.1 以上に達した、3) 心拍数が 20 歳の予想最高心拍数 (maximum heart rate: HR_{max}) である 200 に達した、4) Borg Scale を用いた主観的運動強度が 19 (非常にきつい) 以上となった。さらに事前アンケートで生活習慣の確認を実施した。

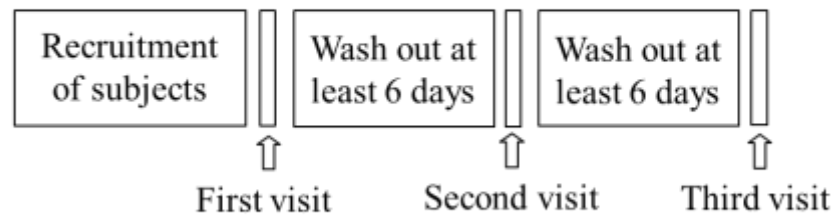
Visit 1 から 6 日以上の間隔をあけて試験 1 回目を実施した (Visit 2)。規定食 (炭水化物:脂質:タンパク質比=71:16:13) の摂取後、6 時間以上の絶食時間を設けた後、2 種類の試験食品のうち一方を摂取し (0 分)、呼気ガスの採取、心拍の測定を開始した。試験食品摂取から試験食品摂取 30 分後までは座位安静とした (安静期)。その後、試験食品摂取後 30 分から 90 分までの 60 分間、 VO_{2max} の 50% の運動強度にて自転車運動を実施した (運動期)。運動実施後、再度座位

安静時間を試験食品摂取 150 分後まで設けた（回復期）。呼気ガス分析は試験食品摂取直後から 150 分後まで実施し、採血は試験食品摂取前、試験食品摂取後 30 分、45 分、60 分、75 分、90 分、120 分、150 分に実施した。

Visit 2 から 6 日以上の間隔をあけて試験 2 回目を実施した（Visit 3）。Visit 3 では、Visit 2 とは異なるもう一方の試験食品を摂取し、採血、呼気ガス分析、心拍測定、自転車運動を Visit 2 と同じスケジュールで実施した。

Visit 1 の最大酸素摂取量測定および Visit 2 と Visit 3 の試技は、恒温恒湿室（ $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $45 \pm 5\%$ ）にて実施した。採取した血液の分析は、血中グリセロール濃度は株式会社イミュー（東京）に、その他の項目は株式会社 LSI メディエンス（東京）に依頼した。

A



B

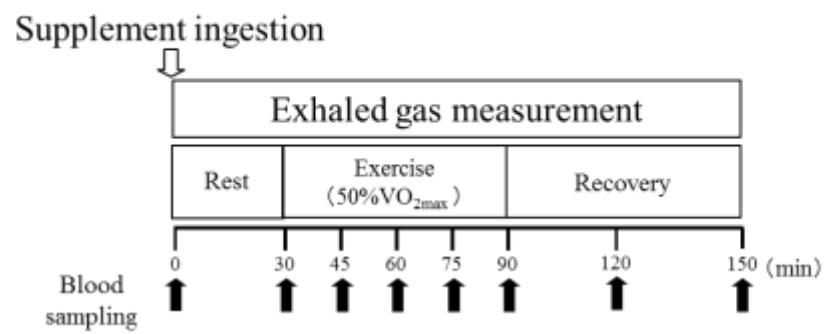


Figure 1. Study design: Study schedule (A) and schedule on experimental trial days (Visits 2 and 3; B). (Ueda et al., 2017c)

(5) 評価指標および統計解析

データの処理は Excel 2003 (マイクロソフト社, ワシントン, アメリカ合衆国) を用いて実施した。有意水準は $P < 0.05$ と定義した。エクセル統計を用いて反復測定二元配置分散分析を行い、群の主効果と時間の主効果での交互作用の有無を検討した。交互作用を認めた項目においては、群間の比較のため、Tukey 法による多重比較を行った。また、安静時、運動時、回復時に期分けした時間帯における血中濃度-時間曲線化面積 (area under the curve: AUC) を算出した。Stat view J-5.0 (アブカス, カリフォルニア, アメリカ合衆国) を用いて、F 検定により等分散性を評価した後、等分散であれば対応のある t 検定、等分散でなければウィルコクソンの符号順位検定を実施した。

主要評価項目は血中グリセロール濃度とし、副次評価項目は血中遊離脂肪酸濃度、血中総ケトン体濃度、血糖値、血中乳酸濃度、血中インスリン濃度、血中グルカゴン濃度、血中成長ホルモン濃度、血中アドレナリン濃度、血中ノルアドレナリン濃度、血中コルチゾル濃度、呼吸交換比、心拍数とした。呼気からの炭水化物酸化量、脂質酸化量は、以下の Peronnet & Massicotte (1991) の式を用いて算出した。

炭水化物酸化量 : $4.585 \times VCO_2 - 3.226 \times VO_2$

脂質酸化量 : $1.695 \times VO_2 - 1.701 \times VCO_2$

3. 結果

(1) 試験参加者背景

試験参加者背景を Table 3 に示した。

Table 3. Characteristics of subjects

Age (years)	21.1 ± 0.7
Height (cm)	170.7 ± 4.9
Body weight (kg)	65.6 ± 5.0
BMI (kg/m ²)	22.5 ± 1.4
VO ₂ max (mL/kg/min)	45.3 ± 4.4

Values are mean ± standard deviation (n = 10), BMI: body mass index.

(2) 心肺機能

心拍数、呼吸交換比、呼気より算出した炭水化物酸化量、脂質酸化量、エネルギー消費量を Table 4 に示した。安静期において、心拍数、炭水化物酸化量、脂質酸化量、およびエネルギー消費量に A-mix 摂取群とプラセボ摂取群との間で有意差は認められなかった。一方、呼吸交換比においては、A-mix 摂取群の方が、プラセボ摂取群よりも低値を示した (P = 0.038)。運動期において、心拍数、呼吸交換比、脂質酸化量、エネルギー消費量に有意差は認められなかった。しかしながら、炭水化物酸化量において、A-mix 摂取群の方が、プラセボ摂取群よりも、有意に低い値を示した (P = 0.041)。回復期において、心拍数、呼吸交換比、炭水化物酸化量、脂質酸化量、エネルギー消費量のいずれにおいても 2 群間で有意差は認められなかった。試験期間中を通したエネルギー消費量についても、2 群間で有意差は認められなかった (A-mix 摂取群: 598.3 ± 45.7 kcal/150 min、プラセボ摂取群: 613.6 ± 70.0 kcal/150 min)。

(3) 生化学的指標

生化学的指標の測定結果を Figure 2 に図示し、安静期、運動期、回復期の各状態の AUC を Table 5 にまとめた。反復測定二元配置分散分析の結果、血中総ケトン体濃度に交互作用を認め (群の主効果: P = 0.13、時間の主効果: P < 0.0001、

交互作用： $P = 0.013$)、Tukey の多重比較を用いた各ポイントにおける 2 群間の比較では、75 分、90 分、120 分、および 150 分において、有意差が認められた ($P < 0.05$)。総ケトン体の回復期の AUC は、A-mix 摂取群においてプラセボ摂取群と比較して、有意に高値を示した ($P = 0.022$)。血中グリセロール濃度および血糖値において、反復測定二元配置分散分析では有意な時間の主効果が認められたが、交互作用は認められなかった。しかしながら、グリセロールの回復期の AUC は、A-mix 摂取群においてプラセボ摂取群と比較して、有意に高値を示した ($P = 0.047$)。血糖値の回復期の AUC は、A-mix 摂取群においてプラセボ摂取群と比較して、有意に低値を示した ($P = 0.039$)。

(4) ホルモン

ホルモン指標の測定結果を Figure 3 に図示し、安静期、運動期、回復期の各状態の AUC を Table 6 に要約した。反復測定二元配置分散分析の結果、血中アドレナリン濃度に交互作用を認め(群の主効果： $P = 0.220$ 、時間の主効果： $P < 0.0001$ 、交互作用： $P = 0.047$)、Tukey の多重比較を用いた各ポイントにおける 2 群間の比較では、60 分、75 分、90 分、120 分、および 150 分において有意差が認められた ($P < 0.05$)。アドレナリン濃度の AUC は、どの時間帯の評価においても有意差は認められなかった。血中グルカゴン濃度、インスリン濃度、ノルアドレナリン濃度、およびコルチゾル濃度において、反復測定二元配置分散分析では有意な時間の主効果を示したが、交互作用は認められなかった。回復期のグルカゴン濃度 AUC は、A-mix 摂取群において、プラセボ摂取群と比較して有意に高値を示した ($P = 0.042$)。インスリン、ノルアドレナリン、成長ホルモン、およびコルチゾル濃度の AUC では、どの時間帯においても群間で有意差は認めら

れなかった。

Table 4. Cardiorespiratory responses of participants during rest, exercise, and post-exercise after consuming the test food.

	Rest (0–30 min)			Exercise (30–90 min)			Post-exercise (90–150 min)		
	A-mix	Placebo	P*	A-mix	Placebo	P*	A-mix	Placebo	P*
HR (bpm)	58 ± 4	72 ± 25	.075	131 ± 9	126 ± 15	.40	81 ± 9	77 ± 5	.18
RER	0.78 ± 0.04	0.82 ± 0.06	.038	0.92 ± 0.03	0.92 ± 0.04	.76	0.81 ± 0.04	0.81 ± 0.04	.43
Carbohydrate oxidation (g/min)	0.08 ± 0.03	0.10 ± 0.03	.086	1.60 ± 0.25	1.79 ± 0.32	.041	0.23 ± 0.06	0.22 ± 0.06	.52
Fat oxidation (g/min)	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02	.44	0.19 ± 0.06	0.16 ± 0.09	.35	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.02	.064
Energy expenditure (kcal)	30 ± 2	31 ± 4	.51	462 ± 43	489 ± 61	.092	107 ± 23	94 ± 9	.17

Values are mean ± standard deviation (n = 10). *P value for the paired-sample t test if data were normally distributed and the Wilcoxon signed-rank test if not.

HR: heart rate, RER: respiratory exchange ratio.

Table 5. Effects of amino acid mixture on the AUC for biochemical parameters

	Rest (0–30 min)			Exercise (30–90 min)			Recovery (90–150 min)		
	A-mix	Placebo	P*	A-mix	Placebo	P*	A-mix	Placebo	P*
Glycerol (min·mg/L)	167 ± 46	155 ± 47	.39	729 ± 320	599 ± 234	.11	760 ± 379	552 ± 159	.047
FFAs (min·mEq/L)	14.1 ± 4.9	13.1 ± 4.3	.49	36.5 ± 16.7	29.0 ± 11.2	.058	60.2 ± 31.4	43.8 ± 11.2	.074
Total ketone bodies (min·mmol/L)	3.91 ± 3.79	2.60 ± 3.87	.24	9.36 ± 7.93	4.29 ± 5.44	.010	34.9 ± 29.4	17.1 ± 16.2	.022
Glucose (min·g/L)	23.5 ± 1.8	25.0 ± 1.5	.049	45.0 ± 4.9	46.7 ± 3.2	.27	42.1 ± 7.4	46.0 ± 3.0	.038
Lactate (min·g/L)	2.97 ± 0.96	3.25 ± 0.68	.41	9.81 ± 1.87	10.7 ± 3.1	.42	6.56 ± 1.60	6.92 ± 1.34	.59

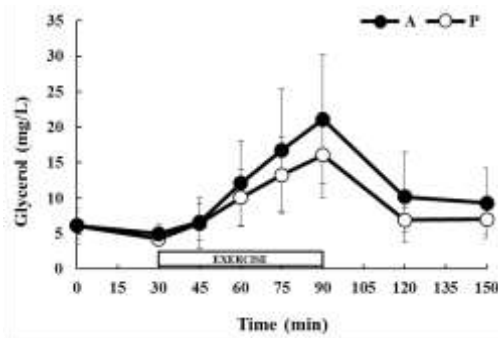
Values are mean ± standard deviation (n = 10). *P value for the paired-sample t test if data were normally distributed and the Wilcoxon signed-rank test if not.
FFAs: free fatty acids.

Table 6. Effects of amino acid mixture on the AUC for circulating hormones

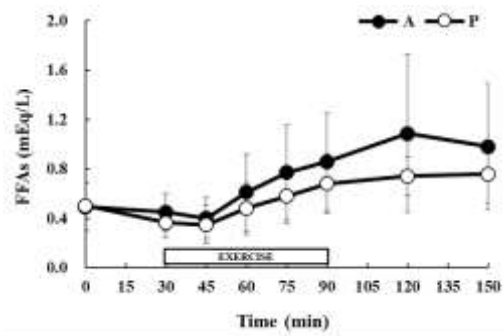
	Rest (0–30 min)			Exercise (30–90 min)			Recovery (90–150 min)		
	A-mix	Placebo	P*	A-mix	Placebo	P*	A-mix	Placebo	P*
Glucagon (min·μg/L)	3.20 ± 0.34	3.10 ± 0.29	.19	7.19 ± 1.01	6.87 ± 1.02	.36	7.97 ± 1.24	7.15 ± 0.80	.042
Insulin (min·mU/L)	57.5 ± 32.1	80.9 ± 78.9	.36	98.3 ± 63.1	102.3 ± 49.7	.63	99.5 ± 95.7	106.8 ± 64.8	.56
Adrenalin (min·μg/L)	1.16 ± 0.55	1.20 ± 0.47	1.0	7.79 ± 3.60	6.43 ± 2.46	.25	7.50 ± 6.16	4.66 ± 1.78	.31
Noradrenalin (min·μg/L)	11.3 ± 3.1	10.9 ± 2.8	.54	51.2 ± 13.3	49.0 ± 9.5	.45	30.5 ± 7.3	29.6 ± 5.6	.46
Growth hormone (min·μg/L)	21.7 ± 25.4	28.5 ± 31.4	.52	343 ± 191	345 ± 224	.89	248 ± 154	195 ± 97	.19
Cortisol (min·mg/L)	3.74 ± 1.04	3.22 ± 1.37	.12	7.87 ± 1.62	7.25 ± 1.93	.52	8.19 ± 3.73	6.66 ± 1.39	.51

Values are mean ± standard deviation (n = 10). *P value for the paired-sample t test if data were normally distributed and the Wilcoxon signed-rank test if not.

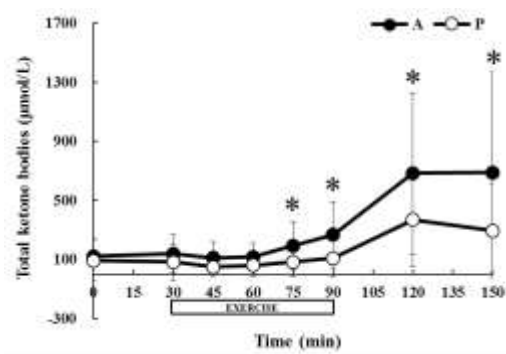
A



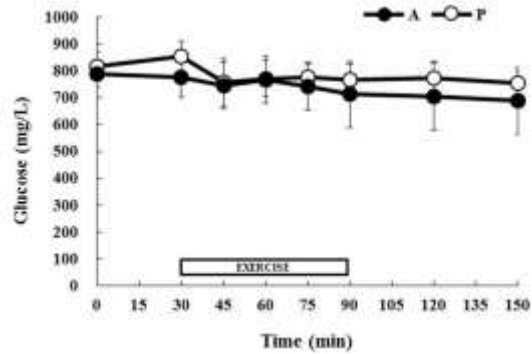
B



C



D



E

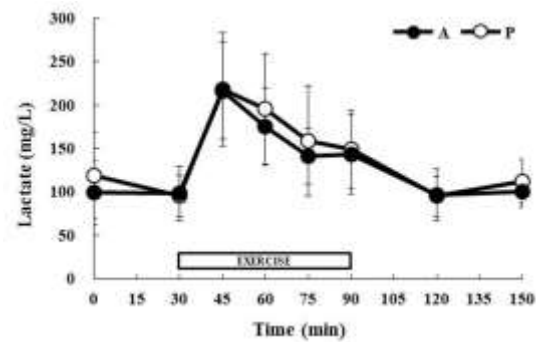


Figure 2. Concentrations of biochemical assessed during the experimental trials: glycerol (A), FFAs (B), total ketone bodies (C), glucose (D), and lactate (E). Values are mean \pm standard deviation ($n = 10$). A, A-mix treatment; FFAs, free fatty acids; P, placebo treatment. (Ueda et al., 2017c)

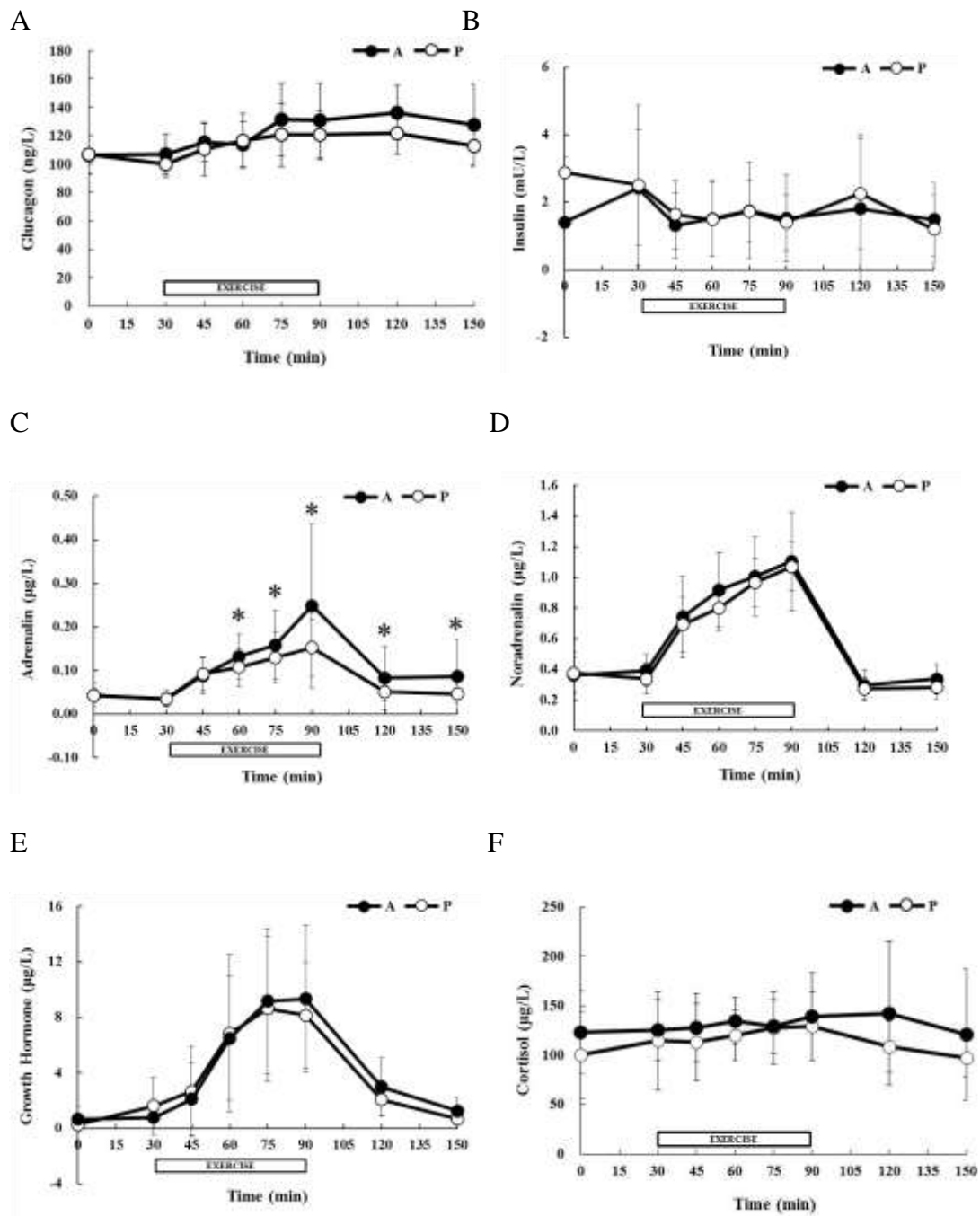


Figure 3. Concentrations of circulating hormones during the experimental trials: glucagon (A), insulin (B), adrenaline (C), noradrenaline (D), growth hormone (E), and cortisol (F). Values are mean \pm standard deviation (n = 10). A, A-mix treatment; P, placebo treatment. (Ueda et al., 2017c)

4. 考察

本研究課題 1 の目的は、運動習慣のある健康な男子大学生を対象とし、A-mix を単回摂取し、運動と併用した際の脂質代謝指標における急性効果を、プラセボと比較検討することであった。その結果、運動前に A-mix を摂取することで、運動後の血中グリセロール濃度、運動中・後の血中ケトン体濃度、運動後のグルカゴン濃度、運動中・後の血中アドレナリン濃度において、有意な上昇を認めた。血中グリセロール濃度は、脂肪分解の指標として扱われることから

(Koschinsky & Gris, 1971)、運動前の A-mix 摂取により運動後の脂肪分解が促進されることが示唆された。またケトン体は、FFA の酸化により産生されるアセチル-CoA が肝臓の hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) サイクル中に反応して生じる (McGarry & Foster, 1980) ため、脂肪組織からの脂肪酸化量を推定する指標として扱われる。このことから、運動前の A-mix 摂取は、肝臓のケトン体生成を刺激することで、少なくとも部分的には運動中の脂肪酸化の増加をもたらしていることが示唆された。さらに、これらに伴う呼気から算出される脂質酸化量が上昇傾向にあることから、運動前の A-mix 摂取は運動後において、糖よりも脂質の導入を促進することが示唆された。

これまでの報告により、アドレナリンおよびグルカゴンは、cAMP を共通作用因子とすることが示唆されている (Blecher et al., 1969)。cAMP カスケードは、HSL の活性化、およびその後の脂肪組織におけるトリアシルグリセロールの加水分解に重要な役割を果たす (Bahr et al., 1990)。本研究課題 1 における運動前の A-mix 摂取による、運動中および運動後の血中アドレナリン濃度、および運動後血中グルカゴン濃度の有意な上昇は、cAMP 依存性ホスホキナーゼ活性および運動によって誘導される HSL 活性を介した脂肪分解および脂肪燃焼が、

ラセボ摂取と比較して増加し得ることを示唆している。実際に HSL が関連しているという点については、さらなる *in vivo* 試験が必要である。

グルカゴン、インスリン、カテコールアミン、成長ホルモン、およびコルチゾルを含むいくつかのホルモンのバランスは、安静時および運動中の両方で、脂質酸化において重要な役割を果たすことが報告されている (Wasserman et al., 1988; Wolfe et al., 1986)。本研究課題 1 では、A-mix の摂取により、運動中および運動後のカテコールアミン濃度、特にアドレナリンの有意な増加が観察された。カテコールアミンは血中のチロシンから合成される。チロシンの前駆体であるフェニルアラニンは、カテコールアミン合成における律速段階を触媒する酵素であるチロシンヒドロキシラーゼの基質である (Fernstrom & Fernstrom, 2007)。チロシンとフェニルアラニンを含んでいないアミノ酸混合物は、げっ歯類とヒトの両方で血中チロシンとフェニルアラニン濃度を急速に枯渇させると報告されており (Gijssman et al., 2002; McTavish et al., 2001; Moja et al., 1996)、ラットの脳のチロシン濃度を低下させるとの報告がある (McTavish et al., 1999a)。さらにいくつかの報告は、チロシンおよびフェニルアラニンを含んでいないアミノ酸混合物を投与すると、血漿カテコールアミン前駆体と他の競合するアミノ酸との比が低下することも示している (Gijssman et al., 2002; McTavish et al., 1999a, 1999b, 2001)。これらを勘案すると、A-mix 摂取の中でも特にフェニルアラニン含量が、血液中のアドレナリンの濃度を増加させる上で重要な役割を果たしている可能性がある。

運動と組み合わせたアミノ酸摂取は、成長ホルモンおよびインスリン様成長因子を増加させることによって脂肪酸化を促進することが報告されている (Elam, 1988; Zajac et al., 2010)。具体的には、1.5 g の L-アルギニン摂取は、成

長ホルモンの分泌を刺激したことが報告されている (Suminski et al., 1997)。しかしながら、本研究課題 1 では、血中成長ホルモン濃度において A-mix とプラセボを比較して有意差は認められなかった。このことから、A-mix の摂取は成長ホルモン非依存性経路を介して、脂質酸化を刺激することを示していると考えられる。

本研究課題 1 にはいくつかの強みがある。第一に、探索的な試験ではあるもののプラセボ対照ランダム化二重盲検クロスオーバー比較試験のデザインを採用しており、結果の信頼性は高い。第二に、アミノ酸の摂取用量が市販のサプリメントと同量であることから、本研究課題 1 による結果は今後の汎用的使用につながる可能性がある。一方で、いくつかの限界も存在する。第一に、試験参加者が健常男子大学生 10 名を対象としていることが挙げられ、データの一般化可能性は必ずしも高くない。第二に、運動習慣がある男性大学生を対象とした試験であり、運動習慣がない者、あるいは女性を対象とした応答については、本研究課題 1 の結果と同様の結果が得られるかどうか、さらなる検討が必要である。

本研究課題 1 から導かれた結論を Figure 4 にまとめた。A-mix の運動前摂取は、運動期間中のアドレナリンの分泌を有意に促進し、運動後にグルカゴンを分泌させた。さらに、運動中および運動後の脂肪分解および脂質酸化、特に肝臓におけるケトン体生成を有意に増加させた。これらのことから、運動前の A-mix 摂取において、運動時のエネルギー基質として脂質酸化を促進することが示唆された。

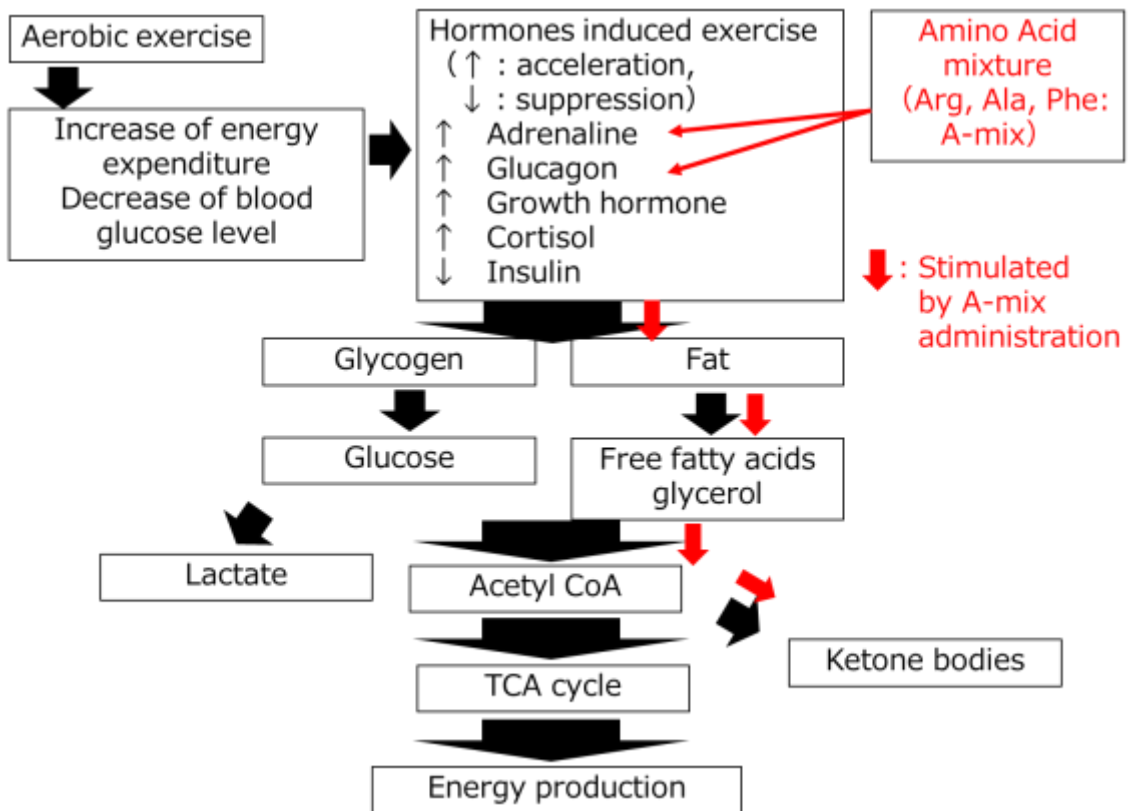


Figure 4. Graphic summary of study 1 (Ueda et al., 2017c)

V. 研究課題 2

1. 諸言

研究課題 1 において、運動負荷時の脂質代謝の反応性が高いと考えられる運動習慣をもつ男子大学生を対象とし、A-mix の運動前摂取による応答を検討した (Ueda et al., 2017c)。一方で、肥満やメタボリックシンドロームの罹患者では、基質である脂肪と炭水化物の選択スイッチが働きにくく、代謝的柔軟性が低い状態にあると言われている (Goodpaster & Sparks, 2017)。具体的には、肥満者では健常者と比較して脂肪組織からの遊離脂肪酸の放出と、血液から脂肪組織へのトリグリセリドの取込の両方向の流れが低下しており、食事由来の脂肪酸が脂肪組織に貯蔵されずに循環し、他の組織に異所的に蓄積することが報告されている (Goodpaster & Sparks, 2017)。そのため、健常者と肥満者では A-mix の運動時の代謝応答が異なることが懸念される。

そこで、本研究課題 2 では運動習慣のない中年過体重者を対象とし、A-mix の単回摂取と運動を組合せることによる脂質代謝応答を検討した。

運動時の糖質あるいは脂質のエネルギー供給率の関係から、40~60% VO₂max の低~中強度運動が体脂肪を減らすには最適であると考えられているのは、研究課題 1 の緒言で述べた通りである。さらに、これまでの横断的研究では、運動時の脂質からのエネルギー供給率が最大になるのは、VO₂max の 42% であることが報告されている (Dériaz et al., 2001)。そこで、本試験では、運動強度を低強度運動に相当する VO₂max 40% 強度と設定し、運動時間を 60 分間とした試験を実施した。

2. 方法

(1) 試験デザイン

本研究課題 2 は、プラセボ対照ランダム化二重盲検クロスオーバー比較試験である。チヨダパラメディカルケアクリニック（東京）にて、2015 年 6～8 月に実施した。本研究課題 2 は、明治臨床試験倫理審査委員会の審査承認後、チヨダパラメディカルケアクリニック臨床試験審査委員会での審査承認を得た試験計画書に基づいて実施した。また、試験参加者に対しては、試験に先立ち研究の趣旨について説明し、同意後でも同意撤回が可能である旨の文書を渡すなど、倫理的配慮のもとに実施した。本研究課題 2 は UMIN 登録を試験参加者募集前に実施した。付与番号は UMIN000018161 であった。

(2) 試験参加者

運動習慣がなく過体重 ($25 \leq \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$) の中年男性 (30 歳以上 50 歳以下) を対象とし、計 33 名を募集した。運動習慣は、30 分以上の運動を週 2 回以上、かつ 1 年以上実施していること (厚生労働省, 2016) と定義した。33 名に対して事前検査 (Visit 1) を実施し、下記の除外条件のいずれの項目も満たさない者 11 名を、本研究課題 2 の試験参加者とした。

除外基準は以下の 9 項目である。1) 重篤な既往歴のある者および罹患者。2) アルコール多飲者 (具体的には 1 日あたり 2 単位 (アルコールとして 40 g、ビール中瓶 2 本 (1 L)、日本酒 2 合 (360 mL)) 以上を毎日摂取している者。3) 喫煙者。4) 食生活が極度に不規則な者。5) 交代勤務制勤務者および深夜勤務者。6) 試験に影響を及ぼす薬剤、健康食品およびサプリメントを日常的に服用・摂取している者。具体的には、コレステロール低下作用、中性脂肪上昇抑制作

用、体脂肪低減作用を標榜する医薬品および食品類。7) 直近6ヶ月以内に献血を行った者。8) フェニルケトン尿症および高フェニルアラニン血症の者。9) その他、事前の一般血液検査と尿検査結果より、試験責任医師の判断によって試験参加者として不適と判断された者。

(3) ランダム化および盲検性の維持

体重を層別因子とし、試験参加者を A-mix 先行群、あるいはプラセボ先行群の2群にランダムかつ1:1に割り付けた。具体的には、試験参加者の平均体重である76.0 kg以上/未満で層別した。割付責任者は、現場スタッフや試験参加者と直接関わらない者とし、パーソナルコンピュータで割付表を作成した。割付表は、試験参加者に試験食品を送付する責任者によって保管され、その責任者は計画、登録、評価、および調査に関与しなかった。試験参加者、介入者、現場スタッフは割付に関わっておらず、盲検性が維持されていた。割付表は最終のデータが固定された後に開封された。

(4) 介入内容

(i) 試験食品

株式会社 明治研究所内にて、L-アラニン、L-アルギニン、L-フェニルアラニンを混合し A-mix を作製した。この A-mix をカプセルへ封入した食品（被験食品）と、デキストリンをカプセルに封入した食品（プラセボ食品）を試験食品として用いた。本研究課題2で使用したすべてのアミノ酸は、協和発酵バイオ株式会社で製造された食品添加物を用いた。デキストリンは、松谷化学工業株式会社で製造された食品を用いた。カプセルに封入する A-mix、デキストリンは

各々3 g であり、試験食品から摂取可能なエネルギー量は 12 kcal であった。試験食品は、試験当日、自転車運動開始 30 分前に 50 mL の水で 1 回、かまずに摂取させた。

(ii) 試験スケジュールおよび測定内容

本研究課題 2 の試験スケジュールを Figure 5 に示した。来院は計 3 回であった。Visit 1 では試験の説明と同意の取得後、身長計 (AD-6351) および体重計 (Lookin' Body 3.2, バイオスペース) を用いて、身長と体重を測定した。また、医師の問診後に採血、採尿を実施した。さらに、エアロバイク (75XL-III, コナミスポーツ株式会社) を用い、漸増 (8W/分) 自転車運動を実施し、75%最大心拍数までの時間 (physical work capacity: PWC75%HRmax) を測定した。心拍はエアロバイクに付随する脈拍計により測定した。PWC75%HRmax を体重で除した数値を用い、VO₂max を推測した (Gore et al., 1999)。さらに事前アンケートで既往歴、アレルギーの有無、医薬品・健康食品摂取状況、飲酒・運動習慣等の確認を実施した。各試験参加者の最大心拍数は以下の式を用いて算出した。

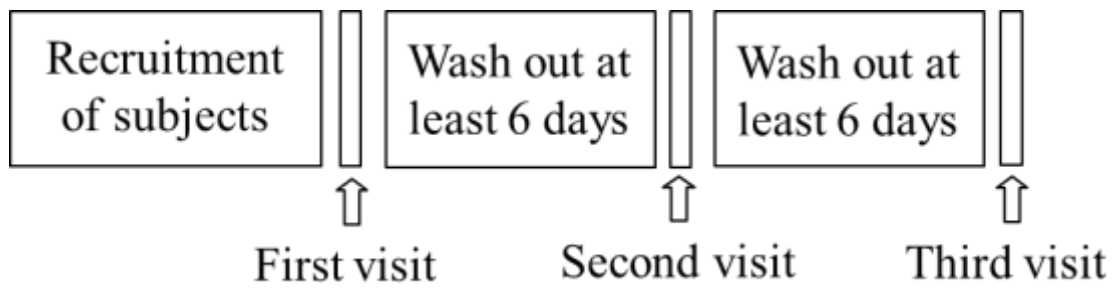
試験参加者の最大心拍数算出式：最大心拍数 = 209 - 0.69 × 年齢

Visit 1 から 6 日以上の間隔をあけて試験 1 回目を実施した (Visit 2)。規定食 (炭水化物：脂質：タンパク質比=71：16：13) の摂取後、6 時間以上の絶食時間を設けた後、2 種類の試験食品のうち一方を摂取 (0 分) した。試験食品摂取から試験食品摂取 30 分後までは座位安静とした (安静期)。その後、試験食品摂取後 30 分から 90 分までの 60 分間、VO₂max の 40%の運動強度にて自転車運動を実施した (運動期)。運動実施中、脈拍を脈拍計にて測定した。運動実施後、

再度、座位安静時間を試験食品摂取 150 分後まで設けた（回復期）。採血は試験食品摂取前、試験食品摂取後 30 分、60 分、90 分、120 分、150 分に実施した。Visit 1、Visit 2 では、試験参加者の脱水対策として試験食品摂取 60 分後の採血終了後に、200 mL の水を摂取させた。

Visit 2 から 6 日以上の間隔をあけて試験 2 回目（Visit 3）を実施した。Visit 3 では Visit 2 とは異なるもう一方の試験食品を摂取し、自転車運動、採血を Visit 2 と同じスケジュールで実施した。試験期間中の運動は全て恒温恒湿室（ 21 ± 2 °C、 $45 \pm 5\%$ ）にて実施した。採取した血液の分析は、血中グリセロール濃度は株式会社イミューにて、その他の項目は株式会社 LSI メディエンスに依頼した。

A



B

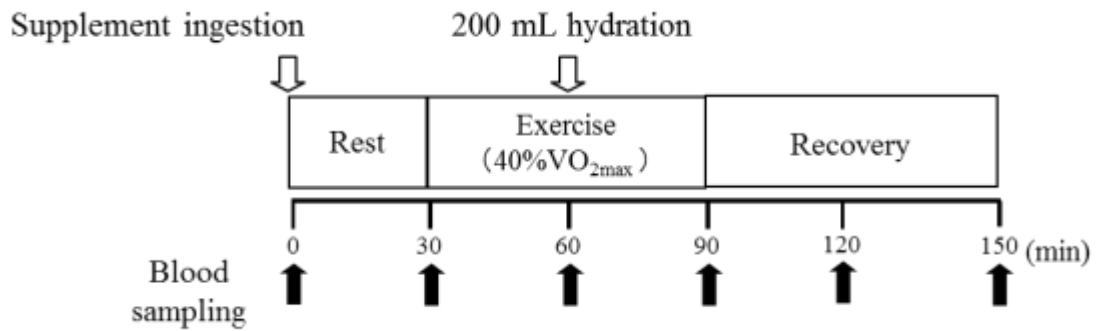


Figure 5. Study design: Study schedule (A) and schedule on experimental trial days (Visit 2 and Visit 3; B). (Ueda et al., 2017d)

(5) 評価指標、および統計解析

データの処理は Excel 2003 (マイクロソフト社) を用いて実施した。有意水準は $P < 0.05$ と定義した。各指標については、エクセル統計を用いて反復測定二元配置分散分析を行い、群の主効果と時間の主効果での交互作用の有無を検討した。交互作用を認めた項目においては、群間比較のため、Tukey 法による多重比較を実施した。また、安静時、運動時、回復時に期分けした時間帯における AUC を算出した。Stat view J-5.0 (アブカス) を用い、F 検定により等分散性を評価した後、等分散であれば対応のある t 検定、等分散でなければウィルコクソンの符号順位検定を実施した。また、相関関係の検定には、Pearson の積率相関係数および Spearman の順位相関係数の有意性検定を用いた。

主要評価項目は血中グリセロール濃度とし、副次評価項目は血中遊離脂肪酸濃度、血中総ケトン体濃度、血糖値、血中乳酸濃度、血中インスリン濃度、血中グルカゴン濃度、血中成長ホルモン濃度、血中アドレナリン濃度、血中ノルアドレナリン濃度、血中コルチゾル濃度、脈拍数とした。

3. 結果

(1) 試験参加者背景

試験参加者背景を Table 7 に示した。

Table 7. Characteristics of subjects

Age (years)	39.7 ± 5.2
Height (cm)	170.0 ± 4.4
Body weight (kg)	76.0 ± 6.1
BMI (kg/m ²)	26.3 ± 1.4
Percent fat mass (%)	24.7 ± 3.2
VO ₂ max (mL/kg/min)	32.7 ± 6.3

Values are mean ± standard deviation (n = 11), BMI, body mass index.

(2) 脈拍数

運動中の脈拍数において、反復測定二元配置分散分析では有意な時間の主効果が認められたが、交互作用は認められなかった。また、運動中の平均脈拍数は、2群間で有意差は認められなかった（A-mix : 112 ± 10 bpm、プラセボ : 108 ± 7 bpm、P = 0.16）。

(3) 生化学的指標

生化学的指標の測定結果を Figure 6 に図示し、安静期、運動期、回復期の各状態の AUC を Table 8 にまとめた。反復測定二元配置分散分析では、血中グリセロール濃度、遊離脂肪酸濃度、総ケトン体濃度、血糖値、乳酸濃度において有意な時間の主効果が認められたが、交互作用は認められなかった。総ケトン体の運動期の AUC は、A-mix 摂取群において、プラセボ摂取群と比較して、有意に高値を示した（P = 0.047）。

(4) ホルモン

ホルモンの測定結果を Figure 7 に図示し、安静期、運動期、回復期の各状態の AUC を Table 9 に要約した。反復測定二元配置分散分析では、血中グルカゴン濃

度に交互作用を認め（群の主効果、 $P = 0.60$ 、時間の主効果： $P < 0.01$ 、交互作用、 $P = 0.018$ ）、Tukey の多重比較を用いた各ポイントにおける 2 群間の比較では、30 分において有意差が認められた ($P < 0.05$)。さらに、グルカゴン濃度の運動期中の AUC は、A-mix 摂取の方がプラセボ摂取よりも有意に高値を示した ($P = 0.026$)。血中インスリン濃度、アドレナリン濃度、ノルアドレナリン濃度、およびコルチゾル濃度において、反復測定二元配置分散分析では有意な時間の主効果を認めたが、交互作用は認められなかった。また、各 AUC においても、どの時間帯においても群間で有意差は認められなかった。

さらに、A-mix 摂取による運動時間中の総ケトン体濃度上昇のメカニズムを考察するため、血中グルカゴン/インスリン濃度比と総ケトン体濃度比の相関を確認した。試験参加者全体 ($n = 22$) の血中グルカゴン/インスリン濃度比、および総ケトン体濃度比分布は不等分散であった。Pearson の相関係数の有意検定の結果、中程度の正の相関が確認され、有意性が認められた ($r = 0.44$ 、 $P = 0.038$)。一方、Spearman の相関係数の有意性検定の結果では、中程度の正の相関が認められたが有意性は認められなかった ($r = 0.31$ 、 $P = 0.16$ 、Figure 8A)。層別解析として、A-mix 摂取時 ($n = 11$)、Placebo 摂取時 ($n = 11$) についても検定を実施した。A-mix および Placebo 摂取時の血中グルカゴン/インスリン濃度比、および総ケトン体濃度比分布はともに不等分散であった。A-mix 摂取時、Pearson の相関係数の有意検定の結果、中程度の正の相関が確認されたが有意性は認められなかった ($r = 0.60$ 、 $P = 0.050$)。一方、Spearman の相関係数の有意性検定の結果では、低い相関が認められたが有意性は認められなかった ($r = 0.25$ 、 $P = 0.45$ 、Figure 8B)。Placebo 摂取時、Pearson の相関係数の有意検定の結果、相関は認められなかった ($r = 0.091$ 、 $P = 0.79$)。一方、Spearman の相関係数の有意性検定の

結果では、中程度の正の相関が認められたが有意性は認められなかった ($r = 0.40$ 、 $P = 0.22$ 、Figure 8C)。

Table 8. Effects of amino acid mixture on the AUC for biochemical parameters

	Rest (0–30 min)				Exercise (30–90 min)				Recovery (90–150 min)			
	A-mix	Placebo	P*	d	A-mix	Placebo	P*	d	A-mix	Placebo	P*	d
Glycerol (min·mg/L)	97 ± 18	94 ± 33	.77	.14	473 ± 154	411 ± 154	.33	.40	481 ± 164	418 ± 187	.28	.36
FFAs (min·mEq/L)	14.0 ± 4.1	12.2 ± 3.8	.29	.45	39.0 ± 14.8	34.4 ± 10.9	.38	.36	55.7 ± 16.6	49.6 ± 16.3	.28	.37
Total ketone bodies (min·mmol/L)	3.83 ± 3.26	2.26 ± 2.12	.051	.57	10.0 ± 8.08	5.49 ± 5.79	.047	.65	28.2 ± 23.3	17.5 ± 18.3	.094	.51
Glucose (min·g/L)	25.3 ± 1.5	25.8 ± 1.1	.17	.35	47.3 ± 3.1	47.0 ± 3.1	.74	.083	46.4 ± 4.1	46.2 ± 2.7	.85	.055
Lactate (min·g/L)	3.00 ± 1.25	2.74 ± 0.95	.46	.23	10.5 ± 5.2	9.53 ± 3.35	.27	.22	6.78 ± 2.35	6.49 ± 1.66	.59	.14

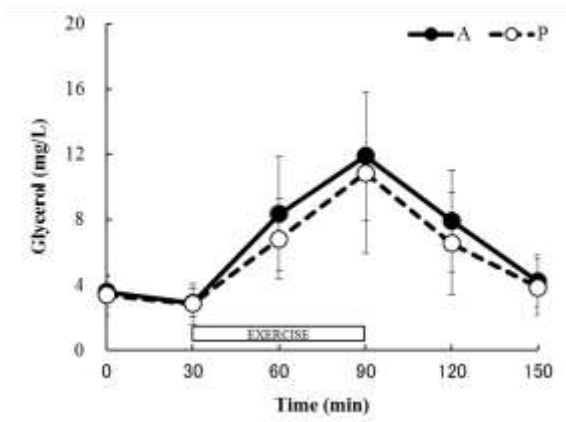
Values are mean ± standard deviation (n = 11). *P value for the paired-sample t test if data were normally distributed and the Wilcoxon signed-rank test if not. FFA, free fatty acids.

Table 9. Effects of amino acid mixture on the AUC for circulating hormones

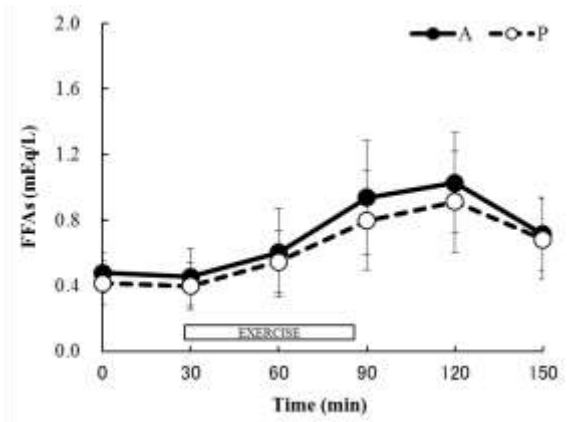
	Rest (0–30 min)				Exercise (30–90 min)				Recovery (90–150 min)			
	A-mix	Placebo	P*	d	A-mix	Placebo	P*	d	A-mix	Placebo	P*	d
Glucagon (min·µg/L)	4.59 ± 1.39	4.14 ± 1.06	.064	.36	9.97 ± 2.79	9.10 ± 2.42	.026	.33	9.94 ± 3.05	9.57 ± 2.59	.24	.13
Insulin (min·mU/L)	168 ± 81	160 ± 93	.62	.099	221 ± 112	221 ± 108	.96	.0075	215 ± 110	213 ± 101	.93	.023
Adrenalin (min·µg/L)	0.71 ± 0.29	0.72 ± 0.42	.85	.038	2.99 ± 1.10	3.14 ± 1.95	.74	.095	2.39 ± 1.66	2.29 ± 1.55	.85	.060
Noradrenalin (min·µg/L)	8.17 ± 1.19	8.58 ± 2.42	.66	.22	30.6 ± 8.3	32.2 ± 14.0	.48	.14	23.9 ± 6.8	23.4 ± 8.2	.72	.069
Growth hormone (min·µg/L)	13.7 ± 21.7	7.31 ± 6.77	.86	.40	94.5 ± 89.9	86.7 ± 55.7	.73	.10	83.8 ± 78.9	76.9 ± 45.1	.75	.11
Cortisol (min·mg/L)	2.42 ± 0.60	2.10 ± 0.37	.061	.65	4.44 ± 1.35	4.47 ± 0.90	.90	.032	4.31 ± 1.87	4.65 ± 2.46	.60	.16

Values are mean ± standard deviation (n = 11). *P value for the paired-sample t test if data were normally distributed and the Wilcoxon signed-rank test if not.

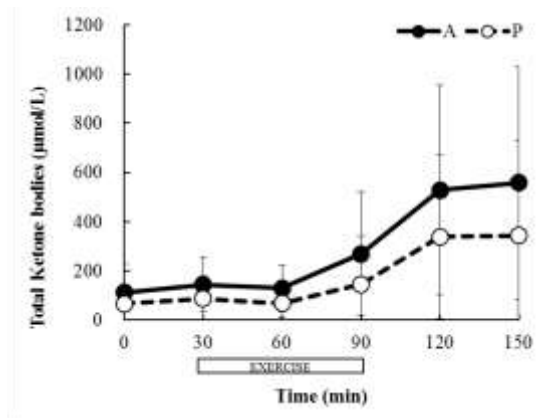
A



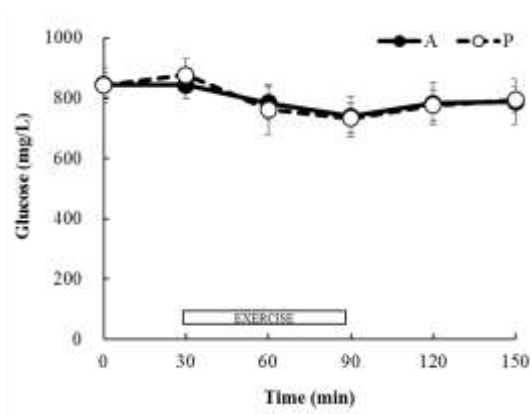
B



C



D



E

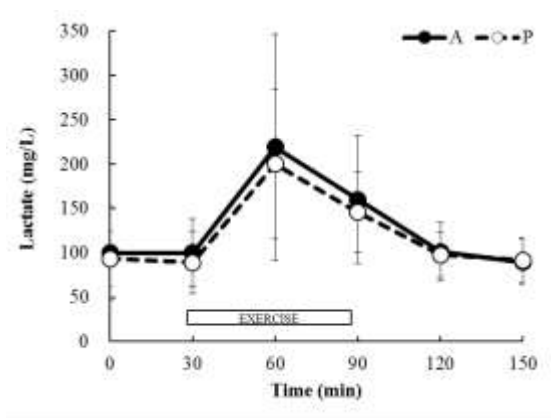


Figure 6. Concentrations of biochemical parameters assessed during the experimental trials: glycerol (A), FFAs (B), total ketone bodies (C), glucose (D), and lactate (E). Values are mean \pm standard deviation ($n = 11$). A, A-mix treatment; FFAs, free fatty acids; P, placebo treatment. (Ueda et al., 2017d)

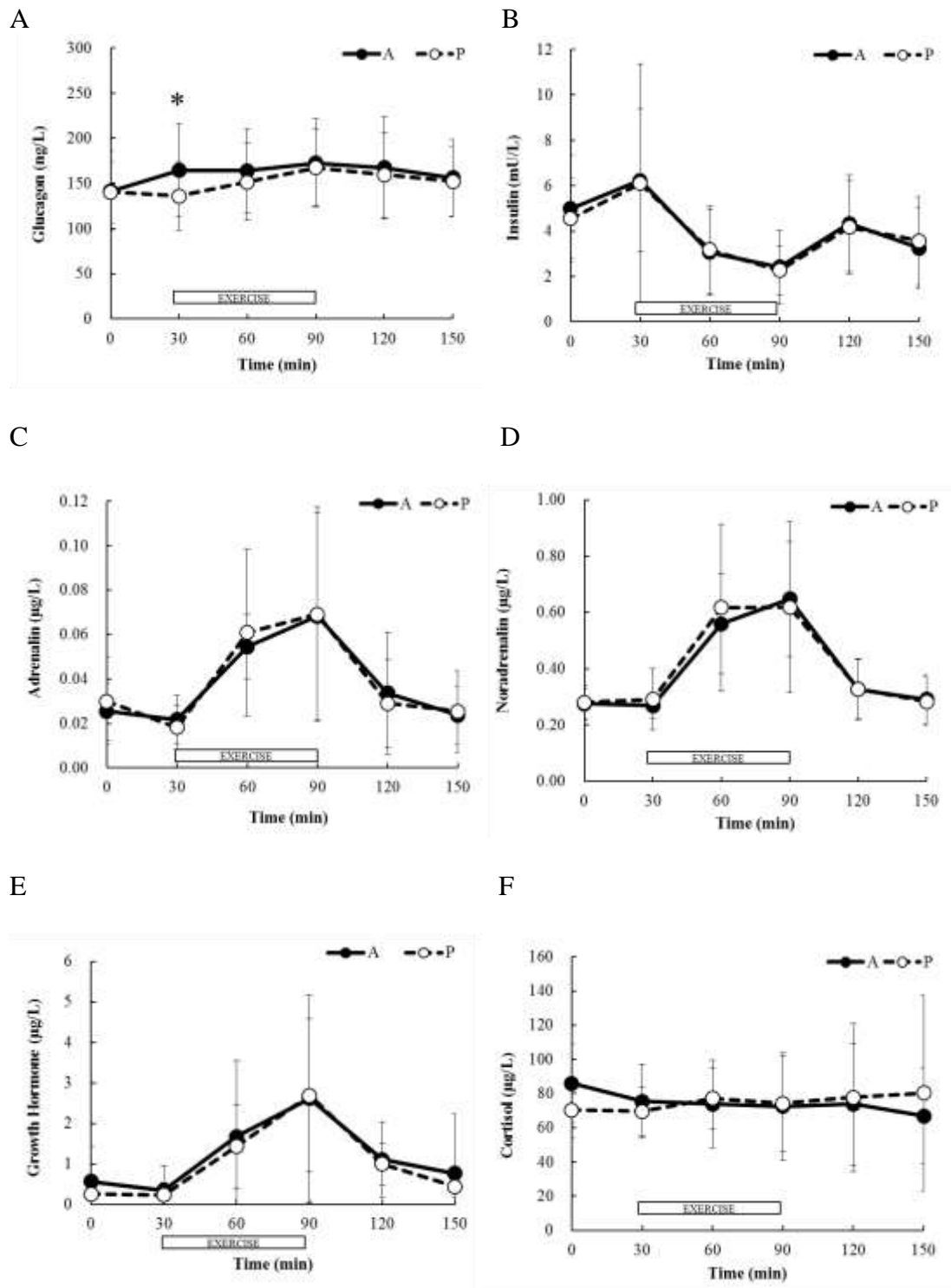
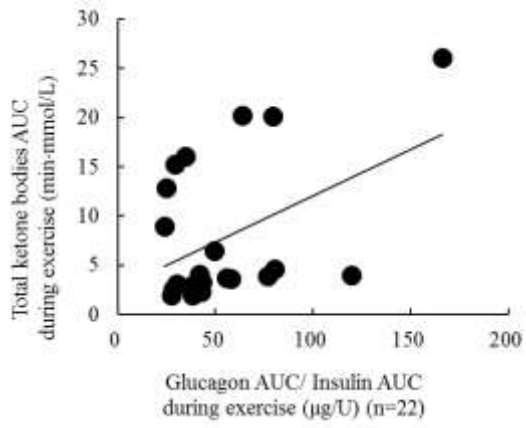
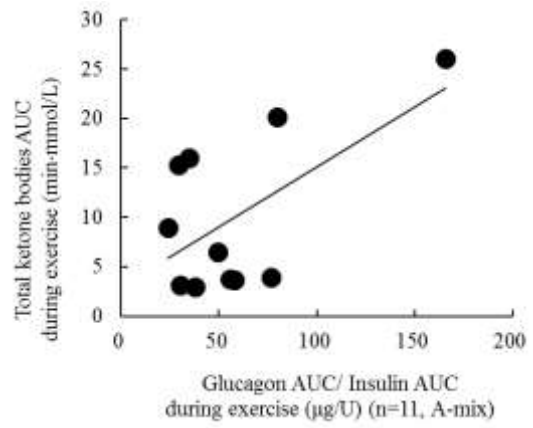


Figure 7. Concentrations of circulating hormones during the experimental trials: glucagon (A), insulin (B), adrenaline (C), noradrenaline (D), growth hormone (E), and cortisol (F). Values are mean \pm standard deviation ($n = 11$). A, A-mix treatment; P, placebo treatment. (Ueda et al., 2017d)

A



B



C

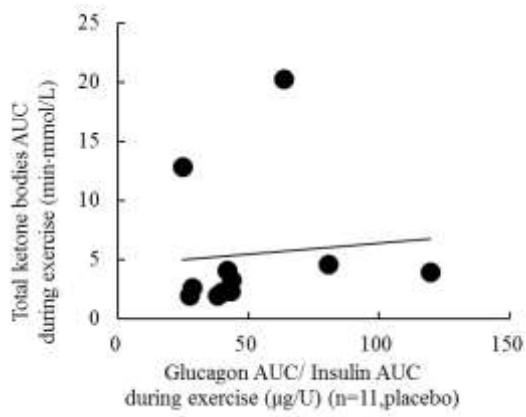


Figure 8. Correlation between total ketone bodies AUC and ratio of glucagon/insulin during exercise: total (A), A-mix (B), and placebo (C), respectively. AUC, area under the curve. (Ueda et al., 2017d より引用、改変)

4. 考察

本研究課題 2 では、定期的な運動習慣を持たない中年過体重男性に対し、低強度運動と組み合わせた際の A-mix の急性効果を検討した。A-mix の摂取により、運動中の総ケトン体濃度 AUC においてプラセボの摂取と比較して有意な上昇が認められた (Table 8)。前述の通り、FFA の酸化により産生されるアセチル-CoA は、肝臓の HMG-CoA サイクル中に反応によってケトン体を生じる

(McGarry & Foster, 1980) ため、脂肪組織からの脂肪酸化量をケトン体生成量から推定することができる。したがって、A-mix の摂取が肝臓のケトン体生成を刺激することで、少なくとも部分的には運動中の脂肪酸化の増加をもたらし得ることを示唆している。さらに、A-mix の摂取は、血液中のグルカゴン濃度を有意に増加させ (Table 9)、さらに[グルカゴン]:[インスリン]比は、運動中のケトン体 AUC と正の相関を示した (Figure 8A, B)。したがって、A-mix 摂取によるケトン体生成の促進は、グルカゴン分泌の増加を介していると推察される。

本研究課題 2 において、A-mix 摂取後、運動中のケトン体濃度がプラセボ摂取と比較して有意に増加し、運動中の[グルカゴン]:[インスリン]比がケトン体 AUC と正相関することが示唆された (Figure 8)。McGarry & Foster (1980) は、[グルカゴン]:[インスリン]比の上昇が、脂肪酸の酸化およびケトン生成の活性化に付随するマロニル-CoA の生成および脂質生成を抑制することを報告している。さらに、肝カルニチンおよび脂肪アシル-CoA 含量の増加は、 β -酸化およ

びアセト酢酸および3-ヒドロキシ酪酸のようなケトン体の生成をさらに促進させると報告した。したがって、[グルカゴン]:[インスリン]比を増加させることは、肝臓の脂肪酸の酸化およびケトン体の生成を制御するための重要な因子である。

グルカゴン、インスリン、カテコールアミン、成長ホルモン、コルチゾルなどのいくつかのホルモンのバランスは、安静時と運動中の両方で、脂質酸化に重要な役割を果たすことは研究課題1でも論じた。さらに、研究課題1では、A-mixを摂取すると、運動中および運動後の両方で、カテコールアミン、特に血中アドレナリン濃度が有意に上昇することを示唆した。しかしながら、本研究課題2では、両群間でアドレナリンおよびノルアドレナリン濃度の有意差は認められなかった。血中アドレナリン濃度は、運動強度とともに増加することが報告されている (McMurray et al., 1987)。これらを勘案すると、研究課題1で確認された血中アドレナリン濃度の上昇は、運動強度の影響が大きく、A-mix摂取による運動に伴う脂肪分解促進効果は、グルカゴン分泌刺激に拠ることが大きい可能性が示唆された。

本研究課題2にはいくつかの強みがある。第一に、本研究課題2はプラセボ対照二重盲検クロスオーバーランダム試験の研究デザインを採用したため、結果の信頼性が高い。第二に、本研究課題2では低強度の運動 (VO_2max の40%) を採用した。高強度運動中は主に炭水化物を基質として用い、低～中程度の運動は脂質を主な基質として利用すると報告されている (Romijn et al., 1993)。さ

らに、低強度運動は高強度運動よりも実施しやすく、運動習慣がない者にとっても応用できる可能性が高いと考えられる。したがって、低強度運動時に脂肪動員を促進するサプリメントは、運動習慣がない者に対し、運動を行う動機付けになる可能性がある。

対照的に、いくつかの限界点も存在する。第一に、本研究課題2では全身における酸素摂取量とエネルギー消費量を測定していない。したがって、本研究課題2で認められた血中ケトン体濃度の上昇が、脂質の酸化物として全身の呼吸代謝にまで影響しているかについては不明なままである。第二に、本研究課題2では11名の中年男性を対象とした。特に女性を含む過体重者において、同様の知見を得ることができるのかについては、さらなる検討が必要である。

結論として、A-mixの運動前摂取は、運動時のグルカゴン分泌を有意に促進させ、脂質酸化、特に肝臓におけるケトン体生成を有意に増加させた。これらのことから、運動前のA-mix摂取は、中年過体重男性において、運動時のエネルギー基質として脂質酸化を促進させることが示唆された。

VI. 研究課題 3

1. 諸言

これまでの研究課題 1、2 より、運動前の A-mix 単回摂取が、その後に実施する運動中の肝臓でのケトン体生成、およびそれに伴う運動後の脂質酸化を促進することがヒトにおいて示唆された (Ueda et al., 2017c, 2017d)。これらのことから、A-mix 摂取後に一定時間、一定強度の運動を負荷するような介入を継続した場合、体脂肪低減効果が期待できる。しかしながら、長期的な摂取効果を検討するためには、運動介入をより実生活に落とし込んだ形で実施する必要がある。普段の生活の中で運動を継続的に実施することは容易ではないことから、より実施可能性の高い身体活動増加の啓発と併用することで、長期的な摂取効果を検討することとした。

身体活動増加の啓発方法として、「健康づくりのための身体活動指針 (アクティブガイド)」(厚生労働省, 2013) に含まれる「+10 (プラステン)」、すなわち、「今より 10 分多く体を動かしましょう」という身体活動啓発方法に着目した。「+10」を実施できれば、死亡リスクを 2.8%、生活習慣病発症リスクを 3.6%、がん発症リスクを 3.2%、ロコモ・認知症の発症リスクを 8.8% 低下させることができること示唆されている (Miyachi et al., 2015; Murakami et al., 2015)。また、Church et al. (2007) は、座位活動が中心の過体重または肥満の閉経後女性 464 名を対象に、持久性体力改善をアウトカムとした RCT を行っており、週あたり

体重 1 kg あたり 4 kcal の運動を行うことで、対照群と比較し、最高酸素摂取量が 4.2%、有意に改善することを報告している。4 kcal/kg の運動時間は週 72.2 分であり、1 日あたり約 10 分である。したがって、上述したアクティブガイドで推奨されている「+10」を実施できれば、持久性体力の改善も期待できる。

「+10」はおよそ 1,000 歩に相当することから、「歩数を 1,000 歩増やす」という身体活動増加の啓発と共に、A-mix 含有飲料を 12 週間連続摂取した際の体脂肪低減効果を、成人過体重男女を対象として検討することとした。本研究課題 3 では、A-mix 含有量の有効用量を推定するため、用量の異なる 3 つの被験食品とプラセボ食品とを比較する予備的な RCT を実施した。

2. 方法

(1) 試験デザイン

本研究課題 3 は、探索的なプラセボ対照二重盲検並行群間ランダム化比較試験である。研究実施場所は茨城県水戸市の公的な会議室等とし、2016 年 1～5 月に実施した。目標試験参加者数は 80 名（20 名×4 群）とした。これは、各群 20 名の 2 群比較であれば、効果量（Cohen's d）0.9 程度の差を有意水準 5%、検出力 80% で検出することが可能であるからである。選択基準への不合致、除外基準への合致を考慮し、スクリーニング人数を 100 名と計画した。本研究課題 3 のプロトコルは、筑波大学医の倫理委員会、明治臨床試験審査委員会にて承認を受け、実施した。試験参加者として組み入れる前に、試験参加について書

面にて同意を得た。本研究課題3はUMIN登録を試験参加者募集前に実施した。
付与番号はUMIN000019870であった。

(2) 試験参加者

試験参加者は、試験実施施設の近隣住民に配布される地域情報誌等の広告により募集した。選択基準は20歳以上、65歳未満の男女で、BMIが25.0以上30.0未満に該当する者とした。除外基準は以下の9項目である。1) 重篤な既往歴のある者または罹患者。2) アルコール多飲者。具体的には1日あたり2単位（アルコールとして40g、ビール中瓶2本（1L）、日本酒2合（360mL））以上を毎日摂取している者。3) 過度の喫煙者。具体的には1日あたり2箱（40本）以上を毎日摂取している者。4) 交代勤務・深夜勤務等、食生活が極度に不規則な者。5) 妊娠あるいは授乳中の者、または試験期間中に妊娠を希望する者。6) 試験に影響を及ぼす可能性のある薬剤、健康食品またはサプリメントを日常的に服用・摂取している者、あるいは過去6ヶ月間、日常的に服用・摂取していた者。具体的には、コレステロール低下作用、中性脂肪上昇抑制作用、体脂肪低減作用を標榜する医薬品または食品類とオリゴ糖を含む食品類。7) フェニルケトン尿症または高フェニルアラニン血症の者。8) 現在、他の臨床試験に参加している者あるいは過去6ヶ月間他の臨床試験に参加していた者。9) その他、事前の一般血液検査と尿検査結果より、試験責任医師の判断によって試験参加者として不適と判断された者。

(3) ランダム化および盲検性の維持

性別を層別因子として、選択基準に合致し、除外基準に合致しなかった試験参加者を4群にランダムかつ1:1:1:1に割り付けた。割付責任者は、現場スタッフや試験参加者と直接関わらない者とし、パーソナルコンピュータで割付表を作成した。割付表は、試験参加者に試験食品を送付する責任者によって保管され、その責任者は計画、登録、評価、または調査に関与していなかった。試験参加者、介入者、現場スタッフは割付には関わっておらず、盲検性が維持されていた。割付表は、最終データが固定された後に開封された。

(4) 介入内容

(i) 試験食品

試験食品は500 ml ペットボトル飲料であり、1本あたりのA-mix含有量を3,000 mg（高用量群）、1,500 mg（中用量群）、750 mg（低用量群）、0 mg（プラセボ群）とした。試験食品は外観、性状ともに同一であった。試験食品のエネルギー量は、26 kcal（高用量群）、20 kcal（中用量群）、17 kcal（低用量群）、14 kcal（プラセボ群）であった。試験参加者には高温多湿と直射日光を避けて試験食品を保存すること、および自由生活下の身体活動や運動時に1日1本試験食品を摂取するように指示した。

(ii) 身体活動啓発

群の割付に関係なく、試験参加者は12週間の介入期間中、月1回の身体活動啓発の講義に参加した(全3回の講義)。介入内容は集団講義と個別の助言で構成した。身体活動の啓発としては、前述の通り、介入当初の歩数より1,000歩の増加、あるいはそれ以上を目標とするように指導した。集団講義では30分の講義と60分のグループワーク(ウォーキング、筋力トレーニング、ストレッチを含む)を実施した。リストバンド型活動量計Fitbit flex(サンフランシスコ、アメリカ合衆国)を配布し、各自のスマートフォンで日々の歩数を確認できるようにした。日誌を配布し、体重、試験食品摂取状況、体調、服薬状況、食事内容、歩数、および運動状況を記載させ、その内容に基づいて、個別指導として専門家が助言した。生活環境の変化の影響を受けにくくするため、日常範囲を大きく逸脱する過度な運動、摂食や過食を制限するように指示した。

(iii) 安全性評価および有害事象

血液学的検査、血液生化学的検査、および尿検査をベースライン検査と12週目の検査にて実施した。同検査日に、医療関係者による健康状態の確認および問診を実施した。

有害事象の発現は、試験参加者の日誌、問診内容、血液学的検査、および血液生化学的検査の解析結果より確認した。今回の試験では、有害事象を試験食品が摂取された際に起こる、あらゆる好ましくないあるいは意図しない徴候、症状、病気と定義した。試験責任医師がこれらの有害事象について、重篤度お

よび試験食品との因果関係を判断した。

(iv) 試験スケジュールおよび測定内容

すべての評価項目は、ベースライン時と 12 週目に測定した。なお、測定は群分けの情報を知らされていない経験豊富なスタッフが実施した。主要評価項目は 12 週間での腹部脂肪面積変化量とした。副次評価項目は体重、体脂肪率、ウエストおよびヒップ周囲径、および血中脂質因子、血糖因子、血圧などの代謝危険因子とした。介入内容の遵守状況を把握するため、食事調査および身体活動量調査をベースライン時と 12 週目に実施した。

(iv) -1 体組成

体重(最小単位 0.05 kg)はデジタル体重計(WB-150, タニタ株式会社, 東京)にて測定した。体脂肪率(最小単位 0.1%)は多周波生体電気インピーダンス装置(InBody 430, バイオスペース, ソウル, 韓国)を用いて測定した。身長(最小単位 0.1 cm)はデジタル身長計(213; Seca, ハンブルク, ドイツ)を用い、ベースライン時に測定した。BMIは体重(kg) ÷ 身長² (m²)から算出した。ウエスト周囲径は、臍位を最小単位 0.1 cmとして2回測定した。測定には柔らかいプラスチックタイプのメジャーを用い、立位にて測定した。解析には2回の平均値を用いた。

(iv) -2 腹部脂肪

腹部脂肪面積はCT(ECLOS, 日立ヘルスケア・マニュファクチャリング、東

京)を用いて臍位で測定し、解析には市販のソフトウェア (Fat Scan, N2system, 大阪)を用いた。

(iv) -3 血圧

収縮期および拡張期血圧は自動血圧計 (自動血圧計 HEM-7430, オムロンヘルスケア, 京都)を用い測定した。試験参加者は5分以上の休憩を挟み、座位において心臓と同じ高さに支持した腕を用い測定した。解析には2回の平均値を用いた。

(iv) -4 血液生化学

採血は一晩絶食 (12時間以上)の後に実施した。静脈血を独立した研究所 (LSIメディエンス, 東京)にて測定した。

(iv) -5 食事摂取量

グラム単位の微量栄養素およびキロカロリー単位の総摂取エネルギー量を、3日間の食事記録から評価した。試験参加者は平日2日、休日1日を含む3日間の食事摂取量を記録するように指示された。食事の量は一般的なグラス、スプーン、デジタルスケールで計量された。食事記録は来院時に持参し、記載の内容についてスタッフが確認を行った。食事内容は食事記録をもとに、管理栄養士がオールガイド食品成分表 2010 (実教出版株式会社, 東京)、およびエクセル栄養君®Ver.6.0 (株式会社 建帛社, 東京)を用いて熱量と各栄養成分摂取量を算出した。

(iv) -6 身体活動量

身体活動量は3軸加速度計（Active style Pro HJA-750C, オムロンヘルスケア）を用いて測定し、装着期間は7日間とした。加速度計は歩数と身体活動の強度（表現型としてはMETs）を内蔵されたアルゴリズムにより測定した。この機器は、睡眠中、水を使う活動中（入浴や水泳）、および接触のある運動に参加する時間は装着しなかった。得られた結果は、10時間/日以上着用された場合のみ記録として採用し、その記録が1日以上存在する場合、歩数と中～高強度の身体活動時間（>3 METs）を試験参加者毎に算出した。

(5) 評価指標および統計解析

本研究課題3では、ランダムに割り付けられ、試験食品を一度でも摂取したすべての試験参加者を、intention-to-treat（ITT）解析による有効性解析対象集団とした。また、per-protocol-based（PPB）解析による有効性解析対象集団を、所定の試験スケジュールおよび試験内容を全て終了した試験参加者であり、以下の解析対象除外基準に該当しない者と定義した。1) 12週間後の測定データが得られなかった者。2) 試験食品の摂取率が80%を下回った者。3) 生活日誌の欠損など、検査結果の信頼性を損なう行為が顕著に見られた者。4) 除外基準に該当していたことや、制限事項を遵守できていないことが、試験開始後に明らかになった者。安全性解析対象者については、ランダムに割り付けられ、試験食品を一度でも摂取したすべての試験参加者を対象とした。

統計解析として、各群の変化量およびその95%信頼区間を記述した。仮説検

定として、一元配置分散分析を用いた ITT 解析により、12 週間の変化量を 4 群間で比較した。統計学的有意性が認められた場合の事後検定としては、Dunnett の方法を用いて、プラセボ群と高用量群、プラセボ群と中用量群、プラセボ群と低用量群との多重比較を計画した。なお、12 週間後の測定データが得られなかった場合には、ベースラインデータを 12 週間後の測定データとして補完した。また、同様の解析を PPB 解析対象集団に対しても実施した。安全性評価に関する測定結果について、各群の前後比較および変化量の群間比較を実施した。また、試験期間中に発現した有害事象および副作用について、症状、程度、頻度を集計、評価し、カイ二乗検定にて群間比較を実施した。

主要評価項目は腹部脂肪面積であった。主な副次評価項目は、体重、体脂肪率、腹囲、食事量、身体活動量、中性脂肪、総コレステロール、HDL コレステロール、low-density lipoprotein (LDL) コレステロール、血糖、glycated hemoglobin A1c (HbA1c)、インスリン等であった。

3. 結果

(1) 試験参加者

本研究課題 3 の目標試験参加者数は 80 名（各群 20 名）であり、募集人数は 100 名であった。試験実施場所の近隣住民に配布される地域情報誌 4 誌、新聞 2 誌に募集記事を掲載するとともに、開発業務受託機関 2 社（株式会社パシフィックグローブ、東京；株式会社クロエ、東京）に登録されている試験参加者ボラ

ンティアからも募集した。

実際の試験参加者のフローを Figure 9 に示した。試験参加説明会において 43 名から同意を取得し、その後 42 名がベースライン検査を受けた。その結果、42 名のうち 35 名が適格基準を満たした。その 35 名を高用量群 9 名、中用量群 9 名、低用量群 8 名、プラセボ群 9 名にランダムに割り付けた。この 35 名が ITT 解析による有効性評価の対象者となった。ITT 解析対象者のベースライン時の各種検査結果を Table 10 に示した。

運動介入を経て、12 週間後の検査を完遂した試験参加者は、高用量群 8 名、中用量群 9 名、低用量群 7 名、プラセボ群 8 名の計 32 名 (91.4%) であった。脱落理由は、個人的理由が 1 名、同意撤回が 2 名であった。また、このうち試験食品の摂取率が 80% 未満だった者が各群に 1 名ずつ存在したことから、高用量群 7 名、中用量群 8 名、低用量群 6 名、プラセボ群 7 名の計 28 名が PPB 解析の対象となった。

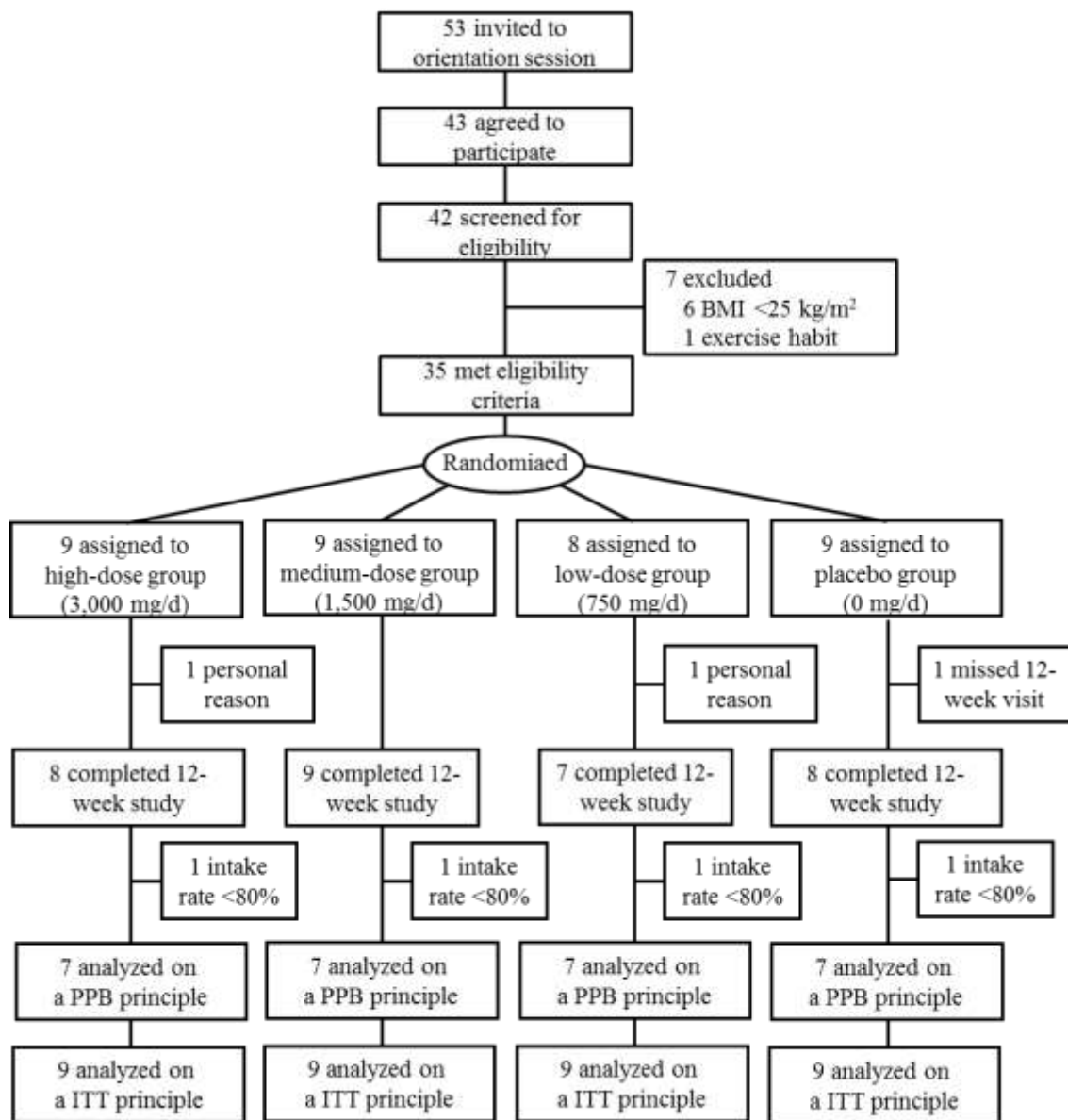


Figure 9. Flowchart of study participants.

BMI, body mass index; ITT, intention to treat; PPB, per-protocol-based. (Sasai et al., 2017)

(2) ITT 解析による有効性評価

ITT 解析による有効性評価結果を Table 11 に示した。主要評価項目である腹部脂肪面積の変化量は、総脂肪面積で高用量群-14.6 cm² (95%CI -39.6-10.4 cm²)、中用量群-25.3 cm² (95%CI -71.0-20.3 cm²)、低用量群-23.2 cm² (95%CI -48.0-1.6 cm²)、プラセボ群-12.5 cm² (95%CI -29.1-4.0 cm²) であった。また、内臓脂肪面積では高用量群-5.4 cm² (95%CI -20.6-9.8 cm²)、中用量群-12.0 cm² (95%CI -26.0-2.0 cm²)、低用量群-13.5 cm² (95%CI -32.1-5.1 cm²)、プラセボ群-4.7 cm² (95%CI -14.6-5.2 cm²) であった。拡張期血圧および HbA1c について、一元配置分散分析では有意性が認められたが、Dunnett の方法を用いた事後検定の結果、プラセボ群との有意差は認められなかった。また、その他の主要評価項目、副次評価項目のいずれについても、有意な群間差は認められなかった。食事および運動面での遵守状況を示唆する食事摂取量と身体活動量の変化については、エネルギー摂取変化量について、高用量群では 18.4 kcal/day (95%CI -389.7-426.6 kcal/d)、中用量群では 25.0 kcal/day (95%CI -510.1-560.1 kcal/d) であったのに対して、低用量群では-171.5 kcal/day (95%CI -442.1-99.1 kcal/d)、プラセボ群では-372.0 kcal/day (95%CI -846.1-102.1 kcal/d) であった。また、1 日あたりの歩数については、高用量群で 1,854 歩 (95%CI -1,538-5,246 歩)、中用量群で 196 歩 (95%CI -1,749-2,142 歩)、低用量群で 2,518 歩 (95%CI 670-5,706 歩)、プラセボ群で 284 歩 (95%CI -152-720 歩) の増加であった。

(3) PPB 解析による有効性評価

PPB 解析による有効性評価結果を Table 12 に示した。主要評価項目である腹部脂肪面積の変化量は、総脂肪面積で高用量群 -17.4 cm^2 (95%CI $-51.6-16.7 \text{ cm}^2$)、中用量群 -21.4 cm^2 (95%CI $-73.4-30.7 \text{ cm}^2$)、低用量群 -27.9 cm^2 (95%CI $-62.6-6.8 \text{ cm}^2$)、プラセボ群 -16.1 cm^2 (95%CI $-37.8-5.6 \text{ cm}^2$) であった。また、内臓脂肪面積では高用量群 6.2 cm^2 (95%CI $-27.2-14.8 \text{ cm}^2$)、中用量群 -13.2 cm^2 (95%CI $-29.2-2.7 \text{ cm}^2$)、低用量群 -16.4 cm^2 (95%CI $-43.0-10.3 \text{ cm}^2$)、プラセボ群 -6.6 cm^2 (95%CI $-19.7-6.6 \text{ cm}^2$) であった。主要評価項目、副次評価項目のいずれについても、有意な群間差は認められなかった。

(4) 安全性評価

本研究課題 3 を通して重篤な有害事象は報告されなかった。参加者の日記により合計 34 件の重大でない有害事象が報告された (Table 13)。これらの有害事象には、発熱、頭痛、歯痛、体の痛み、下痢や便秘などの一般的な消化器症状が含まれていた。同様に、第 12 週に行われた血圧測定および空腹時血液検査により、29 の異常徴候 (参照範囲外の値) が同定された (Table 14)。同定された有害事象のいずれにも群間の差異はなく、全て試験責任医師によって試験食品との因果関係はないと判断された。

Table 10. Baseline participant characteristics

	High-dose group (3,000 mg/d, n = 9)	Medium-dose group (1,500 mg/d, n = 9)	Low-dose group (750 mg/d, n = 8)	Placebo group (0 mg/d, n = 9)
Female, No. (%)	4 (44.4)	5 (55.6)	4 (50.0)	4 (44.4)
Age, years	44.3 (9.4)	39.7 (8.0)	41.9 (10.5)	46.4 (9.4)
Height, cm	165.9 (7.8)	166.8 (10.5)	164.6 (11.0)	161.9 (9.4)
Weight, kg	75.8 (9.6)	76.4 (13.4)	72.5 (12.1)	71.0 (9.1)
Body mass index, kg/m ²	27.4 (1.3)	27.2 (1.6)	26.6 (1.4)	27.0 (1.0)
Waist circumference, cm	93.8 (4.0)	95.3 (7.7)	93.4 (8.8)	95.0 (5.8)
Abdominal fat area, cm ²				
Total	300.1 (45.6)	340.0 (68.9)	326.3 (114.8)	357.2 (71.7)
Subcutaneous	197.8 (37.8)	232.5 (39.5)	196.1 (38.2)	231.4 (70.7)
Visceral	102.3 (44.0)	107.5 (50.0)	130.2 (99.6)	125.8 (32.6)
Blood pressure, mm Hg				
Systolic	134.3 (16.8)	138.9 (22.4)	130.5 (14.7)	127.3 (15.0)
Diastolic	85.0 (9.9)	86.6 (11.5)	82.4 (12.5)	82.1 (9.1)
Blood biochemical parameters				
Triglycerides, mg/dL	130.0 (66.4)	146.7 (107.1)	133.4 (106.8)	150.7 (97.6)
Total cholesterol, mg/dL	210.7 (36.9)	218.7 (35.8)	192.8 (20.9)	253.6 (55.7)
HDL-cholesterol, mg/dL	57.0 (20.9)	56.2 (9.6)	54.4 (20.6)	49.0 (11.1)
LDL-cholesterol, mg/dL	132.9 (30.5)	137.9 (38.1)	116.4 (17.6)	176.1 (47.3)
Fasting blood glucose, mg/dL	91.6 (7.2)	91.8 (7.5)	94.5 (13.6)	97.2 (10.9)
Glycated hemoglobin A1c, %	5.43 (0.23)	5.29 (0.29)	5.62 (0.89)	5.56 (0.35)
Fasting insulin, IU	9.1 (3.1)	17.2 (14.9)	9.6 (4.0)	17.3 (21.7)
Dietary intake				
Total energy, kcal/day	2361 (539)	1998 (383)	2216 (420)	2212 (938)
Protein, g/day	83.9 (14.3)	69.6 (9.8)	86.5 (25.4)	79.7 (30.0)
Fat, g/day	85.9 (28.5)	66.6 (15.9)	73.0 (10.5)	85.3 (59.8)
Carbohydrate, g/day	295.9 (57.6)	268.7 (71.6)	282.1 (58.6)	266.8 (92.9)
Physical activity				
Daily step counts, steps/day	5611 (3484)	6974 (2882)	6172 (2786)	6327 (3121)
MVPA, min/day	53.7 (32.5)	67.6 (36.4)	49.3 (17.2)	59.1 (33.6)

Data shown as mean (standard deviation) unless specified.

HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; MVPA: moderate-vigorous physical activity.

Table 11. Intention-to treat analysis for primary, secondary, and compliance outcomes (n = 35)

	High-dose group (3,000 mg/d, n = 9)	Medium-dose group (1,500 mg/d, n = 9)	Low-dose group (750 mg/d, n = 8)	Placebo group (0 mg/d, n = 9)	P value for ANOVA
Primary outcomes					
Abdominal fat area, cm ²					
Total	-14.6 (-39.6, 10.4)	-25.3 (-71.0, 20.3)	-23.2 (-48.0, 1.6)	-12.5 (-29.1, 4.0)	0.87
Subcutaneous	-9.3 (-23.3, 4.8)	-13.3 (-47.2, 20.6)	-9.7 (-25.3, 5.9)	-7.9 (-20.2, 4.5)	0.98
Visceral	-5.4 (-20.6, 9.8)	-12.0 (-26.0, 2.0)	-13.5 (-32.1, 5.1)	-4.7 (-14.6, 5.2)	0.67
Secondary and exploratory outcomes					
Weight, kg	-0.87 (-2.23, 0.49)	-1.32 (-5.20, 2.56)	-1.04 (-2.63, 0.56)	-0.33 (-1.57, 0.91)	0.91
Waist circumference, cm	-1.58 (-3.10, -0.05)	-0.70 (-4.55, 3.15)	-1.39 (-2.96, 0.18)	-0.23 (-1.98, 1.52)	0.78
Blood pressure, mm Hg					
Systolic	-6.17 (-10.12, -2.21)	3.94 (-3.24, 11.13)	-3.56 (-9.06, 1.93)	-1.89 (-8.53, 4.76)	0.06
Diastolic	-7.67 (-12.71, -2.63)	0.17 (-3.65, 3.98)	-3.31 (-6.49, -0.14)	-2.44 (-6.74, 1.85)	0.03
Blood biochemical parameters					
Triglycerides, mg/dL	-23.6 (-69.6, 22.5)	6.6 (-76.8, 89.9)	-24.9 (-70.6, 20.8)	-2.9 (-33.9, 28.1)	0.74
Total cholesterol, mg/dL	-17.0 (-35.1, 1.1)	-14.9 (-29.0, -0.7)	-11.6 (-27.8, 4.6)	-10.6 (-20.9, -0.2)	0.89
HDL cholesterol, mg/dL	-6.33 (-14.91, 2.24)	-4.00 (-9.24, 1.24)	1.50 (-4.85, 7.85)	-1.11 (-4.15, 1.93)	0.20
LDL cholesterol, mg/dL	-11.8 (-27.5, 4.0)	-14.0 (-28.3, 0.3)	-12.0 (-27.2, 3.2)	-9.4 (-16.5, -2.4)	0.96
Fasting blood glucose, mg/dL	0.00 (-5.64, 5.64)	0.67 (-2.75, 4.08)	2.38 (-11.35, 16.10)	0.33 (-3.82, 4.49)	0.96
Glycated hemoglobin A1c, %	-0.02 (-0.12, 0.08)	0.00 (-0.07, 0.07)	0.14 (0.01, 0.26)	0.09 (-0.01, 0.19)	0.04
Fasting insulin, IU	0.37 (-1.86, 2.59)	-5.54 (-15.23, 4.14)	-0.61 (-4.49, 3.26)	0.43 (-2.43, 3.30)	0.26
Compliance measures					
Dietary intake					
Total energy, kcal/day	18.4 (-389.7, 426.6)	25.0 (-510.1, 560.1)	-171.5 (-442.1, 99.1)	-372.0 (-846.1, 102.1)	0.41
Protein, g/day	1.4 (-10.9, 13.7)	3.0 (-17.1, 23.1)	-12.0 (-27.4, 3.4)	-11.9 (-21.2, -2.6)	0.20
Fat, g/day	-3.1 (-20.7, 14.5)	-0.9 (-19.3, 17.5)	2.3 (-11.7, 16.2)	-25.7 (-70.0, 18.7)	0.33
Carbohydrate, g/day	13.8 (-61.7, 89.2)	-4.3 (-70.7, 62.0)	-39.1 (-79.0, 0.9)	-17.9 (-44.7, 8.9)	0.50
Physical activity					
Daily step counts, steps/day	1854 (-1538, 5246)	196 (-1749, 2142)	2518 (-670, 5706)	284 (-152, 720)	0.35
MVPA, min/day	12.6 (-17.1, 42.2)	-4.9 (-21.8, 12.1)	22.5 (-4.5, 49.5)	2.6 (-6.8, 11.9)	0.22

Data shown as mean (95% confidence intervals).

ANOVA, analysis of variance; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; MVPA, moderate-to-vigorous physical activity

Table 12. Per-protocol-based analyses for primary, secondary, and compliance outcomes (n = 28)

	High-dose group (3,000 mg/d, n = 7)	Medium-dose group (1,500 mg/d, n = 8)	Low-dose group (750 mg/d, n = 6)	Placebo group (0 mg/d, n = 7)	P value for ANOVA
Primary outcomes					
Abdominal fat area, cm ²					
Total	-17.4 (-51.6, 16.7)	-21.4 (-73.4, 30.7)	-27.9 (-62.6, 6.8)	-16.1 (-37.8, 5.6)	0.96
Subcutaneous	-11.2 (-30.2, 7.8)	-8.1 (-45.0, 28.7)	-11.5 (-34.1, 11.1)	-9.5 (-26.3, 7.2)	1.00
Visceral	-6.2 (-27.2, 14.8)	-13.2 (-29.2, 2.7)	-16.4 (-43.0, 10.3)	-6.6 (-19.7, 6.6)	0.75
Secondary and exploratory outcomes					
Weight, kg	-1.32 (-2.91, 0.27)	-1.40 (-5.91, 3.11)	-1.33 (-3.60, 0.95)	-0.25 (-1.93, 1.43)	0.90
Waist circumference, cm	-2.02 (-3.92, -0.12)	-0.70 (-5.17, 3.77)	-1.97 (-3.88, -0.06)	0.09 (-2.14, 2.32)	0.61
Blood pressure, mm Hg					
Systolic	-6.43 (-11.12, -1.74)	3.50 (-4.77, 11.77)	-3.58 (-11.40, 4.24)	-2.50 (-11.64, 6.64)	0.16
Diastolic	-9.14 (-15.26, -3.02)	-0.69 (-4.49, 3.11)	-3.42 (-7.68, 0.85)	-3.14 (-8.93, 2.64)	0.05
Blood biochemical parameters					
Triglycerides, mg/dL	-19.3 (-79.2, 40.7)	-25.5 (-70.2, 19.2)	-32.7 (-98.1, 32.8)	-2.9 (-45.9, 40.2)	0.80
Total cholesterol, mg/dL	-19.6 (-43.8, 4.6)	-13.2 (-29.1, 2.6)	-18.5 (-35.7, -1.3)	-11.1 (-24.7, 2.5)	0.83
High-density lipoprotein cholesterol, mg/dL	-6.57 (-18.11, 4.97)	-4.12 (-10.21, 1.96)	1.00 (-8.15, 10.15)	-1.29 (-5.48, 2.91)	0.43
Low-density lipoprotein cholesterol, mg/dL	-14.7 (-35.7, 6.3)	-9.2 (-19.9, 1.4)	-17.8 (-35.7, -0.0)	-10.6 (-19.6, -1.5)	0.75
Fasting blood glucose, mg/dL	-0.14 (-7.96, 7.68)	0.88 (-3.06, 4.81)	3.17 (-17.13, 23.47)	1.14 (-4.21, 6.49)	0.95
Glycated hemoglobin A1c, %	-0.03 (-0.17, 0.11)	-0.01 (-0.08, 0.06)	0.15 (-0.02, 0.32)	0.11 (-0.01, 0.24)	0.05
Fasting insulin, IU	0.77 (-2.15, 3.69)	-5.71 (-16.96, 5.54)	-2.30 (-5.36, 0.76)	0.56 (-3.42, 4.53)	0.36
Compliance measures					
Dietary intake					
Total energy, kcal/day	4.1 (-561.0, 569.2)	-133.4 (-588.1, 321.3)	-123.5 (-448.3, 201.3)	-211.4 (-474.7, 51.8)	0.86
Protein, g/day	3.3 (-13.2, 19.7)	-4.4 (-16.6, 7.8)	-10.9 (-31.4, 9.5)	-9.9 (-16.9, -3.0)	0.32
Fat, g/day	-8.61 (-28.27, 11.04)	-5.12 (-23.26, 13.01)	5.57 (-12.97, 24.10)	-8.06 (-23.12, 7.00)	0.55
Carbohydrate, g/day	21.8 (-81.4, 124.9)	-16.1 (-86.5, 54.3)	-38.3 (-90.9, 14.3)	-20.9 (-57.4, 15.6)	0.56
Physical activity					
Daily step counts, steps/day	2594 (-1833, 7021)	20 (-2192, 2232)	3651 (-261, 7562)	365 (-216, 945)	0.15
MVPA, min/day	17.2 (-22.9, 57.2)	-7.5 (-25.9, 10.9)	31.9 (-1.7, 65.5)	3.3 (-9.6, 16.1)	0.10

Data shown as mean (95% confidence intervals).

ANOVA, analysis of variance; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; MVPA, moderate-to-vigorous physical activity

Table 13. Adverse events identified by participant's dialy logs (n = 35)

	High-dose group (3,000 mg/d, n = 9)	Medium-dose group (1,500 mg/d, n = 9)	Low-dose group (750 mg/d, n = 8)	Placebo group (0 mg/d, n = 9)	P value for chi-square test
Asthma	0	0	0	1 (11)	0.40
Tongue numbness	0	0	1 (13)	0	0.32
Diarrhea	0	1 (11)	1 (13)	2 (22)	0.53
Constipation	0	0	0	1 (11)	0.40
Gastroenteritis	0	1 (11)	0	0	0.40
Fever	2 (22)	1 (11)	2 (25)	0	0.43
Influenza	0	0	1 (13)	0	0.32
Headache	1 (11)	0	0	1 (11)	0.57
Toothache	0	0	0	1 (11)	0.40
Excessive sweating	1 (11)	0	0	0	0.40
Frequent urination	0	0	1 (13)	0	0.32
Fatigue	1 (11)	0	1 (13)	0	0.52
Foot pain	1 (11)	1 (11)	1 (13)	0	0.77
Knee pain	2 (22)	0	0	0	0.11
Calf pain	0	0	0	1 (11)	0.40
Leg lameness	1 (11)	0	0	0	0.40
Leg cramp	1 (11)	0	0	0	0.40
Shin pain	1 (11)	0	0	0	0.40
Muscle pain	1 (11)	0	0	0	0.40
Back pain	0	1 (11)	0	0	0.40
Scapular pain	1 (11)	0	0	0	0.40
Wrist pain	0	0	1 (13)	0	0.32

Data shown as NO. (%)

Table 14. Adverse events identified during the study period by blood pressure recordings and fasting blood test (n = 35)

	Reference ranges	High-dose group (3,000 mg/d, n = 9)	Medium-dose group (1,500 mg/d, n = 9)	Low-dose group (750 mg/d, n = 8)	Placebo group (0 mg/d, n = 9)	P value for chi-square test
Elevated DBP	<90 mmHg	0	0	1 (13)	0	0.32
Decreased total protein	6.5-8.2 g/dL	0	0	2 (25)	0	0.07
Decreased AST	11 – 35 U/L	1 (11)	0	0	0	0.40
Elevated GGT	≤70 U/L (male) ≤33 U/L (female)	0	1 (11)	0	0	0.40
Elevated CPK	62-287 U/L (male) 45-163 U/L (female)	0	0	0	1 (11)	0.40
Decreased CPK	62-287 U/L (male) 45-163 U/L (female)	0	0	1 (13)	0	0.32
Decreased total cholesterol	130-219 mg/dL	1 (11)	0	0	0	0.40
Decreased HDLC	40-79 mg/dL (male) 40-90 mg/dL (female)	1 (11)	0	0	0	0.40
Elevated LDLC	70-139 md/dL	1 (11)	1 (11)	0	0	0.57
Elevated triglycerides	30-149 mg/dL	1 (11)	0	0	1 (11)	0.57
Decreased urea nitrogen	8.0-23.0 mg/dL	0	1 (11)	1 (13)	0	0.52
Elevated serum potassium	2.5-4.5 mg/dL	1 (11)	0	0	0	0.40
Elevated serum iron	60-190 µg/dL (male) 45-170 µg/dL (female)	0	0	0	1 (11)	0.40
Decreased serum iron	60-190 µg/dL (male) 45-170 µg/dL (female)	0	1 (11)	0	1 (11)	0.57
Elevated A/G	1.10-2.00	0	0	1 (13)	0	0.32
Elevated WBC	3,900-9,700 count/µL (male) 3,500-9,100 count/µL (female)	0	0	1 (13)	0	0.32
Elevated hematocrit	40.4%-51.9% (male) 34.3%-45.2% (female)	1 (11)	0	0	0	0.40
Elevated HOMA-R	≤1.6	2 (22)	2 (22)	1 (13)	2 (22)	0.95

Data shown as No. (%). A/G: albumin/globulin, AST: aspartate aminotransferase, DBP: diastolic blood pressure, CPK: creatine phosphokinase, GGT: gamma-glutamyltransferase, HDLC: high-density lipoprotein cholesterol, HOMA-R: homeostasis model assessment insulin resistance, LDLC: low-density lipoprotein cholesterol, WBC: white blood cell.

4. 考察

本研究課題3の目的は、A-mix含有飲料を12週間連続摂取した際の体脂肪低減効果について、含有量の異なる3つの被験食品とプラセボとの比較によって、有効用量を検討することであった。その結果、A-mixによる用量反応関係は認められなかったものの、プラセボ群に比べて中用量群および低用量群で、主要評価項目である腹部脂肪面積の減少量が大きい傾向がみられた。この結果は、副次評価項目である体脂肪量についても同様の傾向であった。

これまで、動物実験によりA-mixに高い脂肪分解・燃焼促進効果と抗肥満効果があることが明らかになっている（Ueda et al., 2017b）。さらに、研究課題1で検討した通り、健常者を対象としたA-mixの単回摂取と運動負荷を組み合わせた試験では、A-mixの摂取によりプラセボ摂取と比較し、主要評価項目であった血中グリセロール濃度の上昇、副次評価項目であった血中ケトン体濃度が有意な上昇が認められた（Ueda et al., 2017c）。これらの結果より、A-mix摂取による運動時の脂肪分解・燃焼効果が示唆されている。長期摂取試験である本研究課題3では、A-mix摂取を伴う身体活動時における脂質分解・燃焼効果が介入期間中積み重なることで、腹部脂肪や体脂肪の減少につながった可能性がある。その一方で、高用量群では、量反応的な腹部脂肪や体脂肪の低減効果がみられなかった。この機序は不明であるが、1日あたり1,500 mgから3,000 mgの間に最大効力用量（天井効果）が存在する可能性が推察される。

食事および運動面での遵守状況を示唆する食事摂取量と身体活動量の変化について、4群間で必ずしも同様の結果は得られなかった。いずれもサンプルサイズが不足しているため、十分な検出力を伴っていないが、エネルギー摂取量については、高用量群と中用量群でわずかに増加したのに対し、低用量群とプラセボ群では減少した。また、1日あたりの歩数については、中用量群とプラ

セボ群での増加と比較し、高用量群と低用量群での増加量が大きかった。特に低用量群に着目すると、エネルギー摂取量の減少が大きく、歩数の増加量が大きく、他の3群と比較して、エネルギー収支が大きく負に傾いていることが示唆される。本研究課題3では、中用量群および低用量群で、主要評価項目である腹部脂肪面積の減少量が大きい傾向がみられたが、低用量群での体脂肪低減効果は、エネルギー収支が大きく負に傾いたことによるところが大きいと推察される。このことから、A-mix含有量としては1,500 mgが適当と考えられる。

安全性評価に関しては、貧血に関わるヘモグロビン、ヘマトクリットが高用量群を除く3群で有意に減少した。また、下痢や便秘などの消化器症状を含む有害事象が確認された。しかしながら、いずれについても、量反応的に有害事象が多く認められるような項目は認められなかった。このことから、本試験食品の安全性について、本研究課題3から問題点は確認されなかった。

本研究課題3にはいくつかの強みがある。第一に、探索的な試験ではあるものの、プラセボ対照二重盲検並行群間ランダム化比較試験のデザインを採用しており、結果の信頼性は高い。第二に、主要評価項目として腹部脂肪評価の妥当基準のひとつであるCT法を採用していることが挙げられる。第三に、監視型運動プログラムを提供するのではなく、一般消費者の生活場면을意識して、日常生活下における適度な運動を促す介入(1日1,000歩程度の歩数増加)を施しており、一般化可能性は高い。第四に、試験の完遂率が91%と高いことも強みのひとつである。

一方で、いくつかの限界も存在する。第一に、目標試験参加者数が80名(各群20名)であったのに対して、実際には35名(各群8~9名)に留まったことが挙げられる。そのため、データの頑健性は必ずしも高くない。第二に、試験参加者には3食ともに主食、主菜、副菜のバランスの良い食事を摂取し、日常

範囲を大きく逸脱する過度な節食や過食は控えるよう指示し、歩数を 1,000 歩程度増やせるような指導をおこなったが、各群で異なる変化を示した。このような食事および運動面での変化が試験結果に及ぼした影響は否定できない。

結論として、A-mix の摂取量と、継続的な身体活動啓発が体脂肪に及ぼす影響を検討する目的で試験を実施した。腹部脂肪面積はプラセボを含め 4 群全てで減少し、特に 750 mg と 1,500 mg で顕著な減少が見られたが、群間比較では有意差は認められなかった。しかしながら、特に中用量である 1,500 mg/500 mL で統計学的に十分な被験者数で試験を実施した場合には、A-mix の腹部脂肪低減促進効果が検出される可能性が示唆された。

VII. 研究課題 4

1. 諸言

研究課題 3 より、1,500 mg/500 mL/日の A-mix 飲料摂取と、+1,000 歩の身体活動啓発との併用を 12 週間継続することで、腹部脂肪の低減が期待できる知見を得た (Sasai et al., 2017)。しかしながら、先の検討は探索的な試験であったため、この知見の真偽を十分なサンプルサイズで検証する必要がある。

そこで、本研究課題 4 では、A-mix 摂取と身体活動啓発の組合せが、過体重成人の腹部脂肪に対する有効性を検証することとした。

2. 方法

(1) 試験デザイン

本研究課題 4 は、プラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験である。研究実施場所は東京都港区の公的な会議室および品川シーズンテラス健診クリニックとし、2016 年 12 月～2017 年 5 月に実施した。目標試験参加者数は各群 100 名、計 200 名と設定した。このサンプルサイズは、効果量 (Cohen's d) 0.4 の差を、有意水準 5%、検出力 80%にて示すことが可能である。選択基準への不台致、除外基準への台致を考慮し、スクリーニング人数を 340 名と設定した。本研究課題 4 のプロトコルは、筑波大学医の倫理委員会、明治臨床試験審査委員会、日本橋循環器科クリニック試験審査委員会にて承認を受け、実施した。試験参加者として組み入れる前に、試験参加について書面にて同意を得た。本研究課題 4 は UMIN 登録を試験参加者募集前に実施した。付与番号は UMIN000025186 であった。

(2) 試験参加者

試験参加者は開発業務受託機関のボランティアデータベースより募集した。選択基準は20歳以上65歳未満の男女で、BMIが25.0以上30.0未満に該当する者とした。除外基準は以下の14項目である。1) 肥満、高脂血症、脂質代謝に影響を及ぼす可能性がある医薬品を使用/服用している者、2) 重篤な肝障害、心血管障害、呼吸障害、内分泌障害、代謝障害、食物アレルギー疾患に罹患している者、3) 肥満、高脂血症、脂質代謝に影響を及ぼす可能性がある健康食品やサプリメントの摂取を止めることができない者、4) 薬物依存またはアルコール依存の既往歴あるいは現病歴がある者、5) 検査日2日前からの禁酒ができない者、6) 手術等によりCTスキャン測定部位に金属が入っている者、7) 心臓ペースメーカーまたは植え込み型除細動機が入っている者、8) フェニルケトン尿症または高フェニルアラニン血症と診断されたことがある者、9) 家族性高脂血症と診断されたことがある者、10) 妊娠中もしくは授乳中の者または試験期間中に妊娠を希望する者、11) 深夜勤務等食生活や生活サイクルが極度に不規則な者、12) 他の食品の試験や医薬品を使用/服用する試験または化粧品および医薬品を塗布する試験に参加中の者あるいは参加の意思がある者、13) 閉所恐怖症の者、14) その他、試験責任医師の判断によって試験参加者として不適と判断された者。

(3) ランダム化と盲検化

性別と試験開始時期（第1集団と第2集団）を層別因子とし、選択基準に合致し、除外基準に合致しなかった試験参加者を、A-mix群あるいは対照群の2群にランダムかつ1:1に割り付けた。割付者は現場スタッフや試験参加者と直接関わらない者とし、コンピュータープログラムを用いて割付表を作成した。

試験参加者に試験食品を送付する責任者によって割付表は保管され、その責任者は計画、登録、評価、または調査に関与しなかった。試験参加者、介入者、現場スタッフは割付には関わっておらず、盲検性が維持されていた。割付表は、最終データが固定された後に開封された。

(4) 介入内容

(i) 試験食品

A-mix 群、あるいはプラセボ群には、1,500 mg あるいは 0 mg の A-mix をそれぞれ含む 500 mL のペットボトル飲料が提供された。試験食品は外観、性状ともに同一であった。試験食品のエネルギー量は A-mix 飲料が 20 kcal、対照飲料が 13 kcal であった。試験参加者は、高温多湿と直射日光を避けて試験食品を保存すること、および自由生活下の身体活動や運動時に 1 日 1 本試験食品を摂取するように指示された。

(ii) 身体活動啓発

群の割付に関係なく、試験参加者は 12 週間の介入期間中、月 1 回の身体活動啓発の講義に参加した（全 4 回の講義）。介入内容は集団講義と個別の助言で構成された。前述の通り、介入当初の歩数より 1,000 歩の増加、あるいはそれ以上を目標にするよう指導した。集団講義では、30 分の講義と 60 分のグループワーク（ウォーキング、筋力トレーニング、ストレッチを含む）を実施した。日誌を配布し、体重、試験食品摂取状況、体調、服薬状況、食事内容、運動状況、および歩数計（FB-736、タニタ株式会社、東京）を用いて歩数を記録させ、その内容に基づいて、個別指導として専門家が助言した。生活環境の変化の影響を受けにくくするため、農林水産省推奨の食事バランスガイドに基づく食事

をすること、日常範囲を大きく逸脱する過度な運動、節食や過食を制限するように指示した。

(iii) 安全性評価、および有害事象

血液学的検査、血液生化学的検査、および尿検査を4週間ごとの検査にて実施した。同検査日に、医療関係者による健康状態の確認および問診を実施した。

有害事象の発現は、試験参加者の日誌、問診内容、血液学的検査、および血液生化学的検査の解析結果より確認した。今回の試験では、有害事象を試験食品が摂取された際に起こる、あらゆる好ましくないあるいは意図しない徴候、症状、病気と定義した。試験責任医師がこれらの有害事象について、重篤度および試験食品との因果関係を判断した。

(iv) 試験スケジュールおよび測定内容

腹部脂肪を除くすべての評価項目は、ベースライン時と4週間ごとに測定した。なお、測定は群分けの情報を知らされていない経験豊富なスタッフが実施した。主要評価項目は12週間での腹部脂肪面積変化量とした。副次評価項目は体重、体脂肪率、ウエストおよびヒップ周囲径、および血中脂質因子、血糖因子、血圧などの代謝危険因子とした。介入内容の遵守状況を把握するため、食事調査を月に1回実施し、身体活動量調査をベースライン時と12週目に実施した。

(iv) -1 体組成

体重（最小単位 0.1 kg）と体脂肪率（最小単位 0.1%）は多周波生体電気インピーダンス装置（InBody 430, バイオスペース, ソウル, 韓国）を用いて測定した。身長（最小単位 0.1 cm）はデジタル身長計（DSN-90, ムラテック KDS

株式会社、京都) を用い、ベースライン時に測定した。BMI は試験参加者の体重 (kg) ÷身長² (m²) から算出した。ウエスト周囲径とヒップ周囲径は、それぞれ臍位と臀部の最大周囲を最小単位 0.1 cm として 2 回測定した。測定には柔らかいプラスチックタイプのメジャーを用い、立位にて測定した。解析には 2 回の平均値を用いた。ウエストヒップ比は、ウエスト周囲径をヒップ周囲径で除することで算出した。

(iv) -2 腹部脂肪

腹部脂肪面積は CT (Supria, 日立製作所, 東京) を用いて腰椎 L4 部位で測定し、解析には市販のソフトウェア (Fat Scan Ver. 5.0, 東日本技術研究所, 茨城) 22 を用いた。

(iv) -3 血圧

収縮期および拡張期血圧は自動血圧計 (自動血圧計 HEM-907, オムロンヘルスケア, 京都) を用い測定した。試験参加者は 5 分以上の休憩を挟み、座位において心臓と同じ高さに支持した腕を用い測定した。解析には 2 回の平均値を用いた。

(iv) -4 血液生化学

採血は一晚絶食 (12 時間以上) の後に実施した。静脈血を独立した研究所 (LSI メディエンス, 東京) にて測定した。

(iv) -5 食事摂取量

グラム単位の微量栄養素およびキロカロリー単位の総摂取エネルギー量を、3 日の食事記録から評価した。試験参加者は平日 2 日、休日 1 日を含む 3 日間の食事摂取量を記録するように指示された。食事の量は一般的なグラス、スプーン、デジタルスケールで測定した。食事記録は来院時に持参し、記載の内容についてスタッフが確認を行った。食事内容は食事記録をもとに、管理栄養士が

オールガイド食品成分表 2017 (実教出版株式会社, 東京)、およびエクセル栄養君®Ver.8.0 (株式会社 建帛社, 東京) を用いて熱量と各栄養成分摂取量を算出した。

(iv) -6 身体活動量

身体活動量は 3 軸加速度計 (Active style Pro HJA-750C, オムロンヘルスケア) を用いて測定し、装着期間は 7 日間とした。加速度計は歩数と身体活動の強度 (表現型としては METs) を内蔵されたアルゴリズムにより測定した。この機器は、睡眠中、水を使う活動中 (入浴や水泳)、および接触のある運動に参加する時間は装着しなかった。得られた結果は、10 時間/日以上着用された場合にのみ記録として採用し、その記録が 1 日以上存在する場合、歩数と中～高強度の身体活動時間 (>3 METs) を試験参加者毎に算出した。

(5) 評価指標および統計解析

全ての統計解析は事前に定められた統計解析計画に基づいて行われ、使用ソフトは IBM SPSS Statistics Version 24 (日本 IBM, 東京) であった。有意水準は 5% に設定された。試験参加者背景は、連続変数は平均値±標準偏差で示し、カテゴリ変数は実数と割合 (%) を示した。主要解析は PPB 解析とし、下記の 1 つでも該当した者は解析集団から除外した。1) 12 週目の検査に来なかった者。2) 試験食品の摂取率が低い者 (80% を下回った者)。3) 日誌の欠損など、検査結果の信頼性を損なう行為が顕著に見られる者。4) 除外基準に該当していたことがランダム化後に明らかになった者。5) 試験責任医師または試験統括者により、合理的理由により解析対象者として不相当と判断された者。

主要評価項目、副次評価項目、および関連項目における 12 週間の変化量について、対応のない t 検定を用いて比較した。さらに、試験期間中の歩数増加が

+1,000 歩以上/+1,000 歩未満で層別した場合と、ベースライン時の腹部内臓脂肪面積が 100 cm² 以上/未満で層別した場合の解析を実施した。安全性の解析においては、有害事象および血液検査で同定された事象を、カテゴリー変数についてはカイ二乗検定、連続変数については対応のない t 検定を用いて比較した。さらに、対応のある t 検定を用いて、各群内の介入前後のデータを比較した。

3. 結果

(1) 試験参加者

試験全体のフローチャートを Figure 10 に図示した。説明会には全員で 377 名が参加した。書面にて同意を取得できた人数は 370 名、そのうち 340 名がベースラインの測定に参加した。最終的に、選択基準に合致し除外基準に該当しない 200 名を、A-mix 群 (100 名) と対照群 (100 名) にランダムに割り付けた。ベースライン時に測定した試験参加者背景を Table 15 に示した。2 群間において、全ての評価項目について有意差は認められなかった。200 名の試験参加者の内、199 名 (99%) が 12 週間の介入期間と 4 週間の後観察期間を終了した。試験を完遂した 199 名のうち、試験食品摂取割合の中央値は 100% であり、2 群間に有意差は認められなかった ($P=0.42$ 、マンホイットニーの U 検定)。12 週目検査を欠席した者 1 名、ランダム化後に除外基準に該当していたことが判明した者 1 名、試験期間中に重篤なコンプライアンス違反があると判断された者 3 名、計 5 名を解析対象から除外し、194 名の結果を PPB 解析に供した。

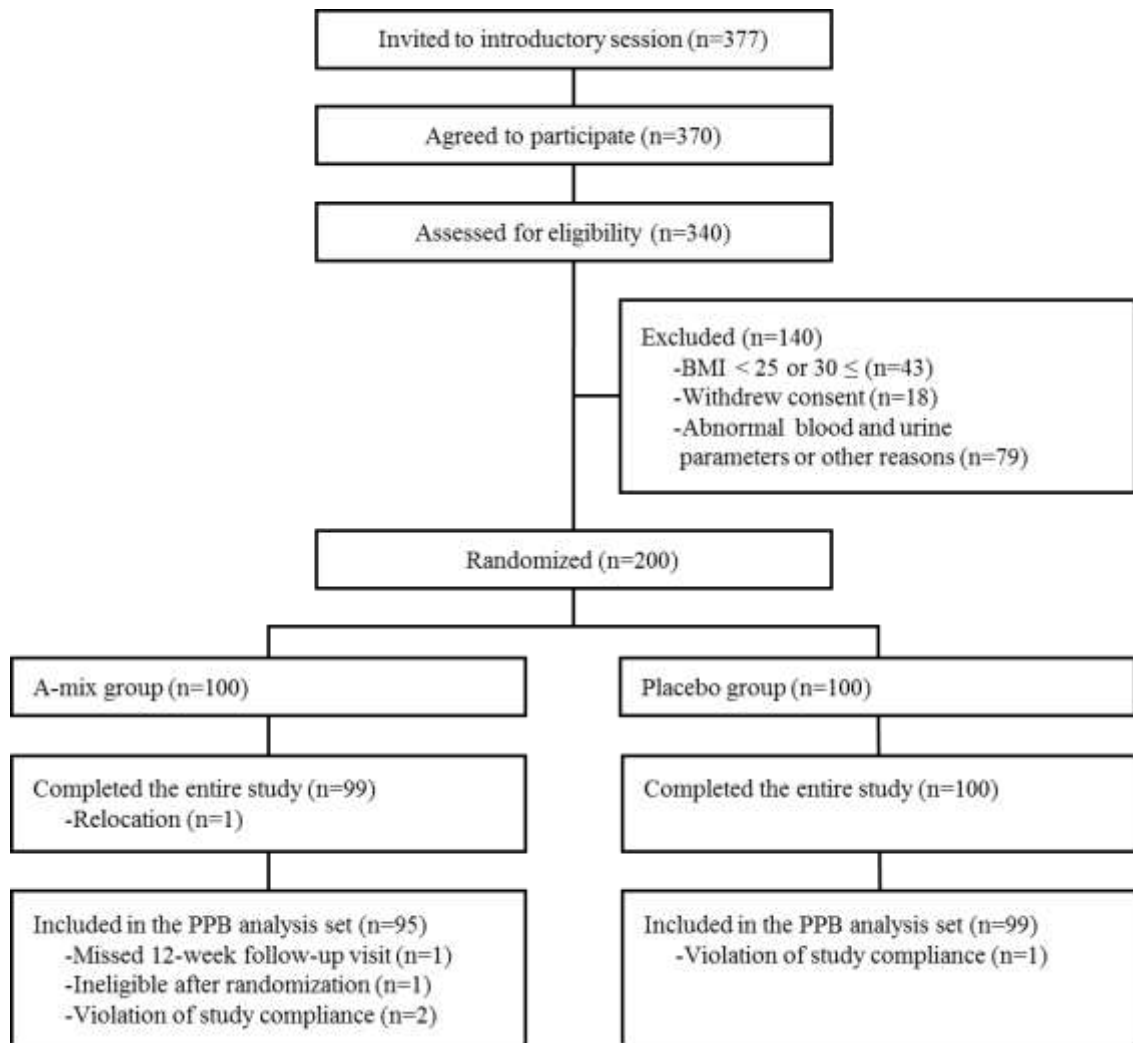


Figure 10. Flowchart of study participants.

BMI, body mass index; PPB, per-protocol-based. (Ueda et al., 2018)

(2) PPB 解析の結果

主要評価項目および副次評価項目の解析結果を Table 16 および Figure 11 に、関連項目を Table 17 に示した。腹部全脂肪面積の 12 週間の変化量は、A-mix 群において対照群と比較し、有意な減少が認められた（群間の平均値の差, 10.0 cm²; 95%CI : 0.4-19.6 cm²; P = 0.041）。腹部皮下脂肪面積においても、類似した結果が得られた（群間の平均値の差, 7.4 cm²; 95%CI : 0.1-14.71; P = 0.047）。その他の主要評価項目および副次評価項目においては有意な差が見られなかった。日々の総エネルギー摂取変化量は、A-mix 群で-131 kcal (95%CI -201--61 kcal)、対照群で-77 kcal (95%CI -150--4 kcal)、日々の歩数は、A-mix 群で 1,779 歩 (95%CI 1,175–2,383 歩)、対照群で 1,629 歩 (95%CI 1,023–2,235) の増加であり、いずれも有意差は認められなかった。

(3) 層別解析

12 週間の介入期間で、歩数の増加が 1,000 歩以上/未満で層別した解析結果を示す (Table 18)。歩数の増加が 1,000 歩以上だった者における解析では、A-mix 群は対照群と比較し、腹部全脂肪面積 (P = 0.019) と皮下脂肪面積 (P = 0.011) において、有意差が認められた。しかしながら、歩数の増加が 1,000 歩に満たなかった者を対象とした解析では、2 群間の有意差は認められなかった。

また、ベースライン時の腹部内臓脂肪面積が 100 cm² 以上/未満で層別した解析結果を示す (Table 19)。どちらの場合も、A-mix 群と対照群の間に、腹部全脂肪面積、腹部皮下脂肪面積、腹部内臓脂肪面積において有意差は認められなかった。

(4) 安全性評価

安全性の項目について、試験参加者の日誌および問診結果より、計 133 件の重篤でない有害事象が観察された (Table 20)。これらの中には、発熱、偏頭痛、歯痛、関節痛、および風邪や花粉症等の一般的な感染症が含まれた。2 群間に有意差が認められた項目 (花粉症およびアレルギー性鼻炎の発生頻度) もあったが、試験責任医師により、試験食品との因果関係は否定された。さらに、血液検査の結果、試験期間全体で計 456 件の基準値からの逸脱が確認された (Table 21)。2 群間に有意差が認められた項目 (赤血球数の増加、ヘモグロビン数の増加、AST の減少、ALT の減少、総ビリルビンの上昇、血中尿素窒素の上昇、カルシウムの上昇、血清鉄の上昇頻度) もあったが、試験責任医師により、試験食品との因果関係は否定された。血液検査と尿検査の結果を Table 22~25 にまとめた。

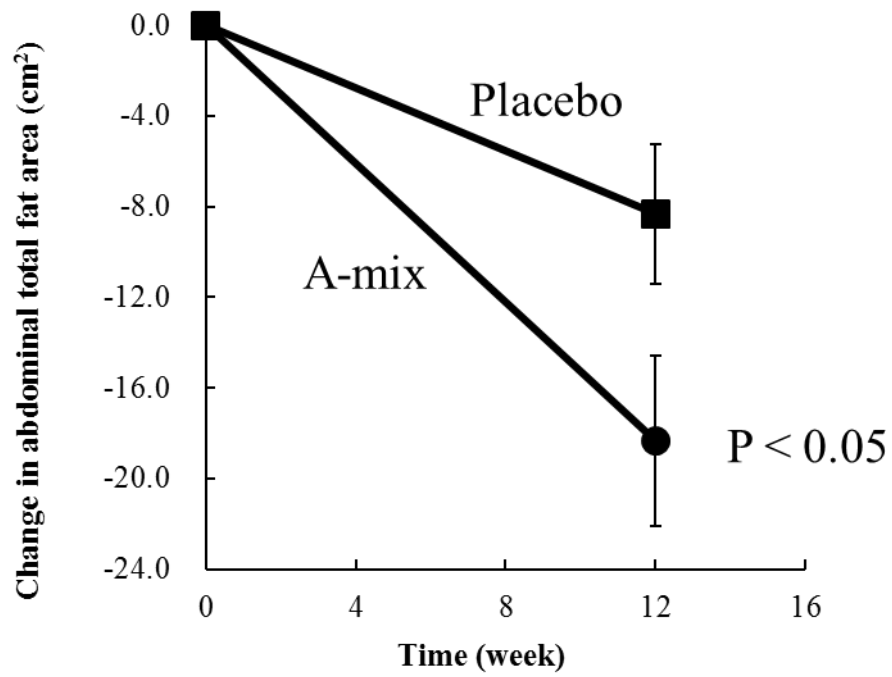


Figure 11. Pattern of change in abdominal total fat area during 12-week intervention by treatment assignment (n = 194). Each data point represents the mean value for per-protocol-based analysis. Error bars indicate standard errors. (Ueda et al., 2018)

Table 15. Baseline participant characteristics.

	A-mix group (n = 100)	Placebo group (n = 100)
Female, n (%)	50 (50)	50 (50)
Age, years	43.5 (9.9)	43.5 (9.7)
Height, cm	164.9 (9.2)	164.3 (8.2)
Weight, kg	73.5 (9.1)	73.4 (7.8)
Body mass index, kg/m ²	27.0 (1.2)	27.1 (1.3)
Fat-free mass, kg	47.9 (9.1)	47.5 (8.5)
Percent fat mass, %	32.1 (6.9)	32.4 (6.9)
Waist circumference, cm	93.8 (5.8)	93.6 (4.9)
Hip circumference, cm	101.2 (4.2)	100.5 (3.8)
Waist to hip ratio	0.93 (0.05)	0.93 (0.05)
Abdominal fat area, cm ²		
Total	339.2 (73.4)	327.6 (71.1)
Subcutaneous	244.0 (66.2)	229.7 (70.4)
Visceral	95.2 (35.9)	98.0 (38.9)
Blood pressure, mm Hg		
Systolic	129.8 (13.6)	129.4 (12.5)
Diastolic	77.6 (10.4)	77.5 (10.6)
Blood biochemical parameters		
Triglycerides, mg/dL	103.1 (53.8)	113.4 (55.5)
Total cholesterol, mg/dL	208.3 (33.5)	215.0 (30.2)
HDL-C, mg/dL	58.3 (13.8)	56.4 (11.3)
LDL-C, mg/dL	126.1 (30.6)	133.6 (27.1)
Fasting blood glucose, mg/dL	85.1 (6.2)	85.3 (7.4)
Glycated hemoglobin A _{1c} , %	5.5 (0.3)	5.5 (0.3)
Fasting insulin, μU/mL	5.6 (2.7)	5.8 (2.4)
HOMA-R	1.18 (0.61)	1.22 (0.53)
Dietary intake		
Total energy, kcal/day	1934 (471)	1850 (393)
Protein, g/day	72.4 (21.0)	68.1 (16.0)
Fat, g/day	67.1 (22.0)	63.0 (17.0)
Carbohydrate, g/day	243.8 (62.0)	238.5 (57.1)
Physical activity		
Daily step counts, steps/day [†]	7565 (3308)	8454 (3598)
MVPA, min/day [†]	65.5 (32.7)	70.2 (37.2)

Data shown as mean (standard deviation) unless specified.

[†]Data were available for 198 participants (100 and 98 in the A-mix and the placebo groups, respectively).

HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HOMA-R, homeostasis model assessment of insulin resistance; MVPA: moderate-to-vigorous physical activity.

Table 16. Per-protocol analyses for primary and secondary outcomes (n = 194).

	A-mix group (n = 95)						Placebo group (n = 99)						P value
	Week 0	Week 4	Week 8	Week 12	Week 16	12-week change	Week 0	Week 4	Week 8	Week 12	Week 16	12-week change	
Primary outcomes													
Abdominal total fat area, cm ²	338.8 (73.6)	NA	NA	320.5 (76.1)	NA	-18.3 (-25.8, -10.8)	326.2 (70.0)	NA	NA	317.8 (71.3)	NA	-8.3 (-14.5, -2.2)	0.041
Abdominal subcutaneous fat area, cm ²	245.2 (66.1)	NA	NA	236.3 (68.1)	NA	-8.9 (-14.5, -3.3)	228.3 (69.4)	NA	NA	226.8 (69.1)	NA	-1.5 (-6.2, 3.3)	0.047
Abdominal visceral fat area, cm ²	93.6 (35.6)	NA	NA	84.1 (34.0)	NA	-9.5 (-12.9, -6.0)	97.9 (39.0)	NA	NA	91.0 (38.8)	NA	-6.8 (-9.6, -4.1)	0.24
Secondary outcomes													
Weight, kg	73.6 (8.9)	73.2 (8.7)	73.0 (8.8)	72.4 (8.7)	72.6 (8.8)	-1.2 (-1.7, -0.8)	73.5 (7.8)	73.1 (8.0)	72.9 (7.9)	72.3 (7.8)	72.4 (7.8)	-1.2 (-1.7, -0.8)	0.96
Body mass index, kg/m ²	27.1 (1.2)	27.0 (1.2)	26.9 (1.2)	26.7 (1.3)	26.7 (1.3)	-0.4 (-0.6, -0.3)	27.2 (1.3)	27.0 (1.4)	26.9 (1.5)	26.7 (1.5)	26.8 (1.6)	-0.5 (-0.6, -0.3)	0.94
Fat-free mass, kg	47.6 (9.1)	47.1 (9.0)	47.0 (9.2)	47.6 (9.0)	47.2 (9.2)	0.0 (-0.21, 0.20)	47.5 (8.6)	47.0 (8.7)	47.0 (8.6)	47.6 (8.5)	47.2 (8.6)	0.04 (-0.21, 0.30)	0.78
Percent fat mass, %	31.9 (7.0)	32.1 (7.4)	32.1 (7.4)	30.7 (7.5)	31.4 (7.7)	-1.2 (-1.6, -0.8)	31.8 (6.8)	32.2 (7.2)	32.0 (7.0)	30.6 (7.1)	31.3 (7.4)	-1.2 (-1.6, -0.9)	0.93
Waist circumference, cm	94.0 (5.4)	93.8 (5.4)	93.0 (5.2)	92.6 (5.4)	92.3 (5.7)	-1.4 (-1.9, -0.9)	94.0 (5.4)	93.9 (5.4)	93.4 (5.4)	92.8 (5.5)	92.5 (5.5)	-1.2 (-1.8, -0.7)	0.65
Hip circumference, cm	100.8 (4.3)	100.7 (4.0)	100.4 (4.0)	100.0 (4.1)	100.0 (4.2)	-0.8 (-1.2, -0.4)	100.2 (3.6)	100.1 (3.6)	99.8 (3.7)	99.6 (3.7)	99.4 (3.7)	-0.6 (-0.9, -0.3)	0.37
Waist to hip ratio	0.93 (0.04)	0.93 (0.04)	0.93 (0.04)	0.93 (0.04)	0.92 (0.04)	-0.01 (-0.01, 0.00)	0.94 (0.05)	0.94 (0.05)	0.94 (0.05)	0.93 (0.05)	0.93 (0.05)	-0.01 (-0.01, 0.00)	0.93
Systolic blood pressure, mm Hg	124.0 (15.1)	126.1 (15.7)	122.0 (14.3)	115.2 (14.8)	121.9 (16.6)	-8.8 (-11.0, -6.7)	124.8 (16.0)	126.3 (15.1)	124.6 (14.2)	116.9 (13.1)	124.7 (13.6)	-7.9 (-10.2, -5.6)	0.55
Diastolic blood pressure, mm Hg	79.5 (11.5)	76.9 (11.2)	73.7 (10.9)	70.5 (9.5)	73.7 (11.2)	-9.0 (-10.7, -7.2)	81.3 (12.5)	77.8 (11.3)	75.5 (11.2)	73.7 (10.0)	75.6 (10.3)	-7.5 (-9.3, -5.8)	0.26
Triglycerides, mg/dL	103.9 (54.9)	103.2 (61.3)	98.0 (53.5)	95.8 (54.5)	103.1 (51.8)	-8.1 (-18.3, 2.1)	113.1 (55.7)	119.0 (58.1)	118.5 (82.6)	110.9 (88.0)	110.4 (51.7)	-2.2 (-20.0, 15.5)	0.57
Total cholesterol, mg/dL	209.9 (33.2)	208.6 (33.9)	209.4 (33.8)	200.2 (33.7)	208.3 (35.9)	-9.7 (-14.3, -5.0)	214.5 (30.0)	211.6 (31.3)	218.1 (32.9)	207.9 (31.7)	212.4 (32.2)	-6.6 (-9.8, -3.4)	0.28
HDL-C, mg/dL	58.5 (13.9)	57.0 (13.3)	58.0 (13.9)	56.0 (12.8)	56.7 (13.1)	-2.5 (-3.7, -1.3)	56.2 (11.1)	54.7 (11.0)	56.0 (12.1)	54.9 (11.2)	55.3 (11.7)	-1.2 (-2.6, 0.1)	0.17
LDL-C, mg/dL	127.4 (30.8)	127.3 (32.4)	126.0 (30.8)	119.9 (30.7)	126.1 (32.2)	-7.5 (-11.4, -3.6)	133.4 (27.2)	129.6 (27.1)	132.6 (28.3)	126.1 (25.9)	131.1 (28.4)	-7.2 (-10.0, -4.5)	0.92
Fasting blood glucose, mg/dL	85.1 (6.2)	85.2 (8.0)	85.0 (7.0)	84.5 (7.7)	83.0 (6.6)	-0.6 (-1.7, 0.5)	85.2 (7.4)	86.3 (7.0)	86.3 (9.3)	84.1 (7.7)	83.6 (6.8)	-1.1 (-2.4, 0.1)	0.53
Glycated hemoglobin A _{1c} , %	5.47 (0.29)	5.51 (0.27)	5.45 (0.27)	5.44 (0.26)	5.47 (0.28)	-0.03 (-0.07, 0.01)	5.46 (0.25)	5.49 (0.29)	5.47 (0.28)	5.43 (0.28)	5.42 (0.29)	-0.03 (-0.06, 0.00)	0.92

次ページに続く

Table 16.続き

Fasting insulin, $\mu\text{U}/\text{mL}$	5.4 (2.3)	5.4 (3.0)	6.7 (8.1)	5.4 (2.0)	6.2 (4.1)	0.0 (-0.5, 0.4)	5.8 (2.4)	5.9 (3.7)	7.1 (4.2)	5.8 (2.8)	6.5 (2.6)	0.1 (-0.5, 0.6)	0.81
HOMA-R	1.14 (0.5)	1.15 (0.7)	1.43 (1.9)	1.13 (0.5)	1.28 (0.9)	-0.01 (-0.12, 0.09)	1.22 (0.5)	1.27 (0.9)	1.53 (0.9)	1.23 (0.7)	1.34 (0.5)	0.01 (-0.12, 0.15)	0.76

Data at weeks 0, 4, 8, 12 and 16 are presented as mean (standard deviation). Changes from baseline to week 12 are presented as mean (95% confidence interval). P value is a result of unpaired t test for 12-week change between groups. HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; HOMA-R, homeostasis model assessment of insulin resistance; NA: Not assessed.

Table 17. Per-protocol analyses for compliance outcomes (n = 194).

Outcome	A-mix group (n = 95)						Placebo group (n = 99)						P value
	Week 0	Week 4	Week 8	Week 12	Week 16	12-week change	Week 0	Week 4	Week 8	Week 12	Week 16	12-week change	
Dietary intake													
Total energy, kcal/day	1928.4 (433.5)	1842.4 (437.7)	1828.6 (426.7)	1797.5 (386.5)	1766.0 (409.4)	-130.9 (-201.0, 60.7)	1852.8 (393.9)	1819.9 (392.2)	1853.0 (377.5)	1776.0 (358.7)	1859.9 (389.9)	-76.8 (-149.8, -3.8)	0.29
Protein, g/day	71.9 (19.3)	69.9 (18.9)	69.7 (17.7)	68.9 (17.9)	66.4 (17.0)	-3.0 (-6.5, 0.5)	68.2 (16.1)	69.3 (15.9)	70.3 (16.7)	68.6 (16.7)	70.6 (15.6)	0.4 (-2.9, 3.7)	0.16
Fat, g/day	67.0 (20.9)	64.9 (23.0)	63.5 (21.4)	62.4 (19.5)	61.2 (19.2)	-4.6 (-8.1, 1.0)	63.1 (17.1)	63.3 (18.7)	63.3 (17.2)	61.6 (18.3)	65.0 (18.5)	-1.5 (-5.5, 2.5)	0.25
Carbohydrate, g/day	243.3 (58.1)	233.1 (55.3)	232.5 (63.6)	228.2 (54.0)	226.3 (59.6)	-15.0 (-25.7, -4.3)	238.8 (57.3)	231.3 (53.5)	238.4 (53.3)	224.4 (47.1)	236.1 (55.4)	-14.3 (-24.9, -3.8)	0.93
Physical activity													
Daily step counts, steps/day [†]	7702 (3302)	NA	NA	9481 (3909)	NA	1779 (1175, 2383)	8488 (3601)	NA	NA	10117 (4460)	NA	1629 (1023, 2235)	0.73
MVPA, min/day [†]	66.9 (32.6)	NA	NA	86.1 (40.2)	NA	19.3 (14.1, 24.4)	70.3 (37.4)	NA	NA	85.4 (47.8)	NA	15.1 (9.1, 21.0)	0.29

Data at weeks 0, 4, 8, 12 and 16 are presented as mean (standard deviation). Changes from baseline to week 12 are presented as mean (95% confidence interval). P value is a result of unpaired t test for 12-week change between groups. [†]Eligible data were available for 192 participants (95 and 97 in the A-mix and the placebo groups, respectively).

MVPA, moderate-to-vigorous physical activity; NA: not assessed.

Table 18. Stratified analyses: participants whose step counts increased by 1,000 steps or more (n = 109) and increased by fewer than 1,000 steps

(n = 83) during the 12-week intervention period.

	Week 0	Week 12	12-week change	Week 0	Week 12	12-week change	P value
Participants who have increased more than 1,000 steps in 12 weeks							
	A-mix group (n = 61)			Placebo group (n = 48)			
Abdominal total fat area, cm ²	330.1 (79.0)	304.6 (80.2)	-25.5 (-35.6, -15.4)	319.5 (69.4)	311.1 (69.8)	-8.4 (-18.3, 1.4)	0.019
Abdominal subcutaneous fat area, cm ²	231.3 (68.3)	217.7 (68.8)	-13.6 (-20.7, -6.5)	219.2 (68.7)	218.6 (67.9)	-0.6 (-7.5, 6.3)	0.011
Abdominal visceral fat area, cm ²	98.8 (37.1)	86.9 (34.2)	-11.9 (-16.7, -7.1)	100.3 (38.0)	92.5 (39.0)	-7.8 (-12.5, -3.1)	0.23
Weight, kg	74.6 (9.0)	72.9 (8.7)	-1.7 (-2.3, -1.1)	74.0 (7.9)	72.5 (7.9)	-1.4 (-2.0, -0.9)	0.51
Body mass index, kg/m ²	27.0 (1.2)	26.4 (1.3)	-0.6 (-0.8, -0.4)	27.1 (1.3)	26.5 (1.5)	-0.5 (-0.7, -0.3)	0.52
Percent fat mass, %	30.5 (6.9)	29.0 (7.5)	-1.5 (-2.1, -1.0)	31.3 (6.8)	29.9 (7.1)	-1.4 (-1.9, -1.0)	0.77
Waist circumference, cm	93.9 (6.0)	92.1 (5.9)	-1.8 (-2.5, -1.1)	94.1 (5.1)	92.7 (5.1)	-1.3 (-2.1, -0.6)	0.36
Hip circumference, cm	100.2 (4.7)	99.3 (4.2)	-0.9 (-1.4, -0.4)	99.8 (3.8)	99.2 (3.8)	-0.6 (-1.0, -0.3)	0.42
Waist to hip ratio	0.94 (0.05)	0.93 (0.05)	-0.01 (-0.02, 0.00)	0.94 (0.04)	0.94 (0.04)	-0.01 (-0.01, 0.00)	0.57
Participants who have increased less than 1,000 steps in 12 weeks							
	A-mix group (n = 34)			Placebo group (n = 49)			
Abdominal total fat area, cm ²	354.4 (60.8)	348.9 (59.1)	-5.4 (-15.0, 4.1)	332.5 (71.8)	323.8 (74.3)	-8.7 (-16.7, -0.7)	0.60
Abdominal subcutaneous fat area, cm ²	270.1 (54.4)	269.7 (52.9)	-0.4 (-9.2, 8.4)	236.9 (71.1)	233.9 (71.4)	-3.0 (-9.8, 3.9)	0.64
Abdominal visceral fat area, cm ²	84.2 (30.9)	79.2 (33.6)	-5.1 (-9.4, -0.7)	95.6 (40.9)	89.9 (39.6)	-5.7 (-9.1, -2.4)	0.80
Weight, kg	71.8 (8.7)	71.5 (8.9)	-0.3 (-0.9, 0.2)	72.7 (7.6)	71.7 (7.6)	-1.0 (-1.6, -0.3)	0.17
Body mass index, kg/m ²	27.3 (1.3)	27.1 (1.3)	-0.1 (-0.4, 0.1)	27.2 (1.4)	26.9 (1.5)	-0.4 (-0.6, -0.1)	0.21
Percent fat mass, %	34.4 (6.6)	33.8 (6.6)	-0.6 (-1.0, -0.2)	32.3 (7.0)	31.2 (7.2)	-1.0 (-1.6, -0.5)	0.24
Waist circumference, cm	94.0 (4.2)	93.4 (4.4)	-0.7 (-1.4, 0.0)	93.9 (5.8)	92.8 (6.0)	-1.1 (-1.9, -0.3)	0.24
Hip circumference, cm	101.8 (3.4)	101.2 (3.4)	-0.6 (-1.1, -0.1)	100.4 (3.5)	99.9 (3.6)	-0.5(-1.0, 0.0)	0.78
Waist to hip ratio	0.92 (0.04)	0.92 (0.04)	0.00 (-0.01, 0.00)	0.94 (0.05)	0.93 (0.05)	-0.01 (-0.01, 0.00)	0.25

Data at weeks 0 and 12 are presented as mean (standard deviation). Changes from baseline to week 12 are presented as mean (95% confidence interval). P value is a result of unpaired t test for 12-week change between groups.

Table 19. Stratified analyses: participants whose abdominal visceral fat area were 100 cm² or more (n = 77) and were less than 100 cm² (n = 117) at base line period.

	Week 0	Week 12	12-week change	Week 0	Week 12	12-week change	P value
Participants whose abdominal visceral fat area were 100 cm² or more							
	A-mix group (n = 37)			Placebo group (n = 40)			
Abdominal total fat area, cm ²	369.0 (69.5)	346.1 (75.3)	-22.9 (-35.2, -10.5)	341.3 (59.2)	330.3 (56.7)	-11.0 (-19.7, -2.2)	0.11
Abdominal subcutaneous fat area, cm ²	241.1 (64.4)	231.9 (66.8)	-9.2 (-17.9, -0.5)	207.6 (49.3)	206.3 (46.8)	-1.3 (-7.7, 5.0)	0.14
Abdominal visceral fat area, cm ²	127.8 (25.5)	114.2 (27.8)	-13.7 (-20.7, -6.6)	133.6 (35.5)	124.0 (37.2)	-9.6 (-14.5, -4.7)	0.34
Weight, kg	76.0 (9.7)	74.7 (9.2)	-1.3 (-2.0, -0.7)	76.4 (8.0)	75.2 (8.0)	-1.2 (-1.8, -0.6)	0.76
Body mass index, kg/m ²	27.3 (1.1)	26.8 (1.0)	-0.5 (-0.7, -0.2)	27.2 (1.3)	26.8 (1.3)	-0.4 (-0.6, -0.2)	0.78
Percent fat mass, %	32.0 (6.8)	31.1 (6.8)	-0.9 (-1.4, -0.4)	30.4 (5.5)	29.3 (5.8)	-1.1 (-1.6, -0.5)	0.66
Waist circumference, cm	96.5 (6.2)	95.0 (5.6)	-1.5 (-2.2, -0.7)	96.3 (4.8)	94.8 (4.2)	-1.5 (-2.2, -0.7)	0.98
Hip circumference, cm	101.0 (4.7)	100.4 (3.9)	-0.6 (-1.3, 0.1)	100.1 (3.5)	99.6 (3.4)	-0.5 (-0.9, 0.0)	0.64
Waist to hip ratio	0.96 (0.05)	0.95 (0.04)	-0.01 (-0.02, 0.00)	0.96 (0.04)	0.95 (0.04)	-0.01 (-0.02, 0.00)	0.98
Participants whose abdominal visceral fat area were less than 100 cm²							
	A-mix group (n = 58)			Placebo group (n = 59)			
Abdominal total fat area, cm ²	319.5 (70.2)	304.1 (72.5)	-15.4 (-25.0, -5.8)	315.9 (75.1)	309.4 (79.1)	-6.5 (-15.2, 2.1)	0.17
Abdominal subcutaneous fat area, cm ²	247.8 (67.5)	239.1 (69.3)	-8.6 (-16.2, -1.1)	242.3 (77.6)	240.7 (78.2)	-1.6 (-8.4, 5.3)	0.17
Abdominal visceral fat area, cm ²	71.8 (20.8)	65.0 (21.3)	-6.8 (-10.2, -3.3)	73.6 (15.7)	68.7 (18.7)	-4.9 (-8.2, -1.6)	0.44
Weight, kg	72.1 (8.2)	71.0 (8.2)	-1.2 (-1.7, -0.6)	71.6 (7.2)	70.3(7.0)	-1.3 (-1.9, -0.7)	0.78
Body mass index, kg/m ²	27.0 (1.3)	26.6 (1.5)	-0.4 (-0.6, -0.2)	27.1 (1.4)	26.7 (1.6)	-0.5 (-0.7, -0.3)	0.78
Percent fat mass, %	31.9 (7.2)	30.5 (8.0)	-1.4 (-1.9, -0.8)	32.8 (7.5)	31.4 (7.8)	-1.3 (-1.8, -0.9)	0.87
Waist circumference, cm	92.4 (4.2)	91.0 (4.7)	-1.4 (-2.0, -0.7)	92.5 (5.2)	91.4 (5.9)	-1.1 (-1.8, -0.3)	0.59
Hip circumference, cm	100.6 (4.1)	99.8 (4.2)	-0.9 (-1.3, -0.4)	100.3 (3.7)	99.7 (4.0)	-0.7 (-1.1, -0.2)	0.45
Waist to hip ratio	0.92 (0.04)	0.91 (0.04)	-0.01 (-0.01, 0.00)	0.92 (0.04)	0.92 (0.04)	-0.01 (-0.01, 0.00)	0.90

Data at weeks 0 and 12 are presented as mean (standard deviation). Changes from baseline to week 12 are presented as mean (95% confidence interval). P value is a result of unpaired t test for 12-week change between groups.

Table 20. Adverse events identified by participants' diary logs and blood hematologic and biochemical tests (n = 200)

	A-mix group (n = 100)	Placebo group (n = 100)	P value for chi-squared test
Asthma	1 (1)	0 (0)	0.32
Vulval tumor	0 (0)	1 (1)	0.32
Diarrhea	1 (1)	0 (0)	0.32
Gastroenteritis	1 (1)	0 (0)	0.32
Fever	1 (1)	0 (0)	0.32
Influenza	3 (3)	5 (5)	0.47
Headache	1 (1)	0 (0)	0.32
Toothache	1 (1)	1 (1)	1.00
Fatigue	2 (2)	4 (4)	0.41
Foot pain	5 (5)	2 (2)	0.25
Knee pain	2 (2)	0 (0)	0.16
Dry eye	0 (0)	1 (1)	0.32
Gum swelling	0 (0)	2 (2)	0.16
Cough	0 (0)	1 (1)	0.32
Anorexia	0 (0)	1 (1)	0.32
Scapular pain	1 (1)	2 (2)	0.56
Wrist pain	0 (0)	1 (1)	0.32
Low back pain	4 (4)	1 (1)	0.17
Cold	25 (25)	23 (23)	0.74
Platelet elevation	1 (1)	0 (0)	0.32
Asthenopia	1 (1)	0 (0)	0.32
Allergy to pollen	15 (15)	6 (6)	0.04
Pharyngitis	3 (3)	2 (2)	0.65
Cold sores	1 (1)	0 (0)	0.32
Bronchitis	1 (1)	0 (0)	0.32
Dizziness	0 (0)	2 (2)	0.16
Flank muscle pain	0 (0)	1 (1)	0.32
Inflammatory pseudotumor	0 (0)	1 (1)	0.32
Allergy rhinitis	0 (0)	6 (6)	0.013

Data are shown as n (%).

Table 21. Deviation identified during the study period by fasting blood test

	Reference ranges	Deviation	A-mix group (n = 396)*	Placebo group (n = 399)*	P value for chi-squared test
White blood cells (/μL)	3300–9000	↑	15 (3.8)	11 (2.8)	0.41
		↓	2 (0.5)	2 (0.5)	0.99
Red blood cells (×10 ⁴ /μL)	Male: 430–570	↑	3 (0.8)	12 (3.0)	0.020
	Female: 380–500	↓	2 (0.5)	2 (0.5)	0.99
Hemoglobin (g/dL)	Male: 13.5–17.5	↑	4 (1.0)	0 (0)	0.044
	Female: 11.5–15.0	↓	8 (2.0)	10 (2.5)	0.65
Hematocrit (%)	Male: 39.7–52.4	↑	7 (1.8)	8 (2.0)	0.81
	Female: 34.8–45.0	↓	3 (0.8)	1 (0.3)	0.31
Platelets (×10 ⁴ /μL)	14.0–34.0	↑	14 (3.5)	18 (2.0)	0.48
		↓	3 (0.8)	1 (0.3)	0.31
AST (U/L)	10–40	↑	2 (0.5)	4 (1.0)	0.42
		↓	4 (1.0)	0 (0)	0.044
ALT (U/L)	5–45	↑	3 (0.8)	5 (1.3)	0.48
		↓	0 (0)	5 (1.3)	0.025
LDH (U/L)	120–240	↑	3 (0.8)	3 (0.8)	0.99
		↓	1 (0.3)	1 (0.3)	1.00
T-Bil (mg/dL)	0.2–1.2	↑	10 (2.5)	21 (5.3)	0.046
		↓	0 (0)	0 (0)	-
ALP (U/L)	100–325	↑	1 (0.3)	1 (0.3)	1.00
		↓	0 (0)	0 (0)	-
γ-GTP (U/L)	Male: ≤80	↑	4 (1.0)	9 (2.3)	0.17
	Female: ≤30	↓			
Total protein (g/dL)	6.7–8.3	↑	2 (0.5)	0 (0)	0.16
		↓	8 (2.0)	3 (0.8)	0.13
Albumin (g/dL)	3.8–5.2	↑	1 (0.3)	0 (0)	0.32
		↓	3 (0.8)	1 (0.3)	0.31
Blood urea nitrogen (mg/dL)	8.0–20.0	↑	17 (4.3)	6 (1.5)	0.019
		↓	9 (2.3)	18 (4.5)	0.08
Creatinine (mg/dL)	Male: 0.61–1.04	↑	12 (3.0)	12 (3.0)	0.99
	Female: 0.47–0.79	↓	6 (1.5)	1 (0.3)	0.06
Uric acid (mg/dL)	Male: 3.8–7.0	↑	28 (7.1)	26 (6.5)	0.76
	Female: 2.5–7.0	↓	2 (0.5)	4 (1.0)	0.42
Sodium (mEq/L)	137–147	↑	0 (0)	0 (0)	-
		↓	0 (0)	2 (0.5)	0.16
Chloride (mEq/L)	98–108	↑	8 (2.0)	9 (2.3)	0.82
		↓	1 (0.3)	0 (0)	0.32
Potassium (mEq/L)	3.5–5.0	↑	1 (0.3)	3 (0.8)	0.32
		↓	0 (0)	0 (0)	-
Calcium (mg/dL)	8.4–10.4	↑	0 (0)	6 (1.5)	0.014
		↓	0 (0)	0 (0)	-
Magnesium (mg/dL)	1.9–2.5	↑	3 (0.8)	1 (0.3)	0.31
		↓	3 (0.8)	2 (0.5)	0.65
Serum iron (μg/dL)	Male: 50–200	↑	6 (1.5)	22 (5.5)	0.002
	Female: 40–180	↓	13 (3.3)	14 (3.5)	0.86

Data are shown as n (%). The sum of the total number of samples at week 4, week 8, week 12, and week 16.

AST, aspartate amino transferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; T-Bil, total-bilirubin; ALP, Alkaline phosphatase; γ-GTP, γ-Glutamyltranspeptidase.

Table 22. Changes in hematologic or hematological parameters

	Reference ranges	Sex	Group	Screening (n = 200)	Week 4 (n = 199)	Week 8 (n = 199)	Week 12 (n = 198)	Week 16 (n = 199)
White blood cells (/ μ L)	3300–9000		A-mix	6538 (1598)	6416 (1904)	6541 (1715)	5978 (1314) #	6389 (1569)
			Placebo	6412 (1621)	6301 (1573)	6257 (1508)	6041 (1404) #	6174 (1547)
Red blood cells ($\times 10^4$ / μ L)	Male: 430–570 Female: 380–500	Male	A-mix	504 (35)	506 (34)	511 (36) #	492 (35) #	501 (40)
			Placebo	504 (37)	512 (36) #	512 (37) #	497 (36) #	502 (35)
		Female	A-mix	464 (30)	464 (26)	469 (29)	457 (31) #	462 (28)
			Placebo	457 (30)	462 (30)	464 (27) #	449 (29) #	454 (28)
Hemoglobin (g/dL)	Male: 13.5–17.5 Female: 11.5–15.0	Male	A-mix	15.5 (0.9)	15.5 (0.9)	15.7 (0.8) #	15.0 (0.8) #	15.4 (1.0)
			Placebo	15.6 (0.9)	15.7 (0.8)	15.8 (0.8)	15.2 (0.8) #	15.4 (0.9) #
		Female	A-mix	13.5 (1.2)	13.4 (1.3)	13.6 (1.2)	13.2 (1.0) #	13.3 (1.0)
			Placebo	13.5 (1.0)	13.5 (1.1)	13.6 (1.1)	13.1 (1.1) #	13.3 (1.1) #
Hematocrit (%)	Male: 39.7–52.4 Female: 34.8–45.0	Male	A-mix	47.9 (2.4)	47.5 (2.6)	47.6 (2.6)	46.3 (2.4) #	47.2 (2.6) #
			Placebo	48.0 (2.6)	48.1 (2.3)	48.0 (2.0)	47.1 (2.5) #	47.4 (2.4)
		Female	A-mix	42.5 (3.1)	42.0 (3.4)	42.3 (3.1)	41.8 (2.8) #	42.1 (2.6)
			Placebo	42.5 (2.6)	42.5 (3.1)	42.5 (2.8)	41.5 (2.9) #	42.0 (3.0)
Platelet count ($\times 10^4$ / μ L)	14.0–34.0		A-mix	30.3 (6.7)	30.1 (7.0)	29.8 (6.9)	29.2 (6.5) #	29.5 (6.5) #
			Placebo	29.2 (6.6)	28.9 (6.1)	29.5 (6.2)	28.3 (5.9) #	29.2 (6.0)

Data are shown as mean (standard deviation).

#Significant difference from the screening value used by paired t tests ($P < 0.05$).

There were no significant differences in any parameters between the two groups at any time points.

Table 23. Changes in blood biochemical parameters

	Reference ranges	Sex	Group	Screening (n = 200)	Week 4 (n = 199)	Week 8 (n = 199)	Week 12 (n = 198)	Week 16 (n = 199)
AST (U/L)	10–40		A-mix	22 (7)	21 (6) [#]	21 (6)	19 (5) [#]	20 (6) [#]
			Placebo	21 (7)	20 (5)	21 (7)	19 (5) [#]	19 (7) [#]
ALT (U/L)	5–45		A-mix	25 (16)	22 (13) [#]	22 (12) [#]	20 (11) [#]	22 (13) [#]
			Placebo	23 (14)	20 (12) [#]	22 (14)	20 (12) [#]	21 (15) [#]
LDH (U/L)	120–240		A-mix	179 (24)	179 (24)	180 (23)	168 (24) [#]	174 (24) [#]
			Placebo	179 (25)	179 (23)	178 (26)	172 (26) [#]	171 (26) [#]
T-Bil (mg/dL)	0.2–1.2		A-mix	0.7 (0.3)	0.8 (0.3)	0.8 (0.3)	0.8 (0.3)	0.8 (0.3)
			Placebo	0.8 (0.3)	0.8 (0.3)	0.8 (0.3) [#]	0.8 (0.3) [#]	0.8 (0.3) [#]
ALP (U/L)	100–325		A-mix	212 (48)	208 (51)	206 (47) [#]	195 (46) [#]	203 (49) [#]
			Placebo	201 (53)	202 (60)	200 (57)	192 (55) [#]	194 (55) [#]
γ-GTP (U/L)	Male: ≤80 Female: ≤30	Male	A-mix	32 (16)	29 (13) [#]	29 (12)	26 (10) [#]	29 (13) [#]
			Placebo	33 (15)	33 (15)	33 (16)	30 (15) [#]	32 (17)
		Female	A-mix	23 (12)	21 (11) [#]	21 (11)	20 (11) [#]	20 (9) [#]
			Placebo	24 (13)	22 (13)	22 (12)	20 (11) [#]	21 (11) [#]
Total protein (g/dL)	6.7–8.3		A-mix	7.5 (0.4)	7.4 (0.4)	7.5 (0.4)	7.2 (0.3) [#]	7.4 (0.4) [#]
			Placebo	7.4 (0.3)	7.4 (0.3)	7.4 (0.4)	7.2 (0.3) [#]	7.3 (0.3) [#]
Albumin (g/dL)	3.8–5.2		A-mix	4.5 (0.3)	4.5 (0.3)	4.5 (0.3)	4.4 (0.3) [#]	4.5 (0.3) [#]
			Placebo	4.5 (0.3)	4.5 (0.3)	4.5 (0.3)	4.4 (0.3) [#]	4.4 (0.3) [#]
Urea nitrogen (mg/dL)	8.0–20.0		A-mix	12.4 (3.0)	12.8 (3.6)	12.7 (3.6)	12.8 (4.0)	12.7 (3.6)
			Placebo	12.8 (3.5)	12.1 (3.2) [#]	12.7 (3.6)	12.4 (3.2)	12.9 (3.6)
Creatinine (mg/dL)	Male: 0.61–1.04 Female: 0.47–0.79	Male	A-mix	0.82 (0.09)	0.85 (0.11) ^{#,*}	0.85 (0.09) ^{#,*}	0.87 (0.10) [#]	0.86 (0.09) [#]
			Placebo	0.86 (0.12)	0.90 (0.12) [#]	0.89 (0.13) [#]	0.90 (0.12) [#]	0.89 (0.12) [#]
		Female	A-mix	0.62 (0.08)	0.63 (0.09)	0.62 (0.09)	0.64 (0.09) [#]	0.64 (0.08) [#]
			Placebo	0.61 (0.09)	0.62 (0.12)	0.62 (0.10)	0.64 (0.09) [#]	0.63 (0.09) [#]
Uric acid (mg/dL)	Male: 3.8–7.0 Female: 2.5–7.0	Male	A-mix	6.4 (1.1)	6.5 (1.2)	6.4 (1.1)	6.5 (1.2)	6.6 (1.2)
			Placebo	6.3 (1.2)	6.2 (1.1)	6.3 (1.2)	6.2 (1.2)	6.4 (1.2)
		Female	A-mix	4.9 (1.1)	4.8 (1.2)	4.9 (1.2)	4.7 (1.0)	4.9 (1.2)
			Placebo	5.0 (0.9)	4.9 (1.0)	4.9 (0.9)	4.9 (0.9)	4.9 (1.0)
Sodium (mEq/L)	137–147		A-mix	141 (2)	141 (2)	142 (2) [#]	141 (2)	141 (2)
			Placebo	141 (2)	141 (2)	142 (2)	141 (2)	141 (2)

次ページに続く

Table 23. 続き

Chloride (mEq/L)	98–108		A-mix	104 (2)	104 (2)	104 (2)	105 (2) [#]	105 (2)
			Placebo	104 (2)	104 (2)	104 (2)	105 (2) [#]	105 (2) [#]
Potassium (mEq/L)	3.5–5.0		A-mix	4.3 (0.3)	4.4 (0.2) [#]	4.4 (0.3) [#]	4.3 (0.3)	4.3 (0.3)
			Placebo	4.3 (0.3)	4.3 (0.3) [#]	4.3 (0.3) [#]	4.3 (0.3)	4.3 (0.3)
Calcium (mg/dL)	8.4–10.4		A-mix	9.6 (0.3)	9.6 (0.3)	9.6 (0.3)	9.5 (0.3) [#]	9.5 (0.3)
			Placebo	9.7 (0.3)	9.6 (0.4)	9.7 (0.4)	9.6 (0.3) [#]	9.6 (0.3) [#]
Magnesium (mg/dL)	1.9–2.5		A-mix	2.2 (0.1)	2.2 (0.1)	2.2 (0.1)	2.1 (0.1) [#]	2.1 (0.1) [#]
			Placebo	2.2 (0.2)	2.2 (0.1)	2.2 (0.1)	2.1 (0.1) [#]	2.1 (0.1) [#]
Serum iron (μg/dL)	Male: 50–200 Female: 40–180	Male	A-mix	114 (39)	119 (37)	107 (33)	108 (33)	117 (40)
			Placebo	112 (42)	117 (38)	121 (44)	115 (39)	124 (43)
		Female	A-mix	103 (54)	86 (47) [#]	90 (35) [#]	99 (45)	92 (45)
			Placebo	91 (38)	101 (53)	98 (46)	95 (50)	92 (42)

Data are shown as mean (standard deviation).

[#]Significant difference from the screening value used by paired t tests ($P < 0.05$).

*Significant difference between the two groups used by unpaired t tests ($P < 0.05$).

AST, aspartate amino transferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; T-Bil, total-bilirubin; ALP, Alkaline phosphatase; γ -GTP, γ -Glutamyltranspeptidase;

Table 24. Changes in quantitative urinalysis parameters

	Reference ranges	Group	Screening (n = 200)	Week 4 (n = 199)	Week 8 (n = 199)	Week 12 (n = 198)	Week 16 (n = 199)
pH	5.0–7.5	A-mix	6.2 (0.5)	6.2 (0.6)	6.2 (0.6)	6.3 (0.6)	6.4 (0.6)
		Placebo	6.2 (0.6)	6.3 (0.7)	6.2 (0.6)	6.3 (0.6)	6.3 (0.6)
Specific gravity	1.006–1.030	A-mix	1.019 (0.008)	1.020 (0.007)	1.019 (0.007)	1.019 (0.008)	1.019 (0.007)
		Placebo	1.020 (0.008)	1.019 (0.008)	1.019 (0.007)	1.017 (0.008) #	1.019 (0.008)

Data are shown as mean (standard deviation).

#Significant difference from the screening value used by paired t tests ($P < 0.05$).

There were no significant differences in either parameter between the two groups used by unpaired t tests ($P < 0.05$).

Table 25. Changes in qualitative urinalysis parameters

	Reference ranges	Group	Screening (n = 200)	Week 4 (n = 199)	Week 8 (n = 199)	Week 12 (n = 198)	Week 16 (n = 199)	
Urine protein	(-)-(±)	A-mix	-	88	90	86	84*	92
			±	12	7	10	9	6
			+	0	1	2	5	1
		Placebo	2+	0	2	1	0	0
			-	94	88 [#]	94	96	95
			±	6	10	6	3	5
			+	0	2	0	1	0
2+	0	0	0	0	0			
Urine glucose	(-)-(±)	A-mix	-	99	99	99	98	98
			±	0	1	0	0	0
			+	1	0	0	0	1
		Placebo	-	100	100	98	100	99
			±	0	0	1	0	1
			+	0	0	1	0	0
			2+	0	0	0	0	0
Urobilinogen	(±)	A-mix	±	99	99	98	97	98
			+	1	1	1	1	1
		Placebo	±	99	99	99	100	99
			+	1	1	1	0	1
			2+	0	0	0	0	0
Bilirubin	(-)	A-mix	-	100	100	99	98	99
			+	0	0	0	0	0
		Placebo	-	100	100	100	100	100
			+	0	0	0	0	0
			2+	0	0	0	0	0
Ketone body	(-)	A-mix	-	97	99	97	96	95
			+	2	0	1	1	1
			2+	1	0	0	1	3
			3+	0	1	1	0	0
			-	100	99	98	98	98
		Placebo	+	0	1	1	1	2
			2+	0	0	0	1	0
			3+	0	0	1	0	0
			2+	0	0	0	0	0
Occult blood	(-)	A-mix	-	94	93	90	86 [#]	95
			±	2	1	2	4	3
			+	1	0	2	1	0
			2+	0	1	3	1	1
			3+	3	5	2	6	0
			-	93	89	95	93	92
		Placebo	±	3	7	3	1	1
			+	1	2	0	0	1
			2+	1	2	0	4	2
			3+	2	0	2	2	4
			2+	0	0	0	0	0

Values indicate the number of participants. The symbols indicate the degree of each item: -, negative; ±, false-positive; +, positive (mild); 2+, positive (moderate); 3+, positive (serious).

[#]Significant difference from the screening value used by Wilcoxon signed-rank tests ($P < 0.05$).

*Significant difference between the two groups used by Mann-Whitney U test ($P < 0.05$).

4. 考察

本研究課題4の目的は、A-mix 摂取と身体活動啓発の組合せが、過体重成人の腹部脂肪に対する有効性を検証することであった。その結果、腹部全脂肪面積と腹部皮下脂肪面積において、A-mix 群において対照群と比較し、有意な減少が認められた。また、安全性の項目では、試験期間中を通し、試験食品に起因する重篤な有害事象は観察されなかった。風邪や花粉症といった一般的な感染症、および血液検査における基準値からの逸脱がみられたが、これらの有害事象はグループの割付に関係なく発生しており、試験責任医師により試験食品との因果関係はないと判断された。

12週間の介入期間で、歩数の増加が1,000歩以上だった者における解析では、A-mix 群は対照群と比較し、腹部全脂肪面積と皮下脂肪面積において有意差が認められた。一方、歩数の増加が1,000歩未満だった者における解析では、腹部全脂肪、皮下脂肪、内臓脂肪のいずれにおいても有意差は見られなかった。この結果は、A-mix 摂取だけでは体脂肪低減効果は期待できず、身体活動量を増やしながらA-mix を摂取することで、腹部脂肪面積減少効果が大きくなると考えられる。また、ベースライン時の腹部脂肪面積が100 cm²以上/未満の層別解析を行ったが、いずれの集団においても有意差は認められず、層別解析の結果から算出された効果量は、腹部内臓脂肪面積100 cm²以上/未満の両方で0.4となり、試験全体の効果量と同等であった。このことから、今回の介入効果は対象者の腹部内臓脂肪量に関わらず、同様の腹部脂肪減少効果が得られるものと考えられる。今後、対象者を内臓脂肪型あるいは皮下脂肪型に限定し、さらに検証を重ねることが必要である。

A-mix 群において、腹部脂肪の減少が顕著だったことについては、研究課題 1 および 2 で記載した機序において説明が可能と考えられる。すなわち、cAMP-依存的な脂肪分解・燃焼作用が A-mix の一過性摂取と運動を組み合わせることにより促進されている可能性がある。そして、この作用が蓄積することで、今回の試験で認められたような腹部脂肪減少効果が得られたと推論される。

文献研究で述べた通り、これまでにアミノ酸の長期摂取と運動の組合せが、脂肪の動員や体重減少を促進したという報告は多くある。これらの報告で用いられている運動プログラムは、今回の試験のプログラムよりも強度が高い。高強度運動時は炭水化物を主要なエネルギー源とするため (Romijn et al., 1993)、体脂肪の減少には高強度運動よりも低～中強度の運動の方が好ましいと推察される。さらに、肥満者には高強度の運動よりも、中程度の運動の方がより許容されやすく、実践しやすいと考えられる。したがって、A-mix 摂取と身体活動啓発を併用した本研究課題 4 の成果は、これまでの報告よりも多くの方々に適用できる可能性が高い。今後、本仮説を裏付けるさらなる試験が必要である。

A-mix の安全性については、単回投与毒性試験、91 日間の反復投与毒性試験、および Ames 試験 (物質の変異原性を評価するためのバイオアッセイ試験) の結果がすでに報告されている (金光他, 2017a, 2017b; 峯川他, 2017)。本研究課題 4 ではいくつかの有害事象が散見されたが、一般的に、これらの症状は飲料の摂取や運動を実施した際、あるいは不活動な試験参加者でも見受けられる事象である。これらのことから、本研究課題 4 で用いた A-mix を含む飲料を長期間摂取しても、重篤な有害事象は起こりにくいと考えられる。Fischer et al. (1974) は、芳香族アミノ酸 (チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン) と BCAA

(バリン、ロイシン、イソロイシン) のインバランスによる有害事象を指摘している。具体的には、フィッシャー比 (BCAA/芳香族アミノ酸) の低下に伴う肝障害が考えられる (Fischer et al., 1974)。しかしながら、本研究課題 4 において、肝機能指標、例として AST、ALT、 γ -GTP には群間差はなかった (Table 23)。このことから、1,500 mg/日の A-mix 摂取は BCAA の代謝に影響を及ぼさないと考えられる。

本研究課題 4 にはいくつかの強みがある。第一に、試験デザインがプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間試験であることである。そのため、得られた結果の信頼性は高い。第二に、主要評価項目とした腹部脂肪面積を CT にて測定しており、妥当性は高い。第三に、試験参加者に対する身体活動啓発が 1,000 歩増加と実行可能性の高い介入であった点である。このようなマイルドな介入は、監視下における運動プログラムと比較すると、一般に受け入れられやすいと考えられる。層別解析の結果においても、介入期間中、1,000 歩以上歩数が増えた者は A-mix による腹部脂肪面積減少効果が顕在化するという結果を得ている。最後に、試験の継続率は 99% であり、ほぼ全員が完遂できたことも強みであると考えられる。

一方で、いくつかの限界がある。第一に、本研究課題 4 では過体重者 ($25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$) を対象としたため、A-mix と身体活動啓発の組合せが肥満者 ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) に与える影響は不明である。第二に、関連項目の変化量の中で、例としてエネルギー摂取量において、2 群間で有意ではないが違いがあった。今回の結果には試験食品自体のエネルギー摂取量については含めていないが、試験食品のエネルギー量はプラセボよりも A-mix で高く、もし含めた場合はこ

のエネルギー摂取量の誤差は小さくなると考えられる。

本検討課題 4 の結論を述べる。1,500 mg/500 mL の A-mix 摂取と、継続的な身体活動啓発の組合せは、過体重成人の腹部脂肪減少を促進することが示唆された。

VIII. 総合考察

1. 結論

本博士論文では、動物試験で確認された A-mix と運動実践の腹部脂肪低減効果に対し、ヒトによる明確なエビデンスを得ることを目的とし、以下の研究課題を設定し、検討した。

1) 20代の健常大学生10名を対象とし、A-mix 3,000 mgの単回摂取と中強度運動（50%VO₂max 運動強度）を併用した際の脂質代謝促進効果を、血中指標および呼気代謝より検討した。

2) 30～40代の過体重男性11名を対象とし、A-mix 3,000 mgの単回摂取と低強度運動（40%VO₂max 運動強度）を併用した際の脂質代謝促進効果を、血中指標より検討した。

3) 20～64歳の過体重成人男女を対象とし、A-mix 混合飲料の長期摂取と+1,000歩程度の身体活動啓発を併用した際の有効性と有効用量を、CTによる腹部脂肪面積を主要評価項目として検討した。

4) 20～64歳の過体重成人男女を対象とし、A-mix 混合飲料（1,500 mg/500 mL）の長期摂取と+1,000歩程度の身体活動啓発を併用した際の有効性を、CTによる腹部脂肪面積の変化量を主要評価項目として検証した。

上記の研究課題を検討することで、以下の結論を得た。

1) 運動前に A-mix を摂取した場合、プラセボ摂取と比較して、中強度運動中の血中アドレナリン濃度、および運動後の血中グルカゴン濃度において有意な上昇が確認された。さらに、運動中・運動後の血中総ケトン体濃度、および運

動後の血中グリセロール濃度を有意に上昇させた。これらの結果は、運動前の A-mix 摂取は運動時・後のエネルギー源として、脂質の利用を促進することが示唆された (Ueda et al., 2017c)。

2) 運動前の A-mix 摂取は、プラセボ摂取と比較して、低強度運動中の血中グルカゴン濃度、および運動中の総ケトン体濃度を有意に上昇させた。さらに、運動時間中の血中総ケトン体濃度-時間曲線化面積 (AUC) と、血中グルカゴン濃度-時間 AUC/血中インスリン濃度-時間 AUC について、正の相関が確認された。これらの結果は、運動前の A-mix 摂取は運動時のエネルギー源として、脂質の利用を促進することが示唆された。さらに、その機序には血中グルカゴン濃度/インスリン濃度の上昇が寄与している可能性が示唆された (Ueda et al., 2017d)。

3) 介入前後の腹部脂肪面積の減少量は、高用量群 14.6 cm²、中用量群 25.3 cm²、低用量群 23.2 cm²、プラセボ群 12.5 cm² となり、中用量群および低用量群で腹部脂肪面積の減少量が大きい傾向がみられた。食事面での遵守状況について、低用量群ではエネルギー摂取量が 171.5 kcal/day 減少していたのに対し、中用量群では 25.0 kcal/day の増加であった。このことから、低用量群での体脂肪低減効果はエネルギー収支が負に傾いたことが強く影響していると推察され、A-mix 含有量としては 1,500 mg が適当であることが示唆された (Sasai et al., 2017)。

4) 介入前後の腹部脂肪面積の減少量は、A-mix 摂取群 18.3 cm²、プラセボ群 8.3 cm² であり、両群間で有意な差 (P = 0.041) が認められた。食事および運動面での遵守状況を示唆する食事摂取量と身体活動量の変化については、エネルギー摂取量についても、1 日当たりの歩数についても、両群間で有意な差は認め

られなかった。歩数の増加が 1,000 歩以上だった集団における解析では、A-mix 群は対照群と比較し、腹部脂肪面積が有意に減少していた ($P = 0.019$) が、歩数の増加が 1,000 歩に満たなかった集団では、2 群間の有意差は認められなかった。これらの結果から、+1,000 歩程度の身体活動啓発と A-mix 混合飲料の摂取を 12 週間継続することで、プラセボ飲料と比較し、腹部脂肪減少を促進することが示唆された。また、継続飲用においても安全な飲料であることが示唆された (Ueda et al., 2018)。

2. 今後の検討課題

本博士論文で得られた結論を一般化するためには、以下の点を留意しながら、さらに検討を加える必要がある。

1) 対象者の身体的特徴

研究課題 3 および 4 で収集されたデータは、過体重成人を対象としたものである。一方で、体脂肪の低減を期待する者としては、過体重成人のみならず、①肥満度のより高い者 ($BMI > 30$)、②標準体重 ($18.5 < BMI < 25$) ではあるがダイエット志向のある者、③減量を目標とするアスリートが想定される。今後、異なる身体的特徴の集団に対して介入研究を行い、その効果を検討する必要がある。

2) 腹部脂肪測定の精度

本研究課題 4 では、+1,000 歩程度の身体活動啓発と A-mix 混合飲料の継続的使用は、腹部脂肪面積の低減を促進するという結論を得た。研究課題 3 および 4 で用いた臍位あるいは腰椎 L4 位の腹部脂肪面積評価は、内臓脂肪体積との相関

が高いことが報告されているが、1 画像の撮影から得られる情報は限定的である。また、体重や体脂肪量において有意差は認められていない。本研究課題 4 で腹部脂肪面積についてのみ有意差が認められた点について、詳細に確認する必要がある。

3) 作用機序のさらなる探索

研究課題 1 および 2 から、A-mix 摂取と身体活動啓発の併用により観察された腹部脂肪の減少に関わる作用機序として、異化ホルモンであるグルカゴン分泌促進による脂質の利用促進を第一候補として考察した。しかしながら、上述の作用経路は脂肪分解と燃焼の機作の一つでしかない。グルカゴン分泌は消化管ホルモン（グリセンチン、グルカゴン様ペプチド-1、グルコース依存性インスリン分泌性ポリペプチド、グルカゴン様ペプチド-2 等）により密接に調整されている（Holst et al., 2011）。したがって、その他の作用経路も含めて、さらなる検討が必要である。

4) 継続したエビデンスの蓄積

+1,000 歩程度の身体活動啓発と A-mix 混合飲料の継続的使用についての報告は、研究課題 4 で実施した本研究課題のみである。他のグループによる追試も含め、RCT を継続的に行い、エビデンスを蓄積していく必要がある。

3. 本研究で得られた知見の意義

本研究で得られた一連の結果は、健常者および過体重者における身体活動時の脂質代謝促進剤として、A-mix が有効である可能性を示している。

肥満および肥満に関連する疾患の増加が進むわが国では、その予防策として、身体活動の増加が重要であり、国策として取り組まれている。その施策の意義を加味し、さらなる脂質代謝促進効果および体脂肪低減効果を持つ素材について明確なエビデンスを得たことは、学術的に意義深いものと考えられる。

また、アミノ酸という手軽に摂取可能なサプリメントを用いた提案は、その汎用性、利便性を鑑みると社会貢献度は高く、本研究の社会的意義は大きいと考えられる。

IX. 謝辞

本博士論文を作成するにあたり、運動疫学分野のみならず、研究全般にわたる懇切なるご指導、ご助言を賜るとともに、いつも厳しくも暖かい激励をもってご指導いただきました筑波大学体育系准教授 中田由夫博士に心より感謝いたします。指導教員および副査の筑波大学体育系教授 前田清司博士におかれましては、博士を取得する心構え、および本論文をまとめるにあたっての熱のこもったご助言を賜り、心より感謝致します。また、主査の筑波大学医学医療系教授 竹越一博博士、副査の筑波大学医学医療系教授 小林裕幸博士、筑波大学体育系准教授 麻美直美博士におかれましては、ご多忙にもかかわらず審査のご快諾と論文の内容に関しての建設的なコメントを頂戴し、深く感謝致します。

単期介入の研究に関しては、立命館大学スポーツ健康科学部教授 藤田聡博士に多大なご指導、ご鞭撻を頂きました。深く感謝申し上げます。長期介入の研究に関しては、東京大学大学院総合文化研究科助教 笹井浩行博士、島根大学人間科学部講師 辻本健彦博士より多大なるご指導を賜りました。両先生に深く感謝申し上げます。

株式会社 明治 研究本部 本部長 伊藤裕之博士、研究戦略統括部 部長 谷口茂氏、乳酸菌研究所 所長 浅見幸夫博士、技術研究所 所長 岡屋英二氏、栄養研究部 部長 河端恵子氏には、本論文をまとめるにあたり、甚大なるご配慮を賜りましたことを深く感謝致します。株式会社 明治 参与 池上秀二博士には、いつも暖かく心のこもったご指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。技術研究所 栄養研究部 栄養 1G 長 三本木千秋博士には、研究者としての心構え、および運動生理学の基礎から丁寧にご指導いただくとともに、研究の方向性に

関して日々、多大なるご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。技術研究所 健康科学研究部 機能評価 1G 長 山口真博士には、著者が明治乳業株式会社に入社した折、研究の方向性につきましてご指導、ご助言いただきました。心より感謝申し上げます。さらに良き先輩として動物実験手技から研究の方向性につきまして、ご指導、ご鞭撻をくださいました府川明佳氏、神田淳博士、山田成臣博士に深く感謝いたします。また、共同研究者としてご協力いただいた田川亮一氏、中山恭佑氏、伊藤恭子氏、高井祥子氏、齊藤由梨氏、吉村彩氏には、様々な場面でお世話になりました。ここに、深く感謝申し上げます。

本論文の研究課題を遂行するにあたり、試験責任医師としてご協力いただいたチヨダパラメディカルケアクリニック院長 海老原淑子医師、品川シーズンテラス健診クリニック 鈴木聡医師、および CPCC 株式会社、並びに株式会社ケイ・エス・オーの諸氏に感謝致します。そして、試験参加者として様々な測定にご協力いただいた皆様に感謝の意を表します。

最後に、これまで支えてきていただいた妻 真弓と娘 真央、実幸には、感謝の気持ちでいっぱいです。本当にありがとうございます。これからもよろしくお願ひ致します。

X. 参考文献

- Achten J & Jeukendrup AE. Maximal fat oxidation during exercise in trained men. *Int J Sports Med* 24(8): 603–608, 2003.
- Ahmadian M, Duncan RE, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidol* 2(2): 229–237, 2007.
- Ahmadian M, Wang Y, Sul HS. Lipolysis in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 42(5): 555–559, 2010.
- Apostolopoulou M, Savopoulos C, Michalakis K, Coppack S, Dardavessis T, Hatzitolios A. Age, weight and obesity. *Maturitas* 71(2): 115–119, 2012.
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP et al., Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J* 16(14): 1879–1886, 2002.
- Bahr R, Hansson P, Sejersted OM. Triglyceride/fatty acid cycling is increased after exercise. *Metabolism* 39(9): 993–999, 1990.
- Bergia RE III, Hudson JL, Campbell WW. Effect of whey protein supplementation on body composition changes in women: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev* 76(7): 539-551, 2018.
- Blecher M, Merlino NS, Ro'Ane JT, Flynn PD. Independence of the effects of epinephrine, glucagon, and adrenocorticotropin on glucose utilization from those on lipolysis in isolated rat adipose cells. *J Biol Chem* 244(13): 3423–3429, 1969.
- Bogdanski P, Suliburska J, Grabanska K, Musialik K, Cieslewicz A, Skoluda A, Jablecka A. Effect of 3-month L-arginine supplementation on insulin resistance and tumor necrosis factor activity in patients with visceral obesity. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16(6): 816–823, 2012.
- Campbell JE & Drucker DJ. Islet α cells and glucagon-critical regulators of energy

- homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 11(6): 329–338, 2015.
- Carmen GY & Victor SM. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* 18(4): 401–408, 2006.
- Church TS, Earnest CP, Skinner JS, Blair SN. Effects of different doses of physical activity on cardiorespiratory fitness among sedentary, overweight or obese postmenopausal women with elevated blood pressure: a randomized controlled trial. *JAMA* 297(19): 2081–2091, 2007.
- Dériaz O, Dumont M, Bergeron N, Després JP, Brochu M, Prud'homme D. Skeletal muscle low attenuation area and maximal fat oxidation rate during submaximal exercise in male obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25(11): 1579–1584, 2001.
- Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(6):1039–1049, 2008.
- Donnelly JE, Blair SN, Jakicic JM, Manore MM, Rankin JW, Smith BK; American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc* 41(2): 459–471, 2009.
- Elam RP. Morphological changes in adult males from resistance exercise and amino acid supplementation. *J Sports Med Phys Fitness* 28(1): 35–39, 1988.
- Fealy CE, Mulya A, Lai N, Kirwan JP. Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 117(3): 239–245, 2014.
- Feng RN, Niu YC, Sun XW, Li Q, Zhao C, Wang C, Guo FC, et al. Histidine supplementation improves insulin resistance through suppressed inflammation in

- obese women with the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Diabetologia* 56(5): 985–994, 2013.
- Fernstrom JD & Fernstrom MH. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr* 137: 1539S–1548S, 2007.
- Fischer JE, Yoshimura N, Aguirre A, James JH, Cummings MG, Abel RM, Deindoefer F. Plasma amino acids in patients with hepatic encephalopathy. Effects of amino acid infusions. *Am J Surg* 127(1): 40–47, 1974.
- Frühbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol* 456: 1–22, 2008.
- Gallagher D, Visser M, Sepúlveda D, Pierson RN, Harris T, Heymsfield SB. How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex, and ethnic groups? *Am J Epidemiol* 143(3): 228–239, 1996.
- Gannon MC & Nuttall FQ. Amino acid ingestion and glucose metabolism—a review. *IUBMB Life* 62(9): 660–668, 2010.
- Gannon MC, Nuttall JA, Damberg G, Gupta V, Nuttall FQ. Effect of protein ingestion on the glucose appearance rate in people with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86(3): 1040–1047, 2001.
- Gijsman HJ, Scarnà A, Harmer CJ, McTavish SB, Odontiadis J, Cowen PJ, Goodwin GM. A dose-finding study on the effects of branch chain amino acids on surrogate markers of brain dopamine function. *Psychopharmacology* 160(2): 192–197, 2002.
- Global BMI Mortality Collaboration, Di Angelantonio E, Bhupathiraju ShN, Wormser D, Gao P, Kaptoge S, Berrington de Gonzalez A, et al. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet* 388(10046): 776–786, 2016.
- Goodpaster BH & Sparks LM. Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metab*

25(5): 1027–1036, 2017.

Gore CJ, Booth ML, Bauman A, Owen N. Utility of pwc75% as an estimate of aerobic power in epidemiological and population-based studies. *Med Sci Sports Exerc* 31(2): 348–351, 1999.

Goulding A, Gold E, Cannan R, Taylor RW, Williams S, Lewis-Barned NJ. DEXA supports the use of BMI as a measure of fatness in young girls. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20(11): 1014–1021, 1996.

Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, et al., Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312(5774): 734–737, 2006.

Hansen D, Meeusen R, Mullens A, Dendale P. Effect of acute endurance and resistance exercise on endocrine hormones directly related to lipolysis and skeletal muscle protein synthesis in adult individuals with obesity. *Sports Med* 42(5): 415–431, 2012.

Hashimoto Y, Fukuda T, Oyabu C, Tanaka M, Asano M, Yamazaki M, Fukui M. Impact of low-carbohydrate diet on body composition: meta-analysis of randomized controlled studies. *Obes Rev* 17(6): 499–509, 2016.

Henagan TM, Lenard NR, Gettys TW, Stewart LK. Dietary quercetin supplementation in mice increases skeletal muscle PGC1 α expression, improves mitochondrial function and attenuates insulin resistance in a time-specific manner. *PLoS One* 9(2): e89365, 2014.

Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1120–1124, 2003.

Holst JJ, Christensen M, Lund A, de Heer J, Svendsen B, Kielgast U, Knop FK. Regulation of glucagon secretion by incretins. *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1:

89–94, 2011.

Jayed A, Rashidy-Pour A, Khorshidi M, Shab-Bidar S. Body mass index, abdominal adiposity, weight gain and risk of developing hypertension: a systematic review and dose-response meta-analysis of more than 2.3 million participants. *Obes Rev* 19(5): 654–667, 2018.

Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, Hu FB, Hubbard VS, et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation* 129(25 Suppl 2): S102–S138, 2014.

Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ, Wu G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem* 17(9): 571–588, 2006.

金光弘幸, 山本哲弥, 中村大地, 花見正幸, 岡憲吾, 高橋昌代, 高井祥子, 三本木千秋 アラニン, フェニルアラニン, アルギニン混合物 A-mix の安全性評価 (5)–ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験– 薬理と治療 45(4): 535–548, 2017a.

金光弘幸, 山本哲弥, 花見正幸, 岡憲吾, 高橋昌代, 高井祥子, 三本木千秋. アラニン, フェニルアラニン, アルギニン混合物 A-mix の安全性評価(4)–ラットを用いた単回経口投与毒性試験–. 薬理と治療 45(4): 531–533, 2017b.

神谷智康, 城戸弥生, 八尋衣里奈, 高野晃, 池口主弥, 高垣欣也, 杉村春日, 近藤和雄. 葛野の花エキス含有粉末茶飲料の腹部脂肪面積低減作用および長期摂取時の安全性に関する検討. *機能性食品と薬理栄養* 7(3): 233–249, 2012.

川上諒子, 村上晴香, 宮武伸行, 澤田亨, 樋口満, 宮地元彦. 健康づくりのため

の身体活動基準 2013 による身体活動評価とメタボリックシンドローム 横
断研究. 日本公衆衛生雑誌 61(12): 64–70, 2014.

Kim H, Kim M, Kojima N, Fujino K, Hosoi E, Kobayashi H, Somekawa S, et al.
Exercise and nutritional supplementation on community-dwelling elderly Japanese
women with sarcopenic obesity: a randomized controlled trial. *J Am Med Dir Assoc*
17(11): 1011–1019, 2016.

Kivimäki M, Kuosma E, Ferrie JE, Luukkonen R, Nyberg ST, Alfredsson L, Batty GD,
et al. Overweight, obesity, and risk of cardiometabolic multimorbidity: pooled
analysis of individual-level data for 120 813 adults from 16 cohort studies from the
USA and Europe. *Lancet Public Health* 2(6): e277–e285, 2017.

Koeslag JH, Levinrad LI, Lochner JD, Sive AA. Post-exercise ketosis in post-prandial
exercise: effect of glucose and alanine ingestion in humans. *J Physiol* 358: 395–403,
1985.

Koh-Banerjee P, Chu NF, Spiegelman D, Rosner B, Colditz G, Willett W, Rimm E.
Prospective study of the association of changes in dietary intake, physical activity,
alcohol consumption, and smoking with 9-y gain in waist circumference among
16587 US men. *Am J Clin Nutr* 78(4): 719–727, 2003.

Koschinsky T & Gris FA. Glycerol kinase and lipolysis in human adipose tissue in
relation to relative body weight. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 352(2): 430–432,
1971.

厚生労働省, 身体活動基準 2013.

<https://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000002xple-att/2r9852000002xpqt.pdf#search=%27%E8%BA%AB%E4%BD%93%E6%B4%BB%E5%8B%95%E5%9F%BA%E6%BA%962013%27>

厚生労働省 平成 28 年 国民健康・栄養調査結果の概要

<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyuu/h28-houkoku.html>

Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30(4): 294–309, 2004.

Laviano A, Molfino A, Lacaria MT, Canelli A, De Leo S, Preziosa I, Rossi Fanelli F. Glutamine supplementation favors weight loss in nondieting obese female patients. A pilot study. *Eur J Clin Nutr* 68(11): 1264–1266, 2014.

Lucotti P, Setola E, Monti LD, Galluccio E, Costa S, Sandoli EP, Fermo I, et al. Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(5): E906–912, 2006.

前川敏宏, 寺本貴則, 中村淳一, 北川義徳, 柴田浩志, 土田隆, 特定保健用食品「黒烏龍茶 O TPP」の継続摂取による体脂肪低減効果の検証とその安全性, *薬理と治療* 39(10): 889–900, 2011.

Mailloux RJ & Harper ME. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* 51(6): 1106–1115, 2011.

Manore MM. Dietary supplements for improving body composition and reducing body weight: where is the evidence? *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 22(2): 139–154, 2012.

Marroquí L, Alonso-Magdalena P, Merino B, Fuentes E, Nadal A, Quesada I. Nutrient regulation of glucagon secretion: involvement in metabolism and diabetes. *Nutr Res Rev* 27(1): 48–62, 2014.

McGarry JD & Foster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 49: 395–420, 1980.

McMurray RG, Forsythe WA, Mar MH, Hardy CJ. Exercise intensity-related responses of beta-endorphin and catecholamines. *Med Sci Sports Exerc* 19(6): 570–574, 1987.

McTavish SF, Cowen PJ, Sharp T. Effect of a tyrosine-free amino acid mixture on regional brain catecholamine synthesis and release. *Psychopharmacology* 141(2): 182–188, 1999a.

McTavish SF, McPherson MH, Sharp T, Cowen PJ. Attenuation of some subjective effects of amphetamine following tyrosine depletion. *J Psychopharmacol* 13(2): 144–147, 1999b.

McTavish SF, McPherson MH, Harmer CJ, Clark L, Sharp T, Goodwin GM, Cowen PJ. Antidopaminergic effects of dietary tyrosine depletion in healthy subjects and patients with manic illness. *Br J Psychiatry* 179: 356–360, 2001.

峯川和之, 藤原奈緒美, 中村香織, 山口典子, 山田マミ, 高橋昌代, 高井祥子, 三本木千秋. アラニン, フェニルアラニン, アルギニン混合物 A-mix の安全性評価(1)–細菌を用いる復帰突然変異試験– *薬理と治療* 45(4): 515–519, 2017.

Mitchell HW, Peter HB, Robert MO and Lawrence EA. American College of Sports Medicine: clinical exercise testing. In *ACSM's guidelines for exercise testing and prescription (7th edition)* (Whaley MH eds.): 93–114, 2006.

Miyachi M, Tripette J, Kawakami R, Murakami H. "+10 min of Physical Activity per Day": Japan is looking for efficient but feasible recommendations for its population. *J Nutr Sci Vitaminol* 61 Suppl:S7–S9, 2015.

Miyatake N, Nishikawa H, Morishita A, Kunitomi M, Wada J, Suzuki H, Takahashi K, et al. Daily walking reduces visceral adipose tissue areas and improves insulin resistance in Japanese obese subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 58(2): 101–107, 2002.

宮崎亮, 高瀬秀人, 原田潮, 石井好二郎. 長期間の歩行運動・高濃度茶カテキン飲料摂取併用中における歩数変化量が、メタボリックシンドロームおよびその予備群の特定健康診査項目等に及ぼす影響. *肥満研究* 16(1): 74–81, 2010.

- Moja EA, Lucini V, Benedetti F, Lucca A. Decrease in plasma phenylalanine and tyrosine after phenylalanine-tyrosine free amino acid solutions in man. *Life Sci* 58(26): 2389–2395, 1996.
- Morimoto-Kobayashi Y, Ohara K, Ashigai H, Kanaya T, Koizumi K, Manabe F, Kaneko Y, et al. Matured hop extract reduces body fat in healthy overweight humans: a randomized, double-blind, placebo-controlled parallel group study. *Nutr J* 15: 25, 2016.
- Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S et al., Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 115(12): 3587–3593, 2005.
- Morino K, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55(Suppl 2): S9–S15, 2006.
- Morton RW, Murphy KT, McKellar SR, Schoenfeld BJ, Henselmans M, Helms E, Aragon AA, et al. A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of protein supplementation on resistance training-induced gains in muscle mass and strength in healthy adults. *Br J Sports Med* 52(6): 376–384, 2018.
- Müller WA, Faloona GR, Aguilar-Parada E, Unger RH. Abnormal alpha-cell function in diabetes. Response to carbohydrate and protein ingestion. *N Engl J Med* 283(3): 109–115, 1970.
- Murakami H, Tripette J, Kawakami R, Miyachi M. "Add 10 min for your health": the new Japanese recommendation for physical activity based on dose-response analysis. *J Am Coll Cardiol* 65(11): 1153-1154, 2015.
- 長尾知紀, 落合龍史, 渡辺卓也, 片岡潔, 小御門雅典, 時光一郎, 土田隆. コーヒ

一飲料の継続摂取による肥満者の内臓脂肪低減効果. 薬理と治療 37(4): 333–344, 2009.

Nagatomo A, Nishida N, Fukuhara I, Noro A, Kozai Y, Sato H, Matsuura Y. Daily intake of rosehip extract decreases abdominal visceral fat in preobese subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Diabetes Metab Syndr Obes* 8: 147–156, 2015.

NCD Risk Factor Collaboration. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet* 387(10026): 1377–1396, 2016.

Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 384(9945): 766–781, 2014.

日本肥満学会, 肥満症診療ガイドライン, 第 2 章 肥満の判定と肥満症の診断基準, 3 肥満・肥満症の評価法, 9–11, ライフサイエンス出版株式会社, 2016.

Noto H, Goto A, Tsujimoto T, Noda M. Low-carbohydrate diets and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *PLoS One* 8(1): e55030, 2013.

Ohkawara K, Tanaka S, Miyachi M, Ishikawa-Takata K, Tabata I. A dose-response relation between aerobic exercise and visceral fat reduction: systematic review of clinical trials. *Int J Obes* 31(2): 1786–1797, 2007.

Ormsbee MJ, Rawal SR, Baur DA, Kinsey AW, Elam ML, Spicer MT, Fischer NT, et al. The effects of a multi-ingredient dietary supplement on body composition, adipokines, blood lipids, and metabolic health in overweight and obese men and women: a randomized controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr* 11: 37, 2014.

- Peronnet F & Massicotte D. Table of nonprotein respiratory quotient: an up date. *Can J Sport Sci* 16(1): 23–29, 1991.
- Pischoen T, Boeing H, Hoffmann K, Bergmann M, Schulze MB, Overvad K, van der Schouw YT, et al. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med* 359(20): 2105–2120, 2008.
- Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutr Biochem* 19(11): 717–726, 2008.
- Ritchie SA & Connell JM. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17(4): 319–326, 2007.
- Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, Wolfe RR. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol Sep* 265(3 Pt 1): E380–E391, 1993.
- Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med* 48(3): e219, 2016.
- Ross R & Janssen I. Physical activity, total and regional obesity: dose-response considerations. *Med Sci Sports Exerc* 33(6 Suppl): S521–S527, 2001.
- Rossignoli CP, Dechandt CRP, Souza AO, Sampaio IH, Vicentini TM, Teodoro BG, Neto MPC et al., Effects of intermittent dietary supplementation with conjugated linoleic acid and fish oil (EPA/DHA) on body metabolism and mitochondrial energetics in mice. *J Nutr Biochem* 60: 16–23, 2018.
- 齋藤佳世、田中高生、小畑秀則、中村淳一、福井宣之、殿塚典彦. 肥満者に対するケルセチン配糖体（酵素処理イソクエルシトリン）配合茶飲料の体脂肪低減作用および安全性の検証. *薬理と治療* 43(2): 181–194, 2015.
- Sasai H, Matsuo T, Fujita M, Saito M, Tanaka K. Effects of regular exercise combined with ingestion of vespa amino acid mixture on aerobic fitness and cardiovascular

- disease risk factors in sedentary older women: a preliminary study. *Geriatr Gerontol Int* 11(1): 24–31, 2011.
- Sasai H, Ueda K, Tsujimoto T, Kobayashi H, Sanbongi C, Ikegami S, Nakata Y. Dose-ranging pilot randomized trial of amino acid mixture combined with physical activity promotion for reducing abdominal fat in overweight adults. *Diabetes Metab Syndr Obes* 10: 297–309, 2017.
- Schwingshackl L & Hoffmann G. Long-term effects of low-fat diets either low or high in protein on cardiovascular and metabolic risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Nutr J* 12: 48, 2013.
- Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF, Herrero L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal* 19(3): 269–284, 2013.
- Shi W, Meininger CJ, Haynes TE, Hatakeyama K, Wu G. Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis and bioavailability in endothelial cells. *Cell Biochem Biophys* 41(3): 415–434, 2004.
- Smith SR & Zachwieja JJ. Visceral adipose tissue: a critical review of intervention strategies. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23(4): 329–335, 1999.
- Stenkula KG, Stenblom EL, Montelius C, Egecioglu E, Erlanson-Albertsson C. Thylakoids reduce body fat and fat cell size by binding to dietary fat making it less available for absorption in high-fat fed mice. *Nutr Metab (Lond)* 14: 4, 2017.
- Stisen AB, Stougaard O, Langfort J, Helge JW, Sahlin K, Madsen K. Maximal fat oxidation rates in endurance trained and untrained women. *Eur J Appl Physiol* 98(5): 497–506, 2006.
- Summermatter S & Handschin C. PGC-1 α and exercise in the control of body weight. *Int J Obes (Lond)* 36(11): 1428–1435, 2012.
- Suminski RR, Robertson RJ, Goss FL, Arslanian S, Kang J, DaSilva S, Utter AC, et al.

- Acute effect of amino acid ingestion and resistance exercise on plasma growth hormone concentration in young men. *Int J Sport Nutr* 7(1): 48–60, 1997.
- 田畑泉, 大野秀樹. I 基礎編, 10 運動とホルモン. 日本体力医学会学術委員会監修, スポーツ医学-基礎と臨床-, 朝倉書店, 74–80, 2003.
- 高野義彦, 小林敏也, 赤井義仁, 生山健, 川崎功博, 土田博. プロバイオティクス *Lactobacillus gasseri* SBT2055 を含有する発酵乳の摂取による肥満者の内臓脂肪低減効果の検証. *薬理と治療* 41(9): 895–903, 2013.
- 立石法史, 江川香, 神崎範之, 北川義徳, 柴田浩志, 木曾良信他, ケルセチン配糖体のマウス食餌性肥満モデルに及ぼす影響: ケルセチンの脂肪分解促進作用. *薬理と治療* 37(2): 123–131, 2009.
- Thomas GA, Kraemer WJ, Comstock BA, Dunn-Lewis C, Maresh CM, Volek JS. Obesity, growth hormone and exercise. *Sports Med* 43(9): 839–849, 2013.
- Tirosh A, Shai I, Afek A, Dubnov-Raz G, Ayalon N, Gordon B, Derazne E, et al. Adolescent BMI trajectory and risk of diabetes versus coronary disease. *N Engl J Med* 364(14): 1315–1325, 2011.
- Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov* 9(6): 465–482, 2010.
- Tsiloulis T & Watt MJ. Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci* 135: 175–201, 2015.
- 土田隆, 板倉弘重, 中村治雄. カテキン類の長期摂取によるヒトの体脂肪低減作用. *Prog Med* 22(9): 2189–2203, 2002.
- 上田啓輔, 高井祥子, 山口真. 運動時の脂肪燃焼効果が高いアミノ酸の探索 ソフト・ドリンク技術資料 2: 183–192, 2015.
- Ueda K, Nakamura Y, Yamaguchi M, Mori T, Uchida M, Fujita S. Amino Acid Mixture

- Enriched With Arginine, Alanine, and Phenylalanine Stimulates Fat Metabolism During Exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 26(1): 46–54, 2016.
- Ueda K, Sanbongi C, Yamaguchi M, Ikegami S, Hamaoka T, Fujita S. The effects of phenylalanine on exercise-induced fat oxidation: a preliminary, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Int Soc Sports Nutr* 14: 34, 2017a.
- Ueda K, Sanbongi C, Takai S, Ikegami S. A combination of exercise and amino acid mixture supplementation comprised of arginine, alanine and phenylalanine reduces diet-induced obesity in mice. *Jpn Pharmacol Ther* 45(8): 1289–1294, 2017b.
- Ueda K, Sanbongi C, Takai S, Ikegami S, Fujita S. Combination of aerobic exercise and an arginine, alanine, and phenylalanine mixture increases fat mobilization and ketone body synthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 81(7): 1417–1424, 2017c.
- Ueda K, Sanbongi C, Ikegami S. An arginine, alanine, and phenylalanine mixture increases synthesis of ketone bodies during low-intensity exercise via stimulating glucagon secretion in men with obesity. *J Phys Fit Sports Med* 6(5): 325–333, 2017d.
- Ueda K, Sasai H, Tsujimoto T, Sanbongi C, Ikegami S, Kobayashi H, Shioya N, et al. Randomized trial of amino acid mixture combined with physical activity promotion for abdominal fat reduction in overweight adults. *Diabetes Metab Syndr Obes* 11: 23–33, 2018.
- Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* 79(2): 208–217, 2008.
- Wahrenberg H, Bolinder J, Arner P. Adrenergic regulation of lipolysis in human fat cells during exercise. *Eur J Clin Invest* 21(5): 534–541, 1991.
- Wang H, Guan Y, Karamercan MA, Ye L, Bhatti T, Becker LB, Baur JA, et al., Resveratrol Rescues Kidney Mitochondrial Function Following Hemorrhagic

- Shock. Shock 44(2): 173–180, 2015.
- Wasserman DH, Spalding JA, Lacy DB, Colburn CA, Goldstein RE, Cherrington AD. Importance of intrahepatic mechanisms to gluconeogenesis from alanine during exercise and recovery. Am J Physiol 254(4 Pt 1): E518–E525, 1988.
- Wirunsawanya K, Upala S, Jaruvongvanich V, Sanguankeo A. Whey Protein Supplementation Improves Body Composition and Cardiovascular Risk Factors in Overweight and Obese Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Am Coll Nutr 37(1): 60–70, 2018.
- Wolfe RR, Nadel ER, Shaw JHF, Stephenson LA, Wolfe MH. Role of changes in insulin and glucagon in glucose homeostasis in exercise. J Clin Invest 77(3): 900–907, 1986.
- Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. Amino Acids 37(1): 1–17, 2009.
- Wu G & Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. Biochem J. 336 (Pt 1): 1–17, 1998.
- 吉池信男, 西信雄, 松島松翠, 伊藤千賀子, 池田義雄, 檜原英俊, 吉永英世, 他. Body Mass Index に基づく肥満の程度と糖尿病, 高血圧, 高脂血症の危険因子との関連—多施設共同研究による疫学的検討. 肥満研究 6(1): 4–17, 2000.
- Yoshizumi T, Nakamura T, Yamane M, Islam AH, Menju M, Yamasaki K, Arai T, et al. Abdominal fat: standardized technique for measurement at CT. Radiology 211(1): 283–286, 1999.
- Zajac A, Poprzecki S, Zebrowska A, Chalimoniuk M, Langfort J. Arginine and ornithine supplementation increases growth hormone and insulin-like growth factor-1 serum levels after heavy-resistance exercise in strength-trained athletes. J Strength Cond Res 24(4): 1082–1090, 2010.

Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R. Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol* 16(3): 333–340, 2005.