

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-73473

(P2020-73473A)

(43) 公開日 令和2年5月14日 (2020.5.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	4 B 0 1 8
A 2 3 L 33/185 (2016.01)	A 2 3 L 33/185	4 C 0 8 4
A 2 3 L 33/175 (2016.01)	A 2 3 L 33/175	4 C 0 8 6
A 2 3 L 33/115 (2016.01)	A 2 3 L 33/115	4 C 2 0 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-179570 (P2019-179570)	(71) 出願人	504043048
(22) 出願日	令和1年9月30日 (2019.9.30)		ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア
(62) 分割の表示	特願2015-557219 (P2015-557219) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア 90015, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリート 1150, スイート 2300
原出願日	平成26年2月12日 (2014.2.12)	(74) 代理人	110001302
(31) 優先権主張番号	61/763,797		特許業務法人北青山インターナショナル
(32) 優先日	平成25年2月12日 (2013.2.12)	(72) 発明者	ロンゴ, ヴァルトル ディー,
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90293, プラヤ デル レイ, ジトラテラス 8240
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 化学毒性および年齢関連性の病気から保護するための方法および食事制限

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 年齢関連性の病気および化学毒性の症状を軽減するための方法の提供。

【解決手段】 対象における化学毒性の症状を軽減するためのキットであって、前記キットが、第1の期間用の低タンパク質食であって、当該低タンパク質食がタンパク質からの10パーセント未満のカロリーを含む低タンパク質食と化学療法剤とを含むことを特徴とするキット。第2～第5日用の1日当たり12～25グラムのグリセロールをさらに含む、前記キット。前記化学療法剤が、ドキソルビシン、シクロホスファミド、シスプラチン、5フルオロウラシル、及びその組み合わせからなる群から選択される、前記キット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象における化学毒性の症状を軽減するためのキットであって、前記キットが：

第 1 の期間用の低タンパク質食であって、当該低タンパク質食がタンパク質からの 10 パーセント未満のカロリーを含む低タンパク質食と；

化学療法剤と；

を含むことを特徴とするキット。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のキットが、第 2 ～第 5 日用の 1 日当たり 12 ～25 グラムのグリセロールをさらに含むことを特徴とするキット。

10

【請求項 3】

請求項 1 に記載のキットにおいて、前記化学療法剤が、ドキソルビシン、シクロホスファミド、シスプラチン、5 フルオロウラシル、およびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とするキット。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のキットにおいて、前記低タンパク質食が、第 1 日用の対象 1 ポンド当たり 4.5 ～7 キロカロリー、および、第 2 ～第 5 日用の 1 日当たり対象 1 ポンド当たり 3 ～5 キロカロリーを提供し、前記低タンパク質食が：

第 1 日用の 30 g 未満の糖と；

第 2 ～第 5 日用の 20 g 未満の糖と；

20

第 1 日用の 28 g 未満のタンパク質（すべて植物ベース）と；

第 2 ～第 5 日用の 18 g 未満のタンパク質（すべて植物ベース）と；

第 1 日用の 20 ～30 グラムの一価不飽和脂肪と；

第 2 ～第 5 日用の 10 ～15 グラムの一価不飽和脂肪と；

第 1 日用の 6 ～10 グラムの多価不飽和脂肪と；

第 2 ～第 5 日用の 3 ～5 グラムの多価不飽和脂肪と；

第 1 日用の 12 g 未満の飽和脂肪と；

第 2 ～第 5 日用の 6 グラム未満の飽和脂肪と；

第 2 ～第 5 日用の 1 日当たり 12 ～25 グラムのグリセロールと；

を含むことを特徴とするキット。

30

【請求項 5】

請求項 1 に記載のキットにおいて、前記低タンパク質食が、非常に低いタンパク質量または無タンパク質食と一緒に、2 週間から 2 か月ごとに、5 ～7 日間の期間、摂取される過剰なレベルの非必須アミノ酸を提供するサプリメントを含むことを特徴とするキット。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のキットにおいて、タンパク質カロリーの 70 % 超が、植物ベースであることを特徴とするキット。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のキットにおいて、前記サプリメントが、窒素の供給源として 1 つ以上の以下のアミノ酸：アラニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、プロリン、セリン、およびチロシンを提供するが、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリン、およびアルギニンが、組み合わせて、対象の食事の全重量の 5 % 未満となる量で存在するように、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリン、およびアルギニンを実質的に除外することを特徴とするキット。

40

【請求項 8】

請求項 7 に記載のキットにおいて、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリン、およびアルギニンが、前記対象の食事の全重量の 3 % 未満である量と一緒に存在することを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年2月12日に提出された米国仮特許出願第61/763,797号明細書の利益を主張し、この開示は、本明細書において参照によってその全体が組み込まれる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、National Institutes of Healthによって与えられる契約番号P01 AG034906-01の下で政府支援によりなされた。政府は、本発明に対して一定の権利を有する。

【0003】

少なくとも1つの態様では、本発明は、年齢関連性の病気および化学毒性の症状を軽減するための方法に関する。

【背景技術】

【0004】

栄養失調を伴わないカロリー制限(CR)は、酵母、線虫、およびマウスを含む多くの動物モデルにおいて寿命を増加させることが一貫して示された。しかしながら、非ヒト霊長動物のライフスパンに対するCRの効果は論争的のままであり、食事内容によって非常に影響を受け得る。モデル生物におけるCRに関連するライフスパン延長は、IGF-1およびインスリンレベルならびにシグナル伝達における続く欠乏に至るGH、GHRに対するその効果を通して働くと考えられる。寿命に対するインスリン/IGF-1経路の効果は、栄養素利用率によって調節されるこの経路における突然変異がライフスパンにおける2倍の増加を引き起こしたことを示すことによって、線虫において発見された。他の研究は、Tor-S6KおよびRas-cAMP-PKAを含む、成長シグナル伝達経路において機能する遺伝子のオルソログにおける突然変異が、複数のモデル生物において加齢を増進し、したがって、成長促進(pro-growth)栄養素シグナル伝達遺伝子による加齢についての、保存された調節の証拠を提供することを明らかにした。

【0005】

最近、血清IGF-1およびインスリンレベルにおいて主な欠損を示す、成長ホルモン受容体欠損(GHRD)を有するヒトが、癌による死も、糖尿病も示さず、肥満症の罹患率がより高いにもかかわらず、このグループにおける心疾患および発作による複合的な死亡が彼らの親類と同様であったことが示された。癌からの同様の保護もまた、230のGHRDを調査した研究において報告された。

【0006】

タンパク質制限またはメチオニンおよびトリプトファンなどのような特定のアミノ酸の制限は、タンパク質制限がIGF-1レベルを低下させ、カロリー摂取量と無関係に哺乳動物における寿命を増加させることができ、かつまた、げっ歯動物モデルにおいて癌発生率を低下させることも示されたので、寿命および疾患の危険性に対するカロリー制限の効果の一部について説明し得る。

【0007】

したがって、彼らの食事制限を長期にわたって変更することを望んでいる対象および定期的な介入のみを検討するが、他の点では、彼らの通常の食事制限を継続するつもりである対象の両方において、年齢関連性の病気の症状を軽減することができる食事療法介入についての必要性がある。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、少なくとも1つの実施形態において、加齢の症状または年齢関連性の症状を軽減するための方法を提供することによって、先行技術の1つ以上の問題を解決する。方法は、対象の平均的な毎日のタンパク質摂取レベルが決定されるステップを含む。一改良

10

20

30

40

50

では、平均的な毎日のタンパク質摂取レベルが、対象が1日当たり平均して摂取するタンパク質からのカロリーパーセントとして表現される。タンパク質摂取に関して、動物および植物の供給源からのタンパク質カロリーの相対量が、決定される。彼らの通常の食事制限と置換される定期的な低タンパク質高栄養物食は、対象の平均的な毎日のタンパク質摂取レベルが所定のカットオフタンパク質摂取レベルよりも大きいと同定される場合および対象が所定の年齢よりも若い場合、対象に提供される。

【0009】

他の態様では、対象におけるグルコースおよび／またはIGF-1レベルを低下させるための方法が、提供される。方法は、植物ベースのタンパク質供給源から約10パーセント未満のカロリーを有する定期的な低カロリーおよび／または低タンパク質食を対象に提供するステップを含む。対象のグルコースおよび／またはIGF-1レベルは、タンパク質摂取量を増加させるべきか、減少させるべきかどうかを決定するためにモニターされる。

10

【0010】

他の態様では、低タンパク質食が、非常に低いタンパク質量または無タンパク質食と一緒に、5～7日間の期間、摂取されることになっている過剰なレベルの非必須アミノ酸を提供するサプリメントを含む。一改良では、低タンパク質食が、通常のタンパク質食と交替される。そのような変形では、低タンパク質で植物ベースの食事制限が、合間の1～7週間の通常の食事制限と共に、2週間～2か月ごとに、7日間、提供される。典型的に、サプリメントは、窒素の供給源として1つ以上の以下のアミノ酸：アラニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、プロリン、セリン、およびチロシンを提供するが、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリン、およびアルギニンが、組み合わせて、対象の食事制限の全重量の5%未満となる量で存在するように、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリン、およびアルギニンを実質的に除外する。さらなる改良では、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリン、およびアルギニンが、組み合わせて、対象の食事制限の全重量の3%未満となる量で存在する。

20

【図面の簡単な説明】

【0011】

30

【図1】図1は、ヒト対象に対して調整した、断食を模倣する食事制限のカロリーの概要を示す表9を示す図である。断食を模倣する食事制限(FMD)、Prolonは、栄養物を最大限にしながら絶食様の応答を誘発する。食事制限の5日間のそれぞれの日についての摂取カロリーならびに体重1ポンドおよび1キログラムあたりに調整したkcalを示す。5日の食事療法レジメンの間に摂取されたカロリーにおける低下(Δ 5日)は、1) 1日当たり2,000カロリーの食事制限に基づいてまたは2) それぞれ ≥ 200 、150～200、および ≤ 150 lbの人の重量について2,800、2,400、および2,000カロリーの食事制限に基づいて示す。

【図2】図2は、180～200 lbヒト対象に対して調整した、それぞれの食事制限日について定められた多量栄養素含有量を示す表10を示す図である。平均180～200 lbの人に基づく5日のFMDレジメンのそれぞれの日についての多量栄養素含有量。食事制限の1日目のカロリー摂取量は、身体が低カロリー摂取に順応するのを可能にするために、以降の日(2～5)と比較して、それほど低下させない。Prolonレジメンのそれぞれの日について脂肪、炭水化物(詳細には糖による)、およびタンパク質が寄与するカロリーの%を示す。

40

【図3】図3は、本発明の変形における180～200 lbヒト対象に対して調整した、それぞれの食事制限日について定められた微量栄養素含有量を示す表11を示す図である。平均180～200 lbの人に基づく5日のFMDレジメンのそれぞれの日についての微量栄養素含有量。一日量のパーセント(% DV)は、2,000カロリーの食事制限に基づいて計算する。* 微量栄養素のうちのいくつかについては、DVは定められない；

50

示す値は、参照一日摂取量 (RDI) に基づく。

【図4】図4は、コックス比例ハザードモデルを使用し、年齢およびタンパク質グループの間の統計的に有意な ($p < .05$) 相互作用が、総死亡率および癌死亡率について見つけられたことを示す図である。これらのモデルに基づいて、予測される残りの期待寿命は、ベースライン時の年齢によってそれぞれのタンパク質グループについて計算した。結果に基づいて、低タンパク質は、66歳前に総死亡率および癌死亡率に対して保護効果を有するよう思われ、この時点でそれは不利益になる。有意な相互作用は、心臓血管系疾患 (CVD) 死亡率にも糖尿病死亡率にも見つけられなかった。

【図5】図5は、低、中程度、または高タンパク質摂取量を報告する、応答者50~65および66+における血清IGF-1レベルを示す図である。応答者50~65におけるIGF-1は、高と比較した場合に、低タンパク質摂取量を有する応答者の間で有意により低い ($P = 0.004$)。66+歳で、高および低摂取量の間の差異は、わずかに有意になる ($P = 0.101$)。IGF-1レベルを計算したコホートは2253人の対象を含む。50~65歳の対象のうち ($n = 1,125$)、89人は、低タンパク質カテゴリーにあり、854人は中程度タンパク質カテゴリーにあり、182人は、高タンパク質カテゴリーにいた。66+歳の対象のうち ($n = 1,128$)、80人は低タンパク質カテゴリーにあり、867人は中程度タンパク質カテゴリーにあり、181人は高タンパク質カテゴリーにいた。* $P < 0.01$ 。

【図6A】図6Aは、20,000個のメラノーマ (B16) 細胞を移植し、高タンパク質 ($n = 10$) または低いタンパク質 ($n = 10$) 食を供給した18週齢雄C57BL/6マウスにおける腫瘍発生率を示す図である。

【図6B】図6Bは、高タンパク質 ($n = 10$) または低タンパク質 ($n = 10$) 食を供給した (18週齢) C57BL/6雄マウスにおけるB16腫瘍体積進行を示す図である。

【図6C】図6Cは、高タンパク質 ($n = 5$) または低タンパク質 ($n = 5$) 食を供給した (18週齢) 雄C57BL/6マウスにおける16日目のIGF-1を示す図である。

【図6D】図6Dは、高タンパク質 ($n = 10$) または低タンパク質 ($n = 10$) 食を供給した雄 (18週齢) C57BL/6マウスにおける16日目のIGFBP-1を示す図である。

【図6E】図6Eは、10月齢雌GHRKOマウス ($n = 5$) 対年齢が一致する同腹仔コントロール (Ctrl; $n = 7$) におけるB16メラノーマ腫瘍進行を示す図である。

【図6F】図6Fは、20,000個の細胞の乳癌 (4T1) を移植し、高タンパク質 ($n = 10$) または低タンパク質 (7%; $n = 10$) 食を供給した12週齢雌BALB/cマウスにおける腫瘍発生率を示す図である。

【図6G】図6Gは、高タンパク質 ($n = 10$) または低タンパク質 ($n = 10$) 食を供給した雌 (12週齢) BALB/cマウスにおける4T1乳癌進行を示す図である。

【図6H】図6Hは、高カゼインタンパク質 ($n = 5$) または低カゼインタンパク質 ($n = 5$) 食を供給した雌 (12週齢) BALB/cマウスにおける16日目のIGF-1を示す図である。

【図6I】図6Iは、高カゼインタンパク質 ($n = 10$) または低カゼインタンパク質 ($n = 10$) 食を供給した雌 (12週齢) BALB/cマウスにおける16日目のIGFBP-1を示す図である。

【図6J】図6Jは、高大豆タンパク質 ($n = 5$) または低大豆タンパク質 ($n = 5$) 食を供給した雌 (12週齢) BALB/cマウスにおける16日目のIGF-1を示す図である。

【図6K】図6Kは、高大豆タンパク質 ($n = 10$) または低大豆タンパク質 ($n = 10$) 食を供給した雌 (12週齢) BALB/cマウスにおける16日目のIGFBP-1を示す図である。

【図6L】図6Lは、0.5×、1×、または2×濃度の標準的なアミノ酸ミックスに曝露された酵母の生存を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 6 M】図 6 M は、その DNA 突然変異頻度を示す図である。

【図 6 N】図 6 N は、すべての AA の存在下において成長させたものと比較した、Trp、Leu、および His のみを含有する培地において成長させた酵母における PDS および STRE 活性を示す図である。

【図 6 O】図 6 O は、Ras2 欠失が、1 mM H_2O_2 に長期にわたって曝露された野生型 (DBY746) および ras2 Δ 突然変異体における DNA 突然変異頻度 (Can^r) として測定された酸化ストレス誘発性ゲノム不安定性から保護することを示す図である。

【図 6 P】図 6 P は、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) における加齢およびゲノム不安定性に対するアミノ酸の効果についてのモデルを示す図である。アミノ酸は、グルコースによっても活性化される Tor-Sch9 および Ras-cAMP-PKA 経路を活性化し、Gis1 および Msn2/4 の活性の低下を部分的に介して年齢および酸化ストレス依存性ゲノムの不安定性を増進することを示す図である。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。

【図 7 A】図 7 A は、若いおよび高齢のマウスにおける体重に対するタンパク質摂取量の効果を示す図である。高 (18%) タンパク質食を供給した若い (18 週齢) ($n = 10$) および高齢 (24 月齢) ($n = 6$) C57BL/6 マウスを示す図である。

【図 7 B】図 7 B は、若いおよび高齢のマウスにおける体重に対するタンパク質摂取量の効果を示す図である。低 (4%) タンパク質食を供給した若い (18 週齢) ($n = 10$) および高齢 (24 月齢) ($n = 6$) C57BL/6 マウスを示す図である。

【図 8】図 8 は、表 12：死亡率およびタンパク質摂取量の間の関連を示す図である。

【図 9 A】図 9 A は、高 (18%) または低 (4%) でタンパク質含有量が異なる等カロリー食を供給した 18 週齢雄 C57BL/6 マウスの 30 日間の体重を示す図である。

【図 9 B】図 9 B は、高 (18%) または低 (4%) でタンパク質含有量が異なる等カロリー食を供給した 18 週齢雄 C57BL/6 マウスの kcal/日での 30 日間の食物摂取量を示す図である。

【図 9 C】図 9 C は、高タンパク質 ($n = 10$) または低タンパク質 ($n = 10$) 食を供給した雄 (18 週齢) C57BL/6 マウスにおける 16 日目の IGFBP-2 を示す図である。

【図 9 D】図 9 D は、高タンパク質 ($n = 10$) または低タンパク質 ($n = 10$) 食を供給した雄 (18 週齢) C57BL/6 マウスにおける 16 日目の IGFBP-3 を示す図である。

【図 9 E】図 9 E は、高 (18%) または低 (7%) でタンパク質含有量が異なる等カロリー食を供給した 12 週齢雌 BALB/c マウスの 30 日間の体重を示す図である。

【図 9 F】図 9 F は、高 (18%) または低 (4%) でタンパク質含有量が異なる等カロリー食を供給した 12 週齢雌 BALB/c マウスの kcal/日での 30 日間の食物摂取量を示す図である。

【図 9 G】図 9 G は、高タンパク質 ($n = 10$) または低タンパク質 ($n = 10$) 食を供給した 12 週齢雌 BALB/c マウスにおける 16 日目の IGFBP-3 を示す図である。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$; ANOVA。

【図 10】図 10 は、10 月齢雌 GHRKO マウス ($n = 5$) 対年齢が一致する野生型コントロール (Wt ; $n = 13$) における B16 メラノーマの腫瘍体積進行を示す図である。* $P < 0.01$ 。

【図 11 A】図 11 A は、酵母の経日的な生存を示す図である。

【図 11 B】図 11 B は、ras2 Δ 突然変異体と比較した野生型 (DBY746) における CAN1 遺伝子における突然変異頻度 (Can^r 突然変異体 / 10^6 細胞として測定) として示される、弱められた年齢依存性のゲノムの不安定性を示す図である。

【図 11 C】図 11 C は、1 mM H_2O_2 により長期にわたって処置した野生型および ras2 Δ 突然変異体の経日的な生存を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 1 1 D】図 1 1 D は、R a s 2 の欠如が、酸化ストレス誘発性のゲノムの不安定性（突然変異頻度 C a n^r）から保護することを示す図である。* P < 0. 0 5、* * P < 0. 0 1、* * * * P < 0. 0 0 0 1。

【図 1 2 a - f】I G F - 1 は、タンパク質摂取および死亡率の間の関連性を調節する。死亡率に対するタンパク質および I G F - 1 の間の相互作用のコックス比例ハザードモデルからの結果に基づいて、予測されるハザード比を、低タンパク質グループに比べた、中程度および高タンパク質グループの両方について I G F - 1 によって計算した。タンパク質および I G F - 1 の間の有意な相互作用は、5 0 ~ 6 5 歳のグループにおいて総死亡率（3 a）についても C V D 死亡率（3 b）についても見出されなかった。しかしながら、I G F - 1 および高対低タンパク質についての相互作用は、5 0 ~ 6 5 歳の対象について癌死亡率（3 c）について有意であった（p = . 0 2 6）。結果は、I G F - 1 の 1 0 n g / m l ごとの増加について、癌の死の危険性が、9 % ずつ、低タンパク質グループに比べて、高タンパク質グループについて増加することを示す（H R_{高タンパク質 × I G F - 1} : 1. 0 9 ; 9 5 % C I : 1. 0 1 ~ 1. 1 7）。タンパク質および I G F - 1 の間の相互作用は、C V D 死亡率についてのみ 6 6 + 歳の応答者について有意であった。I G F - 1 もまた低かった場合、高または中程度タンパク質食の人々は、C V D の危険性が低下した；しかしながら、I G F - 1 が増加すると、有益性はなかった。

【図 1 3】図 1 3 は、表 1 3 : サンプル特徴を示す図である。

【図 1 4】図 1 4 は、表 1 4 : タンパク質摂取量および死亡率の間の関連性（N = 6 , 3 8 1）を示す図である。

【図 1 5】図 1 5 は、表 1 5 : 死亡率およびタンパク質摂取量の間の関連性に対する I G F - I の影響（N = 2 , 2 5 3）を示す図である。

【図 1 6】図 1 6 は、表 1 6 : 死亡率に対するタンパク質および I G F - I の間の相互作用についてのハザード比を示す図である。

【図 1 7】図 1 7 は、表 1 7 : 死亡率およびタンパク質摂取量の間の関連性に対する動物および植物性タンパク質の影響を示す図である。

【図 1 8】図 1 8 は、表 1 8 : 年齢およびタンパク質摂取量による、平均 H b A 1 c、糖尿病罹患率、および平均 B M I の調整を示す図である。

【図 1 9】図 1 9 は、表 1 9 : ベースライン時に糖尿病を有していなかった参加者の間の糖尿病死亡率およびタンパク質摂取量の間の関連性を示す図である。

【図 2 0 A - D】ヒト対象は、低タンパク質低カロリーおよび高栄養物の 5 日間の断食を模倣する食事制限（F M D、緑で示す、テキストを参照されたい）、その後続くおよそ 3 週間の通常の食事制限（茶色で示す）の 3 サイクルに参加した（A）。血液は、5 日間の食事制限の前および終了時に（時点 A および B）ならびにまた、3 回目の 5 日間の F M D の終了の 5 ~ 8 日後に（時点 C）、採血した。5 日間のダイエットは、血中グルコース（B）、I G F - 1（c）、および I G F B P - 1（D）レベルを有意に低下させた。グルコース*、p < 0. 0 5、N = 1 8；I G F - 1、* *、p < 0. 0 1、* p < 0. 0 5、N = 1 6；I G F B P - 1、* *、p < 0. 0 1、N = 1 7；統計的検定はすべて、もとの値に対して対応のある t 検定、両側として実行した。

【図 2 1】図 2 1 は、%での実験食の多量栄養素によって供給されるカロリーを示す図である。A I N 9 3 G 標準固形飼料は、基準食であり、すべてのマウスに供給した。多量栄養素組成（脂肪、タンパク質、および炭水化物）を変更した実験食はすべて、この食に基づくものとした。低炭水化物 L C H P 食は、A I N 9 3 G 配合と比較して 2 0 % に低下させた炭水化物からのカロリーを有した（1 3 % 対 6 3. 9 %）が、より多くのタンパク質（4 5. 2 %）および脂肪（4 1. 8 %）を含有した。食事制限 2 0 % P - 1（脂肪供給源としてダイズ油）および 2 0 % P - 2（脂肪供給源としてヤシ油）は、A I N 9 3 G の配合と比較して、2 0 % に低下させたタンパク質供給源からのカロリーを有した；0 % P 食事制限はタンパク質を含有しなかった；これらの食事制限はすべて、A I N 9 3 G 標準固形飼料と等カロリーであった。ケトン産生高脂肪食 6 0 % H F は、脂肪供給源からの摂取カロリーの 6 0 % を供給するように設計し、タンパク質および炭水化物から生じ

10

20

30

40

50

るカロリーは、比例して低下させた。90%HF食は、90%の脂肪を含有するケトン食療法とし、最低の炭水化物（1%未満）およびタンパク質含有量の半分（9%）しか供給しない。詳細な食事制限組成およびカロリー含有量は、表14に要約する。

【図22A】図22Aは、カロリー制限が、体重、グルコース、およびIGF-1を低下させることを示す図である。12~15週齢雌CD-1マウスに、マウスが初期体重の20%を失うまで（点線）、AIN93Gげっ歯動物標準固形飼料を適宜供給した（灰色の正方形）、40%、60%、80%、および90%カロリー制限AIN93G食（三角形）に曝露した、または絶食させた（STS、緑色の長方形）ことを示す図である。実験グループ当たりN=5。すべてのデータは平均±SEMとして示す。

【図22B】図22Bは、カロリー制限が、体重、グルコース、およびIGF-1を低下させることを示す図である。80%の体重に到達するまでの、CRレジメンの厳しさ対期間（日）についての直線フィットを示す図である。

【図22C】図22Cは、カロリー制限が、体重、グルコース、およびIGF-1を低下させることを示す図である。一旦80%の体重に到達した、マウスについての血中グルコースレベルを示す図である。赤色の線は、平均に相当する；* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、ANOVA、Tukeyの多重比較。

【図22D】図22Dは、カロリー制限が、体重、グルコース、およびIGF-1を低下させることを示す図である。一旦80%の体重に到達した、マウスについての血清IGF-1レベルを示す図である。赤色の線は、平均に相当する；*** $p < 0.001$ 、ANOVA、Tukeyの多重比較。

【図23】図23は、体重、食物摂取量、グルコース、および血清IGF-1に対する多量栄養素を定めた食事制限の効果を示す図である。12~15週齢の5匹の雌CD-1マウスは、AIN93Gげっ歯動物標準固形飼料（黒色の丸）またはA）2つの異なる低タンパク質食（20%P-1および20%P-2）、炭水化物は低い、タンパク質は高い食事制限（LCHP）、タンパク質欠乏食（0%P）、もしくはB）高脂肪食（60%HF）ケトン食療法（90%HF）を適宜供給した。多量栄養素に関する詳細な全体図を表1に示す。C）食事制限AIN93G、20%P-1、20%P-2、LCHP、および0%Pに対する毎日の任意のカロリー摂取量。D）食事制限60%HFおよび90%HFに対する毎日の任意のカロリー摂取量；AIN93Gは基準として示す。すべてのデータは平均±SEMとして示す。E）9日間適宜供給した後の血清IGF-1レベル。線は平均に相当する；* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、ANOVA、AIN93Gコントロールと比較したTukeyの多重比較。

【図24A】図24Aは、カロリー制限した多量栄養素を定めた食事制限についてのストレス抵抗性試験を示す図である。マウスは、ドキシソルビシン（24mg/kg、赤色の点線）の静脈内注射の前に、3日間（緑色のボックス）、適宜（AIN93G）食物を供給した、60時間（STS）絶食させた、または多量栄養素組成を定めた50%カロリー制限食（AIN93G、LCHP、0%P、60%HF、90%HF）を供給した。生存は、注射後25日間続き、その後、残っている動物は、生存者と見なした。

【図24B】図24Bは、3日間の適宜の供給およびCR食後ならびに60時間STS後の血中グルコースレベル示す図である。線は平均に相当する。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、ANOVA、Tukeyの多重比較。統計ソフトウェアPrism（GraphPad Software）によるペアマッチ（pair-matched）プール実験からプロットした生存データ。

【図25A】図25Aは、インビボにおけるGL26神経腫瘍および4T1乳癌の腫瘍進行を示す図である。マウスGL26神経腫瘍の皮下腫瘍進行をmm³で総腫瘍体積によって示す図である。一旦腫瘍が10日目に皮膚下で触診可能になったら、腫瘍測定を始めた。動物は、コントロールとしてのAIN93G（N=5）または低タンパク質食20%P-1（N=6）を適宜供給した。すべてのデータは平均±SEMとして示す。

【図25B】図25Bは、インビボにおけるGL26神経腫瘍および4T1乳癌の腫瘍進行を示す図である。マウス4T1乳癌の皮下腫瘍進行をmm³で総腫瘍体積によって示す

10

20

30

40

50

図である。一旦腫瘍が12日目に皮膚下で触診可能になったら、腫瘍測定を始めた。コントロール動物(N=10)は処置を受けなかった、また、腫瘍は急速に進行し、腫瘍移植の54日後までに2000mm³のエンドポイント体積に到達した。シスプラチン(CDDP)を動物(N=9)に15、33、および44日目に注射した。第1のCDDP用量は、静脈内注射によって12mg/kgで送達し、2回の続く注射は、化学毒性を回避するために8mg/kgで送達した。50%ICR+CDDPグループ(N=9)におけるマウスは、シスプラチン注射の前に、3日間(ICR(緑色のボックス))、コントロールグループの毎日のカロリー摂取量の50%まで低下させたAIN93G食事制限を断続的なレジメンで供給した。注射スケジュールはCDDPグループと同一。すべてのデータは平均±SEMとして示す。***p<0.001、ANOVA、Tukeyの多重比較、コントロールと比較。

【図26A】図26Aは、マウスが初期体重の20%を失うまで、AIN93Gげっ歯動物標準固形飼料を適宜供給した(灰色の正方形)、40%、60%、80%、および90%カロリー制限AIN93G食(三角形)を供給した、または絶食させた(STS、緑色の長方形)動物についてのkcal/日での食物摂取量を示す図である。

【図26B】図26Bは、すべての実験食に対する48時間の曝露の後のマウスについての血中グルコースレベルを示す図である。線は、平均に相当する；**p<0.01、***p<0.001、ANOVA、Tukeyの多重比較。

【図27】図27は、示す実験食を9日間適宜供給した後の血中グルコースレベルを示す図である。線は平均に相当する。

【図28A】図28Aは、ドキシソルビシン(24mg/kg、赤色の点線)の静脈内注射の前に3日間(緑色のボックス)、適宜(AIN93G)食物を供給したまたは多量栄養素組成を定めた(60%HF、LCHP、0%P)50%カロリー制限食を供給したマウスについての体重プロファイルを示す図である。

【図28B】図28Bは、ドキシソルビシン(24mg/kg、赤色の点線)の静脈内注射の前に、適宜(AIN93G)供給した、3日間、多量栄養素組成を定めた(AIN93G、90%HF)50%カロリー制限食を供給した、または60時間絶食させた(緑色のボックス)マウスについての体重プロファイルを示す図である。

【図29】図29は、%での古典的ケトン食療法および変更したアトキンスダイエットの多量栄養素によって供給されるカロリーを示す図である。

【図30】図30は、表20. 実験食に含有される多量栄養素およびカロリーに関する全体図を示す図である。

【図31】図31は、表21. 多量栄養素を定めた食事制限についての詳細な組成を示す図である。

【図32】図32は、表22. 多量栄養素を定めた食事制限についての調節スケジュールを示す図である。

【図33】図33は、表23. カロリー制限食の組成を示す図である。

【図34】図34は、表24. カロリー制限した多量栄養素を定めた食事制限の組成を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の目下好ましい組成物、実施形態、および方法についてここで詳細に言及する。図は必ずしも一定の縮尺ではない。開示される実施形態は、様々なおよび代替の形態で例示されてもよい本発明の単なる例証である。そのため、本明細書において開示される詳細については、限定として解釈されないものとするが、単に、本発明の任意の態様の代表的な基礎としておよび／または本発明を様々なに用いるために当業者に教示するための代表的な基礎として解釈されるものとする。

【0013】

実施例以外または別段の指示がある場合以外、反応および／または使用の材料の量または条件を示す、この説明におけるすべての数量は、本発明の最も広範な範囲を説明するの

に、語「約」によって修飾されるものとして理解されるものとする。述べられる数の範囲内での実施が一般に好ましい。また、別段の指示がない限り、パーセント、「の一部」、および比の値は重量によるものであり、本発明に関する所定の目的に適しているまたは好ましい材料のグループまたはクラスについての説明は、グループまたはクラスの任意の2つ以上のメンバーの混合物が等しく適しているまたは好ましいことを暗示し、化学用語での構成要素の説明は、説明において指定される任意の組み合わせへの追加の時の構成要素を指し、一度混合されたら、混合物の構成要素の間の化学的相互作用を必ずしも起こらないようにするわけではなく、頭文字または他の略語の最初の定義は、同じ略語の本明細書におけるすべての続く使用に適用され、最初に定義された略語の通常の変形に変更にすべき点を変更して適用され、別段の指示がない限り、特性の測定値は、同じ特性についてあらかじめまたは後で参照されるものと同じ技術によって決定される。

10

【0014】

本発明は、特定の構成成分および／または条件がもちろん変わってもよいように、下記に説明される特定の実施形態および方法に限定されない。さらに、本明細書において使用される術語は、本発明の特定の実施形態を説明する目的のみのために使用され、決して限定するようには意図されない。

【0015】

本明細書および添付の請求項において使用されるように、文脈が明らかに示さない限り、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、複数形の指示物を含む。たとえば、単数の構成成分への言及は、複数の構成成分を含むことが意図される。

20

【0016】

用語「必須アミノ酸」は、生物によって合成することができないアミノ酸を指す。ヒトでは、必須アミノ酸は、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリンを含む。そのうえ、下記のアミノ酸もまた、ある条件でヒトにおいて必須であるーヒスチジン、チロシン、およびセレノシステイン。

【0017】

用語「キロカロリー」(kcal)および「カロリー」は、食物カロリーを指す。用語「カロリー」は、いわゆる小カロリーを指す。

【0018】

用語「対象」は、ヒトまたは霊長動物（特に高等霊長動物）、ヒツジ、イヌ、げっ歯動物（たとえばマウスもしくはラット）、モルモット、ヤギ、ブタ、ネコ、ウサギ、および雌ウシなどのようなすべての哺乳動物を含む動物を指す。

30

【0019】

本発明の実施形態では、加齢の症状または年齢関連性の症状を軽減するための方法が、提供される。たとえば、本発明の実施形態の方法は、糖尿病または癌を予防してもよくまたは処置してもよく、年齢関連性の死および他の年齢関連性の疾患を遅延させる。他の変形では、方法が、対象におけるグルコースおよび／またはIGF-1レベルを低下させるのに有用である。さらに他の変形では、方法が、対象における化学毒性を処置する（たとえば、その症状を軽減する）のに有用である。典型的に、方法は、これらの状態の1つ以上の症状を軽減する。特に、対象における寿命を増加させるための方法が、提供される。本発明の状況では、寿命を増加させることは、対象がより長く生きる見込みを改善することを意味する。たとえば、対象と同じプロファイル（体重、年齢、グルコースレベル、インスリンレベルなど、下記を参照されたい）を有する多くの対象が、本発明の方法にかけられる場合、平均的な生存期間は増加する。方法は、対象の平均的な毎日のタンパク質摂取レベルが決定されるステップを含む。一改良では、平均的な毎日のタンパク質摂取レベルが、対象が1日当たり平均して摂取するタンパク質からのカロリーパーセントとして表現される。対象のタンパク質摂取量は、対象が、対象の毎日のまたは毎週のタンパク質、脂肪、および炭水化物摂取に関して、質問に回答するまたは書面の調査に記入することによって評価されてもよい。タンパク質摂取に関して、動物および植物の供給源からのタン

40

50

パク質カロリーの相対量が、決定される。

【0020】

低タンパク質食は、対象の平均的な毎日のタンパク質摂取レベルが所定のカットオフタンパク質摂取レベルよりも大きいと同定される場合および対象が所定の年齢よりも若い場合、対象に提供される。典型的に、所定の年齢は、60～70歳である。所定の年齢は、好ましいものから順に、60歳、61歳、62歳、63歳、64歳、66歳、67歳、68歳、69歳、70歳、65歳、およびそれ以下である。特徴として、低タンパク質食は、所定のカットオフタンパク質摂取レベル未満であるタンパク質からのカロリーパーセントを提供する。典型的に、所定のカットオフタンパク質摂取レベルは、対象によって1日当たり平均して摂取される総カロリーのうち、タンパク質からの20%カロリーである。一改良では、典型的に、所定のカットオフタンパク質摂取レベルが、対象によって1日当たり平均して摂取される総カロリーのうち、タンパク質からの15%カロリーである。一改良では、所定のカットオフタンパク質摂取レベルが、対象によって1日当たり平均して摂取される総カロリーのうち、タンパク質からの10%カロリーである。他の改良では、典型的に、所定のカットオフタンパク質摂取レベルが、対象によって1日当たり平均して摂取される総カロリーのうち、タンパク質からの5%カロリーである。いくつかの改良では、低タンパク質食が、ダイズなどのような植物供給源であるタンパク質から好ましいものから順に、40%、50%、60%、70%、80%、および90%以上のカロリーを提供する。好都合には、低タンパク質食は、植物供給源からタンパク質の約100%のカロリーを提供する。

10

20

【0021】

対象のIGF-1および／またはIGFBP1レベルは、対象が受けるべき食事制限の頻度およびタイプ（たとえば下記のタンパク質量を参照されたい）ならびに特に、タンパク質摂取量を増加させるべきか減少させるべきかどうかを決定するためにモニターされる（すなわち、典型的に、対象が1つ以上のサイクルの低タンパク質食を提供された後、IGF-Iのレベルは減少し、IGFBP1のレベルは増加する。特に、低タンパク質食は、少なくとも10パーセント、IGF-Iを低下させるおよび／または少なくとも50パーセント、IGFBP1レベルを高める。他の改良では、低タンパク質食が、少なくとも20パーセント、IGF-Iを低下させるおよび／または少なくとも75%、IGFBP1レベルを高める。他の改良では、低タンパク質食が、少なくとも50パーセント、IGF-Iを低下させるおよび／または少なくとも2倍、IGFBP1レベルを高める。IGF-I減少および／またはIGFBP1増加が不十分であると決定される場合、低タンパク質食は、タンパク質供給源からのいっそう低い量のカロリーを提供するように調節することができる。

30

【0022】

本発明の実施形態の変形では、高タンパク質食が、対象の年齢が所定の年齢よりも高い場合、対象に提供され、所定のカットオフタンパク質摂取レベルよりも大きいタンパク質カロリーパーセンテージを有する高タンパク質食を対象に提供する。

【0023】

他の変形では、低タンパク質食が、所定の日数、対象に提供される。たとえば、低タンパク質食は、2～10日間、対象に提供される。他の改良では、低タンパク質食が、3～7日間、対象に提供される。多くの状況において、低いタンパク質は、対象に定期的に提供される。低タンパク質食が対象に提供される頻度は、インスリン抵抗性、空腹時血糖レベル、IGF-I、IGFBP1、肥満症、ボディマス指数、前の10年間の体重減少、癌の家族歴、糖尿病の家族歴、早死にの家族歴についての対象のレベルによって決定される。頻度は、高いIGF-Iレベル（たとえば200ナノグラム／ml以上）、低レベルのIGFBP1、および／またはインスリン抵抗性を有する対象について毎月～120～200ng/mlのIGF-Iを有し、かつインスリン抵抗性を有していない対象について3か月ごとに一度とすることができる。

40

【0024】

50

一改良では、低タンパク質食が、タンパク質から10%未満のカロリーを提供するおよび／または国際公開第PCT/US13/66236号パンフレットにおいて示されるようにすべてのタンパク質が植物ベースである、断食を模倣する食事制限であり、この特許出願の全開示は、参照によってこれによって組み込まれる。特に、低タンパク質食は、対象に第1の期間に施される。本明細書において使用されるように、時に、この実施形態の低タンパク質食)。一改良では、低タンパク質食が、第1日(1日目)に対象1ポンド当たり4.5~7キロカロリーおよび次いで、低タンパク質食の第2~第5日(2~5日目)に1日当たり対象1ポンド当たり3~5キロカロリーを提供する。第2の食事制限は、第2の期間に対象に施される。一改良では、第2の食事制限が、低タンパク質食後(たとえば直後)の25~26日間、対象の通常のカロリー消費量の20パーセント以内にある総カロリー消費量を提供する。特徴として、IGF-Iのレベルが減少し、IGFBP1のレベルが増加することが観察される。一改良では、この実施形態の方法が、1~5回、繰り返される。他の改良では、この実施形態の方法が、2~3回、繰り返される。さらに他の改良では、この実施形態の方法が、対象のIGF-IおよびIGFBP1レベルならびにタンパク質摂取量に依存して1~3か月ごとの頻度で、数年の期間または対象の一生を通じて繰り返される。頻度は、高タンパク質摂取量(タンパク質から15%以上のカロリー)ならびに／または高いIGF-Iレベル(たとえば200ナノグラム/ml以上)および低レベルのIGFBP1ならびに／またはインスリン抵抗性を有する対象について毎月~10~15%のカロリーに相当するタンパク質摂取量、120~200ng/mlのIGF-Iレベルを有し、かつインスリン抵抗性を有していない対象について3か月ごとに一度とすることができる。

10

20

【0025】

他の改良では、低タンパク質食ならびに第2の食事制限(たとえば対象の通常食事制限およびカロリー摂取量)の組み合わせが、対象の通常のカロリー摂取量の10パーセント以内のカロリーの総数を対象に提供する。他の改良では、低タンパク質食および第2の食事制限の組み合わせが、対象の通常のカロリー摂取量の5パーセント以内のカロリーの総数を対象に提供する。他の改良では、低タンパク質食および第2の食事制限の組み合わせが、対象の通常のカロリー摂取量の1パーセント以内のカロリーの総数を対象に提供する。

【0026】

一改良では、断食を模倣する食事制限(FMD)が、5日間、対象の食事制限と完全に置換されることを含む。この5日間の期間の間に、対象は、多くの水を摂取する。標準体重(18.5~25の間のボディマス指数またはBMI)の健康な対象については、食事制限は、最初の3か月間、月に一度(5日間、食事制限および25~26日間、彼らの通常食事制限)およびその後3か月ごとに(3か月ごとに5日間)摂取される。対象の体重が測定され、対象は、次のサイクルが始められる前に、食事制限の間の失われた体重の少なくとも95%を取り戻さなければならない。18.5未満のBMIを有する対象は、医師によって推奨されないおよび監督されない限り、FMDを行うべきでない。同じレジメン(3か月間、毎月一度、その後3か月ごとに一度)は、特許出願において示される状態のすべての処置のためにまたは処置のサポートに採用することができる。

30

40

【0027】

FMDのための摂取ガイドラインは、カロリー、多量栄養素、および微量栄養素に関する栄養成分表(Nutrition Facts)を含む。カロリーは、利用者の体重に従って摂取される。全カロリー消費量は、1日目、1ポンド当たり4.5~7カロリー(または1キログラム当たり10~16カロリー)および2~5日目、1ポンド当たり3~5カロリー(または1キログラム当たり7~11カロリー)である。図1~3は、1日目~5日目の栄養素の表を提供する。多量栄養素に加えて、食事制限は、1日目に30g未満の糖および2~5日目に20g未満の糖を含有するべきである。食事制限は、1日目に28g未満のタンパク質および2~5日目に18g未満のタンパク質を、主としてまたは完全に植物ベースの供給源から含有するべきである。食事制限は、1日目に20~30g

50

ラムの一価不飽和脂肪および2～5日目に10～15グラムの一価不飽和脂肪を含有するべきである。食事制限は、1日目に6～10グラムの多価不飽和脂肪および2～5日目に3～5グラムの多価不飽和脂肪を含有するべきである。食事制限は、1日目に12g未満の飽和脂肪および2～5日目に6グラム未満の飽和脂肪を含有するべきである。典型的に、終日の脂肪は、以下のものの組み合わせに由来する：アーモンド、マカダミアナッツ、ペカン、ココナッツ、ヤシ油、オリーブ油、および亜麻仁。一改良では、FMD食事制限が、終日の食物繊維の推奨一日量の50%以上を含む。さらなる改良では、食物繊維の量が、5日間ずっと、1日当たり15グラム以上である。食事制限は、2～5日目に、1日当たり12～25グラムのグリセロールを含有するべきである。一改良では、グリセロールが、体重1ポンド当たり0.1グラム/日で提供される。

10

【0028】

一変形では、FMDが、下記の微量栄養素を含む（少なくとも95%非動物ベース）：1日当たり5,000IU以上のビタミンA（1～5日目）；1日当たり60～240mgのビタミンC（1～5日目）；1日当たり400～800mgのカルシウム（1～5日目）；1日当たり7.2～14.4mgの鉄（1～5日目）；1日当たり200～400mgのマグネシウム（1～5日目）；1日当たり1～2mgの銅（1～5日目）；1日当たり1～2mgのマンガン（1～5日目）；1日当たり3.5～7megのセレン（1～5日目）；1日当たり2～4mgのビタミンB1（1～5日目）；1日当たり2～4mgのビタミンB2（1～5日目）；1日当たり20～30mgのビタミンB3（1～5日目）；1日当たり1～1.5mgのビタミンB5（1～5日目）；1日当たり2～4mgの
 ビタミンB6（1～5日目）；1日当たり240～480megのビタミンB9（1～5日目）；1日当たり600～1000IUのビタミンD（1～5日目）；1日当たり14～30mgのビタミンE（1～5日目）；1日当たり80meg以上のビタミンK（1～5日目）；16～25megのビタミンB12が、全5日間の期間の間に提供される；600mgのドコサヘキサエン酸（DHA、藻類由来）が、全5日間の期間の間に提供される。FMD食事制限は、ケール、カシュー、黄ピーマン、タマネギ、レモン汁、酵母、ウコン、マッシュルーム、ニンジン、オリーブ油、ビート汁、ホウレンソウ、トマト、コラード、イラクサ、タイム、塩、胡椒、ビタミンB12（シアノコバラミン）、ビート、バターナットカボチャ、コラード、トマト、オレガノ、トマト汁、オレンジ汁、セロリ、ロメインレタス、ホウレンソウ、クミン、オレンジの皮、クエン酸、ナツメグ、クローブ、
 およびその組み合わせを含む、ほとんど（つまり重量で50パーセント以上）が自然の供給源由来の高微量栄養素内容物を提供する。表1は、FMD食事制限において提供することができる、さらなる微量栄養素補給の例を提供する。

20

30

【表 1】

表1.微量栄養素補給

	サプリメント	式	量	量の範囲	単位
Vit A			1250 IU	900~1600	IU
Vit C	アスコルビン酸	C ₆ H ₈ O ₆	15.0000	10~20	mg
Ca	炭酸カルシウム	CaCO ₃	80.0000	60~100	mg
Fe	フマル酸第一鉄	C ₄ H ₂ FeO ₄	4.5000	3~6	mg
Vit D3	コレカルシフェロール	C ₂₇ H ₄₄ O	0.0025	0.001~0.005	mg
Vit E	dl-アルファトコフェ ロールアセタート	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	5.0000	3~7	mg
Vit K	フィトナジオン		0.0200	0.1~0.04	mg
Vit B1	チアミンモノニトレート	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₄ S	0.3750	0.15~0.5	mg
Vit B2	リボフラビンE101	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	0.4250	0.2~0.6	mg
Vit B3	ナイアシンアミド	C ₆ H ₆ N ₂ O	5.0000	3~7	mg
Vit B5	パントテン酸 カルシウム	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	2.5000	1.5~4.0	mg
Vit B6	塩酸ピリドキシン	C ₈ H ₁₁ NO ₃ · HCl	0.5000	0.3~0.7	mg
Vit B7	ビオチン	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0.0150	0.01~0.02	mg
Vit B9	葉酸	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	0.1000	0.07~0.14	mg
Vit B12	シアノコバラミン	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	0.0015	0.001~0.002	mg
Cr	ピコリン酸クロム	Cr(C ₆ H ₄ NO ₂) ₃	0.0174	0.014~0.022	mg
Cu	硫酸第二銅	CuSO ₄	0.2500	0.18~0.32	mg
I	ヨウ化カリウム	KI	0.0375	0.03~0.045	mg
Mg	酸化マグネシウム	MgO	26.0000	20~32	mg
Mn	硫酸マンガン	MnSO ₄	0.5000	0.3~0.7	mg
Mo	モリブデン酸 ナトリウム	Na ₂ MoO ₄	0.0188	0.014~0.023	mg
Se	セレン酸ナトリウム	Na ₂ O ₄ Se	0.0175	0.014~0.023	mg
Zn	酸化亜鉛	ZnO	3.7500	3~5	mg

【0029】

他の実施形態では、上記に示される食事制限プロトコールの実施のための食事制限パッケージが、提供される。食事制限パッケージは、対象に第1の期間に施されることになっている低タンパク質食のための食料の第1のセットを含み、低タンパク質食が、第1日に対象1ポンド当たり4.5~7キロカロリーおよび低タンパク質食の第2~第5日に1日当たり対象1ポンド当たり3~5キロカロリーを提供する。食事制限パッケージは、第1日に30g未満の糖；第2~第5日に20g未満の糖、第1日に28g未満のタンパク質、第2~第5日に18g未満のタンパク質、第1日に20~30グラムの一価不飽和脂肪、第2~第5日に10~15グラムの一価不飽和脂肪、第1日に6~10グラムの多価不飽和脂肪、第2~第5日に3~5グラムの多価不飽和脂肪、第1日に12g未満の飽和脂肪、第2~第5日に6g未満の飽和脂肪；および第2~第5日に1日当たり12~2

5 グラムのグリセロールを提供する食料を含む。一改良では、食事制限パッケージが、上記に示される微量栄養素を提供するのに十分な食料をさらに含む。さらなる改良では、食事制限パッケージが、上記に示される方法の詳細を提供する説明書を提供する。

【0030】

上記に示される実施形態の改良では、食事制限の5日間の供給が、スープ／ブロス、ソフトドリンク、ナッツバー、およびサプリメントを含む。食事制限は、以下のように施される：1) 第1の日に、高微量栄養物を有する1000～1200 kcal 食事制限が提供される；2) 次の4日間、650～800 kcal の毎日の食事制限プラス60～120 kcal を提供するグルコース置換炭素供給源（グリセロールまたは等価物）を含有する飲料が提供される。置換炭素供給源は、幹細胞活性化に対する絶食の効果に干渉しない。

10

【0031】

上記に示される実施形態の他の改良では、6日間の低タンパク質食事制限プロトコールが、スープ／ブロス、ソフトドリンク、ナッツバー、およびサプリメントを含む。食事制限は、以下のように施される：1) 第1の日に、高微量栄養物を有する1000～1200 kcal 食事制限が提供される；2) 次の3日間、200 kcal 未満の毎日の食事制限プラス60～120 kcal を提供するグルコース置換炭素供給源を含有する飲料。グリセロールを含むこの置換炭素供給源は、幹細胞活性化に対する絶食の効果に干渉しない；3) 5日目に、対象は通常の食事制限を摂取する；ならびに4) 6日目に、300 kcal の高脂肪供給源および微量栄養物ミックスからなるさらなる補充食物、6日目に、300 kcal の高脂肪供給源および微量栄養物ミックスからなる補充食物が、通常の食事制限に加えて提供される。

20

【0032】

さらに他の改良では、食事制限プロトコールが、スープ／ブロス、ソフトドリンク、ナッツバー、およびサプリメントを含む低タンパク質食事制限の6日間の供給を含む。1) 第1の日に、高微量栄養物を有する1000～1200 kcal 食事制限が提供される；2) 次の3日間、10グラム未満のタンパク質および糖由来の200 kcal 未満を含有する600～800 kcal の毎日の食事制限；3) 5日目に、対象は通常の食事制限を受ける；ならびに4) 6日目に、300 kcal の高脂肪供給源および微量栄養物ミックスからなるさらなる補充食物、6日目に、300 kcal の高脂肪供給源および微量栄養物ミックスからなる補充食物が、通常の食事制限に加えて提供される。

30

【0033】

特に有用な食事制限プロトコールおよび食事療法パッケージは、国際公開第2011/050302号パンフレットおよび本明細書における食事療法プロトコールによって提供される。国際公開第2011/050302号パンフレットは、参照によってこれによってその全体が組み込まれる。特に、対象は、第1の期間に低タンパク質食、第2の期間に第2の食事制限、および第3の期間に任意選択の第3の食事制限が提供される。低タンパク質食は、対象の通常のカロリー摂取量のせいぜい50%を対象に提供し、少なくとも50%のキロカロリーが脂肪、好ましくは一価不飽和脂肪に由来する。対象の通常のカロリー摂取量は、彼または彼女の重量を維持するために対象が摂取するkcalの数値である。対象の通常のカロリー摂取量は、対象にインタビューすることによってまたは対象の重量を考慮して推定されてもよい。おおよその目安として、対象の通常のカロリー摂取量は、平均して男性については2600 kcal / 日および女性については1850 kcal / 日である。ある事例では、低タンパク質食は、700～1200 kcal / 日を対象に提供する。特に有用な改良では、低タンパク質食が、約1100 kcal / 日を平均重量の男性の対象および900 kcal / 日を平均重量の女性の対象に提供する。典型的に、第1の所定の期間は、約1～5日である。ある事例では、第1の所定の期間は、1日である。低タンパク質食における脂肪のレベルを客観的に把握するために、U. S. Food and Drug Administrationは、典型的な2000キロカロリーの1日の食事制限について以下の栄養の内訳を推奨している：65グラムの脂肪（約58

40

50

5 キロカロリー)、50 グラムのタンパク質(約200 キロカロリー)、300 グラムの全炭水化物(約1200 キロカロリー)。そのため、低タンパク質食のあるバージョンにおいて、炭水化物およびタンパク質由来の大部分のカロリーが省かれる。

【0034】

低タンパク質食は、脂肪の事実上任意の供給源を包含するが、一価不飽和脂肪供給源および多価不飽和脂肪供給源を含む不飽和脂肪が高い供給源は特に有用である(たとえばオメガ-3/6 必須脂肪酸)。一価不飽和食物供給源の適した例は、ピーナッツバター、オリーブ、ナッツ(たとえばアーモンド、ペカン、ピスタチオ、カシュー)、アボカド、種子(たとえばゴマ)、油(たとえばオリーブ、ゴマ、ピーナッツ、キャノーラ)などを含むが、これらに限定されない。多価不飽和食物供給源の適した例は、クルミ、種子(たとえばパンプキン、ヒマワリ)、アマニ、魚(たとえばサケ、マグロ、サバ)、油(たとえばベニバナ、ダイズ、トウモロコシ)を含むが、これらに限定されない。低タンパク質食はまた、野菜抽出物、ミネラル、オメガ-3/6 必須脂肪酸、およびその組み合わせからなる群から選択される構成成分をも含む。一改良では、そのような野菜抽出物は、推奨される毎日の1 回分の野菜の5 回分の相当物を提供する。野菜抽出物に適した供給源は、パクチョイ、ケール、レタス、アスパラガス、ニンジン、バターナットカボチャ、アルファルファ、グリーンピース、トマト、キャベツ、カリフラワー、ビートを含むが、これらに限定されない。オメガ-3/6 必須脂肪酸に適した供給源は、サケ、マグロ、サバ、青魚、メカジキ、およびその他同種のものなどのような魚を含む。さらなる改良では、低タンパク質食が、脂肪からの少なくとも25 パーセントのカロリーが、2~7 個の炭素原子を有する短鎖脂肪酸および/または8~12 個の炭素原子を有する中鎖飽和脂肪酸からのものとなるように、脂肪供給源を含む。脂肪酸の特定の例は、ラウリン酸および/またはミリスチン酸を含み、脂肪供給源は、オリーブ油、核油、および/またはヤシ油を含む。他の改良では、低タンパク質食が、食事制限中に含有される総カロリーの約0~22 パーセントの量で脂肪からのカロリーを含む。

【0035】

一改良では、対象が、次いで、第2の期間に第2の食事制限が提供される。第2の食事制限は、せいぜい900 kcal/日を対象に提供する。ある事例では、第2の食事制限は、せいぜい200 kcal/日を対象に提供する。典型的に、第2の所定の期間は、約2~7 日である。ある特定の事例では、第2の所定の期間は、3 日である。さらに他の改良では、第2の食事制限が、野菜抽出物、ミネラル、オメガ-3/6 必須脂肪酸、およびその組み合わせからなる群から選択される構成成分を含む。一改良では、そのような野菜抽出物は、推奨される毎日の1 回分の野菜の5 回分の相当物を提供する。野菜抽出物に適した供給源は、パクチョイ、ケール、レタス、アスパラガス、ニンジン、バターナットカボチャ、アルファルファ、グリーンピース、トマト、キャベツ、カリフラワー、ビートを含むが、これらに限定されない。オメガ-3/6 必須脂肪酸に適した供給源は、サケ、マグロ、サバ、青魚、メカジキ、およびその他同種のもの由来の魚油を含む。

【0036】

本明細書における食事療法プロトコルの有効性は、多くの対象のパラメーターの測定値によってモニターされる。たとえば、IGF-I の対象の血清濃度は、最初のIGF-I およびタンパク質摂取レベルならびに添付の刊行物において記載される死からの保護のための最適なレベルに依存して、第2の食事制限期間の終了までに25~90% 低下することが望ましい。対象における血中グルコース濃度は、第2の食事制限期間の終了までに25~75% 低下することもまた望ましい。

【0037】

本発明の実施形態の他の変形では、低タンパク質食が、あるアミノ酸を有するアミノ酸特異的なサプリメントを含む。典型的に、サプリメントは、非常に低いタンパク質量または無タンパク質食と一緒に、5~7 日間の期間、摂取されることになっている過剰なレベルの非必須アミノ酸を提供する。一改良では、低タンパク質食が、通常のタンパク質食と交替される。そのような変形では、低タンパク質食が、合間の1~7 週間の通常の食事制

限と共に、2週間～2か月ごとに、7日間、提供される。一改良では、アミノ酸特異的なサプリメントが、以下のアミノ酸、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリン、およびアルギニンを実質的に除外する。この文脈において、「実質的に除外する」は、除外されるアミノ酸の合計が、好ましい順に、対象の食事制限の全重量の5重量パーセント、3重量パーセント、1重量パーセント、および0.5重量パーセント未満であることを意味する。代わりに、アミノ酸特異的な食事制限は、窒素の供給源として1つ以上の以下のアミノ酸を提供する：アラニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、プロリン、セリン、およびチロシン。表2～4は、下記に示されるようにタンパク質を制限するものでもあるマウスについてのアミノ酸特異的な食事制限の特徴を提供する。典型的なマウス食事制限は、1日当たり約19kcalを提供する。ヒトなどのような他の哺乳動物については、タンパク質制限（PR）食は、必須カロリーを提供するように調整される。たとえば、米国における成人についての典型的なカロリー摂取量は、1日当たり約2200カロリーである。表5は、ヒト対象についてのそれぞれの供給源由来の1日当たりのキロカロリーを提供するが、表6は、ヒトについてのそれぞれの供給源由来の1日当たりのグラムを提供する。

【表2】

表2.

	成分(g/kg)			多量栄養素(g/kg)	
	通常の食事制限	PR食		通常の食事制限	PR食
コーンスターチ	397.49	397.49	炭水化物	601	617
マルトデキストリン	132	149.88	窒素供給源	177	183
スクロース	100	100	脂肪	72	72
ダイズ油	70	72			
セルロース	50	50		カロリー密度(kcal/g)	
ミネラル	35	35			
ビタミン	10	10		通常の食事制限	PR食
重酒石酸コリン	2.5	2.5			
Tert-ブチルヒドロキノン	0.01	.01		3.7600	3.7673

【表3】

表3.それぞれの食物供給源由来のマウスの1kgにおけるキロカロリー

	通常の食事制限	PR
炭水化物	2404	2468
窒素供給源	708	732
脂肪	648	648
計	3760	3848

【表 4】

表4.それぞれの供給源由来のカロリーパーセント(マウス)

	通常の食事制限	PR
炭水化物	63.94	64.14
窒素供給源	18.83	19.02
脂肪	17.23	16.84

10

【表 5】

表5.それぞれの供給源由来の1日当たりのカロリー(ヒト)

	通常の食事制限	PR
炭水化物	1406.60	1411.02
窒素供給源	414.26	418.50
脂肪	379.15	370.48
合計(kcal)	2200.00	2200.00

20

【表 6】

表6.それぞれの供給源由来の1日当たりのグラム(ヒト)

	通常の食事制限	PR
炭水化物	351.65	352.75
窒素供給源	103.56	104.63
脂肪	42.13	41.16
合計(g)	497.34	498.54

30

【0038】

一改良では、マウスについての1キログラムのアミノ酸特異的な食事制限が、約2 g～20 g アラニン、10 g～30 g アスパラギン酸、2 g～20 g シス테인、40 g～80 g グルタミン酸、2 g～20 g グリシン、2 g～20 g ヒスチジン、15 g～50 g プロリン、5 g～30 g セリン、および5～30 g チロシンを含む。ヒト対象については、ヒト対象についての1日当たりの食事療法製剤の組成物を提供するためにこれらの範囲に係数（すなわち約0.572）を掛ける。たとえば、アミノ酸特異的な食事制限におけるヒト（2200カロリー／日の食事制限）についての特定のアミノ酸の毎日の量は、約2～12 g アラニン、5 g～30 g アスパラギン酸、1 g～7 g シス테인、18 g～73 g グルタミン酸、2 g～9 g グリシン、2 g～10 g ヒスチジン、9 g～37 g プロリン、5 g～21 g セリン、および5～21 g チロシンである。他の改良では、アミノ酸特異的な食事制限が、1キログラムの食事制限当たり約160～約240 g の特定のアミノ酸を含む。そのため、ヒトについて、アミノ酸特異的な食事制限は、1キログラム当たりの食事制限値を、約2200カロリー／日のヒト食事制限を代表する値に変換するために係数（0.572）を使用すると、1日当たり約80～160 g の特定のアミノ酸を提供する。他の変形では、アミノ酸特異的な食事制限が、上記に示された量で、アラニン、アスパラギン酸、シス테인、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、プロリン、セリン、およびチロシンからなる群から選択される少なくとも6つのアミノ酸を含む。さらに他の変形では、アミノ酸特異的な食事制限が、表7において示される1日当たりのヒト体重1 K

40

50

g 当たりのアミノ酸の量をグラムで提供する。特に、アミノ酸特異的な食事制限は、1 日当たりヒト体重 1 K g 当たり以下のグラム、0. 0 6 g アラニン、0. 1 4 g アスパラギン酸、0. 0 4 g システイン、0. 4 5 g グルタミン酸、0. 0 5 g グリシン、0. 0 6 g ヒスチジン、0. 2 3 g プロリン、0. 1 3 セリン、および 0. 1 3 g チロシンを提供した。他の改良では、これらのアミノ酸のそれぞれが、所定の値のプラスまたはマイナス 3 0 パーセントの範囲内にある。

【表 7】

表7.ヒトレベル.1日当たりのヒト体重1kg当たりの認知症を保護する食事制限のために選択されたそれぞれのアミノ酸のグラム

製剤グラム/kg体重			
AA	通常の食事制限	PR	係数
Ala	0.07	0.06	0.81
Asp	0.13	0.14	1.09
Cys	0.02	0.04	2.05
Glu	0.20	0.45	2.23
Gly	0.06	0.05	0.94
His	0.04	0.06	1.68
Pro	0.10	0.23	2.25
Ser	0.09	0.13	1.35
Tyr	0.06	0.13	2.19
合計	0.78	1.30	

【0039】

他の変形では、方法が、第 1 の期間に対象にタンパク質制限（PR）食を施すステップを含む。一変形では、低タンパク質食が、特異的なアミノ酸の栄養補助食品を含む。一改良では、第 1 の期間は、約 5 日～14 日であり、7 日が典型的である。さらに、低タンパク質食は、対象の通常のカロリー摂取量の 70～100 パーセントを対象に提供する。低タンパク質食は、窒素の供給源としてアミノ酸のみを実質的に含む。たとえば、タンパク制限食は、タンパク質からそのカロリーの 10 パーセント未満を得る。他の改良では、タンパク制限食が、タンパク質からそのカロリーの 5 パーセント未満を得る。他の改良では、タンパク制限食が、タンパク質からそのカロリーの 0 パーセントを得る。特に、タンパク制限食は、実質的に以下のアミノ酸、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリン、およびアルギニンを除外する。この文脈において、「実質的に除外する」は、除外されるアミノ酸の合計が、好ましい順に、5 重量パーセント、3 重量パーセント、1 重量パーセント、および 0. 5 重量パーセント未満であることを意味する。代わりに、タンパク制限食は、窒素の供給源として 1 つ以上の以下のアミノ酸を提供する；アラニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、プロリン、セリン、およびチロシン。表 2～4 は、下記に示されるマウス研究についての栄養補助食品を含むタンパク制限食の特徴を提供する。典型的なマウス食事制限は、1 日当たり約 19 kcal を提供する。ヒトなどのような他の哺乳動物については、低タンパク質食は、必須カロリーを提供するように調整される。たとえば、米国における成人についての典型的なカロリー摂取量は、1 日当たり約 2200 kcal カロリーである。表 5 は、ヒト対象についてのそれぞれの供給源由来の 1 日当たりのキロカロリーを提供するが、表 6 は、ヒトについてのそれぞれの供給源由来の 1 日当たりのグラムを提供する。

【0040】

一改良では、マウスについての低タンパク質食の 1 キログラムにおけるアミノ酸が、表 8 において提供される。一改良では、マウスについての 1 キログラムの低タンパク質食が

、約 2 g～20 g アラニン、10 g～30 g アスパラギン酸、2 g～20 g システイン、40 g～80 g グルタミン酸、2 g～20 g グリシン、2 g～20 g ヒスチジン、15 g～50 g プロリン、5 g～30 g セリン、および 5～30 g チロシンを含む。ヒト対象については、ヒト対象についての 1 日当たりのこれらのアミノ酸についての毎日の必要量を提供するためにこれらの範囲に係数（すなわち約 0.572）を掛ける。たとえば、低タンパク質食におけるヒト（2200 カロリー／日の食事制限）についての特定のアミノ酸の毎日の量は、約 2～12 g アラニン、5 g～30 g アスパラギン酸、1 g～7 g システイン、18 g～73 g グルタミン酸、2 g～9 g グリシン、2 g～10 g ヒスチジン、9 g～37 g プロリン、5 g～21 g セリン、および 5～21 g チロシンである。他の改良では、タンパク制限食が、1 キログラムの食事制限当たり約 160～約 240 g の特定の 10
アミノ酸を含む。そのため、ヒトについて、低タンパク質食は、1 キログラム当たりの食事制限値を、約 2200 カロリー／日のヒト食事制限を代表する値に変換するために係数（0.572）を使用すると、1 日当たり約 80～160 g の特定のアミノ酸を提供する。他の変形では、タンパク制限食が、上記に示された量で、アラニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、プロリン、セリン、およびチロシンからなる群から選択される少なくとも 6 つのアミノ酸を含む。表 8 は、マウス食事制限についてのタンパク制限食におけるアミノ酸内容物の例を提供する。表 8 はまた、コントロール（通常の食事制限）に対するタンパク制限食における特定のアミノ酸の比である係数を提供する。これらの比は、ヒト対象などのような他の哺乳動物に等しく適用可能である。さらに他の変形では、低タンパク質食が、表 8 において示される 1 日当たりのヒト体重 20
1 kg 当たりのアミノ酸の量をグラムで提供する。特に、PK 食は、1 日当たりヒト体重 1 kg 当たり以下のグラム、0.06 g アラニン、0.14 g アスパラギン酸、0.04 g システイン、0.45 g グルタミン酸、0.05 g グリシン、0.06 g ヒスチジン、0.23 g プロリン、0.13 g セリン、および 0.13 g チロシンを提供した。他の改良では、これらのアミノ酸のそれぞれが、所定の値のプラスまたはマイナス 30 パーセントの範囲内にある。

【0041】

他の変形では、対象におけるグルコースおよび／または IGF-1 レベルを低下させるための方法が、提供される。方法は、タンパク質供給源から約 10 パーセント未満のカロリーを有する低タンパク質食を対象に提供するステップを含む。対象のグルコースおよび 30
／または IGF-1 レベルは、タンパク質摂取量を増加させるべきか、減少させるべきかどうかを決定するためにモニターされる。一改良では、低タンパク質食が、タンパク質供給源からの 0～10 パーセントのカロリーを有する。さらなる改良では、低タンパク質食が、タンパク質供給源からの 0～5 パーセントのカロリーを有する。他の改良では、低タンパク質食が、典型的に、タンパク質供給源からの約 0 パーセントのカロリーを有する。他の改良では、低タンパク質食がまた、脂肪からのカロリーの少なくとも 50 パーセントが、13～28 個の炭素原子を有する、上記に示される長鎖不飽和脂肪酸からのものとなるように脂肪供給源を含む、低カロリー食でもある。典型的な脂肪供給源は、ダイズ油などのような植物油を含む。さらなる改良では、低タンパク質食が、脂肪からの少なくとも 40
25 パーセントのカロリーが、2～7 個の炭素原子を有する短鎖脂肪酸および／または 8～12 個の炭素原子を有する中鎖飽和脂肪酸からのものとなるように、脂肪供給源を含む。脂肪酸の特定の例は、ラウリン酸および／またはミリスチン酸を含み、脂肪供給源は、オリーブ油、核油、および／またはヤシ油を含む。他の改良では、低タンパク質食が、食事制限中に含有される総カロリーの約 0～22 パーセントの量で脂肪からのカロリーを含む。

【0042】

他の実施形態では、対象において化学毒性の症状を軽減するための方法が提供される。方法は、第 1 の期間に低タンパク質食を提供するステップを含み、低タンパク質食が、タンパク質からの 10 パーセント未満のカロリーを含む。カロリー制限食は、第 2 の期間に 50
対象に提供され、カロリー制限食が、低タンパク質食のカロリーの 0～50 % を有する。

一改良では、カロリー制限食が、タンパク質供給源からの0～10%のカロリーを含む。
一改良では、化学療法処置が、対象に施される。化学療法剤の例は、ドキソルビシン、シクロホスファミド、シスプラチン、5-フルオロウラシル、およびその組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0043】

以下の実施例は、本発明の様々な実施形態を例証する。当業者らは、本発明の精神および請求項の範囲内にある多くの変形を認識するであろう。

【0044】

低タンパク質摂取量の実験

米国における唯一の国家的に代表的な食事療法調査であるNHANESからの50歳以上の6,381人の米国の男性および女性に関する疫学的な研究を、タンパク質およびアミノ酸のレベルおよび供給源、加齢、疾患、ならびに死亡率の間の関係を理解するためにマウスおよび細胞の研究と組み合わせた。

【0045】

結果

ヒト集団

研究集団は、NHANES III、国家的に代表的な横断研究からの、50歳以上の6,381人の成人を含んだ。発明者らの分析サンプルは、65歳の平均年齢を有し、民族性、教育、および健康の特徴において米国の集団の代表となる(表13)。

【0046】

平均して、対象は、1,823カロリーを摂取しこのうち大部分は、炭水化物(51%)、次いで脂肪(33%)、タンパク質(16%)—11%が動物タンパク質由来のものであった。タンパク質からのカロリーパーセントは、高タンパク質グループ(タンパク質からの20%以上のカロリー)、中程度タンパク質グループ(タンパク質からの10～19%のカロリー)、および低タンパク質グループ(タンパク質からの10%未満のカロリー)に対象を分類するために使用した。

【0047】

死亡率についての追跡調査は、2006年までの国家死亡指標(National Death Index)との関連を通してすべてのNHANES参加者について入手可能であった(22)。これは、死についての時間の計測および原因を提供した。死亡率についての追跡調査期間は、18年間にわたって合計83,308人年を包含し、全体的な死亡率は40%、心臓血管系疾患(CVD)による死亡率は19%、癌による死亡率は10%、および糖尿病に引き起こされた死亡率は約1%であった。

【0048】

タンパク質および死亡率の間の関連性

コックス比例ハザードモデルを使用して、発明者らは、高および中程度タンパク質摂取が、50歳以上の対象すべてについて検討した場合に、糖尿病関連性の死亡率と正に関連したが、総死亡率、CVDまたは癌による死亡率に関連しなかったことを発見した。結果は、中程度および高タンパク質摂取量のグループの両方が、低タンパク質グループにおける参加者と比較して、糖尿病による死についてより高い危険性を有したことを示した。総合的に考えると、これらの結果は、中程度～高タンパク質摂取量が糖尿病死を増進することを示すが、この可能性についてさらに試験するためにより大きな研究が必要である。より高度のタンパク質グループにおける糖尿病死亡率の上昇についての代替の説明は、糖尿病診断の後に、個人が、より高度のタンパク質、より低度の脂肪、および低度の炭水化物摂取量で構成される食事制限に切り替え得るという可能性である。これについて試験するために、発明者らは、ベースライン時に糖尿病の罹患率がゼロであった参加者においてタンパク質摂取量および糖尿病死亡率の間の関連性を検査した(表19)。

【0049】

ベースライン時に糖尿病を有していなかった対象の間で、高タンパク質グループにおける対象は、危険性が73倍増加したが(HR:73.52;95%CI:4.47～1

10

20

30

40

50

209.7)、中程度タンパク質カテゴリーにおける対象は、糖尿病死亡率の危険性においてほぼ2.3倍増加した(HR:2.293;95%CI:1.31~4.00.7)。発明者らは、発明者らのサンプルサイズおよび低タンパク質グループにおける糖尿病による死の非常に低い発生率のために、発明者らのハザード比および信頼区間を上昇させてもよいことを強調する。全体として、ベースライン時に糖尿病を有していなかった人の間で21人だけが糖尿病で死亡した—このうちたった1人が低タンパク質グループであった。しかしながら、小さなサンプルサイズにもかかわらず、発明者らの結果は、タンパク質摂取量の増加および糖尿病関連性の死亡率の間の強い有意な関連性をなお示す。

【0050】

コックス比例ハザードモデルは、タンパク質および死亡率の間の関連性が中年および高齢者について異なったかどうかを決定するために再実行し、タンパク質摂取および年齢の間の相互作用について試験した。有意な相互作用が、総死亡率および癌死亡率の両方について発見され、低タンパク質が中年において有益であったことを示すが、その有益性は年齢と共に低下する(図4)。これらの結果に基づいて、発明者らは、2つの年齢のグループ、50~65歳(n=3,039)の人々および66+歳(n=3,342)の人々に集団を層別化し、タンパク質および原因が特異的な死亡率の間の関係について再検査した。50~65歳の人々の間で、より高度のタンパク質レベルは、総死亡率および癌死亡率の有意に増加した危険性に関連づけられた(表12)。この年齢層において、高タンパク質グループにおける対象は、総死亡率の彼らの相対危険度が74%増加し(HR:1.74;95%CI:1.02~2.97)、低タンパク質グループと比較した場合に癌で死ぬ可能性が4倍以上であった(HR:4.33;95%CI:1.96~9.56)。これらの関連性のどれも、総脂質からのカロリーパーセントまたは全炭水化物からのカロリーパーセントをコントロールすることによって有意に影響を与えられなかった。しかしながら、動物タンパク質からのカロリーパーセントをコントロールした場合、総タンパク質ならびに総死亡率および癌死亡率の間の関連性は、それぞれ、排除されまたは有意に低下し、動物タンパク質が、これらの関係のかなりの部分に影響することを示唆する。発明者らが植物ベースのタンパク質の効果をコントロールしても、タンパク質摂取量および死亡率の間の関連性において変化はなく、高レベルの動物タンパク質が死を増進し、植物ベースのタンパク質が保護効果を有さないことを示す(表17)。

【0051】

低タンパク質食を有する対象と比較して、中程度のレベルのタンパク質を摂取した対象もまた、3倍高い癌死亡率(HR:3.06;95%CI:1.49~6.25)を有し、これは、脂肪からのカロリーパーセントまたは炭水化物からのカロリーパーセントによって説明されなかったが、動物タンパク質からのカロリーパーセントをコントロールした場合、わずかに低下した(HR:2.71;95%CI:1.24~5.91)。効果の大きさは、高タンパク質グループにおけるものほど大きくなかった。総合的に考えると、これらの結果は、高レベルの動物タンパク質を摂取している50~65歳の応答者が、全体的なおよび癌の死亡率についての危険性の大幅な増加を示すが、タンパク質が動物供給源からのものではない場合、危険性は多少、減少し得ることを示す。集団45~65について検討した場合、同様の結果が得られた(データ示さず)。

【0052】

上記の発見とは対照的に、ベースライン時に66歳以上であった応答者の間で、より高度のタンパク質レベルは、全体的なおよび癌の死亡率に対する逆の効果に関連したが、糖尿病死亡率に対する同様の効果に関連した(表12)。低タンパク質摂取の対象と比較した場合、高度の量のタンパク質を摂取した対象は、総死亡率において28%低下したが(HR:0.72;95%CI:0.55~0.94)、中程度の量のタンパク質を摂取した対象は、総死亡率において21%の低下を示した(HR:0.78;95%CI:0.62~0.99)。さらに、これは、脂肪、炭水化物、または動物タンパク質からのカロリーパーセントによって影響を与えられなかった。高タンパク質摂取を有する対象はまた、低タンパク質食を有する対象と比較して、癌死亡率において60%低下し(HR:

0.40 ; 95% CI : 0.23 ~ 0.71)、これもまた、他の栄養素摂取量またはタンパク質供給源をコントロールした場合に、影響を与えられなかった。

【0053】

タンパク質および死亡率の間の関連性に対する IGF-1 の影響

調整した平均 IGF-1 レベルは、両方の年齢のグループについてタンパク質摂取と正に関連した (図 5)。IGF-1 が無作為に選択したサブサンプルについてのみ入手可能であったので ($n = 2, 253$)、発明者らは、このサンプルにおけるタンパク質および原因が特異的な死亡率の間の年齢特異的な関連性について再検査し、それらが全サンプルにおいて見られたものと同様であることが分かったが、多少、効果の大きさがより大きかった (表 15)。次に、発明者らは、IGF-1 が、タンパク質および死亡率の間の関連性においてモデレーターまたはメディエーターとして作用するかどうかについて検査した。発明者らは、IGF-1 が、タンパク質摂取および死亡率の間の関連性について説明しなかったが (表 15)、それは、タンパク質および IGF-1 レベルの間の統計的に有意な相互作用によって示されるように関連性の重要なモデレーターであった (表 16)。

【0054】

これらのモデルから、IGF-1 およびタンパク質のグループによって予測されるハザード比を計算した (図 12)。結果は、IGF-1 における 10 ng/ml の増加ごとに、高タンパク質対低タンパク質グループについて 50 ~ 65 歳の対象の間の癌の死の危険性がさらに 9% ずつ増加することを示した ($\text{HR}_{\text{高タンパク質} \times \text{IGF-1}} : 1.09 ; 95\% \text{ CI} : 1.01 \sim 1.17$)。その代わりに、より高齢の対象 (66+ 年) の間で、低タンパク質グループにおける対象と比較した場合、IGF-1 もまた低かった場合、高または中程度タンパク質食を有する対象は、CVD による死の危険性が低下したが、有益性は、IGF-1 が増加するにつれて分からなくなった。

【0055】

マウスにおけるタンパク質摂取量、IGF-1、および癌

因果関係を検証し、メカニズムについての発明者らの研究を進めるために、発明者らは、げっ歯動物における循環 IGF-1、癌発生率、および腫瘍進行のレベルに対する、NHANES 研究における対象と同様の一連のタンパク質摂取量 (4 ~ 18%) の効果について検討した。18 週齢雄 C57BL/6 マウスに、CR を課すこともなく、栄養失調を引き起こすこともない、高度 (18%) または低度 (7%) の量のタンパク質に由来するカロリーを提供するように設計した、実験的な等カロリーの食事制限を 39 日間続けて供給した (図 9A、B)。

【0056】

様々なレベルのタンパク質および IGF-1 のレベルが、それぞれの食事制限の 1 週間後に、新しく形成された腫瘍が生存し、成長する能力に対してどのように影響を与え得るかを理解するために、両方のグループに、20,000 個の同一遺伝子マウスメラノーマ細胞 (B16) を皮下に移植した。腫瘍測定は、それぞれの食事制限の 22 日目の移植の 15 日後に始め、この時点で、発生率は、高タンパク質レベルグループにおいて 100% であったが、低タンパク質レベルグループにおいて 80% にすぎなかった (図 6A)。25 日目に、発生率は、低タンパク質グループにおいて 90% まで上昇し、実験の終了までそのままであった (図 6A)。22 日目から実験の終了まで、腫瘍サイズは、より低量のタンパク質を摂取するグループにおいて有意により小さくなり、はるかにゆるやかな腫瘍進行を示した。39 日目に、平均腫瘍サイズは、高タンパク質グループにおいて 78% より大きいことが観察された (36 日目 $P = 0.0001$; 39 日目 $P < 0.0001$) (図 6B)。IGF-1 および IGF-1 阻害性タンパク質、IGFBP-1 に対するタンパク質摂取量の効果を決定するために、血液サンプルを 16 日目に得、分析した。血清 IGF-1 は、高タンパク質 (18%) 食を供給した動物と比較した場合、低タンパク質 (4%) グループにおいて 35% 低かった ($P = 0.0004$) (図 6C)。反対に、血清 IGFBP-1 は、高タンパク質グループ (図 6D) と比較して、低タンパク質グループにおいて 136% 高かった ($P = 0.003$)。

【0057】

GHR-I GF-1 軸が癌進行を増進するという仮説についてさらに試験するために、発明者らは、GHR/I GF-1 欠損 GHRKO マウスならびにそれぞれの年齢および性別が一致する同腹仔コントロール（18 週齢雄 C57BL/6 マウス）にメラノーマ（B16）を皮下に移植した。腫瘍測定は移植の 10 日後から始めて、18 日目まで続けた。データは、腫瘍進行が、コントロールグループにおける進行と比較した場合、GHRKO マウスにおいて強く阻害されることを示す（図 6 E； $P < 0.01$ ）。

【0058】

発明者らはまた、タンパク質レベル、腫瘍発生率、および進行の間の関係について試験するために乳癌マウスモデルを使用した。12 週齢雌 BALB/c マウスは、マウスが、体重減少を予防するために、第 1 の週内にタンパク質食からの 4 % から 7 % kcal に切り替えなければならなかったという点を除いて、C57BL/6 マウスについて記載されたのと同じ食事療法レジメン下に置いた（図 9 E、F）。これらの食事制限を供給した 1 週間後に、マウスに、同一遺伝子転移性マウス乳癌（4T1）の 20,000 個の細胞を皮下に移植し、15 日後に、腫瘍について評価した。移植後 18 日目（食事制限 25 日目）に、腫瘍発生率は高タンパク質グループにおいて 100 % であったが、低タンパク質グループにおいて 70 % にすぎなかった。低タンパク質グループにおける発生率は、39 日目に 80 % まで上昇し、それは、実験の終了までそのままであった（図 6 F）。腫瘍進行データはまた、より低度のタンパク質食のグループがより小さな平均腫瘍サイズを有したことも示す。45 % 小さな平均腫瘍サイズは、実験の終了時に 53 日目までに高タンパクグループと比較して、低タンパク質グループにおいて観察された（ $P = 0.0038$ ）（図 6 G）。C57BL/6 マウスに関しては、I GF-1 は、食物タンパク質制限の 16 日目に測定した。低タンパク質摂取量グループでは、I GF-1 レベルは、高レベルグループと比較して、30 % 低下した（ $P < 0.0001$ ）（図 6 H）。そのうえ、低タンパク質摂取量はまた、C57BL/6 遺伝的背景において観察されたものと同様に（図 6 D）、84 % の I GFBP1 増加を引き起こした（ $P = 0.001$ ）（図 6 I）。同様に、大豆タンパク質摂取量を高レベルから低レベルに低下させた場合、発明者らは、I GF-1 における 30 % の減少（ $p < 0.0001$ ）（図 6 J）および I GFBP1 における 140 % の増加を観察した（ $p < 0.0001$ ）（図 6 K）。I GF-I および I GFBP1 に対して、同じレベルの動物タンパク質を植物タンパク質と置換する効果があるという傾向があったが、差異は有意ではなかった。これらのデータは、より低度のタンパク質摂取量が、I GF-1 を減少させ、I GF-1 阻害剤 I GFBP1 を増加させることによって、部分的に、癌発生率および/または進行を減少させるのに役割を果たし得ることを示唆する。様々なタイプの動物対植物ベースのタンパク質に関するさらなる研究は、I GF-I および I GFBP1 に対するそれらの効果を決定するのに必要である。

【0059】

細胞研究

アミノ酸およびライフスパンのレベルの間に重要な関係があるかどうかを理解するために、酵母成長および発達に対する特定の濃度のアミノ酸の存在の影響を、生存および突然変異率アッセイによって評価した。野生型 DBY746 出芽酵母（*S. cerevisiae*）株は、半分（0.5×）、標準（1×）、および 2 倍（2×）のアミノ酸濃度の存在下において成長させ、他のすべての栄養素は一定に維持した。生存は、1、3、5、および 8 日目に測定した。生存の差異は、1～3 日目の間に観察されなかった。5 日目に、2 つの最も高度のアミノ酸濃度が、死亡率の増加の傾向を示し、これは、8 日目までに生存する細胞の 10 倍の減少をもたらした（図 6 L）。

【0060】

アミノ酸、加齢、および年齢依存性の DNA 損傷の間の関係性を評価するために、発明者らは、自然突然変異率を測定するために高齢出芽酵母（*S. cerevisiae*）を使用した。突然変異率は、0.5×アミノ酸濃度に曝露された細胞と比較して、それぞれ 1×および 2×のアミノ酸レベルに曝露された 5 日齢であるが若くない細胞において 3 およ

び4倍高かった(図6M)。これらの結果は、単細胞生物においてでさえ、アミノ酸が細胞の加齢および年齢依存性のゲノムの不安定性を増進することを示す。

【0061】

年齢依存性のゲノムの不安定性の増進に関与する経路をさらに見つけるために、発明者らは、アミノ酸の存在下または非存在下において、 $Ras-PKA-Msn2-4-Tor-Sch9-Gis1$ 経路によって調節されるストレス応答遺伝子の誘発を測定した。 Trp 、 Leu 、および His (この株における成長にとって必須)のみを含有するコントロール条件培地において成長させた細胞について、培地におけるすべてのアミノ酸の存在は、ストレス抵抗性遺伝子の誘発を低下させ、アミノ酸の追加が、細胞の保護を阻害するのに十分であったことを示す(図6N)。

10

【0062】

$Tor-Sch9$ 経路は寿命を延長するだけではなく、DNA突然変異を増進する。 $Ras-cAMP-PKA$ シグナル伝達がまた年齢依存性のゲノムの不安定性を調節するかどうかを決定するために、発明者らは $ras2$ の欠損突然変異体について研究した。発明者らは、 $ras2A$ 突然変異体が長命であることを確認したが(図11A)、また、 Ras シグナル伝達の不活性化が年齢および酸化ストレス依存性のゲノムの不安定性を弱めたことをも示す(図11B、11C、6O、11D)。

【0063】

全体的に、これらの結果は、 $Tor-Sch9$ および Ras/PKA 経路の活性化によって、少なくとも部分的に、アミノ酸が突然変異頻度、したがってゲノムの不安定性に影響を与えることができるメカニズムが、ストレス抵抗性を減少させたことを示唆する(図6P)。

20

【0064】

高齢マウスにおける低タンパク質摂取量および体重維持

50~65歳の対象対65歳以上の対象における低タンパク質食について観察された逆の効果ならびに65歳以降のBMIおよびIGF-1レベルにおける主な低下に基づいて、発明者らは、低タンパク質食のより高齢の対象が栄養不良になり得、十分なレベルのアミノ酸を吸収することも、処理することもできなかったと仮定した。マウスにおけるこの可能性について試験するために、発明者らは、18%または4%の動物タンパク質を含有する等カロリーの食事制限を若いマウス(18週齢)および高齢のマウス(24月齢)に供給した。非常に低度のタンパク質食は、高齢の生物におけるタンパク質制限に対する感受性を明らかにするために意図的に選択した。30間、高タンパク質食で維持した高齢のマウスは、体重が増えたのに対して、低タンパク質食の、若いマウスではなく高齢のマウスは、死に対するタンパク質制限の有益な効果を負の効果に変える加齢の影響に一致して、15日目までにそれらの体重の10%を失った(図4A、B)。

30

【0065】

議論

ここで米国の集団における栄養についての主な国家的に代表的な研究を使用して、発明者らの結果は、45歳以上の人々の間で、タンパク質摂取量のレベルが、糖尿病による死の危険性の増加に関連するが、総死亡率、癌、またはCVD死亡率における差異に関連しないことを示す。しかしながら、発明者らは、タンパク質摂取および死亡率の間の関連性についての年齢の相互作用を発見し、50~65歳の対象は低タンパク質摂取量から有益性を受け、66+歳の対象は低タンパク質食から不利益を受けた少なくとも全体的な死亡率および癌について。これは、ここで報告されるタンパク質摂取量、IGF-1、および死亡率の間の強い関連性が以前に記載されなかった理由を説明し得る。さらに、IGF-1レベルを測定した2253人の対象の間で、低タンパク質摂取量グループと比較した高タンパク質摂取量を有する人々についての総死亡率および癌死亡率の危険性は、高レベルのIGF-1をも有した人々についてさらにもっと増加した。これは、様々なタイプの癌にIGF-1レベルに関連づける以前の研究に一致する。

40

【0066】

50

特に、摂取されたタンパク質のタイプが重要であるかもしれないという証拠があった。発明者らの結果は、動物供給源に由来するタンパク質の割合が、全体的なタンパク質摂取量ならびに総死亡率および癌死亡率の間の関連性のかなりの部分を説明したことを示した。これらの結果は、赤身の肉の摂取ならびに全死因、C V D、および癌からの死亡の間の関連性についての最近の発見に一致している。米国における以前の研究は、低炭水化物食が、全体的な死亡率の増加に関連し、そのような食事制限に動物ベースの製品の摂取の増加が伴う場合、全体的なならびにC V Dおよび癌による死の危険性がさらにもっと増加することを発見した。しかしながら、発明者らの研究は、I G F- I、加齢、糖尿病、および癌に対する動物タンパク質の影響が、タンパク質摂取量を確立する調査後18年間で、45~65歳の人々について死の主なプロモーターとなり得ることを示す。その時まで、インタビューの時に65歳であったコホートは83歳になり、高タンパク質摂取量が、65歳以上の対象において死を増進し得ることをはっきり示す。

10

【0067】

酵母およびマウスからの発明者らの結果はまた、アミノ酸、ストレス抵抗性、DNA損傷、および癌発生率/進行の間の関係を提供することによって、タンパク質、癌、および全体的な死亡率の間の重要な関係の少なくとも一部について説明し得る。マウスでは、タンパク質レベルの低下によって引き起こされた変化は、20,000個の腫瘍細胞が皮下部位に既に存在した場合でさえ、腫瘍の10~30%の定着を予防するのに十分に強力な効果を有した。さらに、メラノーマおよび乳癌の両方の進行は、低タンパク質食によって強く阻害され、低タンパク質食が癌予防および処置の両方において用途を有し得ることを示す。

20

【0068】

タンパク質摂取量はベースライン時に中年であった成人についての死亡率の増加に関連するが、低タンパク質食が高齢者にとって危険となり得るという証拠もまたあった。高齢者における高および中程度タンパク質摂取量は、低いグループと比較して、主な改善に関連し、摂取されたカロリーの少なくとも10%に相当するタンパク質摂取量が、年齢依存性の体重減少を低下させるならびにI G F- 1および他の重要な要因の過度の損失を可能性として予防するために、65歳または可能性として75歳以降に必要であるかもしれないことを示唆する。以前の研究は、タンパク質摂取量の増加および結果として生じるI G F- 1の増加が高齢者において有益であることを証明し得ると述べた。実際、低タンパク質食の保護作用から有害作用への劇的な切り替えは、体重が安定し、次いで、低下することが知られている時期と重なり合う。以前の長期的な研究に基づいて、体重は、50~60歳まで増加する傾向があり、この時点で、体重は、65歳以上の人々について毎年平均0.5%ずつ着実に低下し始める前に、安定性になる。発明者らは、これが、かなりのパーセンテージの彼らの体重を失い、タンパク質栄養失調に対してより感受性である低BMIを有する虚弱な対象と見なされている対象の体重減少および虚弱に依存し得ることを推測する。炎症または遺伝要因などのような他の要因が、発明者らのマウス研究に一致して、高齢の対象におけるタンパク質制限に対する感受性の一因となり得る可能性もまたある。

30

【0069】

他の研究は、pHの局地的状態における変化、老齢の消化管における適応応答障害、および腸の形態における変化に関するげっ歯動物における栄養素吸収の年齢関連性の低下を述べたが、老化における形態学および吸収性の変化の間に明らかな関連性はなない。ヒトでは、いくつかの研究は、食物タンパク質の消化および吸収動態が健康で高齢の男性においてインビボにおいて害されないことを示したが、これらの研究はまた、末梢組織への利用率の減少をもたらすかもしれないAAの内臓抽出の増加をも報告した、また、低タンパク質摂取量またはタンパク質必要量の増加の場合に、食事のAAの全身性の利用率の制限が筋肉タンパク質合成の減少の一因となり得ることを推測する。さらに、ヒトにおいて、不良な歯生状態、医薬品、および心理社会的な問題のような他の要因もまた、栄養失調の率に対してかなりの役割を果たす。

40

50

【0070】

I G F - 1 は、高齢の年齢で減少し、可能性として、虚弱および死の危険性を増加させることが以前に示された。したがって、発明者らの発見は、I G F - 1 および死亡率に関する論議を説明し得、最低限のレベルのタンパク質および可能性として I G F - 1 が高齢において重要であるまたは低循環 I G F - 1 が栄養失調による虚弱および／または罹患の状態を反映することを示す。実際、炎症および他の障害は、I G F - 1 レベルを減少させることが知られており、低タンパク質および低 I G F - 1 のグループが、大病を有するまたはそれを発症する過程にある、かなりの数の栄養不良であり虚弱でもある個人を含有し得るという可能性を高める。

【0071】

発明者らの研究に認められるべきいくつかの限界がある。第1に、死亡率評価について18年間追跡した1回の24時間の食事の回想の使用は、24時間の期間が普通の日ではなかった場合に食事の慣習の分類を誤る可能性を有する。しかしながら、発明者らのサンプルの93%は、その24時間の期間が普通の日に相当したことを報告した。発明者らはまた、発明者らの分析においてコントロールとしてこの変数を含む。さらに、24時間の食事の回想は、対象の「通常の食事制限」を同定する非常に妥当なアプローチであることが示された。発明者らは、食事の摂取に対する長期的なデータの欠如が発明者らの研究の潜在的な限界であることを認めなければならないが、高齢の人々の間の6年間にわたる食事の一貫性についての研究は、食習慣において長い間にわたってほとんど変化しないことを明らかにした。20年間にわたる食習慣を調べる他の研究は、人々が年を取るにつれて、エネルギー摂取量がタンパク質、脂肪、および炭水化物について減少したが、減少は3つのタイプにわたって均等であったことを示した。

【0072】

発明者らの研究の他の限界は、タンパク質グループへの応答者の分類および分析のためのサンプルの層別化が、とりわけ、ベースライン時に糖尿病を有していない人または I G F - 1 サブサンプルにおける参加者の間の糖尿病死亡率に関する分析について、比較的小さなサンプルサイズを生成したことである。その結果、発明者らのハザード比および95%信頼区間は、より大きなサンプルサイズで見られていたであろうものよりもはるかに大きいかもしれない。しかしながら、小さなサンプルサイズが発明者らの力を減少させ、関連性を検出するのをより難しくすることを予期するであろう。そのため、発明者らが有意性を検出することができるということは、タンパク質および死亡率の間の関連性が強いことを示す。さらに、発明者らの死亡率分析からの95%信頼区間の下限値は、十分に1.0以上であり、危険性の増加がおそらく大きいことを示す。最終的に、これらの限界を考慮すると、発明者らの研究は、信頼できる、原因が特異的な死亡率についてのデータのその使用および大きな国家的に代表的なサンプルのその包含—多くの場合、以前の文献から欠乏している特徴、によって強められた。

【0073】

全体として、発明者らのヒトおよび動物の研究は、少なくとも部分的に、循環 I G F - 1 および可能性としてインスリンレベルの調節を含んでもよいプロセスを通して、中年の間の低タンパク質食が、癌および全体的な死の予防に有用となり得ることを示す。他の疫学および動物研究に一致して、発明者らの発見は、植物ベースの栄養素が食物摂取量の大部分に相当する食事制限が、健康上の有益性を最大限にする可能性があることを示唆する。しかしながら、発明者らは、65歳および可能性として75歳まで、健康状態に依存して、現在最小限の必要量と見なされる、Food and Nutrition Board of the Institute of Medicineによって公表される0.7~0.8グラムのタンパク質/体重1kg/日は、19~70歳の成人によって摂取される1~1.3gグラムのタンパク質/体重1kg/日に対して、保護的となり得ることを提唱する。発明者らはまた、より高齢の年齢時に、健康な体重の維持および虚弱からの保護を可能にするために、低タンパク質摂取量を回避することおよび徐々に、中程度から高タンパク質、可能性として、主として植物ベースの摂取を採用することは重

要となり得ることを提唱する。

【0074】

実験手順

ヒトデータについての栄養素摂取量

栄養素摂取量データは、24時間の期間の間の食物および飲料摂取量の報告に基づく。データは、80以上の栄養素についての情報と共に、自動マイクロコンピューターベースのコーディングシステムを介して収集した。食事のデータを収集するためのこの方法の使用に、いくつかの利点がある。摂取および回想の間に経過する時間が短いと仮定すると、参加者は、典型的に、より多くの情報を思い出すことができる。また、報告方法と異なり、24時間の食事の回想は、摂取後のデータ収集に依存し、評価が食事の行動を変える可能性を低下させる。さらに、24時間の回想は、一般に使用される食物頻度アンケートと比較して、総エネルギーおよびタンパク質摂取のより説得力のある推定値であることが示され、Block food-frequency questionnaireおよびNational Cancer Institute's Diet History Questionnaireの両方よりも、総エネルギーおよび栄養素摂取量について妥当な測定値であることもまた示された。最終的に、このアプローチはまた、ボディマス指数に関係なくエネルギー、タンパク質、脂肪、および炭水化物摂取量を的確に評価することも分かった。

10

【0075】

疫学的な死追跡調査

死データは、国家死亡指標から入手可能であった。113の可能性のある原死因（UCOD-113）についての情報は、総死亡率、心血管系（CVD）死亡率、癌死亡率、および糖尿病死亡率を決定するために使用した。

20

【0076】

ヒトデータについての統計分析

コックス比例ハザードモデルは、タンパク質からのカロリーの摂取量と続く総死亡率、CVD、癌、および糖尿病死亡率の間の関連性を推定するために使用した—後者の3つの実行は競合リスク構造（competing risks structure）を使用した。次に、発明者らは、死亡率との関連に対する年齢およびタンパク質摂取の間の相互作用を試験した。これらの結果に基づいて、発明者らは、2つの年齢グループ（50～65歳および66+歳）に対象を分類し、これを残りの分析において使用した。年齢層別化比例ハザードモデルは、2つの年齢グループ内の死亡率と、タンパク質からのカロリーのパーセントの関連性を推定し、その関係が脂肪からのカロリーのパーセント、炭水化物または動物タンパク質からのカロリーのパーセントによって影響を受けたかどうかを検査するために使用した。ハザードモデルは、IGF-1を含むことがタンパク質摂取量および死亡率の間の関連性を変化させたかどうかを決定するためにIGF-1サブサンプルについて再度推定した。最終的に、比例ハザードモデルは、タンパク質およびIGF-1の間の相互作用を検査するために使用し、様々なIGF-1レベルでそれぞれのタンパク質グループについて予測されるハザード比を計算し、タンパク質摂取量がIGF-1のレベルに依存して死亡率に異なって影響を与えるかどうかを決定するために使用した。分析はすべて、サンプルウェイトを使用し、サンプリング設計について説明し、かつ年齢、人種／民族性、教育、性別、疾患状態、喫煙、食事の変化、および全カロリー消費量についてコントロールして実行した。

30

40

【0077】

酵母およびマウスの実験についての材料および方法

コックス比例ハザードモデルを使用して、発明者らは、タンパク質摂取ならびに総死亡率、CVD、または癌死亡率の間の関連性を発見しなかった（表14）。しかしながら、高および中程度タンパク質摂取は、糖尿病関連性の死亡率と正に関連した。1つの説明は、可能性として、糖尿病診断後の、より高度のタンパク質、より低度の脂肪、およびより低度の炭水化物摂取への切り替えのために、糖尿病がこれらのグループにおいてより蔓延

50

しているかもしれないことである。

【0078】

最終的に、高対低タンパク質摂取は、66歳以上の対象についての糖尿病による死の危険性における10倍超の増加に関連することが分かった。しかしながら、高タンパク質グループにおける糖尿病の病歴を有する対象のはるかに高度の罹患率および低タンパク質グループにおける糖尿病の死にかかっている対象が少数であることは、これについて説明するかもしれない、したがって、糖尿病発生率および死亡率に対するタンパク質摂取量の役割を決定するためのさらなる研究の必要性を強調する(HR: 10.64; 95% CI: 1.85~61.31)。

【0079】

補足的な材料および方法

ヒトデータにおけるIGF-I

NHANES IIIにおける対象の半分は、推奨される9時間の絶食後に、午前検査に参加するために無作為に選択された。このサブサンプルのうちで、発明者らの研究に含まれた2,253人の対象は、承諾し、IGF-Iについての絶食血清データを測定した。IGF-Iは、標準的な実験室プロトコルを使用してDiagnostic Systems Laboratories Inc.によって測定し、ng/mlで報告した。

【0080】

ヒトデータにおける可能性のある交絡因子

年齢、人種/民族性、教育、性別、疾患状態、喫煙、食事の変化、および全カロリー消費量は、可能性のある交絡因子として分析に含めた。年齢は、応答者の機密性を保護するために、NHANESによるデータセットにおいて年で報告し、90でトップコーディングした。ダミー変数は、3つの人種/民族性カテゴリー：非ヒスパニックの白人、非ヒスパニックの黒人、およびヒスパニックに対象を分類するために作り、教育は教育期間によって示した。ダミー変数は、自己報告の喫煙状態—1度もない、以前、および現在について作った。対象はまた、「医者が今までにあなたが...を有すると言ったことがあるか」と言葉で表された質問において、疾患の彼らの病歴について報告するように依頼され、癌、心筋梗塞、および糖尿病病歴の存在について3つのダミー変数を作るために使用した。食事摂取における最近の変化は、3つの質問に対する返答を使用して評価した—1)「過去12か月の間に、あなたは減量しようとしたことがありますか」?; 2)「過去12か月の間に、あらゆる医学的理由または健康状態のために食べるものを变化させたことがありますか?; および3) (24時間の食事の回想後に)「昨日摂取した食物を通常のものと比較してください」。脂肪過多の指標としてBMIより好まれるウェスト周囲を、腸骨稜で右半身から始めて0.1cm単位まで測定した。

【0081】

マウスにおける癌モデル

動物実験はすべて、USC's Institutional Animal Care and Use Committeeによって承認された手順に従って実行した。皮下癌マウスモデルを確立するために、発明者らは、18週齢雄C57BL/6マウスならびに10月齢GHRKOマウス、年齢が一致する同腹仔コントロールマウス、および野生型同腹仔にB16メラノーマ細胞をならびに12週齢雌BALB/cに4T1乳癌細胞を注射した。注射の前に、成長の対数期の細胞を採取し、 2×10^5 細胞または 2×10^6 で無血清高グルコースダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM)中に懸濁し、続いて、100ul (C57BL/6またはBALB/cマウス当たり 2×10^4 細胞; GHRKOマウス当たり 2×10^5 細胞)を腰に皮下注射した。マウスはすべて皮下腫瘍注射の前に剪毛した。腫瘍発生率は、注射したエリアの触診によって決定し、腫瘍サイズは、移植の10~15日後に始めてデジタルノギスを使用して測定した。C57BL/6およびBALB/cについての実験は、腫瘍サイズおよび潰瘍についてUSC IACUCにより承認された人道的なエンドポイント基準に基づいて、様々な時点で終了した。GHRKO (

10

20

30

40

50

C57BL/6 背景) マウスは、J. J. Kopchick (Ohio University、Athens) によって善意で提供された。

【0082】

マウスにおけるタンパク質制限

A IN-93G 標準固形飼料は、カゼインベースの高タンパク質基準食として使用し (タンパク質から 18% kcal、低タンパク質食 1, O は、カゼインベースの低タンパク質食 (タンパク質から 4% kcal) (Harlan Laboratories、WI) として使用した。食事制限は等カロリーであり、脂肪または炭水化物からの kcal における変化は、タンパク質からの kcal における変化に応じて行った。毎日の摂取量の測定は、ベースライン摂取量を確立するために実験を始める 1 週間前に始めた。すべての動物に、実験の期間、毎日、食物を供給し、適宜の非カロリー制限の給餌を可能にするために、それらのベースライン摂取量の 50% 超を固形飼料により提供した。腫瘍移植 BALB/c マウスは、タンパク質グループの 2 つの異なる kcal のうちの 1 つに割り当てる前に、1 週間、あらかじめ食物を供給した。これらのマウスの給餌は、上記に記載されるものと同じように、実験の過程を通じて継続した。高齢のマウスに対する低タンパク質の効果を決定するために、24 月齢 C57BL/6 マウスをタンパク質グループの 18% または 4% kcal に置き、上記に記載されるように継続的な食事制限を供給した。体重および摂取量は毎日決定した。動物は、水をいつでも摂取した。

10

【0083】

マウスにおける血清 m I G F - I および m I G F B P - 1 測定

20

マウスは 3% の吸入用のイソフルランにより麻酔をかけ、静脈を拡大するために徐々に温め、血液は、尾静脈から収集し、血清を毎週得た。血清 m I G F - I および m I G F B P - 1 アッセイは、R & D systems (Minneapolis、MN) の組換えマウス I G F - I または I G F B P - 1 タンパク質およびポリクローナル抗体を使用して、インハウスの E L I S A アッセイを使用して以前に記載された (Hwang et al, 2008) ように実行した。

【0084】

マウスデータについての統計分析

グループの間の I G F - I 比較は、スチューデントの t 検定を使用して実行し、I G F B P - 1 グループの比較は、スチューデントの t 検定および A N O V A によって実行し、腫瘍体積進行グループの比較は、Graph Pad Prism v. 6 を使用して、二元配置 A N O V A により実行した。統計分析はすべて両側とし、P 値 < 0.05 は有意と見なした。

30

【0085】

酵母生存および突然変異頻度測定

広く使用される D B Y 7 4 6 酵母株 (M A T α l e u 2 - 3, 1 1 2 h i s 3 - Δ 1 t r p 1 - 2 8 9, u r a 3 - 5 2 G A L +) の細胞は、対応するプラスミドによる形質転換によって、原栄養株にし、1 ml の完全合成培地 (S D C) 上に接種し、200 R P M でオービタルシェーカー上において摂氏 30 度で一晩成長させた。

【0086】

40

次いで、このスターター培養物は、5 : 1 のフラスコ体積対培地体積比で、0.5 ×、1 ×、または 2 × の標準的なアミノ酸濃度 (Hu et al., 2013) を含有する新鮮な合成 S D C 培地上で分割し (1 : 100)、全く同じ条件でインキュベーターに戻した。それぞれの培養物の一定分量を一日おきに採取し、適切な希釈液をリッチな Y P D プレート上で平板培養した。コロニー形成単位 (C. F. U.) は、成長の 2 日後に数えた。生存のパーセンテージは、生存を 100% として 3 日目に C F U を考慮して評価した。実験はすべて三通り行った、また、標準偏差を示す。突然変異頻度計算のために、 10^7 細胞をそれぞれの生存の時点で収集し、水により洗浄し、アルギニンを欠き、60 □ l i q - 1 のカナニン (C a n) を補足した合成完全 (S D C) 培地上で平板培養した。C a n 抵抗性のコロニーは、摂氏 30 度で成長の 2 ~ 3 日後に測定し、 10^6 の生存可能

50

な C F U のうちの C a n 抵抗性のクローンの数として表現した。

【0087】

R a s 2 実験成長条件

酵母の経日的な寿命は、コロニー形成単位 (C F U) を測定することによって期限切れの S D C 培地中で 48 時間ごとにモニターした。1 日目の C F U の数は、初期生存 (100%) であると思われ、年齢依存性の死亡率を決定するために使用した。

【0088】

R a s 2 実験 C a n 1 突然変異頻度測定

自然突然変異頻度は、C A N 1 (Y E L 0 6 3) 遺伝子の突然変異の頻度を測定することによって評価した。手短に言えば、一晚の接種物を液体 S D C 培地中に希釈し、30℃でインキュベートした。細胞の生存能力は、酵母抽出物ペプトンデキストロース (Y P D) 培地プレート上に適切な希釈液を平板培養し、C F U を数えることによって、1 日目に始めて 2 日ごとに測定した。液体培養物においてカナバニン抵抗性突然変異体 (C a n^r) を同定するために、適切な数の細胞 (2×10^7 細胞の出発量) を遠心分離によって採取し、滅菌水により一度洗浄し、選択培地 ($60 \mu\text{g}/\text{ml}$ 1-カナバニン硫酸塩を補足した S D C - A r g) 上で平板培養した。突然変異体コロニーは 3~4 日後に数えた。突然変異頻度は、合計の生存可能な細胞に対する C a n^r の比として表現した。

【0089】

ヒト低タンパク質摂取量研究

ヒト対象は、低タンパク質低カロリーおよび高栄養物の 5 日間の断食を模倣する食事制限 (F M D、緑色で示す、テキストを参照されたい)、その後続くおよそ 3 週間の通常の食事制限 (茶色で示す) の 3 サイクルに参加した (a)。血液は、5 日間の食事制限の前および終了時に (時点 A および B) ならびにまた、3 回目の 5 日間の F M D の終了の 5~8 日後に (時点 C)、採血した。5 日間のダイエットは、血中グルコース (b)、I G F - 1 (c)、および I G F B P - 1 (d) レベルを有意に低下させた。グルコース*、 $p < 0.05$ 、 $N = 18$ ；I G F - 1、**、 $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 、 $N = 16$ ；I G F B P - 1、**、 $p < 0.01$ 、 $N = 17$ ；統計的検定はすべて、もとの値に対して対応のある t 検定、両側として実行した。この研究の結果は図 20 において認められる。

【0090】

化学毒性実験についての材料および方法

2. 1. マウス

動物プロトコールはすべて、University of Southern California の Institutional Animal Care and Use Committee (I A C U C) によって承認された。12~15 週齢の雌 C D - 1、B a l B / C、または C 5 7 B L / 6 N マウス (Charles River) は、実験を通じて病原体なしの環境で維持した。

【0091】

2. 2. 多量栄養素を定めた食事制限

A I N 9 3 G 標準固形飼料 (H a r l a n) は、基準食として使用し、別段の定めのない限り、すべてのマウスに供給した。多量栄養素組成 (脂肪、タンパク質、および炭水化物) を変更した食事制限はすべて、A I N 9 3 G に基づくものとした (図 21 および表 20)。食事制限 20% P - 1 (脂肪供給源としてダイズ油) および 20% P - 2 (脂肪供給源としてヤシ油) は、A I N 9 3 G の配合と比較して、20% に低下させたタンパク質供給源からのカロリーを有した；0% P 食事制限はタンパク質を含有しなかった；これらの食事制限はすべて、A I N 9 3 G 標準固形飼料と等カロリーであった。低炭水化物 L C H P 食は、A I N 9 3 G 配合と比較して 20% に低下させた炭水化物からのカロリーを有した (13% 対 63.9%) が、より多くのタンパク質 (45.2%) および脂肪 (41.8%) を含有した。ケトン産生高脂肪食 60% H F は、脂肪供給源からの摂取カロリーの 60% を供給するように設計し、タンパク質および炭水化物から生じるカロリー

10

20

30

40

50

は、比例して低下させた。90%HF食は、90%の脂肪を含有するケトン食療法とし、最低の炭水化物（1%未満）およびタンパク質含有量の半分（9%）しか供給しない。詳細な食事制限組成およびカロリー含有量は、表S2に要約する。実験グループ（N=5／グループ）にグループ化されたそれらの初期体重に基づいて、実験を始める前に、マウスにAIN93Gコントロール食を供給した。マウスは、実験の前に1週間、試験食に順応させた（調節スケジュールは表22に示す）。別段の定めのない限り、食事制限はすべて適宜供給した。

【0092】

2. 3. カロリー制限（CR）および短期間飢餓（STS）

AIN93G食を使用するカロリー制限のために、標準固形飼料は、砕いて粉末にし、必要量でヒドロゲル（Clear H₂O）中で混合し、AIN93Gの60%、50%、40%、20%、10%カロリー密度を実現した（表23）。カロリー制限多量栄養素変更食は、同様に調製した（表24）。栄養失調を回避するために、食事制限はすべて、AIN93G中のものに一致するビタミン、ミネラル、繊維、および必須脂肪酸を補足した。ベースライン食物摂取量（3.7gまたは14kcal／日）は、実験の前にAIN93Gの給餌により決定した（データ示さず）。短期間の飢餓（STS）レジメンについては、マウスは、60時間までの間、食物を摂取しなかった。

【0093】

すべてのCRおよびSTS実験のために、マウスは、食糞または残存している固形飼料での給餌を回避するために毎日新たにした、標準的な靴箱形のケージに一匹で入れた。動物は、水をいつでも摂取し、十分な水分補給を確実にするためにヒドロゲルを供給した。それぞれの個々の動物の体重は、CRまたはSTSレジメンの間にルーチンの測定した。

【0094】

2. 4. グルコースおよびIGF-1の測定のための血液収集

マウスは2%の吸入用のイソフルランにより麻酔をかけ、血液は左心室の心臓穿刺によって収集した。血液は、血清調製（BD）のためにK²-EDTAによりコーティングしたチューブ中に収集した。血中グルコースは、Precision Xtra血中グルコースモニタリングシステム（Abbott Laboratories）により測定した。IGF-1は、マウス特異的ELISAキット（R&D systems）を使用して測定した。

【0095】

2. 5. 高用量化学療法に対する抵抗性

25～32gの体重の12～15週齢の雌CD-1マウスを60時間までの間、絶食させ（STS）、3日間、多量栄養素変更50%CR食を供給し、その後、24mg/kgドキシソルピシン（DXR、Bedford Laboratories）を静脈内注射した。すべての実験において、マウスに、化学療法薬注射の後にAIN93G標準固形飼料を提供し、毎日モニターした。重度のストレスのサインを示すおよび／または健康状態を悪くしている動物は、瀕死と指定し、安楽死させた。

【0096】

2. 6. 皮下腫瘍モデル

マウス4T1乳癌およびGL26神経膠腫細胞は、5%CO₂下、37℃で、10%ウシ胎児血清（FBS）を補足したDMEM（Invitrogen）中で維持した。対数期成長にある細胞を洗浄し、2×10⁶細胞/mLでPBS中に懸濁し、マウスの背下部領域に皮下注射した（s.c.、100μl PBS中2×10⁵細胞／マウス）。腫瘍サイズはカリパスを使用して測定した。ヒトにおけるマルチサイクル処置を模倣するために、マウスは、それぞれ12、8、および8mg／体重1kgで、腫瘍接種後15、33、および44日目に3回、シスプラチン（Teva Parenteral Medicines Inc.）により静脈内で（i.v.、外側尾静脈）処置した。マウスは毎日、モニターし、重度のストレスのサインを示す、健康状態を悪くしている、または過剰な

10

20

30

40

50

腫瘍の負担（ 2000 mm^3 ）のある動物は、瀕死と指定し、安楽死させた。

【0097】

2. 7. 統計分析

グルコースおよびIGF-1測定におけるグループの間の比較は、Graph Pad Prism v. 5を使用して、ANOVA、その後続くTukeyの多重比較により行った。統計分析はすべて両側とし、 P 値 <0.05 は有意と見なした。

【0098】

3. 結果

3. 1. グルコースおよびIGF-1レベルに対するカロリー制限の効果

短期間の絶食（STS）は、グルコースおよびIGF-1の血清レベルを低下させ、高用量化学療法からの細胞の保護を増加させ、化学療法剤に対して悪性細胞を敏感にする。一旦、動物がおよそ20%の体重を失ったら、グルコースおよびIGF-1に対するSTS効果は、通常実現される。したがって、20%の体重減少は、カロリー制限食のグルコースおよびIGF-1のレベルを60時間のSTSレジメンから得られたものと比較するための基準として使用した。

【0099】

20%体重減少閾値は、90%CRについて4日間、80%CRについて6日間、60%CRについて9日間、または40%CRについて13日間で到達した（図22Aおよび図26A）。20%体重減少を実現する時間は、カロリー制限の厳しさに強く依存する（ $r^2=0.9976$ で直線フィット；図22B）。48時間で、血中グルコースレベルにおける低下は、カロリー制限の厳しさに関連する（ $r^2=0.7931$ で直線フィット；補足図26B）。60時間の絶食レジメン（STS）は、適宜に食物を供給したマウスと比較して、血中グルコースレベルを70%低下させる（図22C、 $P<0.001$ ）。4日間の90%CR措置は、血中グルコースをおよそ40%低下させ、STSよりも有意に低かった（ $P<0.05$ ）。そのうえ、傾向は、CR給餌の長さに依存して血中グルコースを低下させるCRの効果について観察された：13日間の40%CR給餌におけるグルコースレベルは、4日間の長さの90%CRグループよりも有意に低かった（ $P<0.05$ ）。しかしながら、60時間絶食グループよりも低い血中グルコースレベルをもたらしたカロリー制限なしのグループはなかった；また、9日以上CRは、絶食グループにおけるCRの範囲にグルコースを低下させる効果を得るために必要とされた（図22C）。すべての実験CRグループのマウスは、制限の厳しさと無関係に、一旦20%の体重減少の差に到達したら、同様の血清IGF-1レベルに到達し、適宜のコントロールグループのマウスよりも有意に（ $P<0.001$ ）低いIGF-1レベルを有した（図22D）。

【0100】

3. 2. グルコースおよびIGF-1レベルに対する多量栄養素を定めた食事制限の効果

多量栄養素を定めた食事制限のセット（図21および表20）は、特定の食事の構成要素の制限が、血中グルコースおよび／または血清IGF-1に対するSTSまたは短期間のCRの効果を模倣することができるかどうかを決定するために、AIN93Gげっ歯動物固形飼料に基づいて設計した。低タンパク質食20%P-1（脂肪供給源としてダイズ油）および20%P-2（脂肪供給源としてヤシ油）は、もとのAIN93Gの配合と比較して、20%に低下させたタンパク質供給源からのカロリーを有し、炭水化物および脂肪は、AIN93Gに等カロリーの食事制限を維持するために増加させる。0%P食事制限はタンパク質を含有しない；炭水化物および脂肪は、食事制限を標準固形飼料に対して等カロリーに保つために比例して増加させる。LCHP食事制限は、もとのAIN93G配合と比較して、20%に低下させた炭水化物供給源からのカロリーを有するが（13%対63.9%）、より多くのタンパク質および脂肪を供給する。高脂肪ケトン食療法60%HFは、脂肪供給源からの摂取カロリーの60%を供給するように設計し、タンパク質および炭水化物から生じるカロリーは、比例して低下させた。90%HF食は、脂肪からの90%のカロリーを含有するケトン食療法であるが、最低の（1%未満の）炭水

化物しか供給せず、タンパク質からの9%のカロリーを有する。より高度の脂肪の割合のために、LCHP、60%HF、および90%HF食は、AIN93G標準固形飼料と比較して、高度のカロリーの密度を有する。詳細な食事制限組成およびカロリー含有量は、表21に要約する。

【0101】

雌CD-1マウスは、体重プロファイル(図23A、B)を確立し、カロリー摂取量(図23C、D)をモニターするために、9日間連続して実験食を適宜供給した。有意な食物嫌悪は観察されなかったが、タンパク質を欠く食事制限(0%P)を供給したマウスは、6日後に、食物摂取量を完全に低下させることに気づいた(図23C)。カロリー摂取量の低下は、この実験グループにおける動物について体重減少を引き起こした(図23A)。ケトン産生高脂肪グループ(60%HFおよび90%HF)におけるマウスは、摂食の9日間の間に、AIN93G標準固形飼料を供給したマウスよりも多くのカロリーを摂取し(図23D)、ケトン産生90%HF食を適宜供給したマウスは、4~5日後に急速に体重が増えた(図23B)。食事制限20%PおよびLCHPを供給した実験グループにおけるCD-1マウスは、AIN93Gコントロール食を供給したマウスと比較して、カロリー摂取量または体重における差異を示さなかった(図23A、C)。

【0102】

多量栄養素変更食のマウスからの2日目、5日目、および9日目の血中グルコースレベルは、標準固形飼料食のものとは異なっていなかった(図27およびデータ示さず)。対照的に、血清IGF-1レベルは、9日間、ケトン産生60%HF食のマウスにおいて有意に上昇したが($P < 0.05$)、ケトン産生90%HF食を供給したマウスについては上昇しなかった(図23E)。興味深いことに、多量栄養素組成(たとえばタンパク質含有量)だけではなく、脂肪酸供給源もまた、循環IGF-1レベルを異なって調整する: 低タンパク質食20%P-1(唯一の脂肪供給源としてダイズ油を含有する)は、IGF-1レベルを低下させなかったが、低タンパク質食20%P-2(唯一の脂肪供給源としてヤシ油)は、IGF-1レベルを有意に($P < 0.05$)低下させ、脂肪供給源以外にこれらの食事制限において差異はない。血清IGF-1に対する最も顕著な効果は、9日間、タンパク質欠乏食0%Pを供給したマウスにおいてあった。循環IGF-1は、標準固形飼料のマウスにおいてそのおよそ30%に低下した(図23E)。タンパク質欠乏食0%Pは、血清IGF-1レベルの低下が60時間の短期間の絶食に匹敵する唯一の食事制限であった。

【0103】

3. 3. 短期間のカロリー制限および絶食はストレス抵抗性を改善する

マウスでは、血清IGF-1および血中グルコースレベルの低下は、高用量投与化学療法剤によって誘発された毒性に対処する能力を増進する。多量栄養素を定めた食事制限(完全なタンパク質除去を除いて)ではなく、短期間のカロリー制限が、IGF-1およびグルコースレベルを低下させたので、組み合わせのアプローチは、通常の毎日のカロリー摂取量の50%で供給される定められた多量栄養素が欠乏している食事制限が、化学毒性保護の増強をもたらすことができるかどうかを試験するために使用した。20%P食は、食事制限0%Pが、血清IGF-1に対してはるかにより明らかな効果を示したという事実のために、ストレス抵抗性実験に含まなかった。

【0104】

ストレス抵抗性は、ドキソルビシン(DXR、 24 mg/kg 、i.v.)処置の前に3日間、通常のカロリー摂取量の50%に低下したAIN93G標準固形飼料または多量栄養素を定めた食事制限を適宜供給したCD-1マウスにおいて試験した(図24A)。50%カロリー制限グループでは、マウスは、3日後に初期体重の12~15%を失ったのに対して、STSグループでは、マウスは60時間後にそれらの体重の20%を失った。DXR処置後に、AIN93G固形飼料は、すべての動物に適宜提供し、マウスは、化学毒性に誘発された体重減少が始まるまで、体重を回復した(図28A、B)。体重減少は、注射の8日後まですべての実験グループにおいて継続し、その後、多くの動物はゆっ

くり回復した。カロリー制限0%PおよびLCHP食を供給したマウスは、それらの初期体重を完全には回復しなかった(図28A)。動物は、DXR処置の後の骨髄抑制の発症の報告および最下点の日に一致して、注射の9~18日後に化学毒性で死に始めた(図24A)(<http://daily.med.nlm.nih.gov>)。それらがDXR注射の25日後に生きていた場合、マウスは生存者と見なした。DXR注射の3日前にAIN93G食を適宜供給したマウスは、最悪の転帰を示し、25日目までに16%しか生存しなかった(図24A)。適宜食物を供給したマウスとは対照的に、絶食(60時間)マウスの大多数(89%)は、高用量化学療法を切り抜けた。DXRにより処置したコントロールマウスは、運動性の低下、逆立った毛、および丸まった背中の姿勢を含む、毒性のサインを示したのに対して、STSグループのマウスは、処置後にストレスまたは痛みについての目に見えるサインを示さなかった(データ示さず)。DXR注射の前の多量栄養素の変更との50%CRの組み合わせの3日間の給餌は、マウスにおいてストレス抵抗性を改善し、45~55%の生存をもたらした(図24A)。すべての食事制限が保護についての同様の率を実現したので、脂肪または炭水化物含有量が結果に影響を与えたという徴候はなかった。データは、食事制限の脂肪または炭水化物組成ではなく短期間のCRが、絶食によって引き起こされたものほど強力ではない、部分的な化学保護を与えることを示す。50%CR LCHP食を供給したマウスは、おそらくIGF-1に対するこの食事制限の高タンパク含有量の効果のために、他のすべてのCRを供給したグループより動作がより悪くなった。

10

【0105】

20

血中グルコース測定は、カロリー制限変更食の3日間の給餌が、50%CRケトン産生90%HF食を除いて、グルコースレベルを有意に低下させるのに十分ではなかったことを明らかにした(図24B)。ケトン産生グループにおけるグルコースレベルの低下は、ストレス抵抗性を増強するようには思われなかった。STSグループのマウスは、他のすべての実験グループよりも血中グルコースレベルが有意に低かった(図24B)。

【0106】

3. 4. 低タンパク質食はGL26神経腫瘍進行を遅延させるようには思われない

タンパク質が低い食事制限は、癌の危険性を低下させることが示されたが、高カロリー高タンパク質食は、肥満症に関連づけられ、発癌を調整するホルモン、代謝、および炎症性の変化を増進する。神経腫瘍モデルにおける低タンパク質食の効果を試験するために、マウスは、腫瘍が触診可能であった場合、GL26細胞の移植の10日後に、標準固形飼料(カロリーの18.8%はタンパク質からのものである、表1)からタンパク質が低い食事制限(20%P-1、カロリーの3.9%はタンパク質からのものである)に切り替えた(図25A)。低タンパク質食を供給したマウスは、AIN93G食を適宜供給したマウスと区別できなかった腫瘍進行を示した(図25A)。これらの結果は、一旦腫瘍が確立されたら、腫瘍進行が、タンパク質制限によって遅らせることができなかったことを示す。

30

【0107】

3. 5. 短期間の断続的なカロリー制限は、乳癌に対する化学療法の効能を増強しない

様々な癌の処置を補うことにおけるSTSの効能は、2倍である：それは正常細胞/組織に対する化学療法誘発性の毒性から保護し、化学療法剤に対して悪性細胞を敏感にする。それにもかかわらず、短い間隔の絶食でさえ(たとえば4日間)、大多数の人々にとって挑戦となり得、したがって、「より穏やかな」カロリー制限アプローチは、より実現可能な解決策となり得る。短期間の断続的な50%CR(ICR)食が確立された絶食プロトコルとして同様の有益な効果をもたらすことができたどうかを試験するために、マウス4T1乳癌細胞を雌BALB/Cマウスに皮下移植し、腫瘍進行をモニターした。腫瘍移植の12日後に、腫瘍体積を測定し、マウスは、未処置コントロールグループ(AIN93G)、シスプラチン(CDDP)を処置したグループ、またはシスプラチン処置の前に3日間、50%CR(ICR)を断続的に供給したグループに割り当てた。未処置コントロールグループにおける腫瘍は、急速に進行し、腫瘍移植の54日後に2000mm³

40

50

の実験エンドポイント体積に到達した（図 2 5 B、黒丸）。シスプラチン処置の 3 つのサイクルが腫瘍進行を遅延させた；これらのマウスの腫瘍体積は、未処置マウスのサイズのおよそ半分であった（図 2 5 B、青色の正方形）。S T S とは対照的に、シスプラチン注射の前に 3 日間マウスに供給した断続的な 5 0 % カロリー制限 A I N 9 3 G 供給レジメンは、腫瘍の増感をもたらさず、化学療法を補わなかった（図 2 5 B、オレンジ色の三角形）。この実験グループにおける腫瘍体積は、シスプラチンのみにより処置したマウスにおける腫瘍体積と有意に異ならなかった。

【0108】

4. 議論

血中グルコースおよび I G F - 1 レベルにおける主な低下は、動物癌モデルにおける 2 ~ 3 日間の絶食の有益な効果を部分的に担うことが以前に示された。マウスでは、6 0 時間の短期間の絶食は、体重を 2 0 % 以上、血清 I G F - 1 を 7 5 % まで、グルコースを 7 0 % まで低下させる。これらの条件下で、動物は、酵母における結果に一致して非常にストレス抵抗性になり、様々な腫瘍は、化学および放射線療法に対して敏感になる。2 0 % の体重減少がエンドポイントとして用いられた場合、予想される通り、様々な程度の C R レジメンは、連続的により速やかな体重減少だけではなく、I G F - 1 およびグルコースの低下をももたらした。しかしながら、非常に短い S T S レジメンは、C R 食が 9 ~ 1 3 日間、維持された場合でさえ、ほとんどの C R 食よりもグルコースに対してより明らかな効果を有し、等しい 2 0 % の体重減少を引き起こしたこともまた観察された。カロリー制限食のそれほど明らかではない効果は、短期間の絶食と比較した場合に、栄養素が完全に不在である条件に特有である、独特な生理応答によって説明されるかもしれない（L e e and L o n g o, 2 0 1 1）。たとえば、この研究における短期間の絶食によって引き起こされた血中グルコースの減少は、7 0 % であり、6 0 時間以内に生じたのに対して、4 0 % のグルコース低下は、9 6 時間後に 9 0 % C R 食によって引き起こされた。

【0109】

食物が欠乏した場合、哺乳動物は一般に 3 つの代謝期を経験する：1) 主な蓄積エネルギー供給源としてのグリコーゲンの使用を含む、食物摂取後に 1 0 時間以上続く吸収後の段階、2) 一旦肝臓グリコーゲン貯蔵が枯渇したら、糖新生によるアミノ酸依存性グルコースの生成および 3) 残りのグルコースが脳によってほとんど消費され、グリセロールおよび脂肪酸が脂肪組織から放出され、主なエネルギー源になる段階。脂肪由来のケトン体は、数日間の絶食のうちに主な炭素供給源になる。体内で、これらの変化は、ゲノム安定性および細胞ストレス抵抗性を同時に増加させながら、増殖、細胞成長に関与する経路のダウンレギュレーションおよび活性酸素種の生成の低下を含む、細胞の応答を引き起こす。グルコースは、悪性細胞などのような増殖細胞について主なエネルギー源となり、血中グルコースの上昇は、癌の危険性の増加に関連した。多くの癌細胞は、グルコース取込み率が上昇しており、解糖、その後に続くピルビン酸の酸化の代わりに、酸素の存在下でさえ、解糖、その後に続く乳酸発酵に依存し、これはワールブルク効果として知られている現象である（O u d a r d et al, 1 9 9 7 ; W a r b u r g, 1 9 5 6）。正常細胞において、血中グルコースおよび I G F - 1 の低下は、おそらく、栄養素感知経路および細胞周期進行によって負に調節されるストレス抵抗性転写因子の活性化の特異な調節の一因となるであろう。癌細胞では、低グルコースは、その代りに、特に化学療法薬もまた存在する場合、特異的で大きな課題を与える。

【0110】

血中グルコースおよび I G F - 1 に対する部分的な効果に一致して、この開示の結果は、炭水化物またはタンパク質が制限された食事制限だけでなく、5 0 % C R の 7 2 時間は、ストレス抵抗性に対して部分的な効果のみを有することを示す。短期間の断続的な 5 0 % C R レジメンおよびシスプラチン処置の組み合わせは、S T S および化学療法の組み合わせとは対照的に、化学療法の効能の増大が現われなかった。本発明の開示は、3 日間の 5 0 % I C R が、血中グルコースレベルを有意に低下させず、したがって、この間隔内でマウス乳癌細胞によって代謝される炭素供給源の十分な低下を引き起こさないかもしれな

いことを示唆する。3日間供給された、50%食事制限食および多量栄養素を定めた食事制限のどれも、ケトン産生90%HF食を除いて、血中グルコースレベルを低下させず、これは、宿主保護および腫瘍増感を増進することが示された。興味深いことには、ケトン食療法で消費されたカロリーにおける50%の低下は、3日間の摂食の後に血中グルコースレベルにおける30%の低下に至り、これは、おそらく、この食事制限の非常に低い炭水化物含有量（1%未満）による効果である。しかしながら、本開示におけるストレス抵抗性実験は、この低下が生存を改善しなかったことを示す。そのうえ、CR食のいずれかからのマウスのどれも、ここで示された実験において60時間の絶食（STS）によって引き起こされたものに等価な保護を実現しなかった。供給措置を延長した、また、実験グループのサイズがより大きなさらなる研究は、特定の食事制限が、絶食サイクルによって引き起こされたものに近いDSRおよびDSS効果を実現するのに十分であるかもしれないかどうかを理解するのに必要になるであろう。今後の研究はまた、ROS産生、腫瘍進行、およびストレス抵抗性に対する、様々な多量栄養素を定めた食事制限およびCR食の効果を評価することもできるであろう。

10

【0111】

食物タンパク質および結果として生じるアミノ酸含有量は、寿命および健康な加齢に影響を与えるように思われる。タンパク質摂取量の制限は、代謝速度の減少、酸化の損傷の低下、毒素および腫瘍形成性の傷害に対する肝臓抵抗性の増強、前癌病変部および腫瘍の減少を含む、CRの生理学的効果のいくつかを共有する。さらに、CRおよびタンパク質制限の両方は、血清IGF-1レベルを低下させ、IGF-1様のシグナル伝達経路が、線虫、キイロショウジョウバエ、およびマウスなどのような様々なモデル生物においてライフスパンを調節するので、これは、寿命延長に対する一因のうちの1つかもしれない。IGF-1経路は、IGF-1受容体欠損マウスにおける酸化ストレスに対するより大きな抵抗性と一貫して、動物の寿命および酸化ストレスに対する感受性の両方に影響を与えることが示された。フォークヘッドボックスタンパク質O1（FOXO1）、IGF-1/AKTシグナル伝達の下流の標的は、IGF-1/AKTシグナル伝達の非存在下/低下において核に入ることができ、ここで、それは、酸化ストレス抵抗性、寿命、および代謝に関与する幅広い遺伝子を調整することができ、したがって、それは、年齢に関連するストレスおよび疾患発症に対する保護に関与する重要なメカニズムとなる。IGF-1の低下が、高用量化学療法に対するストレス抵抗性の改善および腫瘍増感をもたらすことが以前に示唆された。IGF-1は、それらの増殖速度を増加させて、アポトーシスを阻害することによって、様々な癌細胞に対して強力な腫瘍形成効果を及ぼす。ラパマイシンおよびS6K1によるmTOR阻害を含む、IGF-Rシグナル伝達の下流エフェクターにおいて欠損を有するマウスにおける研究は、腫瘍成長を同時に低下させながら、ライフスパンおよびストレス抵抗性を調節する際の、IGF-1の下流の細胞内分裂促進的経路の中心的な役割を実証する。そのうえ、成長ホルモン受容体欠損を有するヒトは、有意により低い循環IGF-1レベルを有し、また、癌および糖尿病の発生率の大幅な低下をも示し、これは、インタクトな成長ホルモン受容体を有する年齢が一致する親類の間でより共通している。

20

30

【0112】

カロリー制限低炭水化物食（LCHP）を供給したグループにおけるマウスは、コントロールグループにおけるマウスに匹敵する、すべてのCRグループのうちで最悪の生存を有した。給餌の3日間の間に、このグループにおけるマウスが同様のまたはより高度の量の脂肪由来のカロリー（50%CR LCHPにおける20.9%対17.2%適宜AIN93G）およびより重要なことには、タンパク質由来のカロリー（50%CR LCHPにおける22.6%対18.8%適宜AIN93G）を摂取したという事実は、保護のこの欠如について説明するかもしれない。ストレス抵抗性の誘発に対して示された結果は、比較的短い（72時間）給餌期間に基づくことは注目すべきであり、したがって、変更したカロリーおよび/または多量栄養素制限によるより長いCRレジメンがストレス抵抗性の改善をもたらすことができ得ることは除外することができない。

40

50

【0113】

ケトン食療法は、子供における難治性てんかんの処置において広範囲に使用されるが、癌治療においても研究されてきた。このアプローチが発明者らのストレス抵抗性および潜在的腫瘍増感実験とどのように匹敵するかを決めるために、2つのケトン食療法を設計した：発明者らの90%HF食（90%：1%：9%の脂肪：炭水化物：タンパク質のカロリー比%；図21）は、それぞれ90%：1.4%：8.6%の脂肪：炭水化物：タンパク質の比を有する古典的ケトン食療法とほとんど同一である（±0.5%の変化）（図29）。高脂肪食60%HF（60%：31%：9%の脂肪：炭水化物：タンパク質のカロリー比%）は、変更したアトキンスダイエットにおいて使用される脂肪の比と同様の脂肪の比を含有したが（60%：5%：35%の脂肪：炭水化物：タンパク質のカロリー比%；図29）、以前の研究が、炭水化物ではなくタンパク質が、ヒトにおけるIGF-1レベルを調節することを確立したので、タンパク質含有量を低下させた。ここで記載される結果は、9日間連続して両方のケトン食療法を供給した後に、グルコースもIGF-1レベルも有意に低下しなかったことを実証する。

10

【0114】

癌処置における飽和对不飽和脂肪酸および中鎖対長鎖脂肪酸の効果を評価するために、脂肪供給源としてダイズ油またはヤシ油を有するコントロール食事制限と等カロリーであったが、低タンパク質含有量を有した2つの食事制限を設計した。長鎖不飽和脂肪酸は、最も一般に使用される食物性脂肪およびダイズ油などのような植物油において見つけられるが、短鎖および中鎖飽和脂肪酸（たとえばラウリン酸およびミリスチン酸）が、パームナッツ油およびヤシ油において比較的高度に豊富に見つけられる。中鎖トリグリセリド（MCT）は、胃腸管において容易に加水分解することができ、肝細胞へ門脈静脈系を通して輸送することができ、ほとんどの長鎖脂肪酸は、リンパ系においてカイロミクロンとして輸送され、肝臓においてトリグリセリドの中にパッケージされる。MCTは、ミトコンドリアβ-酸化に容易に供給することができ、LCTは、肝細胞中のミトコンドリア基質を入れるために、カルニチンなどのような輸送体に依存する。ヒトの研究からのデータは、MCTの摂取またはより高度な不飽和～飽和脂肪酸比を有する食事制限が、血中グルコースの減少に関連し、脂質プロファイルを改善し、肥満症を低下させたことを示した。腹部肥満症を有する女性における生化学的および人体計測的プロファイルの研究において、ヤシ油による食事補給は、腹部肥満症における低下を増進した。

20

30

【0115】

CRの延長の有益な効果は、現在、1世紀以上の間知られている。CRを臨床的な用途に移すことに関連する問題は、長期的なCRが、多くの悪性疾患の進行を遅延させるが、止めず、悪液質癌患者または悪液質になる危険性にある患者にとって不利益かもしれないというだけでなく、また、特に高齢の患者において虚弱を増加させ得る、脂肪および他の貯蔵物を長期にわたって低下させるかもしれない、長期にわたる低下した体重状態に関連することである。実際、CRの延長は、創傷治癒および免疫機能を遅延させ得、これは、化学療法を受けているまたは手術を受けている患者の大多数に対してさらなる障害を与えるかもしれない。さらに、マウスおよびヒトにおける2～5日間の絶食によって引き起こされた血清IGF-1における75%の低下は、タンパク質摂取量もまた制限されない限り、ヒトにおけるIGF-1レベルを低下させない、より中程度のCRによって実現することができない。タンパク質制限と組み合わせた場合でさえ、長期にわたるCRは、ヒトにおけるIGF-1の30%の低下を引き起こすだけである。長期にわたる低体重を伴わない、グルコースおよびIGF-1に対する一貫した効果ならびに正常細胞の保護および癌細胞の増感に対する結果として生ずる効果のために、定期的な絶食サイクルは、多くの腫瘍の処置においてそれらの効能を増大しながら、様々な化学療法薬により処置した患者を保護する最も高い可能性を有すると思われる。

40

【0116】

例証的な実施形態が上記に記載されたが、これらの実施形態が本発明のすべての形態を記載することは意図されない。正確に言うと、本明細書において使用される語は、限定で

50

はなく説明のための語であり、様々な変化が本発明の精神および範囲から逸脱することなくなされてもよいことが理解される。そのうえ、様々な実行するための実施例の特徴は、本発明のさらなる実施例を形成するために組み合わせられてもよい。

【図 1】

体重	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	Δ5日 ¹	Δ5日 ²
	kcal/日						
≥200 lbs	1170	828	768	810	833	-5591	-9591
151-200 lbs	1134	790	737	774	795	-5772	-7772
≤150 lbs	1098	751	706	738	756	-5952	-5952
	kcal/lb						
250 lbs	4.7	3.3	3.1	3.2	3.3		
200 lbs	5.7	3.9	3.7	3.9	4.0		
150 lbs	7.3	5.0	4.7	4.9	5.0		
	kcal/kg						
113 kg	10.3	7.3	6.8	7.1	7.3		
91 kg	12.5	8.7	8.1	8.5	8.8		
68 kg	16.1	11.0	10.4	10.8	11.1		

¹1日当たり2,000カロリーの食事制限に基づく
²それぞれ200、150〜200、および≤150lbの人の重量について2,800、2,400、および2,000カロリーの食事制限に基づく
表9. 断食を模倣する食事制限(FMD)、Probiotic、栄養物を最大限にしながら絶食様の応答を誘発するために、L-Nutrolによって開発された

【図 2】

図1

	1日目	2、3、4、5日目
全カロリー	1152	809
脂肪	56%	46%
炭水化物	34%	46%
糖	10%	9%
タンパク質	10%	9%

表10. 平均180〜200lbの人に基づく5日のFMDレジメンのそれぞれの日に
ついでの多量栄養素含有量

図2

【図 3】

	単位	1日目	% DV*	2、3、4、5日目	% DV*	平均% DV*
タンパク質	g	29		18		
脂肪	g	72		41		
炭水化物(差し引き)	g	98		91		
糖由来	g	29		17.6		
食物繊維	g	22	86%	14	56%	62%
カルシウム	mg	604	60%	426	43%	46%
鉄	mg	13	77%	10	55%	60%
マグネシウム	mg	387	97%	230	58%	65%
リン	mg	390	39%	276	28%	30%
カリウム(K)	mg	2519	72%	1795	51%	55%
ナトリウム(Na)	mg	2427	101%	1750	73%	79%
亜鉛	mg	7	46%	4.2	28%	32%
銅	mg	1.5	76%	1.2	59%	63%
マンガン	mg	3	148%	1.9	95%	105%
セレン	mcg	7	10%	5.3	8%	8%
Vit A	IU	39254	785%	27549	551%	598%
Vit C	mg	236	393%	137	229%	261%
Vit B1 チアミン	mg	4	209%	2.2	113%	132%
Vit B2 リボフラビンB2	mg	3.8	191%	2	109%	126%
Vit B3 ナイアシン	mg	28.5	143%	18	92%	102%
Vit B5 パントテン酸	mg	1.2	12%	1.0	10%	10%
Vit B6 ピリドキサルリン酸	mg	4.0	200%	2.2	111%	129%
Vit B9 葉酸	mg	479	120%	317	79%	87%
B12 コバラミン	mcg	16	227%	16	227%	227%
Vit D	IU	952	238%	952	238%	238%
Vit E	mcg	25	127%	16	80%	89%
Vit K	mg	1795	2243%	1110	1387%	1559%

表11. 平均180~200lbの人に基づく5日のFMDレジメンのそれぞれの日についての微量栄養素含有量

図3

【図 4】

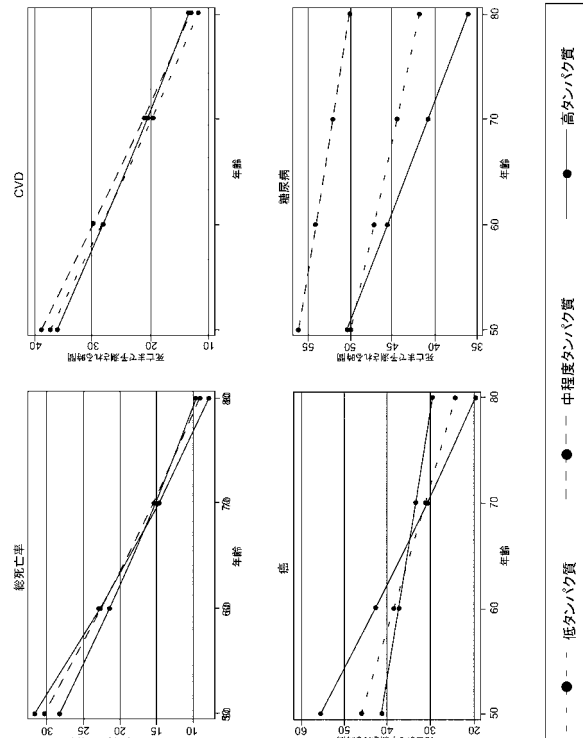


図4

【図 5】

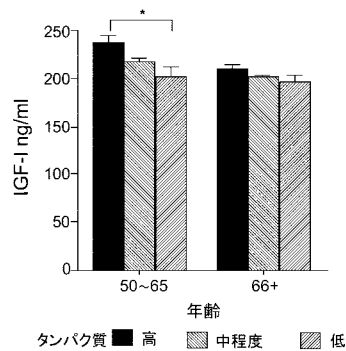


図5

【図 6 A - B】

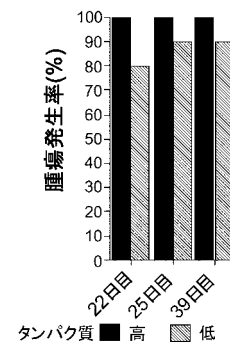


図6A

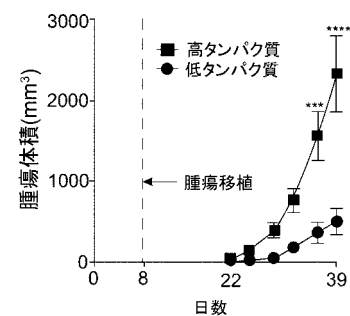
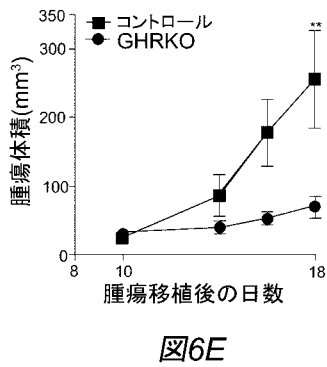
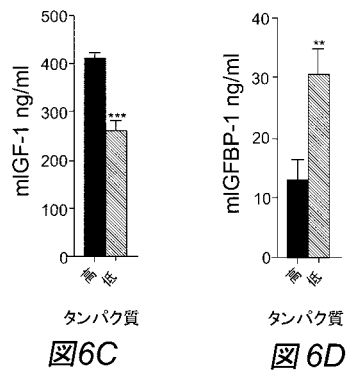
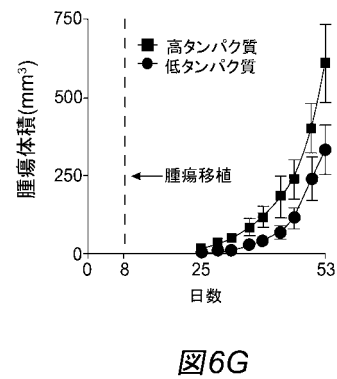
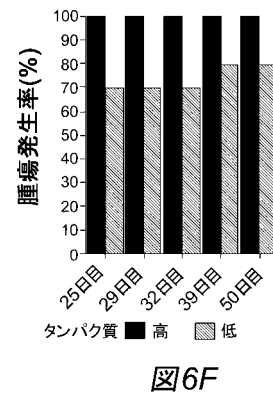


図6B

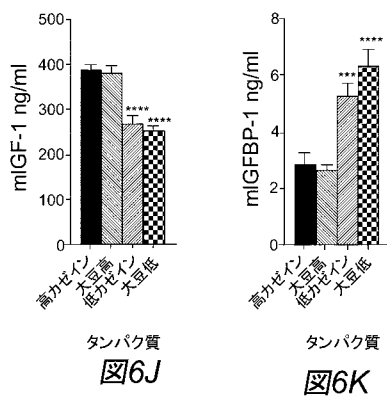
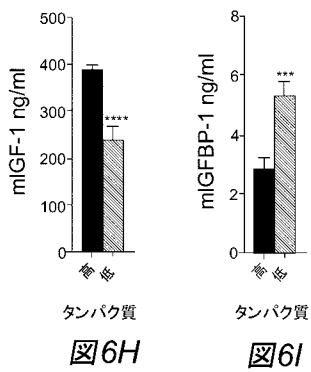
【図 6 C - E】



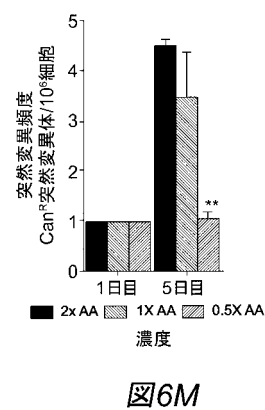
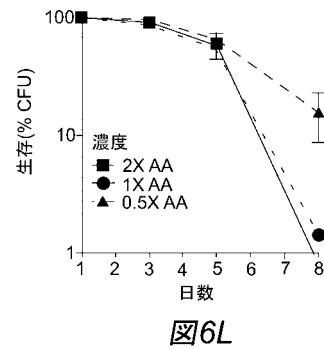
【図 6 F - G】



【図 6 H - K】



【図 6 L - M】



【図 6 N - O】

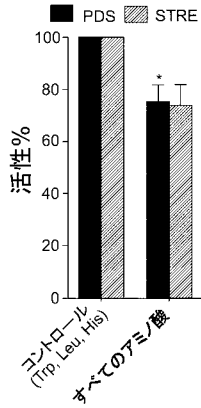


図6N

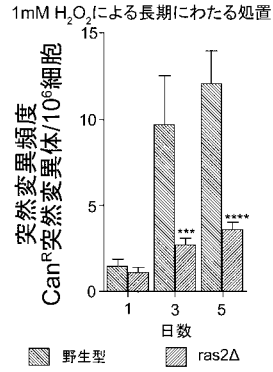


図6O

【図 6 P】

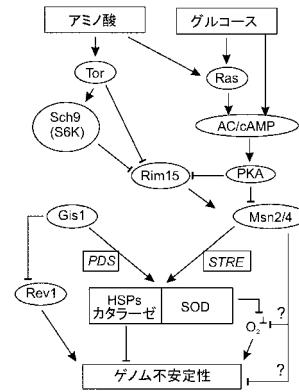


図6P

【図 7 A - B】

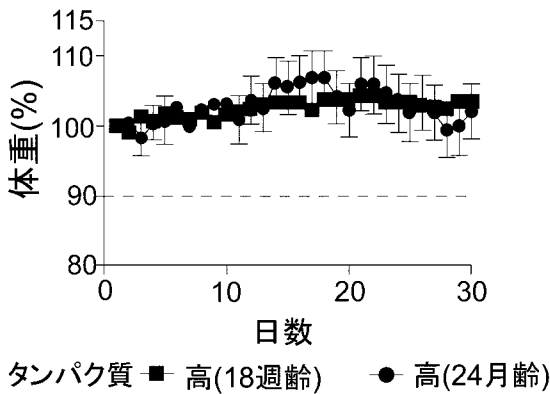


図7A

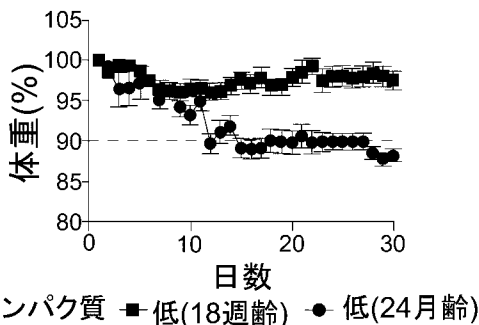


図7B

【図 8】

表12: 死亡率およびタンパク質摂取量の間の関連

	ハザード比 (95% CI)							
	50~65歳 (N=3,039)				66+歳 (N=3,342)			
	モデル1	モデル2	モデル3	モデル4	モデル1	モデル2	モデル3	モデル4
総死亡率								
中程度タンパク質 (n=4,795)	1.34 (0.81~2.22)	1.37 (0.82~2.27)	1.35 (0.80~2.29)	1.15 (0.67~1.95)	0.79 (0.62~0.99)	0.79 (0.62~0.99)	0.79 (0.62~0.99)	0.79 (0.61~1.01)
高タンパク質 (n=1,146)	1.74 (1.02~2.97)	1.77 (1.03~3.03)	1.74 (0.99~3.05)	1.18 (0.60~2.31)	0.72 (0.55~0.94)	0.73 (0.56~0.95)	0.72 (0.55~0.94)	0.72 (0.50~1.02)
脂肪 kcal %	0.99 (0.98~1.01)	1.56 (0.99~1.01)	1.03 (1.00~1.06)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)
炭水化物 kcal %	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)
動物タンパク質 kcal %	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)
CVD死亡率								
中程度タンパク質 (n=4,795)	0.76 (0.40~1.54)	0.83 (0.43~1.60)	0.81 (0.41~1.62)	0.61 (0.28~1.29)	0.80 (0.57~1.12)	0.80 (0.57~1.12)	0.80 (0.57~1.12)	0.80 (0.56~1.14)
高タンパク質 (n=1,146)	1.03 (0.51~2.09)	1.08 (0.54~2.15)	1.10 (0.52~2.31)	0.55 (0.19~1.62)	0.78 (0.54~1.14)	0.79 (0.54~1.15)	0.78 (0.53~1.15)	0.77 (0.42~1.25)
脂肪 kcal %	0.99 (0.97~1.01)	1.00 (0.97~1.01)	1.00 (0.97~1.01)	1.00 (0.97~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)
炭水化物 kcal %	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)
動物タンパク質 kcal %	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)
癌死亡率								
中程度タンパク質 (n=4,795)	3.06 (1.49~6.28)	3.13 (1.52~6.44)	3.26 (1.55~7.05)	2.71 (1.24~5.91)	0.67 (0.43~1.06)	0.67 (0.43~1.06)	0.67 (0.42~1.05)	0.66 (0.41~1.07)
高タンパク質 (n=1,146)	4.33 (1.96~9.96)	4.42 (2.01~9.74)	4.58 (2.13~11.66)	3.19 (1.21~8.35)	0.40 (0.23~0.71)	0.41 (0.23~0.71)	0.39 (0.22~0.69)	0.39 (0.17~0.82)
脂肪 kcal %	0.99 (0.98~1.01)	1.00 (0.98~1.01)	1.00 (0.98~1.01)	1.00 (0.98~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)
炭水化物 kcal %	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)
動物タンパク質 kcal %	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)
糖尿病死亡率								
中程度タンパク質 (n=4,795)	3.43 (0.69~17.02)	3.36 (0.67~16.96)	3.41 (0.67~17.35)	2.99 (0.58~15.31)	5.38 (0.95~30.49)	5.05 (0.93~27.34)	4.93 (0.85~27.35)	6.20 (0.35~107.01)
高タンパク質 (n=1,146)	3.93 (0.73~21.07)	3.88 (0.71~21.17)	3.90 (0.67~22.84)	2.77 (0.24~31.73)	10.64 (1.85~61.31)	10.42 (1.88~57.87)	9.87 (1.49~55.30)	15.16 (1.95~118.9)
脂肪 kcal %	1.01 (0.97~1.05)	1.00 (0.97~1.05)	1.00 (0.97~1.05)	1.00 (0.97~1.05)	1.00 (0.97~1.05)	1.00 (0.97~1.05)	1.00 (0.97~1.05)	1.00 (0.97~1.05)
炭水化物 kcal %	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)
動物タンパク質 kcal %	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)	1.00 (0.99~1.01)

基準=低タンパク質 (n=437, 両方の年齢グループにおいて)

モデル1: (ベースライン) モデル2: 年齢、性別、人種/民族、教育、ウエスト周囲、

喫煙、慢性症状 (糖尿病、癌、MI)、昨年減量しようとした、昨年食事制限を減量

させた、典型的な食事制限を代表する報告された摂取量、総カロリーについて

調節

モデル2: 共変数 (covariate) および総脂質からの kcal % について調節

モデル3: 共変数および全炭水化物からの kcal % について調節

モデル4: 共変数および動物タンパク質からの kcal % について調節

図8

【図 9 A】

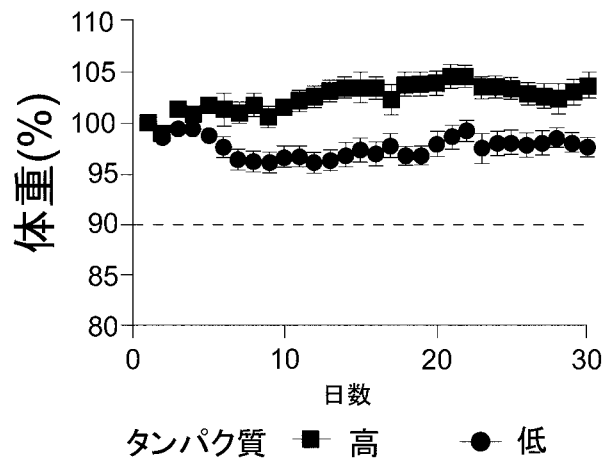


図9A

【図 9 B】

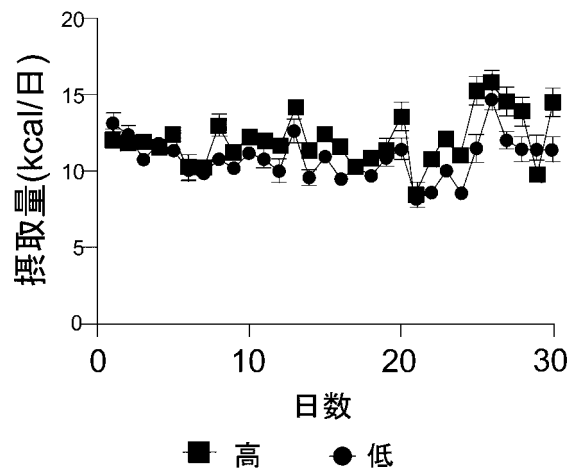


図9B

【図 9 C - D】

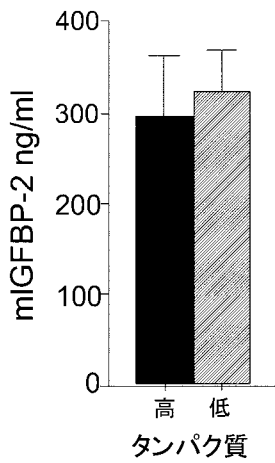


図9C

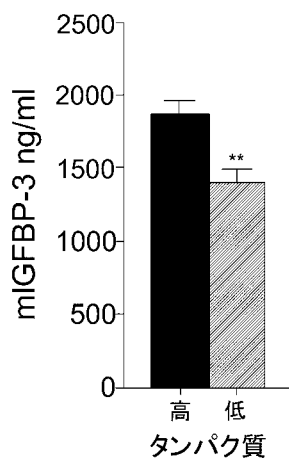


図9D

【図 9 E】

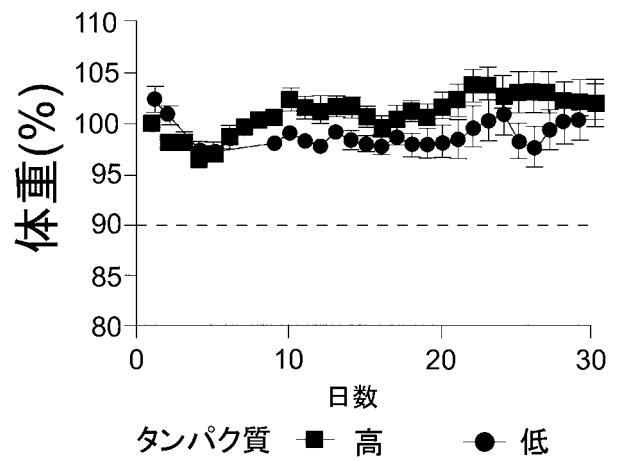


図9E

【図 9 F】

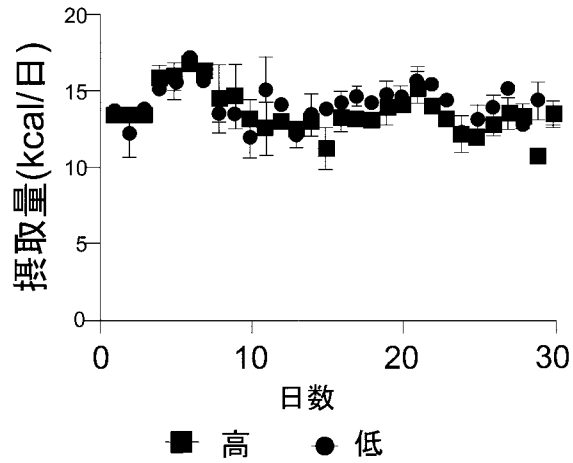


図9F

【図 9 G】

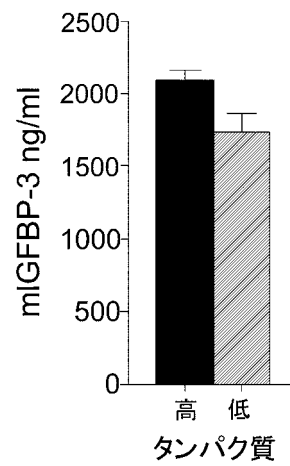


図9G

【図 1 0】

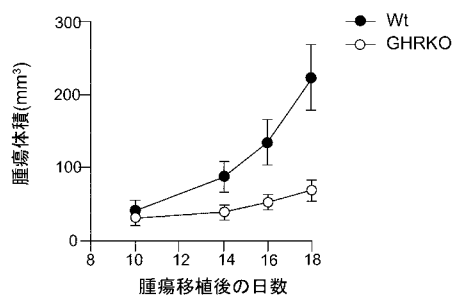


図10

【図 1 1 A - B】

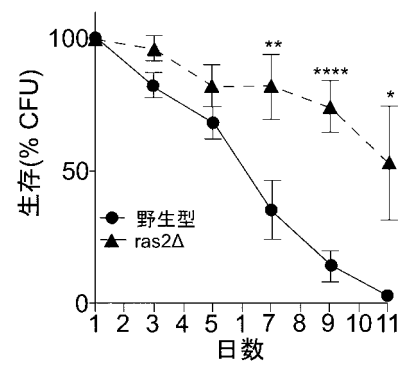


図11A

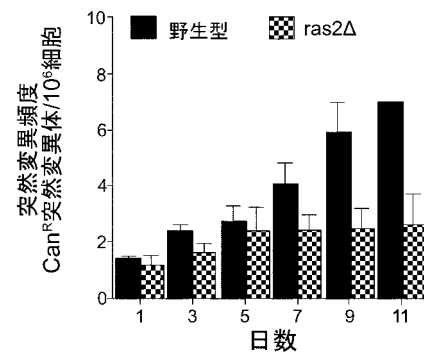


図11B

【図 1 1 C】

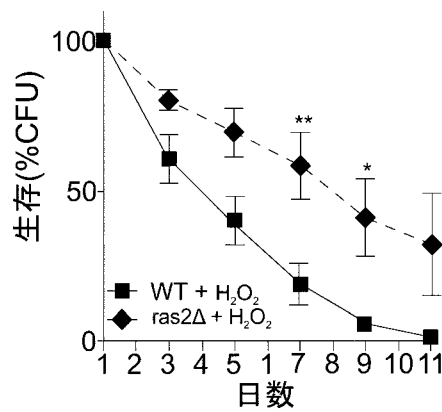


図11C

【図 1 1 D】

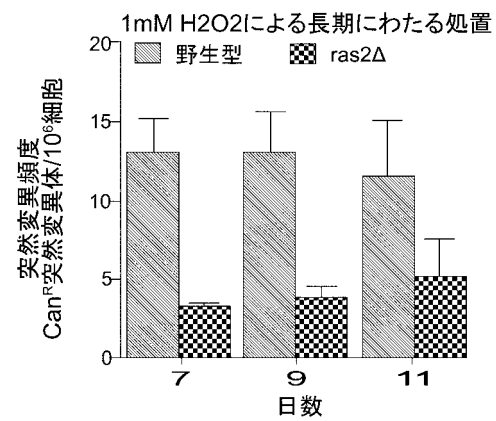


図11D

【図 1 2】

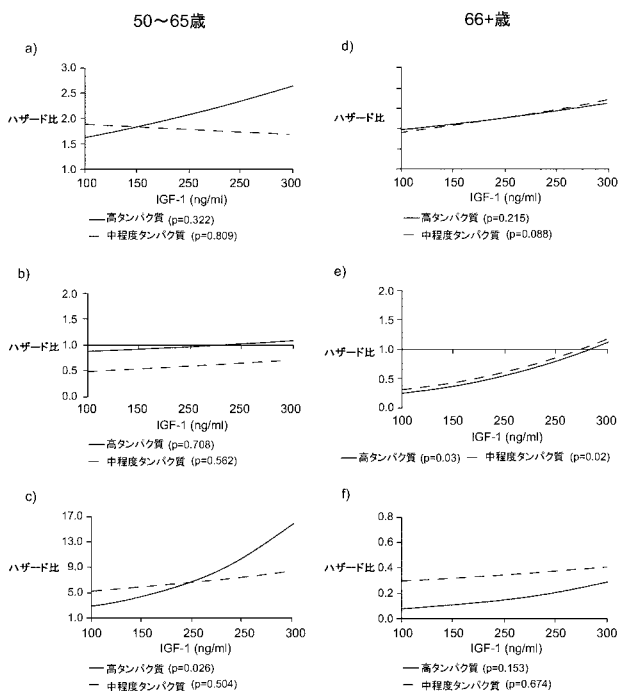


図12

【図 1 3】

表13: サンプル特徴	全サンプル (N=6,381)	低タンパク質 (N=437)	中程度タンパク質 (N=4,798)	高タンパク質 (N=1,146)
年齢	64.8 (10.0)	65.3 (10.1)	64.8 (10.0)	64.5 (9.8)
女性	55.4	56.3	55.0	57.0
白人	85.1	81.6	86.5	80.3
黒人	8.7	12.3	7.9	10.9
ヒスパニック	6.2	6.1	5.6	8.8
教育	11.5 (3.6)	11.1 (3.3)	11.6 (3.5)	11.0 (3.8)
ウエスト周長(cm)	96.9 (13.2)	96.5 (13.5)	96.8 (13.2)	97.5 (13.0)
現在喫煙者	19.1	21.8	19.1	18.2
喫煙経験者	38.0	39.8	37.9	37.8
MIの病歴	9.1	7.9	8.9	10.2
癌の病歴	7.3	11.7	7.5	5.0
糖尿病の病歴	10.9	2.6	10.3	17.0
減量しようとした	38.2	37.5	37.0	43.9
食事制限を変化させた(健康上の理由)	23.1	15.0	22.4	29.3
動物タンパク質からのkcal %	10.6 (5.1)	4.1 (1.8)	9.5 (3.1)	18.3 (4.9)
タンパク質からのkcal %	16.0 (4.8)	8.5 (1.4)	14.9 (2.6)	23.7 (4.1)
脂肪からのkcal %	33.0 (9.6)	31.9 (11.2)	33.6 (9.3)	31.0 (10.2)
炭水化物からのkcal %	50.7 (11.6)	56.6 (13.5)	51.3 (11.0)	45.4 (11.4)
総カロリー	1,822.9 (832.2)	1965.6 (1072.8)	1862.5 (807.4)	1593.6 (796.2)
24時間の回想 多い	1.6	1.8	1.4	2.1
24時間の回想 普通	93.3	83.0	93.9	94.6
24時間の回想 少ない	5.1	15.2	4.7	3.3
死亡(全死因)	40.4	42.9	39.6	42.9
死亡(CVD)	18.7	21.3	18.0	20.7
死亡(癌)	9.9	9.8	10.1	9.0
死亡(糖尿病)	1.0	0.2	0.9	2.0
人年	83,308	5,183	63,661	14,464

BMI: ボディマス指数; MI: 心筋梗塞; 24時間の回想(多い/普通/少ない); 24時間の回想の間に報告された食物は、対象の通常の食事制限(よりも多い/と同じ/よりも少ない); CVD: 心臓血管系疾患

図13

【図 14】

表14:タンパク質摂取量および死亡率の間の関連性(N=6,381)

タンパク質 (g, kcal)	ハザード比 (95% CI)			
	総死亡率	CVD死亡率	癌死亡率	糖尿病死亡率
基準	基準	基準	基準	基準
<10 (m=474)	0.96 (0.74~1.11)	0.82 (0.61~1.11)	0.98 (0.66~1.46)	1.27 (1.02~10.20)
10-19 (m=1,809)	0.93 (0.74~1.19)	0.88 (0.63~1.22)	0.89 (0.58~1.44)	1.51 (1.09~17.99)

研究対象: 性別、人種/民族性、教育、ウエスト周囲、喫煙、慢性症状(糖尿病、癌、MI)、昨年減量しようとした、昨年食事制限を変化させた、典型的な食事制限を代表する報告された摂取量、総カロリー

図14

【図 15】

表15: 死亡率およびタンパク質摂取量の間の関連性に対するIGF-Iの影響(N=2,253)

総死亡率	ハザード比 (95% CI)			
	50~65歳(N=1,125)		66+歳(N=1,128)	
	モデル1	モデル2	モデル1	モデル2
低タンパク質	基準	基準	基準	基準
中程度タンパク質	1.73 (0.91~3.30)	1.69 (1.90~3.20)	0.62 (0.41~0.94)	0.52 (0.40~0.94)
高タンパク質	2.83 (1.39~5.76)	2.71 (1.34~5.47)	0.59 (0.36~0.95)	0.59 (0.37~0.95)
IGF-I (10 ng/ml)		1.01 (0.99~1.04)		1.00 (0.98~1.01)
CVD死亡率				
低タンパク質	基準	基準	基準	基準
中程度タンパク質	0.76 (0.33~1.74)	0.71 (0.33~1.54)	0.77 (0.43~1.38)	0.77 (0.43~1.37)
高タンパク質	1.29 (0.49~3.40)	1.03 (0.39~2.75)	0.69 (0.36~1.34)	0.70 (0.36~1.35)
IGF-I (10 ng/ml)		1.04 (1.01~1.07)		0.99 (0.97~1.00)
癌死亡率				
低タンパク質	基準	基準	基準	基準
中程度タンパク質	0.91 (1.56~30.68)	0.91 (1.56~30.72)	0.41 (0.18~0.92)	0.39 (0.18~0.86)
高タンパク質	13.05 (2.77~61.40)	13.09 (2.80~61.13)	0.24 (0.08~0.68)	0.23 (0.08~0.67)
IGF-I (10 ng/ml)		1.00 (0.96~1.03)		0.97 (0.94~0.99)

モデル1:(ベースラインモデル)年齢、性別、人種/民族性、教育、ウエスト周囲、喫煙、慢性症状(糖尿病、癌、MI)、昨年減量しようとした、昨年食事制限を変化させた、典型的な食事制限を代表する報告された摂取量、総カロリーについて調節

モデル2:共変数およびIGF-Iについて調節

図15

【図 16】

表16: 死亡率に対するタンパク質およびIGF-Iの間の相互作用についてのハザード比

	50~65歳		66+歳	
	ハザード比	P値	ハザード比	P値
全死因				
中程度	2.03	0.349	0.27	0.008
高	1.30	0.722	0.30	0.040
IGF-I	1.01	0.738	0.97	0.077
中程度タンパク質×IGF-I	0.99	0.899	1.03	0.088
高タンパク質×IGF-I	1.02	0.322	1.03	0.215
CVD				
中程度	0.59	0.379	0.16	0.008
高	0.77	0.802	0.13	0.020
IGF-I	1.02	0.520	0.93	0.007
中程度タンパク質×IGF-I	1.02	0.562	1.07	0.020
高タンパク質×IGF-I	1.01	0.798	1.07	0.031
癌				
中程度	4.08	0.264	0.25	0.201
高	1.27	0.858	0.04	0.018
IGF-I	0.96	0.194	0.96	0.243
中程度タンパク質×IGF-I	1.02	0.504	1.02	0.674
高タンパク質×IGF-I	1.09	0.036	1.06	0.153

すべてのモデルは、年齢、性別、人種/民族性、教育、ウエスト周囲、喫煙、慢性症状(糖尿病、癌、MI)、昨年減量しようとした、昨年食事制限を変化させた、典型的な食事制限を代表する報告された摂取量、総カロリーを含んだ。

図16

【図 17】

表17: 死亡率およびタンパク質摂取量の間の関連性に対する動物および植物性タンパク質の影響

総死亡率	ハザード比 (95% CI)					
	50~65歳(N=3,039)			66+歳(N=3,342)		
	モデル1	モデル4	モデル5	モデル1	モデル4	モデル5
中程度タンパク質	1.34	1.15	1.33	0.79	0.79	0.80
(0.81~2.22)	(0.67~1.96)	(0.80~2.21)	(0.62~0.99)	(0.61~1.01)	(0.63~1.01)	(0.63~1.01)
高タンパク質	1.74	1.18	1.73	0.72	0.72	0.73
(1.02~2.97)	(0.60~2.31)	(0.86~2.96)	(0.55~0.94)	(0.50~1.02)	(0.56~0.96)	(0.56~0.96)
動物タンパク質 kcal %		1.03			1.00	
		(1.00~1.06)			(0.98~1.02)	
植物性タンパク質 kcal %			1.01			0.98
			(0.96~1.06)			(0.95~1.01)
CVD死亡率						
中程度タンパク質	0.79	0.64	0.77	0.89	0.80	0.82
(0.40~1.54)	(0.26~1.29)	(0.40~1.51)	(0.57~1.12)	(0.56~1.14)	(0.58~1.14)	(0.58~1.14)
高タンパク質	1.03	0.55	1.02	0.75	0.73	0.74
(0.51~2.09)	(0.19~1.62)	(0.50~2.06)	(0.54~1.14)	(0.48~1.25)	(0.54~1.16)	(0.54~1.16)
動物タンパク質 kcal %		1.04			1.00	
		(0.98~1.11)			(0.98~1.02)	
植物性タンパク質 kcal %			1.03			0.98
			(0.96~1.10)			(0.94~1.02)
癌死亡率						
中程度タンパク質	3.06	2.71	3.03	0.67	0.66	0.68
(1.49~6.25)	(1.24~5.91)	(1.49~6.19)	(0.43~1.06)	(0.40~1.07)	(0.43~1.09)	(0.43~1.09)
高タンパク質	3.33	3.19	4.30	0.40	0.38	0.41
(1.86~9.56)	(1.21~6.35)	(1.93~9.59)	(0.23~0.71)	(0.17~0.62)	(0.23~0.72)	(0.23~0.72)
動物タンパク質 kcal %		1.02			1.00	
		(0.97~1.07)			(0.97~1.04)	
植物性タンパク質 kcal %			1.01			0.99
			(0.91~1.12)			(0.92~1.06)
糖尿病死亡率						
中程度タンパク質	3.43	2.99	3.64	5.38	6.20	5.50
(0.89~)	(0.58~)	(0.76~)	(0.98~)	(0.35~)	(0.96~31.50)	(0.96~31.50)
高タンパク質	17.02	15.31	17.55	30.49	37.01	
3.93	2.77	3.97	10.64	15.16	10.71	
(0.73~)	(0.24~)	(0.75~)	(1.85~)	(1.93~)	(1.87~61.28)	(1.87~61.28)
動物タンパク質 kcal %	21.07	31.73	21.11	61.31	118.9	
		1.02			0.98	
		(0.92~1.14)			(0.90~1.06)	
植物性タンパク質 kcal %			0.90			0.98
			(0.75~1.07)			(0.84~1.14)

モデル1:(ベースラインモデル)年齢、性別、人種/民族性、教育、ウエスト周囲、喫煙、慢性症状(糖尿病、癌、MI)、昨年減量しようとした、昨年食事制限を変化させた、典型的な食事制限を代表する報告された摂取量、総カロリーについて調節。

モデル4:共変数および動物タンパク質からのkcal %について調節

モデル5:共変数および植物性タンパク質からのkcal %について調節

基準=低タンパク質

50~65歳:低タンパク質(N=219)、中程度タンパク質(N=2,277)、高タンパク質(N=643)

66+歳:低タンパク質(N=218)、中程度タンパク質(N=2,521)、高タンパク質(N=603)

図17

【図 18】

表18:年齢およびタンパク質摂取量による、平均HbA1c、糖尿病罹患率、および平均BMIの調整

	HbA1c	糖尿病 (%)	BMI
50~65歳			
低タンパク質摂取量	5.52	2.8	27.65
中程度タンパク質摂取量	5.65	9.8	27.93
高タンパク質摂取量	5.90	10.7	27.98
P値	<.001	<.001	.834
66+歳			
低タンパク質摂取量	5.52	5.4	26.19
中程度タンパク質摂取量	5.81	11.6	26.70
高タンパク質摂取量	6.03	20.4	26.50
P値	<.001	<.001	.401

年齢、性別、人種/民族性、教育、喫煙、疾患、総カロリー摂取量、およびダイエットをコントロールするモデルから推定

【図 19】

表19:ベースライン時に糖尿病を有していなかった参加者の間の糖尿病死亡率およびタンパク質摂取量の間の関連性

	ハザード比(95%信頼区間)
高タンパク質 (n=930)	73.52 (4.47~1209.7)
中程度タンパク質 (n=4,441)	22.93 (1.31~400.7)

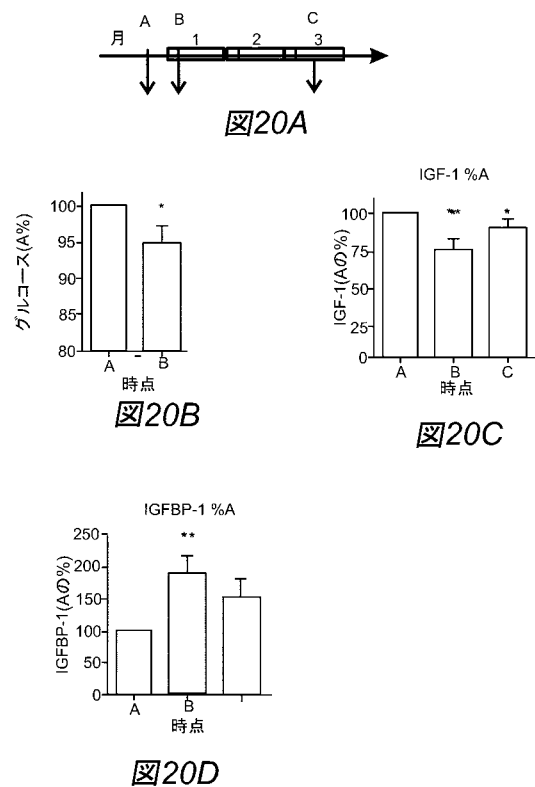
基準=低タンパク質(n=449, 両方の年齢グループにおいて)

コックス比例ハザードモデル:年齢、性別、人種/民族性、教育、ウエスト周囲、喫煙、その他の慢性症状(癌、MI)、昨年減量しようとした、昨年食事制限を度化させた、典型的な食事制限を代表する報告された摂取量、総カロリーについて調整。

図19

図18

【図 20 A-D】



【図 21】

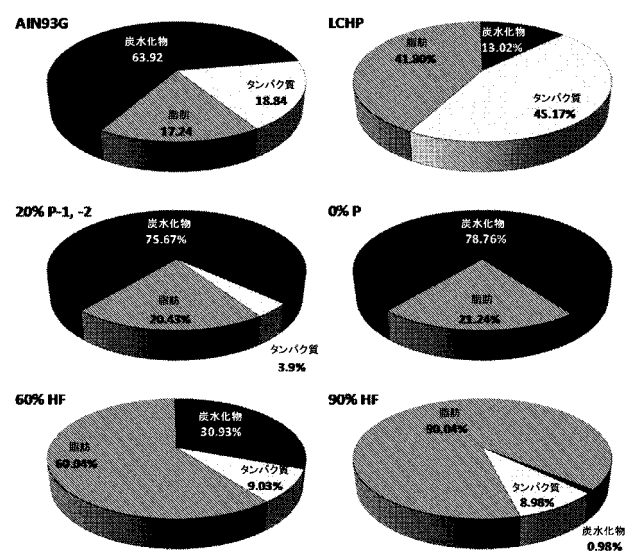


図21

【図 2 2】

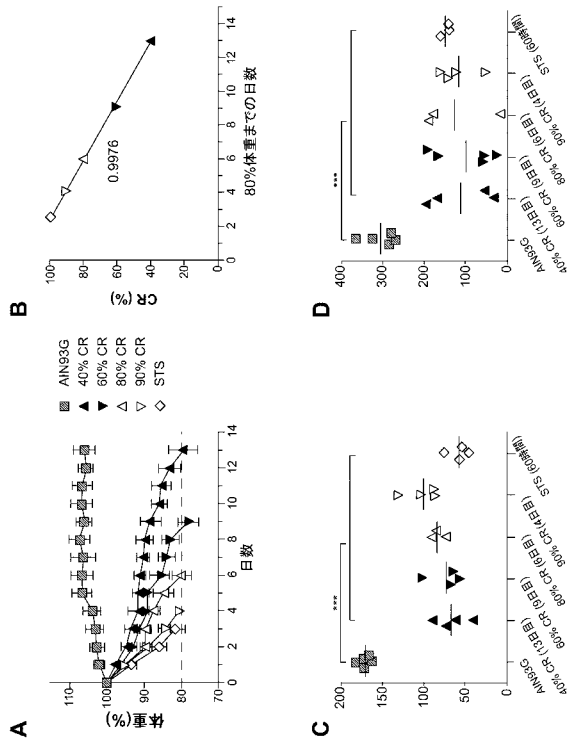


図22

【図 2 3】

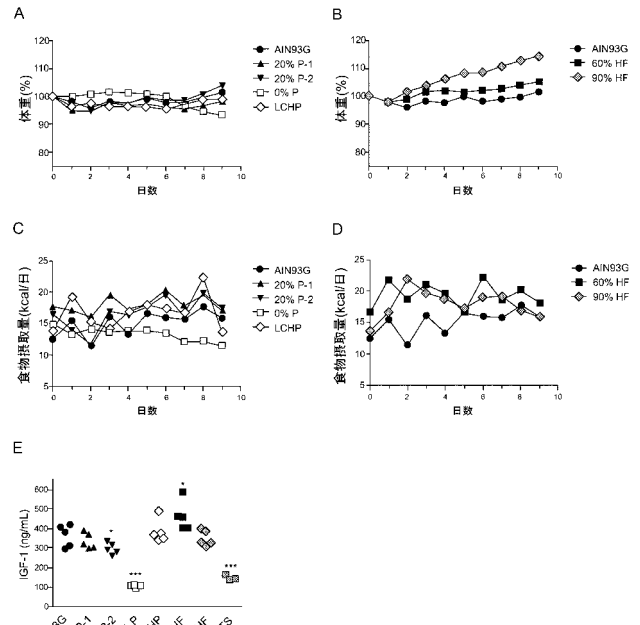


図23

【図 2 4】

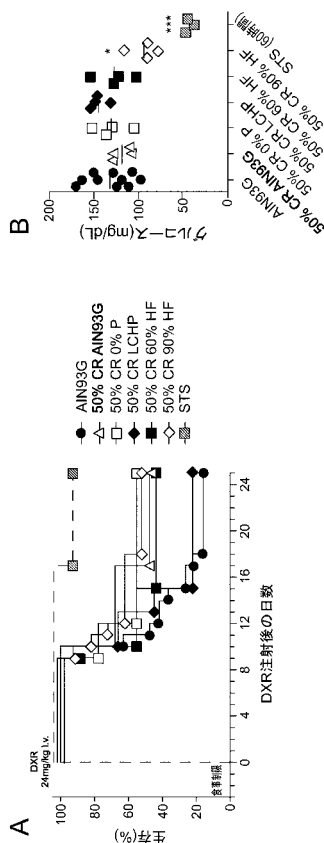


図24

【図 2 5 A - B】

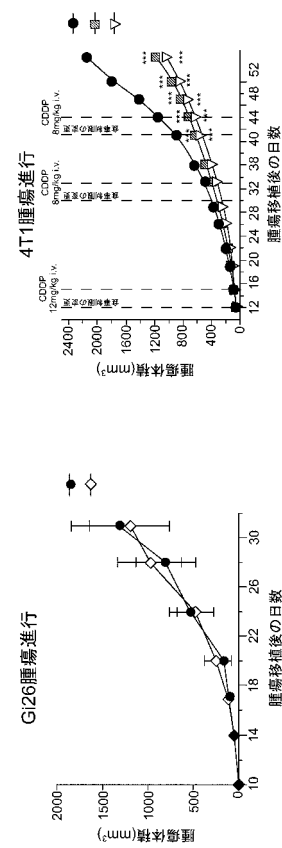


図25A

図25B

【図 26 A - B】

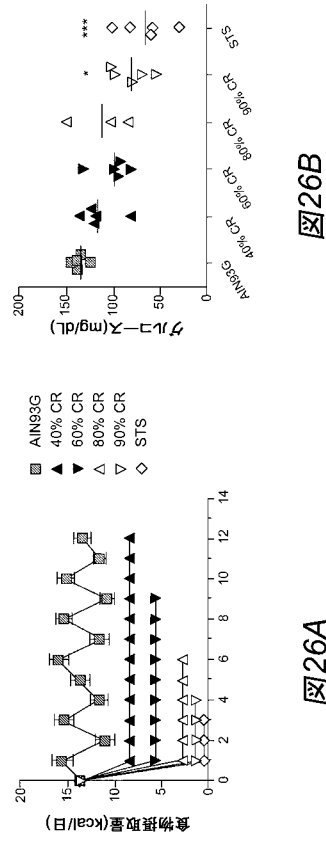


図26B

図26A

【図 28 A - B】

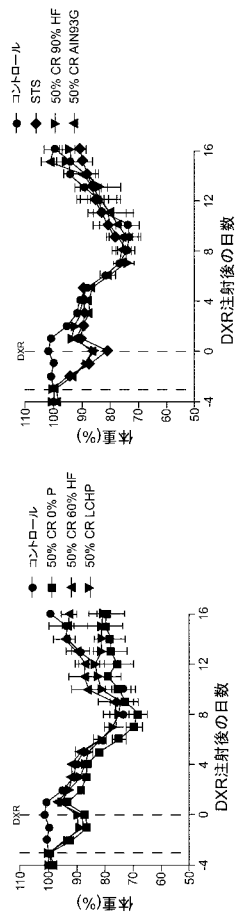


図 28B

図 28A

【図 29】

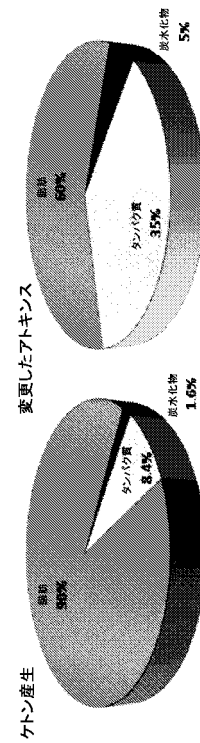


図 29

【図 27】

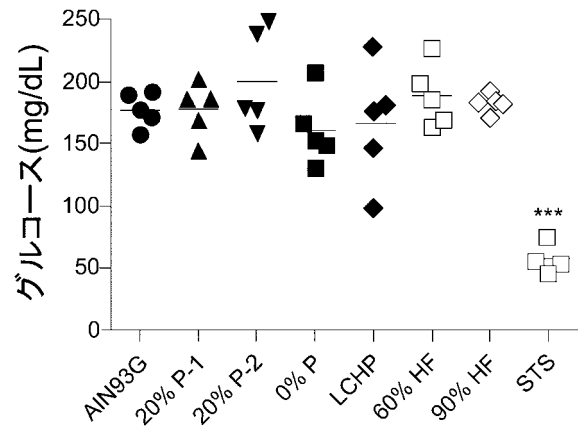


図27

【図 3 0】

食事制限のカロリー%				
食事制限	タンパク質	炭水化物	脂肪	kcal/g
AIN93G	18.8	63.9	17.2	3.8
^a 20% P-1	3.9	75.7	20.4	3.9
^b 20% P-2	3.9	75.7	20.4	3.9
0% P	0	78.8	21.2	3.9
LCHP	45.2	13	41.8	4.4
60% HF	9	30.9	60	5.3
90% HF	9	0.99	90.1	7.1

^a脂肪供給源としてダイズ油

^b脂肪供給源としてヤシ油

【図 3 1】

食事制限g/kg	AIN93G	20% P-1	20% P-2	0% P	LCHP	60% HF	90% HF
コーンステータチ	337.486	487.232	487.232	611.638	85.406	173.086	
チキンスキン/ヒヨコステータチ	132.000	181.694	181.694	170.000	28.380	170.000	
スクロース	100.000	122.700	122.700	128.700	21.500	86.200	
カゼイン	200.000	40.000	40.000		666.000	133.200	180
脂肪	70.000	67.500	67.500	82.050	198.100	360.200	706.37
セルロース	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	80
ミネラル (AIN-93-G-MD)	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000
ビタミン (AIN-93-G-MD)	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
シスチン	3.000	3.000	3.000		3.000	3.000	3
重炭酸コリン	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500
tert-ブチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.133
リン酸カルシウム	0.050	0.050	0.050		0.050	0.050	0.050
食品用染料	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
合計(g)	1000.00	1000.00	1000.00	1000.000	1000.00	1000.00	1000.000

図31

図30

【図 3 2】

食事制限	NEW	AIN93G	NEW	NEW	AIN93G	AIN93G	AIN93G
日	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
マウス/ケージ	5	5	5	5	1	1	1

図32

【図 3 3】

全食事制限(kg)について 0.2							
40% CR	50% CR	60% CR	80% CR	90% CR	STS		
AIN-93G (g)	118.20	95.60	74.80	33.40	12.60	0.00	0.00
必須FA(ml)	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43
繊維 (g)	4.18	5.22	6.26	8.33	9.37	10.60	10.60
AIN-93G-MX (g)	2.83	3.65	4.38	5.93	6.56	7.00	7.00
AIN-93-VX (g)	0.84	1.04	1.25	1.67	1.87	2.00	2.00
ヒドロゲル (g)	75.44	94.08	112.91	150.37	169.20	180.80	180.80

図33

【図 3 4】

以下をベースにする50%CR食:							
AIN93G	0% P	LPHC	60% HF	90% HF			
kcal/g	3.76	3.90	4.39	5.25	7.11		
食事制限 (g)	95.6	92.1	81.9	68.5	50.5		
必須FA(ml)	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43		
繊維 (g)	5.22	5.22	5.22	5.22	5.22		
AIN-93G-MX (g)	3.65	3.65	3.65	3.65	3.65		
AIN-93-VX (g)	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04		
ヒドロゲル (g)	94.1	97.6	107.8	121.2	139.1		
合計 (g)	200	200	200	200	200		

図34

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 K 31/675 (2006.01)	A 6 1 K 31/675	
A 6 1 K 33/24 (2019.01)	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 K 31/513 (2006.01)	A 6 1 K 31/513	
A 6 1 K 31/70 (2006.01)	A 6 1 K 31/70	
A 6 1 K 31/047 (2006.01)	A 6 1 K 31/047	
A 6 1 K 31/201 (2006.01)	A 6 1 K 31/201	
A 6 1 K 31/202 (2006.01)	A 6 1 K 31/202	
A 6 1 K 31/198 (2006.01)	A 6 1 K 31/198	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 39/02 (2006.01)	A 6 1 P 39/02	
A 6 1 P 3/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/02	

(72)発明者 ブランドホルスト, セバスチャン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90006, ロサンゼルス, マグノリアアヴェニュー 950, #5

(72)発明者 レヴィン, モーガン エリース
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 93101, サンタバーバラ, ダブリュ. キャノンパーデイドストリート 637

Fターム(参考) 4B018 MD14 MD19 MD20 ME10
 4C084 AA02 AA19 BA44 CA62 MA02 MA52 NA06 NA07 ZB261 ZB262
 ZC371 ZC751
 4C086 AA01 AA02 BC43 DA35 EA01 EA10 HA12 HA28 MA02 MA03
 MA04 MA52 NA06 NA07 ZB26 ZC37 ZC75
 4C206 AA01 AA02 CA05 DA04 DA05 DB47 FA53 MA03 MA04 MA72
 NA06 NA07 ZB26 ZC37 ZC75