

**サブテーマ 1 : ウイルス発がんの機序解明と予防・治療法の創出****小テーマ 1-3: ウイルス発がん予防における高機能性食品の有効性の検証****b) ブルーベリー葉が有する生理機能の解明(in vivo)における有効性の検証とヒト臨床試験)**

サブテームリーダー サブテームリーダー 鹿児島大学医歯学総合研究科：教授 坪内博仁

研究従事者 宮崎大学医学部：教授 片岡寛章

宮崎県産業支援財団：研究員 高見陽一郎、研究員 湯地久美子

雲海酒造(株)：研究員 境田博至

**研究の概要、新規性及び目標****①研究の概要**

ブルーベリー葉は、強力な抗 HCV 活性を有することを in vitro のレプリコン細胞系で見出したが、次の段階として in vivo モデル動物を用いた検証が必要である。しかし、HCV 感染の in vivo モデルとしては、一般的にはサルなどの大型動物やヒト肝細胞キメラマウスなどが用いられるが、特別な実験施設や莫大な研究費が必要であり、現実的ではない。そこで、HCV 感染モデル動物を用いて検証する代替として、古典的な肝発がんモデルを用いブルーベリー葉の有効性を調べる。それと同時に、PAC を始めとした有効成分の体内動態を明らかにする。更に、毒性試験と健常者を対象とした安全性試験でブルーベリー葉の安全性を確認した上で、C 型慢性肝炎患者を対象とした臨床試験を進める。

**②研究の独自性・新規性**

ブルーベリーの果実については、多くのがんで in vivo 試験を含め盛んに研究が行われているが、葉についてはほとんど行われていない。C 型慢性肝炎患者を対象としたブルーベリー葉の臨床試験は他に例がなく、独自性・新規性は極めて大きい。

**③研究の目標**

- ・フェーズⅠ：古典的な肝発がんモデル動物を用いて、ブルーベリー葉の有効性を検証する。
- ・フェーズⅡ：毒性試験と健常者を対象とした安全性試験でブルーベリー葉の安全性を確認する。ブルーベリー葉摂取動物において、PAC を始めとした有効成分の体内動態を明らかにする。また、ブルーベリー葉の他の機能性（脂肪肝、血圧など）に着目した解析を進める。
- ・フェーズⅢ：C 型慢性肝炎患者を対象とした臨床試験を進める。

**研究の進め方及び進捗状況**

肝発がんモデルラットにブルーベリー葉を摂取させたところ、肝がんの進展が抑制された。次にヒトへの臨床応用を見据えて、亜急性毒性試験、変異原試験（エイムス試験）、小核試験を行い、いずれの試験でも安全性に問題はないことを確認した。注目すべきは、これら安全性試験の過程で、ブルーベリー葉に脂肪肝抑制効果が認められたことである。同様の効果は、レプチン欠損の肥満モデルである ob/bo マウスでも見られた。以上の結果、ブルーベリー葉は、抗 HCV 活性の他にも肝がん進展抑制効果や脂肪肝抑制効果を有することが示唆された。更に、ブルーベリー葉熱水抽出物を経口投与したラットの血漿、尿、糞を分析した結果、PAC は腸管から吸収されて血中に移行し、肝臓で代謝されて体外に排泄されることが示唆された。

以上の結果を踏まえて、ヒトを対象とした臨床試験を開始した。健康成人を対象としてブルーベリー葉熱水抽出液のヒト安全性試験・過剰投与試験を実施した結果、臨床所見と血清データ解析から、特に安全性に問題はないと判断された。フェーズⅢより C 型慢性肝炎に対するブルーベリー葉の有効性を臨床的に検証する予定である。

**主な成果****具体的な成果内容：**

肝発がんモデルラットを作製するため、F344 ラットに Diethylnitrosamine を投与し、部分肝切除を行い、肝がん発症を誘発した。ブルーベリー葉凍結乾燥粉末を摂取させた群とさせない群（コントロール）で、肝がんの発症過程を比較した。その結果、ブルーベリー葉摂取群において、癌結節の数はコントロールと差は認められなかったが、前癌病変の指標である glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞集の面積が有意に減少することが分かった。これらの結果は、ブルーベリー葉は、肝がん発症過程のイニシエーションの段階には影響はないが、病変部位の拡大（プロモーション）の段階を抑制することを示唆している。

安全性試験の予備的検討として、ブルーベリー葉凍結乾燥粉末を 3%含む飼料を SD 系雄ラットに 2 週間摂取させたところ、何ら毒性は認められず、むしろ脂肪肝が抑制されることが分かった。この事を確認するため、肥満モデル動物であるレプチン欠損 ob/bo マウスにブルーベリー葉を摂取させたところ、同様に脂肪肝が抑制されることが分かった。これらの結果は、ブルーベリー葉は、HCV 感染だけではなく、NASH のような脂肪肝を背景とする肝細胞がんにも有効であることを示唆している。また、ブルーベリー葉には、血圧上昇抑制効果があることも見出した。従って、ブルーベリー葉は多機能性を有する高機能性食品素材で、メタボリックシンドローム対策にも有効である可能性が考えられた。

科学的エビデンスに基づいた高機能性食品を開発する上で、投与量や投回数、効率的な摂取形態を設定することは極めて重要な作業である。そのためには、有効成分の血中濃度、体内での代謝、排泄などの体内動態を詳細に把握する必要がある。そこで、ブルーベリー葉の含有成分が経口摂取された後、どのような機構で血中に取り込まれ、代謝、排泄されるのかを調べた。ブルーベリー葉熱水抽出物をラットに経口投与し、回収した血漿、尿、糞便中に有効成分がどのような分子構造で検出されるのかを LC-MS で分析した。まず、抗 HCV 活性本体である PAC は尿中に検出されたことから、PAC は腸管から吸収されて血中へ移行し、血中を循環した後、体外へ

腎排泄されることが示唆された。腸管から吸収された栄養は、門脈を通して直ちに肝臓に取り込まれることから、PACはHCV感染部位に達する可能性が高いことと思われる。同様に、他のブルーベリー葉含有成分であるProcyanidin、Rutin、Kaempferolについても尿に検出されると共に、それらはメチル化または/及びグルクロン酸抱合されていたことから、ブルーベリー葉含有成分は肝臓で代謝されることが示唆された。

ブルーベリー葉に関しては十分な摂食情報がないため、この抽出物をヒトに適用するにあたっては、安全性の確認が重要となる。そこで、ラットを用いた亜急性毒性試験（28日反復経口投与）を行なったところ、病理組織学および血清学的に毒性は認められなかった。変異原試験（エイムス試験）と小核試験も陰性であったことから、遺伝毒性も認められないと判断した。

ブルーベリー葉の安全性試験の結果を踏まえて、いよいよヒト臨床試験を開始することにした。鹿児島大学医学部・歯学部附属病院臨床研究倫理委員会の承認のもと、健康成人を対象としてブルーベリー葉熱水抽出液のヒト安全性試験（190ml/本×4本/日×4週間、健康成人男子12名が被検者）を実施した。問診、自覚症状、血圧、血液、生化学データによる評価を行ったところ、特に有害事象と考えられる所見はなかった。更に安全性を確認するため、過剰投与試験（190ml/本×6本/日×4週間）を実施した。その結果、臨床所見と血清データ解析から、特に安全性に問題はないと判断された。これらの結果をもとに、鹿児島大学医学部・歯学部附属病院臨床研究倫理委員会により、「C型慢性肝炎の患者を対象としたブルーベリー葉熱水抽出物の有効性の検討」が承認され、フェーズⅢよりC型慢性肝炎に対するブルーベリー葉の有効性を臨床的に検証することとなった。

特許件数：5件

論文数：6件

口頭発表件数：10件

## 研究成果に関する評価

### 1 国内外における水準との対比

C型肝炎に有効な医薬品開発は世界中で盛んに行われているが、ブルーベリー葉のような高機能食品に着目し、実際に臨床的有用性を実証しようとする試みは本研究が唯一のものである。開発中の抗HCV薬の多くは臨床的評価を得る前に開発が頓挫することを考えると、C型慢性肝炎患者への投与まで研究を進めたことは、世界的に見ても非常に高い評価が得られるものと思われる。また、一般の高機能性食品は、in vitroの評価のみで効能を謳っている商品が多く、科学的なエビデンスが充分でないものが多い。その意味からも、医薬品開発と同じステップを経て、ブルーベリー葉の有効性を実証しようとしていることは極めて意義深い。

### 2 実用化に向けた波及効果

ヒト臨床試験により、C型慢性肝炎患者に対するブルーベリー葉の有用性が実証されれば、ブルーベリー葉を用いたお茶の需要が爆発的に増える可能性が高い。抗HCV活性の有効成分であるPACは耐熱性であることから、パンや菓子など様々な加工食品に添加することが可能で、C型肝炎予防食品として産業的波及効果は極めて大きい。また、サプリメント開発なども期待される。

## 残された課題と対応方針について

最も大きな課題は、C型慢性肝炎患者にブルーベリー葉が有効であることを実証することである。今のところ、熱水抽出物（お茶）を経口投与する予定であるが、抗HCV効果が認められなかった場合、PACのサプリメントとして投与するなど投与形態の検討が必要である。C型慢性肝炎予防食品の開発については、PACはすでに健康食品として市販されている（ピクノジェノール；ブドウ種子由来PAC）ことから、ブルーベリー葉と既存商品とうまく差別化することが肝要である。また、C型慢性肝炎のような特定の疾病を対象とする場合は、食品といえども医薬品として薬事法の規制を受けることになる。従って、たとえブルーベリー葉がC型慢性肝炎患者に効果が認められたとしても、現時点ではブルーベリー葉の薬効を謳うことは法律上許されていない。将来的な法整備を期待するだけでなく、疾病リスク低減食品として特定保健用食品としての認可を得ることも視野に入れた研究開発が必要である。

	JST負担分（千円）							地域負担分（千円）							合計
	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	
人件費	0	0	0	4,627	3,726	3,116	11,469	0	0	4,125	2,700	0	0	6,825	18,294
設備費	0	0	0	6,038	2,532	0	8,570	0	0	0	0	0	0	0	8,570
その他研究費 （消耗品費、 材料費等）	200	2,986	4,500	7,084	6,614	2,600	23,984	0	0	1,351	800	0	0	2,151	26,135
旅費	0	0	0	39	200	70	309	0	0	0	0	0	0	0	309
その他	27	46	32	354	333	207	999	0	0	0	400	0	0	400	1,399
小計	227	3,032	4,532	18,142	13,405	5,993	45,331	0	0	5,476	3,900	0	0	9,376	54,707

代表的な設備名と仕様〔既存（事業開始前）の設備含む〕

JST負担による設備：ラットケージ

地域負担による設備：