

紅茶エキスによるインフルエンザウイルス感染性の阻止

— *in vivo* における検討 —

¹⁾国立予防衛生研究所ウイルス部

²⁾昭和大学医学部細菌学教室

³⁾三井農林株式会社食品総合研究所

中山 幹男¹⁾²⁾ 戸田眞佐子²⁾ 大久保幸枝²⁾

原 征彦³⁾ 島村 忠勝²⁾

(平成5年11月15日受付)

(平成6年3月23日受理)

Key words: influenza virus, tea, catechin,
antiviral activity

要 旨

マウスのインフルエンザウイルス感染実験系を用いて、紅茶エキスによるインフルエンザウイルスの感染性の阻止を検討した。

ウイルス懸濁液のみを鼻腔内に吸入させたマウス群は、体重減少をおこし10日以内に100%が死亡したが、ウイルス懸濁液に2% (w/w) 紅茶エキスを混合し5分後に吸入させたマウス群では、正常マウス群と同等の体重増加を示し、すべてのマウスが生残した。

生残マウスのインフルエンザウイルスに対する血中抗体価を調べたところ、10匹中9匹は抗体陰性であった。この実験結果から、日常飲用している紅茶エキス濃度(約2~3%)で、 $10^{5.3}$ PFU/マウス ($10^{1.3}$ LD₅₀) の高濃度のインフルエンザウイルスの感染性がほぼ100%阻止されることが明らかになった。

以上の成績は、MDCK細胞を用いた *in vitro* の成績を支持するとともに、紅茶エキスで処理されたウイルスの感染性が生体内で復帰しないことを示唆している。

序 文

茶および茶より抽出した(一)エピガロカテキンガレート (EGCg)、テアフラビンジガレート (TF3) が、A 香港型 (H3N2)、A ソ連型 (H1N1) および B 型インフルエンザウイルスの感染性を、抗原型に関係なく阻止することを既に報告した¹⁾²⁾。

EGCg および TF3 はウイルスに直接に作用し、ウイルスの細胞への吸着能を消失させ、赤血球凝集反応も阻止する。ウイルス粒子はウイルス間で結合し凝集塊を形成する。さらに、ウイルスの細胞吸着時に EGCg および TF3 を作用させると、ウ

イルスの細胞内侵入が阻止される²⁾。

我々は、*in vitro* で得られたこれらの知見を背景に、*in vivo* での実験を行い若干の成績を得たので報告する。

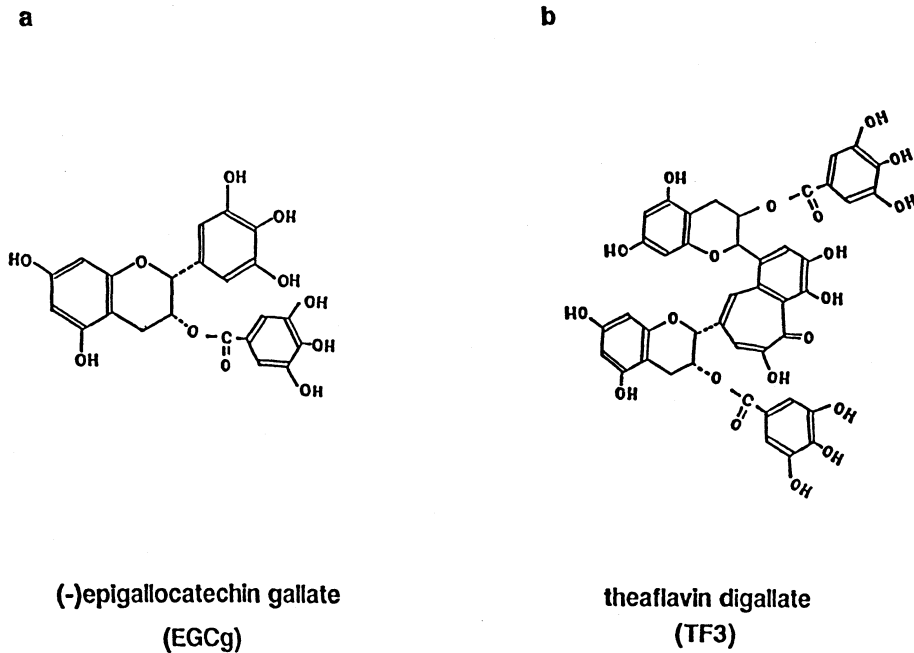
材料と方法

紅茶エキス：市販の紅茶 (Lipton) を用いた。紅茶20g に、80ml の PBS (pH 7.0) を加えて室温で3時間浸出した後、ガーゼで濾過し、2.5M NaOH で pH を7.0 に修正した。これを15,000 rpm 10分間遠心して得た上清を、メンブランフィルター (Minisart NML 0.2, Germany) で濾過し、20%溶液を作成した。これを用時4%に希釈して実験に用いた。

カテキン：(一)エピガロカテキンガレート

別刷請求先：(〒142) 東京都品川区旗の台1-5-8
昭和大学医学部細菌学教室 島村 忠勝

Fig. 1 Molecular structures of (-) epigallocatechin gallate (EGCg); (a) and theaflavin digallate (TF3);(b).



(EGCg) およびテアフラビンジガレート (TF3) は、緑茶³⁾および紅茶⁴⁾より分離精製したものを、それぞれ4mM 濃度になるように PBS (0.01M, pH 7.2) に溶解した。それぞれの分子構造を Fig. 1 に示した。

インフルエンザウイルス：A/WSN/33 (H1N1) 温度非感受性株を、国立公衆衛生院植田昌宏博士より分与を受け、実験に用いた。ウイルスは、MDBK (Madin-Darby bovine kidney) 細胞に感染させ、35°C、26時間培養後の培養上清を1,500 rpm 10分間遠心し、その上清を-80°Cに保存した。これを用時融解して実験に用いた。

細胞培養：Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞および MDBK 細胞を用いた。細胞増殖用培地には、Eagle's minimum essential medium (MEM) にウシ胎児血清を10%に加えた。ウイルス増殖用培地の fluid および overlay 培地は、MEM 培地に acetylated trypsin (Sigma Chem. Co., U.S.A.) を3μg/ml になるように加えた。

Plaque assay：飛田らの方法⁵⁾によった。

6well tissue culture plate (Coster, U.S.A.) を用いて、MDCK 細胞を monolayer となるように培養した。約200PFU のウイルスと紅茶エキス、またはカテキンを等量混合し、一定時間反応させた後この細胞に接種し、37°Cで吸着させた。ついで細胞を MEM 培地で 2 回洗い、その後0.17% NaHCO₃, 200μg/ml DEAE dextran (Pharmacia, Sweden), 3μg/ml trypsin, 0.9% noble agar (Difco, U.S.A.) を含む overlay medium (3 ml/well) を重層した。5%CO₂の存在下で33.5°C、4日間培養後、10%ホルマリン (2ml/well) で細胞を固定した。流水で寒天培地を除き、0.038%メチレンブルー液で2時間染色した後、plaque 数を数えた。plaque 抑制率は、カテキン無添加の control 群と比較して%で表わした。

マウス：C3H/He 3 週齢、雌、SPF マウスを用いた。A/WSN/33株に対する C3H/He マウスの LD₅₀ は、10^{3.87}PFU/マウスであった。10^{1.8}PFU/マウスを感染させた場合でも、すべてのマウスにおいて抗体の産生が認められ、C3H/He マウスは、A/WSN/33株に対して高い感受性を示した。

感染性阻止実験：感染ウイルス量は、 2×10^5 PFU/マウス ($10^{1.3}LD_{50}$) となるように調製した。マウスは、4群に分け各10匹ずつ用いた。第1群は、ウイルス液とMEM培地、第2群は、ウイルス液と4%紅茶エキス、第3群は、4%紅茶エキスとMEM培地をそれぞれ等量混合し、5分間室温にて反応させた。第4群は、MEM培地のみを用いた。混合液30 μ lをエーテル麻酔下で吸入させたマウスは、毎日体重測定を行い14日間観察した。生残マウスは、40日後に採血し、A/WSN/33株に対するHI抗体価を測定した。

HI抗体価の測定：マウス血清をRDE〔武田薬品工業(株)〕で処理しニワトリ赤血球による吸収後、抗体価の測定を行った。

成績

紅茶エキスおよびカテキンによるA/WSN/33株のPlaque形成の抑制

紅茶エキスのA/WSN/33株に対するplaque形成抑制濃度を確かめる目的で、plaque assayを行った。また、EGCgおよびTF3についても同様の実験を行った。約200PFUのウイルスのplaque形成を100%抑制する紅茶エキスの濃度は、5秒間の作用時間では250 μ l/ml (0.5%)、5分間では4 μ l/ml (0.008%)であった(Fig. 2)。また、EGCg

Fig. 2 Inhibition of plaque formation of influenza A/WSN/33 (H1N1) virus by tea extract. Virus was diluted to 2×10^2 PFU ml⁻¹ and incubated with various concentrations of tea extract for 5 sec (○) or 5 min (●) at 37°C before virus adsorption to MDCK cells.

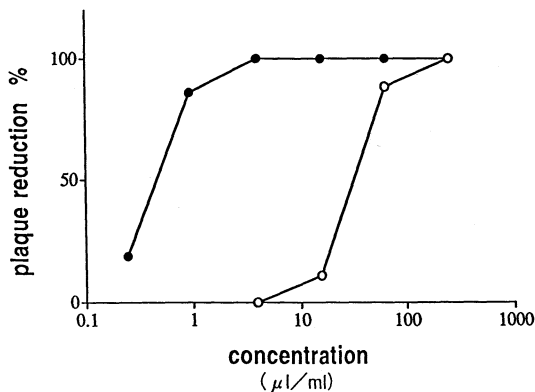


Fig. 3 Inhibition of plaque formation of influenza A/WSN/33 (H1N1) virus by catechins. Virus was diluted to 2×10^2 PFU ml⁻¹ and incubated with various concentrations of catechins for 5 sec and 5 min at 37°C before virus adsorption to MDCK cells.

EGCg: 5sec (○), 5min (●), TF3: 5sec (△), 5min (▲)

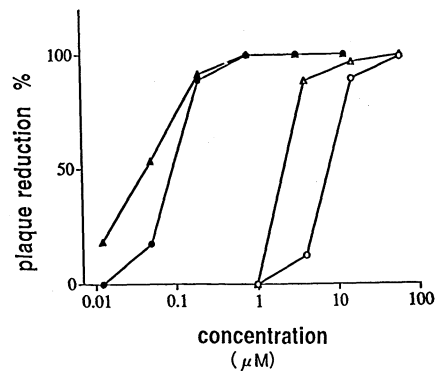
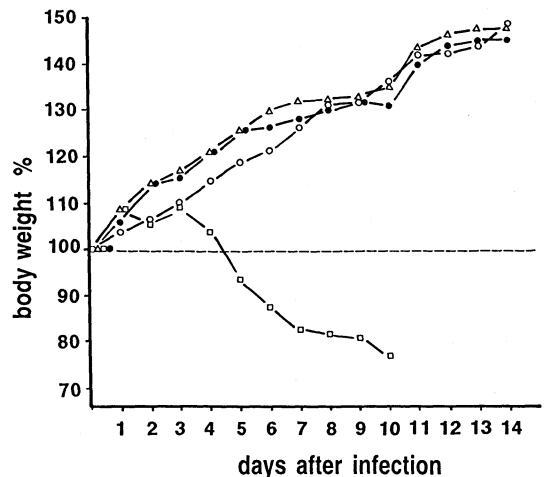


Fig. 4 Protection by tea extract of mice against influenza infection. Mice were administered with $10^{5.3}$ PFU/mice ($10^{1.3}LD_{50}$) of WSN virus. Body weight was observed for 14 days.

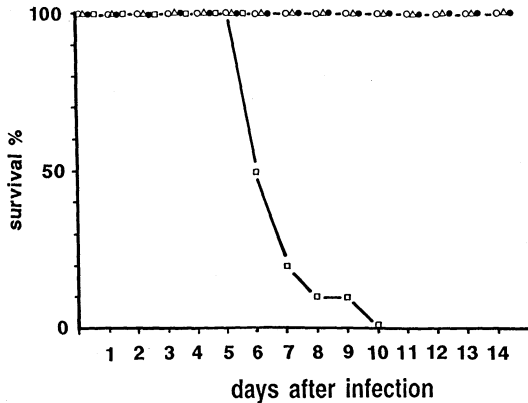
(○):MEM, (□):virus, (△):2% Black tea, (●): 2%Black tea and virus.



およびTF3においては、5秒間でそれぞれ50 μ M/ml、5分間では、1.0 μ M/mlの濃度であった(Fig. 3)。紅茶エキス、EGCgおよびTF3の、5秒間と5分間の作用時間について有効濃度を比較すると、50倍の開きが認められた。

Fig. 5 Protection by tea extracts of mice against influenza infection. Mice were administered with $10^{5.3}$ PFU/mice ($10^{1.3}$ LD₅₀) of WSN virus. Survival was observed for 14 days.

(○):MEM, (□):Virus, (△):2%Black tea, (●):2%Black tea and virus.



紅茶エキスによるインフルエンザウイルス感染性の阻止—マウス体重の推移と死亡率—

C3H/He マウスは、A/WSN/33株の感染により肺に consolidation が起ると、急激な体重の減少が見られる。そのため体重の減少は consolidation のマーカーとなっている。このことから、混合液吸入後のマウス体重を測定した。ウイルス液と MEM 培地の混合液を吸入したマウス群は急激な体重減少が吸入4日目より始まり、5日目にはすべてのマウスの体重は吸入時以下になり、8日以後は20%以上の体重減少を示した (Fig. 4)。また6日目には50%、10日目には100%のマウスが死亡した (Fig. 5)。一方、ウイルス液と紅茶エキスの混合液を吸入したマウス群では、すべてのマウスで体重低下は見られず、MEM 培地のみを吸入した control マウス群と同等の体重増加を示し、すべてのマウスが生残した。また、紅茶エキスと MEM 培地の混合液を吸入したマウス群においても、control マウス群と同等の体重増加を示し、2%紅茶エキスの鼻腔内吸入による毒性は認められなかった。さらにウイルス液と紅茶エキスの混合液を吸入後、40日目に生残マウスから採血し、A/WSN/33インフルエンザウイルスに対する血清中の HI 抗体価を測定した (data not

shown)。その結果、A/WSN/33株に対する抗体産生は10匹中9匹に於て認められなかったが、1匹のみ若干の抗体産生を認めた。

考 察

緑茶エキス、紅茶エキスおよびこれらから抽出、精製したカテキンが、病原性細菌に対して抗菌活性^{9)~14)}、細菌性外毒素に対して抗毒素活性⁸⁾¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾ および各種ウイルスに対して抗ウイルス活性¹⁾²⁾¹⁷⁾を有することを我々は報告した。インフルエンザウイルスについては、孵化鶏卵内でのインフルエンザウイルス増殖を紅茶エキスが抑制するという Green, R.H.の報告¹⁸⁾が最初であった。最近我々は、インフルエンザウイルスの感染性を茶およびカテキンが阻止する機序について、MDCK 細胞を用いた *in vitro* の系で検討した²⁾。その結果、茶エキスまたはカテキンによるインフルエンザウイルスの感染性阻止機構は、ウイルス粒子の表在糖蛋白である HA スパイクの先端にカテキンが結合することによって、細胞表面のレセプターへのウイルス吸着が阻害されることが示唆された。このことは細胞への吸着阻害、赤血球に対する凝集活性の消失、インフルエンザウイルスの Type, Subtype や抗原変異等に関係なく感染性が阻止されることなどから裏付けられた。しかしこれらの成績は、*in vitro* の結果であり、生体内では、ウイルス—カテキン complex の解離による感染性の復帰も考えられる。また、*in vitro* の中和反応が必ずしも生体内での感染防御とイコールではないという他のウイルスでの報告¹⁹⁾²⁰⁾もある。そこで我々は、インフルエンザウイルスに感受性を示すマウスを用いて *in vivo* で検討した。今回使用した A/WSN/33株の C3H/He マウスに対する病原性は、今までの報告²¹⁾にもあるようにきわめて高く、1LD₅₀= $10^{3.87}$ PFU/マウスであった。感染性においても高感受性で、 $10^{1.8}$ PFU/マウスのような感染ウイルス量の少ない場合でも、すべてのマウスにおいて抗体産生が認められた。今回の実験に用いたウイルス量は、 $10^{1.3}$ LD₅₀ ($10^{5.3}$ PFU)/マウスと高濃度であり、紅茶エキスによる A/WSN/33株の感染性の阻止を、マウスの生死で判定するためであった。

ウイルス液と MEM 培地混合液を吸入させたマウス群は、体重減少を伴い、6 日目に 50% そして 10 日目までに 100% のマウスが死亡した。死亡したマウスの肺にはすべて consolidation が認められた。ウイルス液と紅茶エキスの混合液を吸入させたマウス群では 100% すべてのマウスが生残り、体重減少は無く、control 群のマウスと変わらない体重増加を示した。ウイルス感染を確認するために行った血中抗体の HI 試験成績では、10 匹中 9 匹のマウスで陰性 ($< 1 : 16$) であった。このことは、紅茶エキスがインフルエンザウイルスの鼻粘膜細胞への吸着を阻止し、しかもマウス生体内におけるウイルス感染性の復帰がなかったことを示唆している。また 1 匹の抗体陽性マウスについては、体重の減少もなく抗体価も高くなかった ($1 : 128$) ことから、紅茶エキスで処理されたウイルスのごく一部に感染性ウイルスが残っていたと思われる。紅茶エキスと MEM 培地混合液を与えたマウス群の体重増加率は、正常マウス群と差が無く、肺への吸入による紅茶エキスの毒性は認められなかった。

日常飲用する紅茶濃度は約 2~3% である。この濃度でインフルエンザウイルス感染性を効率よく、しかも即時に阻止することが明らかになった。しかしインフルエンザウイルスが一旦細胞内に侵入し、感染が成立した後では紅茶エキスの効果はみられない²⁾。インフルエンザ流行期に紅茶エキスで咽頭部をうがいすれば、口腔内のフリーのウイルスの感染性を即時に阻止する可能性があると思われる。

適切なご指導を承りました国立公衆衛生院・植田昌宏博士ならびに国立予防衛生研究所・北野忠彦博士に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nakayama, M., Toda, M., Okubo, S. & Shimamura, T.: Inhibition of influenza virus infection by tea. *Letters Appl. Microbiol.*, 11: 38-40, 1990.
- 2) Nakayama, M., Suzuki, K., Toda, M., Okubo, S., Hara, Y. & Shimamura, T.: Inhibition of the infectivity of influenza viruses by tea polyphenols. *Antiviral Res.*, 21: 289-299, 1993.
- 3) 松崎妙子, 原 征彦: 茶カテキン類の抗酸化作用について. *日農芸誌*, 59: 129-134, 1985.
- 4) 原 征彦, 松崎妙子, 鈴木建夫: 茶成分のアンジオテンシン I 変換酵素阻害能について. *日農芸誌*, 61: 803-808, 1987.
- 5) Tobita, K., Sugiura, A., Enomoto, C. & Furuyama, M.: Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med. Microbiol. Immunol.*, 162: 9-14, 1975.
- 6) Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R. & Shimamura, T.: The bactericidal activity of tea and coffee. *Letters Appl. Microbiol.*, 8: 123-125, 1989.
- 7) 戸田真佐子, 大久保幸枝, 大西玲子, 島村忠勝: 日本茶の抗菌作用および殺菌作用について. *日細菌誌*, 44: 669-672, 1989.
- 8) 戸田真佐子, 大久保幸枝, 生貝 初, 島村忠勝: 茶カテキン類およびその構造類似物質の抗菌作用ならびに抗毒素作用. *日細菌誌*, 45: 561-566, 1990.
- 9) 大久保幸枝, 戸田真佐子, 原 征彦, 島村忠勝: 白癬菌に対する茶およびカテキンの抗菌・殺菌作用. *日細菌誌*, 46: 509-514, 1991.
- 10) Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H., Suzuki, T., Suzuki, Y. & Shimamura, T.: The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae* O1. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 109-112, 1991.
- 11) 堀内善信, 戸田真佐子, 大久保幸枝, 原 征彦, 島村忠勝: 茶およびカテキンの百日咳菌に対する防御作用. *感染症誌*, 66: 599-605, 1992.
- 12) 帖佐 浩, 戸田真佐子, 大久保幸枝, 原 征彦, 島村忠勝: 茶およびカテキンのマイコプラズマに対する抗菌・殺菌作用. *感染症誌*, 66: 606-611, 1992.
- 13) Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., Hara, Y. & Shimamura, T.: The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol. Immunol.*, 36: 999-1001, 1992.
- 14) Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y. & Shimamura, T.: Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1147: 132-136, 1993.
- 15) Okubo, S., Ikigai, H., Toda, M. & Shimamura, T.: The anti-haemolysin activity of tea and coffee. *Letters Appl. Microbiol.*, 9: 65-66, 1989.
- 16) 生貝 初, 戸田真佐子, 大久保幸枝, 原 征彦, 島村忠勝: カテキン及びテアフラビンの構造と溶血毒阻害作用について. *日細菌誌*, 45: 913-919, 1990.

- 17) Mukoyama, A., Ushijima, H., Nishimura, S., Koike, H., Toda, M., Hara, Y. & Shimamura, T.: Inhibition of rotavirus and enterovirus infections by tea extracts. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 44: 181—186, 1991.
- 18) Green, R.H.: Inhibition of multiplication of influenza virus by extracts of tea. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 71: 84—85, 1949.
- 19) Stanley, J., Cooper, S. & Griffin, D.E.: Monoclonal antibody cure and prophylaxis of lethal sindbis virus encephalitis in mice. *J. Virology*, 58: 107—115, 1986.
- 20) Grosfeld, H., Velan, B., Leitner, M., Cohen, S., Lustig, S., Lachmi, B.-E. & Shafferman, A.: Semliki forest virus E2 envelope epitopes induce a nonneutralizing humoral response which protects mice against lethal challenge. *J. Virology*, 63: 3416—3422, 1989.
- 21) Sugiura, A. & Ueda, M.: Neurovirulence of influenza virus in mice. 1. Neurovirulence of recombinants between virulent and avirulent virus strains. *Virology*, 101: 440—449, 1980.

Inhibition of the Infectivity of Influenza Virus by Black Tea Extract

Mikio NAKAYAMA¹⁾²⁾, Masako TODA²⁾, Sachie OKUBO²⁾,
Yukihiko HARA³⁾ & Tadakatsu SHIMAMURA²⁾

¹⁾Department of Virology, National Institute of Health

²⁾Department of Microbiology and Immunology, Showa University School of Medicine

³⁾Food Research Laboratories, Mitsui Norin Co.

We determined whether black tea extract inhibits the infectivity of influenza virus to mice. When mice were inoculated intranasally with $10^{5.3}$ PFU influenza viruses ($10^{1.3}$ LD₅₀), their body weight decreased and all died within 10 days. Whereas, when mice were inoculated *i.n.* with the mixture of influenza viruses and 2% (w/w) black tea extract, 5 min after mixing, all mice showed normal body-weight increase and survived. Neutralizing antibody to influenza virus was not detected in nine of 10 survived mice.

The results indicate that black tea extract at beverage concentration (2% w/w) inhibits almost completely the infectivity of influenza virus to mice and that *in vivo* reversion of the tea-inactivated influenza virus does not occur.