

# エピガロカテキンを主要カテキンとする水出し緑茶飲用による インフルエンザワクチン接種後の抗体価上昇効果の検討

宗宮浩一<sup>1)</sup> 竹中 洋<sup>2)</sup> 根岸宏邦<sup>3)</sup> 物部真奈美<sup>4)</sup>  
山本(前田)万里<sup>5)</sup> 玉置 淳子<sup>6)</sup> 石坂信和<sup>1)</sup>

## はじめに

ポリフェノール的一种であるカテキンは、タンニンと呼ばれている緑茶の渋みの主成分である。カテキンには、抗腫瘍効果、抗肥満効果、抗糖尿病効果などの健康増進効果があることが、動物モデルを使用した検討で数多く報告されている<sup>1)</sup>。緑茶飲料には、8種類のカテキンが含まれており、このうち、エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートの含有量が多い。われわれは、マウスの小腸パイエル板の細胞からのIgA産生を指標とした検討により、エピガロカテキンに粘膜免疫系の活性化作用があること、また、この作用はエピカテキンガレートよりも強いことを示した<sup>2)</sup>。

インフルエンザは高齢者において死亡率が高い感染症であるが、より若年層においても、致死的な転帰をたどる場合がある。呼吸器疾患や心疾患などの併存は死亡率の増大をもたらすし、インフルエンザ関連死亡の85～90%を占めるとの報告がある<sup>3)</sup>。平成11年度の厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「インフルエンザワクチンの効果に関する研究」によると、病院、老人保健施設、特別

養護老人ホーム等へ入院・入所している65歳以上の高齢者では、インフルエンザワクチンが発病リスクを34～55%減らし、死亡リスクを82%減ずる効果があったと報告されている<sup>4)</sup>。インフルエンザの各流行期の超過死亡は2000年以降、増加傾向から横ばいに転じているが、その背景には、2001年の予防接種法改正による、高齢者等の予防接種率の向上も関与していると考えられる<sup>5)</sup>。また、2000年頃以降からのインフルエンザの迅速診断法やノイラミニダーゼ阻害薬などの開発・普及も超過死亡の横ばい傾向に関与している可能性がある。

高橋らの集計によると、それでも本邦においては、季節性インフルエンザ感染症により年間700～800人が死亡しているとされ、また、流行年においては、インフルエンザ関連死亡が1万人超になるという推計もある<sup>3)</sup>。

これらの背景をもとに、今回われわれは、エピガロカテキンの免疫活性化作用が、インフルエンザワクチンによる抗体保有の陽転化促進、ひいてはインフルエンザ関連の健康被害の抑制に働く可能性について、高齢者および、より若年の成人を対象とした臨床試験を行った。

本研究では、対象を高齢群と成人群の2群に設定したことに加え、エピガロカテキンの1日摂取量について、0 mg (プラセボ群)、50 mg、100 mgの3群を設定し、忍容性、有効性、用量依存性を評価するとともに、ELISPOT法を用いて、抗原特異的な免疫賦活について *in vitro* の検討も併せて行った。

1) 大阪医科大学 内科学Ⅲ

2) 大阪医科大学 耳鼻咽喉科学

3) 社会福祉法人 愛和会

4) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
野菜茶業研究所

5) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
食品総合研究所

6) 大阪医科大学 衛生学・公衆衛生学

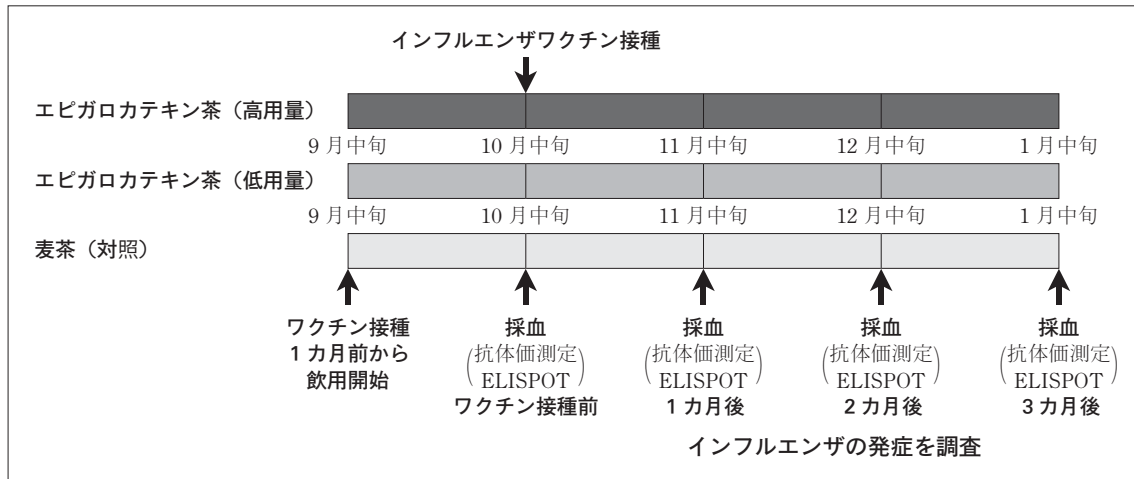


図1 プロトコール

## 対象および方法

### 1. 試験期間

本試験は、試験実施機関を大阪医科大学（大阪府高槻市大学町2番7号）として実施し、大阪医科大学および社会福祉法人愛和会の倫理審査により承認された後、飲用を2013年9月中旬から開始、10月中旬から下旬の期間にインフルエンザワクチン接種を行い、下記のプロトコールにより、定期的な抗体価等の調査を行うことと並行して、2014年1月下旬から3月上旬までの期間にアンケート調査を行い、インフルエンザの発症、その他の有害事象などに関する調査を行った。

### 2. 被験者の選定と倫理的配慮

#### 2-1) 対象

高齢群は社会福祉法人愛和会の特別養護老人ホーム豊中あいわ苑と宝塚あいわ苑の入所者、成人群は大阪医科大学の職員で、以下の選択基準を満たし除外基準に合致しない者を被験者とした。被験者本人あるいは代諾者が、書面で研究に同意された方を研究に組み入れた。

#### 2-2) 選択基準

高齢群：65歳以上

成人群：20歳以上65歳未満

#### 2-3) 除外基準

慢性感染症や栄養不良などで全身状態が不良な被験者

ステロイドや免疫抑制薬が投与されている被験者

#### 2-4) 倫理委員会および被験者の同意

本試験はヘルシンキ宣言の精神に則り、大阪医科大学倫理委員会と社会福祉法人愛和会倫理委員会の承認を得たのち、被験者に対して同意説明文書を示し、文書および口頭により本試験の目的と方法を十分に説明し、被験者から自由意志による同意を文書で得て実施された。

#### 2-5) 臨床試験登録

本試験は、実施前に臨床試験登録UMIN-CTRに登録を行った（UMIN試験ID：UMIN000011951）。

### 3. エピガロカテキン添加飲料の調整と投与

#### 3-1) 試験品と対照品

試験品は国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所から、水出し緑茶のパウダー状エキスとして提供を受けた。エピガロカテキンの1日摂取量が50mg（低用量）になるように調整された水出し緑茶エキスと、100mg（高用量）になるように調整されたエキス、また対照として麦茶（市販品）エキスの提供を受けた。低用量の試験品、高用量の試験品、対照品のパックにはA, B, Cと記載されているのみで、研究実施者、被験者、施設のスタッフのいずれにもA, B, Cがどれであるかは判別が不可能な状態で提供され、研究の二重盲検性を担保した。

#### 3-2) 摂取方法

指定されたスプーン1杯の試験品と対照品を50～200mLの水または湯に溶かして摂取させた。茶の調整は、高齢群では特別養護老人ホームの職員が、成人群では被験者自身が行った。

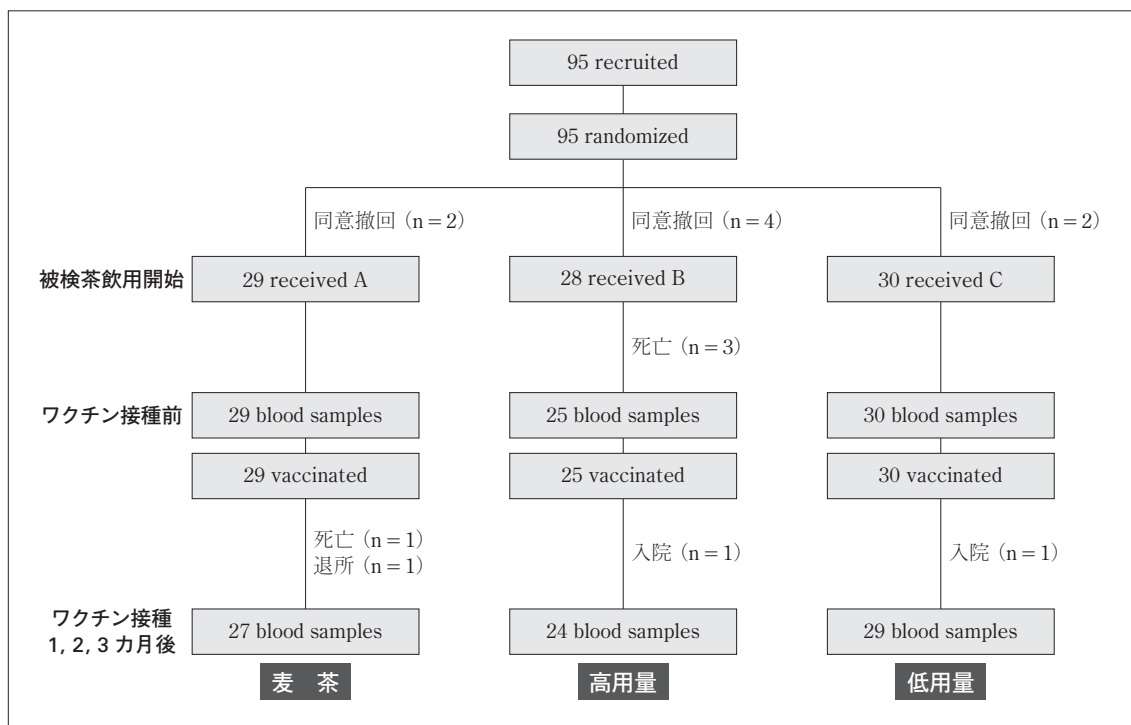


図 2a 高齢群のフローチャート

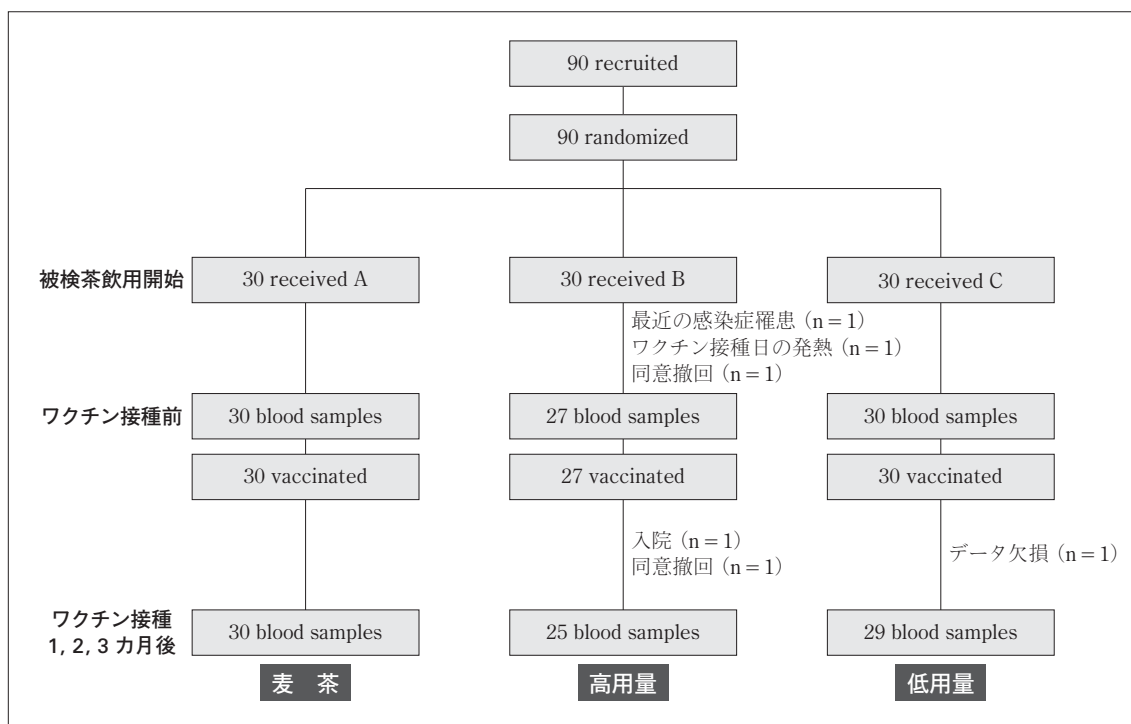


図 2b 成人群のフローチャート

#### 4. 割り付けと試験プロトコール

##### 4-1) 割り付け

高齢群では試験に関係のない特別養護老人ホーム職員がサイコロを使用して割り付け、成人群では試

験担当者が Microsoft® Excel® for Mac 2011 で作成した乱数により割り付けを行った。

##### 4-2) 試験スケジュール

試験スケジュールを図 1 に示す。試験期間は

表 1a 高齢各投与群のベースラインデータ

Variables	麦茶 (n = 27)	低用量 (n = 29)	高用量 (n = 24)	P-value
Age (years)	85.7 ± 7.9	88.1 ± 7.7	86.4 ± 6.5	0.455
Male sex	4 (15)	6 (21)	3 (13)	0.702
Laboratory data				
White blood cell count ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	5.6 (4.8-6.8)	5.5 (4.6-6.3)	6.0 (5.4-7.0)	0.240
Hemoglobin (g/dL)	11.7 (11.1-13.0)	11.2 (10.1-12.8)	12.3 (11.1-12.9)	0.378
Platelet count ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	23.2 (18.6-27.7)	19.5 (17.9-22.0)	21.3 (18.9-25.5)	0.034*
Albumin (g/dL)	3.6 (3.3-2.8)	3.4 (3.2-3.9)	3.45 (3.2-3.5)	0.125
Creatinine (mg/dL)	0.70 (0.55-0.87)	0.81 (0.60-0.96)	0.69 (0.54-0.87)	0.384
AST (U/L)	17 (15-20)	19 (15-23)	17 (14-19)	0.349
ALT (U/L)	9 (7-18)	13 (10-18)	11 (8-14)	0.284
CRP (mg/dL)	0.09 (0.04-0.25)	0.07 (0.03-0.23)	0.25 (0.06-0.56)	0.103
IgG (mg/dL)	1371 (1182-1677)	1341 (1136-1488)	1577 (1336-1671)	0.082
IgA (mg/dL)	290 (239-346)	295 (205-357)	292 (223-405)	0.793
IgM (mg/dL)	61 (49-95)	63 (53-111)	74 (56-108)	0.789

\*P &lt; 0.05

表 1b 成人各投与群のベースラインデータ

Variables	麦茶 (n = 30)	低用量 (n = 29)	高用量 (n = 25)	P-value
Age (years)	43.7 ± 8.9	40.9 ± 9.1	43.4 ± 8.4	0.423
Male sex	9 (30)	6 (21)	12 (48)	0.222
Laboratory data				
White blood cell count ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	6.6 (5.2-7.6) †	6.1 (5.6-6.4) ‡	5.6 (4.8-7.1) §	0.306
Hemoglobin (g/dL)	13.9 (13.1-14.9) †	13.4 (12.5-13.9) ‡	13.4 (12.7-14.3) §	0.304
Platelet count ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	25.3 (21.2-29.2) †	26.6 (24.4-29.3) ‡	24.5 (23.3-29.9) §	0.697
Albumin (g/dL)	4.5 (4.3-4.8)	4.5 (4.3-4.7)	4.6 (4.4-4.8)	0.373
Creatinine (mg/dL)	0.73 (0.65-0.89)	0.69 (0.62-0.76)	0.71 (0.64-0.82)	0.575
AST (U/L)	19 (16-20)	18 (17-23)	21 (18-23)	0.212
ALT (U/L)	16 (12-21)	13 (11-18)	16 (13-21)	0.227
CRP (mg/dL)	0.02 (0.01-0.03)	0.02 (0.01-0.04)	0.02 (0.01-0.04)	0.745
IgG (mg/dL)	1198 (1052-1371)	1198 (1021-1435)	1288 (1021-1435)	0.397
IgA (mg/dL)	187 (165-271)	201 (138-244)	203 (160-320)	0.660
IgM (mg/dL)	83 (60-126)	112 (85-136)	104 (79-130)	0.140

† : n = 26, ‡ : n = 27, § : n = 21

2014年9月から2015年1月とした。インフルエンザHAワクチンはフルービックHA<sup>®</sup> (一般財団法人阪大微生物病研究会)を使用した。2013/14シーズンのインフルエンザワクチンの製造株は、A型株としてA/カリフォルニア/7/2009 (H1N1) pdm09とA/テキサス/50/2012 (H3N2)を、B型株としてB/マサチューセッツ/2/2012を含有する。試験期間中、試験品と対照品以外のお茶の飲用は、高濃度カテキン茶を禁止した以外に制限を設けなかった。インフルエンザワクチン接種直前と接種1, 2, 3カ月後に採血を行った (図1)。

## 5. 評価項目と統計的解析

### 5-1) 有効性評価

インフルエンザ罹患の有無：高齢群では特別養護老人ホーム医師が診断し、成人群ではアンケート調査を実施した。赤血球凝集抑制反応によるインフルエンザ抗体を測定し (LSIメディエンスに測定を依頼)、EMEA評価基準に基づき、抗体保有率、抗体陽転率、抗体増加率を計算し、抗体価の評価を行った<sup>6)</sup>。成人群で、ELISPOT法を用いて、インフルエンザワクチンに含まれる抗原刺激によってIFN- $\gamma$ を遊離するT細胞数を測定した (SRLに測定を

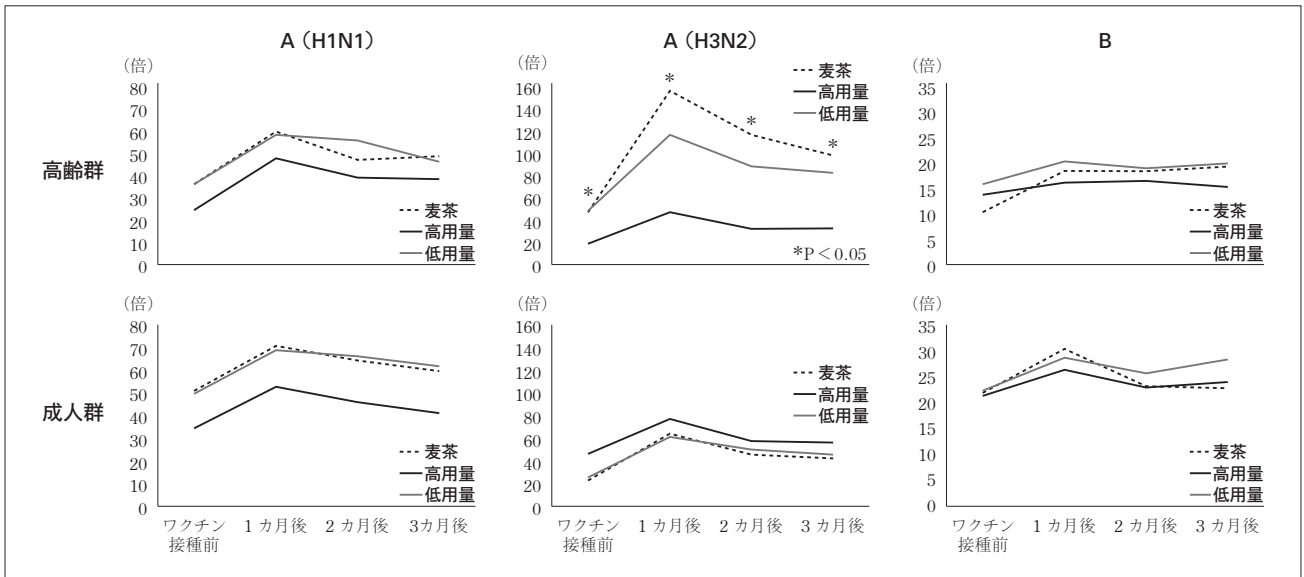


図3 抗体価の推移

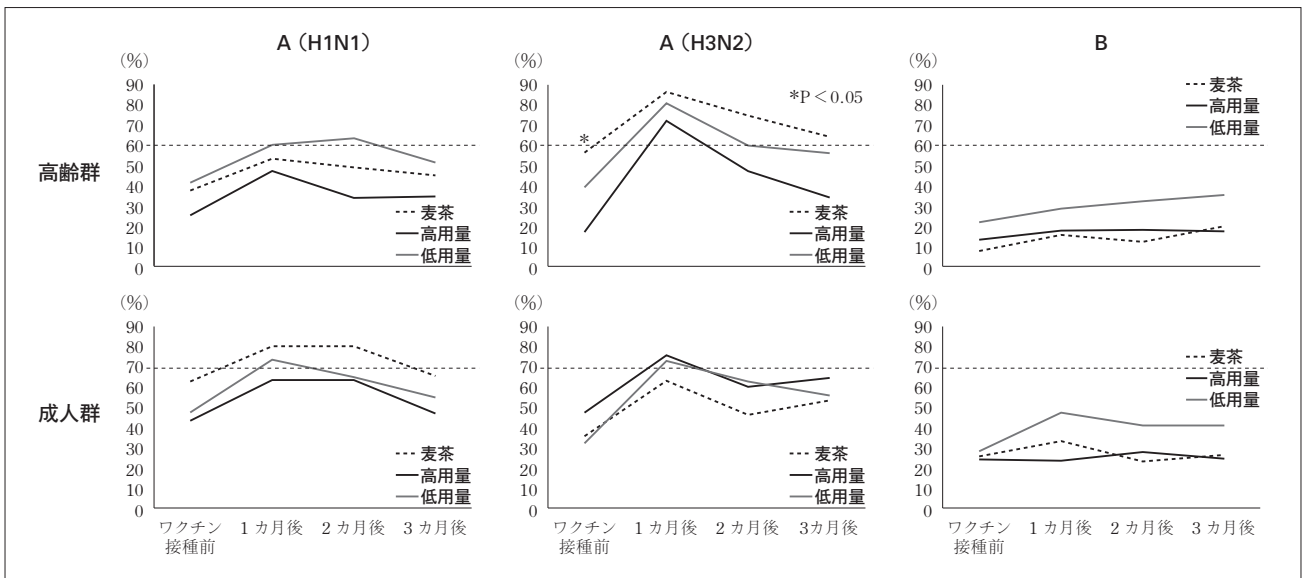


図4 抗体保有率

依頼)。

5-2) 安全性評価

試験期間中の有害事象について、高齢群では特別養護老人ホーム職員が調査し、成人群ではアンケート調査を実施した。

5-3) 臨床検査

採血時に以下の項目を測定した。白血球数，ヘモグロビン，血小板数，アルブミン，AST，ALT，クレアチニン，CRP，免疫グロブリン (IgG, IgA, IgM)。

5-4) 統計処理

IBM® SPSS® Statistics Version 22 による統計処理を行った。

結 果

1. 被験者の構成

被験者の構成を図2に示す。高齢群では95名，成人群では90名が登録された。高齢群では，同意を撤回した8名，死亡した4名，疾病のため入院した2名，特別養護老人ホームを退所した1名の計15名はすべての評価から除外した。成人群で

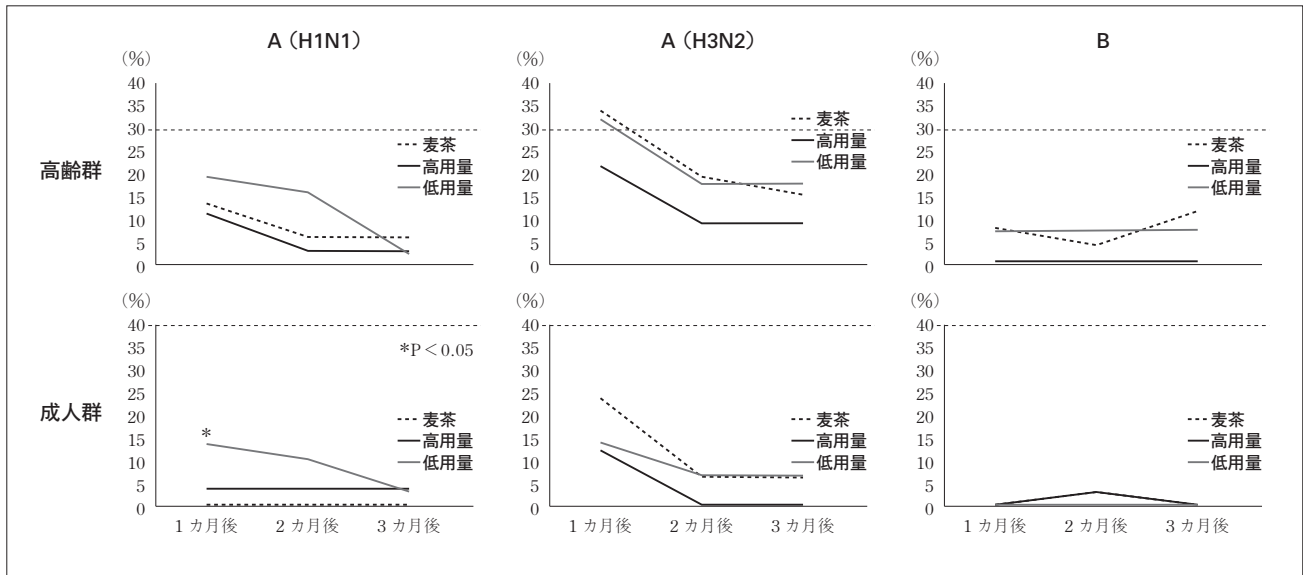


図5 抗体陽転率

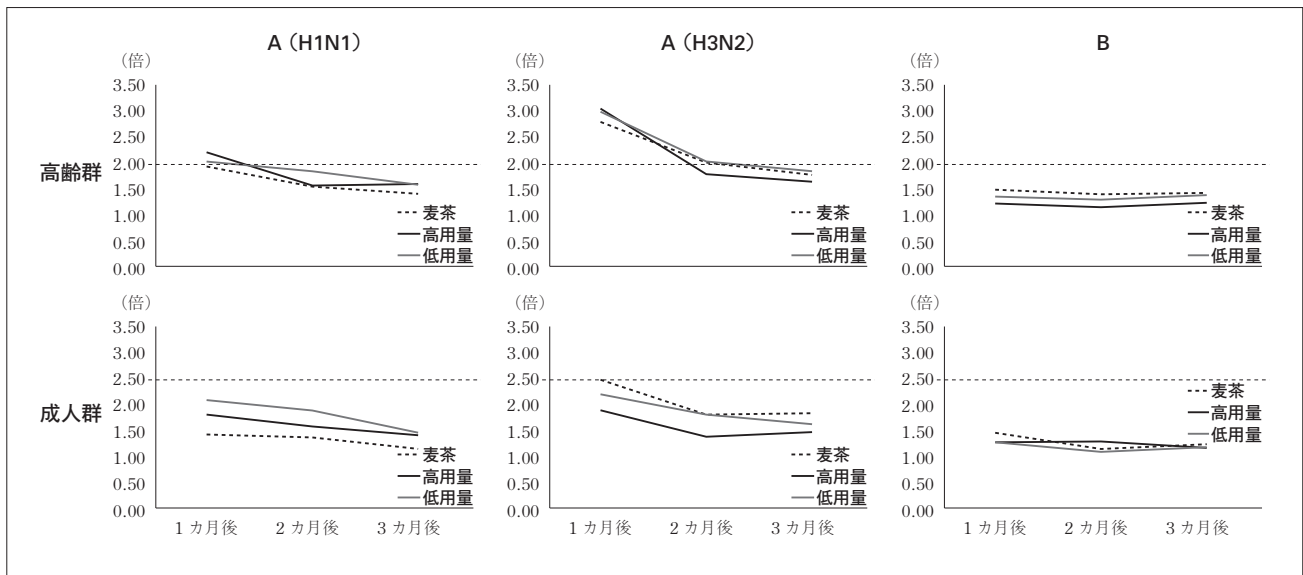


図6 抗体増加率

は、同意を撤回した2名、インフルエンザワクチンを接種できなかった2名、疾病のため入院した1名、データ欠損の1名の計6名はすべての評価から除外した (図 2a, b)。

### 2. 被験者の背景

インフルエンザワクチン接種前の背景因子を表 1 に示す。高齢群で血小板数に3群間の有意差を認めただけ以外、高齢群、成人群ともに統計学的な偏りは認められなかった (表 1a, b)。

### 3. 有効性

高齢群ではインフルエンザの発症を認めなかつ

た。成人群では3群ともに1名ずつインフルエンザの発症を認めた。いずれも発症数が少ないため、統計的な評価は行えないと考えた。

高齢群において A (H3N2) 抗体価が、接種前および接種後いずれの時点においても、高用量群において有意に低かった (図 3)。一方、A (H1N1) 抗体価、B 抗体価、成人群での A (H3N2) 抗体価に有意差を認めなかった。また、抗体保有率についても、抗体価の推移とほぼ同様の所見を示している (図 4)。

一方、高齢群の A (H3N2) については、抗体価

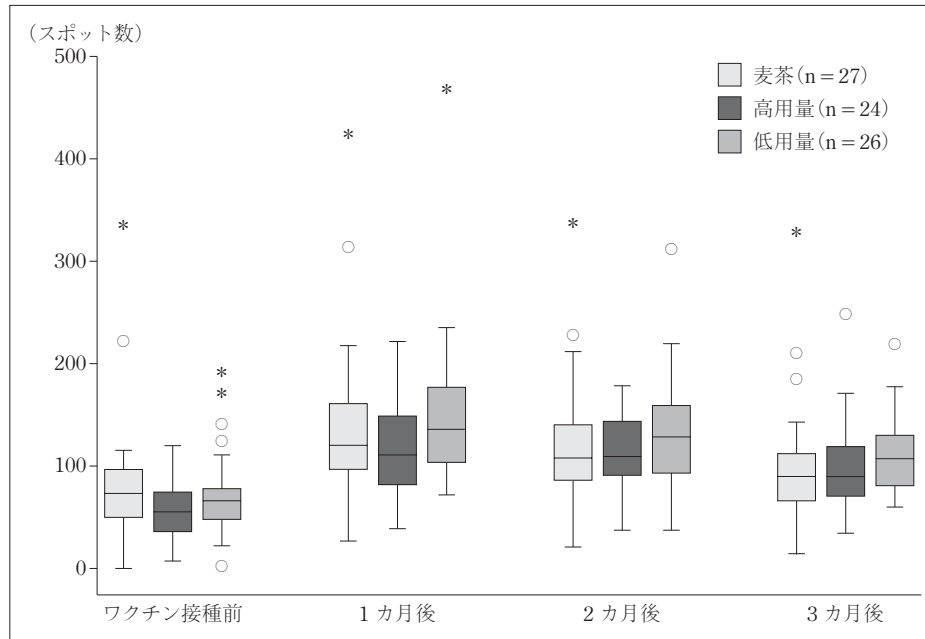


図7 ELISPOT

表2 有害事象

高齢群	高用量	死亡… 3名 (老衰2名, 急性腎不全1名) 入院… 1名
	低用量	入院… 1名 (脳梗塞)
	麦茶	死亡… 1名 (誤嚥性肺炎)
成人群	高用量	下痢… 2名 腹部膨満感… 1名
	低用量	腹痛… 1名
	麦茶	なし

や抗体保有率の基礎値に有意差があり、また、有意ではないが、成人群においても、A (H1N1) の接種前の抗体価は高用量群で低値であった。そのため、接種前の基礎値を元として、抗体陽転率 (図5) および抗体増加率 (図6) を求めた。その結果、成人群でインフルエンザワクチン接種1カ月後のA (H1N1) 抗体陽転率に3群間の差を認め、低用量群で有意に高値であったが、成人群でのA (H3N2) とB、および高齢群においては、3群間に有意な違いは観察されなかった。抗体増加率には、いずれの群でも差を認めなかった。

被験者の末梢血単核球に、インフルエンザワクチンによる抗原刺激を行い、IFN- $\gamma$  を遊離するT細胞数をELISPOT法にて検討した。採血量が多くなるため高齢群は対象とせず、採血量が増えることに

同意が得られた成人群の被験者を対象とした。抗原特異的T細胞数を示すスポット数は、インフルエンザワクチン接種1カ月後に増加し、2~3カ月後に緩やかに減少した。このことは、インフルエンザワクチンの有効性を意味すると同時に、接種3カ月後の時点では、ワクチンの効果が徐々に低下していることがみて取れる。一方、被検茶間での有意差は認めなかった (図7)。

#### 4. 安全性

有害事象の一覧を表2に示す。成人群において、腹部症状をアンケートに記載した被験者が高用量群で3名、低用量群で1名存在したが、対照品群では、そのような訴えがなかったことより、試験品と関連した事象である可能性が推察される。一方、高齢群での4名の死亡と2名の入院は、施設の医師

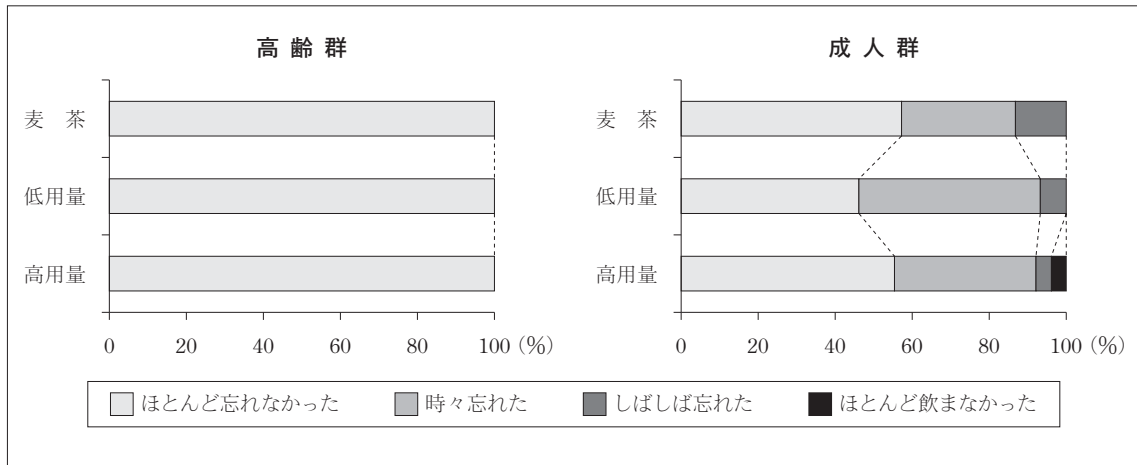


図8 茶の飲用状況

により試験品との関連はないと判断された。アンケート調査による自覚症状やイベントに加え、各群において、抗体価判定と併行して、肝腎機能などについてのスクリーニングを行ったところ、インフルエンザワクチン接種後の臨床検査値に3群間での差を認めなかった (data not shown)。

### 5. 茶の飲用状況

茶の飲用状況を図8に示す。高齢群では施設の職員が管理を行ったため飲み忘れはなかった。一方、成人群においては、試験品の飲用が充分でなかったことがみて取れる。「ときどき忘れた」は各群で差がないが、「ほとんど飲まなかった」被験者が高用量群に存在した。これが上記の腹部症状と関連したものであるかどうかについては明らかではない。

### 考 察

本研究では、高齢群、成人群いずれにおいても、エピガロカテキンを主要カテキンとする水出し緑茶の飲用が、インフルエンザワクチン接種後の抗体価上昇に有効であることは見いだせず、また、用量依存的な何らかの傾向を読み取ることは困難であった。

これには複数の要因があると考えられる。まず、インフルエンザワクチン接種前の抗体価の群間差が影響した可能性がある。A (H1N1) の抗体価は高齢群、成人群いずれにおいても高用量群で低い傾向があり、高齢群において A (H3N2) の抗体価は高用量群で有意に低かった。また、いずれの群においても抗体陽転率が低いことが目立った。インフルエ

ンザワクチン接種前に、高齢群全体では、A (H1N1) に対する抗体保有率が 35.0%，A (H3N2) に対する抗体保有率は 38.8%と高く、成人群全体においては、A (H1N1) に対する抗体保有率は 52.4%，A (H3N2) に対する抗体保有率は 39.3%と、さらに高値であった。インフルエンザウイルスの既感染や過去のワクチン接種による抗体保有者が多く存在したことにより、本研究における抗体陽転率や抗体増加率に被検茶間での差が出にくかった可能性がある。

次に、被検茶の飲用が充分でなかった可能性がある。高齢群における飲用状況は良好であったが、成人群においては被検茶の飲用は被験者に委ねられており、アンケート調査結果以上に実際の飲用状況が不良であった可能性を考慮する必要がある。A (H3N2) に対する抗体陽転率と抗体増加率は成人群に比べ高齢群で高く、被検茶の飲用状況が影響した可能性が否定できない。ただし、被検茶の飲用状況が抗体陽転率と抗体増加率に影響をもたらした可能性を想定したとしても、飲用状況に群間差があったわけではない。

B型に関しては、インフルエンザワクチン接種前の抗体保有率が低いにもかかわらず、抗体陽転率、抗体増加率ともに低値であった。インフルエンザ HA ワクチン フルービック HA<sup>®</sup>の添付文書によれば、A型に比しB型では抗体陽転率と抗体増加率が低値にとどまっており、B型の抗体獲得は、A型より困難な状況がある可能性がある。

抗体価の上昇効果を明らかにするには、本研究でのエピガロカテキン摂取量が少なかった可能性があ



る。しかし、高用量群において消化器症状を訴えた被験者が多いことから、これ以上の増量は難しいと考えられる。

カテキンの健康増進効果について、本邦から肥満や心血管疾患リスクの減少に効果があったなどの報告があり<sup>7)</sup>、特定保健用食品として市販され、その効果がうたわれている。インフルエンザ予防については、山田らは特別養護老人ホームの入所者を対象に、茶カテキンでのうがいインフルエンザ発症抑制に効果があったことを報告している<sup>8)</sup>。これは、カテキンがインフルエンザウイルスに吸着することにより、ウイルスが喉や鼻腔の細胞の表面蛋白に結合するのを抑制するためと考えられており、本研究との比較は困難である。

ELISPOTの結果から、成人群において、抗原特異的T細胞数を示すスポット数は、被検茶飲用の有無にかかわらず、インフルエンザワクチン接種1カ月後と比較して、2～3カ月後には徐々に低下していくことが確認された。このことは、インフルエンザ予防のためのワクチン接種は、流行前の適切なタイミングで行われる必要があることを意味している。

インフルエンザワクチン接種後の抗体獲得については、シーズンや使用されるワクチン株によって大きく異なると考えられる。本研究では、エピガロカテキンを主要カテキンとする水出し緑茶飲用による抗体獲得のブースト作用は認められなかったが、1シーズンのみの観察であり、水出し緑茶の有効性についての結論を出すためには、他のシーズンを含めた検討が必要であると考えられる。

## 利益相反

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「農林水産物・食品の機能性等を解析・評価するための基盤技術の開発」からの研究資金を受けている。

## 引用文献

- 1) Crespy V, Williamson G: A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J Nutr* 2004; **134** (12 Suppl): 3431S-3440S.
- 2) Monobe M, Ema K, Tokuda Y, et al: Effect on the epigallocatechin gallate/epigallocatechin ratio in a green tea (*Camellia sinensis* L.) extract of different extraction temperatures and its effect on IgA production in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; **74**: 2501-3.
- 3) 高橋美保子, 永井正規: 1987年 - 2005年のわが国におけるインフルエンザ流行による超過死亡—性別, 年齢階層別, 死因別死亡による推定—. *日本衛生学雑誌* 2008; **63**: 5-19.
- 4) 平成9 - 11年度厚生科学研究(新興, 再興感染症研究事業)報告書「インフルエンザワクチンの効果に関する研究」(主任研究者: 神谷 齊), 2008.
- 5) 厚生労働省医薬品局血液対策課: 平成13年度～平成17年度予防接種法に基づく高齢者のインフルエンザワクチン予防接種状況調査報告, 2008.
- 6) The Committee for Proprietary Medicinal Products (CHMP): Note for guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines. CHMP/BWP/214/96. 2009.
- 7) Nagao T, Hase T, Tokimitsu I: A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity (Silver Spring)* 2007; **15**: 1473-83.
- 8) Yamada H, Takuma N, Daimon T, et al: Gargling with tea catechin extracts for the prevention of influenza infection in elderly nursing home residents: a prospective clinical study. *J Altern Complement Med* 2006; **12**: 669-72.