

Japan  
Food  
Research  
Laboratories

# 試験報告書

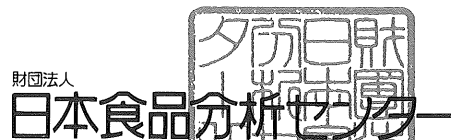
第 209040684-001号  
2009年(平成21年)06月01日

依頼者 株式会社 和漢生薬研究所

検体 霊芝センダン葉のど飴(液状)

表題 ウイルス不活化試験

2009年(平成21年)04月08日当センターに提出された  
上記検体について試験した結果は次のとおりです。



財団法人

日本食品分析センター

東京本部 〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号  
大阪支所 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町3番1号  
名古屋支所 〒460-0011 名古屋市中区大須4丁目5番13号  
九州支所 〒812-0034 福岡市博多区下呉服町1番12号  
多摩研究所 〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号  
千歳研究所 〒066-0052 北海道千歳市文京2丁目3番  
彩都研究所 〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目4番41号

## ウイルス不活化試験

### 1 依頼者

株式会社 和漢生薬研究所

### 2 検体

霊芝センダン葉のど飴(液状)

### 3 試験目的

検体のインフルエンザウイルスに対する不活化試験を行う。

### 4 試験概要

検体にインフルエンザウイルスのウイルス浮遊液を添加，混合し，作用液とした。室温で作用させ，30及び60分後に作用液のウイルス感染価を測定した。

なお，あらかじめ予備試験を行い，ウイルス感染価の測定方法について検討した。

### 5 試験結果

結果を表-1に示した。

なお，細胞維持培地で作用液を1,000倍に希釈することにより，検体の影響を受けずにウイルス感染価が測定できることを予備試験により確認した。

表-1 作用液のウイルス感染価測定結果

試験ウイルス	対象	log TCID <sub>50</sub> /ml*		
		開始時	30分後	60分後
インフルエンザ ウイルス	検体	7.3	5.5	4.3
	対照	7.3	7.3	7.3

TCID<sub>50</sub>: median tissue culture infectious dose, 50 %組織培養感染量

\* 作用液1 ml当たりのTCID<sub>50</sub>の対数値

開始時: 作用開始直後の対照のTCID<sub>50</sub>を測定し，開始時とした。

対照: 精製水

作用温度: 室温

## 6 試験方法

### 1) 試験ウイルス

インフルエンザウイルスA型(H1N1)

### 2) 使用細胞

MDCK(NBL-2)細胞 ATCC CCL-34株[大日本製薬株式会社]

### 3) 使用培地

#### ① 細胞増殖培地

イーグルMEM培地「ニッスイ」①[日水製薬株式会社]に牛胎仔血清を10%加えたものを使用した。

#### ② 細胞維持培地

以下の組成の培地を使用した。

イーグルMEM培地「ニッスイ」①	1,000 ml
10 %NaHCO <sub>3</sub>	14 ml
L-グルタミン(30 g/l)	9.8 ml
100×MEM用ビタミン液	30 ml
10 %アルブミン	20 ml
0.25 %トリプシン	20 ml

### 4) ウイルス浮遊液の調製

#### ① 細胞の培養

細胞増殖培地を用い、使用細胞を組織培養用フラスコ内に単層培養した。

#### ② ウイルスの接種

単層培養後にフラスコ内から細胞増殖培地を除き、試験ウイルスを接種した。次に、細胞維持培地を加えて37℃±1℃の炭酸ガスインキュベーター(CO<sub>2</sub>濃度:5%)内で1~5日間培養した。

#### ③ ウイルス浮遊液の調製

培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態を観察し、細胞に形態変化(細胞変性効果)が起きていることを確認した。次に、培養液を遠心分離(3,000 r/min, 10分間)し、得られた上澄み液をウイルス浮遊液とした。

### 5) 試験操作

検体1 mlにウイルス浮遊液0.1 mlを添加、混合し、作用液とした。室温で作用させ、30及び60分後に細胞維持培地を用いて1,000倍に希釈した。

なお、精製水を対照として同様に試験し、開始時についても測定を行った。

6) ウイルス感染価の測定

細胞増殖培地を用い、使用細胞を組織培養用マイクロプレート(96穴)内で単層培養した後、細胞増殖培地を除き細胞維持培地を0.1 mlずつ加えた。次に、作用液の希釈液0.1 mlを4穴ずつに接種し、37℃±1℃の炭酸ガスインキュベーター(CO<sub>2</sub>濃度:5%)内で4~7日間培養した。培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態変化(細胞変性効果)の有無を観察し、Reed-Muench法により50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)を算出して作用液1 ml当たりのウイルス感染価に換算した。

以 上

「霊芝センダン葉のど飴」のウイルス不活化試験（第 209040684 号）ウイルス感染価測定結果の読み方

表-1 作用液のウイルス感染価測定結果

試験ウイルス	対象	logTCID <sub>50</sub> /ml*		
		開始時	30 分後	60 分後
インフルエンザ ウイルス	検体	7.3	5.5	4.3
	対照	7.3	7.3	7.3

解説

検体組

1. 開始時 logTCID<sub>50</sub>/ml 7.3 : 試験開始時にウイルス数は 10<sup>7.3</sup> があるとのこと。  
10<sup>7.3</sup> = 19 952 623.1
2. 30 分後 logTCID<sub>50</sub>/ml 5.5 : 試験開始後 30 分のウイルス数は 10<sup>5.5</sup> があるとのこと。  
10<sup>5.5</sup> = 316 227.766
3. 60 分後 logTCID<sub>50</sub>/ml 4.3 : 試験開始後 60 分のウイルス数は 10<sup>4.3</sup> があるとのこと。  
10<sup>4.3</sup> = 19 952.6231

対照組

logTCID<sub>50</sub>/ml 7.3 : 試験全段階のウイルス数は 10<sup>7.3</sup> があるとのこと。  
10<sup>7.3</sup> = 19 952 623.1

ウイルス不活化率の計算 :

1. 検体組 30 分後 :  $316\ 227.766 (10^{5.5}) \div 19\ 952\ 623.1 (10^{7.3}) = 0.0158$

**30 分後の不活化率 98.42%**

2. 検体組 60 分後 :  $19\ 952.6231 (10^{4.3}) \div 19\ 952\ 623.1 (10^{7.3}) = 0.001$

**60 分後の不活化率 99.9%**

試験の結果から霊芝センダンのど飴のウイルス不活化率は非常に高く、インフルエンザウイルス予防に利用できると考えられる。

\* 試験ウイルスはインフルエンザウイルス H1N1 である。

# 靈芝センダン葉のだ飴であることの利点

## 1. 靈芝センダン葉のだ飴のウイルス不活化作用：

試験済み(日本食品分析センターによる報告)

## 2. インフルエンザ感染経路：

呼吸系疾病のため、インフルエンザウイルスは、鼻か口から侵入し、病気を引き起こす。**咽頭部の粘膜バリアを強くし、咽喉部からのウイルス侵入予防は非常に重要なことである。**

靈芝センダン葉のだ飴をなめることによる有効成分は、**咽喉部局部に定着し、**レイシセンダン葉エキスがもつウイルスへの不活化作用が、侵入してきたウイルスの増殖を防げると考えている。

インフルエンザ予防策としてはうがいも薦められていることも、咽喉部の粘膜に付着しているウイルスを駆除するためである。

## 3. 靈芝の働き：

靈芝は赤血球内の 2,3-DPG 産生に促進作用はあることが教科書と研究室の研究にて証明されている。

2,3-DPG は解糖過程の産物である。赤血球内の 2,3-DPG が酸化ヘモグロビンと結合すると、構造変化を介してヘモグロビンの酸素親和性を低下させ(酸素飽和曲線の右方シフト)。従って、赤血球内の 2,3-DPG が上昇すると、**末梢組織への酸素供給量は増加する。**

この作用はインフルエンザ患者の発熱時に酸欠の改善に役に立つと考えられる(呼吸系の病気と発熱時の酸素消費が増加する為)。特にインフルエンザ合併肺炎時に肺のガス交換は障害され、組織への酸素供給は著しく低下し、酸欠になり、持病があるヒトは危険状態に陥りやすくなる。

## 4. インフルエンザ治療薬：

- ①リレンザとタミフルはインフルエンザウイルス風邪の**初期、発現から2日以内に有効。**
- ②リレンザとタミフルはA型またはB型インフルエンザウイルス感染以外のウイルスや細菌感染には効果がないこと。
- ③予防投与には認められていない。
- ④特に、タミフルは10代の患者への投与は副作用ため、懸念されている。

## 5. 口腔衛生の重要性：

口腔内特に咽頭部粘膜のバリア機能は、口内細菌が作り出す「プロテアーゼ」という酵素によって弱め、ウイルスがくっつき、細胞粘膜に侵入できるようになると考えられる。

NHK の調査によると口腔細菌を減らす事でインフルエンザの発病率は十分の一に激減した(インフルエンザ最新対策—平成21年2月4日放送)。

霊芝センダン葉のど飴をなめることは、インフルエンザウイルスはもちろんであるが、殺菌作用もあると考えている。

## 6. 症例：

実際去年試作から、たくさんのヒトに使ってもらった結果、のどがおかしくなりはじめに飴を**2個を立て続けてなめる**(約1時間使用)と、かなりの改善は見られた(更なる臨床例の採取と統計学の処理が必要と思う)。

インフルエンザが流行った高校(九州)に、霊芝センダン葉のど飴をなめている高校生たちのほとんどはインフルエンザに罹らなかった。

\* 研究報告参考資料ですので販売目的に利用しないで下さい。

微小循環研究所

森 昌夫