

# ステビア甘味料の安全性

## 1. ステビア甘味料の定義

ステビア甘味料は菊科植物“ステビア”( *Stevia rebaudiana BERTONI* )の葉を原料とし、そこから水で抽出・精製して得られた天然の高甘味度甘味料です。主要4配糖体(ステビオシド、レバウジオシドA、レバウジオシドC、ズルコシドA)含有量80%以上のものを“ステビア抽出物”と言います(1)。

なお“酵素処理ステビア(α-グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア)”は“ステビア抽出物”に糖転移酵素を作用させて得られたものです(1)。

## 2. “ステビア抽出物”の安全性

“ステビア抽出物”は国内外の多くの研究者により古くから各種安全性試験が行われています。長期投与及び最新の方法による試験等で安全性を疑わせる結果は出ていません。

### これまで実施された主な安全性試験

- ・ 急性毒性試験
- ・ 変異原性試験 復帰突然変異原性試験, 小核試験, コメットアッセイ
- ・ 繁殖毒性試験
- ・ 亜急性 / 慢性毒性 / ガン原性試験、
- ・ 催奇性試験
- ・ 代謝・吸収試験
  - (ア)ステビアのヒト腸内細菌叢代謝試験
  - (イ)ステビオール*の in vitro* 肝代謝試験
  - (ウ)ステビアのラット小腸における吸収性検討 - *In vitro* 反転腸サック法による吸収性評価
  - (エ)ステビアのラット小腸における吸収性検討 - ステビアのラット小腸に経口投与した時の門脈血漿中ステビオールの分析

## 3. ステビアの安全性試験結果

### [1] 急性毒性試験

ステビオシド(経口)のLD50はマウス、ラット、ハムスターで8.2g/kg以上であり、ステビオシドが低毒性であることを示しています(3)。

### [2] 変異原性試験 Ames試験, 小核試験, コメットアッセイ

ステビオールの変異原性試験では*In vitro* 前進突然変異試験等の代謝活性化のケースにDNA損傷性及び染色体異常が報告されていますが、*In vitro* のAmes, DNA修復試験、及び*In vivo* のマウス、ラット、ハムスターの小核試験でいずれも陰性の結果が出ています(Table 1)。

また高感度の変異原性試験であるコメットアッセイ(多臓器アルカリSCG法)を*In vitro* 1機関、*In vivo* 3機関で実施しました(22)。*In vitro* 試験はステビオールについてヒトリンパ芽球細胞株を用いて行い、代謝活性化系の有無に関わらずステビオールはDNA損傷誘発性を示しませんでした。*In vivo* 試験では、2機関で実施したステビオール2例、ステビア抽出物(市販品)1例のマウスへの500,1000,2000mg/kg投与は、試験した臓器全てでDNA損傷性を示しませんでした(22)。一方、ステビオールを用いた1機関の試験では1臓器(結腸粘膜)に弱い陽性反応が認められました。

しかし、他の2臓器では同一臓器で陰性である事、国内外の小核試験で陰性の結果が出ていること、発がん性試験においてもがん原性が見られないこと等から、最終的に、肝臓、腎臓、結腸等試験した臓器いずれにおいてもDNA損傷性を示さない、あるいは示すとしても問題となるものではないことが確認されました(平成13年11月、「薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会 毒性・添加物合同部会」)(21)。

[3] 繁殖毒性試験

繁殖毒性では明石ら、森らがラットで、YodyingyuadVらがゴールデンハムスターを用いてそれぞれ試験し、妊娠率、交配率等に影響の無いことを報告しています (Table 2)。

[4] 亜急性 / 慢性毒性 / ガン原性試験

慢性毒性, がん原性については山田ら、L.Xiliら、豊田らがそれぞれ2年間に渡る試験を実施し、いずれも明確な毒性作用なし、発がん性を認めないと報告しています (Table 3)。酵素処理ステビアについては13週間、5%混餌投与試験(亜慢性毒性試験)で、毒性と思われる所見なしと報告されています (Table 3)。

[5] 催奇性試験

催奇形性では宇佐見らがステビオシドを用い、Wasuntarawatらがステビオールを用いて試験し、ステビオシド、ステビオールに催奇形性作用の無いことを報告しています (Table 4)。

Table 1 「ステビア抽出物(含:ステビオール)」の安全性試験結果  
変異原性

報告	被験物質	In vitro 試験					In vivo 試験	
		Ames 試験	前進突然変異	DNA 修復試験	Umu test	染色体異常試験	小核試験	コメットアッセイ
1978 奥村ら(4)	ステビオクト 粗結晶純度: 95%							
1980 石館ら(5)	ステビオクト 純度: 85%							
1985 Pezzutoら(6)	ステビオクト ステビオール		+9mix					
1987 義平、松井ら(7)	ステビオクト ステビオール		+9mix		+9mix	+9mix	マウス -	
2000 P.Temcharoenら(8)	ステビオール 純度: 90%						マウス - ラット - ハムスター -	
2001 (報告資料*)	レバウイオクト A							
2001 佐々木ら(22)	ステビオール ステビア市販品							

+ : 陽性      : 陰性

\* 薬事・食品衛生審議会、食品衛生文科会、毒性・添加物合同部会(平成13年11月6日)資料

Table 2 「ステビア抽出物」の安全性試験結果  
繁殖毒性

報告	被験物質	試験系	結果
1975 明石ら (9)	ステビア抽出物 粗結晶純度：95%	ラット(、)に21日間0.15%混餌投与後、 交配	妊娠率、出産仔数に有意な差はなし
1981 森ら (10)	ステビア抽出物結晶 純度：95.98%	ラットに0.15,0.75,3.00%混餌投与 雄：6週齢から60日間投与し、その後交配 成立まで投与 雌：11週齢から14日間投与後交配し、妊娠 7日まで投与	交配率、妊娠率、および胎仔への影響なし
1991 Yodyingyud.V ら (11)	総ステビア抽出物純度：90%	ゴールデンハムスター(、)3世代0.50,1.0,2.5g/ kg体重/日	生殖に影響無し

Table 3 「ステビア抽出物(含：ステビアオール、酵素処理ステビア)」の安全性試験結果  
亜急性/慢性毒性・癌原性

報告	被験物質	投与量	投与期間	結果
1976 三橋ら (12)	ステビア抽出物結晶	0.1,0.5,2.5g/kgラット経口強制 投与	4週間	明確な毒性作用なし
1984 山田ら (13)	ステビア抽出物 95.20%(total stevioside) ステビア抽出物 74.54% リボース抽出物-A16.27%	0.1,0.3,1.0% ラット混餌投与	2年間	明確な毒性作用なし 発がん性を認めない
1988 菊池 (14)	-グルコシルステビアオール配糖体	0,1.25,2.5,5.0% 混餌投与	13週間	毒性と思われる所見なし
1991 阿瀬ら (15)	ステビア抽出物 純度 95.6%	0.31,0.62,1.25,2.50,5.00%ラット 混餌投与	13週間	明確な毒性作用なし
1992 L.Xiliら (16)	ステビア抽出物 純度 85%	0.2,0.6,1.2% ラット混餌投与	2年間	明確な毒性作用なし 発がん性を認めない
1997 豊田ら (17)	ステビア抽出物 純度 95.6%	2.5、5.0%ラットに 混餌投与	2年間	明確な毒性作用及び癌原性は認められない

Table 4 「ステビア抽出物(含：ステビアオール)」の安全性試験結果  
催奇形性(発生毒性)

報告	被験物質	投与量	投与期間	結果
1995 宇佐見ら (18)	ステビア抽出物 純度 95.6%	0.25,0.50,1.00g/kg/日、 水に溶解ラット 胃管投与	妊娠6-15の10日間	催奇形性作用なし
1998 Wasuntarawatら (19)	ステビアオール 純度 90%	0.25,0.50,0.75,1.00g/kg/ 日 ゴールデンハムスター 胃管 投与(コーンオイル使用)	妊娠6-10の5日間	催奇形性作用なし

## [6] 代謝・吸収試験

試験した全ての配糖体甘味成分（ステビオシド、レバウジオシドA、レバウジオシドC、ズルコシドA）は配糖体のままでは腸内では吸収されず、腸内細菌叢によって徐々にアグリコンであるステビオールに分解され吸収されること、またステビオールは最終代謝物で、これ以外の代謝物は生成せず、さらにステビオールはヒト肝臓においてほとんど代謝を受けないことが報告されています。同様に、酵素処理ステビアも、先ず、元のステビア抽出物に戻り、その後はステビア抽出物と同じ経路をたどって吸収・代謝されることが報告されています。

### （ア）ステビアのヒト腸内細菌叢代謝試験

小山らがプールヒト糞便で種々のステビアサンプルをインキュベーションし、被検物質の減少と生成物の同定、及び変化を調べ報告しています（23）。ステビオシド、レバウジオシドAをそれぞれ別々にインキュベーションすると0.2mg/mL濃度では24hrで完全に消失し相当するステビオールの生成が見られました。4成分混合物（ステビオシド、レバウジオシドA、レバウジオシドC、ズルコシドA）のインキュベーションではステビオシドは0.2mg/mLでは8hrで消失し10mg/mLでは24hrで消失しました（Fig1）。一方レバウジオシドAは0.2mg/mLでは24hrで消失しましたが10mg/mLでは24hr経てもほとんど変化しませんでした（Fig1）。レバウジオシドCは糖の分岐構造がレバウジオシドAに似ていますが0.2mg/mL 10mg/mLの両方とも24hrで完全に消失しプールヒト糞便ではステビオシドに近い分解を受けることがわかりました。ステビオールをプールヒト糞便でインキュベーションした場合、24hr後も変化が無くステビオールはヒト腸内細菌叢で代謝を受けないと考えられました（Fig2）。

種々のステビアサンプルのヒト腸内細菌叢での判明した分解経路は以下の通りです。ステビオシドは13位に結合したソホロシル基の末端の糖（グルコース）が切れ、ルブソシドが生成し、その後は2つの径路、一つは13位の残りの糖の分解、また一つは19位のエステル加水分解を経てステビオールへ分解します。

レバウジオシドAの場合には主たる分解径路はステビオシドを経由する径路であり、またマイナーな径路としてレバウジオシドBを経由する径路があります（Fig3）。

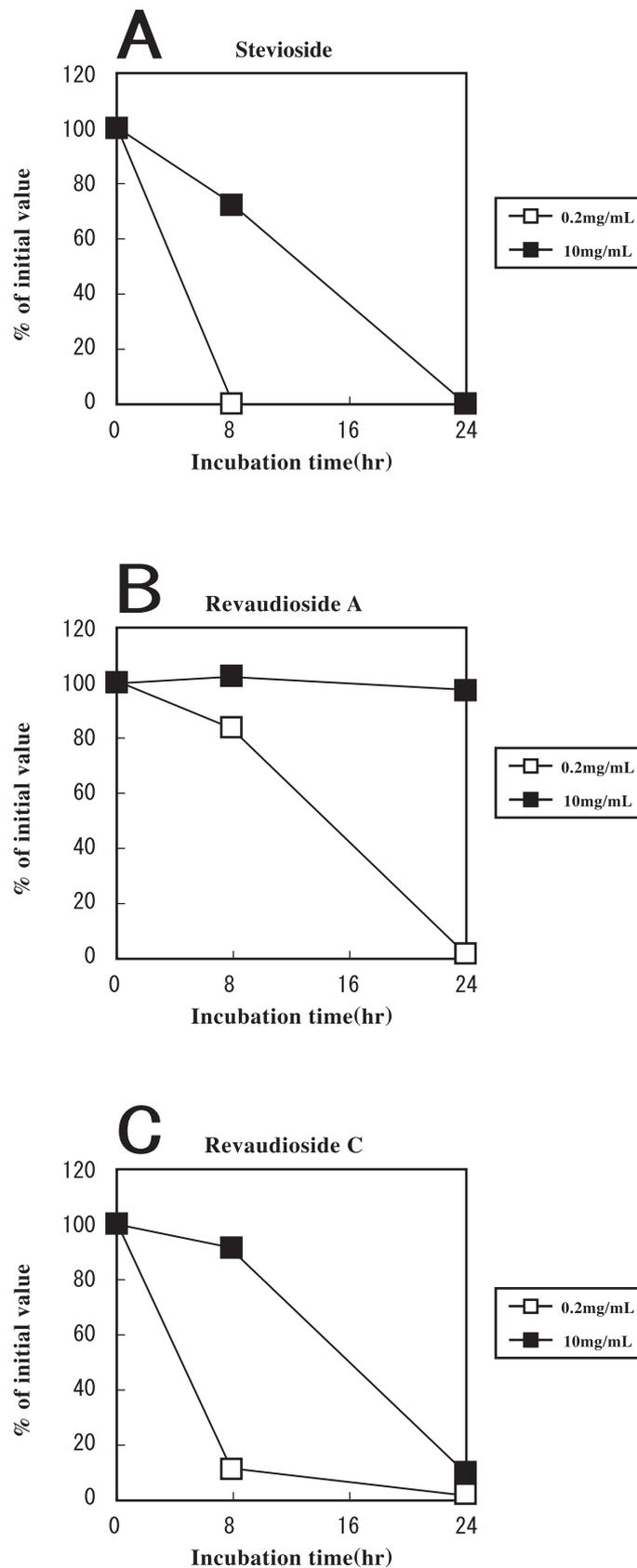


Figure 1 Time-dependency on degradation of stevia components by pooled human fecal homogenates

Stevia (0.2 or 10 mg/mL) was incubated with pooled human fecal homogenates obtained from 5 healthy male volunteers (face-buffer-ratio: 1:50, w/v) at 37 °C under anaerobic condition. Each point represents the mean of duplicate determinations.

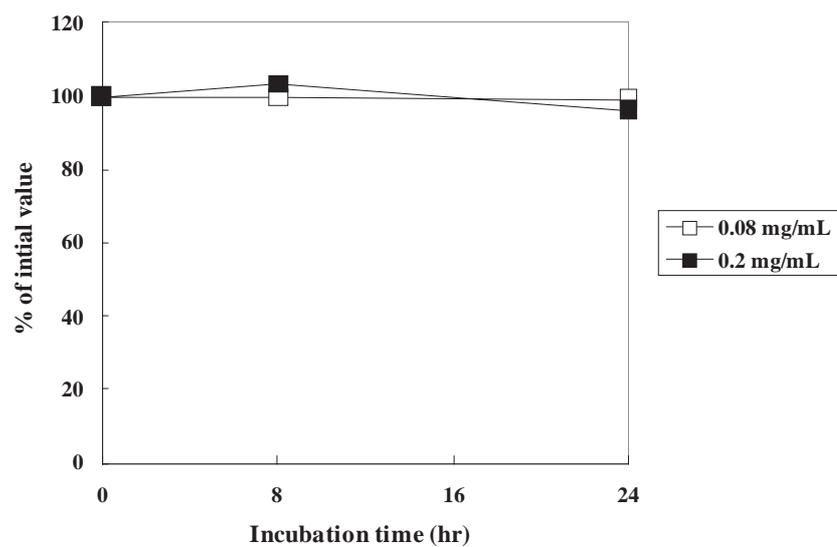


Figure 2 Time-dependency on degradation of steviol degradation by pooled human fecal homogenates

Steviol (0.08 or 0.2 mg/mL) was incubated with pooled human fecal homogenates obtained from 5 healthy male volunteers (feces-buffer-ratio: 1:50, w/v) at 37 °C under anaerobic condition. Each point represents the mean of duplicate determinations.

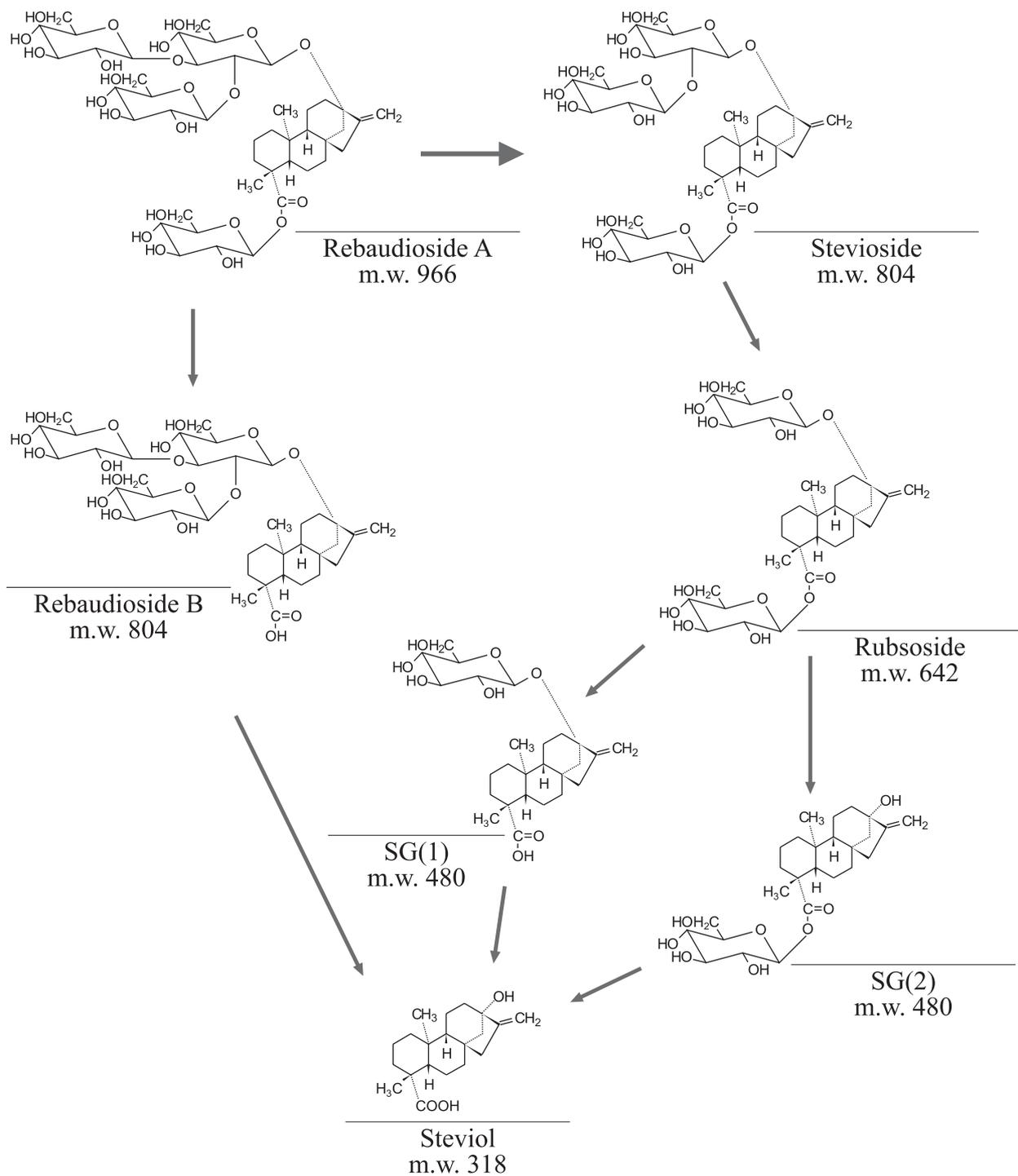


Figure 3 Proposed pathways of rebaudioside A metabolism in human intestinal microflora

グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビアの場合には、新たに付加した糖は容易に外れ元のステビオシド、あるいはレバウジオシド-Aに戻り、その後は既に示された経路でステビオールへ分解します (Fig4)。

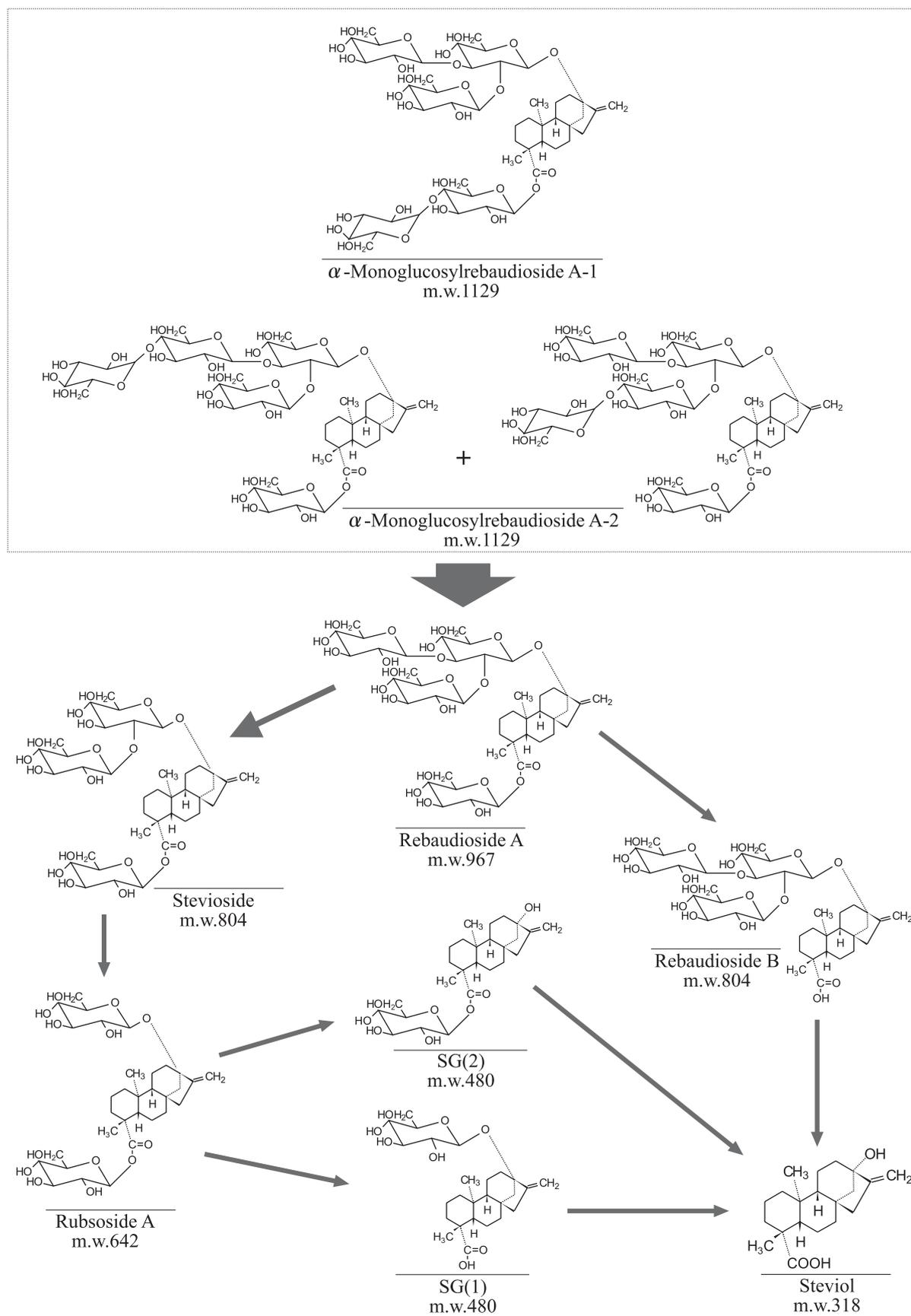


Figure 4 Proposed metabolic pathway of  $\alpha$ -monoglucosylrebaudioside A in human intestinal microflora

(イ) ステビオールの in vitro 肝代謝試験

小山らはステビオールのヒト肝マイクロソームにおける代謝を調べるとともに、ラット肝マイクロソームでの代謝と比較し、ヒトとラットでは肝マイクロソームにおける酸化代謝の定性的なプロフィールにほとんど種差は認められないこと、活性値はヒトの方がラットに比べて極めて低いことを報告しています (24) (Fig5)。

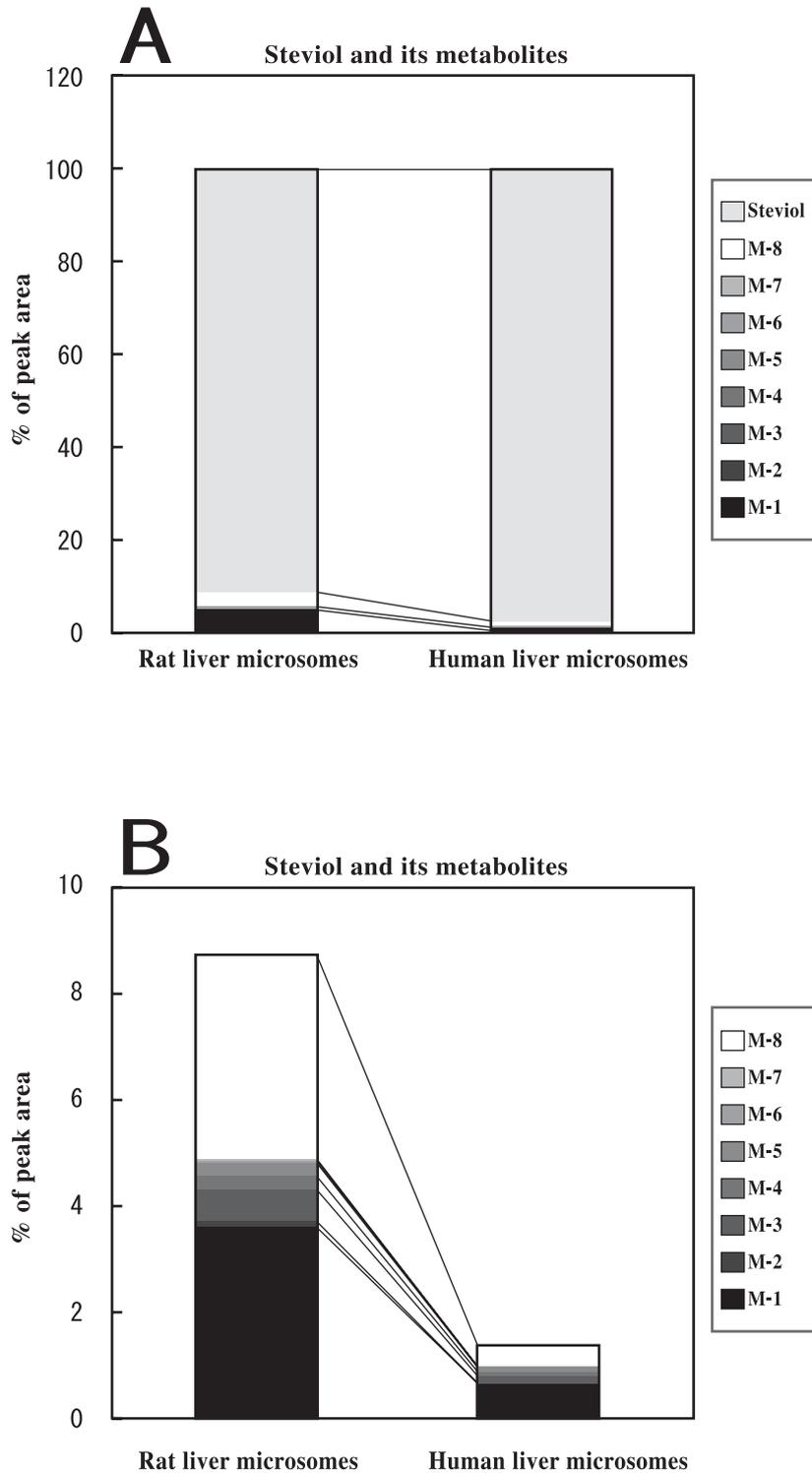


Figure 5 Comparison of steviol metabolic profile between rat and pooled human liver microsomes

1mmol/L steviol was incubated with rat or human liver microsomes (0.5 mg/mL) at 37 for 120 min. Data are the mean of triplicate incubations.

- (ウ) ステビアのラット小腸における吸収性検討 - In vitro 反転腸サック法による吸収性評価  
小山らはラットの反転腸を用いてステビオールと4成分混合物の腸管膜の透過性を試験し、ステビオール、コントロールに用いたサリチル酸は容易に腸管膜を透過するが、4成分混合物はほとんど透過しないことを報告しています(24)。
- (エ) ステビアのラット小腸における吸収性検討 - ステビアのラット小腸に経口投与した時の門脈血漿中ステビオールの分析( -  
小山らはラットに経口でステビオール、4成分混合物を投与して門脈血漿中ステビオールを調べ、先の(ア)(ウ)のIn vitroの結果をIn vivoの系で検証・確認しています(24)。

## 参考文献

- (1) 第三版 既存添加物 自主規格, 2002
- (2) 林裕造, 既存天然添加物の安全性評価に関する調査研究 - 平成 8 年度厚生科学研究報告書 -, 1998
- (3) 高橋道人, ステビア抽出物の安全性, JAFAN, 17, 4, 115-122, 1997
- (4) 奥村昌也, 藤田陽子, 今村美喜郎, 相川清, ステビオサイドの修復試験および復帰変異試験, 食衛誌, 19, 5, 486-490, 1978
- (5) 石館基, 吉川邦衛, 祖父尼俊雄, 食品添加物の変異原性試験成績, 変異原性と毒性, 12, 82 - 90, 1980
- (6) J.M.Pezzuto, C.M.Compadre, S.M.Swanson, N.P.Dhammika Nanayakkara and A.D.Kinghorn, Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic, Proc Natl Acad Sci USA, Apr, 82 (8), 2478-82, 1985
- (7) 義平邦利, 松井道子, 石館基, ステビオサイドの最近の話題, トキシコロジーフォーラム, 10, 281-289, 1987
- (8) P.TEMCHAROEN, S.KLONGPANICHPAK, T.GLINSUKON, M.SUWANNATRAI, S.APIBAL, C.TOSKULKAO, Evaluation of the Effect of Steviol on Chromosomal Damage using Micronucleus Test in Three Laboratory Animal Species, J.Med.Assoc.Thai March, 101-107, 2000
- (9) 明石春雄, 横山幸雄, ステビア乾葉抽出物の安全性についてー各種毒性試験結果の報告ー, 食品工業, 10 月下, 34-43, 1975
- (10) 森規子, 坂上正子, 竹内雅也, 新保幸太郎, 田辺恒義, ステビオサイドのラットによる妊娠前および妊娠初期混餌投与試験, 食衛誌, 22, 5, 409-414, 1981
- (11) V.Yodyingyuad and Supranee Bunyawong, Effect of stevioside on growth and reproduction, HUMAN REPRODUCTION, Vol.6, No.1, 158-165, 1991
- (12) 片山脩, 住田哲也, 林口紘司, 三橋博, ステビア実用化と研究開発データ, アイエスユー(株), 1976
- (13) A.Yamada, S.Ohgaki, T.noda, M.Shimizu, Chronic Toxicity Study of Dietary Stevia Extracts in F344 Rats, J.Food Hygienic Society of Japan, Vol.26, No.2, 169-183, 1985
- (14) 菊地啓明, 糖転移ステビア甘味料の安全性評価, 月間フードケミカル, 6, 54-58, 1988
- (15) 阿瀬善也, 豊田和弘, 今井田克己, 林修次, 今沢孝善, 林祐造, 高橋道人, Stevioside の F344 ラットを用いた亜慢性毒性試験, 衛生試験所報告, 第 109 号, 48-54, 1991
- (16) L.Xili, B.Chengjian, X.Eryi, S.Reiming, W.Yuengming, S.Haodong and H.Zhiyian, Chronic oral toxicity and Carcinogenicity study of Stevioside in rats, Food and Chemical Toxicology, 30, 957-965, 1995
- (17) K.Toyoda, H.Matsui, T.Shoda, C.Uneyama, K.Takada and M.Takahashi, Assessment of the Carcinogenicity of Stevioside in F344 Rats, Food and Chemical Toxicology, 35, 597-603, 1997
- (18) 宇佐見誠, 酒見和枝, 川島邦夫, 津田充宥, 大野泰雄, ステビオサイドのラットを用いた催奇形性試験, 衛生試験所報告, 第 13 号, 31-35, 1995
- (19) C.Wasuntarawat, P.Temcharoen, C.Toskulkao, P.Mungkornkarn, M.Suttajit and T.Glinsukon, DEVELOPMENTAL TOXICITY OF STEVIOL, A METABOLITE OF STEVIOSIDE, IN THE HAMSTER, DRUG AND CHEMICAL TOXICOLOGY, 21(2), 207-222, 1998
- (20) JECFA, Toxicological evaluation of certain food additives. WHO food Additives series, 42, 119 - 143, 1999
- (21) 掛川邦男, 月間フードケミカル, 12, 41 - 46, 2001
- (22) K.Sekihashi, H.Saitoh, Y.Sasaki, GENOTOXICITY STUDIES OF STEVIA EXTRACT AND STEVIOL BY THE COMET ASSAY, The Journal of Toxicological Science, Vol.27, Supplement, 1-8, 2002
- (23) E.Koyama, N.Sakai, Y.Ohori, O.Izawa, K.Kakegawa, A.Fujino, M.Ui, In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora, Food and Chemical Toxicology, 41, 359-374, 2003
- (24) E.Koyama, N.Sakai, Y.Ohori, K.Kitazawa, O.Izawa, K.Kakegawa, A.Fujino, M.Ui, Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans, Food and Chemical Toxicology, 41, 875-883, 2003