

## 天然甘味料, Stevioside の一般薬理試験

倉橋 寿, 山口由理子, 都筑新太郎  
前橋 浩

松本歯科大学 歯科薬理学教室 (主任 前橋 浩 教授)

### Pharmacological Studies of Stevioside

HISASHI KURAHASHI, YURIKO YAMAGUCHI, SHINTARO TSUZUKI and  
HIROSHI MAEHASHI

*Department of Dental Pharmacology, Matsumoto Dental College*  
(Chief: Prof. H. Maehashi)

#### Summary

Stevioside is a kind of diterpen glycoside which is two or three hundred times as sweet as suger, and is contained about 7% in the dried leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Chrysanthemum family. It has been used as wild sweetening in Paraguay for a long time. Many researchers have been engaged in studying about the method of cultivation and extraction of sweetening since it was introduced to Japan in 1971. In the field of dentistry, it is noticed as substitute sweetening for suger which causes the increase of dental caries. It is necessary to ascertain whether the new sweetening is safe or not. However, few data have been issued until a recent date. So the pharmacology of stevioside was investigated.

Two kinds of purity, 93% (S-93) and 69% (S-69), of stevioside extracted from dried *Stevia* leaves were used. The sweetness test by human tongues showed that S-69 was one hundred and twenty times as sweet as sucrose. In the liking test by male rats, S-69 solutions which contain from 0.01% to 0.08% were drunk about 1.4 to 2.1 times as compared with water. On the LD 50 of S-69 on male mice, they were 0.89 g/kg by intravenous injection (I. V.), 1.38 g/kg by intraperitoneal injection (I. P.) and 1.67 g/kg by subcutaneous injection (S. C) respectively. But no mice died by even 16 g/kg of oral administration (P. O.). The respiration, blood pressure, cardiogram and body temperature of male rabbits did not change when 15 g/kg of S-69 was administrated orally. But, blood pressure and heart beats were decreased, and respiration number and capacity were increased when 0.4 g/kg

of S-69 was administrated by I. V.. In connection with S-69 and central nervous system stimulants and depressants, there was no statistical significance of motality when 5.8 mg/kg of picrotoxin or 1 mg/kg of strychnine nitrate was injected into male mice intraperitoneally after the oral administration of 2 g/kg of S-69. The statistical significance of sleeping time was not observed when 70 mg/kg of hexobarbital was injected into male mice intraperitoneally after oral administration of 0.5 g/kg of S-93. As for the effect on pain, there was no statistical significance of writhing syndrome when 0.1 ml per 10 g body weight of 0.6% acetic acid was injected into male mice intraperitoneally after the oral administration of 2 g/kg of S-69. As for the effect on membranes, any change was not to be seen when 0.2 ml of 5% S-69 was dropped in an eye of male rabbits, and 20% S-69 was applied to the skin of male mice. As for the effect on removed internal organs, the amplitude of bullfrogs' heart was somewhat suppressed above the concentration of 0.2 mg/ml of S-93. The amplitude of rabbits' intestine was suppressed more than 50% above 3.2 mg/ml of S-69 and S-93. The shrink of guinea pigs' ileum on histamine hydrochloride (final concentration: 0.2 mcg/ml) was not affected by S-93, but it occurred more than 50% above the concentration of 4 mg/ml of S-69.

## 結 言

Stevioside は Paraguay 原産のキク科植物 *Stevia rebaudiana* Bertoni の乾葉中に 6~7% 含まれ、蔗糖の200~300倍の甘さを有すると言われる Fig.1 に示すような構造式を持った diterpen glycoside である<sup>4)</sup>。Paraguay では野生の甘味料として原住民が多年にわたり使用しており、1971年に日本に導入されて以来、多くの研究機関でこの植物の栽培法や甘味成分抽出法についての開発が進められている<sup>1) 2) 3)</sup>。歯科領域でも齲蝕の発生要因と言われる砂糖に代る甘味料として関心が持たれているが<sup>6)</sup>、甘味料として使用されるには十分な安全性への配慮が必要である。しかしながら毒性試験などのデータの公表は現在まで非常に少ないので<sup>5)</sup>、今回この stevioside の一般薬理試験を行ない、その作用について検討した。

## 材料および方法

Stevioside は分子式  $C_{38}H_{60}O_{18}$  の白色粉末で、水やアルコールその他の溶剤に容易に溶解し熱、酸、アルカリにも安定である<sup>4)</sup>。この実験には *stevia* 乾葉より抽出された純度92.6% (以下 S-93) と純度69.2% (以下 S-69) の2種類の stevioside 粉末を用時、蒸留水に溶解して用いた。

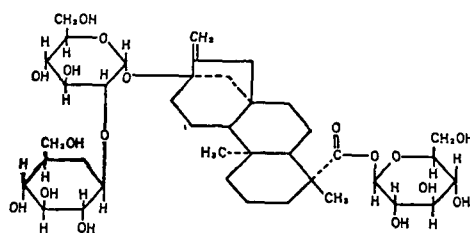


Fig. 1. Stevioside  
M. P. 198°C  
M. W. 804.90

## 1 Stevioside の甘味強度の測定

蔗糖、S-69、サッカリンを蒸留水に溶解してそれぞれ濃度の異なる溶液を作り、蔗糖溶液を基準として5名のパネラーによりS-69とサッカリンのそれぞれの濃度の溶液が蔗糖のどの濃度に相当するかを比較判定した。

## 2 ラットの Stevioside 嗜好性

1群8匹の雄ラットを用いて、それぞれ濃度の異なるS-69の水溶液あるいは蔗糖溶液を飲用水として与え、蒸留水の飲水量を基準としてラットの各溶液の嗜好性を判定した。

## 3 急性毒性実験

1群10匹の雄 dd 系マウス (体重約 25 g) を用い尾静脈、腹腔、皮下および経口によりS-69の投与を行なった。投与後1週間の経過を観察した後、LD<sub>50</sub> 値を算出した。

## 4 呼吸，血圧，心拍数および体温への影響

日本白色種の体重約2.8 kg の雄ウサギ4匹を使用した。呼吸は気管内圧を，血圧は頸動脈よりトランスジューサーを介して，心拍数は肢誘導によりそれぞれ導出し，三栄測器製ポリグラフ（141-6形）を用いて記録した。体温は仁丹製サーモファイナーを用いて直腸温を測定した。S-69は経口および耳静脈内投与によった。

## 5 中枢作用薬物との関連

## 1) Picrotoxin 致死に対する影響

1群10匹の雄 dd 系マウスに 2/kg の S-69 を経口投与し，1時間後に picrotoxin 5.8 mg/kg を腹腔内投与して，picrotoxin 単独投与群との死亡率を比較した。

## 2) Strychnine 致死に対する影響

Strychnine nitrate 1 mg/kg を腹腔内投与し，方法は前項と同様に行なった。

## 3) Hexobarbital 睡眠に対する影響

Hxobarbital 70 mg/kg を腹腔内投与し，前項と同様の方法で睡眠時間を測定した。

## 6 刺激性に対する実験

## 1) マウス腹腔内酢酸刺激に対する影響

1群10匹の雄 dd 系マウスに 2 g/kg の S-69 を経口投与し，1時間後に0.6%酢酸 0.1 ml/10 g を腹腔注射して writhing syndrome の出現数を測定し，酢酸刺激に対する影響を酢酸単独投与群と比較した。

## 2) ウサギ眼粘膜に対する刺激性

体重約 3 kg の日本白色種雄ウサギ3匹を用い，S-69の5%溶液0.2mlを左眼角膜部に滴下し，右眼を対照として経過を観察した。

## 3) マウス皮膚に対する刺激性

体重約 25 g の dd 系雄マウス5匹の背部を剪毛し，S-69の20%液を塗布し経過を観察した。

## 7 摘出臓器に対する作用

## 1) カエル心運動に対する作用

八木式心臓灌流法によってウシガエルの摘出心運動に及ぼすS-69とS-93の作用を調べた。

## 2) ウサギ腸管に対する作用

体重約 3 kg の雄ウサギの回腸を約 2 cm 摘出し，マグヌス装置を用いてS-69とS-93の腸管運動に対する作用を調べた。実験には Tyrode 液を使用し，トランスジューサーを介してポリグラフ（三栄測器141-6形）によりペン書きオンログラフに

記録した。

## 3) モルモットの腸管に対する作用

体重約 400 g の雄モルモットの回腸を摘出し，前項の方法と同様にして，histamine 塩酸塩（終濃度 0.2 mcg/ml）収縮に対するS-93とS-69の影響を調べた。

## 実験結果

## 1 Stevioside の甘味強度の測定

水に溶解されたS-69は Table 1 に示したようにその濃度により甘さが異なり，25 mg/l 以下では甘味を感じないが，50-100 mg/l では弱い甘味，200-400 mg/l では普通の甘味，800 mg-1.6 g/l では強い甘味を感じたが，3.2 g/l 以上では濃度上昇に伴ない苦味が増加した。また甘味比較試験ではS-69はサッカリン（99.8%）とほぼ同等の甘味があり，蔗糖の約120倍の甘さを示した。S-69の甘味の質はややサッカリンの味に近く，蔗糖の甘味の質とは多少異なるように思われた。

Table 1. The comparison of Sweetness with Stevioside, Saccharin and Sucrose

Taste level	Stevioside (69.2%)	Saccharin (99.8%)	Sucrose (99.7%)
No taste	Under 0.025 g/l	Under 0.025 g/l	Under 3 g/l
Weak sweet	0.05-0.1	0.05-0.1	6-12
Normal sweet	0.2-0.4	0.2-0.4	25-50
Strong sweet	0.8-1.6	0.8-1.6	Over 100
Bitter	Over 3.2	Over 3.2	-----

Table 2. The liking Test of Stevioside Compared with Water and Sucrose

Material	Concentration	Drinking volume(%)
Stevioside	0.01 %	159 ± 60 (189)
	0.02 %	179 ± 76 (213)
	0.04 %	136 ± 37 (162)
	0.08 %	117 ± 26 (139)
	0.16 %	113 ± 33 (135)
Sucrose	1 %	162 ± 46 (193)
	2 %	246 ± 68 (293)
	4 %	276 ± 48 (329)
Water	---	84 ± 36 (100)

The mean of 8 rats for a week.  
The Numbers of drinking volume were indicated by ml/kg of body weight in a day.

## 2 ラットの Stevioside 嗜好性

ラットの S-69 嗜好性について Table 2 に示した。ラットの体重 1 kg 当りの飲量は蔗糖液には及ばないものの、甘味を感じる 0.01%~0.16% の濃度で水に比べて 1.4 倍から 2.1 倍の量であった。

## 3 急性毒性実験

マウスを用いて得られた S-69 の急性毒性実験結果を Table 3 に示した。LD<sub>50</sub> は静脈注射で

0.89 g/kg, 腹腔注射で 1.38 g/kg, 皮下注射では 1.67 g/kg であったが、経口投与では 16 g/kg でも死亡例はなかった。

## 4 呼吸, 血圧, 心拍数および体温への影響

## 1) 経口投与による S-69 の影響

ウサギに S-69 を 15 g/kg 経口投与した時の結果を Table 4 に示した。投与後, 血圧, 呼吸数, 心拍数, 体温がごくわずかに徐々に低下したが, これらはウサギを固定したことによる影響のためと考えられ, 経口投与の一般的効果発現時間である投与 30 分前後からの影響は見られなかった。

## 2) 静脈注射による S-69 の影響

ウサギに S-69 を 0.4 g/kg 静脈注射した時の結果を Table 5 に示した。投与直後, 急激な血圧の低下, 呼吸数と呼吸深度の増加が見られ, 時間

Table 3. The Acute Toxicity of Stevioside (69%)

Animal	Method	Dose(g/kg)	Mortality	LD 50(g/kg)
Mouse (Male)	P.O.	3.00	0/10	
		9.00	0/10	
		16.00	0/10	----
Mouse (Male)	S.C.	1.25	0/10	
		1.40	3/10	
		1.56	4/10	
		1.75	7/10	
		1.95	10/10	1.67
Mouse (Male)	I.P.	1.12	0/10	
		1.25	3/10	
		1.40	5/10	
		1.56	9/10	
		1.75	10/10	1.38
Mouse (Male)	I.V.	0.51	0/10	
		0.64	1/10	
		0.80	5/10	
		1.00	6/10	
		1.25	8/10	
		1.40	10/10	0.89

Table 4. The Effect of Stevioside on the Blood Pressure, Respiration, Heart Beat and Body Temperature

Time (Min.)	Blood Pressure	Respiration Numbers/Min.	Respiration Depth	Heart Beats/Min.	Body Temperature
-30	80 mm Hg	84	9	324	36.9°C
-20	80 mm Hg	94	10	327	36.7°C
-10	80 mm Hg	85	10	336	36.5°C
Stevioside administration (15 g/kg P.O.)					
5	78 mm Hg	93	10	306	36.5°C
10	77 mm Hg	90	11	312	36.5°C
20	78 mm Hg	89	11	312	36.6°C
30	79 mm Hg	83	10	306	36.4°C
40	79 mm Hg	81	9	300	36.4°C
50	78 mm Hg	81	10	294	36.3°C
60	78 mm Hg	75	9	300	36.3°C

Stevioside(69%) was used.

Table 5. The Effect of Stevioside on the Blood Pressure, Respiration, Heart Beat and Body Temperature

Time (Min.)	Blood Pressure	Respiration Numbers/Min.	Respiration Depth	Heart Beats/Min.	Body Temperature
-30	83 mm Hg	59	8	288	37.1°C
-20	83 mm Hg	62	9	276	36.7°C
-10	82 mm Hg	60	8	282	36.5°C
Stevioside administration (0.4 g/kg I.V.)					
0	56 mm Hg	103	25	246	36.5°C
5	50 mm Hg	86	16	246	36.4°C
10	48 mm Hg	87	17	216	36.3°C
20	52 mm Hg	75	11	228	36.2°C
30	52 mm Hg	60	11	216	36.1°C
40	67 mm Hg	72	14	234	36.0°C
50	69 mm Hg	69	10	246	36.0°C
60	72 mm Hg	67	9	228	35.8°C

Stevioside(69%) was used.

Table 6. The Effect of Stevioside on Picrotoxin Mortality

Dose	Mortality
Picrotoxin 5.8 mg/kg I.P.	6/10
Picrotoxin 5.8 mg/kg I.P. + Stevioside(69%) 2 g/kg P.O.	7/10

Table 7. The Effect of Stevioside on Strychnine Nitrate Mortality

Dose	Mortality
Strychnine nitrate 1 mg/kg I.P.	4/10
Strychnine nitrate 1 mg/kg I.P. + Stevioside(69%) 2 g/kg P.O.	5/10

Table 8. The Effect of Stevioside on Hexobarbital Sleeping Time

Dose	Sleeping time (Min)
Hexobarbital 70 mg/kg I.P.	45.8 ± 6.5
Hexobarbital 70 mg/kg I.P. + Stevioside(93%) 500 mg/kg P.O.	41.8 ± 12.0

The mean of 10 male mice.

Table 9. The Effect of Stevioside on Writhing Syndrome by Acetic Acid

Dose	Writhing (Times)
Acetic acid(0.6%) 0.1 ml/10 g I.P.	26.3 ± 7.1
Acetic acid(0.6%) 0.1 ml/10 g I.P. + Stevioside(69%) 2 g/kg P.O.	24.3 ± 5.4

The mean of 10 male mice.

の経過とともに徐々に回復したが、心拍数の減少、体温の低下は経口投与実験の値を上回った。

5 中枢作用薬物との関連

1) Picrotoxin 致死に対する影響

マウスに picrotoxin 5.8 mg/kg を単独投与した時の24時間までの死亡率は Table 6 に示すように60%であった。S-69前投与群では70%の死亡率で両群の間に差は見られなかった。

2) Strychnine 致死に対する影響

マウスに strychnine nitrate 1 mg/kg を単独投与した時の24時間までの死亡率は Table 7 に示すように40%であった。S-69前投与群では50%の死亡率で両群の間に差は見られなかった。

3) Hexobarbital 睡眠に対する影響

マウスに hexobarbital 70 mg を単独投与した時の睡眠時間は Table 8 に示すように約46分であった。S-93前投与群では約42分であり両群の間に有意差は見られなかった。

6 刺激性に関する実験

1) マウス腹腔内酢酸刺激に対する影響

酢酸の単独投与による writhing 回数は Table 9 に示すように約26回であった。S-69前投与群は約24回であり、両群の間に有意差は見られなかった。また前項の急性毒性実験でS-69を腹腔注射した際には、生存しているマウスに writhing が観察された。

2) ウサギ眼粘膜に対する刺激性

ウサギ角膜にS-69を滴下し経過を観察したが、異常は認められず、眼瞼反射や対光反射も正常であった。

3) マウス皮膚に対する刺激性

マウスの背部皮膚にS-69を塗布しても何の異

常も認められなかった。なお同じS-69を人の皮膚に塗布した場合も刺激性は感じられなかった。

7 摘出臓器に対する作用

1) カエル心運動に対する作用

ウシガエル摘出心運動に対するS-93およびS-69の作用については、どちらも終濃度0.1mg/ml以下で拍動数や収縮に変化を与えなかったが、0.2mg/ml以上の終濃度で収縮に変化を生じた。その例を Fig.2 に示したが、No.1のように収縮幅が抑制されるもの、No.2のように収縮幅が拡大されるもの

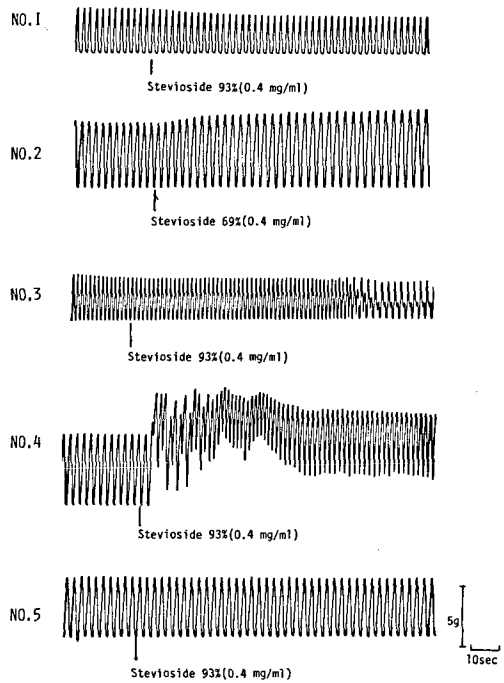


Fig. 2. The Type of Effect of Stevioside on Frog Heart

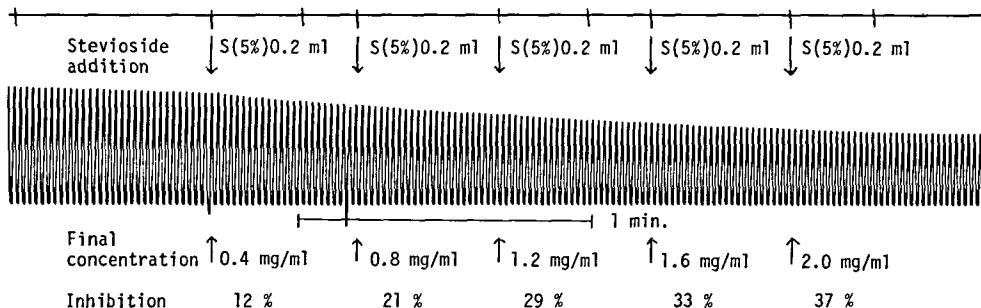


Fig. 3. The Effect of Stevioside (93%) on Frog Heart

もの, No.3 のように収縮波形が変化するもの, No.4 のように波形が移動するもの, No.5 のようにあまり変化しないものなどのタイプがあった。このうち No.1 と No.3 のタイプが比較的多く観察され, No.1 のタイプでは Fig.3 に示したように S-93 の濃度増加に伴って収縮が抑制され, 終濃度 2.0mg/ml までで, 添加前に比べ 37% の抑制が認められた。

2) ウサギ腸管に対する作用

S-93 あるいは S-69 を添加した実験では Fig.4 と Fig.5 に示したように, 終濃度の増加に伴ない腸管運動の振幅抑制も増加した。S-93 の終濃度 1.6mg/ml で抑制率の値が低いのは腸管の Tyrode 液による洗浄効果が充分でなかったためと想われる。S-93 も S-69 も比較強く腸管運動を抑制し, 50% 抑制量は約 1 mg/ml であり, 無作用量は 0.1mg/ml 以下の量であると推察された。

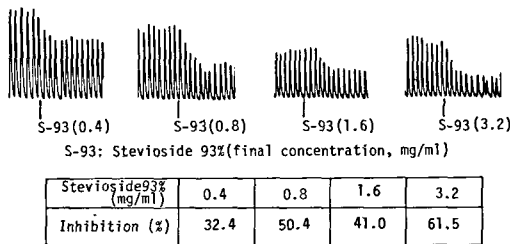
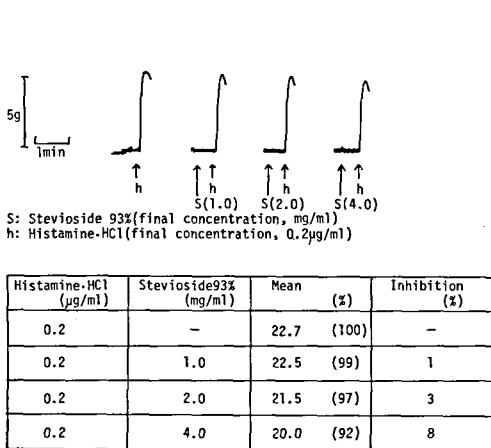


Fig. 4. The Effect of Stevioside (93%) on Rabbit Ileum



The mean of 5 male guinea pigs.

Fig. 6. The Effect of Stevioside (93%) on Histamine Contraction of Ileum

3) モルモットの腸管に対する作用

S-69 あるいは S-93 をあらかじめ添加して histamine hydrochloride (終濃度 0.2 mcg/ml) による腸管の収縮を見た結果を Fig.6 と Fig.7 に示した。S-93 では終濃度 4.0mg/ml でも 8% ほどしか収縮を抑制しなかったが, S-69 ではその濃度増加に伴なって収縮が抑制され, 同じ終濃度の 4.0mg/ml では 50% も抑制された。この結果の相違は stevioside の純度が異なることによって生じたものであり, stevia に含まれる他の植物成分にこの収縮抑制作用があるものと推察された。

考 察

この甘味成分については Rebaudi (1908), Rassenack (1908), Dieterich (1909) らの研究を経て, Bridel (1931) らによって結晶として単離され stevioside と命名され, Wood (1955) らの研究に

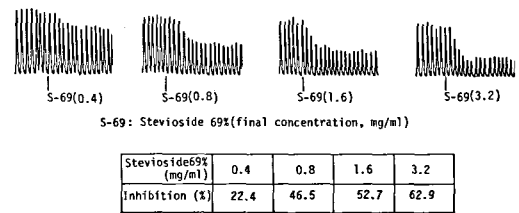
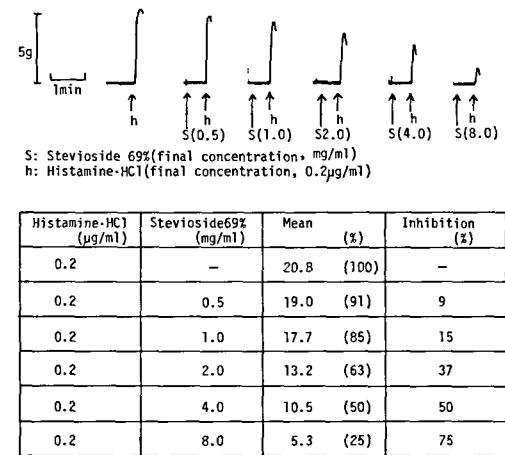


Fig. 5. The Effect of Stevioside (69%) on Rabbit Ileum



The mean of 5 male guinea pigs.

Fig. 7. The Effect of Stevioside (69%) on Histamine Contraction of Ileum

よって構造が解明された分子式  $C_{30}H_{60}O_{18}$ 、分子量804.9、融点195~198°Cの白色結晶粉末である。Paraguay の現地住民は昔から *stevia* の葉をマテ茶や紅茶の甘味づけとして使っている。Planas (1968) らは *stevia* の煎汁をネズミに経口投与した際、妊娠率が低下したことを報告しているが、Persinos (1970)、Whistler (1973) らは stevioside の作用ではないと否定しており、他の物質によるものであろうと結論している。また Dorfman (1960) らは stevioside 誘導体の steviol と dihydro-iso-steviol にホルモン作用があると報告しているが、Farnsworth (1973) はこれらの誘導体が *stevia* 中に生じることはなく、stevioside の代謝物でもないと報告している。日本国内における研究では明石 (1975) らが妊娠試験、急性毒性試験、亜急性毒性試験を行ない、*stevia* 精製エキスを飼料に混入して与えた場合、いずれの試験でも悪い影響を認めないとしている<sup>5)</sup>。今回の一般薬理試験でも経口投与による影響は認めなかったが、一部の摘出臓器では比較的低濃度の stevioside で変化が生じたので、今後この影響がどのようなものであるか検討を加えてみたい。stevioside の甘味強度については岩村 (1982) らの報告で、6%蔗糖に相当する量は 0.461 g/ℓ であるとしている<sup>7)</sup>。この結果は今回の甘味測定の結果とほぼ一致しており、stevioside の甘さは蔗糖の120~130倍と思われる。近年 *stevia* の葉には stevioside 以外の甘味配糖体が数種存在することがわかっており、今後これらの物質にも検討を進める必要があるものと思われる。

#### ま と め

純度92.6% (S-93) と69.3% (S-69) の二種類の stevioside を用いて一般薬理試験を行

なった。

ヒト舌による甘味試験でS-69は蔗糖の約120倍の甘さを示し、ラットのS-69嗜好性は水の1.4~2.1倍であった。マウスのLD<sub>50</sub>はi.v.で0.89 g/Kg,i.p.で1.38 g/kg,s.c.で1.67 g/kgであったが、p.o.では16 g/kgでも死亡例はなかった。ウサギの呼吸、血圧、心電図および体温に対しては15 g/kgのp.o.で殆んど変化はなかったが、0.4 g/kgのi.v.で血圧低下、呼吸増加、心拍数減少などの影響があった。中樞作用薬との関連実験や刺激性に関する実験では対照群との差は少なかったが、摘出臓器に対する作用では比較的低濃度でウシガエル心運動に変化を与え、ウサギ回腸運動を抑制した。またモルモット回腸のヒスタミン収縮に対してはS-69が収縮を抑制したが、S-93では殆んど影響を与えなかった。

#### 文 献

- 1) 住田哲也 (1975) 新甘味資源作物ステビアの導入と試験研究の動向。農業および園芸, 50:143-148.
- 2) 加藤一郎 (1975) ステビオサイドの利用技術と安全性。食品工業, 10下:44-49.
- 3) 三橋 博, 上野純子, 住田哲也 (1975) *Stevia rebaudina* Bertoni の栽培研究, Stevioside の定量について。薬学雑誌, 95:127-130.
- 4) 松実成忠 (1974) 甘味源としてのステビアをめぐるわが国の現状と問題点。食品工業, 5下:60-64.
- 5) 明石春雄, 横山幸雄 (1975) ステビア乾葉抽出物の安全性について。食品工業, 10下:34-43.
- 6) 藪 正章, 高瀬真理子, 戸田恭司, 谷本加代子, 安武愛記, 岩本義史 (1977) 天然甘味料 Stevioside について 数種の口腔細菌の増殖に及ぼす影響。廣大歯誌, 9:12-17.
- 7) 岩村淳一, 木下了彦, 石間紀男, 片山修, 守田豊重, 平尾子之吉 (1982) ステビオンド類の薄層デントメトリーによる直接定量と甘味強度。農化, 56:87-91.