

天然添加物である甘味料ステビアの免疫機能に及ぼす影響について

江川 恵理子¹⁾・細川 友秀¹⁾

Stevioside Effects on the Immune Function as a Natural Additive Sweetener

Eriko EGAWA and Tomohide HOSOKAWA

抄録：近年，我が国では人々の生活スタイルの多様化によって中食産業が成長を続けている。それに伴い加工食品の需要も高まり，その生産量が増加している。このような状況で食品添加物の需要もますます増加するものと予想される。

最近の自然・天然志向の高まりによって食品添加物も天然ならば安心であるという考えを多くの消費者が持っている。このような状況下で，長年使用されてきた天然添加物は安全性確認の試験が行われずに 1995 年に食品添加物として指定された。本研究では，現在幅広い用途で使用されている天然添加物である甘味料ステビアについて，その摂取が免疫機能に及ぼす影響について調べることにした。

甘味料ステビアの主成分がステビオサイドであることを考慮して，ステビオサイドの継続的な摂取が免疫機能に及ぼす影響についてマウスを用いて調べた。マウスにステビオサイドを 1 日 1 回 2 週間にわたって経口投与し，全身性免疫系と消化管免疫系の抗体産生機能に及ぼす影響を調べた。また，ステビオサイドを脾臓細胞の培養液に添加して，脾臓細胞の免疫機能に及ぼす直接的な影響についても評価した。その結果，ステビオサイドの継続的な摂取は，1 日摂取許容量（ADI）より少ない量では全身性免疫系の器官である脾臓と消化管免疫系の器官であるパイエル板の抗体産生機能をわずかに促進する傾向が認められ，ADI の約 4 倍量の継続的な摂取はこれらの免疫機能をわずかに抑制する傾向が認められた。しかしながら，これらの傾向は統計学的有意差が無く，調べたすべての投与量においてステビオサイドの経口投与は免疫機能に対して統計学的に有意な影響を及ぼさなかった。

キーワード：食品添加物，ステビア，脾臓細胞，パイエル板細胞，抗体産生機能

I. はじめに

食品添加物は，指定添加物，既存添加物，一般飲食物添加物，天然香料の 4 種類に分けることが出来る。一般に天然添加物とは，既存添加物，一般飲食物添加物，天然香料のことを指す。1995 年の「食品衛生法及び栄養改善法の一部を改正する法律」により，天然添加物の扱いに

1) 京都教育大学

対する大幅な改正が行われ、従来の指定制度の対象外であった天然添加物も指定制度の範囲に含まれることになった。それまでは、天然添加物は長年使用された経験に基づき安全であるとされてきただけで、安全性を科学的に確認されたものはほとんどなく、実質的に法規制を受けず自由に使用されていた。つまり、長年使用されてきた天然添加物は安全性を確認する試験を行わず、それまでの使用実績に基づき 1995 年に食品添加物として指定されたのである。

2004 年 7 月、天然添加物であるアカネ色素に遺伝毒性及び腎臓への発癌性が認められるとして、既存添加物名簿からアカネ色素を削除し、その使用等を禁止することになった。自然・天然志向が強く、天然であれば安心であるという考えは、多くの消費者が持っているが、その考えも今は見直さなければならない時期に来ている。

当研究室においては、食品添加物の免疫機能に及ぼす影響に注目していくつかの甘味料添加物を研究の対象としてきたが、それらは全て指定添加物であり安全とされている天然添加物については調べられていなかった。そこで、天然添加物である甘味料ステビアについて本研究で調べることにした。

ステビアと呼ばれる添加物は、「ステビア抽出物」、「フルクシルトランスフェラーゼ処理ステビア」、「 α -グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア」、「ステビア末」の 4 種類である。「ステビア抽出物」はキク科ステビア (*Stevia rebaudiana* BERTONI) の葉から抽出・精製したもの、「ステビア末」はキク科ステビアの葉を粉碎したもの、「 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 α -グルコシルトランスフェラーゼを用いてグルコースを付加したもの、「フルク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フルクシルトランスフェラーゼを用いてフルクトースを付加したものである。

4 種類のなかでも「ステビア抽出物」は、最も多く使用されていて、ほとんど無臭で清涼な甘味を示し、ショ糖の約 300 倍の甘味度を持ち、カロリーのない甘味料である。そのため、ダイエット飲料、漬物、冷菓、菓子類など、幅広い用途で使用されている。ステビア抽出物の主成分はステビオサイド ($C_{38}H_{60}O_{18}$ ，分子量 804.90) で、他にレバウジオサイド A，ズルコサイド A，レバウジオサイド C を含んでいる。本研究ではステビア抽出物の主成分で最も多く含まれるステビオサイドを使用した。

ステビア抽出物はこれまでに急性毒性試験，慢性毒性試験，発癌性試験，変異原性試験，催奇形性試験，繁殖毒性試験が行われ、これらの項目については安全性が確認されている。また、ステビア甘味料の 1 日摂取許容量 (ADI 量) が 2004 年 6 月 FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) において設定された。ADI 量とは、毎日一定量の食品添加物を食べさせ、一生食べ続けても有害な影響がみられない最大の用量を無毒性量とし、無毒性量の通常 100 分の 1 と定義している。天然物由来の甘味料ではステビア抽出物において初めて ADI 量が設定された。しかしながら、これまでに免疫機能に対する影響を調べる試験は行われていない。さらに、この ADI 量は暫定的なものであり、今後変更されることが予想される。このような点に注目し、本研究では天然添加物である甘味料ステビアの免疫機能に及ぼす影響について調べることにした。

II. 材料と方法

(1) マウス

我が研究室で維持した C3H/HeSlc マウスの 3～5 ヶ月齢の雌を使用した。

(2) 培養液と緩衝液

RPMI1640 完全培地: RPMI1640 粉末培地 (日水製薬, 東京) 5.1 g を再蒸留水 500 ml に溶かし, 120 °C で 20 分間オートクレーブして常温まで冷却した後, 7% 炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて pH 7.2 に調整し, 牛胎仔血清 (FCS, Bio Whittaker, Verviers, Belgium) を 5 %, L-グルタミンを 2 mM, 2-mercaptoethanol を 5×10^{-5} M, ペニシリン (ナカライテスク, 京都) が 100 U/ml, ストレプトマイシン (ナカライテスク) が 100 μ g/ml の濃度になるようにそれぞれ加えて完全培地とした。

イーグル MEM 培養液: イーグル MEM 粉末培地 (日水製薬) 4.7 g を再蒸留水 500 ml に溶かし, 120 °C で 20 分間オートクレーブして常温まで冷却した後, 7% 炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて pH 7.2 に調整した。

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.2): NaCl 8.0 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, KCl 0.2 g を再蒸留水 1 l に溶かし, 高圧蒸気滅菌した。

Coating buffer (pH 9.6): Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g, NaN_3 0.2 g を再蒸留水 1 l に溶かしてオートクレーブした。

Diethanolamine buffer: Diethanolamine 97 ml, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, NaN_3 0.2 g を再蒸留水 800 ml に溶かして 4 N HCl で pH 9.8 に調整し, 再蒸留水を加えて全量を 1 l にした後, オートクレーブした。

PBS Tween 液: Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) (ナカライテスク) 0.5 ml と NaN_3 0.2 g を PBS 1 l に溶解した。

0.2 % トリパンブルー溶液: Trypan blue (ナカライテスク) 0.2 g を PBS 100 ml に溶かした。

(3) 脾臓, 腸間膜リンパ節, パイエル板の各細胞懸濁液の調製

すべて無菌条件下で細胞懸濁液の調整操作を行った。マウスを脱血死させた後, 全身をアルコール消毒し, 腹部切開し, ピンセットとハサミを使って, 脾臓, 腸間膜リンパ節, 小腸の順に摘出した。小腸は, PBS を適量入れた 9 cm petri dish (Falcon 3003, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) 内で注射器と先の丸いゾンデ針を用いて腸管内を洗浄後, パイエル板を切り出した。イーグル MEM 培養液の中で, 各臓器に切り込みを数カ所入れ, ピンセットで挟み, ステンレスメッシュにこすりつけて細胞をほぐし出し, 得られた細胞浮遊液を脱脂綿で濾過し組織片などを取り除いた。1000 rpm で 10 分間の遠心操作を 3 回繰り返して細胞を洗い, 最後の遠心後上清を静かに捨てて RPMI1640 完全培地を加えて各臓器の細胞懸濁液をつくり, 細胞濃度を調整して実験に用いた。各細胞懸濁液の一部を採取して Thoma 計算盤にて細胞濃度を測定した。

(4) 血球計算盤による細胞数の測定

細胞液 25 μ l を 0.2 % トリパンプルー溶液 75 μ l にて 4 倍希釈し懸濁した後, Thoma 計算盤に流し込み, トリパンプルー溶液に染まった細胞を死細胞と判断し, 赤血球を除いて染まらない細胞を生細胞として数え, 細胞濃度を決定した。

(5) 脾臓, 腸間膜リンパ節, およびパイエル板細胞の培養

24-well plate (Falcon 3047: Becton Dickinson and Company) を用い, 各細胞を 1 well あたり 1.0×10^6 個滴下した。ポリクローナルな抗体産生反応を誘発するため, マイトージェンとして LPS (lipopolysaccharide: B *E.coli* 026:B6, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) を 0.01 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, または 1.0 μ g/ml の濃度に添加した。また, LPS 非添加群を対照として準備した。これらをあわせて 1 well あたり 2 ml になるように, RPMI 1640 培養液を加えて調整し, 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂, 加湿状態の CO₂ インキュベーター内で 7 日間培養した。

(6) ステビオサイドの経口投与

ステビアの ADI 量は 5 mg/kg ヒト体重であり, ステビオサイドに換算すると 2 mg/kg ヒト体重になる。それをマウス 20 g 体重に換算すると 0.1 mg である。この値を参考に 1 日のステビオサイドの投与量を 0.02 mg, 0.04 mg, 0.4 mg とした。これらの 1 日の投与量のステビオサイドを再蒸留水 0.4 ml に溶かし, ゾンデ針を用いてマウスに経口投与した。経口投与は 1 日 1 回 2 週間連続して行った。マウスはケージ内を自由に動き回れるようにし, 経口投与時以外は餌と水を自由に摂取できるようにした。対照群のマウスはステビオサイド投与群と同じように飼育し, ステビオサイドの代わりに再蒸留水 0.4 ml を同じ操作で投与した。

(7) ステビオサイドの細胞培養への添加

免疫細胞へのステビオサイドの直接作用の効果を調べるため, RPMI 1640 培養液で適当な濃度に調整したステビオサイド溶液を 0.22 μ m ポアサイズのシリンジフィルター (Corning, Corning, New York, USA) で滅菌して, 正常マウス (実験操作をしていないマウス) の脾臓細胞の LPS を加えた培養に様々な濃度で添加し, CO₂ インキュベーター内で 7 日間培養した。

(8) 酵素標識免疫吸着法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) による抗体量の測定

7 日間培養した各 well の上清中の総 IgM 抗体量を ELISA 法で定量した。96-well assay plate (Falcon 3915, Becton Dickison and Company) に, coating buffer で 10000 倍希釈したヤギ抗マウス Ig (IgG+IgM+IgA) 抗体 (Organon Teknika Co., Durham, North Carolina, USA) を 100 μ g/well ずつ分注し, 冷蔵庫内で一晩置いて抗体を固相化した。翌日, PBS Tween で各 well を 3 回ずつ洗浄し, 0.5 % ウシ血製アルブミン (BSA: ナカライテスク) を溶解した PBS (0.5 % BSA in PBS) で 1 時間室温に静置し各 well をブロックした。PBS Tween で各 well を 3 回ずつ洗浄し, 0.05 % BSA in PBS で 10 ~ 270 倍希釈 (LPS を添加しなかった培養の上清) または 100 ~ 2700 倍希釈 (LPS を添加した培養の上清) した培養上清を 100 μ l/well ずつ分注した。検量線用に, IgM ミエローマ蛋白 (Zymed Laboratories, San Francisco, California, USA) を段階

希釈して分注した。その後、これらの ELISA プレートを手袋に入れ 1 時間 30 分室温下に静置して、PBS Tween で各 well を 8 回ずつ洗浄し、16000 倍に希釈した alkaline phosphatase (AP) 標識 - ウサギ抗マウス IgM 抗体 (Zymed Laboratories) を $100 \mu\text{l/well}$ ずつ分注し、さらに 1 時間 30 分室温下に静置した。次に、PBS Tween で各 well を 8 回ずつ洗浄し、diethanolamine buffer で 1 mg/ml に溶解した p-nitrophenylphosphoric acid disodium salt (和光純薬) を $100 \mu\text{g/well}$ ずつ分注した。その後遮光し、室温で約 5 時間発色反応させ、マイクロプレートリーダーで各 well の 415 nm と 450 nm における吸光度の差を求めて比色定量した。IgM の総抗体産生量は、IgM のミエローマ蛋白によるスタンダード曲線により決定した。

(9) 有意差検定

任意の 2 群間の有意差検定は Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ のとき有意差があると判定した。

Ⅲ. 結 果

(1) ステビオサイド経口投与マウスの脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板の各細胞の抗体産生機能

水を経口投与したマウスを対照として、ステビオサイド 0.02 mg, 0.04 mg, または、0.4 mg を 1 日 1 回 2 週間経口投与したマウスの脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板の各細胞を個体ごとに LPS で刺激して 7 日間培養した。7 日後に、培養上清中に蓄積した IgM 抗体産生量を測定して、各免疫臓器の抗体産生機能についてステビオサイド投与群と水投与の対照群を比較した。この実験を 3 回繰り返して類似の結果が得られたので、3 回の実験分をあわせてデータ処理を行い、その結果を図 1 ～ 4 に示す。各実験群のマウスの個体数は 20 ～ 24 匹である。

脾臓細胞の IgM 抗体産生量をみると、LPS 無添加の培養条件では、ステビオサイドを ADI 量より少ない量の 0.02 mg/day と 0.04 mg/day 経口投与した群が水投与群に比べて、IgM 抗体産生量がわずかに増加する傾向がみられた。また、ADI 量の 4 倍にあたる 0.4 mg/day 経口投与した群は水投与群に比べて、IgM 抗体産生量がわずかに減少する傾向がみられた。しかし、いずれの場合においても統計学的な有意差はなかった。また、その他の培養条件ではステビオサイド経口投与の影響は見られなかった (図 1)。

腸間膜リンパ節細胞の IgM 抗体産生量をみると、どの培養条件においてもステビオサイドの経口投与による IgM 抗体産生量への影響はみられなかった (図 2)。

次に、パイエル板細胞の IgM 抗体産生量をみると、LPS を $0.1 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した培養条件では、ステビオサイドを 0.02 mg/day と 0.04 mg/day 経口投与した群が水投与群に比べて、IgM 抗体産生量がわずかに増加する傾向がみられた。しかし、いずれの場合においても統計学的な有意差はなかった。また、その他の培養条件ではステビオサイド経口投与の影響は見られなかった (図 3)。

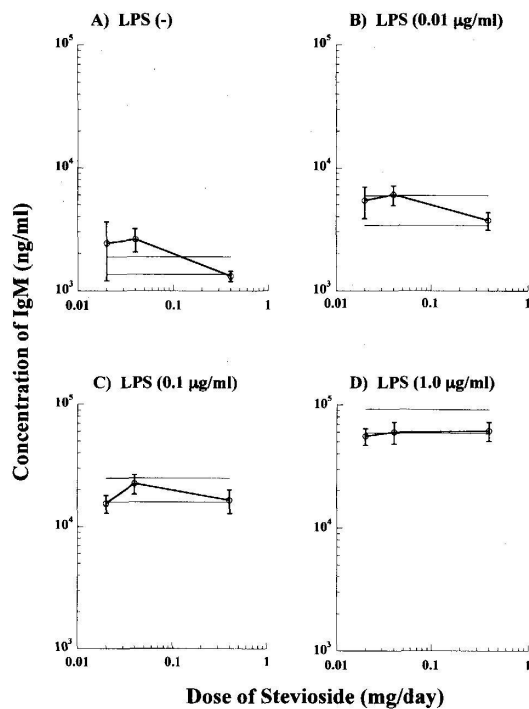


図 1. ステビオサイド投与マウスの脾臓の抗体産生機能

ステビオサイドを 0.02mg, 0.04mg, または 0.4mg 経口投与した (投与量を横軸に示す) マウスの脾臓細胞を A) LPS 無添加, B) LPS0.01 μ g/ml, C) LPS0.1 μ g/ml, または, D) LPS1.0 μ g/ml の条件で培養した。培養 1 週間後の培養上清中に産生されたポリクローナル IgM 抗体濃度の平均値と標準誤差を示す。各グラフの 2 本の水平線は水を経口投与した対照マウスの細胞培養による抗体濃度の平均値 $\pm$ 1 標準誤差の範囲を示す。

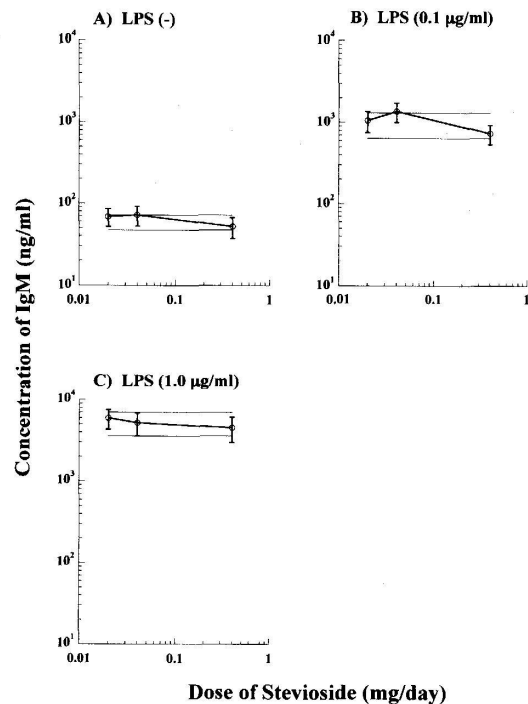


図 2. ステビオサイド投与マウスの腸管膜リンパ節の抗体産生機能

ステビオサイドを 0.02mg, 0.04mg, または 0.4mg 経口投与した (投与量を横軸に示す) マウスの腸管膜リンパ節細胞を, A) LPS 無添加, B) LPS0.1 μ g/ml, または, C) LPS1.0 μ g/ml の条件で培養した。培養 1 週間後の培養上清中に産生されたポリクローナル IgM 抗体濃度の平均値と標準誤差を示す。各グラフの 2 本の水平線は水を経口投与した対照マウスの細胞培養による抗体濃度の平均値 $\pm$ 1 標準誤差の範囲を示す。

(2) ステビオサイド経口投与によるマウスの体重変化

ステビオサイドの 1 日 1 回 2 週間の経口投与によるマウスの体重への影響を調べるため, 各実験群の投与前と投与終了後のマウスの体重を測定し比較した。結果を図 4 に示す。水投与群を含めて, どのステビオサイド投与群においても, 経口投与によるマウスの体重への影響は見られなかった。

(3) ステビオサイドの脾臓に対する直接作用の効果について

ステビオサイドを脾臓細胞の培養液に添加して, 脾臓細胞の免疫機能に及ぼす直接的な影響についても評価した。

何も処理していない正常マウスの脾臓細胞を 24-well 培養プレートの 1 well あたり 1.0×10^6 個滴下した。そこに, ステビオサイドを 0 (無添加), 1.0 μ g/ml, または, 100 μ g/ml の濃度

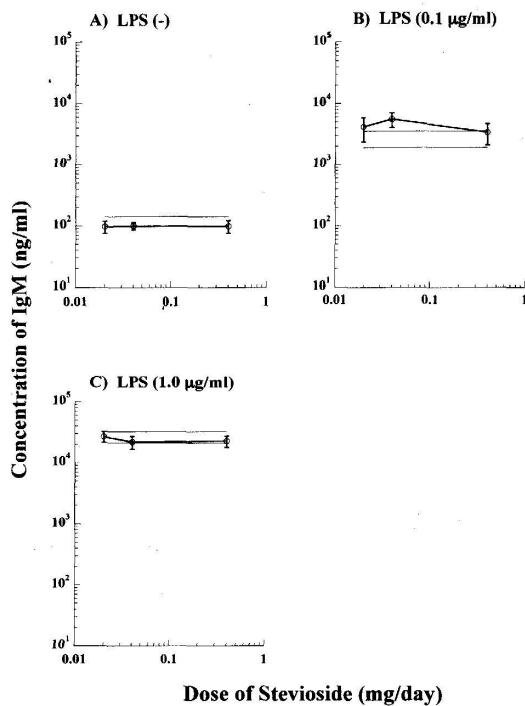


図3. ステビオサイド投与マウスのパイエル板の抗体産生機能

ステビオサイドを0.02mg, 0.04mg, または0.4mg 経口投与した（投与量を横軸に示す）マウスのパイエル板細胞を、A) LPS 無添加, B) LPS 0.01 μ g/ml, または、C) LPS 1.0 μ g/ml の条件で培養した。培養1週間後の培養上清中に産生されたポリクローナル IgM 抗体濃度の平均値と標準誤差を示す。各グラフの2本の水平線は水を経口投与した対照マウスの細胞培養による抗体濃度の平均値 $\pm$ 1標準誤差の範囲を示す。

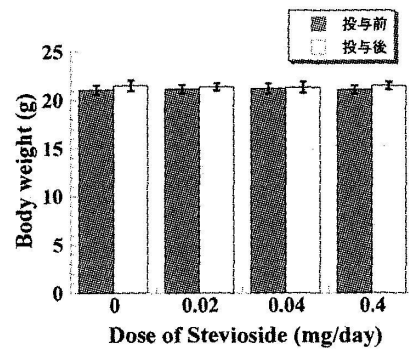


図4. ステビオサイド投与の体重への影響
ステビオサイドを0mg（水投与）、0.02mg, 0.04mg, または0.4mg 経口投与する（投与量を横軸に示す）前と投与期間終了後の各群マウスの体重変化を示す。

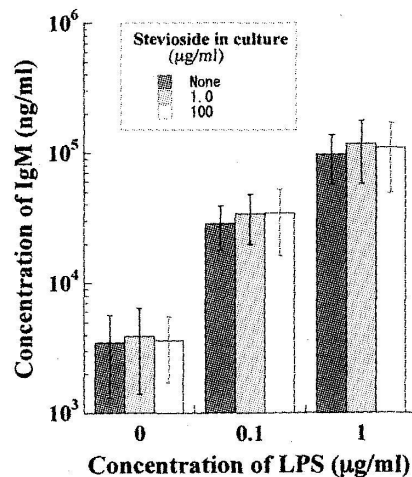


図5. ステビオサイド投与の体重への影響
ステビオサイドを0（無添加）、1.0 μ g/ml または、100 μ g/ml の濃度で脾臓細胞の培養に添加し、横軸に示す濃度のLPSによってポリクローナルな抗体産生反応を誘発した。1週間後の培養上清中に蓄積したIgM抗体濃度を示す。カラムとバーは、独立した3回の実験結果をあわせた9つの培養の平均値 $\pm$ 1SEを表す。

に添加し、0.1 μ g/ml, または、1.0 μ g/ml の濃度のLPSによってポリクローナルな抗体産生反応を誘発した。結果を図5に示すとおり、ステビオサイドの添加による脾臓細胞のIgM抗体産生量への影響は見られなかった。

IV. 考 察

継続的なステビオサイドの摂取が免疫機能に及ぼす影響について調べるため、マウスにステビオサイドの1日1回2週間の経口投与を行った。

経口投与を行う前と投与終了後のマウスの体重を比較した結果、水投与群、ステビオサイド投与群のいずれの場合においてもマウスの体重に影響は見られなかった。このことより、経口投与の操作による重大なストレスがマウスに負荷されたとは考えられない。また、ステビアの ADI 量をステビオサイドに換算すると 2 mg/kg ヒト体重になる。さらに、それをマウス 20 g 体重に換算すると 0.1 mg である。この値を参考に 1 日のステビオサイドの投与量を 0.02 mg, 0.04 mg, 0.4 mg と設定した。最大の投与量の 0.4 mg は ADI 量の 4 倍に相当する。しかし、この量においてもマウスの体重に変化はみられなかった。以上のことから、今回の経口投与の投与量において、ステビオサイドはマウスの全身状態に影響を与えなかったと考えられる。

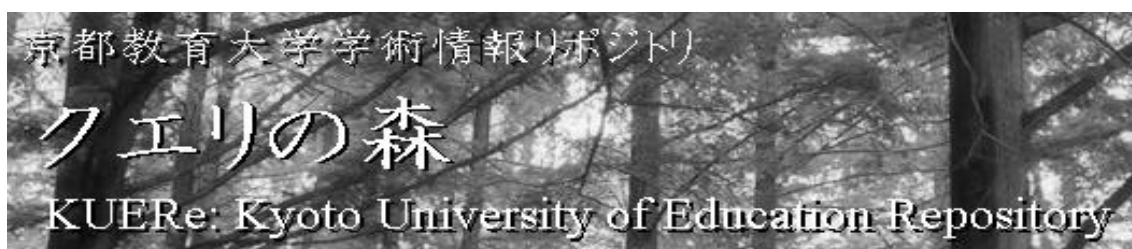
経口的に摂取されたステビオサイドが直接作用するのは消化管の免疫系である。そのため、消化管免疫系の腸間膜リンパ節とパイエル板の各細胞を用いてステビオサイド経口投与の免疫機能への影響を調べた。また、全身性免疫系への影響も調べるため脾臓細胞も用いた。結果は、脾臓とパイエル板で細胞の培養条件によっては、ステビオサイド経口投与の投与量効果が認められるようにも見えたが、マウスの個体差が大きく統計学的に有意な差ではなかった。結論としては、ポリクローナルな抗体産生機能について見る限り、ADI 量の 4 倍程度までのステビオサイドの経口摂取は免疫機能に影響を与えないと言える。しかしながら、NK 活性やマクロファージによる NO 産生などの細胞性免疫機能に及ぼす影響については調べていないので不明である。

また、ステビオサイドが脾臓細胞の免疫機能に直接的に影響を及ぼすか調べたが、脾臓細胞の IgM 抗体産生量に影響はみられなかった。ポリクローナルな抗体産生反応で見る限り、ステビオサイドは脾臓細胞の免疫機能に直接影響は及ぼさないと考えられる。

ヒト腸内細菌叢におけるステビオサイドおよびレバウジオサイド A の最終代謝産物はステビオールである。また、ステビオールについては酸化代謝がそれ以上進行せず、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。ステビア経口投与後のラットの血漿中のステビオール濃度は、投与 2 時間後で初めてステビオールが検出され、8 時間後まで増加する。つまり、ステビアは腸内細菌叢によってステビオールに代謝された後、ゆっくりと吸収され、腸肝臓循環後は主に糞便中に排泄される。今回使用したステビオサイドでは影響はないと考えられるが、ステビオールでは違う結果が得られる可能性がある。また、パイエル板、腸間膜リンパ節などの消化管付随免疫器官へのステビオールの直接的な影響を調べる必要があるだろう。

参考文献

- 1) 食品添加物事典 (1999) 総合食品安全事典編集委員会編, 産業調査会.
- 2) 岸 真之輔 (1998) 既存添加物と天然香料, 食品素材. 天然物便覧, 食品と科学社.



この文献は、国立情報学研究所において電子化されたものを、本学でテキスト加工したものです。

