

GENOTOXICITY STUDIES OF STEVIA EXTRACT AND STEVIOL BY THE COMET ASSAY

Kaoru SEKIHASHI^{1,*}, Hiromi SAITOH^{2,**} and Yu F. SASAKI²

¹*Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd.,
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo 004-0839, Japan*

²*Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National College of Technology,
16-1 Uwanotai, Tamonoki, Hachinohe, Aomori 039-1192, Japan*

(Received March 12, 2002; Accepted August 2, 2002)

ABSTRACT — The genotoxicity of steviol, a metabolite of stevia extract, was evaluated for its genotoxic potential using the comet assay. In an *in vitro* study, steviol at 62.5, 125, 250, and 500 $\mu\text{g/ml}$ did not damage the nuclear DNA of TK6 and WTK1 cells in the presence and absence of S9 mix. *In vivo* studies of steviol were conducted by two independent organizations. Mice were sacrificed 3 and 24 hr after one oral administration of steviol at 250, 500, 1000, and 2000 mg/kg. DNA damage in multiple mouse organs was measured by the comet assay as modified by us. After oral treatment, stomach, colon, liver, kidney and testis DNA were not damaged.

The *in vivo* genotoxicity of stevia extract was also evaluated for its genotoxic potential using the comet assay. Mice were sacrificed 3 and 24 hr after oral administration of stevia extract at 250, 500, 1000, and 2000 mg/kg. Stomach, colon and liver DNA were not damaged. As all studies showed negative responses, stevia extract and steviol are concluded to not have DNA-damaging activity in cultured cells and mouse organs.

KEY WORDS: Stevia extract, Steviol, Comet assay

Correspondence : Yu F. SASAKI

* Present address, Toxicology Laboratory, Taisho Pharmaceutical Co.,Ltd.,
1-403 Yoshino-cho, Saitama-shi, Saitama 330-8530, Japan

**Present address, Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Kashima Laboratory, Genetic Toxicology Group,
14 Sunayama, Hasaki-cho, Kashima-gun, Ibaragi 314-0225, Japan

Vol. 27 Suppl. I

コメットアッセイによるステビア抽出物およびステビオールの遺伝毒性試験

關橋 薫^{1,*}, 齋藤 宏美^{2,**}, 佐々木 有²

¹株式会社化合物安全性研究所

〒004-0839 北海道札幌市清田区真栄363-24

²八戸工業高等専門学校物質工学科

〒039-1192 青森県八戸市田面木上野平16-1

要 約 — 甘味料ステビア抽出物の安全性試験の一環として、ステビア抽出物およびその代謝物であるステビオールの遺伝毒性をコメットアッセイで評価した。ステビオールは*in vitro*と*in vivo*の両方で、ステビア抽出物は*in vivo*で検討した。

in vitro コメットアッセイではヒトリンパ芽球細胞株TK6およびWTK-1を用いた。ステビオールの1000 µg/mlでは著しい細胞生存率の低下がみられたことから、生細胞数が70%を下回らない濃度としてラット肝由来の代謝活性化系の有無に関わらず500 µg/ml以下で評価した。代謝活性化系の有無に関わらず500 µg/ml以下で統計学的に有意なDNA損傷の増加はみられなかった。以上の結果から、本試験条件下において、ステビオールには代謝活性化系の有無に関わらず*in vitro*でDNA損傷誘発性はないと考えられた。

ステビア抽出物およびステビオールの致死用量は2000 mg/kg以上であることから、最高用量を2000 mg/kgとしてマウスに単回強制経口投与し、3および24時間後に肝、腎、胃、結腸、精巣でDNA損傷性を検討した(ステビア抽出物では肝、胃、結腸のみ)。ステビア抽出物およびステビオール投与群では、いずれの臓器においても統計学的に有意なDNA損傷の増加はみられなかった。以上の結果から、本試験条件下において、ステビア抽出物およびステビオールには評価対象としたマウスのいずれの臓器に対してもDNA損傷誘発性はないと考えられた。

結 言

ステビア抽出物とは、キク科植物ステビア(*Stevia rebaudiana Bertoni*)の葉より、室温時もしくは熱時水で

抽出し、精製して得られたものである。ステビオサイドおよびレバウディオサイドAを主成分とし、蔗糖の約200倍の甘味を持ち、我が国では「ステビア抽出物およびステビア末」として既存添加物名簿に収載されて使用が認められている食品添加物である。一方、EU委員会では1999年6月に新規添加物としての評価が行われ、新規の添加物として承認することはできない旨の評価が1999年11月に「甘味料としてのステビア抽出物に関する意見」として公表された(厚生省生活衛生局食品化学課, 1999)。その理由は(1) 試験に供されたステビア抽出物の純度が明確ではない、(2) 腸内細菌による代謝物であるステビオールについて*in vitro*の遺伝毒性が陽性との結果がある、(3) 小核試験では陰性とされるが、代謝試験および追加の遺伝毒性試験が必要である、(4) 葉の水性粗エキスを繁殖毒性(特に雄精巣への影響)が認められており、ステビアの純度を明確にした上で再試験が必要である、というものであった。なお、以上の評価はイタリア企業から提出された資料を基に行われたものであり、評価の時点(1999年11月)では食品添加物として許可するために必要な全てのデータが提出されていないという認識であり、ステビア抽出物の安全性に疑問が呈されているものではなかった(厚生省生活衛生局食品化学課, 1999; 掛川, 2001)。以上のEUの指摘事項の中には我が国においては既存の資料もあるものの、ADI設定等に向け、規格の設定、*in vivo*での遺伝毒性評価、代謝試験等を実施する必要が認められるに至った(厚生省生活衛生局食品化学課, 1999)。

ステビア抽出物およびステビオールの遺伝毒性については、既に広範囲の試験が実施されている(厚生省生活衛生局食品化学課, 1999)。ステビア抽出物は純

* 現所属, 大正製薬株式会社医薬研究所安全性研究室

**現所属, 三菱化学安全科学研究所鹿島研究所 応用生物研究部 遺伝毒性グループ

度50%のステビオサイドについてAmes試験と染色体異常試験で陽性となっている例(石館ら, 1980)を除き, ステビア粗エキス, 同精製エキス, 同粗結晶はAmes試験とDNA修復試験で陰性, 純度85%のステビオサイドはAmes試験と染色体異常試験で陰性と報告されている(Matsui *et al.*, 1996)。一方, ステビオールについてはAmes試験とDNA修復試験で陰性であるものの, 前進突然変異試験, Umu test, 染色体異常試験ではいずれもS9 mix存在下で陽性とされている(Matsui *et al.*, 1996)。しかし, ステビオールは*in vivo*のマウス小核試験では陰性であることから(義平ら, 1987), 直ちに生体への悪影響が懸念されるものではないと考えられていた。以上の既存の遺伝毒性の成績を受け, 平成11年12月21日に開催された厚生省食品衛生調査会毒性部会・添加物合同部会では, 骨髄以外の臓器におけるステビアの遺伝毒性をコメットアッセイによって検討することが提案された(厚生省生活衛生局食品化学課, 1999)。本報告はステビア工業会の委託に基づいてステビア抽出物およびステビアの遺伝毒性をコメットアッセイによって検討したものをまとめたものである。ステビア抽出物の遺伝毒性は*in vivo*でのみ検討したが, ステビアについては*in vitro*および*in vivo*の両試験を実施した。特に, ステビアの*in vivo*コメットアッセイは二研究機関で独立して行った。ステビアの*in vivo*コメットアッセイのうちの一試験(試験B)のみを株式会社化合物安全性研究所において実施し, 他の全ての試験は八戸工業高等専門学校物質工学科・佐々木研究室において実施した。コメットアッセイに関する毒性試験指針は未だ公表されていないが, 本試験はInternational Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP, Washington, D.C., 1999年)における専門家会議の合意事項(Tice *et al.*, 2000)を順守して, 具体的にはSasaki *et al.* (2000)の方法に従って行った。

実験材料および方法

被験物質

1. ステビオール

ステビオール (ent-13-hydroxykaur-16-en-19-oic acid, $C_{20}H_{30}O_3$)は丸善製薬株式会社で製造されたものであり, Lot No. Lab. No. A-560 (99.9%)およびLot No. Lab. No. A-666 (99.1%)を用いた。*In vivo*コメットアッ

セイのうちの試験AではLot No. Lab. No. A-560を, 試験BではLot No. Lab. No. A-666を用いた。

2. ステビア抽出物

ステビア抽出物はステビロース90Mとして市販されているもののうち, Lot No. WA2413000 (総ステビオサイド含量: 88.28% (無水物当り))を用いた。本被験物質に含まれるステビオール配糖体は以下の通りであった。

ステビオール配糖体主要4成分*	85.30% (無水物当り)
ステビオサイド:	51.76% (無水物当り)
レバウディオサイド-A:	22.25% (無水物当り)
レバウディオサイド-C:	8.53% (無水物当り)
ズルコサイド-A:	2.76% (無水物当り)
ルブソサイド:	1.20% (無水物当り)
ステビオールピオサイド:	1.51% (無水物当り)

*ステビオサイド, レバウディオサイド-A, C, ズルコサイド-A

ステビアに関する*in vitro*コメットアッセイ

1. 供試細胞

ヒトリンバ芽球細胞株TK6およびWTK-1を用いた(国立医薬品食品衛生研究所の本間正充博士より分与)。WTK-1細胞は*p53*に異常を持つため, 両者は同一細胞(WIL-2)由来でありながら*p53*の状態が異なる細胞株である。いずれの細胞株も10%(v/v)で牛胎仔血清(HyClone Laboratories, Inc. (U.S.A))を含むRPMI1640培地(日水製薬株式会社)にビルビン酸ナトリウムを200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ストレプトマイシン硫酸塩(和光純薬工業株式会社)を100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加した培地で37℃, 5% CO_2 下で培養した。

2. *In vitro*コメットアッセイ

ステビオール (Lot No. Lab. No. A-666)はDimethyl sulfoxide (DMSO, 和光純薬工業株式会社)に最終処理濃度の200倍の濃度を基準に溶解した。対数的に増殖しているWTK-1細胞を 1×10^6 cell/mlに希釈し, 上記のように調製したステビア薬液を培地中に添加し, そのまま2および4時間培養を継続することで細胞を処理した。4時間の処理終了後に生細胞数が70%を下回らない程度の細胞毒性(トリパンブルー染色法による)が認められる処理濃度を最高処理濃度とした。被験薬物処理は代謝活性化系(S9 mix)の存在下と非存

在下で行った。代謝活性化系の組成の処理培地中の濃度は4 mM MgCl₂, 16.5 mM KCl, 2.5 mM Glucose-6-phosphate, 2 mM NADPH, 2 mM NADP, 50 mM Phosphate buffer (pH 7.4), 5% S9とした。S9はフェノバルビターエルと5,6-ベンゾフラボンを前投与したSD雄ラット肝から調製したものをオリエンタル酵母工業株式会社(Lot No.: 01080305, 2001年8月3日調整)から購入した。なお、陰性対照としてステビオールの溶媒であるDMSOで、陽性対照としてMethyl methanesulfonate (MMS) (代謝活性化系非存在下)およびBenzo[a]pyrene (B[a]P) (代謝活性化系存在下)で細胞を処理した。2および4時間の被験薬物処理後直ちに遠心分離によって細胞を分離し、Miyamae *et al.* (1997)に記載された方法に従って試験を実施した。

ステビオールに関する*in vivo*コメットアッセイ

1. 供試動物および群構成

1) 試験A (八戸工業高等専門学校・佐々木研究室において実施)

BDF1マウス雄(日本エスエルシー株式会社)を用いた。動物は8週齢で購入し、1週間馴致の後、9週齢で試験に供した。動物は馴致および試験期間を通じて室温約25℃, 明暗サイクル12時間(7時点灯, 19時消灯)で飼育した。飼料には固形飼料MF(オリエンタル酵母工業株式会社)を、飲水は八戸市営水道水を、いずれも自由に摂取させた。

2) 試験B (株式会社化合物安全性研究所において実施)

Crj:CD-1系の雄性マウス(日本チャールス・リバー株式会社)を用いた。動物は7週齢で購入し、1週間馴致の後、8週齢で試験に供した。動物は馴致および試験期間を通じて温度23±3℃, 湿度55±20%, 換気回数10~15回/時間, 明暗サイクル12時間(8時点灯20時まで点灯)で飼育した。飼料にはγ線照射固形飼料CRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社)を、飲水は札幌市水道水(マイクロフィルター通過済み)を、いずれも自由に摂取させた。

2. 投与用量および群の構成

ステビオールのマウス経口投与のLD50は>2000 mg/kgであることから、ステビオールの投与用量は250, 500, 1000, 2000 mg/kgとした。ステビオールはオリーブ油(試験Aでは日興製薬株式会社, Lot No.247131,

試験Bではヤクハン製薬株式会社, Lot No.902132)に溶解して1回経口投与した。陰性対照群では溶媒のオリーブ油を、陽性対照群ではMMS(試験AではAldrich Chemical Company, Inc., Lot No.06609JYを160 mg/kgで経口投与, 試験BではAldrich Chemical Company, Inc., Lot No.HS09419LRを80 mg/kgで腹腔内投与)を投与した。いずれの群も動物数は4匹, 投与容量は20 ml/kgとした。

3. *In vivo*コメットアッセイ

試験Aでは肝, 胃, 結腸を、試験Bでは肝, 腎, 結腸, 精巣とした。これは、肝, 胃, 結腸の組み合わせが*in vivo*遺伝毒性を検出するためにもっとも感度が高いこと、ステビオールで精巣への影響が認められたとのEU委員会の評価に基づいたものである。投与3, 24時間後に頸椎脱臼によって動物を屠殺し、直ちに対象臓器を摘出し、Sasaki *et al.* (1997, 2000)の方法に従って試験を実施した。

ステビア抽出物に関する*in vivo*コメットアッセイ

ステビオールに関する*in vivo*コメットアッセイのうち試験Aと完全に同様とした。ただし、ステビア抽出物は生理食塩水に溶解し、ステビア粗エキス, 同精製エキス, 同粗結晶のマウス経口投与のLD50は、各々、17073 mg/kg, >42000 mg/kg, >15000 mg/kgであることから、ステビア抽出物の投与用量は500, 1000, 2000 mg/kgとした。陰性対照群では生理食塩水を、陽性対照群ではMMS (Aldrich Chemical Company, Inc., Lot No.06609JY)を160 mg/kgで投与した。いずれの群も動物数は4匹, 単回経口で投与容量は10 ml/kgとした。

試験成績

ステビオールに関する*in vitro*および*in vivo*コメットアッセイ

*In vitro*コメットアッセイの試験成績をTable 1に示した。1000 μg/mlでは著しい細胞生存率の低下がみられたことから、生細胞数が70%を下回らない濃度として代謝活性化系の有無に関わらず500 μg/ml以下でMigrationの値を測定した。代謝活性化系の有無に関わらず500 μg/ml以下でMigrationの値に統計学的に有意な増加はみられなかった。一方、陽性対照群ではMigrationの値は統計学的に有意な高値であった。以上

の結果から、本試験条件下において、ステビオールには代謝活性化系の有無に関わらず*in vitro*でDNA損傷誘発性はないと考えられた。

*In vivo*コメットアッセイの試験成績をTable 2 (試験A), Table 3 (試験B)に示した。いずれの試験においてもステビオールを投与した全ての群、および陰性陽性対照群において動物の死亡例はみられなかった。また、全ての群において、投与後に動物の一般状態の異常および剖検時の異常はみられなかった。ステビオール投与群においては、肝、胃、結腸、精巣のいずれの臓器でもMigrationの値に統計学的に有意な増加はみられなかった。一方、MMSを投与した陽性対照群では、肝、胃、結腸のいずれの臓器でもMigrationの値は統計学的に有意な高値であった。以上の結果から、本試験条件下において、ステビオールにはマウス肝、胃、結腸、精巣のいずれの臓器に対してもDNA損傷誘発性はないと考えられた。二つの独立した研究機関で実施された以上の試験には供試動物の系統に違いはあるものの、いずれの結果もステビオールにDNA損傷誘発性が認められなかったという一致した結果を示したものである。

ステビア抽出物に関する*in vivo*コメットアッセイ

ステビア抽出物を投与した全ての群、および陰性陽性対照群において動物の死亡例はみられなかった。また、全ての群において、投与後に動物の一般状態の異常および剖検時の異常はみられなかった。

試験成績をTable 4に示した。ステビア抽出物投与群においては、肝、胃、結腸のいずれの臓器でもMigrationの値に統計学的に有意な増加はみられなかった。一方、MMSを投与した陽性対照群では、肝、胃、結腸のいずれの臓器でもMigrationの値は統計学的に有意な高値であった。

以上の結果から、本試験条件下において、ステビア抽出物にはマウス肝、胃、結腸のいずれの臓器に対してもDNA損傷誘発性はないと考えられた。

考 察

ステビア抽出物に含まれる配糖体は腸内細菌によってアグリコンであるステビオールに代謝される(掛川, 2001)。消化管腔内には多くの微生物が生息し、胃、小腸、大腸と消化管下部に移行するに従い腸内細菌は増加し、ヒト大腸内には100種100兆個もの腸内細菌

Table 1. *In vitro* comet assay with steviol.

Concentration (μg/ml)		Migration (μm, mean ± SEM of 50 cells) ^a			
		TK6		WTK1	
		2 hr	4 hr	2 hr	4 hr
Without S9					
Steviol	0	23.3 ± 0.35 (100)	23.3 ± 1.17 (100)	23.9 ± 0.36 (100)	24.1 ± 0.62 (100)
	62.5	20.7 ± 0.58 (103.8)	22.2 ± 0.30 (88.3)	24.7 ± 1.21 (102.4)	23.7 ± 0.86 (95.1)
	125	24.3 ± 0.39 (95.3)	25.3 ± 0.72 (93.2)	28.5 ± 1.66 (83.2)	26.3 ± 0.61 (93.2)
	250	27.1 ± 0.34 (88.3)	27.1 ± 0.65 (77.3)	28.4 ± 1.59 (80.0)	28.6 ± 1.11 (73.3)
	500	28.2 ± 0.60 (75.2)	27.5 ± 0.57 (72.9)	25.6 ± 3.60 (70.3)	28.5 ± 0.91 (82.5)
	1000	-(29.3)	-(20.4)	-(44.3)	-(24.1)
MMS	10		35.5 ± 3.09* (85.1)		50.2 ± 2.07* (78.5)
With S9					
Steviol	0	22.2 ± 0.57 (100)	22.3 ± 1.28 (100)	23.0 ± 0.57 (100)	23.7 ± 1.19 (100)
	62.5	23.8 ± 0.88 (99.4)	22.4 ± 1.52 (85.2)	22.2 ± 1.03 (100.5)	22.3 ± 1.14 (83.1)
	125	25.7 ± 2.22 (82.5)	23.8 ± 0.58 (93.1)	23.2 ± 1.70 (95.3)	22.9 ± 1.45 (105.1)
	250	28.9 ± 1.16 (86.3)	26.3 ± 1.63 (77.5)	24.6 ± 1.70 (88.5)	27.9 ± 1.84 (77.3)
	500	27.9 ± 2.04 (73.1)	27.1 ± 1.86 (75.2)	24.4 ± 1.69 (75.3)	24.9 ± 0.94 (78.5)
	1000	-(18.4)	-(10.2)	-(25.0)	-(13.1)
B[a]P	100		48.4 ± 4.04* (88.1)		45.6 ± 3.46* (98.4)

^a Cell viabilities (%) are shown in the parenthesis.

Significant difference: * $p < 0.001$ (Dunnett test).

Table 2. *In vivo* comet assay in mice organs with steviol (Experiment A).

Compound	Dose (mg/kg)	Sampling time (hr)	Migration (μm , Mean \pm SEM of 4 animals)		
			Liver	Stomach	Colon
Olive oil	0	3	2.98 \pm 0.33	6.52 \pm 1.07	7.24 \pm 0.66
Steviol	250	3	1.61 \pm 0.54	4.34 \pm 0.29	6.17 \pm 1.65
	500	3	2.36 \pm 0.49	4.67 \pm 0.56	6.37 \pm 0.24
	1000	3	2.20 \pm 2.22	5.51 \pm 1.13	7.32 \pm 1.35
	2000	3	2.18 \pm 0.52	4.83 \pm 0.24	5.35 \pm 0.52
MMS	160	3	38.3 \pm 17.3**	49.5 \pm 7.39***	52.6 \pm 8.86**
Olive oil	0	24	2.36 \pm 0.57	7.29 \pm 0.52	5.58 \pm 0.45
Steviol	250	24	2.12 \pm 0.49	5.89 \pm 0.62	4.36 \pm 0.43
	500	24	1.89 \pm 0.86	4.43 \pm 0.99	4.87 \pm 0.37
	1000	24	1.29 \pm 0.21	6.23 \pm 0.74	5.96 \pm 0.58
	2000	24	1.51 \pm 0.36	4.81 \pm 0.39	5.15 \pm 0.39
MMS	160	24	44.5 \pm 6.90***	42.8 \pm 1.63***	25.5 \pm 1.75***

Significant difference: ** 0.001 < p < 0.01; *** p < 0.001 (Dunnett test).

Table 3. *In vivo* comet assay in mice organs with steviol (Experiment B).

Compound	Dose (mg/kg)	Sampling time (hr)	Migration (μm , Mean \pm SEM of 4 animals)			
			Liver	Kidney	Colon	Testis
Olive oil	0	3	1.07 \pm 0.45	1.60 \pm 0.22	9.78 \pm 0.55	0.83 \pm 0.24
Steviol	500	3	1.78 \pm 0.18	1.21 \pm 0.58	8.29 \pm 1.22	0.63 \pm 0.35
	1000	3	1.21 \pm 0.37	2.38 \pm 0.52	6.73 \pm 0.68	1.03 \pm 0.56
	2000	3	2.04 \pm 0.40	1.95 \pm 0.24	7.31 \pm 0.97	1.28 \pm 0.45
MMS	80	3	50.6 \pm 4.08***	38.5 \pm 1.97***	37.9 \pm 1.48***	39.3 \pm 2.34***
Olive oil	0	24	1.07 \pm 0.33	1.40 \pm 0.60	6.98 \pm 1.27	0.42 \pm 0.33
Steviol	500	24	1.75 \pm 0.70	0.90 \pm 0.36	6.18 \pm 0.59	0.97 \pm 0.40
	1000	24	1.54 \pm 0.23	2.14 \pm 0.41	7.42 \pm 0.89	0.85 \pm 0.29
	2000	24	1.45 \pm 0.32	1.88 \pm 0.16	5.54 \pm 0.50	0.41 \pm 0.26

Significant difference: *** p < 0.001 (Dunnett test).

Table 4. *In vivo* comet assay in mice organs with stevia extract.

Compound	Dose (mg/kg)	Sampling time (hr)	Migration (μm , Mean \pm SEM of 4 animals)		
			Liver	Stomach	Colon
Olive oil	0	3	2.27 \pm 0.63	6.69 \pm 0.82	7.15 \pm 0.87
Stevia extract	500	3	1.59 \pm 0.24	6.26 \pm 0.72	5.70 \pm 0.58
	1000	3	0.97 \pm 0.10	3.50 \pm 0.68	5.07 \pm 1.05
	2000	3	2.51 \pm 0.51	5.32 \pm 1.02	4.25 \pm 0.36
MMS	160	3	38.3 \pm 17.3**	49.5 \pm 7.39***	52.6 \pm 8.86**
Olive oil	0	24	1.40 \pm 0.26	6.14 \pm 1.07	7.28 \pm 1.02
Stevia extract	500	24	1.21 \pm 0.41	5.56 \pm 0.89	5.15 \pm 0.53
	1000	24	2.00 \pm 0.48	7.07 \pm 1.36	6.36 \pm 0.48
	2000	24	2.08 \pm 0.50	6.83 \pm 0.84	6.71 \pm 1.24
MMS	160	24	44.5 \pm 6.90***	42.8 \pm 1.63***	25.5 \pm 2.75***

Significant difference: ** 0.001 < p < 0.01; *** p < 0.001 (Dunnett test).

菌が生育している。この総菌数はヒトの全細胞数に匹敵し、無数の酵素が存在し、腸管腔内であらゆる酵素反応が進行している。したがって、消化管腔は体外ではあるが、多くの薬物の解毒、毒性化、活性化に重要な役割を果たしている(赤尾, 2000)。ニトロ基、アゾ基は腸内細菌によりアミンに還元代謝される。癌原性ニトロ化合物、アゾ化合物の多くは代謝の場である結腸に強い遺伝毒性を示し、その他の複数の臓器でも陽性であった(Sasaki *et al.*, 2000; Tsuda *et al.*, 2000)。このことから、投与された薬物が消化管内で代謝されて遺伝毒性物質が生成する場合には、消化管でコメットアッセイの陽性結果が得られるものと推測される。しかしながら、ステビア抽出物は結腸のみならずその他の臓器に遺伝毒性を示さなかった。すなわち、マウスの消化管内でステビアから生成する代謝物には遺伝毒性活性がないことを示唆するものと考えられる。このことは、ステビア抽出物だけでなくその代謝物であるステビオール自身に結腸およびその他の臓器に対する遺伝毒性が認められなかったことにより明らかである。

ステビア抽出物は純度50%のステビオサイドについてAmes試験と染色体異常試験で陽性となっている例(石館ら, 1980)を除き、ステビア粗エキス、同精製エキス、同粗結晶はAmes試験とDNA修復試験で陰性、純度85%のステビオサイドはAmes試験と染色体異常試験で陰性と報告されている(Matsui *et al.*, 1996)。一方、ステビオールについては、前進突然変異試験, umu test, 染色体異常試験ではいずれもS9 mix存在下で陽性とされているが(Matsui *et al.*, 1996), Ames試験, DNA修復試験, *in vivo*のマウス小核試験は陰性と報告されている(義平ら, 1987)。ここで示したステビア抽出物とステビオールに関するコメットアッセイの結果は、以上の遺伝毒性試験の陰性データと一致するものである。

コメットアッセイはDNA損傷をDNA鎖切断とアルカリ感受性部位として検出するものである(Singh *et al.*, 1988; Fairbairn *et al.*, 1995)。*In vivo*コメットアッセイは齧歯類に対する変異癌原物質に対して高い陽性率を示す一方で非癌原物質に対しては高い陰性率を示すことが既に示されている(Sasaki *et al.*, 2000)。すなわち, *in vivo*コメットアッセイの陽性結果が当該化合物がマウスにおいて癌原性を有することを強く示唆する一方で、その陰性結果は検討した化合物がマウス非癌原物質である可能性を示す有力な証拠となるものである。

ステビア抽出物(ステビオサイド74.54%, レバウディオサイド-A 16.27%)およびステビオサイド(純度85%)をラットに2年間混餌投与した慢性毒性・発癌性試験でも明確な毒性作用および発癌性はみられていない(Yamada *et al.*, 1985; Xili *et al.*, 1992)。ここで示したステビア抽出物およびステビオールのコメットアッセイ陰性の結果は、これらにDNA初期損傷誘発性がないことを示すのみならず、慢性毒性・発癌試験の陰性成績を傍証するものと言える。

慢性毒性・発癌試験の陰性成績のみならず*in vivo*の遺伝毒性試験の陰性結果(小核試験および本報告のコメットアッセイ)から、S9 mix存在下の一部の*in vitro*遺伝毒性試験で陽性結果がみられているものの、ステビア抽出物およびステビオサイドに直ちにヒトへの安全性が懸念されるような遺伝毒性はないと推察される。

参考文献

- 赤尾光昭(2000):薬物の代謝に関与する腸内細菌の酵素系, 薬物代謝学第2版(加藤隆一, 鎌滝哲也編), 東京化学同人, 55-61.
- 石館基, 吉川邦衛, 祖父尼俊雄(1980):食品添加物の変異原性試験成績-昭和54年度厚生省試験研究費による第一次スクリーニング・データ(第一回), 変異原性と毒性, **12**, 82-90.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L. (1995): The comet assay: A comprehensive review, *Mutat. Res.*, **339**, 37-59.
- 掛川邦男(2001):ステビア甘味料における最新の安全性評価, 月刊フードケミカル, 2001-12, 41-46.
- 厚生省生活衛生局食品化学課(1999):99/12/21 食品衛生調査会毒性部会・添加物合同部会議事録
- Matsui, M., Matsui, K., Kawasaki, Y., Oda, Y., Noguchi, T., Kitagawa, Y., Sawada, M., Hayashi, M., Nohmi, T., Yoshihira, K., Ishidate, Jr M. and Sofuni, T. (1996): Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six *in vitro* and one *in vivo* mutagenicity assays, *Mutagenesis*, **11**, 573-579
- Miyamae, Y., Iwasaki, K., Kinae, N., Tsuda, S., Murakami, M., Tanaka, M. and Sasaki, Y.F. (1997): Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single cell gel electrophoresis (SCG) assay: 2. Relationship between DNA migration and alkaline

- condition, *Mutat. Res.*, **393**, 107-113.
- Sasaki, Y.F., Tsuda, S., Izumiyama, F. and Nishidate, E. (1997): Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Mutat. Res.*, **388**, 33-44.
- Sasaki, Y.F., Sekihashi, K., Izumiyama, F., Nishidate, E., Saga, A., Ishida, K. and Tsuda, S. (2000) : The comet assay with multiple mouse organs: Comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC Monographs and U.S. NTP carcinogenicity database, *Crit. Rev. Toxicol.*, **30**, 629-799.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell. Res.*, **175**, 184-191.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C. and Sasaki, Y.F. (2000): The Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing, *Environ. Mol. Mutag.*, **35**, 206-221.
- Tsuda, S., Matsusaka, N., Madarame, H., Ueno, S., Susa, N., Ishida, K., Kawamura, N., Sekihashi, K. and Sasaki, Y.F. (2000) : The comet assay in eight mouse organs: Results with 24 azo compounds, *Mutat. Res.*, **465**, 11-26.
- Yamada, A., Ohgaki, S., Noda, T. and Shimizu, M. (1985): Chronic toxicity study of dietary stevia extract in F344 rats, *食衛誌*, **26**, 169-183.
- 義平邦利, 松井道子, 石館基 (1987) : 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.
- Xili, L., Chengjian, B., Eryi, X., Reiming, S., Yuengming, W., Haodong, S. and Zhiyian, H. (1992): Chronic oral toxicity and carcinogenicity study in stevioside in rats, *Food Chem. Toxicol.*, **30**, 957-965.