

2015年4月10日発行

ISSN 0300-8533

# 応用薬理

PHARMACOMETRICS

VOL. 88 NO. 3/4 March 2015



応用薬理研究会

OYYYA2 88 (3/4) 31-68

# 乳酸菌発酵ステビア (SW03) と砂糖との労働負荷計算力低下抑制作用の比較

辻 真貴、出雲 信夫、桑原 弘行、都築 繁利、渡邊 泰雄\*

〒245-0066 神奈川県横浜市戸塚区俣野町 601 横浜薬科大学総合健康メディカルセンター

## Comparative effects of between stevia fermented by lactic acid bacteria (SW03) and sugar on the reduction of errors of calculations induced by fatigue in human study.

Maki Tsuji, Nobuo Izumo, Hiroyuki Kuwahara, Shigetoshi Tsuzuki, Yasuo Watanabe\*  
601 Matano-cho, Totuka-ku, Yokohama, Kanagawa 245-0066, Japan  
General Health Medical Center, Yokohama University of Pharmacy

This study clinically evaluated that the fermented stevia by lactic acid bacteria (SW03) improves the calculating ability deteriorated by fatigue and that compared to these results of sugar. Steviol glycoside which is the sweet ingredient of stevia has been used as the materials of foods and drinks for the diabetic patients, and also it has been reported that stevia improves the insulin resistance. Moreover it has been reported that stevia has anti-oxidizing activity and modulating intra-cellular mechanism. Thus stevia can be expected as a functional food. This study was a prospective double-blinded, randomized and cross over study. Twelve-two healthy volunteer (8 men and 14 women: 23.0±1.0 yrs old) were randomly assigned to two groups: intake of either a 30ml SW03 added coffee or a sugar added coffee. Before, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min after ingestion, the blood pressure/pulse and the scores of Kraepelin test (one session was a 45 sec task x 3 times and 75 sec rest time) were measured. The total score, corrected scores and corrected rate during test were increased and the error rate was decreased in both groups. Furthermore, the heart rates and pulse were not seen the significant difference between sugar and SW03 groups. In the statistical analysis between two groups, SW03 group showed much less error rate than sugar group, significantly. The oral administration of SW03 significantly improved the error number under the forced calculation measured by Kraepelin test even though SW03 has no energy unlike sugar. These results suggest that the oral administration of SW03 can be useful to prevent the reduction of calculating ability under the stressful conditions.

**Keywords:** *fermented stevia by lactic acid bacteria/calculating ability/Kraepelin test/forced task/low energy/sugar*

### 緒言

我国では、低カロリーのダイエット甘味料として、飲料や食品に含有されるステビア (*Stevia rebaudiana*) は、多年草でキク科の植物である。含有される甘味成分として、ステビアの葉部には、stevioside, rebaudioside A, B, D, E, dulcoside A, B が分析されている (Koda et al., 1976; Kaneda et al., 1977)。

原産地はパラグアイや南米で、元来、ステビアは原産地では生薬として各種の疾患治療や予防に伝統医療の一つとして適用されてきた (Curi et al., 1986; Chatsudthipong and Muanprasat, 2009)。最近の研究では、stevioside が抗腫瘍効果や降圧作用を有することが示唆されている (Parveen et al.,

2014; Lee et al., 2001)。さらに、Shiozaki 等の研究から、ステビアの幹の熱水抽出物がモルモットの摘出腸管平滑筋のヒスタミンやアセチルコリン誘発の収縮運動に拮抗し、この作用機序として細胞外  $Ca^{2+}$  流出に関連する事が示唆された (2006)。以上の様に、ステビアは単なる甘味素材としてではなく、多種の効能が報告されている (Takahashi et al., 2001)。

本研究は、特許出願している製法で乳酸菌発酵させたステビアエキスを含有する濃い褐色液体 (SW03) を試験品として使用した。予備試験として、SW03 を愛用していない数名の健常者に SW03 を 30ml 飲用してもらい、MCFAN (血流測定装置) による血液流動性の検討や生化学検査を行った結果、血液流動性の改善や中性脂肪、血糖値の改善が示唆された (未発表)。これらの成績を基盤として、本研究は、「ステビア」というノンカロリー食品添加物が、栄養学的にエネルギー産生や細胞賦活性を有する「糖」と比較して、

\*Correspondence author: 渡邊 泰雄  
〒245-0066 神奈川県横浜市俣野町 601  
横浜薬科大学総合健康メディカルセンター  
Tel: 045-859-1363 Fax: 045-859-1363  
E-mail: yasuwat@ym.hamayaku.ac.jp

「甘み」のみならず「生理活性」にも同等性あるいは優位性を有するかをヒトで実証可能かを検討した。そこでSW03の短時間での強制的に施行される計算力変動や持久性、また安全性に及ぼす影響を検討する事を主目的とした。

## 方法

本試験の選択基準に適合し、除外基準に抵触していない健康な成人男性及び女性に対し、試験総括者が同意説明を行い、同意書を得られた40名の被験者を選考した。被験者は、予備試験としてクレペリンテストを行い、計算能力の差異を比較検索した。最終選考に残った被験者には、「乳酸菌発酵ステビアエキス SW03 (30ml) 含有コーヒー飲料 (ブレンディ<sup>TM</sup>)」(ステビア入り群)あるいは「SW03 含有無しで加糖コーヒー飲料 (ブレンディ<sup>TM</sup>)」(ステビア無し群)を無作為に割付け摂取させることとした。被験者が摂取する量はどちらも総量180ccとし、飲料温度を約8℃にすることで飲用感を可能な限り近似させた。尚、試験物質が濃い褐色液体のため、広汎に飲用されている市販のコーヒー飲料を用いた。摂取前、摂取直後、摂取15分後、摂取30分後、摂取45分後、摂取60分後に下記の評価項目をダブルブラインド法クロスオーバー試験により検討した。

### 1. 有効性評価項目

①クレペリン試験法による計算力の客観評価  
(回答数, 正解数, 誤回答, 正解率 (%))

②血圧/脈拍測定

③アンケート調査

### 2. 測定項目

#### (1)クレペリン試験法

摂取前、摂取直後、摂取15分後、摂取30分後、摂取45分後、摂取60分後での各イベント15分毎に、45秒間クレペリンの計算を行い、75秒間の休憩を挟み連続で3回施行各計算要領は、45秒間の計算、75秒間の休憩を1クールとし、計3クール実施した。

#### (2)血圧/脈拍の測定方法

校正の取れた自己測定装置で被験者各自が各イベント毎に1回測定し、結果を各自記録用紙に記載した。

#### (3)調査票およびアンケート内容

アンケート項目として、①現在の心境(摂取前)、②計算力、③集中力、④性格、⑤コーヒーの習慣性、アルコールの習慣性、喫煙の習慣性、⑥現在服用中の医薬品、薬品名、⑦何時間前に食事したか、⑧その際の飲み物、⑨現在の心境(摂取後)、⑩味覚に関して、を挙げて各試験毎に実施した。なお、調査票及びアンケート表には黒インクボールペンにて記載し、訂正については必要箇所に二重線を引いて記入することとした。

#### (4)除外基準

・重篤な現病気で通院治療を受けている者

- ・現在、認知症の治療を受けている者
- ・脳梗塞の既往歴のある者
- ・食品に対し、過度なアレルギー症状を示す恐れのある者
- ・試験登録時に健康食品やサプリメント等を摂取している者、また試験期間中に摂取する予定のある者
- ・高度の貧血のある者
- ・アルコールを過度に摂取している者(1日当たり平均純アルコールで約60g以上の摂取)
- ・試験期間中に妊娠を希望する者、あるいは妊娠しているもしくは妊娠の可能性のある者
- ・重篤な精神障害を有する者
- ・他のヒト臨床試験に参加している者
- ・その他、試験総括者が本試験の対象として不適当と判断した者

#### (5)被験者の同意

試験実施機関は、試験を開始する前に、以下の項目について書面によるインフォームドコンセントを被験者ごとに実施した。その際、この試験への参加は自由意思であること、同意しなくても不利益を受けないこと等を十分に説明した。同意は文書によるものとし、被験者本人の署名をもって同意取得とした。なお、未成年者が試験に参加する場合は、被験者本人とともに親権者の同意も合わせて取得するものとした。

- ・試験の目的および方法
- ・試験品の説明、作用、予想される発現副作用
- ・試験実施期間中は被験者を試験実施機関の十分な管理下に置くこと
- ・被験者は試験の参加に同意しない場合があっても不利益を受けないこと
- ・被験者が試験への参加に同意した後でも随時これを撤回できること
- ・本試験に関する健康被害が発生した場合に、被験者が受けることのできる適切な処置および治療体制があること
- ・本試験への継続の参加について被験者の意思に影響を与える可能性のある情報が得られた場合には速やかに被験者に伝えられること
- ・その他、被験者の人権保護および被験者の情報開示に関し必要な事項
- ・被験者が守るべき事項(全体スケジュール、来院日時、摂取量など)
- ・被験者が本試験および被験者の権利に関してさらなる情報が欲しい場合や本試験に関連する健康被害が生じた場合に、照会すべき医療機関の相談窓口の設置がなされていること
- ・被験者への交通費および協力費について

#### (6)被験者のプライバシー保護

試験実施に関わる原資料類、同意文書等の取り扱いに関しては、被験者のプライバシー保護を十分に配慮した。試験結果報告書の作成にあたっては、被験者の特定は被験者番号で行なった。

#### (7) 試験品の保存方法

試験品の通常保存条件に従い、直射日光、高温、多湿を避けて冷所（約8℃）にて保存。

#### (8) 統計解析

有意水準は両側検定で5%とし、10%を傾向とした。統計手法は Visit ごとの測定値について要約統計量を算出し、以下の手法を第1選択として統計解析を行った。

##### 【群内比較】

- ・クレペリン試験法による計算力の客観評価（正解率%/対応のある  $t$ -検定）
- ・収縮期、拡張期血圧/脈拍測定/対応のある  $t$ -検定
- ・クレペリン試験法による計算力の客観評価（回答数、正解数、誤回答/Wilcoxon の符号付順位和検定）

##### 【群間比較】

- ・クレペリン試験法による計算力の客観評価（正解率%/対応のない  $t$ -検定）
- ・収縮期、拡張期血圧/脈拍測定/対応のない  $t$ -検定
- ・クレペリン試験法による計算力の客観評価（回答数、正解数、誤回答/Wilcoxon の符号付順位和検定）

#### (9) 被験者管理事項

- ・検査前日はコーヒー・アルコールの摂取を禁止した。
- ・各観察日当日、検査開始3時間前から検査開始まで水以外の摂取を禁止した。
- ・検査前日は、不規則な生活（睡眠不足、暴飲暴食など）を禁止とした。
- ・食事、運動習慣、睡眠に関しては、本試験開始前と同様な量・質を維持するようにさせた。特に検査前日の過度の運動などは禁止とした。
- ・新たに医薬品、医薬部外品、健康食品類の服用および摂取は禁止とした。
- ・試験期間中は、献血を禁止とした。

#### (10) 倫理的配慮

本試験は、ヘルシンキ宣言（2013年WMAフォルトアレザ総会で修正）及び疫学研究に関する倫理指針（平成19年11月1日施行、平成20年12月1日一部改正）に準拠した。被験者の人権および安全性と試験データの信頼性の確保を図るため、横浜薬科大学 倫理委員会での審議、承認の下に実施された。

#### (11) 有害事象

有害事象とは、試験品を摂取した被験者に生じた全ての体調に関する自覚症状のうちで不快と感じられる

ものとした。試験実施期間中は自他覚症状や検査値異常等のすべての有害事象について、内容・発現時期・消失時期・程度・処置・転帰・重篤性評価を記録し、被験品との関連性を症例報告書に記載した。また、必要に応じて追跡調査も行なった。

## 結果

### 1. クレペリン試験法による計算力の客観評価 (Fig.1-Fig.4)

クレペリン式計算法の強制負荷試験において、「ステビア入り群」と「ステビア無し群」の両群ともに摂取前と比較して、試験に参加した全員（40名）の総回答数、正解数は時間経過に従って有意な増加が認められた。一方、誤解答数は低下傾向が認められた。しかし、両群間の比較において、図には示していないが有意な差は認められなかった。そこで、当該試験に影響を及ぼすと考えられる次の要素をもつ被験者を除く事とした。①計算力向上を評価目的としているため、摂取前の正解率が初回、2回目共に100%の正解率の被験者、②初回と2回目の試験前の直前食事摂取時間が10時間以上異なる被験者、③初回と2回目のアンケートのどちらか一方、あるいはその両方に未回答がある被験者。これにより、有効被験者数の22名（男性8名、女性14名、平均年齢23.0±1.0歳）を対象に層別解析を行った。総解答数 (Fig.1) ならびに総正解数 (Fig.2) において「ステビア入り群」と「ステビア無し群」のいずれも、摂取前に比較して有意な差を持って総数の増加が認められた。両群間の比較では「ステビア無し群」の方が「ステビア入り群」よりも有意な差を持って総解答数ならびに総正解数の増加が認められた。

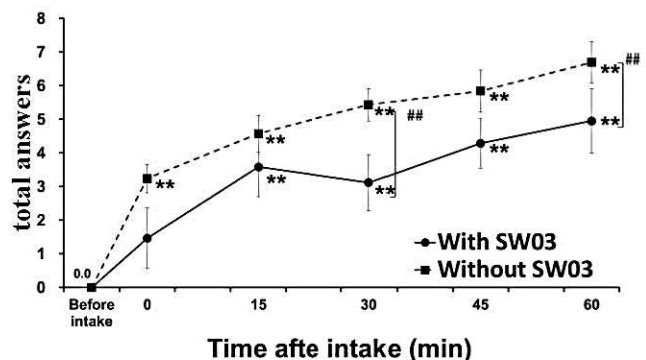


Fig.1 Changes in the total answers by Kraepelin test

Mean ± SE

\*: Significant Differences compared to Before intake.

\*\* : p < 0.05

# : Significant Differences between each point at same time.

## : p < 0.05

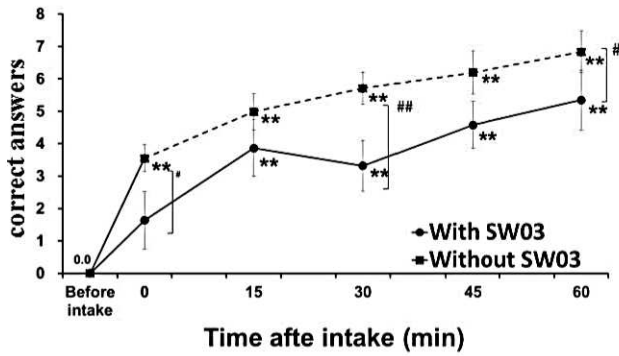


Fig.2 Changes in the correct answers by Kraepelin test

Mean ±SE

\*:Significant Differences compared to Before intake.

\*\*: $p < 0.05$

#:Significant Differences between each point at same time.

#: $p < 0.1$  ##: $p < 0.05$

一方、総誤答数は「ステビア入り群」と「ステビア無し群」のいずれも、摂取前に比較して減少傾向が認められた。両群間の比較では「ステビア入り群」の方が「ステビア無し群」よりも有意な差を持って総誤答数の減少が認められた (Fig. 3)

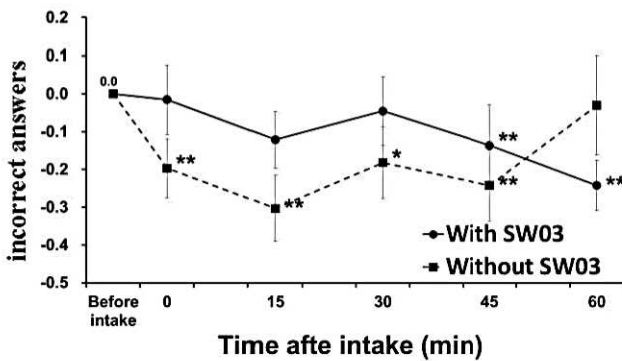


Fig.3 Changes in the incorrect answers by Kraepelin test

Mean ±SE

\*:Significant Differences compared to Before intake.

\*\*: $p < 0.1$  \*\*\*: $p < 0.05$

さらに、正解率を経過時間で比較した (Fig. 4) . いずれの群も正解率の増加が認められた。両群間の比較では「ステビア入り群」の方が「ステビア無し群」よりも有意な差を持って正解率の増加が認められた (Fig. 4) .

## 2. クレペリン試験実施時における循環系の経時的変化 (Fig. 5-Fig. 7)

血圧に関して、収縮期血圧は、両群ともに、摂取前と比較してほぼ安定した傾向であった。しかし、両群間を比較すると、「ステビア無し群」の方が「ステビア入り群」と

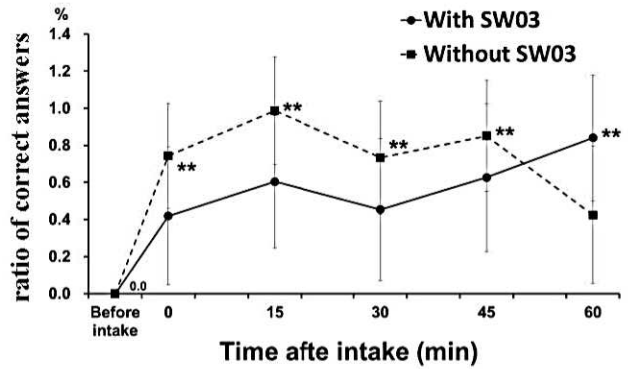


Fig.4 Changes in the ratio of correct answers by Kraepelin test

Mean ±SE

\*:Significant Differences compared to Before intake.

\*\*: $p < 0.05$

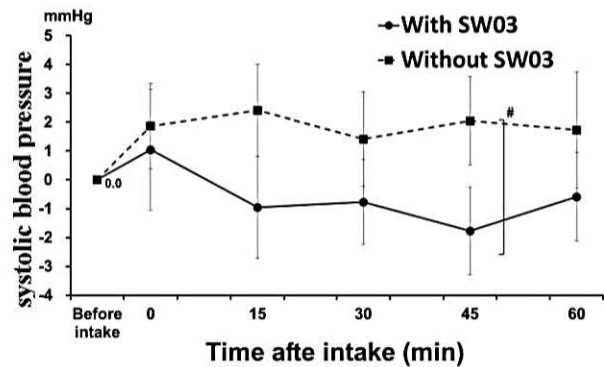


Fig5 Changes in the systolic blood pressure

Mean ±SE

#:Significant Differences between each point at same time.

#: $p < 0.1$

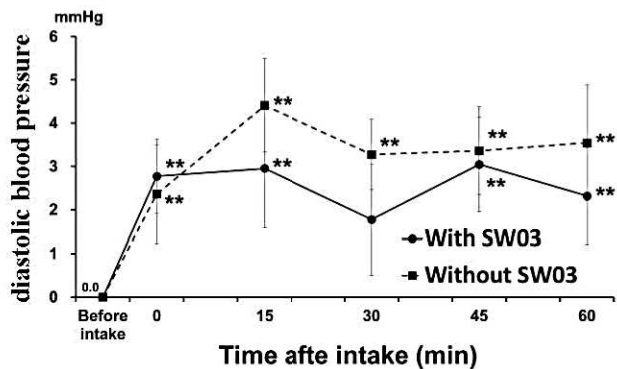


Fig. 6 Changes in the diastolic blood pressure

Mean ±SE

\*:Significant Differences compared to Before intake.

\*\*: $p < 0.05$

比較して有意に低い結果が得られた (Fig. 5) . 拡張期血圧は、両群共に上昇傾向が認められ、両群間の比較においても有意な差は認められなかった (Fig. 6) . 一方、脈拍数は両群共に有意な減少が認められたが、両群間での有意な

差は認められなかった (Fig. 7) .

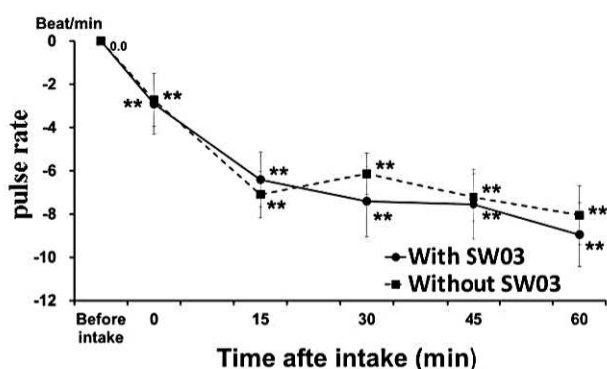


Fig7 Changes in the pulse rate

Mean  $\pm$  SE

\*: Significant Differences compared to Before intake.

\*\* : p < 0.05

## 考察

ステビアは、砂糖と比較してカロリーは低いが砂糖と同等の甘みが得られることから、我が国を始め、欧米諸国では低カロリー甘味料として広範に使用されている (Kaneda et al., 1977). 一方、パラグアイを始めとして南アメリカの原産地では「神聖な植物」であり、一種の漢方薬的なハーブ療法の様な使用も行われている (Curi et al., 1986; Chatsudthipong and Muanprasat, 2009). 本研究では、これまでのステビアによる効能を文献で検索し、且つ、我々の予備試験を踏まえて乳酸菌発酵ステビアである SW03 の労働負荷による計算力の低下に及ぼす影響を砂糖と比較するため市販の加糖と無糖のコーヒー飲料を用いて検索を行った。

試験は、15分間隔で、一回の試行は、45秒間クレペリンの計算を行い、75秒の休憩を挟み連続で3回施行した。回答数、正解数、誤答数、正解率の変動を基盤として、比較検討を行った。加えてアンケート調査を行い「計算力の自信の有無」、「服用薬物」、「落ち着き」などの他に、予測として「飲用した飲料のステビアエキス (SW03) の有無」に関する回答を得た。これらの結果はクレペリン試験の結果を統計解析する際に参考評価として使用した。

「SW03」含有群の労働負荷での計算力に及ぼす影響は、「砂糖」含有群と同様に回答数、正解数、正解率は経時的に増加し、誤答数は経時的な減少が見られた。一方、血圧の変動も両群間に有意な差は認められず、心拍数の経時的減少傾向が認められた。そこで被験者のデータ精査を行ない、解析対象から除外すべき被験者データを除去して、各項目での「ステビア (SW03) 入り群」と「ステビア無し群」との比較を行った。その結果「ステビア入り群」は「ステビア無し群」と比較して「誤答数」が有意に低い事が認められた。

本研究は、「ステビア」というノンカロリー食品添加物が、栄養学的にエネルギー産生や細胞賦活性を有する「糖」

と比較して、「甘み」のみならず「生理活性」にも同等性あるいは優位性を有する事をヒトで実証した。すなわち、乳酸菌発酵ステビアの SW03 は短時間での強制的に施行される計算力変動や持久性に対して有意な効能を示し、さらに、試験の期間中においても、何らの有害作用は生じない事からも安全性に関して問題は無いが実証された。

被験者のアンケート調査において、両群間に大きな差を有する被験者や試験当日に影響を及ぼすと思われる要因は全て排除したため、さらに、市販のコーヒー飲料の無糖に SW03 を加え「加糖」と比較した事から、本研究で得られた結果は「砂糖」と「SW03」との比較を容易にさせると考えられる。さらに、カフェイン飲料とした理由は、カフェインの軽度な中枢興奮作用も加味して同条件で比較検索を行った。

ステビアに関しては、Muanprasat 等が報告している様に cyclic AMP の活性化 (2013) や腎機能改善効果 (Toskulkao et al., 1994) が有る。これらの機序を考慮すれば、我々が既に予備試験として行った血流改善効果も SW03 の細胞内 Ca イオンなどを介した機序と考えられる。さらに、腸管内常在菌を介した細胞機能活性化効果 (Tomita et al., 1997) は強制負荷時の細胞機能活性化にも通じる。甘味料としてのステビア製品は、栽培地では民間医療として用いられていた様に今後の更なる研究を通して、機能性食材としての活用化が期待される事を本研究結果からも示唆される。

本成績を総括すると、SW03 は、「砂糖」と比較して単位当たり甘味程度は数十倍の差があるとされているが、カロリーはゼロに近い。そのため、エネルギー消費を伴う短時間 (60 分間) での強制的かつ連続的な計算では、「糖」と比較して計算成績に関して有意な低下が生じるものと仮説されていた。ところが脳活動に負荷の掛かった状態においても、SW03 は「糖」と比較して全回答数、正解数、誤答数、正解率において、同等もしくは、それ以上の好成績が得られた。これらの結果は、SW03 は「糖」と同様な計算力を維持する事を示した結果であり、エネルギーの失活や脳疲労を招いていない事を示すものである。SW03 の計算力の維持に係るメカニズムは、現時点では明らかではないが、1つの作用として脳血流量を改善することが示唆される。付記するに、本試験は、労働負荷による計算力低下に対するステビアの抑制効果を示唆した最初の論文である。

## 文献

Chatsudthipong, V., Muanprasat, C. (2009): Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol. Ther.* 121, 41-54

Curi, R., Alvarez, M., Bazotte, R.B., Botion L.M., Godoy J.L., Bracht, A. (1986): Effect of *Stevia rebaudiana* on glucose tolerance in normal adult man. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 19, 771-774

- Kaneda, N., Kasai, R., Yamasaki, K., Tanaka, O. (1977): Chemical studies on sweet diterpene-glycosides of *Stevia rebaudiana*: Conversion of stevioside into rebaudioside-A. *Chem.Pharm.Bull.* 25(9), 2466-2487
- Koda, H., Hasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K., Tanaka, O. (1976): New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, 15, 981-983.
- Lee, C.N., Wong, K.L., Liu, J.C., Chen, Y.J., Cheng, J.T., Chan P. (2001): Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertention. *Planta Med* 67, 796-799.
- Muanprasat, C., Sirianant, L., Sawasvirojwong, S., Homvisasevongsa, S., Suksamran, A., Chatsudthipong, V. (2013): Activation of AMP-activated protein kinase by a plant-derived dihydroisosteviol in human intestinal epithelial cell, *Biol. Pharm. Bull.* 36(4), 522-528.
- Parveen, R. and Kumar, K. (2014): Comparative cytogenetical and biochemical assessment in two varieties of *Stevia rebaudiana* Bertoni under the influence of ethyl methane sulphonate, *Chromosome Botany*, 9, 23-29.
- Shiozaki, K., Fujii, A., Nakano, T., Yamaguchi, T., Sato, M. (2006): Inhibitory effects of hot water extract of the *Stevia* stem on the contractile response of the smooth muscle of the guinea pig ileum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(2), 489-494
- Takahashi, K., Akiba, Y., Nakano, T., Yamaguchi, T., Sato, M., Sato, N. (2001): Effect of dietary stevia (*Stevia rebaudiana*) extract on gizzard erosion and ulceration induced by dietary histamine in broiler chicks. *J Poultry Sci* 38, 181-184
- Tomita, T., Sato, N., Arai, T., Shiraishi, H., Sato, M., Takeuchi, M., Kamio, Y. (1997): Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni towards enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria. *Micobiol. Immunol.* 41, 1005-1009
- Toskulkao, C., Deechakawan, W., Temnharoen, P., Buddhasukh, D., Glinsukon, T. (1994): Nephrotoxic effects of stevioside and steviol in rat renal cortical slices. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 16, 123-131
- Yasukawa, K., Kitanaka, S., Seo, S. (2002): Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1488-1490