

ナイシンの食品添加物の指定に関する添加物部会報告書（案）

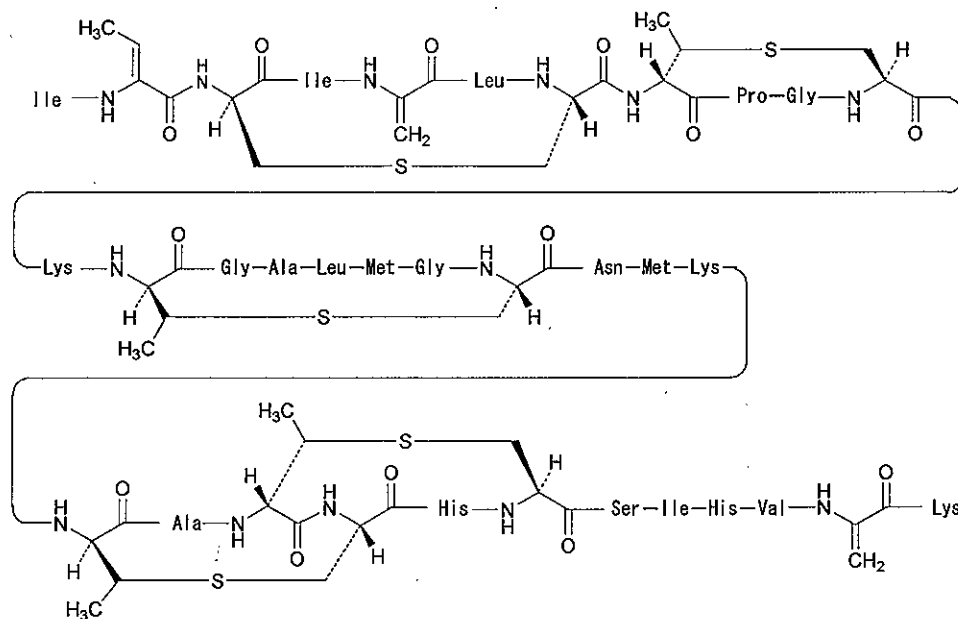
1. 品目名

ナイシン

英名：Nisin

[CAS 番号：1414-45-5]

2. 構造式、分子式及び分子量



発酵乳から分離されたラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*) が産生する 34 個のアミノ酸からなるペプチド

分子式： $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$

分子量：3354.07

3. 用途

保存料

4. 概要及び諸外国での使用状況

ナイシンは発酵乳から分離された *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* が産生する 34 個のアミノ酸から成るペプチドである。乳酸菌などが産生する抗菌性物質にバクテリオシンと呼ばれるものがあり、これらは、主に、生産菌の類縁細菌に殺菌的に作用するタンパク質又はペプチドである。ナイシンは、ランチオニンなどの特殊な構造のアミノ酸を含んでおり、ランチビオティクス系のバクテリオシンに分類されている。

ナイシンは、現在、50 カ国以上で保存料として、チーズ、乳製品、缶詰等を使用されている。米国では、「Nisin preparation」（ナイシン製剤）は一般に安全と認められる物質（GRAS 物質）として、低温殺菌チーズスプレッド、低温殺菌プロセスチーズスプレッド等に抗菌剤として使用されている。また、欧州連合（EU）では、ナイシンは保存料としてチーズ等への

使用が認められている。

FAO/WHO合同食品添加物専門家会議（JECFA）では、第12回（1968年）会議において評価され、ADIが設定されている。

5. 食品添加物としての有効性

ナイシンは *Bacillus* 属と *Clostridium* 属を含むグラム陽性菌に対して、効果がある保存料であり、様々な食品の細菌による腐敗を防ぐ。作用機序として、細胞膜に作用して、膜孔を形成することにより、細胞膜の膜機能を破壊するということが挙げられている。

1) 細菌芽胞増殖に対する抑制作用について

ナイシンの細菌芽胞の増殖に対する抑制作用について、以下に列記する。

- (1) 芽胞菌を含む培養液を用いて、ナイシンを 14mg/kg (=560 IU/g) で加えたものと、加えていないもの（コントロール）それぞれについて 250° F(121°C)における D 値*を測定した。ナイシンを加えたものの D 値はコントロールの D 値と比較して、以下のとおりであった。Cl. *thermosaccharolyticum* を除く芽胞の試験で D 値が低下した。（表 1）¹

表 1

試験対象の細菌芽胞	培養液中の芽胞の数(個/mL)	D 値 (コントロールに対する割合)
P. A. 3679**	22,500	40%
<i>C. thermosaccharolyticum</i> 3814	28,000	111%
<i>B. coagulans</i> 43P	800	7%
<i>B. stearothermophilus</i> 1518	4,400	30%

* D値とは、細菌数を1/10に減少させるのに要する、一定温度における加熱時間を表す。

** putrefactive anaerobe（腐敗性嫌気性菌）の略

- (2) *B. coagulans*(31株)を 1×10^5 個/mL となるように、それぞれトマトジュース (pH5.3) に接種し、35°C、45°C、55°Cでそれぞれ計7日間培養し、pHが5.3から4.0~4.2まで低下することを指標として菌の増殖を調べた。その結果、濃度0.1mg/mL (=4.0 IU/g) のナイシンでは4菌株について、1.0mg/mL (=40 IU/g) のナイシンでは19菌株について、5mg/L (=200 IU/g) のナイシンでは試験した31菌株の全てについて増殖が抑制される結果が得られた。²

- (3) ナイシンを 14mg/kg (=560 IU/g) で加えたものと、加えていないもの（コントロール）それぞれについて以下の通り各食品における D 値を測定した。試験を行った全芽胞の試験で D 値が低下した。（表 2）³

¹ O'Brien R T, Titus D S, Devlin K A, Stumbo C R, Lewis J C. 'Antibiotics in food preservation. II. Studies on the influence of subtilin and nisin on the thermal resistance of food spoilage bacteria'. 1954. Fd. Technol 10: 352-355

² Campbell L L and Sniff E E. 'Nisin sensitivity of *Bacillus coagulans*'. 1959. Appl Microbiol 7: 289-291

³ Campell L L, Sniff E E, O'Brien R T. 'Subtilin and nisin as additives that lower the heat-process requirements of canned foods'. 1959. Fd Technol 12: 462-464

表 2

試験対象の芽胞菌	試験温度	食品中の芽胞の数 (個/g)	対象食品	コントロールのD値 (分)	ナイシンを添加した場合のD値 (分)
P.A. 3679	240° F(116°C)	4,230	エンドウピューレ	5.59	2.18
P.A. 3679	240° F(116°C)	4,230	カリフラワーピューレ	2.10	0.74
<i>B. stearothermophilus</i>	250° F(121°C)	657	カーネルコーン	2.67	0.53
<i>B. coagulans</i>	212° F(100°C)	9,600	トマトジュース	5.93	0.51

(4) ナイシン産生菌の培養液を用いて、以下の芽胞菌について、その生育とガス産生を調べた。その結果、ナイシン産生菌の培養液濃度依存的に芽胞の発芽後生育が阻害された。(表 3)⁴

表 3

試験対象の芽胞菌	培養液中の芽胞の数 (個/mL)	ナイシン産生菌の培養液の希釈率																	
		コントロール		1/10		1/20		1/40		1/80		1/160		1/320		1/640		1/1280	
		生	ガ	生	ガ	生	ガ	生	ガ	生	ガ	生	ガ	生	ガ	生	ガ	生	ガ
<i>Cl. butyricum</i> N. C. T. C. 7423	3,500	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++				
	30	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
<i>Cl. sporogenes</i> Cl. 6	800	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	8	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
<i>Cl. Bifermentans</i> N. C. T. C. 2914	800	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	8	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	

＋、－の符号は試験細菌の生育、不生育の程度を示す。

⁴ Hirsch A and Grinstead E. 'Methods for the growth enumeration of anaerobic spore formers from cheese, with observations on the effect of nisin'. 1954. J Dairy Res 21: 101-110

2) 食品における効果について

(1) プロセスチーズ及びプロセスチーズ製品に対するナイシンの効果⁵

水分含量 40~60% の様々なプロセスチーズにナイシン 2.5 又は 6.25 mg/kg (=100 又は 250 IU/g) を添加し、加工の溶解段階で *Clostridium* 属の混合物 (*Cl. Butyricum*, *Cl. Tyrobutyricum*, *Cl. Sporogenes*) 160~240 CFU/g を接種してインキュベートした。製造されたチーズを 37°C で保存し、週単位で変質を調べた。

その結果、ナイシンを添加しなかったチーズが直ちに腐敗したのに対して、ナイシン 2.5 mg/kg を添加したチーズでは腐敗するまでの日数が延長され、ナイシン 6.25 mg/kg を添加したチーズでは、試験期間内では腐敗しなかった (表 4)

表 4 37°C で保存したプロセスチーズ製品の腐敗率

製品	ナイシン 添加量 (mg/kg)	試料 10 個中腐敗した個数					
		保存週数					
		1	2	3	4	5	6
プロセスCHEDAR チーズ	0	0	0	1	1	1	1 (B)
	2.5	0	0	0	0	0	0
	6.25	0	0	0	0	0	0
プロセスCHEDAR チーズ付きハム	0	0	0	0	0	0	0
	2.5	0	0	0	1	1	1 (S)
	6.25	0	0	0	0	0	0
プロセスCHEDAR チーズスプレッド	0	0	3	3	4	5	7 (B)
	2.5	0	0	2	2	2	2 (B)
	6.25	0	0	0	0	0	0
プロセスCHEDAR チーズスプレッド付きハム	0	2	2	3	4	7	7 (B)
	2.5	0	0	2	2	2	2 (B+S)
	6.25	0	0	0	0	0	0
プロセスエメンタール チーズ	0	0	0	1	2	3	3 (B)
	2.5	0	0	0	0	0	0
	6.25	0	0	0	0	0	0
プロセスエメンタール チーズスプレッド	0	0	5	6	6	8	8 (B+S)
	2.5	0	0	0	3	3	3 (B+S)
	6.25	0	0	0	0	0	0

(B) = 主として酪酸生成クロストリジウム属による腐敗 ; (S) = 主として *Cl. sporogenes* による腐敗

(2) 液状卵に対するナイシンの保存効果⁶

ナイシン 5 mg/L (=200 IU/g) を液状全卵に添加した後に 64.4°C、2.5 分で殺菌した。次に無菌的に個分けした後、6°C で保存し、試験 1 では 1~23 日に総細菌数、嫌気性菌数、pH、性状、異臭を、試験 2 では 1~21 日に総細菌数、*Bacillus cereus* 数、pH、性状、異臭を測定した。その結果は、以下のとおり。

⁵ Delves-Broughton J and Gasson M J. 'Nisin'. In: *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*. 1994. CAB International. (Editors: Dillon V M and Board R G). Chapter 4, 99-131

⁶ Delves-Broughton J, Williams G C, Wilkinson S. 'The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in pasteurized liquid whole egg'. 1992. *Letters in Appl Microbiol* 15: 133-136

細菌学検査

試験1 (表5) : ナイシン非添加コントロール群では、4~6日で腐敗がみられ、この原因菌は *Bacillus cereus* と同定された。ナイシン添加群では17~20日で性状の変化がみられ、腐敗の原因菌はグラム陰性桿菌 (*Pseudomonads* 属) であった。

試験2 (表6) : コントロール群の保存期間は11日、ナイシン添加群では20日であった。コントロール群の腐敗原因菌は主に *Pseudomonads* であった。ナイシン添加群の腐敗菌は *Bacillus* 属 (長さ3~8 μ m) で、カタラーゼ陽性、ムコイド形成コロニーを示した。分離株に芽胞は存在しなかった。

pH、性状、異臭

試験1 (表5) : コントロール群では、強い異臭、退色、卵の凝固、pHの低下がみられた。一方、ナイシン添加群では、退色及びpHの低下程度が小さかった。

試験2 (表6) : コントロール群では果物臭、粘稠、若干のpH低下がみられた。ナイシン添加群では明確な異臭、pH低下はみられなかった。

表5 殺菌液状全卵を6°Cで保存した時のナイシンの効果 (試験1)

日	総細菌数	嫌気性菌	pH	性状	異臭
1. ナイシン添加 (5 mg/L)					
1	3	3	7.67	良好	なし
4	10*	<10	7.55	良好	なし
7	4.0×10^2 *	<10	7.46	良好	なし
10	2.0×10^1 *	50	7.72	良好	なし
14	7.0×10^1 *	<10	7.68	良好	なし
17	2.0×10^2	<10	7.67	良好	なし
21	—	—	7.74	やや退色	なし
22	$>10^7$ *	<10	7.46	やや退色	なし
23 (1)	$>10^7$ *	<10	7.59	やや退色	なし
23 (2)	$>10^7$ *	<10	7.56	やや退色	なし
23 (3)	$>10^7$ *	<10	7.59	やや退色	なし
2. コントロール (ナイシン非添加)					
1	90 †	2.7×10^2 ‡	7.59	良好	なし
4	2.4×10^4 †	3.0×10^2 ‡	7.55	良好	なし
7	5.3×10^6 †	5.0×10^3	6.88	やや退色	弱い
10	7.3×10^7 †	3.0×10^2	6.23	完全な退色/ 分離/凝固	強い

* グラム陰性桿菌 (*Pseudomonads*)

† *Bacillus* (*Bacillus cereus* と同定)

‡ グラム陽性球菌

表6 殺菌液状全卵を6°Cで保存した時のナイシンの効果(試験2)

日	総細菌数	<i>Bacillus cereus</i> /mL	pH	性状	異臭
1. ナイシン添加 (5 mg/L)					
1	<10	<10	7.72	良好	なし
4	<10	<10	7.71	良好	なし
5	<10	<10	7.67	良好	なし
6	10	<10	7.71	良好	なし
7	<10	<10	7.66	良好	なし
8	10	<10	7.68	良好	なし
9	10	<10	7.70	良好	なし
10	10	<10	7.72	良好	なし
11	50	<10	7.69	良好	なし
12	10	<10	7.71	良好	なし
13	15	<10	7.74	良好	なし
14	100*	<10	7.70	良好	なし
15	25*	<10	7.72	良好	なし
16	2×10^3 *	<10	7.72	良好	なし
17	4.8×10^3 *	<10	7.72	良好	なし
18	1.5×10^4 *	<10	7.74	良好	なし
19	1.0×10^4 *	<10	7.67	良好	なし
20	5.0×10^3 *	<10	7.71	良好	なし
21	3.3×10^6 *	<10	7.71	良好	なし
2. コントロール (ナイシン非添加)					
1	8.3×10^2 †	<10	7.67	良好	なし
4	1.2×10^3 †	<10	7.64	良好	なし
5	1.1×10^3 †	<10	7.68	良好	なし
6	8.0×10^2 † ‡	<10	7.64	良好	なし
7	1.3×10^3 †	<10	7.65	良好	なし
8	1.9×10^3 † ‡	<10	7.67	良好	なし
9	1.5×10^3 †	<10	7.61	良好	なし
10	1.5×10^3 †	<10	7.66	良好	なし
11	1.6×10^3 * †	<10	7.68	良好	なし
12	1.7×10^8 §	10	7.57	良好	わずかな果実臭
13	1.9×10^8 §	<10	7.58	良好	弱い果実臭

* ムコイドコロニー、グラム陰性好気性桿菌(長さは主に3-4μm、最大7-8μm)、芽胞なし、カタラーゼ陽性 *Bacillus*

† 主に黄色コロニー、グラム多様小型桿菌、カタラーゼ陽性、コリネ型

‡ *Bacillus* コロニー。数は少ない。

§ グラム陰性、オキシダーゼ陽性 *Pseudomonads*

(3) 味噌麴に対するナイシンの効果⁷

ナイシンとクエン酸の水溶液（蒸留水 150g）に、米 300g を入れて 5℃にて 16 時間浸漬した。蒸留水と米の総量に対して、ナイシンを 75mg/kg (3000IU/g) とした。浸漬した米を 1 時間蒸した後、室温にて放冷したものに、*Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 芽胞液を 10CFU/g となるように接種した。芽胞液を接種した米に種麴を接種し、芽胞接種後及び 38℃で 48 時間保存後に *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 菌数及びナイシンの活性を調べた。その結果、対照群では菌の増殖が見られたものの、ナイシンを添加したものでは、接種後直ちに抑制され、保存後においても菌の増殖は見られなかった。また、保存後にナイシンの活性の低下が見られた。（表 7）

表 7 味噌麴の製麴工程における菌数及びナイシン活性の変化

試験区		芽胞液接種後	38℃、48 時間保存後
コントロール	菌数 [CFU/g]	1.0×10	1.5×10 ³
	ナイシン活性 [IU/g (mg/kg)]	0 (0)	0 (0)
ナイシン添加	菌数 [CFU/g]	<10	<10
	ナイシン活性 [IU/g (mg/kg)]	1700 (42.5)	148 (3.70)

6. 食品安全委員会における評価結果（案）について

食品安全基本法（平成15年法律第48号）第24条第1項第1号の規定に基づき、平成15年10月20日付け厚生労働省発第1020002号により食品安全委員会あて意見を求めたナイシンに係る食品健康影響評価については、添加物専門調査委員会の議論を踏まえ、以下の評価結果案が平成19年8月30日付けで公表されている。

ナイシンのNOAEL の最小値は、ラット 3 世代繁殖毒性試験の1.0% (12.5mg/kg 体重/日相当) と考えられる。安全係数は、繁殖毒性試験で認められている毒性が重篤なものではないことから、通常の100 を適用することとした。

上記を踏まえ、ナイシンのADI は、0.13 mg/kg 体重/日と評価した。

ADI 0.13 mg/kg 体重/日

(ADI 設定根拠資料) 3 世代繁殖試験

(動物種) ラット

(投与方法) 混餌投与

(NOAEL 設定根拠所見) F0 : 体重増加抑制、F2B : 低体重

(NOAEL) 12.5 mg/kg 体重/日

(安全係数) 100

なお、その詳細は以下の通りである。

⁷味噌麴中における *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* の挙動とナイシンによる増殖抑制効果（三栄源エフ・エフ・アイ株式会社）

ナisinについて、*in vitro* 及び*in vivo* における遺伝毒性試験において全て陰性の結果が得られており、生体にとって問題となる遺伝毒性を有するとは考えられず、また発がん性を有するものではないと考えられる。

JECFA 及び米国FDA が根拠としているラット2年間慢性毒性試験は、1960年代に実施された試験であり、信頼性に問題があることから評価に用いないこととした。欧州SCF の評価の根拠とされているラット3世代繁殖試験については、親動物F0の5.0%投与群の雄群で認められた体重増加抑制、児動物F2Bの5.0%投与群で認められた低体重を根拠に、NOAELは1.0% (12.5 mg/kg 体重/日相当) と評価した。追加資料として提出されたラットの90日間反復投与毒性試験では、5.0%投与群の雌雄で認められた血液学的検査項目 (MCH、HGB 等) の変動を根拠に、NOAELは1.0% (45 mg/kg 体重/日相当) と評価した。

以上より、ナisinのNOAELの最小値は、ラット3世代繁殖毒性試験の1.0% (12.5mg/kg 体重/日相当) と考えられる。安全係数は、繁殖毒性試験で認められている毒性が重篤なものではないことから、通常の100を適用することとした。

上記を踏まえ、ナisinのADIは、0.13 mg/kg 体重/日と評価した。

ADI 0.13 mg/kg 体重/日

(ADI 設定根拠資料) 3世代繁殖試験

(動物種) ラット

(投与方法) 混餌投与

(NOAEL 設定根拠所見) F0: 体重増加抑制、F2B: 低体重

(NOAEL) 12.5 mg/kg 体重/日

(安全係数) 100

ナisinは、グラム陽性菌の芽胞の生育を阻害する乳酸菌バクテリオシン (ペプチド) であり、上部腸管でパンクレアチン等により分解され、不活化される。耐性菌の選択に関する専門家の意見のポイントは以下のとおりである。

- ・経口摂取したとしても体内には吸収されず、腸管への移行も少量であると考えられ、下部腸管における腸内細菌叢への影響も極めて少ない。
- ・近年、リステリア菌のナisin耐性及び他のバクテリオシンとの交差耐性に関する報告があるものの、医療用抗生物質との交差耐性は実験的に認められておらず、医療上の問題となったとの臨床における報告も得られていない。
- ・仮に添加物としての使用により、耐性菌が選択されるとしても、海外における長期の使用経験の中で、ヒトの健康に重大な影響を及ぼしたとする報告は現時点で得られていない。

以上、現時点で得られている知見から判断して、添加物として適切に使用される場合にあっては、耐性菌出現による医療上の問題を生じる可能性は極めて少ないと考えられる。

なお、ナisinを添加物として適切に使用するためには、使用基準を慎重に検討するこ

とが重要であり、欧米における使用状況を勘案した上で、耐性菌出現により有効性等に影響を及ぼすことがないように十分な配慮が必要と考えられる。また、新たな知見が得られた場合には、必要に応じて再評価を検討する必要があると考える。

7. 摂取量の推計

上記の食品安全委員会の評価結果（案）によると以下の通りである。

米国では、プロセスチーズスプレッド、フランクフルトのケーシング等に使用されており、ナイシンの食品からの推定摂取量は2.15 mg/ヒト/日（体重60 kgとして0.036 mg/kg 体重/日）とされている。また、EU では、チーズ等に使用されており、推定摂取量は0.008 mg/kg 体重/日との情報がある。要請者により提案されている使用基準案に基づき、添加物として使用された場合のわが国における推定摂取量は、国民栄養調査を参考にして算出すると0.041 mg/kg 体重/日とされている。

8. 新規指定について

ナイシンを食品衛生法第10条に基づく添加物として指定することは差し支えない。ただし、同法第11条第1項の規定に基づき、次の通り使用基準及び成分規格を定めることが適当である。

1) 使用基準について

要請者は、CODEX基準、米国、EUでの使用基準等を踏まえたうえで、以下の使用基準（案）*を提案している。食品安全委員会における評価結果（案）を踏まえ、要請者の提案する使用基準（案）のとおりとすることが適当である。ただし、当然の事ながら、その使用に当たっては、食品汚染菌の管理を行ううえで必要十分とされる量が用いられるべきである。

使用基準（案）

ナイシンは、アイスクリーム類、たれ、卵加工品、チーズ、つゆ、ドレッシング、生菓子、乳飲料、食肉製品、フラワーペースト類、ホイップクリーム、味噌及び洋菓子以外の食品に使用してはならない。

ナイシンの使用量は精製ナイシンとしてアイスクリーム類、チーズ（プロセスチーズを除く。）、乳飲料、食肉製品及びホイップクリームにあっては1kgにつき0.0125g以下、たれ、つゆ及びドレッシングにあっては1kgにつき0.010g以下、プロセスチーズ、フラワーペースト類、洋菓子にあっては1kgにつき0.00625g以下、卵加工品及び味噌にあっては1kgに

*当初、いくら、かずのご調味加工品、辛子明太子、魚介乾製品、魚肉練り製品、麴、すじこ、たらこ及び豆腐に対する使用についても要請されていたが、要請者より、海外における使用実態を踏まえ、使用基準（案）の訂正申し出があり、以下の通り変更している。

1. いくら、かずのご調味加工品、辛子明太子、魚介乾製品、魚肉練り製品、麴、すじこ、たらこ及び豆腐は対象食品から除外する。

2. チーズに対して0.015g/kgからチーズ（プロセスチーズを除く。）に対して0.0125g/kg、プロセスチーズに対して0.00625g/kgに変更する。

3. 生菓子に対して0.0050g/kgから0.0030g/kgに変更する。

つき 0.0050g 以下、生菓子にあつては 1kg につき 0.0030g 以下でなければならない。但し、特別用途表示の許可又は承認を受けた場合は、この限りではない。

(参考 1) 各対象食品とそれに対する推定摂取量について

使用基準案の 食品名	国民栄養調査 食品分類 (H12)	摂取量 (g/日)	使用基準案 (mg/kg)	ナイシン摂取量 (mg/日)
アイスクリーム類、 乳飲料、 ホイップクリーム	84：その他の乳製品	19.4	12.5	0.243
チーズ（プロセスチーズを含む。）	83：チーズ	2	12.5 (6.25)	0.025*
生菓子	22：その他の菓子類	12.9	3	0.039
フラワーペースト類、洋菓子	6：菓子パン	8.8	6.25	0.076
	20：カステラ・ケーキ類	3.3		
食肉製品	80：ハム、ソーセージ	9.5	12.5	0.119
たれ、つゆ、ドレッシング	57：その他の調味料	11.3	10	0.161
	27：マヨネーズ類	4.8		
卵加工品	81：卵類	39.7	5	0.199
味噌	28：味噌	13.0	5	0.065
合計				0.927**

* プロセスチーズは 12.5mg/kg として計算

** 対 ADI 比 14.3%

2) 成分規格について

ナイシンの成分規格をそれぞれ別紙1のとおり設定することが適当である。(設定根拠は別紙2、成分規格(案)と対応する国際規格等との比較は別紙3のとおり。)

3) 耐性菌について

食品安全委員会の評価結果(案)では、「現時点で得られている知見から判断して、添加物として適切に使用される場合にあつては、耐性菌出現による医療上の問題を生じる可能性は極めて少ないと考えられる。なお、ナイシンを添加物として適切に使用するためには、使用基準を慎重に検討することが重要であり、欧米における使用状況を勘案した上で、耐性菌出現により有効性等に影響を及ぼすことがないよう十分な配慮が必要と考えられる。」とされている。本使用基準案は、味噌以外は欧米等で広く使用されている範囲となっており、これらの対象食品に使用を認めることは、差し支えないと考えられる。なお、味噌については、味噌中の乳酸菌の16SrRNA解析からナイシン産生菌 *Lactococcus lactis* が同定されており、天然にナイシンが含有されていることが示されている⁸。したがって、食品添加物としてナイシンを使用することで、味噌についても使用を認めることは差し支えないと考えられる。

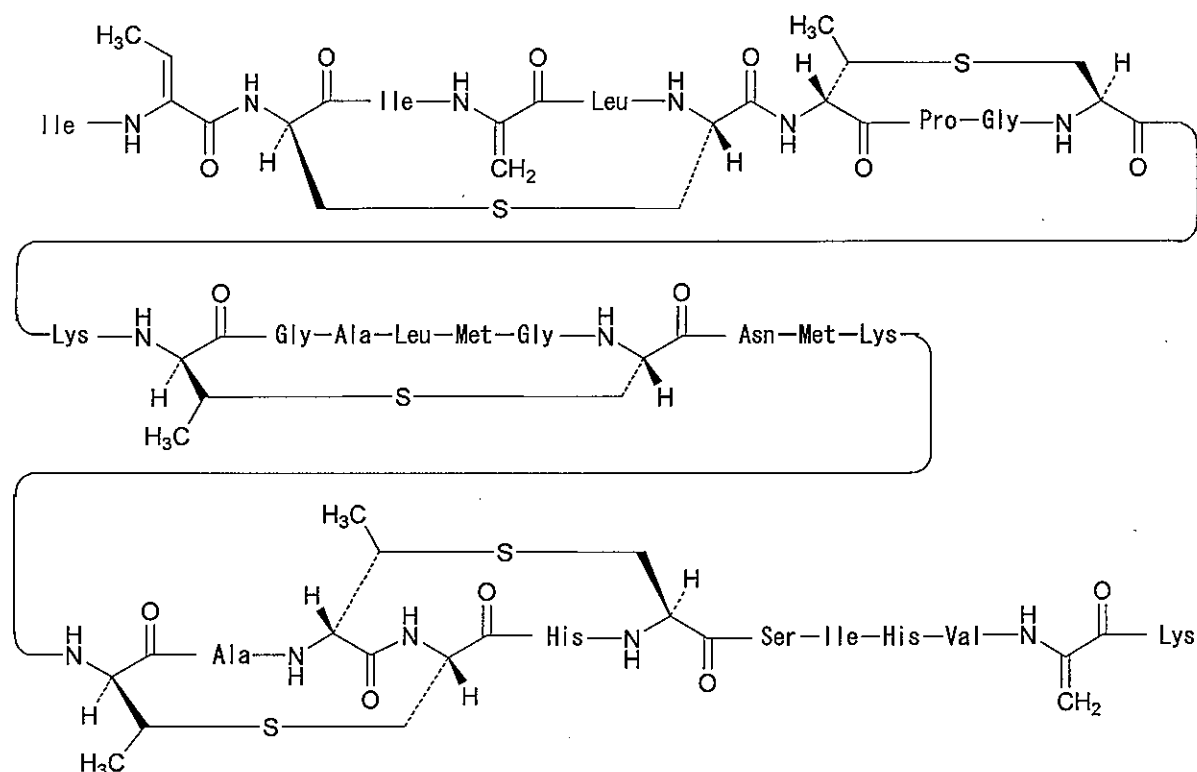
一方で、耐性菌の出現に関する情報を入手することは、添加物の適切な使用を指導するうえで重要であるため、ナイシン耐性菌に関して情報を収集し、安全性、有効性の点で問題となるような新たな知見あれば、速やかに報告するよう事業者等に対し周知を図ることが適当である。

⁸ 恩田匠 味噌中に高頻度で存在するバクテリオシン産生乳酸球菌の同定 山梨県工業技術センター 研究報告 p.132 No. 15(2001)

成分規格案

ナイシン

Nisin


 $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$

分子量 3354.07

[1414-45-5]

定義 本品は、*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 菌株の培養液から得られたナイシンの塩化ナトリウム及び固形無脂肪乳との混合物である。

力価及び含量 本品は、1mg 当たり 900 単位以上の力価を有する。ただし、本品の力価は、ナイシン ($C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$) としての量を単位で示し、その 1 単位はナイシン ($C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$) 0.025 μ g に対応する。また、塩化ナトリウム 50% 以上を含む。

性状 本品は、白～淡黄白色の粉末で、においがいいか又はわずかに特異なにおいがある。

確認試験 (1) 本品 0.100g を正確に量り、0.2 μ m のフィルターを通して滅菌した 0.02mol/L 塩酸 80 ml に懸濁する。2 時間室温に置き、更に 0.02mol/L 塩酸を加えて 100 ml する。この液 1ml を正確に量り、0.02mol/L 塩酸を用いて 200ml とし、比較液とする。比較液 20ml を 5 分間煮沸し、検液とする。検液及び比較液につき、定量法に示す方法により、力価を測定するとき、検液の力価は、比較液の力価の 100 \pm 5% である。別に検液 20ml に 5mol/L 水酸化ナトリウムを加えて pH11 に調整した後、65 $^{\circ}$ C、30 分間加熱する。冷後、塩酸を加えて pH2.0 に調整し、定量法に示す方法により、力価を測定するとき、その活性は失われている。

(2) 滅菌した脱脂粉乳の水溶液(1→10)中で *Lactococcus lactis* (ATCC 11454 又は NCIMB 8586) を 30℃, 18 時間培養し, 試験菌液とする。リトマスミルク 100 ml を入れたフラスコを 121℃で 15 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌したリトマスミルクに本品 0.1g を加え, 室温に 2 時間放置する。この液に試験菌液を 0.1ml 加え, 30℃, 24 時間培養するとき, *Lactococcus lactis* の生育を認める。

純度試験 (1) 鉛 1.0 µg/g 以下

本品 10.0g を量り, 5ml の硫酸を入れた耐熱性ビーカーに入れ, 徐々に加熱し, 更に硫酸少量を加え, できるだけ低温でほとんど灰化する。さらに, 500℃で灰化するまで強熱した後, 放冷する。残留物に 40ml の水を加えて溶かし, 試料液とする。試料液にクエン酸二アンモニウム溶液(1→2)10ml を加え, チモールブルー試液を指示薬として, アンモニア水で弱アルカリ性とする。冷後, この液を 200ml の分液漏斗に移し, ビーカーを水で洗い, 洗液を分液漏斗に合わせ, 約 100ml とする。ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム溶液(3→100)5ml を加えて 5 分間放置し, 酢酸ブチル 10ml を加えて 5 分間振とうした後, 静置する。酢酸ブチル層をとり, 検液とする。別に, 鉛標準原液 1ml を正確に量り, 水を加えて正確に 100ml とする。この液 10ml を正確に量り, 試料液と同様に操作し, 比較液とする。検液及び比較液につき, 鉛試験法第 1 法により試験を行う。

(2) ヒ素 As₂O₃ として 2.0 µg/g 以下 (1.0g, 第 3 法, 装置 B)

乾燥減量 3.0%以下 (105℃, 2 時間)

微生物限度 微生物限度試験法により試験を行うとき, 本品 1g につき, 細菌数は 10 以下である。また大腸菌は認めない。ただし, 大腸菌試験の試料の採取量は 25g とする。さらに, サルモネラ試験を行うとき, サルモネラは認めない。

(1) サルモネラ試験

試験の手順

試料 25g を量り, 乳糖ブイオンを加えて 100ml とし, 30~35℃で 24~72 時間培養する。増殖が観察された場合は, 培養液を軽く振った後, 1ml ずつを 10ml のセレナイトシスチン液体培地及びテトラチオネート液体培地に接種し, 12~24 時間培養する。なお, セレナイトシスチン液体培地に代えて, ラパポート液体培地を使用することができる。培養後, それぞれの液体培地からブリリアントグリーン寒天培地, XLD 寒天培地及び亜硫酸ビスマス寒天培地のうちの少なくとも 2 種類以上の培地上に塗抹し, 30~35℃で 24~48 時間培養する。ブリリアントグリーン寒天培地上で小型で無色透明又は不透明で白~桃色の集落, 又は XLD 寒天培地上で赤色の集落あるいは亜硫酸ビスマス寒天培地上で黒色又は緑色の集落が見出されない場合はサルモネラ陰性と判定する。なお, ブリリアントグリーン寒天培地上に見られる小型で無色透明又は不透明で白~桃色の集落には, しばしば周囲に桃~赤色の帯が形成され, XLD 寒天培地上で見られる赤色の集落には, 中心部に黒点が現れる場合がある。これらの特徴を有するグラム陰性桿菌の集落が見出された場合は白金線を用いて TSI 斜面寒天培地の深部と斜面に疑われる集落を接種し, 35~37℃で 18~24 時間培養する。サルモネラが存在する場合, 深部は黄色となり, 斜面部は赤色のまま変化しない。通常, 深部でガスの産生が見られるが, 硫化水素は産生される場合とされない場合がある。

キット使用を含む、更に詳細な生化学的試験と血清学的試験を併用することで、サルモネラの同定、型別試験を行うことが望ましい。

培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験

試験には、非病原性又は病原性の弱いサルモネラ菌株を、乳糖ブイオン培地を用い、30～35℃で18～24時間培養して使用する。次に、ペプトン食塩緩衝液、リン酸緩衝液、乳糖ブイオン培地等を用いて、1ml当たり約1,000個の生菌を含む菌液を調製する。必要に応じて、約1,000個/mlの生菌を含むサルモネラの菌液0.1mlを混和して、試料の存在下及び非存在下において、培地の有効性、抗菌性物質の存在等を試験する。

再試験

不確定な結果やあいまいな結果が得られた場合は、初回の2.5倍量の試料を用いて再試験を行う。方法は最初の試験法と同じであるが、試料の増加に比例して、培地などの量を増加させて行う。

培地

(i) セレナイトシスチン液体培地

ゼラチン製ペプトン	5.0g
乳糖 1 水和物	4.0g
リン酸三ナトリウム 12 水和物	10.0g
亜セレン酸ナトリウム	4.0g
L-シスチン	0.010g
水	1,000ml

全成分を混和し、加温して溶かす。液性は pH 6.8~7.2。滅菌してはならない。

(ii) テトラチオネート液体培地

カゼイン製ペプトン	2.5g
肉製ペプトン	2.5g
デソキシコール酸ナトリウム	1.0g
炭酸カルシウム	10.0g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	30.0g
水	1,000ml

固体を含む上記の溶液を煮沸する。使用当日に水 20ml にヨウ化カリウム 5g 及びヨウ素 6g を溶かした液を加える。更に滅菌ブリリアントグリーン溶液 (1→1000) 10ml を加え、混和する。その後は培地に熱を加えてはならない。

(iii) ラパポート液体培地

ダイズ製ペプトン	5.0g
塩化ナトリウム	8.0g
リン酸二水素カリウム	1.6g
マラカイトグリーンシュウ酸塩	0.12g
塩化マグネシウム 6 水和物	40.0g
水	1,000ml

マラカイトグリーンシュウ酸塩と塩化マグネシウム 6 水和物及び残りの成分をそれぞれ別々に水に溶かして、121℃で 15～20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後、混和して

使用する。液性は pH 5.4~5.8。

(iv) ブリリアントグリーン寒天培地

ペプトン(肉製及びカゼイン製)	10.0g
酵母エキス	3.0g
塩化ナトリウム	5.0g
乳糖 1 水和物	10.0g
白糖	10.0g
フェノールレッド	0.080g
ブリリアントグリーン	0.0125g
寒天	20.0g
水	1,000ml

全成分を混和し、1 分間煮沸する。使用直前に 121℃で 15~20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の液性は pH 6.7~7.1。約 50℃に冷却してペトリ皿に分注する。

(v) XLD(キシロース・リジン・デソキシコール酸)寒天培地

D-キシロース	3.5g
塩酸 L-リジン	5.0g
乳糖 1 水和物	7.5g
白糖	7.5g
塩化ナトリウム	5.0g
酵母エキス	3.0g
フェノールレッド	0.080g
デソキシコール酸ナトリウム	2.5g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	6.8g
クエン酸アンモニウム鉄(III)	0.80g
寒天	13.5g
水	1,000ml

全成分を混和し、煮沸して溶かす。煮沸後の液性は pH 7.2~7.6。高圧蒸気滅菌をしてはならない。過剰な加熱は避ける。約 50℃に冷却してペトリ皿に分注する。

(vi) 亜硫酸ビスマス寒天培地

肉エキス	5.0g
カゼイン製ペプトン	5.0g
肉製ペプトン	5.0g
ブドウ糖	5.0g
リン酸三ナトリウム 12 水和物	4.0g
硫酸鉄(II)7 水和物	0.30g
亜硫酸ビスマス・インジケーター	8.0g
ブリリアントグリーン	0.025g
寒天	20.0g
水	1,000ml

全成分を混和し、煮沸して溶かす。煮沸後の液性は pH 7.4~7.8。高圧蒸気滅菌をし

てはならない。過剰な加熱は避ける。約 50℃に冷却してペトリ皿に分注する。

(vii) TSI(トリプルシュガーアイアン)寒天培地

カゼイン製ペプトン	10.0g
肉製ペプトン	10.0g
乳糖 1 水和物	10.0g
白糖	10.0g
ブドウ糖	1.0g
硫酸アンモニウム鉄(II)6 水和物	0.20g
塩化ナトリウム	5.0g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	0.20g
フェノールレッド	0.025g
寒天	13.0g
水	1,000ml

全成分を混和し、煮沸して溶かした後、小試験管に分注して、121℃で 15～20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の液性は pH7.1～7.5。斜面寒天培地として使用する。なお、上記の組み合わせに加えて、肉エキスや酵母エキス 3g を含むものや、硫酸アンモニウム鉄(II)6 水和物の代わりにクエン酸アンモニウム鉄(III)を含むものも使用して差し支えない。

定量法 (1) 力価

穿孔寒天平板を用いて得られる試験菌の発育阻止円の大きさを指標として、抗菌活性を測定する。水、試薬・試液及び計器・器具は、必要に応じ、滅菌したものを用いる。

(i) 試験菌 *Micrococcus luteus* (ATCC 10240, NCIMB 8166)を用いる。

(ii) 培地 培地の pH は水酸化ナトリウム試液又は 1mol/L 塩酸を用いて調製し、滅菌後の pH が規定の値になるようにする。なお、規定の培地と類似の成分を有し、同等又はより優れた菌の発育を示す他の培地を用いることができる。滅菌は高圧蒸気法で行う。

① 種層用寒天培地

トリプトン	10 g
肉汁	3 g
塩化ナトリウム	3 g
酵母エキス	1.5 g
シヨ糖	1 g
寒天	15 g
水	1,000 ml

全成分を混和し、121℃、15 分間滅菌する。滅菌後の pH は 7.4～7.6 とする。滅菌後、培地と同温度の 50%ポリソルベート 20 溶液を 2 ml 添加する。

② 試験菌移植用斜面寒天培地

ブレインハートインフュージョン寒天	52g
水	1,000 ml

全成分を混和し、121℃、15 分間滅菌する。滅菌後の pH は 7.2～7.6 とする。この寒