

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
ショ糖	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。この寒天培地 9ml を内径約 16mm の試験管に分注して斜面とする。

(iii) 試験菌液の調製 試験菌を試験菌移植用斜面寒天培地を用いて 30℃で 48 時間培養する。この菌を滅菌した生理食塩水 7ml に懸濁させ、試験菌液とする。菌を移植した試験菌移植用斜面寒天培地は 4℃で最大 14 日間保存することができる。

(iv) 種層寒天培地の調製 試験菌液を生理食塩水で希釈した液(1→10) 2ml を 48~51℃に保った種層用寒天培地 100ml に加え、十分に混合し、種層寒天培地とする。

(v) 穿孔寒天平板の調製 シャーレ (内径 90mm, 高さ 20mm) の場合は約 20 ml, 大型皿の場合は培地の厚さが 2~3 mm となるように種層寒天培地を入れ、寒天が水平になるように広げて室温にて固化させたものを種層寒天平板とする。種層寒天平板上の半径約 25~28 mm の円周上に、円筒 (ペニシリンカップ) の中心間の距離が 30 mm 以上となるように一定間隔で 4 個並べる。円筒を置いた状態で種層寒天培地 20 ml を分注し、固化させた後、4℃にて 30~60 分保持し、滅菌したピンセット等を用いて培地より円筒を静かに抜き、穿孔寒天平板とする。円筒は、外径 7.9~8.1 mm, 内径 5.9~6.1 mm, 高さ 9.9~10.1 mm のステンレス製のもので、試験に支障をきたさないものを用いる。穿孔寒天平板は用時調製する。

(vi) ナイシン標準液の調製 ナイシン標準品 0.100g を正確に量り、0.2µm 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、0.02mol/L 塩酸を加えて 100 ml とし、これを標準原液 (1,000 単位/ml) とする。更に 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 (単位/ml) となるよう、標準原液を 0.02mol/L 塩酸を用いて希釈し、標準液とする。

ナイシン標準液は用時調製する。

(vii) ナイシン標準曲線の作製 穿孔寒天平板 5 枚(大型皿穿孔寒天平板の場合はこれに順ずる枚数)を 1 組として用いる。ナイシン標準液を濃度ごとに異なる穿孔寒天平板へ 0.2 ml ずつ 4 箇所穴に入れる。標準液分注後、プレートに蓋をし、30℃で 18 時間培養する。培養後、形成された阻止円の直径をノギスを用いて 0.1 mm 単位で測定する。ナイシン濃度(単位/ml)に対して阻止円の直径(mm)をプロットし、ナイシン標準曲線とする。

(viii) ナイシン濃度測定 本品 0.100g を正確に量り、0.2µm 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、検液とする。標準曲線の作成の手法に従い、検液の阻止円の測定を行う。検液は用時調製する。また、標準液及び検液は阻止円の測定は同時に試験を行う。阻止円測定後、得られた値より標準曲線から力価(単位/mg)を求める。

(ix) 力価の算出 標準液より導いた標準曲線 ( $y = \alpha \ln(X) + \beta$ ) より、検液の力価を求める。

$$\text{検液の力価} = \text{EXP} \left( (\text{阻止円直径} - \beta) / \alpha \right) \text{ (単位/ml)}$$

$$\text{本品の力価} = \text{検液の力価} / 5 \times 1000 \text{ (単位/mg)}$$

## (2) 塩化ナトリウムの定量

本品 0.1g を精密に量り、水 100ml を加えて溶かし、さらに硝酸を加えて酸性とし、指示電極に銀電極、参照電極に銀・塩化銀電極を用い、0.1mol/L 硝酸銀溶液で滴定する。別に空試験を行い補正して消費量 a ml を求め、次式により含量を求める

$$\text{塩化ナトリウム (NaCl) の含量} = \frac{a \times 5.85}{\text{試料の採取量(g)} \times 10} \text{ (\%)}$$

## 試薬・試液

亜硫酸ビスマス・インジケーター 微生物試験用に製造したもの。

クエン酸二アンモニウム  $C_6H_{14}N_2O_7$  [K 8284]

生理食塩水 日本薬局方生理食塩液を用いる。

ブレインハートインフュージョン寒天 微生物試験用に製造したもの。

プロテオースペプトン 微生物試験用に製造したもの

50% ポリソルベート 20 溶液 ポリソルベート 20 と水を一対一で混合し、滅菌する。

マラカイトグリーンシュウ酸塩  $C_{52}H_{54}N_4O_{12}$  [K 8878, マラカイトグリーン(しゅうさん酸塩), 特級]

リトマス [K 8940:1961] 本品は、青～帯紫青色の粉末又は塊で、水又はエタノールに溶け、その溶液は青～紫青色を呈する。

確認試験 本品 0.5g を温水 50ml に溶かし、赤色を呈するまで希硫酸を滴加し、10 分間煮沸する。この間青色を呈するときは赤色となるまで希硫酸を滴加する。さらに、紫色を呈す

るまで水酸化バリウム溶液を加えてろ過し、A液とする。煮沸して冷却した水 100ml に A液 0.5ml 及び 0.1mol/L 塩酸 0.05ml を加えるとき、赤色を呈する。また、煮沸して冷却した水 100ml に A液 0.5ml 及び 0.1mol/L 水酸化ナトリウム 0.05ml を加えるとき、青色を呈する。

リトマスミルク 脱脂粉乳 100g, リトマス 0.5g 及び無水硫酸ナトリウム 0.5g に水 1,000ml を加えて混和し、115℃, 15分間滅菌する。

リン酸三ナトリウム 12水和物  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  [K 9012, リン酸三ナトリウム・12水, 特級]

ナイシン標準品 厚生労働大臣の登録を受けた者が製造する標準品

## ナイシンの規格設定の根拠

主に、JECFA 規格及び FCC 規格を参考とし、EU の食品添加物規格も参考に成分規格案を設定した。なお、本品は、原体としてではなく、塩化ナトリウムを含む製剤としてのみ流通するため、ナイシンの製剤として規格を設定した。

### 名称、構造式、分子式及び分子量

名称は、JECFA 規格及び FCC 規格では Nisin Preparation、EU では Nisin (製剤規格) とされている。製剤としてのみ流通することから、製剤の文字を省略し、単に「ナイシン」とした。今回の指定の対象となっているのはナイシン A であるため、構造式、分子式及び分子量については、Nisin A のものを採用した。なお、分子量は、JECFA では約 3354、FCC では～3348、EU では 3354.12 としているが、2005 年の原子量表に基づき、3354.07 とした。

### 定義

JECFA において、ナイシンは、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が産生する関連性が高い抗菌性ポリペプチドの混合物であり、活量調整のために添加される塩化ナトリウム、及び無脂肪乳固形分又はその他の発酵源由来の固形分を含むことが定義されている。FCC では *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 菌株が産生する関連性が高いポリペプチドの混合物であり、活量調整のために、塩化ナトリウム及び固形無脂肪乳を加えると記載されている。EU においては、*Streptococcus lactis* (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* の旧菌株名) から産生される数種の関連性の高いポリペプチドから成ると定義されている。本規格案では、菌名は、JECFA 及び FCC に準拠した。また、抗菌活性の本質はナイシン A であることから、明確に定義する為、「主たる抗菌性ポリペプチドはナイシン A である。」と記載した。また、培地 (乳培地又は糖培地) 由来の成分を含むことから、そのことを記載した。

### 含 量

JECFA、FCC 及び EU とともに、900 国際単位/mg 以上と設定されており、これらの規格に準拠し、単位当たりのナイシン量を明確に示した。また、本品は塩化ナトリウムを加えて、活性を調整した製剤であり、JECFA、FCC 及び EU において、塩化ナトリウムの含量を規定しているため、本規格案でも採用した。

### 性 状

JECFA においては白～淡褐色の微粉末、FCC では白色の流動性粉末 (free-flowing powder) とされている。色については JIS 色名帳 (JIS Z 8102) に準拠した。

### 確認試験

JECFA 及び FCC とともに他の抗菌剤との識別を確認する為、酸に対する安定性及び *Lactococcus lactis* のナイシンに対する耐性試験を設定している。JECFA、FCC に準拠して設定した。

## 純度試験

- (1) 鉛 JECFA では 1 mg/kg 以下、FCC では 2 mg/kg 以下、EU では、5mg/kg と設定されている。JECFA に準拠し、1.0µg/g と設定した。
- (2) ヒ素 JECFA、FCC ともに設定されていないが、EU に As として 1mg/kg と設定されている。本規格案では EU の規格を踏まえ、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> として 2.0µg/g とした。

## 乾燥減量

JECFA、FCC 及び EU ともに 3.0% で設定されている。これらの規格に準拠し、設定した。

## 微生物限度

JECFA 及び FCC において、微生物限度が設定されていることから、本規格案でも、採用した。JECFA では、サルモネラ陰性(試料 25g)、大腸菌群 30/g、大腸菌陰性(試料 25g)が規定され、一方、FCC では、生菌数 10cfu/g、大腸菌陰性(試料 25g)、サルモネラ陰性(試料 25g)が規定されている。本規格案では、FCC 規格に準じ、生菌数、大腸菌及びサルモネラを設定し、試験法は、一般試験法及び日本薬局方に準拠した。ただし、生菌数試験では発育阻止が認められたため、試験液濃度を 1mg/ml とし、100ml を試験に用い、メンブランフィルターの材質を規定した。また、大腸菌試験では、本品の溶解性を考慮し、「本品 1g を量り、乳糖ブイヨン培地と混和して 100ml とし、30～35℃ で 24～72 時間培養する。」とした。

## 定量法

### (1) 力価

JECFA では試験菌に *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* を用い、比色法による力価測定法を採用している。JECFA の比色法では目視により検液と標準液を比較し、計算を行っているため、半定量的である。一方、FCC では、*Micrococcus luteus* を試験菌として用い、穿孔平板法により得られる発育阻止円の大きさを指標として力価測定を採用している。FCC の方法は、発育阻止円の標準曲線に基づき定量的に力価測定ができる。また、穿孔平板法は、日本薬局法 一般試験法 4.02 抗生物質の微生物学的力価試験法とほぼ同等である。本規格では、定量性、及び日本における公定試験法との整合性から、FCC の規格に準拠した。

### (2) 塩化ナトリウム

JECFA では及び FCC では、指示薬を用いて滴定を行っているが、いずれも操作が煩雑であるため、本規格案では、電位差滴定を採用した。

## JECFA または FCC 等に設定され、本規格では採用しなかった項目

JECFA では、「溶解性」として、「水に可溶、無極性溶媒に不溶」としているが、確認試験として、溶解性の項を設定する必要はないと考えられるため、本規格案では溶解性に係る規格は採用しないこととした。

## 他の規格との対比表

	本規格案	JECFA	FCC	EU
品名	ナイシン	Nisin Preparation	Nisin Preparation	Nisin
CAS No.	1414-45-5	1414-45-5	1414-45-5	
Einecs No.				215-807-5
化学式	C <sub>143</sub> H <sub>230</sub> N <sub>42</sub> O <sub>37</sub> S <sub>7</sub>	C <sub>143</sub> H <sub>230</sub> N <sub>42</sub> O <sub>37</sub> S <sub>7</sub>	C <sub>143</sub> H <sub>230</sub> O <sub>37</sub> N <sub>42</sub> S <sub>7</sub>	C <sub>143</sub> H <sub>230</sub> N <sub>42</sub> O <sub>37</sub> S <sub>7</sub>
分子量	3354.07	約3354	~3348	3354.12
定義	本品は、 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> の培養液から得られた抗菌性ポリペプチドの塩化ナトリウムとの混合物である。無脂肪乳培地又は糖培地由来の成分を含む。主たる抗菌性ポリペプチドはナイシンAである。	<i>Lactococcus lactis</i> , subsp. <i>lactis</i> により産生される関連性の高い抗菌性ポリペプチドの混合物。ナイシンは無脂乳又は無乳培養源(酵母抽出物、炭水化物)の滅菌培地で産生される。ナイシンはいろいろな方法で回収される。ナイシン製剤は、ナイシンと塩化ナトリウムからなり、900IU/mg以上の活性を持つ。活性は、塩化ナトリウムの添加によって調整する。製剤には、固形無脂乳又はその他の発酵源が存在する。ナイシン製剤は室温及び酸性下での加熱に安定である。	成長に適した培養液中で、ランズフィールド分類N群の <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> により産生される関連性の高いポリペプチドの混合物である。ナイシンは、いろいろな方法で回収される。製品は、ナイシンと塩化ナトリウムからなり、活性度が900IU/mg以上となるよう、塩化ナトリウムと無脂乳固形物の添加により調整されている。(Description)	ナイシンはランズフィールド分類N群の <i>Streptococcus lactis</i> の自然菌株から産生される数種の関連性の高いポリペプチドから成る。
含量	ナイシン 900単位 / mg 以上	ナイシン 900 IU /mg 以上	ナイシン900 IU /mg以上	ナイシン 900 IU /mg 以上
	塩化ナトリウム 50%以上	塩化ナトリウム 50%以上	塩化ナトリウム 50.0%以上 (Requirements))	塩化ナトリウム 50%以上
性状	本品は白～淡黄色の粉末でにおいがなく又はわずかに特異なおいがある	白～うす茶色の微粉末	白色, free-flowing powder.	白色粉末
<b>確認試験</b>				
他の抗菌物質との区別	・酸に対する安定性 ・高濃度ナイシンに対する <i>Lactococcus lactis</i> の耐性	・酸に対する安定性 ・高濃度ナイシンに対する <i>Lactococcus lactis</i> の耐性	・酸に対する安定性 ・高濃度ナイシンに対する <i>Lactococcus lactis</i> の耐性	—
溶解性	設定しない	水に可溶, 無極性溶媒に不溶	—	—
<b>純度試験</b>				
鉛	1.0 μg/g以下	1mg/kg 以下	2mg/kg以下	5mg/kg以下
ヒ素	2.0 μg/g以下 (1g,第3法,装置B)	—	—	1mg/kg以下
重金属 (Pbとして)	設定しない	—	—	10mg/kg以下
水銀	設定しない	—	—	1mg/kg以下
乾燥減量	3.0%以下 (105°C, 2時間)	3.0%以下 (105°C, 2時間)	3.0%以下 (105°C, 2時間)	3%以下 (102~103°C, 恒量)
<b>微生物限度</b>				
細菌数	1gにつき100以下	—	10 CFU/g	—
大腸菌	陰性 (試料1g中)	陰性 (試料25g中)	陰性 (試料25g中)	—
サルモネラ菌	陰性 (試料10g中)	陰性 (試料25g中)	陰性 (試料25g中)	—
大腸菌群	設定しない	30以下/g	—	—
<b>定量法</b>				
(1)力価	<i>Micrococcus</i> を用いた発育阻止円サイズによる力価の測定	<i>Lactococcus</i> を用いた比色法による力価の測定	<i>Micrococcus</i> を用いた発育阻止円サイズによる力価の測定	—
(2)塩化ナトリウム	0.1mol/L硝酸銀溶液で滴定(電位差滴定)	0.1N硝酸銀で滴定(ジクロロフルオレセイン)	過剰の硝酸銀を0.2Nチオシアン酸アンモニウム溶液で滴定(硫酸アンモニウム鉄試液)	

(参考)

これまでの経緯

平成15年10月20日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに添加物の指定に係る食品健康影響評価について依頼
平成15年10月23日	第15回食品安全委員会（依頼事項説明）
平成16年4月9日	第7回食品安全委員会添加物専門調査会
平成16年11月16日	第14回食品安全委員会添加物専門調査会
平成17年1月26日	第17回食品安全委員会添加物専門調査会
平成19年7月30日	第46回食品安全委員会添加物専門調査会
平成19年8月27日	第47回食品安全委員会添加物専門調査会
平成19年8月30日	第204回食品安全委員会（報告）
～平成19年9月28日	食品安全委員会における国民からの意見聴取
平成19年9月13日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
平成19年9月26日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会
平成19年10月24日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会
平成20年1月31日	第224回食品安全委員会（報告）
	食品安全委員会より食品健康影響評価が通知
平成20年2月28日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会

●薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会

[委員]

	石田 裕美	女子栄養大学教授
	井手 速雄	東邦大学薬学部教授
	井部 明広	東京都健康安全研究センター
	北田 善三	畿央大学健康科学部教授
	佐藤 恭子	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部第一室長
	棚元 憲一	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長
○	長尾 美奈子	共立薬科大学客員教授
	堀江 正一	埼玉県衛生研究所水・食品担当部長
	米谷 民雄	国立医薬品食品衛生研究所食品部長
	山内 明子	日本生活協同組合連合会組織推進本部 本部長
	山川 隆	東京大学大学院農学生命科学研究科准教授
	山添 康	東北大学大学院薬学研究科教授
	吉池 信男	独立行政法人国立健康・栄養研究所研究企画評価主幹

(○：部会長)