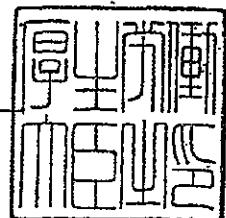


厚生労働省発食安第0913010号
平成 19 年 9 月 13 日

薬事・食品衛生審議会
会長 望月 正隆 殿

厚生労働大臣 外添要



諮問書

食品衛生法（昭和22年法律第233号）第10条の規定に基づき、下記の事項について、貴会の意見を求めます。

記

ナイシンの食品添加物としての指定の可否について

平成 20 年 3 月 13 日

薬事・食品衛生審議会
食品衛生分科会
分科会長 吉倉 廣 殿

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
添加物部会長 長尾 美奈子

食品添加物の指定等に関する薬事・食品衛生審議会
食品衛生分科会添加物部会報告について

平成 19 年 9 月 13 日付け厚生労働省発食安第 0913010 号をもって厚生労働大臣から諮問されたナイシンの食品添加物としての指定の可否について、当部会において審議を行った結果を別添のとおり取りまとめたので、これを報告する。

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

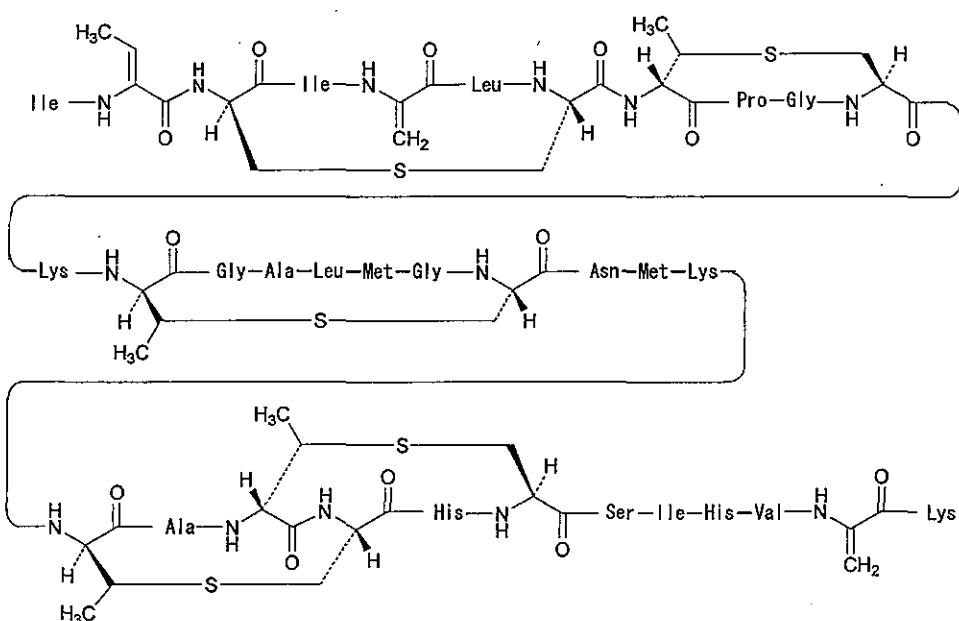
1. 品目名

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



主たる抗菌性成分は、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（ナイシンA）

分子式 : $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$

分子量 : 3354.07

3. 用途

保存料、製造用剤

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、缶詰等に使用されている。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、欧洲連合（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。また、ナイシンは常温及び酸性条件下（pH 3 で最も安定）の加熱に安定である。

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。*C. 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 1×10^6 個/mL となるように、それぞれトマトジュース(pH 5.3)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/L (=4.0 IU/g) のナイシンでは 4 菌株について、1.0mg/L (=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 Campbell 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
B. stearothermophilus	250° F(121°C)	657	カーネルコーン	2.67	0.53
B. coagulans	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
C. butyricum N.C.T.C. 7423	3,500	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++				
	30	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
C. sporogenes Cl. 6	800	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	8	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
C. bifermentans N.C.T.C. 2914	800	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	8	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++

十、ーの符号は試験細菌の生育、不生育の程度を示す。

⁴ Hirsch A and Grinsted 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 (*C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. 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
プロセスチェダー 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
プロセスチェダー 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
プロセスチェダー 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
プロセスチェダー 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 *C. 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 μm) 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 ⁴ *	<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 ⁵ †	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) 味噌麹に対するナイシンの効果

1) 製麹工程での使用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°C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麹を接種し、芽胞接種後及び38°C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 味噌麹の製麹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	30°C、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)

*麹は通常、蒸米に種麹を接種してから約40時間で出来上がることを踏まえ設定

2) 熟成工程での使用⁸

水に一晩浸漬した大豆を120°C60分蒸した後、放冷、磨碎し蒸煮大豆とした。市販の味噌用麹と蒸煮大豆を等量混合し、食塩を最終濃度が8%となるように添加し、更に、ナイシン添加区はナイシンを200IU/g(5mg/kg)及び400IU/g(10mg/kg)となるよう添加した。30°Cで保存し、熟成中の一般生菌数を測定した結果、ナイシン無添加区は熟成期間とともに、菌数の増加が認められ、熟成13日後では、腐敗レベルの菌数となった。しかしナイシン添加区では顕著な増殖は認められなかった。(図1)

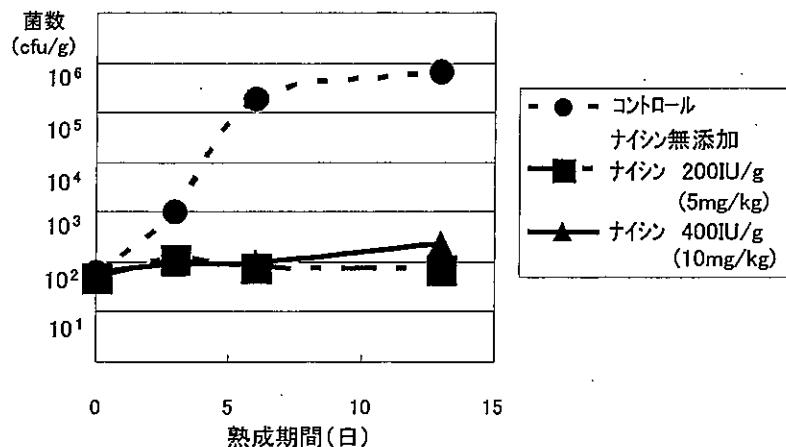


図1. 味噌(食塩含量8%)の熟成中の細菌数の推移

⁷味噌麹中における*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)

⁸味噌熟成中における一般細菌数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)

6. 食品安全委員会における評価結果について

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、以下の評価結果が平成20年1月31日付けで報告されている。

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 世代繁殖毒性試験

(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。

ナイシンについて、*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が担保できないことから、一日摂取許容量(ADI) 設定には用いせず、あくまで評価の参考に用いることとした。

欧州SCF の評価の根拠とされているラット3 世代繁殖毒性試験については、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 世代繁殖毒性試験

(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

ナイシンは、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、不活性化される。

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り、また、移行したナイシンは腸内酵素により分解又は不活性化されると考えられ、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、リストリア菌のナイシン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、交差耐性を含む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。

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。

糖培地を用いて製造されたナイシン製剤（変更行程品）は、乳培地を用いて製造されたナイシン製剤（従来行程品）と同等の力値を有し、より純度が高く、また、乳由来の不純物の含有がないことから乳アレルギーのリスクの低減化が図れると考える。

以上から、従来行程品の評価結果は変更品の評価にも適用することができる」と判断した。

7. 摂取量の推計

上記の食品安全委員会の評価結果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、国民健康・栄養調査を参考にして算出すると0.045 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適正な量が用いられるべきである。

使用基準案

ナイシンは、穀類及びでん粉を主原料とする洋生菓子、ソース類、卵加工品、チーズ、ドレッシング、食肉製品、ホイップクリーム類（乳脂肪分を主成分とする食品を主要原料として泡立てたものをいう。以下この目において同じ。）、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チーズ（プロセスチーズを除く。）、食肉製品及びホイップクリーム類にあっては1kgにつき0.0125g以下、ソース類、マヨネーズ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、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につき0.0050g以下、穀類及びでん粉を主原料とする洋生菓子にあっては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。

穀類及びでん粉を主原料とする洋生菓子：ライスピディングやタピオカピディング等をいい、団子のような和生菓子は含まない。

ソース類：果実ソースやチーズソースなどのほか、ケチャップも含む。ただし、ピューレー及び菓子などに用いるいわゆるフルーツソースのようなものは含まない。

*当初、アイスクリーム類、いくら、かずのこ調味加工品、辛子明太子、魚介乾製品、魚肉練り製品、麺、すじこ、ソーセージ類、卵加工品、たれ、たらこ、チーズ、つゆ、豆腐、ドレッシング、生菓子、乳飲料、ハム、フラワーペースト類、ホイップクリーム及び洋菓子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. アイスクリーム類、いくら、かずのこ調味加工品、辛子明太子、魚介乾製品、魚肉練り製品、麺、すじこ、たらこ、つゆ、豆腐、乳飲料、フラワーペースト類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. 生菓子を穀類及びでん粉を主原料とする洋生菓子に変更するとともに、これに対して0.0050g/kgから0.0030g/kgに変更する。
4. たれをソース類、マヨネーズに変更する。

(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	国民健康・栄養調査 食品分類 (H16)	摂取量 (g/日)	使用基準案 (mg/kg)	ナイシン摂取量 (mg/日)
ホイップクリーム類(乳脂肪 分を主成分とする食品を主 要原料として泡立てたもの をいう。)	74: その他の乳製品	8.2	12.5	0.103
チーズ(プロセスチーズを除 く。)	72: チーズ	2.3	12.5	0.029*
プロセスチーズ			6.25	
穀類及びでん粉を主要原料と する洋生菓子	85: その他の菓子類	5.3	3.0	0.016
洋菓子	5: 菓子パン 82: ケーキ・ペスト リーメン	6.4 7.4	6.25	0.086
食肉製品	63: ハム、ソーセー ジ	11.4	12.5	0.143
ソース類、マヨネーズ、ドレ ッシング	92: ソース 95: マヨネーズ 97: その他の調味料	2.1 3.3 56.8	10.0	0.622
卵加工品	70: 卵類	34.4	5.0	0.172
味噌	96: 味噌	11.7	5.0	0.059
合計				1.230**

* プロセスチーズへの使用量は 12.5mg/kg として計算

** 対ADI比 18.9% (ヒト体重を 50kg とした場合)

2) 成分規格案について

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では、「現時点では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* が同定されている⁹。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。

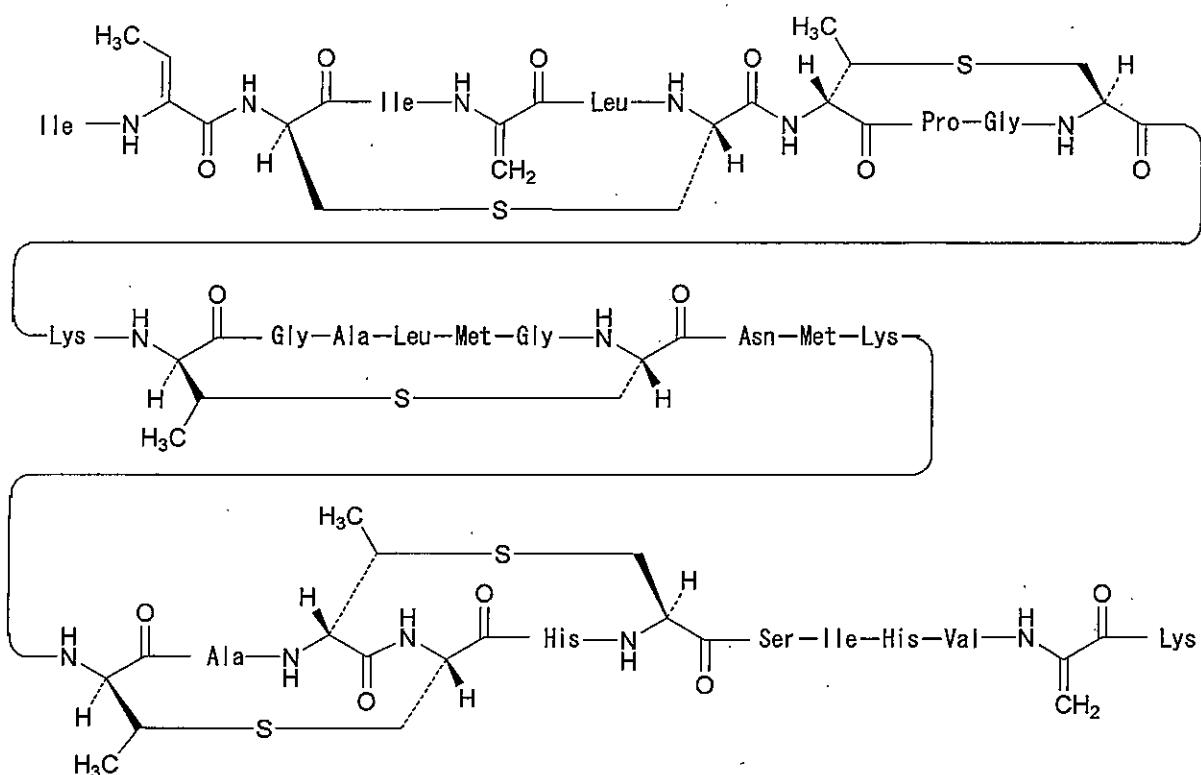
一方で、耐性菌の出現に関する情報を入手することは、添加物の適切な使用を指導するうえで重要であるため、ナイシン耐性菌に関して情報を収集し、安全性、有効性の点で問題となるような新たな知見あれば、速やかに報告するよう事業者等に対し周知を図ることが適当である。

⁹ 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

ナイシン

Nisin



分子量 3354.07

[1414-45-5]

定義 本品は、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 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。

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 ($C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$) 0.025μg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、においがな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、0.2μmのフィルターを通して滅菌した0.02mol/L 塩酸80mlに懸濁する。2時間室温に置き、更に0.02mol/L 塩酸を加えて100ml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±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°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) 減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°C, 18 時間培養し, 試験菌液とする。リトマスマルク 100 ml を入れたフラスコを 121°Cで 15 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌したリトマスマルクに本品 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°C, 24 時間培養するとき, *Lactococcus lactis* の生育を認める。

純度試験 (1) 鉛 Pb として 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°C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°C, 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100以下である。また大腸菌は認めない。ただし, 細菌数については, 生菌数試験のメンプランフィルター法により求める。試料液は, 本品1gを量り, ペプトン食塩緩衝液と混和して1,000mlとする。試料液100ml をセルロース混合エステル製メンプランフィルターでろ過した後, フィルターをろ過洗浄し, ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地の表面に置き, 30~35°Cで5日間培養する。また大腸菌については, 本品1gを量り, 乳糖ブイヨン培地を加えて100mlとし, 30~35°Cで24~72時間培養する。

さらに, 下記の試験を行うとき, サルモネラは認めない。

試験の手順

試料 10g を量り, 乳糖ブイヨンを加えて 200ml とし, 30~35°C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 のテトラチオネート液体培地及びラバポート液体培地に接種し, 30~35°Cで 18~24 時間培養する。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及び XLD 寒天培地上に塗抹し, 30~35°Cで 42~48 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°C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、乳糖ブイヨン培地を用い、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、乳糖ブイヨン培地等を用いて、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) 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

全成分を煮沸して溶かす。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。

(ii) ラバポート液体培地

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pH5.4～5.8。

(iii) 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。

(iv) 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。高压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。

(v) 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分間高压蒸気滅菌する。滅菌後の液性はpH 7.1~7.5。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
ショ糖	1 g
寒天	15 g
水	1,000 ml

全成分を混和し、121°C、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°C、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°C 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°C 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釀した液(1→10) 2ml を 48~51°C 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 となるよう種層寒天培地を入れ、寒天が水平になるよう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°C 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成 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箇所の穴に入れる。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 x (単位/ml) の常用対数値 $\log x$ を横軸に、阻止円の直径 y (mm) を縦軸にとり、ナイシン標準曲線 ($y = \alpha \log x + \beta$) を作成し、定数 α 及び β を求める。
- (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 以下の式により、本品の力価を求める。

$$\text{検液の力価} = 10^I (\text{単位/ml})$$

$$I = \frac{\text{阻止円の直径(mm)} - \beta}{\alpha}$$

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

(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

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

試薬・試液

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。

トリプトン 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 1:1 の割合で混合し、121℃で 15 分間高压蒸気滅菌を行う。

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

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飽和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。

リトマスマルク 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°C、15分間滅菌する。

リン酸一カリウム リン酸二水素カリウムを見よ

リン酸二水素カリウム KH_2PO_4 [りん酸二水素カリウム、K 9007]

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

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体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体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, 1.0 μ g/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, As₂O₃ として 2.0 μ g/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, 本品の抗菌性を考慮し, 「本品 1g を量り, 乳糖ブイヨン培地と混和して 100ml とし, 30~35°Cで 24~72 時間培養する。」とした。サルモネラ試験では, 本品の溶解性を考慮し, 「試料 10g を量り, 乳糖ブイヨンを加えて 200ml とし」とし, 培地は試験法の検討に用いたものに限定した。

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。

1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	$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$	$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$	$C_{143}H_{230}O_{37}N_{42}S_7$	$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$
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> により产生される関連性の高い抗菌性ポリペプチドの混合物。ナイシンは固形無脂乳又は無乳培養源(酵母抽出物, 炭水化物)の滅菌培地で产生される。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以上の活量を持つ。活量は、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、ランスフィールド分類N群の <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> により产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)	ナイシンはランスフィールド分類N群の <i>Streptococcus lactis</i> の自然菌株から产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いか又はわずかに特異なにおいがある	白～うす茶色の微粉末	白色, free-flowing powder.	白色粉末
認試験				
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	—	—
限度試験				
鉛	1.0 μ g/g以下	1mg/kg 以下	2mg/kg以下	5mg/kg以下
ヒ素	2.0 μ g/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)
微生物限度				
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	—	—
定量法				
(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(ジクロロフルオレスцин)	過剰の硝酸銀を0.2Nチオシアニ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)
平成20年2月28日	食品安全委員会より食品健康影響評価が通知 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

(平成19年9月26日、平成19年10月24日、平成20年2月28日開催)

[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)

答申（案）

ナイシンについては、食品添加物として人の健康を損なうおそれはないことから、指定することは、差し支えない。

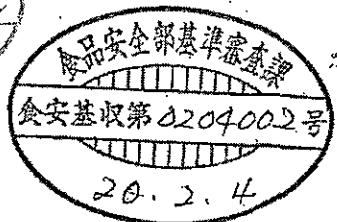
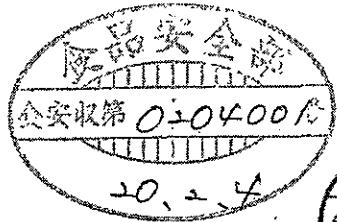
なお、指定に当たっては、以下のとおり使用基準及び成分規格を設定することが適当である。

使用基準

使用基準の食品名	使用基準 (mg/kg)
ホイップクリーム類（乳脂肪分を主成分とする食品を主要原料として泡立てたものをいう。）	12.5
チーズ（プロセスチーズを除く。）	12.5
プロセスチーズ	6.25
穀類及びでん粉を主原料とする洋生菓子	3.0
洋菓子	6.25
食肉製品	12.5
ソース類、マヨネーズ、ドレッシング	10.0
卵加工品	5.0
味噌	5.0

成分規格

部会報告書 別紙1(p. 17)に記載のとおり。



資料 1-3

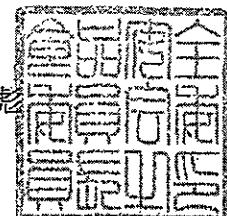
府食第 00108 号
平成 20 年 1 月 31 日

厚生労働大臣

舛添 要一 殿

食品安全委員会

委員長 見上 處



食品健康影響評価の結果の通知について

平成 15 年 10 月 20 日付け厚生労働省発食安第 1020002 号をもって貴省から当委員会に意見を求められたナイシンに係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりです。食品安全基本法（平成 15 年法律第 48 号）第 23 条第 2 項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

ナイシンの一日摂取許容量を 0.13 mg/kg 体重/日 と設定する。

添加物評価書

ナイシン

2008年1月

食品安全委員会

目次

○ 審議の経緯.....	1
○ 食品安全委員会委員名簿.....	1
○ 食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿.....	1
○ ナイシンを添加物として定めることに係る食品健康影響評価に関する審議結果.....	3
・ 要約	3
1. はじめに.....	5
2. 背景等.....	5
3. 添加物指定の概要.....	5
4. 物理化学的性質等.....	6
5. 安全性.....	6
(1) 体内動態.....	6
(2) ナイシン様抗生物質產生菌のウシ及びヒトにおける存在.....	7
(3) 微生物の耐性.....	7
(4) 毒性.....	8
①急性毒性.....	8
②亜急性毒性.....	8
③慢性毒性.....	11
④慢性毒性（/繁殖毒性）.....	11
⑤発がん性.....	11
⑥繁殖毒性.....	11
⑦遺伝毒性.....	12
⑧抗原性.....	12
⑨一般薬理.....	12
6. 国際機関等における安全性評価.....	12
(1) JECFA における評価.....	12
(2) 米国食品医薬品庁（FDA）における評価.....	13
(3) 歐州食品科学委員会（SCF）における評価.....	13
7. 一日摂取量の推計.....	14
8. 評価結果.....	14
【引用文献】.....	17
安全性試験結果一覧.....	20
(別添)ナイシンの使用予定食品及び推定摂取量.....	23

〈審議の経緯〉

平成15年10月20日	厚生労働大臣から添加物の指定に係る食品健康影響評価について要請、関係書類の接受
平成15年10月23日	第21回食品安全委員会（要請事項説明）
平成16年4月9日	第7回添加物専門調査会
平成16年11月16日	第14回添加物専門調査会
平成17年1月26日	第17回添加物専門調査会
平成19年7月30日	第46回添加物専門調査会
平成19年8月27日	第47回添加物専門調査会
平成19年8月30日	第204回食品安全委員会（報告）
平成19年8月30日 から平成19年9月28日	国民からの意見・情報の募集
平成19年12月25日	第52回添加物専門調査会
平成20年1月29日	添加物専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
平成20年1月31日	第224回食品安全委員会（報告） (同日付け厚生労働大臣に通知)

〈食品安全委員会委員〉

平成18年6月30日まで	
寺田 雅昭 (委員長)	中村 靖彦
寺尾 允男 (委員長代理)	本間 清一
小泉 直子	見上 彪
坂本 元子	
平成18年12月20日まで	
寺田 雅昭 (委員長)	野村 一正
見上 彪 (委員長代理)	畠江 敬子
小泉 直子	本間 清一
長尾 拓	
平成18年12月21日から	
見上 彪 (委員長)	畠江 敬子
小泉 直子 (委員長代理*)	廣瀬 雅雄**
長尾 拓	本間 清一
野村 一正	*平成19年2月1日から **平成19年4月1日から

〈食品安全委員会添加物専門調査会専門委員〉

平成15年9月25日から平成17年9月30日まで	
福島 昭治 (座長)	大野 泰雄
山添 康 (座長代理)	西川 秋佳
井上 和秀	林 真
今井田 克己	三森 国敏
江馬 真	吉池 信男

平成19年9月30日まで

福島 昭治 (座長)	久保田 紀久枝
山添 康 (座長代理)	中島 恵美

石塚 真由美
井上 和秀
今井田 克己
江馬 真
大野 泰雄

西川 秋佳
林 真
三森 国敏
吉池 信男

平成19年10月1日から
福島 昭治 (座長)
山添 康 (座長代理)
石塚 真由美
井上 和秀
今井田 克己
梅村 隆志
江馬 真

久保田 紀久枝
頭金 正博
中江 大
中島 恵美
林 真
三森 国敏
吉池 信男

〈参考人〉

河村 葉子
中澤 裕之

ナイシンを添加物として定めることに係る 食品健康影響評価に関する審議結果

要 約

保存料として使用される添加物「ナイシン」（CAS番号：1414-45-5）について、各種試験成績等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に供した試験成績は、ナイシン及びそれを含有する製剤もしくは加水分解物を被験物質としたものも含め、反復投与毒性、発がん性、生殖発生毒性、遺伝毒性等である。

ナイシンについて、*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が担保できないことから、一日摂取許容量（ADI）設定には用いず、あくまで評価の参考に用いることとした。

欧州 SCF の評価の根拠とされているラット 3 世代繁殖毒性試験については、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、無毒性量（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%（12.5 mg/kg 体重/日相当）と考えられることから、安全係数を 100 とし、ナイシンの ADI を 0.13 mg/kg 体重/日と設定した。

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、交差耐性を含む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。

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。

糖培地を用いて製造されたナイシン製剤（変更工程品）は、乳培地を用いて製造されたナイシン製剤（従来工程品）と同等の力価を有し、より純度が高く、また、乳由來の不純物の含有がないことから乳アレルギーのリスクの低減化が図れると考える。以上から、従来工程品の評価結果は変更工程品の評価にも適用することが可能であると判断した。

1 はじめに

ナイシンは発酵乳から分離されたラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) が产生する 34 個のアミノ酸から成るペプチド（ランチビオティック^{注1}系バクテリオシン^{注2}）で、*Bacillus* 属と *Clostridium* 属を含むグラム陽性菌の熱処理後における芽胞の発芽後生育を低濃度で阻害する。

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、缶詰等に使用されている。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 (Generally Recognized as Safe; 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¹⁾。欧洲連合 (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 (E234)²⁾。

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) では、第 12 回 (1968 年) 会議においてナイシンが評価され、ラットの 2 年間慢性毒性試験の結果より、NOAEL は 3,330,000 U/kg 体重* とされ、ADI は 0-33,000 U/kg 体重とされている³⁾。

(*原著によると、3,330,000 U/kg は飼料中濃度である。9 ページ参照)

2 背景等

厚生労働省は、平成 14 年 7 月の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会での了承事項に従い、①JECFA で国際的に安全性評価が終了し、一定の範囲内で安全性が確認されており、かつ、②米国及び EU 諸国等で使用が広く認められていて国際的に必要性が高いと考えられる食品添加物 46 品目については、企業等からの指定要請を待つことなく、指定に向けた検討を開始する方針を示している。これに該当するナイシンについては、関係企業からの指定の要請もあったことから、食品安全基本法に基づき食品安全影響評価が食品安全委員会に依頼されたものである。（平成 15 年 10 月 20 日、関係書類を接受）

3 添加物指定の概要

今般、ナイシンについて、チーズ、アイスクリーム類、乳飲料、ホイップクリーム、ハム、ソーセージ類、たれ、つゆ、ドレッシング、フラワーペースト類、洋菓子、卵加工品、生菓子、魚介乾製品、魚肉練り製品、いくら、すじこ、たらこ、辛子明太子、かずのこ調味加工品、豆腐、味噌、麹への使用に関する基準を定め、JECFA の規格等を参考に規格を定めた上で、新たに添加物として指定しようとするものである。

注1 乳酸菌バクテリオシンは一般的に 3 つあるいは 4 つのクラスに分けられ、クラス I はランチビオティックと呼ばれ、細胞膜攻撃性の耐熱性低分子ペプチド（分子量 5,000 未満）である。

注2 細菌が產生し、別の細菌を殺すことができる抗菌性タンパク質あるいはペプチド。

4 物理化学的性質等³⁾

ナイシン^{注3}

英名 : Nisin

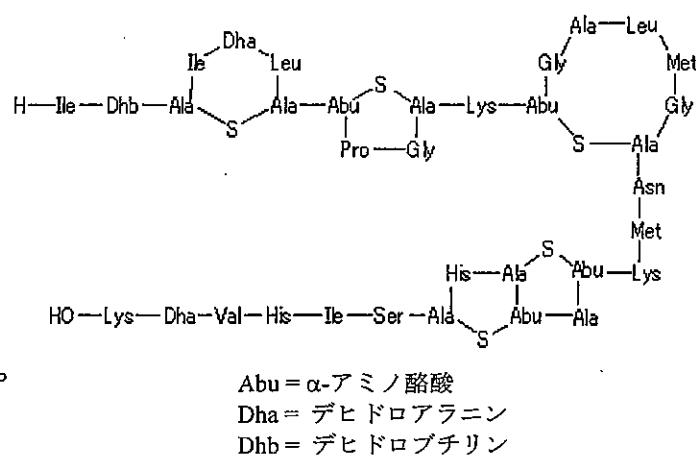
CAS 番号 : 1414-45-5

化学式 : C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇

分子量 : 3354.07

性状: 白色～淡黄白色の粉末で、においがないか又はわずかに特異なにおいがある。

ナイシン製剤は、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の培養液から得られたナイシン A を主成分とした塩化ナトリウム (NaCl) との混合物であり、1 mg 当たり 900 IU^{注4} 以上のナイシンを含む。なお、精製されたナイシンは 1 mg 当たり 4~5×10⁴ IU 程度のナイシンを含む。



乳培地を用いて製造されたナイシン製剤（従来工程品）と糖培地を用いて製造されたナイシン製剤（変更工程品）について、組成分析、HPLC 及び SDS-PAGE による分析に関する資料に基づき評価した。その結果、組成の比較から、変更工程品は従来工程品と同等の力値を有し、より純度が高く、ナイシン A 以外のタンパク質の残留物質、脂質、炭水化物及び乳糖の含有が少ないと考えられた⁴⁾。HPLC による分析により、従来工程品、変更工程品においてともに共通のピークが検出され、そのピークはナイシン A と同定された。また、従来工程品においてはナイシン A 以外にも主要なピークが認められた⁵⁾⁻⁷⁾。SDS-PAGE 分析においても同様の結果であった⁸⁾。

5 安全性

(1) 体内動態

①ヒトにおける試験

ナイシン約 200 RU^{注4}/mL [5 µg/mL] 含有のチョコレートミルクを、11 名に摂取させ、残存時間と口腔内細菌叢への影響を検討したところ、投与後の唾液中のナイシンは 1 分以内に大部分が消失し、5 分後には対照と同程度になった。10 分

注3 本評価書でいうところのナイシンは、ナイシン A である。

注4 U : Unit

IU : International Unit

RU : Reading Unit

1 ml ミルク中の *Streptococcus agalactiae* の 1 細胞を阻害するのに必要なナイシン量 (DANISCO 社より)
H.U.M : Hoemoglobin Unit of Mochida (Anson 氏の Hoemoglobin 法による)

後の唾液中濃度が低下していない例もあったが、実験誤差とされている⁹⁾。

ボランティアに、ナイシン含有チョコレートミルク (25,000 IU/日) を 14 日間摂取させたところ、唾液中の一般細菌数及びナイシン耐性細菌数に対照群との差は認められなかった¹⁰⁾。

② *In vitro* 試験

ナイシン製剤 100~100,000 U^{注4)}/mL を唾液由来プチアリン (500 U/mL、pH 6.8) 又はトリプシン (1,000 H.U.M^{注4)}/mL、pH 7.1) と反応させ、阻止円に及ぼす影響が検討された。いずれの実験においても、低濃度では阻止円の縮小が認められ、ナイシンの抗菌性は低下したが、高濃度では阻止円の縮小は認められなかつた¹¹⁾。

ナイシン 80 RU/mL [2 µg/mL] を 37°C で、濃度 2.5~25.6 mg/100 mL のパンクレアチンと反応させたところ、2.5 mg/100 mL 以外の濃度において、30 分後にはナイシン活性が 0 となり、ナイシンは速やかに分解された¹²⁾。

ナイシンは精製パンクレアチンと α -キモトリプシンによって分解され、精製トリプシンでは分解されなかつたことから、パンクレアチンによるナイシンの分解は α -キモトリプシンによると結論されている¹³⁾。

In vitro 試験から、摂取されたナイシンはタンパク質分解酵素により不活性化され、ナイシン分子としては吸収されないと予測され、*in vivo* におけるナイシンの代謝は、他のポリペプチド代謝と類似していると考えられている。

(2) ナイシン様抗生物質產生菌のウシ及びヒトにおける存在

ウシ及びヒトの各種検体を調べた結果、ヒト鼻咽喉粘膜及び糞便から 320 倍希釈液で *Lactococcus agalactiae* に対する増殖阻害能を有する 10 菌株が得られ、これらより分泌される抗菌性物質の抗菌スペクトルはナイシンと類似していた。ウシ由来の生乳から 320 倍希釈液で阻害能を有する 3 菌株が得られ、これらより分泌される抗菌性物質の抗菌スペクトルもナイシンと類似していた¹⁴⁾。

ナイシン様抗生物質產生菌は、頻度は低いがヒト及びウシの腸内や鼻腔内に常 在している¹⁴⁾こと、摂取されたナイシンはタンパク質分解酵素により不活性化されると予測される¹¹⁾⁻¹³⁾ことから、ナイシンが腸まで到達したとしても、腸内細菌叢のバランスを崩す可能性は低いと考えられる。

(3) 微生物の耐性^{注5)}

ナイシンは、*L. lactis* が産生する 34 個のアミノ酸から成るランチビオティック系 バクテリオシンであり、広範囲のグラム陽性菌とその芽胞に対し抗菌活性を有する。作用機序としては、細胞膜に作用して膜孔を形成することにより、膜電位や膜内外

注5 一般に、環境条件や化学物質などに対する抵抗性。抗生物質に対する細菌の抵抗力など。

の pH 勾配あるいは、その両者のバランスを崩し細胞死を引き起こすことが考えられている¹⁵⁾。

バクテリオシン感受性の *Listeria monocytogenes* などの菌を高濃度のバクテリオシン存在下で培養すると耐性変異株が出現するとの報告があり、このような耐性は、一般的に細胞膜の構造変化（特にリン脂質組成変化）に起因するとされている¹⁵⁾。

また、ナイシン耐性 *Listeria* 属の細菌が、他のクラスのバクテリオシン（ペディオシン等）に対し、感受性低下を示すとの報告もある¹⁶⁾⁻¹⁹⁾。

ナイシンへの暴露は、*L. monocytogenes* の抗生物質アンピシリンとクロラムフェニコールに対する耐性菌出現頻度に影響を与えない、種々のグラム陽性病原菌において、抗生物質多剤耐性獲得はナイシンに対する感受性に影響を与えない、ナイシンと 33 種の抗生物質間の交差耐性^{注6)}を調査した結果、*Staphylococcus aureus* のペニシリン耐性菌は野性株に比べナイシンに対して 50 倍以上の高い感受性を示した等の研究から、バクテリオシン耐性が抗生物質に対して交差耐性を示す可能性は極めて低いと考えられるとされている¹⁵⁾。

また、頻用される医療用抗生物質の標的となる一般的な病原微生物の感受性に、ナイシンが影響を与える可能性について検討するために、各菌株を 2.5 µg/mL のナイシン含有培地又は非含有培地で 24 時間培養した後、抗生物質の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。全てのグラム陰性細菌はナイシン非感受性であった。感受性菌である *Staphylococcus* 属では、ナイシン含有培地ではナイシンに対する感受性が低下した。その他の医療用抗生物質に対しては、有意な感受性の低下は認められなかつた。以上から、ナイシンによる医療用抗生物質に対する交差耐性は認められないとされている²⁰⁾。

ナイシンは、その化学構造、物性、作用機序、交差耐性、消化管酵素による影響などから、一般に言われる抗生物質又は抗菌性物質とは異なる範疇の物質と言える。海外における使用経験からも特段問題となる報告はなく、食品添加物として使用しても、ヒト腸内細菌をはじめとする各菌種に影響を与える可能性は極めて低いと考えられる。

(4) 毒性

①急性毒性

ラットへの経口投与での LD₅₀ は 2,000 mg/kg 体重以上²¹⁾、マウスへの経口投与での LD₅₀ は 6,950 mg/kg 体重¹¹⁾等が報告されている。

②亜急性毒性

白色マウス（雑種）（雌雄各 25 匹、体重 8~10 g 又は 15~20 g）にナイシン製

注6 ある薬物に対して形成された耐性が、他の薬物にもみられること。

剤（生物学的力価： 10^6 IU/g）を 2 ヶ月間強制経口投与（0、0.4、4.0、400 mg/kg 体重/日）したところ、雄の全投与群で体重増加の上昇がみられたが、生存率及び摂餌量には差はみられなかった。2 ヶ月間投与後に実施した 50% 食餌制限では、高用量群で対照群の 43% に対して 70% と高い死亡率を示した²²⁾。

白色マウス（雑種）（雌雄各 50 匹、体重 8~10 g）に 4.0 mg/kg 体重/日のナイシン製剤（生物学的力価、 10^6 IU/g）を 3 ヶ月間強制経口投与したところ、投与 2.5 ヶ月後の生存率が低下した。3 ヶ月間投与後に実施した 90% 食餌制限の後では、死亡率は対照群で 56.3% に対し、投与群では 84.6% と高値を示した²²⁾。

上記の白色マウス（雑種）を用いた試験については、対照群の死亡率が異常に高いこと、ナイシン投与群における死亡率が非常に高いにもかかわらず死因についての記載がないこと等から、試験自体が非常に粗雑でデータの信頼性が低いため、評価の対象とはしないこととした。

Crl:CDBR ラット（雌雄各 5 匹）に、精製ナイシン（ナイシンとして 0、500、1,000、2,000 mg/kg 体重/日）を 10 日間強制経口投与したところ、一般状態、生存率、体重、摂餌量、血液生化学的検査、臓器重量、剖検所見及び病理組織学的検査において投与に関連した変化は認められなかった。血液学的検査では、雄でヘモグロビン濃度、赤血球数及び平均赤血球容積に用量に相關した減少がみられ、雌でも同じ項目において投与群が対照群より低値を示したが、用量相関性は認められていない²³⁾。

Crl:CDBR ラット（雌雄各 10 匹）に精製ナイシン（ナイシンとして 0、500、1,000、2,000 mg/kg 体重/日）を 28 日間強制経口投与したところ、一般状態、体重、摂餌量、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、剖検所見及び病理組織学的検査において、投与に関連した変化はみられていない。血液学的検査では、いくつかの項目に変化がみられ、臓器重量では、雌の高用量群において、肝臓重量が対照群に比べ有意に減少したが、この週齢と動物種で通常認められる範囲の値であり、生物学的意義はないとされている²⁴⁾。

離乳 Birmingham-Wistar 雄性ラット（各群 10 匹）に 12 週間、投与群にはナイシン含有チーズ ((0、2.00、3.01、4.01) $\times 10^7$ U/g 飼料； (0、1.0、1.51、2.01) $\times 10^6$ U/kg 体重/日²⁵⁾)、対照には非含有チーズを含む飼料を与えた。ナイシン投与群の体重、一般状態、行動及び剖検時の所見に対照群と差は認められなかつた²⁶⁾。

ラット（雌雄各 5 匹）に 12 週間、ナイシン製剤（生物学的力価： 10^6 RU/g、飼料中濃度 0、10,000 RU/g；0、 0.5×10^6 RU/kg 体重/日²⁵⁾）を混餌投与した結果、対照群と投与群の体重増加に差は認められず、投与群には何ら異常は認められなかつた。投与群と対照群の雄の生殖率は同等（100%）で、投与群と対照群の雌も同程度であった（それぞれ 90% と 85%）。すべての出生児は正常であった²⁷⁾。

雄性 Wistar ラット（各群 5 匹）に 0.5~5,000 U/kg 体重/日のナイシン製剤を 90 日間強制経口投与したところ、一般状態、体重、血液学的検査、臓器重量、主要

臓器の病理組織学的検査において投与に起因した変化はみられなかった¹¹⁾。

Birmingham-Wistar 雄性ラット（各群 10 匹）にナイシン加水分解物（ナイシン製剤を 1.0 N 塩酸で加水分解し、脱水して活性炭処理後に再結晶したもの）、又はナイシン (3.33×10^6 IU/kg 飼料) を 10 週間混餌投与した後、さらに 25 週間混餌投与したところ、ナイシン加水分解物を混餌投与した動物の体重増加に影響はなかった。個別ケージで飼育されたラットの脾臓重量の増加がみられたが、複数でケージに入れられた飼育群に同様の変化はみられず、また、評価された他の指標には影響がみられなかったことから、ストレスに起因すると結論されている²⁶⁾。

F344/DuCrI CrIj ラット（雌雄各群 10 匹）にナイシン A（生物学的力値：3,000 IU/mg、飼料中濃度 0、0.2、1.0 及び 5.0%；約 0、120、600、3,000 mg/kg 体重/日相当、参照対照群 3.712%NaCl 添加飼料（5.0%ナイシン A 添加飼料中の NaCl 含量；約 2,200 mg/kg 体重/日相当））を 90 日間反復投与したところ、投与期間中に死亡例はみられず、一般状態、体重、摂餌量、眼科的検査及び肉眼的病理検査において被験物質に起因すると考えられる変化は認められなかった。5.0%投与群の雌雄で血色素量（HGB）の上昇、平均赤血球色素量（MCH）の上昇、5.0%投与群の雌で平均赤血球血色素濃度（MCHC）の上昇が認められた。

ナイシン A 投与群において、摂水量の高値、尿検査における尿量の高値、尿中 Na 及び Cl の高値、尿中 K の低値、血液生化学的検査における Na の低値、腎臓の絶対重量及び相対重量の高値、病理組織学的検査における前胃の境界縁における扁平上皮過形成が観察された²⁸⁾。しかし、これらの変化は参照対照群においても観察されており、被験物質に含まれる NaCl に起因する変化と考えられる。なお、血液生化学的検査の総コレステロール（T-CHO）及びリン脂質（PL）の用量相関的な減少は、参照対照群では認められておらず、ナイシンの影響による影響と考えられるが、毒性学的な意義はないと考える。

よって、ナイシンの NOAEL は 1.0%（ナイシン 1 g は 40×10^6 IU に相当することから、45 mg/kg 体重/日相当）と考えられる。

ビーグル犬（雌雄各 2 匹）に精製ナイシンを最大耐量（MTD：12 日間かけて 0（対照群）、あるいは 500、1,000、2,000 mg/kg 体重/日と增量）と固定用量（対照群について、続いて 2,000 mg/kg 体重/日を 7 日間）を強制経口投与したところ、MTD 及び固定用量投与期間において、一般状態、生存率、体重、摂餌量、血液学的検査、尿検査、臓器重量、剖検所見及び病理組織学的検査において投与に起因する変化はみられず、精製ナイシン 2,000 mg/kg 体重/日投与での毒性は認められていない²⁹⁾。

ビーグル犬（雌雄各 3 匹）への精製ナイシン（ナイシンとして 0、150、500、2,000 mg/kg 体重/日）の 28 日間強制経口投与により、一般状態、生存率、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量、剖検所見及び病理組織学的検査結果では、投与に関連した変化はみられていない。2,000 mg/kg

体重/日投与群の雄及び 150 mg/kg 体重/日投与群以上の雌で、対照群と比較して体重增加抑制がみられ、500 mg/kg 体重/日投与群以上の雌で摂餌量の減少が認められた³⁰⁾。

③慢性毒性

Wistar ラット（雌雄各 10 匹）に 2.0 mg/kg 体重/日のナイシン製剤（生物学的力価 : 10^6 IU/g）を通常の飼料を与える前にペースト状にして 18 ヶ月間混餌投与した結果、ナイシン投与群の平均摂餌量は対照群と同程度で、摂水量は雌の投与群で高値を示した。血液 pH (blood alkalinity)、C 反応性蛋白及び血液形態学的評価は、対照群と同程度であった²²⁾。

④慢性毒性（／繁殖毒性）

Birmingham-Wistar ラット（雌雄各 10 匹）に基準飼料又はナイシン製剤 3.33×10^4 U/kg 含有飼料、 3.33×10^6 U/kg 含有飼料 (1,665、166,500 U/kg 体重/日²⁵⁾) を最長約 2 年間与えた。16 週間後、同一群の雌雄を交配させ、生殖能力を評価し、各投与群の出生児 (F1) の雌 30 匹と雄 10 匹に親 (F0) と同じ食餌を与えた。F0 の対照群と投与群では生存率及び生殖能力に差はみられず、F1 の血液学的検査、肝臓、腎臓、消化管の機能検査は正常であった。F0 及び F1 ともに、雄の投与群において体重増加の有意な減少がみられたが、これは摂餌量のわずかな低下に起因すると考えられている。雌の高用量群で腎臓、卵巢及び子宮の相対重量が有意に増加したが、肉眼的及び病理組織学的所見に特記すべき異常は認められなかった。よって、ナイシンの NOAEL は 3.33×10^6 U/kg 含有飼料と考えられる (JECFA は、4.16 mg/kg 体重/日相当と換算し、FDA は、4.9 mg/kg 体重/日相当と換算している)²⁶⁾、注⁷、注⁸。

非げっ歯類を用いた慢性毒性試験は実施されていない。

⑤発がん性

発がん性試験は実施されていない。なお、ラット 2 年間慢性毒性試験の病理組織学的所見に異常はみられていない²⁶⁾。

⑥繁殖毒性

3 世代 (F0、F1B、F2B) の CrI:CDBR ラット（各群雄 12 匹、雌 24 匹）にナイシン製剤 0、0.2、1.0、5.0%を含有する基礎飼料 ((0、0.1、0.5、2.5) $\times 10^6$ IU/kg 体

注⁷ ナイシン 1 g は 40×10^6 U に相当し²¹⁾、「Principles for the Safety Assessment of Food Additives and Contaminants in Food (JECFA, 1987)」において示されたラット (old) の食餌中濃度の換算係数 (1 ppm=0.050 mg/kg 体重/日) を採用すると、NOAEL は 4.16 mg/kg 体重/日となる。

注⁸ FDA は、実験者の仮定（ラットの体重を 250 g、摂餌量を 15 g と仮定）に基づき、高用量群の投与量が 1.96×10^5 U/kg 体重 (4.9 mg/kg 体重) に相当することから、ADI を 0.049 mg/kg 体重/日と算出している。

重/日²⁵⁾)、並びに参照対照群としてNaClを3.8%含有する飼料を与えた。親動物については、F0の5.0%投与群の雄群で体重増加抑制が観察されたが、食餌効率、交配行動、妊娠率、妊娠期間、肉眼的病理検査では、投与に起因した変化はみられなかった。児動物については、生存率、同腹児数、剖検所見、試験終了時の臓器重量及び病理組織学的検査に投与に起因した変化はみられなかつたが、F2Bの5.0%投与群で低体重が観察された³¹⁾。よつて、ナイシンのNOAELは1.0%（12.5 mg/kg 体重/日相当）と考えられる^{注9}。

⑦遺伝毒性

Salmonella typhimurium (TA98、TA100、TA1535、TA1537) と *Escherichia coli* (WP2/pKM101、WP2uvrA/pKM101) を用いた精製ナイシンの復帰突然変異試験において、S9mix の有無にかかわらず、試験した全ての用量（0～1,500 µg/プレート）において陰性であった³²⁾。

マウスリンパ腫 L5178Y 細胞を用いた精製ナイシンの遺伝毒性試験において、S9mix の有無にかかわらず、いずれの濃度（最低濃度25～50、最高濃度300～1,000 µg/mL）においても陰性であった³³⁾。

ヒトリンパ球初代培養細胞を用いた精製ナイシンの染色体異常試験において、S9mix の有無にかかわらず、いずれの用量（62.5～500 µg/mL）においても染色体異常誘発性は認められていない³⁴⁾。

In vivo マウス骨髄小核試験では、最高2,000 mg/kg 体重/日のナイシン強制経口投与マウスの骨髄の多染性赤血球 (PCE) において小核の誘発は認められず、生体内における染色体異常誘発性はないものと考えられる³⁵⁾。

⑧抗原性

モルモット回腸の収縮の測定による感作性の検討において、ナイシン製剤50 mg (50,000 U)/日を3ヶ月間混餌投与した3匹の感作性は陰性であったが、等用量を単回腹腔内投与した3匹では全て陽性であった。これは、ナイシンが小腸内のタンパク質分解酵素やペプチダーゼによって分解されることと整合するとされている²⁶⁾。

⑨一般薬理

一般薬理試験は実施されていない。

6 國際機関等における評価

(1) JECFAにおける評価

JECFAでは、1968年に、ラット2年間慢性毒性試験²⁶⁾の結果よりラットにおける

注9 注7で用いた換算係数を採用すると、ナイシン製剤(ナイシン2.5%含有²⁶⁾)1.0%投与群の投与量は12.5 mg/kg 体重/日に相当する。

NOAEL を最高用量の 3,330,000 U/kg として、ADI は 33,000 U/kg と設定した³⁾が、原著論文によるとこの値は飼料中の濃度である。ヒト体重あたり、かつ mg 単位に換算すると、NOAEL は 4.16 mg/kg 体重/日に相当し、ADI は 0.042 mg/kg 体重/日となる注⁷⁾。

なお、細菌抵抗性について、細菌においてナイシン以外の抗生物質治療に影響する交差耐性が生じることを示した包括的な微生物学的研究は示されておらず、ナイシンの抗菌活性は上部消化管におけるタンパク質の分解消化により即座に失われるため、腸内細菌叢に対する影響が示されることないとされている。

2007 年の第 68 回 JECFA 会合において、従来の乳培地を用いて製造されたナイシン製剤に加え、糖培地を用いて製造されたナイシン製剤についても成分規格に含めるための変更がなされた³⁶⁾。

(2) 米国食品医薬品庁 (FDA) における評価

米国 FDA では、1984 年に、JECFA が評価に用いたラット 2 年間慢性毒性試験²⁶⁾の結果より、ナイシンの ADI を 2.9 mg/ヒト/日と設定した旨公表しており^{37), 38)}、これは体重 60 kg 換算で、0.049 mg/kg 体重/日となる注⁸⁾。

なお、ナイシンはパンクレアチン（腸内酵素）により分解されることから、腸内細菌叢に影響を与えないと考えられ、病原微生物の交差耐性に影響するとの報告はないとしている。

(3) 欧州食品科学委員会 (SCF) における評価

SCF が 1990 年に発表した報告書³⁹⁾によると、SCF は、ラット及びマウスの急性毒性、亜急性並びに長期試験、及びラットの繁殖毒性試験について JECFA が 1968 年にレビューした資料を入手し、さらに *in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験、繁殖毒性試験についてレビューし、遺伝毒性及び発がん性に関する入手可能なデータでは、現在の毒性試験基準を満たしていないが、投与に関連した有害作用は認められていないとし、3 世代繁殖毒性試験の結果³¹⁾に基づき、ADI を 0.13 mg/kg 体重/日と設定しているが、NOAEL 等の評価の詳細な内容は発表されていない注⁹⁾。

なお、本報告書中で引用されているレポートでは、感受性菌である *Staphylococcus* 属がナイシン自身に耐性を示す証拠があるが、微生物がナイシンに暴露されることにより、抗生物質やその他の治療薬に対し耐性を生じる可能性はほとんどないとしている。

2006 年 1 月、歐州食品安全機関 (EFSA) の AFC パネルは、ADI 0.13 mg/kg 体重/日を変更しなければならなくなるような新しいデータはないとしている。また、ナイシンはトリプシンとパンクレアチンにより不活性化されることから腸内細菌叢には影響しないと推察するとともに、食品へのナイシン使用により耐性を生じる懸念はないと指摘している⁴⁰⁾。

2006 年 10 月に AFC パネルは、糖培地を用いて製造されたナイシン（製剤）は、

従来の乳培地を用いて製造されたナイシン（製剤）と同等であるが、より純度が高く、タンパク質（ナイシン A 以外）の残留物質、脂肪、炭水化物及び乳糖の含有が少ないと評価している。その上で、ADI 0.13 mg/kg 体重/日を変更する必要はないことを確認するとともに、乳製品に対するアレルギーのリスクを回避できるだろうと結論している⁴¹⁾。

動物種	試験種類	試験期間	飼料中濃度	NOAEL 又は NOEL	備考
ラット	慢性毒性 / 繁殖 ²⁶⁾	2 年間	3.33 × 10 ⁴ 、 3.33 × 10 ⁶ U/kg 飼料 (0.83、83.3 mg/kg 飼料)	3.33×10 ⁶ U/kg 飼料 (83.3 mg/kg 飼料) [4.16 mg/kg 体重/日相当 ^{注7)}	JECFA(1968) ADI=3.3×10 ⁴ U/kg (0.042 mg/kg 体重/日)
				[4.9 mg/kg 体重/日相当 ^{注8)}	FDA(1984) ADI=0.049 mg/kg 体重/日
	繁殖 ³¹⁾	26 週間	0、0.2、1.0、5.0%	1.0% [12.5 mg/kg 体重/日相当 ^{注9)}	EU/SCF(1990) ADI=0.13 mg/kg 体重/日

7 一日推定摂取量の推計

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^{22), 37), 42)}。また、EU では、チーズ等に使用されおり、推定摂取量は 0.008 mg/kg 体重/日との情報がある^{2), 43)}。

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、国民健康・栄養調査を参考にして算出すると 0.045 mg/kg 体重/日とされている（別添：ナイシンの使用予定品目及び推定摂取量）⁴⁴⁾。

8 評価結果

ナイシンについて、*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が担保できないことから、一日摂取許容量（ADI）設定には用いず、あくまで評価の参考に用いることとした。

欧州 SCF の評価の根拠とされているラット 3 世代繁殖毒性試験については、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% (12.5 mg/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 世代繁殖毒性試験
(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

ナイシンは、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り、また、移行したナイシンは腸内酵素により分解又は不活性化されると考えられ、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、リストリア菌のナイシン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は得られていない。

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、交差耐性を含む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。

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。

糖培地を用いて製造されたナイシン製剤（変更工程品）は、乳培地を用いて製造されたナイシン製剤（従来工程品）と同等の力価を有し、より純度が高く、また、乳由來の不純物の含有がないことから乳アレルギーのリスクの低減化が図れると考える。以上から、従来工程品の評価結果は変更工程品の評価にも適用することが可能であると判断した。

【引用文献】

- 1) 21 CFR Ch.I (4-1-03 Edition) Food and Drug Administration, HHS. §184.1538 2003.
- 2) European Parliament and Council Directive No 95/2/EC of 20 Feb 1995 on food additives other than colours and sweeteners
- 3) FAO Nutrition Meetings Report Series: 45A 1968 Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some antibiotics: 33-35.
- 4) Nisin (E234) new specification – process modification/ liquid eggs application (ダニスコ社が欧州委員会に提出した規格変更、液卵用途追加の要望資料 (2005年10月24日))
- 5) Re:Nisin (INS 234) - Specification Modification, November 24, 2006 (ダニスコ社がJECFAに提出した規格変更の要望資料 (2006年11月24日))
- 6) Nisin (INS 234) - Specification Revision, November 24, 2006 三栄源エフ・エフ・アイ(株)社内資料 (ダニスコ社がJECFAに提出した規格変更の要望資料 (2006年11月24日))
- 7) 乳培地及び糖培地由来ナイシン A の HPLC 分析比較. 三栄源エフ・エフ・アイ(株)社内資料. (2007年11月)
- 8) SDS-PAGE Analysis of Nisaplin and Nisaplin Dairy. ダニスコ社内資料 (2007年11月14日)
- 9) Claypool L, Heinemann B, Voris L, Stumbo CR. Residence time of nisin in the oral cavity following consumption of chocolate milk containing nisin. *J. Dairy Sci.* (1966) 49: 314-316.
- 10) Cowell ND, Allen AR, Jarvis B. The *in vivo* effect of nisin on the microflora of the oral cavity. *J. Appl. Bact.* (1971) 34: 787-791.
- 11) Hara S, Yakazu K, Nakakawaji K, Takeuchi T, Kobayashi T, Sata M, Imai Z, Shibuya T. An investigation of toxicity of nisin with particular reference to experimental studies of its oral administration and influence by digestive enzymes. *J. Tokyo Med. Coll.* (1962) 20: 176-207.
- 12) Heinemann B, Williams R. Inactivation of nisin by pancreatin. *J. Dairy Sci.* (1966) 49: 312-314.
- 13) Jarvis B, Mahoney RR. Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin. *J. Dairy Sci.* (1969) 52: 1448-1450.
- 14) Hirsch A, Wheater DM. The production of antibiotics by *Streptococci*. *J. Dairy Res.* (1951) 12: 193-197.
- 15) 川本伸一, 島純. 乳酸菌科学の最前線-どこに向かうのか 乳酸菌バクテリオシンとその利用. *Foods & Food Ingred. J. Jpn.* (2004) 209: 758-767.
- 16) Gravesen A, Kallipolitis B, Holmstrom K, Hoiby PE, Ramnath M, Knochel S. pbp2229-Mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross-protection to class IIa bacteriocins and affects virulence gene expression. *Appl.*

- Environ. Microbiol.* (2004) 70: 1669-1679.
- 17) Rasch M, Knochel S. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. *Lett. Appl. Microbiol.* (1998) 27: 275-278.
 - 18) Crandall AD, Montville TJ. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* (1998) 64: 231-237.
 - 19) Song H-J, Richard J. Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *Int. J. Food Microbiol.* (1997) 36: 155-161.
 - 20) Hossack DJN, Bird MC, Fowler GG. The effects of nisin on the sensitivity of microorganisms to antibiotics and other chemotherapeutic agents. *Antimicrobials and Agriculture* (1983) 425-433.
 - 21) 'Purified nisin: Acute oral toxicity (limit test) in the rat'. SPL Project Number: 867/002. SafePharm Laboratories, November 1995. Unpublished Confidential Report.
 - 22) Shtenberg AJ, Ignat'ev AD. Toxicological evaluation of some combinations of food preservatives. *Fd. Cosmet. Toxicol.* (1970) 8: 369-380.
 - 23) 'Ambicin N (purified nisin): 7 Day oral (gavage administration) toxicity study in the rat'. Corning Hazleton. Report No. 1334/3-1050. December 1995. Unpublished Confidential Report.
 - 24) 'Ambicin (purified nisin): 28 Day oral (gavage administration) toxicity study in the rat'. Corning Hazleton. Report No. 1334/1-1050. April 1996. Unpublished Confidential Report.
 - 25) Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. Environmental Health Criteria 70. IPCS in cooperation with the JECFA. World Health Organization, Geneva. (1987).
 - 26) Frazer AC, Sharratt M, Hickman JR. The biological effects of food additives. I. -Nisin. *J. Sci. Food&Agri.* (1962) 13: 32-42.
 - 27) Pesquera TI. Nisin -its use, estimation and toxicity in sterilised milk. *Revista Espanola de Lecheria.* (1966) 59: 25-41.
 - 28) ナイシンAのラットを用いた90日間反復投与毒性試験 試験番号0637
株式会社DIMS医科学研究所 (最終報告書 2007.6.27)
 - 29) 'Ambicin N (purified nisin): Maximum tolerated dose (MTD) toxicity study followed by a 7 day fixed dose oral (gavage administration) toxicity study in the dog'. Corning Hazleton. Report No. 1334/4-1050. December 1995. Unpublished Confidential Report.
 - 30) 'Ambicin (purified nisin): 28 Day oral (gavage administration) toxicity study in the dog'. Corning Hazleton. Report No. 1334/1-1050, Corning Hazelton (Europe), Harrogate N. Yorkshire, England. April 1996.
 - 31) 'Effect of nisaplin on reproductive function of multiple generations in the rat'. Huntingdon Research Centre. Report No. APL 1/801028, June 1981. Unpublished

Confidential Report.

- 32) 'Ambicin N (purified nisin). Bacterial mutation assay'. Huntingdon Life Sciences. Report No. APM 1/952077, November 1995 and Protocol. Unpublished Confidential Report.
- 33) 'Ambicin N. Mouse lymphoma mutation assay'. Inveresk Research International. Report number 12242, December 1995 and Protocol. Unpublished Confidential Report.
- 34) 'Ambicin (purified nisin). Metaphase chromosome analysis of human lymphocytes cultured in vitro'. Huntingdon Life Sciences. Report No. APM 2/952601, April 1996 and Protocol. Unpublished Confidential Report.
- 35) 'Ambicin N (purified nisin). Induction of micronuclei in the bone marrow treated mice'. Corning Hazleton. Report No. 1334/5-1052, January 1996 and Protocol. Unpublished Confidential Report.
- 36) JECFA. 「NISIN PREPARATION」
(<http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph4/additive-295-m4.pdf>)
- 37) Federal Register : 53 FR 11247, Apr. 6, 1988, Food and Drug Administration, HHS.
- 38) Memorandum of November 9, 1984, from Alfred N. Milbert to Jphn W. Gordon.
- 39) Food-science and techniques Reports of the Scientific Committee for Food (Twenty-sixth series). Commission of the European Communities. (1992)
- 40) Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commision related to The use of nisin (E234) as a food additive. Question number EFSA-Q-2005-031 (Adopted on 26 January 2006) 314; 1-16
- 41) Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on the safety in use of nisin as a food additive in an additional category of liquid eggs and on the safety of nisin produced using a modified production process as a food additive. Question number EFSA Q-2005-031b (Adopted on 20 October 2006) 314b; 1-8
- 42) Agency Response Letter GRAS Notice No.GRN 000065.
- 43) Shillinger Y, Bogoroditskaia VP, Osipova IN. Hygienic characteristics of a Soviet-made preparation nisin –an antibiotic employed for preservation of food products. (1969) 28:44-48
- 44) 健康・栄養情報研究会編：国民栄養の現状（平成 16 年厚生労働省国民健康・栄養調査結果）平成 16 年
- 45) Hirsch A, Mattick ATR. Some recent applications of nisin. *The Lancet*. (1949) 190: 190-7.

ナイシン 安全性試験結果

試験	投与期間	動物種	投与方法	1群当たりの動物数	被験物質	投与量又は濃度	試験結果	参考資料
急性毒性	単回 (7日間観察)	ラット	経口	記載なし	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	最高 10^6 U/kg 体重	LD ₅₀ : > 10^6 U/kg 体重	26
			腹腔内	記載なし	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	最高 10^6 U/kg 体重	LD ₅₀ : > 10^6 U/kg 体重	
	単回 (2週間観察)	ラット	経口	雌雄各5	精製ナイシン (52.2×10^6 U/g)	2,000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : >2,000 mg/kg 体重	21
	単回 (7日間観察)	ラット	強制経口	3	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	(0.5, 1.0, 1.5) $\times 10^6$ RU/kg 体重	LD ₅₀ : > 1.5×10^6 U/kg 体重	27
	単回 マウス		経口	10	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	6,000-8,000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : 6,950 mg/kg 体重	11
			腹腔内	10	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	3,500-6,000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : 4,750 mg/kg 体重	
			皮下注	10	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	3,500-5,000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : 4,450 mg/kg 体重	
	単回 ウサギ		静注	記載なし	精製ナイシン	記載なし	LD ₅₀ : 約 30 mg/kg 体重	45
			筋注	記載なし	精製ナイシン	記載なし	LD ₅₀ : 200 mg/kg 体重	
			皮下注	記載なし	精製ナイシン	記載なし	LD ₅₀ : >1,000 mg/kg 体重	
亜急性毒性	2ヶ月間	マウス	経口	雌雄各25	ナイシン製剤 (10^6 IU/g)	0.4, 4.0, 400 mg/kg 体重/日	雄の全投与群で体重増加が上昇。生存率、摂餌量には変化なし。	22
	3ヶ月間	マウス	経口	雌雄各50	ナイシン製剤 (10^6 IU/g)	4.0 mg/kg 体重/日	投与後 2.5ヶ月の生存率が低下した。	22
	10日間	ラット	経口	雌雄各5	精製ナイシン (51.6×10^6 IU/g)	0, 500, 1,000, 2,000 mg/kg 体重/日	雄でヘモグロビン濃度、赤血球数、平均赤血球容積に用量に相關した減少がみられた。雌でも低値を示したが、用量相関性はなかった。	23
	28日間	ラット	経口	雌雄各10	精製ナイシン (49.6×10^6 IU/g)	0, 500, 1,000, 2,000 mg/kg 体重/日	投与に関連した変化はみられなかつた。	24
	28日間	イヌ	経口	雌雄各3	精製ナイシン ($(49.1-51.1) \times 10^6$ IU/g)	0, 150, 500, 2000 mg/kg 体重/日	2,000 mg/kg 体重/日投与群の雄及び150 mg/kg 体重/日投与群以上の雌で、対照群と比較して体重増加抑制がみられ、500 mg/kg 体重/日投与群以上の雌で摂餌量の減少が認められた。	29
	12週間	ラット	混餌	雄10	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	(0, 2.00, 3.01, 4.01) $\times 10^7$ U/kg 飼料 [(0, 1.0, 1.51, 2.01) $\times 10^6$ U/kg 体重 / 日] ^{*4}	投与群と対照群との間に体重、一般状態及び行動及び剖検時の所見に差は認められなかつた。	26
	12週間	ラット	混餌	雌雄各5 *1	ナイシン製剤 (10^6 RU/g)	10^6 RU/g 飼料 [0.5 $\times 10^6$ RU/kg 体重 / 日] ^{*4}	投与群と対照群との間に体重増加、生殖率の差はみられず、胎児は全て正常であった。	27
	90日間	ラット	経口	雄5	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	0.5 ~ 5,000 U/kg 体重/日	投与に起因した変化はみられなかつた。	11

試験	投与期間	動物種	投与方法	1群当たりの動物数	被験物質	投与量又は濃度	試験結果	参考資料
亜急性毒性(統き)	10+25週間*2	ラット	混餌	雄10	ナイシン加水分解物	(ナイシンとして) 3.33×10^6 U/kg 飼料	体重増加に影響はみられなかった。個別ケージで飼育したラットの脾臓重量の増加がみられたが、グループ飼育群にはみられず、他の指標にも影響が認められなかった。	26
	90日間	ラット	混餌	雌雄各10	ナイシンA (3×10^6 IU/g)	0、0.2、1.0及び5.0%飼料中濃度〔約120、600、3,000 mg/kg 体重/日相当〕 参照対照群：3.712%NaCl 添加飼料〔約2,200 mg/kg 体重/日相当〕	投与期間中に死亡例はみられず、一般状態、体重、摂餌量、眼科的検査及び肉眼的病理検査において被験物質に起因すると考えられる変化は認められなかった。5.0%投与群の雌雄でHGBの上昇、MCHの上昇、5.0%投与群の雌でMCHCの上昇が認められた。 また、ナイシンA投与群において、一部の観察項目において、変動が認められているが、参照対照群においても観察されており、NaClの影響と考えられる。 [NOAEL：1.0% (45 mg/kg 体重/日相当)]	28
	12日間(MTD Phase)/7日間(Fixed Dose Phase)	イヌ	経口	雌雄各2	MTD Phase : 精製ナイシン (51.6×10^6 IU/g). Fixed Dose Phase : 精製ナイシン (50.6×10^6 IU/g)	0 (対照群)、あるいは500、1,000、2,000 mg/kg 体重/日と增量 対照群について、統いて2,000 mg/kg 体重/日	投与に起因する変化はみられず、2,000 mg/kg 体重/日投与で毒性はみられなかった。	29
慢性毒性	18ヶ月間	ラット	混餌(ベースト状)	雌雄各10	ナイシン製剤 (10^6 IU/g)	2.0 mg/kg 体重/日	平均摂餌量は変化なし。摂水量が雌で高値を示した。血液pH、C反応性蛋白及び血液形態学的評価は対照群と同程度であった。	22
慢性毒性/繁殖	2年間	ラット	混餌	雄15、雌30	ナイシン製剤 (10^6 IU/g)	0、 3.33×10^4 、 3.33×10^6 U/kg 飼料 [1,665、166,500 U/kg 体重/日] *4	雌の高用量群で腎臓、卵巣及び子宮の相対重量が有意に増加したが、肉眼的及び病理組織学的所見に異常は認められなかった。 [NOAEL： 3.33×10^6 U/kg 飼料 (4.16又は4.9 mg/kg 体重/日相当)]	26
繁殖	26週間*3	ラット	混餌	雄12、雌24	ナイシン製剤 (10^6 IU/g)	0、0.2、1.0、5.0% [(0、0.1、0.5、2.5) $\times 10^6$ IU/kg 体重/日]*4 参照対照群：3.8%NaCl 含有飼料	親動物：F0の5.0%投与群の雄群で体重増加抑制が観察されたが、投与に起因した変化はみられなかった。 児動物：投与に起因した変化はみられなかったが、F2Bの5.0%投与群で低体重が観察された。 [NOAEL：12.5 mg/kg 体重/日相当]	31

試験	投与期間	動物種	投与方法	1群当たりの動物数	被験物質	投与量又は濃度	試験結果	参考資料
遺伝毒性		TA98、 TA100、 TA1535、 TA1537、 WP2/pKM101、 WP2uvA/pK101	<i>in vitro</i>		精製ナイシン (52.2×10^6 IU/g)	5、15、50、150、 500、1,500 μg/plate	S9mix の有無にかかわらず陰性。	32
	(予備試験)	マウスリンパ L5178Y 細胞	<i>in vitro</i>		精製ナイシン (51.6×10^6 IU/g)	3.3-1,000 μg/mL (6 濃度)	予備試験では、100-1,000 μg/mL で細胞毒性がみられたが、S9mix の有無にかかわらず陰性。	33
	(本試験)					25-10,000 μg/mL (7 濃度)		
	処理時間 21、 45 時間	ヒトリン バ球初代 培養細胞	<i>in vitro</i>		精製ナイシン (52.2×10^6 IU/g)	62.5-500 μg/mL	S9mix の有無にかかわらず、染色体異常誘発性を示さなかった。	34
抗原性	単回	マウス	経口		精製ナイシン (51.6×10^6 IU/g)	500、1,000、 2,000 mg/kg 体重	小核誘発性を示さなかった。	35
	2回(2日間)							
抗原性	3ヶ月間	モルモット	混餌	各 3 (対照 2)	精製ナイシン (10^6 RU/g)	50,000 U/日	感作性は示さなかった。	26
	単回		腹腔内				感作性を示した。	

*1 対照群は雌 3 匹、雄 2 匹からなる。

*2 1 匹ごとにケージで飼育したラットにナイシン加水分解物を 10 週間混餌投与後、5 匹ずつケージで飼育し 25 週間混餌投与した。

*3 F0、1 世代：交配前に少なくとも 60 日間混餌投与。

*4 「Principles for the Safety Assessment of Food Additives and Contaminants in Food (JECFA, 1987)」において示されたラット (old) の体重 (0.40 kg) 及び摂餌量 (20 g) に基づく事務局換算²⁵⁾。

(別添)

ナイシンの使用予定食品及び推定摂取量⁴⁴⁾

使用基準案の 食品名	国民健康・栄養調査 食品分類 (H16)	摂取量 (g/日)	使用量 (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	74: その他の乳製品	8.2	12.5 mg/kg	0.103
チーズ	72: チーズ	2.3	15 mg/kg	0.035
生菓子	81: 和菓子類	10.7	5 mg/kg	0.080
	85: その他の菓子類	5.3		
フラワーペースト類、洋菓子	5: 菓子パン	6.4	6.25 mg/kg	0.086
	82: ケーキ・ペストリー 類	7.4		
ハム、ソーセージ類	63: ハム、ソーセージ	11.4	12.5 mg/kg	0.143
たれ、つゆ、ドレッシング	95: マヨネーズ類	3.3	10 mg/kg	0.601
	97: その他の調味料	56.8		
豆腐	19: 豆腐	36.7	10 mg/kg	0.367
卵加工品	70: 卵類	34.4	5 mg/kg	0.172
味噌、麹	96: 味噌	11.7	5 mg/kg	0.059
魚介乾製品、魚肉練り製品、 いくら、すじこ、たらこ、辛 子明太子、かずのこ調味加工 品	56: 魚介(塩蔵、生干し、 乾物)	15.8	25 mg/kg	0.63
	59: 魚介練り製品	9.3		
合計				2.27

※ヒト体重を 50 kg とすると、ナイシン摂取量は 0.045 mg/kg 体重/日

ナイシンの食品健康影響評価に関する審議結果
についての御意見・情報の募集結果について

1. 実施期間 平成19年8月30日～平成19年9月28日
2. 提出方法 インターネット、ファックス、郵送
3. 提出状況 4通
4. 御意見・情報の概要及びそれに対する添加物専門調査会の回答案

	御意見・情報の概要	専門調査会の回答
1	【物理化学的性質等】 添加物評価書に記載された <i>Lactococcus lactis</i> は種であり、4つの亜種が知られています。JECFAのモノグラフでは、「Nisin is a mixture of closely related antimicrobial polypeptides produced by strains of <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 」と記載されているので、国際的整合性の観点から JECFAと揃え、産生菌株を <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> に限定すべきである。	御指摘については、リスク管理に関する御意見であることから、担当の厚生労働省にお伝えします。なお、御指摘を踏まえ、評価書の「4 物理化学的性質等」における記載を <i>Lactococcus lactis</i> 菌株から <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> に訂正します。

	御意見・情報の概要	専門調査会の回答
2	<p>【物理化学的性質等】</p> <p>第17回専門調査会配布資料1-2では、被験物質に関する化学的なデータが示されていないので、極論を言えば、ナイシンAが殆ど含まれていないこともあり得る。従って、ナイシンA含量を正確に分析するとともに、不明の部分についても分析化学的に明らかにされなければ、健康影響評価を実施したことにはならない。</p>	<p>御指摘は、第46回添加物専門調査会にて配布された資料1-2に関する事項と思われますので、90日間反復投与毒性試験についての御意見と考えてお答えします。</p> <p>まず、ナイシンの含量は、その比活性から換算するものであり、例えば2.5%ナイシン製剤がナイシンの濃度として2.5%という訳ではありません(第47回添加物専門調査会配付資料4-1)。</p> <p>申請資料によると、欧州SCFでADIの設定根拠とされた試験で用いられたナイシンは、Aplin and Barrett社(現ダニスコ社)製の市販のナイシンA製剤(Nisaplin; 2.5%ナイシン製剤、1,000IU/mg)であり、76%の塩化ナトリウムと20%の固形無脂肪乳を含有するとされています。これ以上の組成等については不明です(文献26)。</p> <p>また、JECFA及び米国FDAでADIの設定根拠とされた試験で用いられたナイシンは、市販のナイシン製剤(1,000IU/mg)とされており、組成等は不明です(文献21)。</p> <p>一方、90日間反復投与毒性試験で用いられたナイシンは、市販のNisaplinと同様に製造し、NaClによって調整した製剤(3,000IU/mg)であり、74.23%の塩化ナトリウムを含有するとされています。これ以上の組成等については、SCF等の評価に用いられた製剤と同様に不明です(文献23)。</p> <p>ただし、毒性試験に用いられたナイシンは、JECFA等でも評価に用いられたものでありJECFA等の成分規格に準じたものが使用されていると考えられます。</p> <p>添加物専門調査会としては、海外で評価の対象となつた資料に加え、新たに実施された90日間反復投与毒性試験結果についても評価を行っており、最新の科学的知見も踏まえ、客観的かつ中立公正に評価を行っております。</p>
3	<p>【物理化学的性質等】</p> <p>ナイシンにはA、Z、Qが知られているが、今回の健康影響評価の対象物質がナイシンAに関するものかナイシン類に関するものか、明確にする必要がある。また、引用された文献がナイシンAに関するものかナイシン類に関するものかが特定され、被験物質が明確にされるべきである。</p>	<p>今回の評価の対象物質はナイシンAです。わが国で新たに実施された90日間反復投与毒性試験の被験物質もナイシンAです。また、引用された文献の被験物質については、特段の記載がございませんが、いずれもJECFA、SCF等で評価された文献におけるものであり、ナイシンAであると考えております。</p> <p>なお、御指摘を踏まえ、「4 物理化学的性質等」の項に、今回の評価の対象物質がナイシンAであることを明記することといたしました。</p>

	御意見・情報の概要	専門調査会の回答
4	【物理化学的性質等】 主成分のナイシン A の分子量を訂正されたい。第 8 版食品添加物公定書に収載された原子量表に基づき計算すると、3354.07 となる。また、EFSA Journal (2005) 314, p3 にも、3354.07 と記載されている。	御指摘については、リスク管理に関する御意見であることから、担当の厚生労働省にお伝えします。なお、御指摘を踏まえ、第 8 版食品添加物公定書に基づき、評価書の「4 物理化学的性質等」における分子量の記載を 3354.07 に訂正します。
5	【物理化学的性質等】 化学構造式を訂正されたい。1 番目のアミノ酸である Ile (イソロイシン) の左側は「NH ₂ 」(アミノ基)、34 番目のアミノ酸である Lys (リジン) の左側は、「COOH」と記載するのが一般的である。	添加物専門調査会としては、要請者たるリスク管理機関から入手した情報に基づき評価を行っております。なお、JECFA でも同様の化学構造式を使用していることを確認しております。御指摘については、リスク管理に関する御意見であることから、担当の厚生労働省にお伝えします。

御意見・情報の概要		専門調査会の回答
6 【体内動態】 体内動態に関して、 <i>in vitro</i> 試験の結果から、「摂取されたナイシンは、蛋白質分解酵素により不活性化され、ナイシン分子としては吸収されない」とされているが、データが不十分であり、消化、吸収、代謝についてのデータを記述すべきである。 また、「ヒトに牛乳あるいはヨーグルトを摂取させ、その後、消化管内のペプチドの動態および血漿への出現が調べられ、投与1、2、4時間後に静脈血中に κ -カゼイン(106~116残基)と α_1 s1カゼイン(1~23残基)のオリゴペプチドを検出した。」との報告があるように、ヒトでの吸収は否定できることから、「ナイシン分子として吸収されないと予測され、」には根拠がない。	御指摘のようにナイシンの体内動態データは限られていますが、ナイシンは、 <i>in vitro</i> 試験では、パンクレアチニン等の消化酵素によって不活性化されることが示されていることから、添加物専門調査会としては、現時点での国内外の知見について審議し、「摂取されたナイシンはタンパク分解酵素により不活性化され、ナイシン分子としては吸収されないと予測され、」との結論を導くことは可能と考えております。なお、JECFA、FDAに加え2006年1月にEFSAにおいても同様の評価（ナイシンは腸内酵素により分解又は不活性化される。）がなされている旨、評価書に記載することいたしました。 なお、御懸念は、ナイシンより大きい分子量を有する、牛乳やヨーグルトの消化管での分解物が血中に吸収されるとする報告があることから、ナイシンも一部分子として吸収されるのではないかという点と思慮しますが、御指摘の文献はナイシンに関するものではないことから、最終的な食品健康影響評価を変更する必要はないと考えております。	
7 【ナイシン様抗生物質產生菌の存在場所】 ナイシン様抗生物質產生菌は、「頻度は低いがヒト及びウシの腸内や鼻腔内に常在している」ことをもって、「腸内細菌叢のバランスを崩す可能性は低いと考えられる。」との結論は稚拙である。胃や十二指腸等の常在菌への影響について検討するなど、この結論を証明するための試験がなされるべきだ。	添加物専門調査会としては、現時点での国内外の知見について審議し、「腸内細菌叢のバランスを崩す可能性は低いと考えられる。」と評価しております。ナイシンが腸内酵素によって不活性化されることも、その根拠であると考えますので、評価書に根拠を追記することいたしました。なお、JECFA、FDAに加え2006年1月にEFSAにおいても同様の評価（ナイシンは腸内酵素により分解又は不活性化されることから、腸内細菌叢には影響しない。）がなされている旨、評価書に記載することいたしました。 御指摘のようなデータはございませんが、他の体内動態や毒性試験のデータも総合的に評価して、「腸内細菌叢のバランスを崩す可能性は低いと考えられる。」との結論を導くことは可能と考えております。	

御意見・情報の概要		専門調査会の回答
8	【耐性】 抗生物質に対する感受性の低下の概念については、近年の文献等を詳細に検討する必要があるのではないか。引用文献以外にもたくさんの文献が公表されている。	<p>耐性菌の問題については、「5 安全性」の項において、「ナイシンは、その化学構造、物性、作用機序、交差耐性、消化管酵素による影響などから、一般に言われる抗生物質又は抗菌性物質とは異なる範疇の物質と言える。海外における使用経験からも特段問題となる報告はなく、食品添加物として使用しても、ヒト腸内細菌をはじめとする各菌種に影響を与える可能性は極めて低いと考えられる。」と評価しています。また、「8 評価結果」に記載のとおり、近年、リステリア菌のナイシン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りますが、「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、交差耐性を含む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」と評価しております。</p> <p>ただし、幅広い使用が予定されていることから、評価結果には「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。」と付記しているところです。</p>
9	【毒性】 第46回添加物専門調査会における議論にあるように、ラットの雌雄で背景データに100倍の差があること（福島座長の指摘）について、明快な回答も議論もないまま、それを毒性とは捉えないとする結論に飛躍しているのはおかしい。きちんと実験動物のバックグラウンドを精査し、慎重な議論をするべきである。雌雄に100倍の差があるとすると、安全係数としてどの数値を探るのか。 また、ヒトのADIは成人男性を基準に設定していることから、特に感受性の高い子どもにはそのまま当てはめるることはできないと思われる。	<p>添加物専門調査会においては、原則は、提出されたデータをもって評価すべきであって、その上で必要であれば背景データを提出いただいたて議論することとされました。なお、御指摘の件については、「トータルコレステロールやリン脂質が、肝臓あるいは甲状腺の疾患で二次的に下がることがあることは知られており、そういう意味から、この毒性試験を見ると、そういうところに全く影響が見られていない。従って、恐らく影響ではあるけれども、明らかな毒性は見られていない。」との複数の御意見も踏まえ、総合的に、慎重に議論を尽くして判断したものです。</p> <p>安全係数については、今回、ADI の設定根拠資料とされたラット 3 世代繁殖毒性試験において、発生毒性のところで奇形が認められるであるとか、一般毒性よりも低い投与量で繁殖毒性が認められるなどの重大な影響は認められていないことなどから、追加の係数は必要なく、通常の 100 の値を採用すると評価されました。</p> <p>なお、繁殖毒性など、次世代への影響についても評価した上で評価結果をまとめております。</p>

	御意見・情報の概要	専門調査会の回答
10	<p>【毒性】</p> <p>今回の評価結果において、90日間反復投与毒性試験の結果が結論に反映されていない。また、繁殖毒性のデータを採用したことは恣意的に見える。慢性毒性または慢性毒性試験のデータからADIを0.04 mg/kg/日に設定すれば、一日推定摂取量の推計値はADIぎりぎりであって、食品添加物として指定することに疑問が生じる。</p> <p>海外での使用経験を評価材料としている以上、JECFA及び米国FDAの評価結果にならいADIを0.042～0.049 mg/kg体重/日とするなど、ADIの設定について再検討することを要望する。</p>	<p>最終的な添加物としての一日摂取量の推計、指定の可否については、リスク管理に関する御意見であることから、担当の厚生労働省にお伝えします。</p> <p>JECFA 及び米国 FDA の評価の根拠とされているラット2年間慢性毒性試験は、1960年代に実施された試験であり、剖検が可能であった動物にいずれも腫瘍が検出されなかつた等の不可解な点があり、信頼性が担保できないことから、ADI 設定には用いず、あくまで評価の参考に用いることとしました。</p> <p>一方、SCF の評価の根拠とされているラット3世代繁殖毒性試験については、1980年頃に実施された GLP 適合試験であり、評価の対象とすることとしました。</p> <p>また、ラット90日間反復投与毒性試験については、第46回添加物専門調査会において審議され、NOAEL が設定されました。</p> <p>添加物専門調査会としては、これらの毒性データを評価し、NOAEL の最小値であるラット3世代繁殖毒性試験結果を基にADIを設定することとしました。</p> <p>ADI の設定については、現時点での国内外の知見も踏まえ、客観的かつ中立公正に評価したものであり、見直す必要はないと考えております。</p>
11	<p>【一日推定摂取量の推計】</p> <p>オーストラリア・ニュージーランドでは、畜肉加工食品への使用について検討されているが、その中で子供への摂取への考慮もなされている。これは、他の添加物にも当てはまることがあるが、子供の摂取については別途検討することも必要ではないか。</p>	<p>オーストラリア・ニュージーランドでは、現在、チーズ類の他、クリーム製品、小麦粉製品（パンケーキ、麺類、パスタを含む）等への使用が認められています。更に現在、御指摘のように、加工した肉、家禽製品への使用を検討中（昨年9月19日まで意見募集）です。使用対象食品を増やしても、幼児（2～6歳）の摂取量は多くてもADI（0～0.625 mg/kg 体重/日）の10%で、ADIを十分に下回ることから、安全性の懸念は生じないことが記されています。</p> <p>なお、添加物専門調査会においては、繁殖毒性など、次世代への影響についても評価した上で評価結果をまとめております。</p>

	御意見・情報の概要	専門調査会の回答
12	【一日推定摂取量の推計】 別添の国民栄養調査における食品分類及び食品分類番号を、現在のものに修正する必要があるのではないか。マヨネーズ及び味噌については、食品分類が変更されている。	御指摘を踏まえ、平成16年国民健康・栄養調査に基づき、評価書の「別添：ナイシンの使用予定食品及び推定摂取量」における食品分類及び食品分類番号を訂正します。 併せて、「7 一日推定摂取量の推計」の項におけるナイシンの推定摂取量を訂正します。
13	【国際機関等における評価】 2006年1月に承認されたEFSAの見解では、ADI 0.13 mg/kg bw を変更すべき新しいデータはないと指摘している。この再評価についても言及すべきではないか。	御指摘については、「6 国際機関における評価（3）欧州食品科学委員会(SCF)における評価」の項の末尾に、追記することいたします。
14	【国際機関等における評価】 コーデックスのGSFAを検討した結果を記載すべきではないか。ナイシンについては、「01, 6, 6 Whey protein cheese MAX 12 mg/kg」とされている。	使用基準については、当委員会の審議結果を受けてリスク管理機関が検討を行います。御指摘については、リスク管理に関する御意見であり、必ずしも評価書に記載すべき事項ではないと考えます。
15	【全般的な事項】 幅広い使用予定食品が記載されているが、ナイシンが中性から高いpHでは溶解性も悪く安定性も悪いことが知られているので、チーズ以外の記載された食品で安全性や効果が確かめられたのかは疑問である。	御指摘の有効性については、リスク管理に関する御意見であることから、担当の厚生労働省にお伝えします。 なお、幅広い使用が予定されていることから、評価結果において「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。」と付記しているところです。

	御意見・情報の概要	専門調査会の回答
16	<p>【全般的な事項】</p> <p>ナイシンについては、抗菌活性が高いペプチドであること、耐性に関する概念、抗菌スペクトルが極めて狭いこと、欧米ではチーズへの使用に限定されていること、使用予定食品は海外における使用食品に比べものにならないくらい多いことから、使用分野を限定すべきである。</p>	<p>申請者から提出された資料によると、欧米においてはチーズ以外にも液状卵等に使用が可能となっております。耐性菌の問題については、「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っては、交差耐性を含む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」と評価しております。ただし、幅広い使用が予定されていることから、評価結果において「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。」と付記しているところです。</p> <p>なお、使用基準については、当委員会の審議結果を受けてリスク管理機関が検討を行うことになることから、御意見を担当の厚生労働省にお伝えいたします。</p>
17	<p>【全般的な事項】</p> <p>抗生素質が持つ毒性、耐性菌の発生、常在菌への影響など、いくつも問題点が考えられる。現段階では、これらの影響についての研究はまだ十分ではなく調査を続ける必要がある。将来予測されるリスクについて、もっと真摯な態度で臨んでほしい。</p> <p>特に、今回のナイシンのように、乳製品やハム・ソーセージ、調味料、豆腐など、乳幼児や子どもたちが日常的に多く摂取する食品への抗生素質の添加は、慎重であるべき。抗生素質が食品の一部として日常的に体内に取り込まれることの是非について、健康影響と耐性菌の発生などの面から、基本的な考え方の再検討を望む。</p>	<p>ナイシンの評価については、第14回、第17回、第46回、第47回の計4回にわたり当調査会において、慎重に審議を行ったところです。</p> <p>JECFA、FDA及びSCFにおいても議論されている耐性菌の問題に関しては、当調査会においても、微生物の専門家から御意見を伺うなど慎重に審議を行ったところであります、「現時点で得られている知見から判断して、交差耐性を含む耐性菌出現による医療上の問題を生じるなど安全性上の問題を生じる可能性は極めて少ない」と評価しております。</p> <p>また、添加物に対するものではないものの、薬剤耐性菌に関する最新の評価指針である「家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する評価指針（平成16年9月30日食品安全委員会決定）」に基づいて整理、評価しております（第14回配布参考資料1、第17回配布参考資料1、2）。</p> <p>ただし、幅広い使用が予定されていることから、評価結果において「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。」と付記しているところです。</p> <p>なお、御指摘の、抗生素質を添加物として使用するとの可否については、リスク管理に関する御意見であることから、担当の厚生労働省にお伝えします。</p>

	御意見・情報の概要	専門調査会の回答
18	<p>【全般的な事項】</p> <p>「耐性菌出現による医療上の問題を生じる<u>可能性は極めて少ない</u>と考えられる。」等の記載からみてとれるが、ナイシンに係る食品健康影響評価は、到底科学的・定量的評価とは言えない。</p>	<p>ナイシンの評価については、第14回、第17回、第46回、第47回の計4回にわたり当調査会において、慎重に審議を行ったところです。</p> <p>JECFA、FDA及びSCFにおいても議論されている耐性菌の問題に関しては、当調査会においても、微生物の専門家から御意見を伺うなど慎重に審議を行ったところであります、「現時点で得られている知見から判断して、交差耐性を含む耐性菌出現による医療上の問題を生じるなど安全性上の問題を生じることは極めて少ない」と評価しております。</p> <p>また、添加物に対するものではないものの、薬剤耐性菌に関する最新の評価指針である「家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する評価指針（平成16年9月30日食品安全委員会決定）」に基づいて整理、評価もしております（第14回配布参考資料1、第17回配布参考資料1、2）。</p> <p>ただし、幅広い使用が予定されていることから、評価結果において「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。」と付記しているところです。</p>

	御意見・情報の概要	専門調査会の回答
19	<p>【全般的な事項】</p> <p>ナイシンの指定後に、ナイシンを使用するのではなく、それらを産生する菌を食品に使用する場面が考えられる。また、各種のバクテリオシンの利用も研究され、特許なども数多く見られる。リスク管理機関である厚生労働省においては、規格や使用基準の設定にとどまらず、先の「照会」をもとに、監視・指導方針の詳細をお示しいただきたいと願っている。</p> <p>各種のバクテリオシンの食品への利用が考えられ、多種の類似物質の販売が予見される。ナイシンに関する健康影響評価の影響は極めて大きい。そのことを踏まえたリスク評価を望むものである。このような商業的な物質については、毒性評価にとどまらず、健康影響評価は、社会的側面からも検討されるべきである。</p>	<p>頂いた御意見は、リスク管理に関する御意見でもあることから、担当の厚生労働省にお伝えします。</p> <p>なお、食品安全委員会の行う食品健康影響評価は、最新の科学的知見に基づき、客観的かつ中立公正に行うこととしております。</p>

