

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）

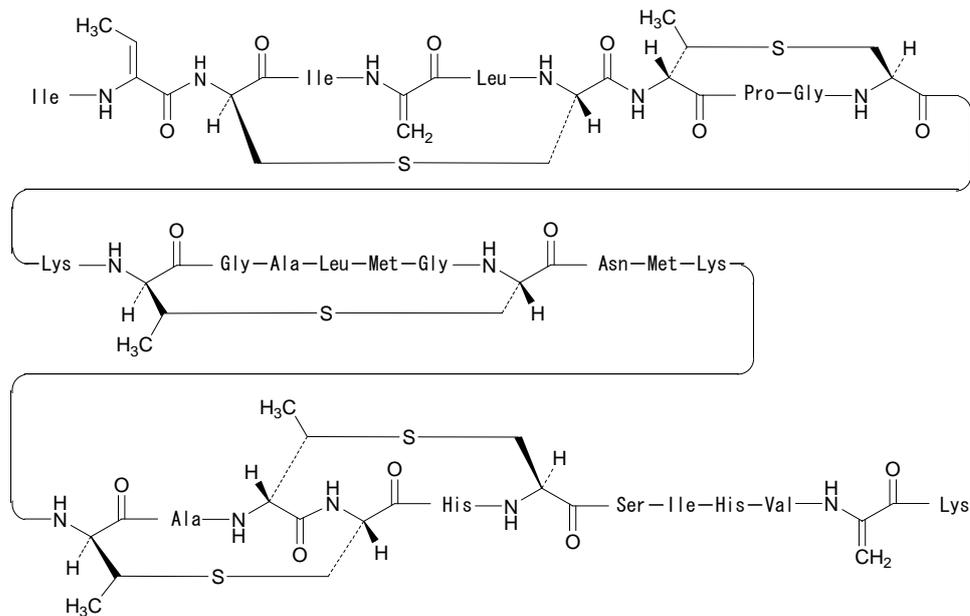
1. 品目名

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



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。また、ナイシンは常温及び酸性条件下（pH3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 1×10^5 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/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 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>C. butyricum</i> N. C. T. C. 7423 | 3,500 | +++ | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ | | | | |
| | 30 | +++ | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>C. sporogenes</i> Cl. 6 | 800 | +++ | +++ | - | - | - | - | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | | | | |
| | 8 | +++ | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>C. 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 (*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 *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 | $4.0 \times 10^{2*}$ | <10 | 7.46 | 良好 | なし |
| 10 | $2.0 \times 10^{1*}$ | 50 | 7.72 | 良好 | なし |
| 14 | $7.0 \times 10^{4*}$ | <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 † | $2.7 \times 10^2 ‡$ | 7.59 | 良好 | なし |
| 4 | $2.4 \times 10^4 †$ | $3.0 \times 10^2 ‡$ | 7.55 | 良好 | なし |
| 7 | $5.3 \times 10^6 †$ | 5.0×10^3 | 6.88 | やや退色 | 弱い |
| 10 | $7.3 \times 10^7 †$ | 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 3-4 μm、最大 7-8 μm)、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

1) 製麴工程での使用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℃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 | 30℃、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) |

* 麴は通常、蒸米に種麴を接種してから約 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℃60 分蒸した後、放冷、磨砕し蒸煮大豆とした。市販の味噌用麴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℃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）

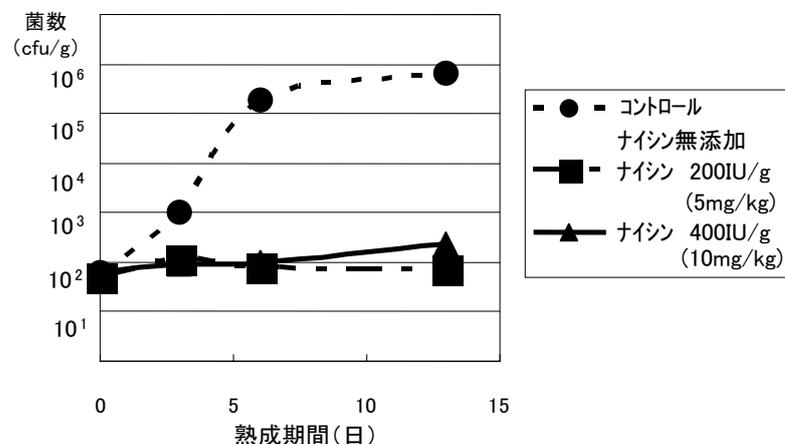


図 1. 味噌（食塩含量 8%）の熟成中の細菌数の推移

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）

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、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）と同等の力価を有し、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可能であると判断した。

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つては1kgにつき0.0125g以下、ソース類、マヨネーズ及びドレ
ッシングにあつては1kgにつき0.010g以下、プロセスチーズ、洋菓子にあつては1kgにつき
0.00625g以下、卵加工品及び味噌にあつては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。

穀類及びでん粉を主原料とする洋生菓子：ライスプディングやタピオカプディング等をいい、
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、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、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 | 6.4 | 6.25 | 0.086 |
| | 82：ケーキ・ペストリー類 | 7.4 | | |
| 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 | 2.1 | 10.0 | 0.622 |
| | 95：マヨネーズ | 3.3 | | |
| | 97：その他の調味料 | 56.8 | | |
| 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に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。

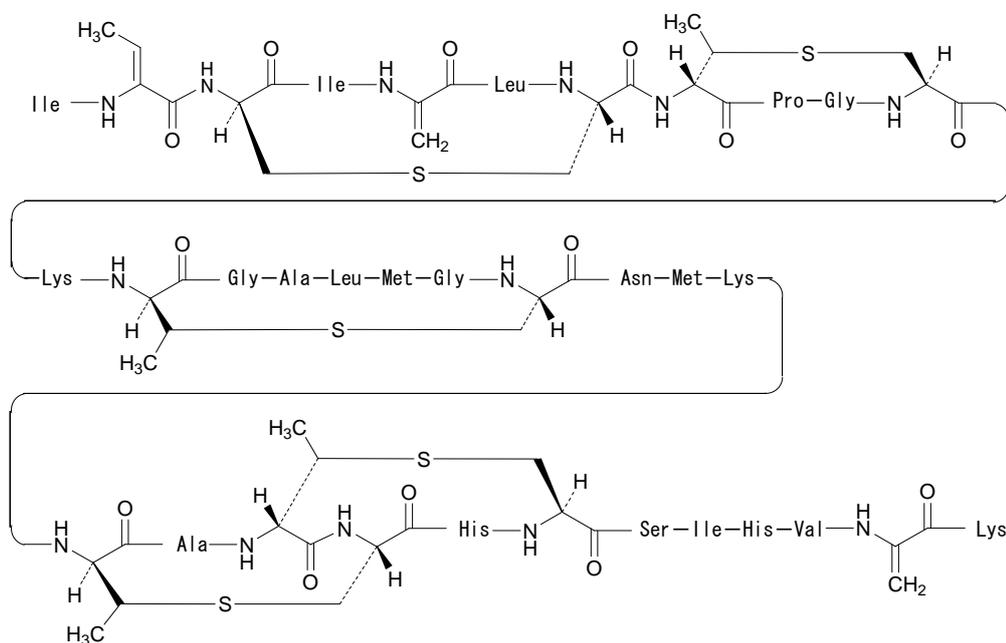
一方で、耐性菌の出現に関する情報を入手することは、添加物の適切な使用を指導するうえで重要であるため、ナイシン耐性菌に関して情報を収集し、安全性、有効性の点で問題となるような新たな知見があれば、速やかに報告するよう事業者等に対し周知を図ることが適当である。

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

C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇

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 (C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇) としての量を単位で示し、その 1 単位はナイシン (C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇) 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〜うすい黄赤色の粉末で、においがなく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、塩酸(1→600)80ml に懸濁する。2 時間室温に置き、更に塩酸(1→600)を加えて 100ml とし、試料液とする。

(i) 試料液を水浴中で 5 分間加熱する。加熱した試料液 1ml を正確に量り、塩酸(1→600)を用いて 200ml とし、検液とする。この検液につき、定量法に示す方法により力価を求めるとき、検液の力価は、定量法の検液の力価の 100±5% である。

(ii) (i)の加熱した試料液の残りの液に、水酸化ナトリウム溶液(1→5)を加えて pH11 に調整

削除: 淡黄白

削除: 0.2µm のフィルターを通して滅菌した 0.02mol/L

削除: 0.02mol/L

削除: する。この液 1ml を正確に量り、0.02mol/L 塩酸を用いて 200ml

削除: 比較液とする。比較液 20ml を

削除: 煮沸

削除: 検液及び比較液につき、

削除: ,

削除: 測定する

削除: 比較液

削除: 別に検液 20ml に 5mol/L

した後、65℃、30分間加熱する。冷後、塩酸を加えてpH2.0に調整し、この液1mlを量り、塩酸(1→600)を用いて200mlとし、検液とする。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懸濁液(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100ml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。

削除: 水溶液

純度試験 (1) 鉛 Pbとして1.0 µg/g以下

本品10.0gを量り、硫酸5ml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。更に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。試料液にクエン酸水素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、これを検液とする。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。

削除: 5mlの

削除: さらに

削除: ,

(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(発育阻止物質の確認試験を除く)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、生菌数試験のメンブ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ブ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℃で少なくとも5日間培養する。また大腸菌については、本品1gを量り、乳糖ブイオン培地を加えて100mlとし、30~35℃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、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を加えて500ml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のテトラチオネート液体培地及びラパポート液体培地に接種し、30~35℃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℃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

削除: 乳糖

削除: ブイオン

削除: 200

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

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を混和して培地の有効性を試験する。

削除：及び発育阻止物質の確認試験

削除：、試料の存在下及び非存在下において、

削除：、抗菌性物質の存在等

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→1,000) 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。

(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。

(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 培地の液性は水酸化ナトリウム試液又は塩酸(1→10)を用いて調整し、滅菌後の液性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。滅菌後の液性はpH7.4~7.6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2ml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。滅菌後の液性はpH7.2~7.6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 内径90mmで高さ20mmのペトリ皿に約20mlの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25~28mmの円周上に、円筒をその中心間の距離が30mm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20ml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7.9~8.1mm、内径5.9~6.1mm、高さ9.9~10.1mm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 ナイシン標準品約0.1gを精密に量り、塩酸(1→600)80mlに懸濁する。2時間室温に置き、塩酸(1→600)を加えて100mlとし、これを標準原液とする。更に1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0(単位/ml)となるよう、標準原液を塩酸(1→600)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。

削除: pH

削除: 1mol/L

削除: 調製

削除: pH

削除: pH

削除: pH

削除: シヤーレ (

削除: ,

削除:) の場合は

削除: , 大型皿の場合は培地の厚さが2~3mmとなるように

削除: (ペニシリンカップ)

削除: 00

削除: 正確

削除: 0.2µmのフィルターを通して滅菌した0.02mol/L

削除: 0.02mol/L

削除: (1,000 単位/ml)

削除: 0.02mol/L

(vii) ナイシン標準曲線の作成 穿孔寒天平板 5 枚を 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 0.2ml ずつ 4 箇所 の 穴 に入 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 0.1mm 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。

削除: (大型皿穿孔寒天平板の場合はこれに順ずる枚数)

(viii) 検液の調製 本品約 0.1g を精密に量り、塩酸(1→600)80ml に懸濁する。2 時間室温に置き、更に塩酸(1→600)を加えて 100 ml とし、試料液とする。試料液 1ml を正確に量り、塩酸(1→600)を用いて 200ml とし、検液とする。検液は用時調製する。

削除: 試料液

削除: ナイシン濃度測定

削除: 00

削除: 正確

削除: 0.2µm のフィルターを通して滅菌した 0.02mol/L

削除: 0.02mol/L

削除: 試料

削除: この

削除: 液 1ml を正確に量り、

削除: 0.02mol/L

削除: 塩酸(1→600)を用いて 200ml とし、検液とする。検液は用時調製する。

削除: の

削除: 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

削除: 検液の力価 = 10^l (単位/ml)

削除: ×1,000

削除: 5

削除: クエン酸二アンモニウム C₆H₁₄N₂O₇ [K 8284]

削除: 0.1mol/L

削除: 0.1mol/L

(ix) 力価の算出 標準曲線の作成の手法に従い、検液の阻止円の直径を測定し、以下の式により、本品の力価を求める。

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

検液の力価 = 10^l (単位/ml)

$$\text{本品の力価} = \frac{\text{検液の力価} \times 20}{\text{試料の採取量(g)}} \quad (\text{単位/mg})$$

(2) 塩化ナトリウムの定量

本品約 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

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

試薬・試液

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 分間高圧蒸気滅菌を行う。

マラカイトグリーンシュウ酸塩 C₅₂H₅₄N₄O₁₂ [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 及び塩酸(1→120)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 及び水酸化ナトリウム(1→500)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 10g, リトマス 0.05g 及び無水硫酸ナトリウム 0.05 g に水 100ml を
加えて混和する。用時調製する。

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]

削除: 0

削除: , 0

削除: し, 115°C, 15 分間滅菌

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, As₂O₃ 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℃ で 24~72 時間培養する。」とした。サルモネラ試験では, 本品の抗菌性を考慮し, 前培養にはソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 500ml を用いることとし, 選択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。本規格では, FCC の規格に準拠した。ただし, 培地の調製方法は, より感度が高く, 検量線の直線性が良好となる方法を採用した。

(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。

削除: 溶解性

削除: 「試料 10g を量り, 乳糖ブイヨン

削除: を加えて

削除: 200

削除: とし」

削除: 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。

削除: 定量性, 及び日本における公定試験法との整合性から,

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 | $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ | $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ | $C_{143}H_{230}O_{37}N_{42}S_7$ | $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ |
| 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~うすい黄赤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 |
| 確認試験 | | | | |
| 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 | — | — |
| 純度試験 | | | | |
| 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 |
| 平成20年4月21日 | 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 |
| 平成20年5月20日 | 国際貿易機関への通報（WTO通報） |
| ～平成20年7月18日 | |
| 平成20年5月20日 | 国民からの意見聴取 |
| ～平成20年7月XX日 | |
| 平成20年9月24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

(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)

(平成20年9月24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 | 慶應義塾大学薬学部客員教授 |
| | 堀江 正一 | 埼玉県衛生研究所水・食品担当部長 |
| | 米谷 民雄 | 静岡県立大学 食品栄養科学部 客員教授 |
| | 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 | 青森県立保健大学健康科学部 栄養学科長 公衆栄養学教授 |
| | 由田 克士 | 独立行政法人国立健康・栄養研究所 栄養疫学プログラム国民健康・栄養調査プロジェクトリーダー |

(○：部会長)