

ナイシンの微生物限度試験について (JECFA規格やFCC規格と規格値が異なる理由)

1 JECFA 規格及び FCC 規格で微生物限度試験が設定された経緯を確認したところ、JECFA 規格における設定根拠は不明であった。一方、FCC 規格は、ナイシンの製造業者が食品製造業者の要望に応えるため、当該製造業者が保証できる範囲内で設定した社内規格がそのまま採用されたことが想定されることであった。

そこで、本成分規格では、FCC 規格に準じ、規格項目として細菌数、大腸菌、サルモネラ菌を設定することとした。

2 しかしながら、本成分規格における微生物限度の各項目の試験法については、食品衛生法の登録検査機関等での実施のしやすさや、ナイシンの抗菌性が、「ナイシン」中に混在する微生物の存在を試験時にマスクする可能性を踏まえ、発育阻害物質の影響を考慮した食品添加物公定書又は日本薬局方の一般試験法を採用した。

よって、本成分規格の規格値は、ナイシンの微生物に対する影響を排除できるように設定した方法によるものであり、それを考慮していない方法による JECFA 規格や FCC 規格よりも緩いものではない。

3 なお、EU 規格では、微生物限度は設定されていない。

微生物限度	成分規格案	JECFA 規格 ¹	FCC 規格 ¹	EU 規格
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	—	30 以下/g	—	—

¹ FCC 規格の微生物限度試験の試験法では、食品を対象とした試験法(Bacteriological Analytical Manual (BAM))を採用し、試料中に存在する発育阻止物質の影響を除く操作が含まれていない。また、JECFA 規格も FCC 規格に準拠した試験法が設定されている。

(参考 1) 規格案の設定根拠

① 細菌数

食品添加物公定書の一般試験法を準用し、メンブランフィルター法を採用した。バリデーション試験を行った結果、ナイシン 1g をペプトン食塩緩衝液と混和して 1,000ml とし、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することで、ナイシンの抗菌性による影響なく、試験が実施できることが確認できた²。この場合、ナイシン 0.1g 相当量を 1 つのシャーレで培養することとなり、培地上に集落が 1 つ観察されただけで「1g につき、細菌数は 10」となる。よって、試験法の誤差を加味して限度値を「1g につき、細菌数は 100 以下」とした。

* 既に指定されている添加物の微生物限度規格は、1g につき 1,000~50,000 以下で設定されており(1,000 以下は 2 品目のみ)、「1g につき、細菌数は 100 以下」は、これらに比して厳しい限度値となっている。

② 大腸菌

食品添加物公定書の一般試験法を採用した。バリデーション試験を行った結果、試料量 1g に乳糖ブイオン培地を加えて 100ml とする方法で、ナイシンの抗菌性による影響なく、試験を実施できることが確認できた。よって、限度値を「陰性(試料 1g 中)」とした。

③ サルモネラ菌

食品添加物公定書に一般試験法が規定されていないため、第 15 改正日本薬局方の一般試験法を採用した。バリデーション試験を行った結果、ナイシン 10g に SCD 培地を加えて 500ml として培養することで、ナイシンの抗菌性による影響なく、試験を実施できることが確認できた。よって、限度値を「陰性(試料 10g 中)」とした。

(大腸菌及びサルモネラ菌で発育阻止が認められた理由について)

ナイシンは、*Bacillus* 属、*Clostridium* 属を含むグラム陽性菌に対して効果を有する保存料であるが、今回、グラム陰性菌である大腸菌及びサルモネラ菌でのバリデーション試験の結果、グラム陽性菌に対する効果とは比較にならないが、これらに対して抗菌作用が認められた。

その理由は明らかではないが、外膜構造の違いにより大きな効力はないが、バリデーション試験を実施した高濃度では陰性菌でもある程度の作用を示しているか、又は菌の増殖過程での外膜の生合成段階で若干効果を示し、コロニー形成に影響を与えているのではないかと考えられる。

² ナイシンは溶媒に対する溶解性が低いため、メンブランフィルターでのろ過を適切に実施し、公定法に採用できる濃度及びろ過量として、本条件での設定が限界であった。

(参考 2) 本規格案、FCC規格及びJECFA規格の試験法概略

細菌数

	成分規格案	FCC	JECFA
試料	1g	10g	10g
希釈水	ペプトン食塩緩衝液と混和し 1000mlとする	リン酸緩衝液 90mL	リン酸緩衝液 90mL
MF法	100mlをろ過	1mlをペトリ皿へ分注	1mlをペトリ皿へ分注
培地	ソレブリン・カゼイン・ダイゼスト寒天培地	Plate count agar	Plate count agar
培養温度	30~35°C	35°C	35°C
培養時間	5日以上	48±2時間	48±2時間
判定	10~100個/フィルターの集落を持つ平板より算出	25~250個の集落を持つ平板より算出	25~250個の集落を持つ平板より算出

Nisinに関しては一般細菌数の規格設定なし

大腸菌

	成分規格案	FCC	JECFA
試料	1g	25g (50g)	10g
希釈水		リン酸緩衝液 225mL (450mL)	リン酸緩衝液 90mL
培地	乳糖ブイヨン培地 100 mL	Lauryl tryptose broth 10mL MPN法 (3段階希釈 3本ずつ)	Lauryl tryptose broth 10mL MPN法 (3段階希釈 3本ずつ)
培養温度	30~35°C	35°C	35°C
培養時間	24~72時間 増殖の確認	48±2時間 ガス産生	48±2時間 ガス産生
判定	マッコンギー寒天平板に塗抹 30~35°C 18~24時間 周囲に赤みがかかった沈降線の帯を持つ赤レンガ色のグラム陰性菌の集落	陽性的の場合 EC発酵管 45.5±0.2°C 48±2時間 ガス産生	陽性的の場合 EC発酵管 45.5±0.2°C 48±2時間 ガス産生
判定	陽性的の場合 EMB寒天培地に塗抹 30~35°C 18~24時間 金属光沢を持つ集落又は透過光下で青黒色を帯びた集落	陽性的の場合 L-EMB寒天培地に塗抹 35°C 18~24時間 中心部黒色、平たん、金属光沢	陽性的の場合 L-EMB寒天培地に塗抹 35°C 18~24時間 中心部黒色、金属光沢
判定	陽性的の場合 ・IMVIC試験(インドール産生試験、メチルレッド反応試験、フォーゲル・プロスカウエル試験、クエン酸利用試験) ・44.5°Cでの生育試験	陽性的の場合 標準寒天斜面培地 35°C 18~24時間 グラム陰性、(短)桿菌	陽性的の場合 標準寒天斜面培地 35°C 18~24時間 グラム陰性、(短)桿菌又は球菌
判定	・IMVIC試験 : + + - - ・44.5°Cでの生育試験 : 陽性 (大腸菌迅速キットの使用も可能)	陽性的の場合 ・IMVIC試験(インドール産生試験、メチルレッド反応試験、フォーゲル・プロスカウエル試験、クエン酸利用試験)、ガス産生 ・市販キット	陽性的の場合 ・IMVIC試験(インドール産生試験、メチルレッド反応試験、フォーゲル・プロスカウエル試験、クエン酸利用試験)、ガス産生再 ・市販キット

Nisinに関しては大腸菌群数の規格設定もあり

サルモネラ

