

8. ナタマイシンの安定性

遮光状態であれば、乾燥した結晶状の本品は極めて安定であり、活性（抗真菌性）の損失は2年間の通常状態の保管で発生しない。20℃（暗所）で保管された本品の製剤 Delvocid® は少なくとも4年後も安定である。

加熱すると約200℃で分解する。120℃以下では1時間以上放置されない限り活性は損なわれない。水溶性懸濁液の安定性は、暗所保管で乾燥状態と同様に高く pH5.0 ～9.0、暗所であればまったく安定である。

ナタマイシンは紫外線の照射でテトラエン構造を失って分解し、化学的酸化で活性は急速に破壊される。

極端な pH の範囲では急速に不活性化する。温和な酸化条件では生物学的に不活性な物質に分解してマイコサミン、アボナタマイシン及びジナタマイシノライドジオールを産生する^{6) 7)}。

9. 食品中のナタマイシン分析法⁸⁾

高速液体クロマトグラフィーによる定性及び定量

本法はチーズの表面処理剤として使用された防かび剤ナタマイシンを測定する方法である。

〔試 薬〕 ① ナタマイシン標準品：純度90%以上の粉末又は結晶性粉末を使用する。

② 試薬：いずれも特級を使用する。水メタノールは水とメタノールを1：2（v/v）の割合で混和して調製する。

〔装 置〕 高速液体クロマトグラフ：紫外吸収検出器を有するもの。

〔ナタマイシン標準液の調製〕 使用直前にナタマイシン50mgをメタノール100mlに溶かす。本液5mlに水メタノールを加え50mlとし、この希釈液5mlに再び水メタノールを加えて50mlとする。最終溶液のナタマイシン濃度は5 µg/mlとなる。

〔試験溶液の調製〕 スライサー^{註1)}によって、チーズのリンドの幅が3cmを超えないような大きさにカットする。チーズカンナ^{註1)}または適当な方法で表面から5mmの厚さまで削り取る。このリンドを切断して表面積（上側のみ）20～40cm²の直方体を調製し、表面積を精密に測定した後、重量をg単位で秤量する。面積および重量を測定した片を含めて、すべてのチーズリンドを注意深く攪拌・混和する。直ちにその一定量を取り、サンプルジャーに入れ、密封する。

〔試験操作〕 高速液体クロマトグラフィーの条件

カラム：内径4～5mm。長さ150mmのガラスまたはステンレススチール製のものにカラム充填剤をよく混和して充填したもの。

カラム充填剤：オクタデシルシラン結合シリカゲル（5 μ m）

カラム温度：40℃

移動相：メタノール・水・酢酸混液（60：40：5）

流速：1 ml/min

検出波長：303nm；感度 0.005A UFS

定性試料 10.0 g を 200ml の三角フラスコにはかり込み、メタノール 100ml を加える。マグネチックスターラーまたは振とう機により内容物を 90 分間かき混ぜ、または振り混ぜたのち、低速ろ缶を用いてろ過し、ろ液は最初の 5ml を捨てたのちに適当な容器に集める。常温に暫時放置したのち、マイクロフィルタータイプのガラスろ過器（G4）を用いてろ過する。ナタマイシン標準溶液を薄めて 1,2,4,6 および 8ml/50ml（水メタノール）溶液を調製する。各希釈液のナタマイシン含量はそれぞれ 2,4,8,12 および 16ng/20ml となる。

ナタマイシン標準溶液および試験溶液の各 20 μ l を注入して高速液体クロマトグラフィーを行い、得られたピークの保持時間を比較して定性を行う。

定量：定性の場合と同じ条件で 5 段階の高速液体クロマトグラフィーを行い、それぞれのピーク高さまたは面積を測定して検量線を作成する。試験溶液 20 μ l を注入し、その高さまたはピーク面積を求める。

次式によりチーズリンド中のナタマイシン含量を求める。

$$C=5*10^{-3}B \quad (1)$$

C：チーズリンド 10g 中のナタマイシン含量（mg）

B：20 μ l 中のナタマイシン含量（ng）

$5*10^{-3}$ ：20 μ l 中のナタマイシン含量（ng）を、チーズリンド 10 g を含む懸濁液 100ml 中の含量（mg）に換算するための係数

チーズリンドの表面のナタマイシン含量は（2）の変換式によって求められる。

$$C'=10C*X/Y \quad (2)$$

C'：チーズリンド表面のナタマイシン含量（mg/100cm²）

10：10g のチーズリンドを 100 cm² 当たりの重量に換算する係数

X：チーズの重量（g）

Y：チーズの表面積（cm²）

〔注解〕

1) ナタマイシンの検出：定量法としては、分光光度計法（紫外 3 点法）およ

び液体クロマトグラフィーがあるが、UV 法はチーズ中の妨害物質による影響をうけることがあるので HPLC を選んだ。

- 2) ナタマイシンは DSM 社 (旧 Gist-brocades 社 ; オランダ) より供給されている。
- 3) チーズカンナまたはスライサーで表面から 5mm の厚さまで削り取る。残留量の規制が表面積当たりなので、必ず表面積を精密に測定したのち、ひょう量する。
- 4) ろ紙は 5 種 C を使用する。

注 1 : チーズスライサーまたはチーズカンナ

ハード、セミハード・タイプのチーズの表面を薄く削り取る道具であり、通常はチーズの検査用サンプルや試食用サンプルなどの採取に使用される。

10. 成分規格 (案) の設定根拠

(ア) 規格案

外観・性状 ; 白～乳白色、殆ど無臭、結晶粉末

同定 ; UV 及び IR-スペクトル ; 色調反応

含有率 ; 95.0%以上 (乾物換算)

分析方法 ; 微生物学的分析

乾燥減量 ; 8.0%以下

旋光特性 ; $[\alpha]_D^{20}$: +250~295° (20°C、氷酢酸中の 1%w/v 溶液)

pH ; 5.5~7.5 (20 部ジメチルホルムアミドと 80 部水の混液中の 1%w/v 溶液)

硫酸塩 ; 0.5%以下

重金属 (Pb として) ; 30 ppm 以下

ヒ素 (As_2O_3 として) ; 3 ppm 以下

(イ) 国際規格及び海外の規格との対比表を添付する ;

ナタマイシンの仕様書 / 別紙 5 の添付

分 析／ 特 性	規格案	JECFA ¹	EU ²	USA(FDA) ³	USP ⁴	DSM ⁵ 仕様書	FCC ⁶	日本薬局方 ⁷
性 状	白色から乳白色 殆ど無臭、 結晶粉末	白色から乳白色、 殆ど無臭、 結晶粉末	白色から乳白色、 結晶粉末			白色から明るい クリーム色の 結晶粉末	灰色がかった 白色からクリーム 色の結晶末	白色から黄白色 結晶状粉末
同 定	UV 及び IR-スペクトル； 色調反応	UV 及び IR-スペクトル； 色調反応	UV 及び IR-スペクトル； 色調反応		UV	HPLC	UV	UV 色調反応
含 有 率	>95.0% (乾物で計算)	>95.0% (乾物で計算)	>95.0% (無水物換算)	97±2% (無水物換算)	90.0~102.0% (無水物換算)	86~93% (それ自体で)	97.0~102.0%	>96.0%
分析方法	微生物学的分析	HPLC	微生物学的分析		HPLC	HPLC	HPLC	UV
乾燥減量	8.0%以下	8.0%以下	8%以下(60℃の真空で P ₂ O ₅ 上で恒量になる迄)		6.0~9.0% (USP 法 1 [921])	6.5~8.0%	6.0~9.0%	6.0~9.0% 容量滴定法
旋光特性	[α] _D ²⁰ : +250° から 295° (20℃で氷酢酸中 の 1% w/v 溶液)	[α] _D ²⁰ : +250° から 295° (20℃で氷酢酸中 の 1% w/v 溶液)	[α] _D ²⁰ : +250° から 295° (20℃で氷酢酸中 1% w/v 溶液及び乾物に ついて計算した)				[α] _D ²⁰ : +276° から 280°	[α] _D ²⁰ : +243° から 259° (0.1g, (100), 25ml 100mm)
pH	5.5~7.5 (20 部のジメチル ホルムアミドと 80 部 の水中の 1.0%w/v 溶液)	5.5~7.5 (20 部のジメチル ホルムアミドと 80 部 の水中の 1.0%w/v 溶液)	5.5~7.5 (20 部のジメチル ホルムアミドと 80 部 の水中の 1%w/v 溶液)		5.0~7.5 (ml 中に 10 mg含有の懸濁液) (USP 法 [791]) (WHO)	5.0~7.5 (USP) 5.5~7.0	5.0~7.5	
硫酸塩	0.5% 以下	0.5% 以下	0.5% 以下			0.5%		
重 金 属 (Pb として)	30 ppm 以下	2 mg/kg 以下	10 mg/kg 以下	20 ppm 以下		10 mg/kg	0.002% 以下	30 ppm 以下
ヒ 素	3 ppm 以下		3 mg/kg 以下	1 ppm 以下		1 mg/kg		
鉛	5 ppm 以下		5 mg/kg 以下					
水 銀			1 mg/kg 以下					

分 析／ 特 性	規格案	JECFA ¹	EU ²	USA(FDA) ³	USP ⁴	DSM ⁵ 仕様書	FCC ⁶	日本薬局方 ⁷
微生物基準 －総菌数 －エンテロ バクター －かび －リステリア			100 cfu/g 以下			100/g 1/g 1/5g 1/25g		
結晶性					要求に合致 (USP 法[695])	USP と同様		

¹ 第57回 FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (2001年)

² 1996年12月2日発、委員会指導 96/77/EC (EC公式議事録、L339, 39巻、1996年12月30日、1頁)

³ 連邦規格の規約21、§172.155

⁴ USP XXII, 919頁；ナタマイシン／公式研究論文集

⁵ DSM 社 (旧 Gist - brocades Co., Ltd.)

⁶ 第4版 フード・ケミカル・コーデックス

⁷ 第十四改正 日本薬局方 第一追補

III 有効性

1. 有効性の試験⁹⁾

ポリエン抗生物質は、細胞膜のステロール（特にエルゴステロールは関係が深い）との間に相互作用し、Membrane Polyene Complex（メンブレイン-ポリエン複合体）を形成し、細胞膜に歪みを生じせしめ、膜機能に欠陥が現れ細胞内の原形質成分（Essencial Metabolites）が漏出してしまいうため、生育阻害となると理解されている。ただし、細菌はその細胞膜にステロールを含有しないのでポリエン系抗生物質の相互作用を受けることはなく、かび及び酵母のみが特異的に生育阻害を受ける。

表1に主なかび及び酵母に対するナタマイシンの最小阻止濃度（MIC）をもって示す。

表1 ナタマイシンのかび及び酵母への効果（ソルビン酸対比）

	最小阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	
	ナタマイシン	ソルビン酸
<i>Absidia glauca</i> , var. <i>paradoxa</i> 4007	10	—
<i>Absidia</i> sp.	5	500
<i>Alternaria</i> sp.	2.5	500
<i>Aspergillus chevalieri</i> 4258	0.63	—
<i>Aspergillus clavatus</i>	0.1 - 0.5	500 - 750
<i>Aspergillus columnaris</i>	50	—
<i>Aspergillus fischeri</i>	10	—
<i>Aspergillus flavofurcatis</i>	50	—
<i>Aspergillus effusus</i>	10	—
<i>Aspergillus flavus</i> 4053	40	200 - 1,300
<i>Aspergillus flavus</i> CBS 3105	6	
<i>Aspergillus flavus</i> BB 67	4.5	
<i>Aspergillus flavus</i> Madagascar	5	
<i>Aspergillus flavus</i> Port Lamy	5	
<i>Aspergillus flavus</i> Gabon I	5	
<i>Aspergillus flavus</i> Museum	50	2,000
<i>Aspergillus flavus</i> entomophaga I	10	
<i>Aspergillus flavus</i> entomophaga	10	
<i>Aspergillus flavus</i> Batista II	10	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.2 - 20	
<i>Aspergillus fumigatus</i> 4010	5	—
<i>Aspergillus fumigatus</i> E.1940	0.5	
<i>Aspergillus fumigatus</i> L.C.	0.1	
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	

	最小阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	
	ナタマイシン	ソルビン酸
<i>Aspergillus niger</i>	1 - 1.8	} 250 - 2,000
<i>Aspergillus niger</i> 4066	5	
<i>Aspergillus ochraceus</i> 4069	2.5	500 - 1,000
<i>Aspergillus oryzae</i>	10	} 10 - 500
<i>Aspergillus oryzae</i> 4075	20	
<i>Aspergillus parasiticus</i>	50	-
<i>Aspergillus parasiticus</i> P	6	-
<i>Aspergillus parasiticus</i> spaere 39 D	2.3	-
<i>Aspergillus spec. br. 5</i>	4.5	-
<i>Aspergillus sojae</i> , var. <i>gymnosardae</i> 4294	20 - 40	-
<i>Aspergillus sulphureus</i> 4299	5	-
<i>Aspergillus tamarii</i> 4099	20 - 40	-
<i>Aspergillus terreus</i>	5	>1,000
<i>Aspergillus ustus</i>	10	500
<i>Aspergillus versicolor</i>	5	500 - 1,000
<i>Aspergillus wentii</i>	5	250
<i>Aspergillus zonatus</i>	0.5	-
<i>Botrytis cinerea</i>	1 - 25	120 - 500
<i>Botryotinia fuckeliana</i> 5365	2.5	-
<i>Candida albicans</i>	1.5 - 20	300 - 1,400
<i>Candida parapsilosis</i>	5	100 - 600
<i>Candida tropicalis</i>	3 - 12	60 - 2,000
<i>Candida utilis</i> 0396	5	300 - 500
<i>Chaetomium globosum</i>	25	100 - 1,000
<i>Ceratocytis ulmi</i>	10 - 25	-
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	0.9	-
<i>Cladosporium herbarum</i>	2.5	80 - 3,000
<i>Cladosporium fulvum</i>	2.5	-
<i>Coccidioides immitis</i>	2.5 - 25	-
<i>Corynespora melonis</i>	10	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> (<i>Blastomyces neof.</i>)	5 - 10	<1,000
<i>Cylindrocarpon sp.</i>	10	-
<i>Epidermophyton floccosum</i>	12	-
<i>Fusarium sp.</i>	10	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	25	700
<i>Glenospora graphii</i>	3	-
<i>Gloeosporium album</i>	2.5	-
<i>Gloeosporium perennans</i>	2.5	-
<i>Geotrichum candidum</i> "4597	10	-
<i>Hansenula anomala</i> 0122	5	200 - 1,000
<i>Histoplasma capsulatum</i>	3	-

	最小阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	
	ナタマイシン	ソルビン酸
<i>Hormodendrum compactum</i>	6	250
<i>Microsporum lanosum</i>	12	-
<i>Monascus anka</i> IFO 4478	2.5	-
<i>Mucor hiemalis</i> "5303	2.5	-
<i>Mucor mucedo</i>	1.2 - 5	500
<i>Mucor racemosus</i> "5403	2.5	100 - 1,000
<i>Neurospora sitophila</i> 4596	10	60 - 125
<i>Oidium lactis</i>	10	500 - 1,000
<i>Paecilomyces</i> sp.	2.5	500
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.6 - 1.3	250 - 2,000
<i>Penicillium digitatum</i> , var. <i>latum</i> 5747	2.5	-
<i>Penicillium digitatum</i>	5	200 - 500
<i>Penicillium expansum</i>	5	100 - 7,000
<i>Penicillium expansum</i> 5854	2.5	-
<i>Penicillium fusiculosum</i> 5857	10	500
<i>Penicillium islandicum</i>	1.1	-
<i>Penicillium martensii</i>	<0.6	500 - 1,000
<i>Penicillium notatum</i> 4640	5	250 - 2,000
<i>Penicillium roqueforti</i> , var. <i>punctatum</i> 6018	10	250 - 1,200
<i>Penicillium</i> sp.	5	-
<i>Penicillium velutinum</i> 6064	5	1,000
<i>Phialophora cinerescens</i>	5	-
<i>Phytophthora cactorum</i>	100	-
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	100	-
<i>Pichia membranaefaciens</i> 0128	2.5	250 - 1,000
<i>Pityrosporum</i> sp.	12	-
<i>Podospora setosa</i>	25	-
<i>Pythium</i> sp.	150 - 300	-
<i>Rhizopus javanicus</i> 5441	10	200
<i>Rhizopus nigricans</i> 4781	2.5	120 - 2,000
<i>Rhizopus oryzae</i> 4758	10	-
<i>Rhizopus</i> sp.	5	-
<i>Rhodotorula gracilis</i>	5	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 0021	2.5	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , var. <i>ellipsoideus</i> 0205	2.5	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sp.	1 - 5	24 - 1,200
<i>Saccharomyces ludwigii</i> 0339	2.5	500 - 1,000
<i>Saccharomyces rouxii</i> 0562	5	250 - 1,000
<i>Saccharomyces sake</i> 0305	5	-
<i>Sclerotinia fructicola</i>	1	500
<i>Sporotrichum schenkii</i>	12	-
<i>Stemphylium consortiale</i>	25	-
<i>Stereum purpureum</i>	1.2	-
<i>Stromatinia gladioli</i>	10 - 25	-
<i>Thielaviopsis</i> sp.	25	-

	最小阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	
	ナタマイシン	ソルビン酸
<i>Trichocladium asperum</i>	10	—
<i>Trichoderma</i> sp.	1.2	500 – 1,000
<i>Trichophyton concentricum</i>	6 – 50	—
<i>Trichophyton gallinae</i>	25	—
<i>Trichophyton gypsum</i>	25	100
<i>Trichophyton interdigitale</i>	25 – 100	750 – 800
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	50 – 100	<1,000
<i>Trichophyton rosaceum</i>	12	—
<i>Trichophyton rubrum</i>	12 – 50	—
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	6	—
<i>Trichophyton sulfureum</i>	3	—
<i>Trichophyton violaceum</i>	12	—
<i>Trichophyton verrucosum</i>	>50	—
<i>Trichosporon cutaneum</i>	12	—
<i>Torulaspora rosei</i>	10	—
<i>Verticillium cinnabarinum</i>	50	5,000
<i>Verticillium dahliae</i>	1.2	—
<i>Zygosaccharomyces barkeri</i>	1	500
<i>Zygosaccharomyces major</i> 0533	2.5	600