

## ナイシンに関する資料概要

社団法人 日本乳業協会  
ダニスコジャパン株式会社  
三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

## 資料概要目次

1. 本要請の目的と必要性	1
2. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料	2
(1) 起源又は発見の経緯	2
(2) 外国における使用状況	2
1) JECFAでの評価	
2) 国際食品添加物規格委員会（CCFAC）での評価	
3) 米国における使用状況	
4) 欧州における使用状況	
3. 物理化学的性質及び成分規格に関する資料	7
(1) 名称	7
(2) 構造式	7
(3) 分子量	7
(4) 含量規格	7
(5) 製造方法	7
(6) 性状	8
(7) 確認試験	8
(8) 示性値	8
(9) 純度試験	8
(10) 乾燥減量	9
(11) 強熱残分	9
(12) 定量法	9
(13) ナイシンの安定性	12
(14) 食品中のナイシンの分析法	13
(15) 成分規格案の設定根拠	14
1) 成分規格案及び設定根拠	
2) 成分規格案と他の規格との対比表	
3) 成分規格案による実測値	
4. 有効性に関する資料	22
(1) 欧米における有効性の経緯	25
(2) ナイシンの有効性	25
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	25
液状卵に対するナイシンの保存効果	28

低温殺菌豆腐に対する腐敗抑制効果	32
味噌へのスターターカルチャーとしてのナイシン生産菌の利用	34
(3) 食品中の栄養成分に及ぼす影響	36
5. 安全性に関する資料	37
(1) 毒性に関する資料	40
1) 急性毒性試験	
2) 亜急性毒性試験	
① ラットにおける7日間強制経口投与（精製ナイシン）	
② ラットにおける28日間強制経口投与（精製ナイシン）	
③ イヌにおける最大耐量（MTD）/7日間固定用量（精製ナイシン）	
④ イヌにおける28日間強制経口投与（精製ナイシン）	
3) 亜慢性毒性試験	
① 12週間ラット混餌投与試験	
② 12週間ラット混餌投与試験	
③ ラットにおける90日間試験	
④ ラットにおける10週間/25週間試験（ナイシン加水分解物）	
⑤ マウスにおける2ヶ月間試験	
⑥ マウスにおける3ヶ月間試験	
⑦ 非げっ歯類を用いた亜慢性毒性試験	
4) 慢性毒性試験	
① ラットにおける18ヶ月間試験	
② ラットにおける2年間反復投与毒性試験/繁殖試験	
③ 非げっ歯類を用いた慢性毒性試験	
5) 繁殖試験	
6) 発がん性試験	
7) 変異原性試験	
① 微生物を用いる突然変異試験	
② マウスリンパ腫試験	
③ <i>In vitro</i> で培養したヒトリンパ球の分裂中期染色体解析（metaphase chromosome analysis）	
④ マウス骨髄における小核誘発試験	
8) 抗原性試験	
9) 一般薬理試験	
(2) 体内動態に関する資料	58
(3) 交差耐性に関する資料	62
(4) ナイシン様抗菌性物質酸性菌のウシ及びヒトにおける存在	66
(5) 使用の歴史	66
(6) 食品添加物の1日摂取量に関する資料	67

- 1) 1日摂取量の推計
- 2) 1日摂取許容量 (ADI) との比較

6. 使用基準案に関する資料 .....	69
7. 参考資料 .....	70

## 1. 本要請の目的と必要性

ナイシンは 2002 年 7 月 26 日開催の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会で了承された「国際的に安全性が確認され、かつ、汎用されている未指定添加物」である。

海外におけるナイシンの適用食品群は GSFA 案 (Draft Codex General Standard for Food Additives) に記載されているが、これらの用途以外にも液状卵および液状卵製品に及んでいる。

日本においては、豆腐へのナイシン添加、豆味噌、米味噌、米麴へのスターターカルチャーとしてナイシン生産菌の利用が検討されており、これら日本独自の食品への新規保存料ナイシンの使用が望まれている。

ナイシンは熱処理食品の抗菌性保存料として特に有用であり、*Bacillus* 属と *Clostridium* 属を含むグラム陽性菌の熱処理後の芽胞の発芽後生育を低濃度で非常に効果的に阻害して様々な食品の微生物による腐敗を防止する。特に *Clostridium botulinum* 芽胞の発芽後増殖と毒素生成を阻害する点で独特な抗菌性保存料である。特定の食品はその特性ゆえ完全に殺菌することができないため、製造過程で低温殺菌しか行われぬが、ナイシンはこのような食品の保存に役立つ。

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* subsp. *Lactis*) が生産する 34 個のアミノ酸から成るペプチドで、消化酵素により容易に分解される。

安全性については JECFA で評価されており、現在、50 ヶ国以上で保存料として使用されている。なお、ナイシンは頻用される医療用抗生物質の標的となる病原微生物に交差耐性をつけることはないことが確認されている。ナイシン様抗菌性物質産生菌は、頻度は低いが、ヒト腸内に常在していることから、消化を免れたナイシンが腸にまで到達したとしても、腸内細菌叢のバランスが崩れる可能性は低いと考えられる。

以上より、安全性が高く国際的に頻用されているナイシンを、チーズ、液状卵及び液状卵製品、豆腐、味噌・米麴等の保存料用途に使用する許可を要請する。

## 2. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料

### (1) 起源又は発見の経緯

1928年英国において、チーズ製造中にスターターカルチャー (*Lactobacillus bulgaricus*) の増殖が阻害されるという問題が起こり、*lactic streptococci* が細菌増殖を阻害していることがわかった。その後も同様の知見は続き、第2次世界大戦中には *lactic streptococci* の分泌性阻害タンパク質が単離され、チーズ製造工程の問題解決ではなく、医学および獣医学においての有効利用を目的として試験された。1947年、Mattick と Hirsch は産生菌及び阻害タンパク質の性状解析を行い、産生菌がランスフィールドのN群に属する *Streptococcus lactis*<sup>\*1</sup> であることを発見し、“Group N Inhibitory Substance” に、抗生物質に一般的に使用される語尾“-in”を付けて「Nisin」と名付けた(1)。

Nisin は1953年以降、チーズおよびチーズ製品などのさまざまな食品における抗菌保存料として試験的に使用され、1960年以降、Nisin が商業的に使用されるようになった(2)。

### (2) 外国における使用状況

ナイシンは食品に使用できるバクテリオシンであり、保存料として、アメリカ、イギリス、イタリアを始め世界50ヶ国以上でチーズ、乳製品、缶詰等々に使用されており、イギリスなど最大使用量に制限がない国もある(3)。

#### 1) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会、JECFA) での評価

ナイシンは第12回(1968年)JECFA会議にて評価された。生物学的データとして直接的生物学的効果、急性毒性、短期試験(12週間)、長期試験(2年間)、抗原性試験、交差耐性の結果が提出され、評価された(4)。

2年間の反復投与試験の結果より、無毒性量は3,330,000 U/kg体重とされ、ADIは0-33,000 U/kg体重と設定されている<sup>\*2</sup>。

#### 2) 国際食品規格委員会食品添加物汚染物質部会(Codex Committee on Food Additives and Contaminants; CCFAC)での評価

CCFACが作成する「コーデックス食品添加物一般基準案(Draft Codex General Standard for Food Additives, GSFA案)」におけるナイシンの食品カテゴリー表の最新案は以下であり、第36回CCFACで討議される予定である(5)。

<sup>\*1</sup> 核酸プローブを用いた連鎖球菌に関する研究に従い、1985年、3つの属が定義された。この提案の結果、乳由来連鎖球菌(Dairy Streptococci)はラクトコッカス属に分類され、*Streptococcus lactis*は*Lactococcus lactis*と同一となった。

<sup>\*2</sup> 要請者注；JECFAはラットを用いた2年間の毒性試験の結果よりADIを0-33,000 U/kg b.w.と設定したが、文献原文より33,000 U/kgは飼料中濃度である。

## Draft GSFA (35th CCFAC)

ナイシン INS:234

機能：保存料

食品 カテゴリ No.	食品カテゴリー	最大使用量	Step
01.0	乳製品類、但し、区分 02.0 の製品類を除く	500 mg/kg <sup>1</sup>	3
01.4.3	凝固乳	10 mg/kg	6
01.6.1	未熟成チーズ	12.5 mg/kg	6
01.6.2	熟成チーズ	12.5 mg/kg	6
01.6.3	ホエイチーズ	12.5 mg/kg	6
01.6.4	プロセスチーズ	250 mg/kg <sup>1</sup>	6
01.6.5	チーズと同類のもの	12.5 mg/kg	6
01.6.6	ホエイ蛋白チーズ	12.5 mg/kg	6
04.2.2.4	缶詰又は瓶詰め(殺菌済みの)又はレトルトパウチ包装の野菜類(キノコ類、根菜類及び塊茎類、大豆等の豆類及び豆果、アロエ、海藻) <sup>2</sup>	GMP	6
06.5	シリアル及び澱粉を主原料とするデザート類(例：ライスペディング、タピオカプディング) <sup>3</sup>	3 mg/kg	6
07.2	装飾をしたパン製品類 <sup>4</sup>	250 mg/kg <sup>1</sup>	6
08.0	食肉及び食肉製品類、家禽及び狩猟動物肉を含む <sup>5</sup>	500 mg/kg <sup>1</sup>	3
12.5.1	即席スープ類及びだし汁類、缶詰、瓶詰め及び冷凍品を含む	GMP	6
12.9	タンパク質製品類 <sup>6</sup>	200 mg/kg <sup>1</sup>	3

1 最大使用量がナイシン製剤量として表記されている。

2 マッシュルーム、ジャガイモ、トマト、ヤングコーン、タケノコ等の様々な加熱処理野菜が該当する。

3 典型的な製品は、英国の Unilever Bestfoods 社の Ambrosia ブランドの製品“canned Semolina”で、これはセモリナ澱粉を主原料とする牛乳で調理されたデザートである。

4 典型的な適用は、オーストラリアおよびニュージーランドのクランペット(薄いパン製品)

5 ソーセージ類等が該当する。

6 小麦グルテン製品、大豆タンパク製品(豆腐、大豆飲料等)を含む様々な食品に関係している。

### 3) 米国における使用状況

ナイシンは、「Nisin preparation」として 21 Code of Federal Regulations (米国連邦規則集、CFR、2002年) § 184.1538 に記載されており、GRAS と確認された物質として、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、果物、野菜もしくは肉類入り低温殺菌チーズスプレッド、低温殺菌チーズスプレッドおよび果物、野菜もしくは肉類入り低温殺菌チーズスプレッドに抗菌剤として使用されている (6)。

1994年には、Aplin&Barrett Ltd.社 (現ダニスコ・グループ会社) による液状卵、卵白、卵黄およびこれらの混合製品に対するナイシン使用の GRAS 申請 (7) が、1995年には同社によるソースおよびサラダ用ドレッシングに対するナイシン使用の GRAS 申請が認定された (8)。2000年には Rhodia 社が、フランクフルトのケーシング (casing) に添加量 6.9 mg/kg、調理済み肉および料理済みの家禽類製品に添加量 5.5 mg/kg で抗菌剤として使用する場合において、ナイシンが GRAS であることを告知しており、2001年4月には FDA がその告知を了承している (9)。

#### <21 CFR §184.1538> ナイシン製剤 (nisin preparation)

(a) ナイシン製剤は、*Streptococcus lactis* Lancefield Group N の特定株の純粋培養発酵に由来する。ナイシン製剤は、抗生物活性をもつ一群の関連ペプチドであるナイシン (CAS Reg. No. 1414-45-5) を含有する。

(b) 本成分は、濃縮物もしくは乾燥物で、“Specifications for Identity and purity of Some Antibiotics”, World Health Organization, FAO Nutrition Meeting Report Series, No. 45A, 1969 の記述に従って試験した場合、以下の規格に適合する。上記はここに言及することにより、本連邦規則の一部となる。資料コピーは、食品医薬品局認可証管理部門 (HFA-305) (rm. 1-23, 12420 Parklawn Dr., Rockville, MD 20857) から入手でき、または米国官報発行所 (1100 L St. NW., suite 700, Washington, DC 20408) で閲覧できる。

- (1) ナイシン含量、900 IU/mg以上
  - (2) ヒ素、1 ppm以下
  - (3) 鉛、2 ppm以下
  - (4) 亜鉛、25 ppm以下
  - (5) 銅 (亜鉛と銅と加算して)、50 ppm 以下
  - (6) 総平板培養菌数、10 個/g以下
  - (7) 大腸菌、10 g中認めない
  - (8) サルモネラ菌、10 g中認めない
  - (9) コアグラウゼ陽性ブドウ球菌、10 g中認めない
- (c) 本成分は、本章 § 170.3(o)(2) に定める抗微生物剤として、本章 § 133.175 に記載する、低温殺菌チーズスプレッドおよび低温殺菌プロセスチーズスプレッド、§ 133.176 に定める果物、野菜もしくは肉類入り低温殺菌チーズスプレッド、§ 133.179 に定める低温殺菌チーズスプレッド、§ 133.180 に定める果物、野菜もしくは肉類入り低温殺菌チーズスプレッドに、ボツリヌス菌芽胞の増殖や毒素の生成を阻害するために使用される。
- (d) 本成分は、本章 § 184.1(b)(1) に従って、GMP を超えない量で使用される。現行 GMP レ



ベルとは、British Standard Institution Methods である “Methods for the Estimation and Differentiation of Nisin in Processed Cheese”, BS 4020 (1974)に従って測定した場合に、最終製品中のナイシン濃度が最大で 250 ppm となるような量のことである。上記の方法はここに言及することにより本連邦規則の一部となる。資料のコピーは、食品医薬品局認可証管理部門(HFA-305) (rm. 1-23,12420 Parklawn Dr., Rockville, MD 20857) から入手でき、又は米国官報発行所 (1100 L Street NW., suite 700 Washington, DC 20408)にて閲覧できる。

[53 FR 11250、1988 年 4 月 6 日、59 FR 14364、1994 年 3 月 28 日改正]

#### <ADI の設定>

FDA は、1984 年にラットにおける長期投与試験 (10) に基づきナイシンの ADI を 2.9 mg/ヒト/日と算出している (2)。

設定の根拠 (11) :

Frazer らの報告で、最高用量 (196,000 IU/kg 体重、4.9 mg/kg 体重相当) において決定的な影響はなかったため、DT (Division of Toxicology) は本値 (=4.9 mg/kg 体重; 要請者注) を NOAEL として用いることを適当とみなし、100 倍の安全係数を適用した。これによって、60 kg のヒトでの ADI を 2.94 mg/ヒト/日とされる。

#### 4) 欧州における使用状況

欧州において、ナイシンは食品添加物 (用途: 保存料) として、一部の食品への使用が認められており、その使用基準が理事会指令 No 95/2/EC に収載されている (12)。使用基準は下記のとおりである。

付属書Ⅲ 条件付で許可される保存料と酸化防止剤、Part C その他の保存料

E234 ナイシン\*

食品	最大使用量
セモリナプディング、タピオカプディング及びその同類食品	3 mg/kg
熟成チーズ、プロセスチーズ	12.5 mg/kg
クロテッドクリーム	10 mg/kg
マスカルポーネ	10 mg/kg

\* 本物質は、発酵工程の結果として、ある種チーズの中に天然に存在することがある。

#### <ADI の設定>

欧州の食品科学委員会 (Scientific Committee for Food) が、1992 年に報告書を公表した (13)。保存料としての使用について、委員会の見解が会議報告書として示されているが、ADI 設定に必要な NOAEL、安全係数は発表されていない。報告書の該当箇所を以下に示す。