

本物質は、低温殺菌食品における微生物の芽胞形成阻害において有用な抗微生物物質のポリペプチドである。委員会は、ラットおよびマウスの急性毒性、亜急性および長期試験、ラットの繁殖試験について、JECFA が 1968 年にレビューした資料を入手した。委員会はさらに、*in vitro* および *in vivo* の変異原性試験だけでなく繁殖試験、生殖毒性試験についてもレビューした。遺伝毒性およ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。近年の繁殖試験に基づき、委員会は 40,000 units/g の活性を示すナイシン製品について、ADI を 0.13 mg/kg 体重と設定した。

[要請者の試算]

SCF では ADI 設定に必要な繁殖試験の NOAEL、安全係数を発表していない。繁殖試験では、ナイシン製剤を 0、0.2、1.0、5.0% 混餌投与しており、F0 世代で摂餌量および体重の両方のデータが示されている最も長期の投与期間は 9 週間である。F0 の雄 5.0% 群で体重増加抑制がみられたことから、1.0% 群について、より体重の重い雄の 9 週時のデータから、ナイシンの摂取量を以下の通りに試算した。

添付資料5-11(ラット繁殖試験), Table 4A (p.41) および Table 6A (p.47) より

9週時における、雄・中用量群(1.0%)のデータ

摂餌量	182 g/rat/week
体重	506 g

↓
 $182 \text{ g}/7 \text{ 日}/0.506 \text{ kg} =$
 $51.38 \text{ g diet/kg/day}$

1.0% ナイシン製剤 (10^6 IU/g) 混餌
 $0.5138 \text{ g Nisaplin/kg/day}$

精製ナイシン (活性40倍とした時)
 $0.01285 \text{ g Nisin/kg/day}$

→ ADI は 0.13 mg/kg/day (安全係数100の時)

3. 物理化学的性質及び成分規格に関する資料

JECFA 食品添加物規格 (1)、米国食品添加物公定書 (2) を参考に作成した。

1) 名称

名称：ナイシン

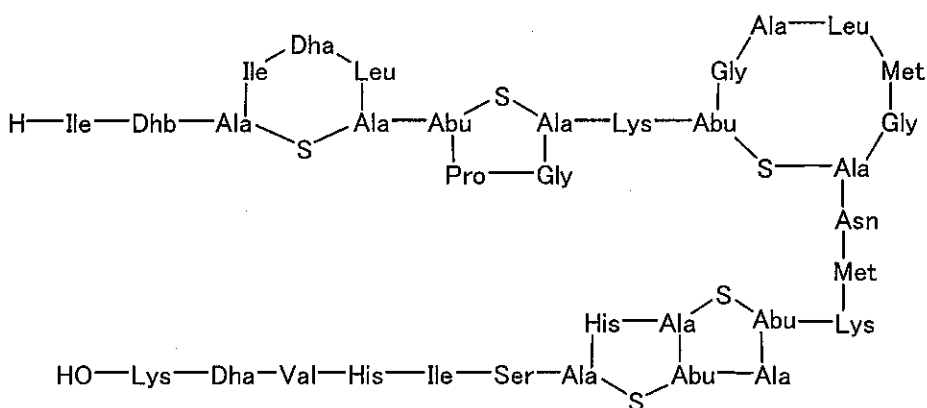
別名：ナイシンA

英名：Nisin

INS 番号：234

CAS 番号：1414-45-5

2) 構造式



Abu = α -アミノ酪酸

Dha = デヒドロアラニン

Dhb = デヒドロブチリン

化学式： $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$

3) 分子量

3354.12

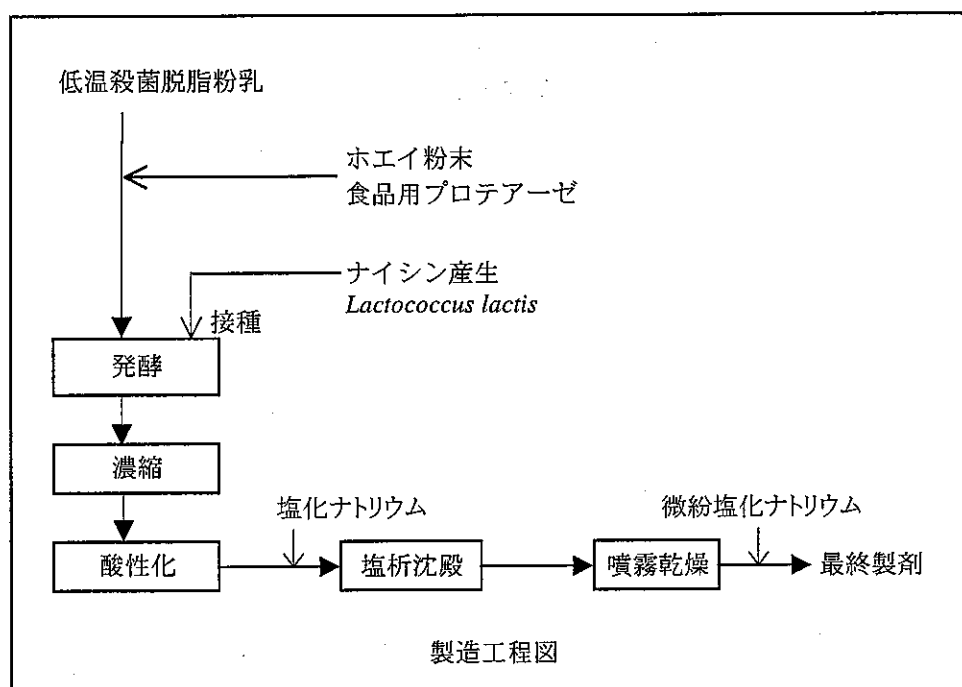
4) 含量規格

本品は、1 mg 当たり 900IU 以上のナイシン ($C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7=3354.12$) を含む。

5) 製造方法⁽³⁾

抗菌剤の入っていない低温殺菌脱脂粉乳を 10℃以下で一晩保存し、少量のホエイ粉末と食品用プロテアーゼを混合し、カゼインを酵素的に分解する。この発酵培地を pH と温度を調整した滅菌済みステンレス製発酵用タンクに入れる。培地にナイシンを産生する *Lactococcus lactis* の純粋培養菌を接種し、ナイシンが産生される至適条件となるまでの数時間、pH と温度を調整した条件の下で維持する。発酵中に生じる乳酸は、滅菌済みの石灰ス

ラリーで中和する。産生されたナイシンを濃縮し、安定化するため酸性とし、塩化ナトリウムで塩析する。沈殿中のナイシン（培地脱脂粉乳由来の残余タンパク性物質を含む）を噴霧乾燥する。噴霧乾燥したナイシンを微粉塩化ナトリウムと混合し、ナイシン製剤とする。



6) 性状

本品は、白色～淡黄白色の粉末で、においがいいか又はわずかに特異なにおいがある。

7) 確認試験

滅菌したミルク中で *Lactococcus lactis* (NCIB 8586) を 30℃、18 時間培養し、試験菌液として用いる。リトマスミルク*を 100ml 含むフラスコを 121℃、15 分の条件下で滅菌する。滅菌したリトマスミルクに本品 0.1g を加え、室温にて 2 時間静置する。この液に試験菌液を 0.1ml 加え、30℃、24 時間培養したとき *Lactococcus lactis* の生育を認める。

8) 示性値

JECFA 規格および FCC 規格では設定されていない。

9) 純度試験

① 重金属

Pb として 2 μg/g 以下 (10 g、第 2 法、比較液 鉛標準液 2 ml)

* リトマスミルク：リトマスを含むスキムミルク培地であり、乳酸菌の種類（属、種）によって、生育結果が酸性化、脱色、凝固、液化の 4 段階となる。

② ヒ素

As₂O₃として2 μg/g以下 (1g、第3法、装置B)

10) 乾燥減量

3.0%以下 (105℃、2時間)

11) 強熱残分

ナイシン製剤には、塩化ナトリウムが多く含まれているため、JECFA および FCC 規格において設定されていない。5 ロットの実測値の結果は下記のとおりである (4)。

製造バッチ-製造日	1	2	3	平均	標準偏差
ZKS 2003/2/2	83.08	83.08	83.05	83.07	0.017
JPU 2003/4/2	84.08	84.10	84.12	84.10	0.020
DHE 2003/8/2	78.03	78.00	78.00	78.01	0.017
TSV 2003/10/2	79.53	79.54	79.54	79.54	0.006
DOX 2003/12/2	85.21	85.20	85.23	85.21	0.015
	最小値 78.00 最大値 85.23			ロット間平均値 81.99	ロット間標準 偏差 2.85

12) 定量法

穿孔平板法

本法は、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方法である。

本法で使用する水、生理食塩液、緩衝液、試薬・試液および計器・器具は、必要ならば滅菌したものを用いる。

1. 使用菌株

Micrococcus luteus ATCC10240、NCIB8166

試験菌移植用寒天培地のスラントにより *Micrococcus luteus* (ATCC10240、NCIB8166) を培養する (30℃、48時間)。準備したスラントで4℃にて最大14日間保存することができる。使用するときは、スラント上に生えた菌を滅菌した生理食塩水に懸濁させる。

2. 培地

培地の成分として単にペプトンと記載してある場合は、肉製ペプトン又はカゼイン製ペプトンのいずれを用いてもよい。培地の pH は水酸化ナトリウム試液又は1 mol/l 塩酸試液を用いて調製し、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) 基層用及び種層用寒天培地

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	1000 ml

全成分を混和し、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 Tween 20 50% 溶液を 2 ml 添加する。

Tween 20 50% 溶液の調製： Tween 20 (polyoxyethylene(20) sorbitan monolaurate) と滅菌水を
一対一で混合し、滅菌する。

(2) 試験菌移植用寒天培地

Brain Heart Digest	17.5 g
ペプトン	10 g
塩化ナトリウム	5 g
ブドウ糖	2 g
リン酸一水素ナトリウム	2.5 g
寒天	15 g
水	1000 ml

全成分を混和し、滅菌する。滅菌後の pH は 7.2~7.6 とする。

3. 基層寒天平板の調製

48~51℃ に保った種層用寒天培地に標準溶液により明瞭でかつ適当な大きさの阻止円を形成する量の試験菌液を加え、十分に混合し、種層寒天培地とする。

ペトリ皿の場合は種層寒天培地約 20 ml を、大型皿の場合は培地の厚さが 2~3 mm となるように種層寒天培地を入れ、寒天が水平になるように広げて基層寒天平板とする。

4. 種層寒天平板の調製

48~51℃ に保った種層用寒天培地に標準溶液により明瞭でかつ適当な大きさの阻止円を形成する量の試験菌液を加え、十分に混合し、種層寒天培地とする。

5. 穿孔寒天平板の調製

基層寒天平板上の半径約 25~28 mm の円周上に、等間隔になるように 4 個の円筒（ペニシリンカップ）を置く。円筒（ペニシリンカップ）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、円筒（ペニシリンカップ）を静かに抜き穿孔寒天平板とする。

円筒（ペニシリンカップ）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。

6. 操作法

1) ナイシン標準溶液

定量用ナイシン製剤（Nisaplin スタANDARD : WHO）100 mg を 0.02 N 塩酸溶液（濾過＜0.2 μm＞滅菌済み）80 ml に懸濁する。2 時間室温に置き、0.02N 塩酸溶液 100 ml に最終調製（100 mg/100 ml）する。これをナイシン標準原液（1000 IU/ml）とする。0.02 N 塩酸溶液を用いて 1.25、2.5、5.0、10.0、20.0（IU/ml）のナイシン標準溶液になるように希釈する。希釈溶液は用時調製する。

2) 標準曲線の準備

生理食塩水を用いて、1 対 10 の割合で使用菌株溶液を希釈する。十分攪拌した後、48℃に保った培地 100 ml に作成した希釈溶液 2 ml を添加する（2%）。この菌を接種した培地をシャーレ（φ90×20）に 20 ml 注ぎ、固化させる。室温にて固化させた培地上に、円筒（ペニシリンカップ）（4 個/1 シャーレ）を孔の中心間の距離が 30 mm 以上となるように一定間隔で並べる。円筒（ペニシリンカップ）を並べた状態で、さらに菌を接種した培地 20 ml を注ぎ、固化させる。固化後、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カップを取り出す。

1.25、2.5、5.0、10.0、20.0（IU/ml）の範囲のナイシン標準溶液 0.2 ml を穴の中に入れる。各濃度について、異なったシャーレの 4 箇所の穴に入れる（N=4）。

標準溶液分注後、プレートに蓋をし、30℃にて 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 単位で阻害された領域の測定を行う。

阻止円の直径（mm）に対してナイシン濃度（IU/ml）をプロットし、ナイシン標準曲線とする。

3) ナイシン濃度測定

試験サンプル（ナイシン）100 mg を 0.02 N 塩酸溶液（濾過＜0.2 μm＞滅菌済み）80 ml に懸濁する。2 時間室温に置き、0.02N 塩酸溶液 100 ml に最終調製（100 mg/100 ml）する。これを試験サンプル溶液（1000 IU/ml）とする。

0.02N 塩酸溶液を用いて 5.0 IU/ml の試験サンプル溶液になるように希釈し、標準曲線の作成の手法に従い阻止円の測定を行う。希釈液は毎回測定のたびに作製する。

また、阻止円の測定に於いて標準サンプルおよび試験サンプル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ナイシン含量（IU/mg）を求める。

7. 力価の計算法

標準溶液より導いた標準曲線（ $y = \alpha \ln(X) + \beta$ ）より、試料溶液中の力価を求める。

$$\text{力価} = \text{EXP} \left((\text{阻止円直径} - \beta) / \alpha \right)$$

$$\text{ナイシン含量 (IU/mg)} = \text{力価} / 5 \times 1000$$

13) ナイシンの安定性

濃縮ナイシンは室温で安定である。精製ナイシンも濃縮ナイシンも酸性状態では加熱しても安定で、121°Cの場合 pH2.0 では 30 分、pH3.0 では 15 分安定である。pH をこれより高くした場合、ナイシンは不安定である。すなわち緩衝液中 121°C で 15 分加熱した場合、活性は pH4.0 で 29%、pH5.0 で 69%、pH6 で 86%、pH7.0 で 99.7%が失われる (1)。

食品中において、ナイシンは酸性下で最も安定である。pH2の溶液においては、2~7°Cの温度で長期間にわたり安定で、活性を消失させずに121°Cの熱処理に耐えうる事ができる。アルカリ性下では、即座に活性は低下し、pH11、63°Cで30分で消失する (5)。

ナイシン製剤を4~55°Cの様々な温度で1年間保存し、3ヶ月毎に含量を測定した (5)。その結果、ナイシンは22°C未満の温度での保存条件下において少なくとも1年間は安定であることが示された (下表)。

表：様々な温度で保存した製剤中のナイシン含量の経時変化* (%)

保存期間	4°C	22°C	30°C	35°C	55°C
3ヶ月	100	100	81.8	72.7	8.2
6ヶ月	100	100	79.0	60.0	3.6
9ヶ月	100	100	78.1	40.0	0.9
12ヶ月	100	99.5	78.1	22.7	0.4

* 安定性試験開始時のナイシン含量を100とした

* 荷姿：密封性の1kgポリエチレンビン

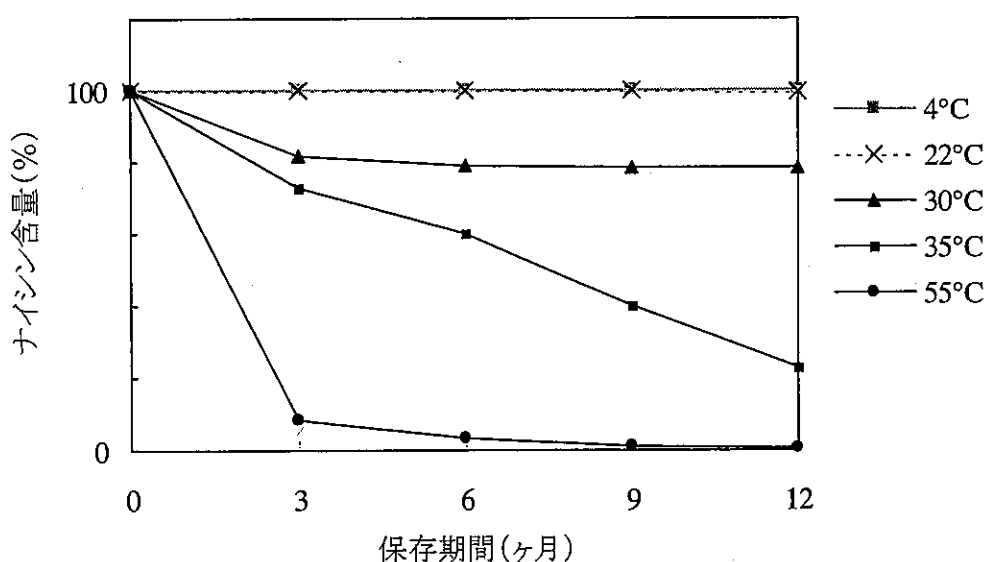


図. 様々な温度で保存した製剤中のナイシン含量

14) 食品中のナイシンの分析法

ナイシンの定量法には、被験細菌として*Micrococcus luteus*を利用するプレート拡散分析法が最もよく用いられている。この方法は、ナイシンの力価を測定することを目的としており、JECFA報告ならびにFowlerらの方法(6)に基づくものである。

食品中のナイシン含量は、このプレート拡散法(JECFA方法と以前の英国規格(British Standard) BS 4020分析法に基づいた方法)で測定する(7)。本法では、ナイシンの力価をAplin & Barrett 標準品(ナイシン 1.0×10^6 IU/gを含有)と比較する。分析法を以下に簡単に記載する。

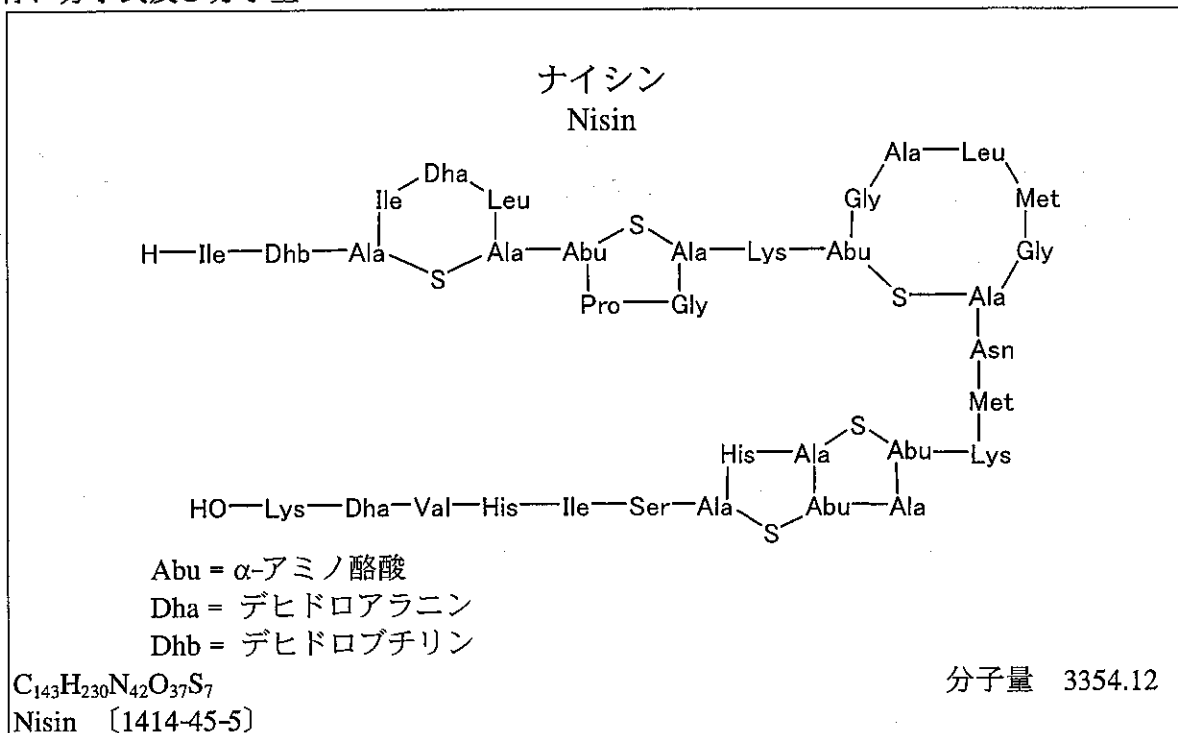
食品中ナイシンのプレート拡散分析法

食品サンプルを酸で処理し、pHを調製する(プロセスチーズについてはpH 4.0 ± 0.05 、その他の食品についてはpH 2.0 ± 0.05)。サンプルは熱処理し、2つに分割する。1つは分析用の試験サンプルである。もう1つ(対照)はアルカリ処理と熱処理を行い、ナイシンを不活性化する。対照は食品成分中の干渉物質(また他の抗菌物質)の存在を明らかにするために用い、サンプルと標準品用の希釈液として用いる。被験細菌である*Micrococcus luteus*(分類上、以前は*Micrococcus flavus*とされていた)を含む分析用プレート上に、試験サンプルおよび対照サンプルを接種する。標準ナイシン溶液のセット(概して0.5~10 IU/ml)も接種する。インキュベーション後、平均阻止円直径を測定し、標準用ナイシン溶液についてのデータから作成した標準曲線(ナイシン濃度 vs 阻止円直径)からナイシン含量を求める。

15) 成分規格案の設定根拠

① 成分規格案および設定根拠

名称、分子式及び分子量



JECFA 規格に準拠した。

定 義

本品は、*Lactococcus lactis* 菌株の培養液から得られたナイシンを主成分とし、固形無脂肪乳及び塩化ナトリウムの混合物である。

JECFA においては、Nisin で規格化されており、ランスフィールド分類 N 群に属する *Streptococcus lactis* 菌株が産生する数種の関連性が高いポリペプチド抗菌剤と塩化ナトリウム及び固形無脂肪乳の混合物として定義されている。FCC では、Nisin Preparation として規格化されており、ナイシン自体はランスフィールド分類 N 群に属する *Lactococcus lactis* 菌株が産生する数種の関連性が高いポリペプチド抗菌剤と定義し、塩化ナトリウム及び固形無脂肪乳の混合物を Nisin Preparation と定義している。

抗菌活性の本質はナイシンあることから、明確に定義する為、ポリペプチド抗菌剤ではなく、ナイシンを主成分とすると記載した。また、JECFA 及び FCC に準拠し、塩化ナトリウム及び固形無脂肪乳の混合物をナイシンと定義した。

含 量

本品は、1 mg 当たり 900 IU 以上のナイシン ($C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S=3354.12$) を含む。

JECFA 及び FCC ともに、900 IU/mg 以上と設定されている。これらの規格に準拠し、設定した。

性 状

本品は、白色～淡黄白色の粉末で、においがいいか又はわずかに特異なにおいがある。

JECFA においては白色、微粉状のスプレー乾燥粉末、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

滅菌したミルク中で *Lactococcus lactis* (NCIB 8586) を 30℃、18 時間培養し、試験菌液として用いる。リトマスミルクを 100 ml 含むフラスコを 121℃、15 分の条件下で滅菌する。滅菌したリトマスミルクに本品 0.1g を加え、室温にて 2 時間静置する。この液に試験菌液を 0.1ml 加え、30℃、24 時間培養したとき *Lactococcus lactis* の生育を認める。

JECFA 及び FCC ともに他の抗菌剤との識別を確認する為、*Lactococcus lactis* に対する耐性試験を設定している。より明確な試験方法を記載している FCC に準拠して設定した。

純度試験

(1) 重金属 Pb として 2 μ g/g 以下 (10g、第 2 法、比較液 鉛標準液 2 ml)

JECFA では Pb として 2 mg/kg 以下、FCC では鉛で 2 mg/kg 以下と設定されている。JECFA に準拠し、設定した。

(2) ヒ素 As_2O_3 として 2 μ g/g 以下 (1g、第 3 法、装置 B)

JECFA では、ヒ素として 1 mg/kg で設定されているが、FCC では設定されていない。JECFA に準拠し、採用した。

乾燥減量

3.0% 以下 (105℃、2 時間)

JECFA 及び FCC 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。