

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 1:1 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 スタンドラード：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（N=4）の穴に入れる。

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。

0.02 N 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めに作製する。

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。

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

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

JECFA 及び FCC とともに、定量法は微生物学的力価試験法を行っている。JECFA では試験菌に *Streptococcus cremoris* を用い、比色法による力価測定法を採用している。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。

②本規格案、JECFA 規格、FCC 規格およびEU 規格比較表

		規格案		JECFA	FCC	EU
名称		ナイシン		Nisin	Nisin Preparation	Nisin
INS/CAS 番号		- / 1414-45-5		234 / 1414-45-5	234 / 1414-45-5	234 / -
Einecs 番号		-		-	-	215-807-5
定義	本品は、 <i>Lactococcus lactis</i> 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。	Nisin はランスフィールド分類 N 群に属する <i>Streptococcus lactis</i> 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より成る。固形無脂肪乳への塩化ナトリウム混入量を最小限 50% にした場合、Nisin 濃度は mg 当たり 900 U 以上である。力価を最大限に調整した Nisin でも mg 当たり 40,000 U の含有量である。ここでの単位は Tramer と Fowler が標準調整 Nisin に換算し再定義したものである。この単位は Berridge が報告した力価に近似している。		Description : Nisin preparation は白色の流動的 (free-flowing) 粉末であり、殺菌されたミルク培地中で、ランスフィールド分類 N 群に属する <i>Lactococcus lactis</i> 菌株が産生する関連性が高いポリペプチド抗菌剤の混合物である。発酵 broth 中のナイシンは、無菌注入、圧縮気体 (froth concentration) ; 酸性化 ; 塩析 ; 噴霧乾燥等の様々な方法により recover される。ナイシン製剤は、ナイシンと塩化ナトリウムより成り、塩化ナトリウム及び固形無脂肪乳の添加により 900 IU 以上の活性に調整される。		Nisin はランスフィールド分類 N 群に属する <i>Streptococcus lactis</i> 菌株が産生する数種の関連性が高いポリペプチドより成る
化学式		$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$		$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$	34 のアミノ酸を含み、概ね $C_{143}H_{230}O_{37}N_{42}S_7$	$C_{143}H_{228}O_{37}N_{42}S_7$
分子量		3354.12		3354.12	~3348	3354.12
含量	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。	定義に記載：固形無脂肪乳への塩化ナトリウム混入量を最小限 50% にした場合、Nisin 濃度は 900 U/mg 以上。力価を最大限に調整した Nisin でも 40,000 U/mg の含有量である。		ナイシン製剤 1 mg 当たりにナイシン 900 IU 以上を含有		ナイシン濃縮液：固形無脂肪乳への塩化ナトリウム混入量を最小限 50% にした場合、ナイシン濃度は 900 U/mg 以上である。

性状	白色～淡黄白色の粉末で、においが ないか又はわずかに特異なにおい がある	白色、微粉状のスプレー乾燥粉末であ る。濃縮ナイスンは大気温度で安定。 精製及び濃縮ナイスンは酸性下では 加熱しても安定で、121°Cの場 合 pH2.0 で 30 分、pH3.0 で 15 分安 定。pH を高くすると不安定になる。 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。	—	白色の粉末
用途	保存料	抗菌性保存料	抗菌剤	—
融点	—	なし。加熱により炭化する。	—	—
溶解性	—	40,000 U/mg を含有する精製 Nisin : 水、pH2.5 : 4.8×10^6 U/ml、 非極性溶媒には不溶 濃縮 Nisin : 変性蛋白が存在するた め水に溶かすと不透明な懸濁液を 形成するが、Nisin 成分は精製 Nisin と同じ性質を持つ。	—	—
確認試験	他の抗菌剤 との識別	試験に適合 (試験方法参照)	試験に適合 (試験方法参照)	—
純度試験	NaCl 含量	—	定義に記載 (50.0%以上)	含量に記載 (50.0%以上)
	重金属 (as Pb)	2 μ g/g 以下 (Pbとして)	2.0 ppm 以下	10 mg/kg 以下 (Pbとして)
	ヒ素	2 μ g/g 以下 (As ₂ O ₃ として)	1.0 ppm 以下	5 mg/kg 以下
	水銀	—	—	1 mg/kg 以下
	鉛	—	—	5 mg/kg 以下
微生物	—	—	2 mg/kg 以下 好気性プレートカウト : 10 CFU/g 以下 大腸菌 : 陰性、サルモネラ : 陰性 3.0%以下	—
乾燥減量	3.0%以下	3.0%以下	—	3%以下
定量法	発育阻止円サイズによるカ価測定	比色法によるカ価測定	発育阻止円サイズによるカ価測定	—

③成分規格案による実測値

項目	規格	測定	バッチコード及び製造日					
			ZKS 2002/2/2	JPU 2002/4/2	DHE 2002/8/2	TSV 2002/10/2	DOX 2002/12/2	
含量 ⁽⁸⁾	1 mg当たり 900 IU以上の ナイシン (C ₁₄₃ H ₂₃₀ N ₄₂ O ₃₇ =3354.12)を 含む。	1	1123.7	1201.2	1004.2	1248.7	1117	最小値 : 992.2 最大値 : 1514.5
		2	1514.5	1255.7	1389.0	1238.7	1209.5	
		3	1395.2	1001.2	1598.0	992.2	1075.7	総標準偏差:184.9
		平均値	1344.4	1152.7	1330.4	1159.8	1134.0	総平均値 : 1230.3
性状	白色～淡黄白 色の粉末で、 においがない か又はわずかに 特異なおいがある	1	適	適	適	適	適	適
		2	適	適	適	適	適	
		3	適	適	適	適	適	
確認試験	他の抗菌剤 との識別	1	適	適	適	適	適	適
		2	適	適	適	適	適	
		3	適	適	適	適	適	
重金属 (Pbとして)	2 μg/g以下	1	0.02	0.06	0.04	0.07	0.03	最小値 : 0.02 最大値 : 0.08
		2	0.03	0.04	0.05	0.07	0.06	
		3	0.04	0.07	0.03	0.08	0.05	総平均値 : 0.05 総標準偏差 : 0.02
		平均値 標準偏差	0.030 0.010	0.057 0.015	0.040 0.010	0.073 0.006	0.047 0.015	
ヒ素 (As ₂ O ₃ と して)	2 μg/g以下	1	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	最小値 : 0.01 最大値 : 0.03
		2	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	
		3	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	総平均値 : 0.01 総標準偏差 : 0.01
		平均値 標準偏差	0.01 2E-10	0.01 2E-10	0.03 5E-10	0.01 2E-10	0.01 2E-10	
乾燥減量	3.0%以下	1	0.3	0.4	0.7	0.6	0.4	最小値 : 0.3 最大値 : 0.7
		2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.3	
		3	0.4	0.4	0.6	0.6	0.4	総平均値 : 0.46 総標準偏差 : 0.13
		平均値 標準偏差	0.33 0.06	0.40 0.00	0.60 0.10	0.60 0.00	0.37 0.06	

4. 有効性に関する資料

4.1 欧米における有効性の経緯

ナイシンは広範囲に及ぶグラム陽性菌とその芽胞に対して効果がある有効な抗菌剤である。ナイシンが食品用保存料として有用であることは、多くの国でプロセスチーズ製品、乳製品デザート、レトルト食品を含む食品に対するナイシン製剤としてのナイシンの使用が承認されていることから明らかである。

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細菌による腐敗を防ぐ。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ませんが、ナイシンはそのような食品の保存に役立つ。

文献には、ナイシンが細菌芽胞の増殖を阻害する能力をもつことを実証した研究が多く報告されている。表1にこれらの発表された研究の結果を要約する。

表 1. ナイシンによる細菌芽胞の生育阻害

試験を行った細菌芽胞	芽胞濃度 (ml、g 当たり)	結果
<i>Cl. butyricum</i> NCTC 7423 <i>Cl. sporogenes</i> 1.6 <i>Cl. bifementans</i>	3,500 800 800	40 倍以上のナイシン希釈培養液で芽胞の発芽後生育が阻害された (1)。
P.A. 3679* <i>Cl. botulinum</i> 62A <i>Cl. botulinum</i> 25B <i>C.thermosaccharolyticum</i> 3814 <i>B. coagulans</i> <i>B.stearothermophilus</i> 1518	22,500 20,000 156,000 28,000 800 4,400	濃度 14 μ g/g (生物学的力価、 40×10^6 IU/g) のナイシンにより <i>Cl. thermosaccharolyticum</i> を除く芽胞の D 値**が低下した (2)。
<i>B. coagulans</i> (31 株)	2×10^8 まで	濃度 5 μ g/ml のナイシンにより、全菌株が阻害された (3)。
P.A. 3679 <i>B. stearothermophilus</i> <i>B. coagulans</i> <i>B. coagulans</i>	4,230 657 9,600 100,000	様々な食品素材において、14 μ g/g のナイシンにより試験を行った全芽胞の D 値が低下した (4)。 濃度 14 μ g/g のナイシンにより、大気温度で 18 ヶ月間、缶入りのトマトジュースの腐敗が予防された (4)。
<i>Cl.botulinum</i> 62A <i>Cl.botulinum</i> 213B <i>B.stearothermophilus</i> 1518	20,000 20,000 4,200	ナイシン製剤は 100 μ g/g (生物学的力価、 10^6 IU/g) で <i>Cl.botulinum</i> 芽胞、25 μ g/g (生物学的力価、 10^6 IU/g) で <i>B.stearothermophilus</i> 芽胞を阻害した (5)。
<i>B.stearothermophilus</i> P.A. 3679 <i>B.coagulans</i> 2273	134 まで 179 まで 241 まで	ナイシン (0.26~0.5 IU/ml 培地) は、様々な熱処理後の芽胞の発芽後生育を阻害した (6)。

* putrefactive anaerobe (腐敗性嫌気性菌) の略

** 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。

食品に由来するリステリア症 (幼年者、高齢者、妊婦、免疫が低下している者では重篤な疾患および死亡の原因となりうる) について多くの規制当局が懸念を強めているが、ナイシンは特定食品中、例えばある種のソフトチーズ中の *Listeria monocytogenes* の菌数のコントロールに有効であることが明らかにされている。*Listeria monocytogenes* は低温で増殖可能である。

Bacillus cereus は水分が多く小麦粉が主成分のホットプレートで作られる食品 (クランペット、パンケーキ、ホットケーキ) と特に関連があり、これまでに生命に関わる食中毒の発生と関係してきた。英国やオーストラリアで好まれるクランペットと呼ばれるケーキでは、*B. cereus* に対して 3.75 μ g/g のナイシンが顕著な効果 (10^6 芽胞/g から 10^3 芽胞/g に低下) を示す

ことが分かり、オーストラリア規制当局は、*Bacillus cereus* 毒素による食中毒の危険性を低減するために、ホットプレートで作られる食品にナイシンを使用することを承認している (7)。

乳酸菌はしばしば低 pH で増殖可能であるが、ナイシンに対する感受性が高いため、サラダ用ドレッシングやアルコール飲料など熱処理されない低 pH の食品にナイシンは有用である。酵母はナイシンに対する感受性を示さないため、発酵液中の乳酸菌の増殖をコントロールするためにナイシンを酵母と共に使用する場合もある。

ナイシンと同じ抗菌スペクトルを有する食品保存料は他にない。例えば、ソルビン酸塩や他の有機酸とエステルは (安息香酸とそのエステルを含む)、フェノール類と同様、酵母とカビを阻害するために主に使用される。ポリリジンは主にグラム陰性菌に対して作用し、ナイシンが保存効果を示すグラム陽性菌に対する作用は弱い (8)。

以上のように、ナイシンは保存料としての有効性という点で独特であり、芽胞形成性グラム陽性菌および乳酸菌をコントロールする際の主力となる保存料であり、*Listeria* コントロールへの適用も期待できる。ナイシンを保存料として用いた製品には、腐敗が減少し、賞味期間が延長され、病原性となる可能性のある微生物から消費者を守ることができるという利点がある。保存料の一部にナイシンを使用することで他の保存料の使用量を減らすことができ、その結果食品の味質が改善される。例えば、保存料の一部にナイシンを使用しているプロセスチーズ製品は高水分、低 pH、低塩分にすることが可能になるが、これらの条件はすべて消費者にとってより安全であり、製品の味を改善するものである。レトルト食品にナイシンを使用すると、熱処理時の熱量を減らすことができ、それによって製品の熱による劣化が減り、食感、外観、味の優れた製品が得られる。ナイシンの使用により、レトルトデザートや類似食品中の砂糖の含量を減らすことができる。

4.2 ナイシンの有効性

4.2.1 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

4.2.1.1 背景

プロセスチーズの製造に使用される原料（原料チーズ、バター、脱脂粉乳、ホエイパウダー、香料、乳化剤、水）中にクロストリジウム芽胞が存在することはしばしば不可避であり、芽胞は溶解工程に用いられる高温（85～105℃）処理で生残する可能性がある（9）。プロセスチーズの環境、すなわち高 pH と高水分は嫌気的環境と芽胞の発芽後生育に好都合である。プロセスチーズの腐敗に関連する嫌気性芽胞形成菌は *Clostridium butyricum*、*Clostridium tyrobutyricum*、および *Clostridium sporogenes* である。

4.2.1.2 ナイシン添加の技術的利点

特定カテゴリーの食品は、許容範囲内の方法で製造され取り扱われても避けられないレベルの微生物汚染があり、それにより腐敗がもたらされたり、賞味期間が著しく制限される可能性がある。プロセスチーズ製品はこのカテゴリーに該当する食品の典型例である。ナイシンの使用目的は加工食品中のグラム陽性菌の生育を阻害することであり、その効果は証明されている。

4.2.1.3 ナイシンのクロストリジウム属に対する効果⁽⁹⁾

水分含量 40～60% の様々なプロセスチーズとナイシン 2.5 又は 6.25 mg/kg に、加工の溶解段階で *Clostridium* 属の混合物 (*Cl. Butyricum*、*Cl. Tyrobutyricum*、*Cl. Sporogenes*) 160～240 CFU/g を接種させてインキュベートした。製造されたチーズを 37℃ 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 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 添加では、チーズ製品の腐敗を完全に抑制した（表 2）。