

表8 ナイシン生産菌による乳酸発酵米麴を使用した無塩米味噌の熟成中の微生物変化

	熟成期間 (日)				
	0	7	14	21	28
<i>B. subtilis</i>	<10	<10	<10	<10	<10
乳酸菌	1.3×10^9	1.3×10^9	1.6×10^8	4.2×10^5	<10
pH	6.1	6.1	4.6	4.6	4.6
ナイシン	6,400	400	100	ND	ND

第3表と同様の条件で製麴を行った。米麴と同量の乳酸発酵大豆に食塩0%、水分51%となるように仕込みを行った。30°Cで熟成した。

Lc. lactis IFO12007 10^6 cfu/g 接種, *B. subtilis* ATCC19659 10^5 cfu/g 接種, 麴: *As. oryzae* KBN930.

4.3 食品中の栄養成分に及ぼす影響

ナイシンは低分子ペプチドであり、消化酵素によって不活性化されることから、食品中の栄養成分への影響はないと考えられる。

5. 安全性に関する資料

ナイシンの安全性に関する試験結果の総括を以下に示す。使用した被験物質について、生物学的力価（IU/g、U/g等）が原文に記載されている場合は、総括表の「被験物質」欄に記載し、投与量については原文の記載方法に従った。

ナイシンの安全性に関する試験結果<総括表>

試験	投与期間	動物種等	投与方法	1群当たりの動物数	被験物質	投与量及び濃度	試験結果	参考資料
急性毒性	単回投与 (7日間観察)	ラット	経口	記載なし	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	最高 10^6 U/kg体重	LD ₅₀ : > 10^6 U/kg体重	5-1
			腹腔内	記載なし	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	最高 10^6 U/kg体重	LD ₅₀ : > 10^6 U/kg体重	
	単回投与 (2週間観察)	ラット	経口	雌雄各5	精製ナイシン (52.2×10^6 IU/g)	2000 mg/kg体重	LD ₅₀ : > 2000 mg/kg体重	5-2 GLP
	単回投与 (7日間観察)	ラット	強制経口	3	ナイシン製剤 (10^6 RU/g)	(0.5, 1.0, 1.5) × 10^6 RU/kg体重	LD ₅₀ : > 1.5×10^6 RU/kg体重	5-3
	単回投与	マウス	経口	10	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	6000-8000 mg/kg体重	LD ₅₀ : 6950 mg/kg体重	5-4
			腹腔内	10	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	3500-6000 mg/kg体重	LD ₅₀ : 4750 mg/kg体重	
			皮下注	10	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	3500-5000 mg/kg体重	LD ₅₀ : 4450 mg/kg体重	
	単回投与	ウサギ	静注	記載なし	精製ナイシン	記載なし	LD ₅₀ : 約30 mg/kg体重	5-5
			筋注	記載なし	精製ナイシン	記載なし	LD ₅₀ : 200 mg/kg体重	
			皮下注	記載なし	精製ナイシン	記載なし	LD ₅₀ : >1000 mg/kg体重	
亜急性毒性	7-10日間	ラット	経口	雌雄各5	精製ナイシン (51.6×10^6 IU/g)	0, 500, 1000, 2000 mg/kg体重/日	毒性学的影響はみられなかった 投与群に赤血球の明らかな減少が見られたが、病理組織学的検査において対照群との差はみられなかった	5-6 GLP
	28日間	ラット	経口	雌雄各10	精製ナイシン (49.6×10^6 IU/g)	0, 500, 1000, 2000 mg/kg体重/日	毒性学的影響はみられなかった	5-7 GLP
	12日間 (MTD Phase) / 7日間 (Fixed Dose Phase)	イヌ	経口	雌雄各2	精製ナイシン (51.6×10^6 IU/g)	500, 1000, 2000 mg/kg体重/日 (平均投与容量 14 ml/kg/日)	最高濃度2000mg/kg体重の投与に対して耐性を示し、毒性はみられなかった 体重、摂餌量、臨床病理学又は臓器重量、顕微鏡学的所見に異常はみられなかった	5-8 GLP
					精製ナイシン (50.6×10^6 IU/g)	2000 mg/kg体重/日		
28日間	イヌ	経口	雌雄各3	精製ナイシン (49.1×10^6 - 51.1×10^6 IU/g)	0, 150, 500, 2000 mg/kg 体重/日	雌の中・高用量投与群と雄の高用量投与群に、摂餌量の減少による体重増加抑制がみられた	5-9 GLP	
亜慢性毒性	12週間	ラット	混餌	雄10	ナイシン (ナイシン含有チーズ混合飼料)	(0, 2.00, 3.00, 4.01) × 10^7 U/kg飼料	投与群と対照群との間に体重、一般状態 (general health) 及び行動に差はみられず、剖検時においても異常を認めなかった	5-1

試験	投与期間	動物種等	投与方法	1群当たりの動物数	被験物質	投与量及び濃度	試験結果	参考資料
亜慢性毒性	12週間	ラット	混餌	雌雄各5*1	ナイシン製剤 (10 ⁶ RU/g)	10 ⁴ RU/g飼料	投与群と対照群との間に体重増加の差はみられなかった 投与群に異常はみられなかった 投与群と対照群との間に受精率に差はみられず、胎児は全て正常であった	5-3
	90日間	ラット	経口	雄5	ナイシン製剤 (10 ⁶ U/g)	0.5-5000 U/kg体重/日	投与群と対照群との間に成長率、血液学的指標の差はみられなかった 主要臓器の組織学的検査においても毒性学的影響はみられなかった	5-4
	10+ 25週間*2	ラット	混餌	雄10	ナイシン加水分解物	(ナインとして) 3.33×10 ⁶ U/kg飼料	体重増加抑制はみられなかった 1匹毎にケージで飼育したラットの脾臓に肥大がみられたが、グループ飼育群にはみられず、他の指標にも影響が認められなかったため、ストレスに起因すると結論された	5-1
	2ヶ月間	マウス	経口	雌雄各25匹	ナイシン製剤 (10 ⁶ IU/g)	0.4, 4.0, 400 mg/kg/日	雄の全投与群で体重増加が上昇 生存率、摂餌量には変化なし	5-10
	3ヶ月間	マウス	経口	雌雄各50匹	ナイシン製剤 (10 ⁶ IU/g)	4 mg/kg/日	投与2.5ヶ月後の生存率が低下	5-10
慢性毒性	18ヶ月間	ラット	混餌 (ペースト状)	雌雄各10匹	ナイシン製剤 (10 ⁶ IU/g)	2 mg/kg/日	平均摂餌量は変化なし 摂水量で雌で若干高値 血液pH、C反応性蛋白、血液形態学的評価では対照群と同程度	5-10
慢性毒性 / 繁殖	2年間	ラット	混餌	雄15、雌30	ナイシン製剤 (10 ⁶ U/g)	0、3.33×10 ³ 、3.33×10 ⁶ U/kg飼料	対照群と投与群との間に、生存率、繁殖行動、臓器重量、肉眼的および病理組織学的所見に差はみられなかった 肝臓、腎臓及び胃腸の機能に有意な差はみられなかった [NOAEL : 3.33×10 ⁶ U/kg飼料]	5-1
繁殖	26週間*3	ラット (F0, F1B, F2B)	混餌		ナイシン製剤 (10 ⁶ IU/g)	0, 0.2, 1.0, 5.0%	対照群と投与群との間に、生存率、成長、繁殖行動及び肉眼的/病理組織学的所見に差はみられなかった *4, *5	5-11 GLP
変異原性		サルモネラ菌、大腸菌	<i>in vitro</i>	5濃度	精製ナイシン (52.2×10 ⁶ IU/g)	5, 15, 50, 150, 500, 1500 μg/plate *6	代謝活性化の有無にかかわらず陰性 (使用菌株 : <i>Salmonella thyphirium</i> TA1535, 1537, 98, 100, <i>E.coli</i> CM881, 891)	5-12 GLP
	(予備試験)	マウリンハ ^o L5178Y 細胞	<i>in vitro</i>	6濃度	精製ナイシン (51.6×10 ⁶ IU/g)	3.3-1000 μg/ml *7	予備試験では、100-1000 μg/mlで、細胞毒性がみられたが、代謝活性化の有無にかかわらず変異原性は示さなかった	5-13 GLP
	(本試験)			7濃度		25-10000 μg/ml *8		
	処理時間 21、45 時間	ヒト培養リンパ球	<i>in vitro</i>	3濃度	精製ナイシン (52.2×10 ⁶ IU/g)	62.5-500 μg/ml	代謝活性化の有無、および処理時間の長短にかかわらず、染色体異常誘発性を示さなかった	5-14 GLP
	単回投与 2回 (2日間)	マウス	経口	3濃度 (対照 : 1濃度)	精製ナイシン (51.6×10 ⁶ IU/g)	500, 1000, 2000 mg/kg 体重	マウス骨髄細胞の多染性赤血球に対して小核誘発性を示さなかった	5-15 GLP

試験	投与期間	動物種等	投与方法	1群当たりの動物数	被験物質	投与量及び濃度	試験結果	参考資料
抗原性	3ヶ月間 (p.o.) 3週間 (i.p.)	モルモット	混餌	各投与経路3 (対照各2)	ナイシン製剤 (10 ⁶ RU/g)	50000 U/動物	経口投与後に感作性は示さなかった 腹腔内投与後に感作性を示した	5-1
			腹腔内					

*1 対照群は雌3匹、雄2匹からなる

*2 1匹毎にゲージで飼育したラットにナイシン加水分解物を10週間混餌投与後、5匹づつゲージで飼育し25週間混餌投与した

*3 F01世代: 交配前に少なくとも60日間混餌投与、

*4 予備試験は、0.15、0.5、1.5、5、15、50、150、500、1500、5000 μ g/plateの10濃度で実施

*5 3.3、10、33.3、100、333.3、1000 μ g/ml濃度で実施されたが、333.3 μ g/ml以上では溶媒への溶解濃度を超えていた

*6 各試験の濃度は次の通り

アッセイ1 (S-9 mixなし): 25、50、100、150、200、250、300 μ g/ml アッセイ2 (S-9 mixあり): 50、100、200、400、600、800、1000 μ g/ml

アッセイ3 (S-9 mixなし): 25、50、100、200、400、600、800 μ g/ml アッセイ4 (S-9 mixあり): 25、50、100、200、400、600、800 μ g/ml

*7 F0の雄5.0%群で体重増加抑制がみられた。雄の1.0%群の摂取量は約13mg/kg/day

*8 FDAのメモランダムによると、米国FDAはNOAELを90mg/kg体重/日と評価している

(ただし、Federal Registerでは投与量は「75mg nisin/kg体重/日」とされている)

(1) 毒性に関する資料

ナイシンの投与量 (mg) は、原文に記載された単位で記載し、被験物質の生物学的力価が記載されているもので、重量表記である急性毒性試験については、比較のため U または IU 表記に換算した値を [] 内に記載し、試験間の比較ができるようにした。

1) 急性毒性試験

動物種等	投与方法	1群当たりの動物数	被験物質	投与量及び濃度	試験結果
ラット Birmingham-Wistar系 1)	経口 (7日間観察)	記載なし	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	最高 10^6 U/kg 体重	LD ₅₀ : $>10^6$ U/kg 体重
	腹腔内	記載なし	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	最高 10^6 U/kg 体重	LD ₅₀ : $>10^6$ U/kg 体重
ラット Sprague-Dawley CD系 2)	経口 (2週間観察)	雌雄各 5	精製ナイシン (52.2×10^6 IU/g)	2000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : > 2000 mg/kg 体重 [= 104.4×10^6 IU/kg 体重]
ラット 3)	強制経口 (7日間観察)	3	ナイシン製剤 (10^6 RU/g)	(0.5, 1.0, 1.5) × 10^6 RU/kg 体重	LD ₅₀ : $>1.5 \times 10^6$ RU/kg 体重
マウス DD系 4)	経口	10	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	6000-8000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : 6950 mg/kg 体重 [= 6.95×10^6 U/kg 体重]
	腹腔内	10	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	3500-6000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : 4750 mg/kg 体重 [= 4.75×10^6 U/kg 体重]
	皮下注	10	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	3500-5000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : 4450 mg/kg 体重 [= 4.45×10^6 U/kg 体重]
ウサギ 5)	静注	記載なし	精製ナイシン	記載なし	LD ₅₀ : 約 30 mg/kg 体重
	筋注	記載なし	精製ナイシン	記載なし	LD ₅₀ : 200 mg/kg 体重
	皮下注	記載なし	精製ナイシン	記載なし	LD ₅₀ : >1000 mg/kg 体重

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)

方法：試験方法は、OECD、英国保健省 (UK Department of Health) のガイドラインを遵守した(6)。精製ナイシン(生物学的力価、 51.6×10^6 IU/g)を強制経口投与した。CrI:CDBR系ラット雌雄各5匹のグループに、7日間以上連続して(実際の投与期間は10日間)、ナイシン0、500、1,000、2,000 mg/kg 体重/日を投与した。溶媒として蒸留水を使用し、投与は13.5 ml/kgの一定容量とした。連日、一般状態を観察し、1、4、8、11日目および剖検時に体重を記録した。摂餌量も記録した。血液学的検査および血液生化学的検査のため、投与期間終了時、全動物から血液を採取した。投与期間終了時、全動物を殺処分し、腎臓、肝臓、脾臓の重量を測定し、対照群および高用量投与群の腎臓、肝臓、脾臓に関しては、病理組織学的検査を実施した。

結果：一般状態、生存率、体重、摂餌量、血液生化学的検査、臓器重量、剖検所見において投与に関連した変化はみられず、精製ナイシン 2,000 mg/kg 体重/日以下の投与は十分に耐性があり、毒性は認められなかった。血液学的検査では、雄の投与群においてヘモグロビン濃度、赤血球数、血球容積に用量に相関した減少がみられた。雌でも同じ項目において投与群が対照群より低値を示したが、これには用量相関性は認められなかった（表 1）。病理組織学的検査では、偶発的变化は認められたが、投与に起因する変化はみられなかった。

表1 血液学的検査結果^a

性別	投与量 (mg/kg体重/日)	Hb g/dL	RBC mil/cm ²	PCV %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	RETIC %	RET ABS mil/cm ²	PLAT 1000/cm ²
雄	0	14.9±0.7	6.77±0.64	43.6±2.7	64.5±2.3	22.0±1.2	34.1±0.7	5.9±0.9	0.39±0.06	1143±308
	500	14.3±0.4	6.70±0.23	42.6±1.0	63.5±1.7	21.4±0.8	33.6±0.5	3.5±1.2	0.24±0.07	1167±275
	1000	14.0±0.6	6.23±0.28	41.1±1.7	66.0±0.8	22.5±1.2	34.2±1.5	4.8±1.4	0.31±0.10	898±138
	2000	13.9±0.5	6.17±0.18	39.8±1.6	64.4±1.8	22.4±0.6	34.9±0.9	5.1±1.6	0.32±0.09	1070±273
雌	0	15.0±0.8	6.53±0.39	41.8±2.8	64.1±1.7	23.0±0.5	35.8±0.6	2.5±1.3	0.17±0.09	1020±107
	500	13.8±1.0	6.28±0.35	39.8±1.8	63.5±2.8	21.9±1.3	34.6±1.3	3.0±1.1	0.19±0.08	978±83
	1000	13.5±0.7	5.96±0.60	38.8±2.6	65.3±3.6	22.7±1.3	34.8±1.2	5.4±0.9	0.32±0.06	891±217
	2000	13.9±0.2	6.37±0.16	40.2±1.3	63.1±1.7	21.8±0.7	34.6±1.0	3.2±2.1	0.20±0.13	967±159

^a 平均値±標準偏差 (n=5) で示した

略号: Hb(ヘモグロビン濃度)、RBC(赤血球数)、PCV(血球容積)、MCV(平均血球容積)、MCH(平均赤血球ヘモグロビン量)、MCHC(平均赤血球ヘモグロビン濃度)、RETIC(網状赤血球数)、RETIC ABS(総網状赤血球数)、PLAT(血小板数)

② ラットにおける 28 日間強制経口投与（精製ナイシン）

方法：試験方法は、OECD、英国保健省（UK Department of Health）のガイドラインを遵守した（7）。精製ナイシン（生物学的力価、 49.6×10^6 IU/g）を CrL: CD BR 系ラット雌雄各 10 匹のグループに強制経口投与した。ナイシン投与量は 0、500、1,000、2,000 mg/kg 体重/日で、28 日間反復投与した。溶媒として蒸留水を使用し、投与は 20 ml/kg の一定容量とした。連日、一般状態について動物を観察し、1 週間ごとに詳細な観察を行った。投与前と試験中は 1 週間ごとに体重を記録し、毎週、摂餌量を測定した。眼科学的検査は、投与前は全動物、第 4 週は対照群と高用量群について行った。血液学的検査および/または血液生化学的検査のため、第 2 週および第 4 週には全動物から、剖検前には雌ラットから血液を採取した。また、第 4 週には全動物から尿を採取した。投与期間終了時、全動物を剖検し、臓器重量を測定、常法に従い、病理組織学的検査を実施した。体重、体重増加量、血液および血液生化学的検査、尿検査、臓器重量について統計解析を実施した。

結果：一般状態、体重および体重増加量、摂餌量、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、剖検所見、病理組織学的検査において、投与に関連した変化はみられなかった。生存率では、雌の高用量群で 1 匹死亡したが、肉眼的病理検査から死因は誤投与と考えられた。血液学的検査では、投与後 2 週間で変化はみられなかったが、4 週間後、雄の

中・高用量群のPCVおよび高用量群のMCVで対照群に比べわずかではあるが有意な低値を示した。雄の中、高用量群ではヘモグロビン濃度においてもごくわずかではあるが有意な低値を示した(表2)。しかし、全ての値は背景データの範囲内であった。雌では、中用量群で赤血球数その他の群に比べて有意に低下し、中、高用量群でリンパ球数(%)がわずかではあるが有意に高値を示した。血液生化学的検査では、雄の高用量群で血糖値のわずかではあるが有意な上昇がみられ、雄の総ビリルビン量では用量に相関した有意な減少がみられた(表3)。その他のパラメータでも変動はみられたが、投与に起因するものではないとした。臓器重量では、雌で高用量群において、肝臓重量が対照群に比べ有意に低下した(表4)。以上より、28日間、用量2,000 mg/kg体重/日以下の精製ナisin投与は十分に耐性があり、毒性はほとんど認められなかった。測定値はすべて、この週齢と動物種で通常認められる範囲内であり、雄で認められた血液検査項目の変動に生物学的意義はないとした。

表2 血液学的検査結果

性別	投与量 (mg/kg体重/日)	Hb g/dL	RBC mil/cm ²	PCV %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	PLAT 1000/cm ²	RETIC ^a %	RET ABS ^b mil/cm ²	PT secs	APTT secs
雄	0	15.4±0.5	7.79±0.28	47.0±1.4	60.4±2.0	19.8±0.8	32.9±0.6	962±121	1.7±0.9	0.13±0.08	19.0±1.3	18.0±0.9
	150	15.3±0.5	7.76±0.35	46.0±1.4	59.3±1.7	19.7±0.9	33.3±0.7	1110*±107	1.5±0.7	0.12±0.05	18.4±2.1	15.7±1.4
	500	14.9±0.5	7.65±0.28	44.7*±1.5	58.5±1.7	19.4±0.6	33.2±0.4	930±158	1.5±0.5	0.11±0.04	20.4±2.0	18.1±1.8
	2000	14.8±0.9 DR*	7.69±0.41	44.7*±2.8	58.1*±1.4	19.3±0.5	33.2±0.5	928±127	1.8±0.8	0.14±0.06	19.8±2.4	16.1±3.6
雌	0	14.8±0.5	7.86±0.34	44.9±1.5	57.2±2.0	18.8±0.7	32.8±0.7	1100±140	1.2±0.4	0.10±0.04	20.8±1.6	15.8±0.9
	150	14.4±0.5	7.55±0.54	43.9±2.6	58.2±2.2	19.2±1.1	32.9±1.2	1102±143	1.8±0.8	0.14±0.06	21.0±0.8	15.1±0.7
	500	14.2±0.7	7.54±0.29	43.6±1.6	57.8±2.4	18.8±0.8	32.5±0.7	1084±144	1.8±0.6	0.14±0.05	21.1±1.2	15.1±1.3
	2000	14.6±0.6	7.83±0.37	44.4±1.7	56.8±1.2	18.7±0.3	32.9±0.5	1086±126	2.0±0.9	0.16±0.07	21.1±0.9	14.9±0.9

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

DR = 用量相関性検討で有意

^{a, b}: 統計処理実施せず

略号: Hb (ヘモグロビン濃度)、RBC (赤血球数)、PCV (血球容積)、MCV (平均赤血球容積) MCH (平均赤血球ヘモグロビン量)、MCHC (平均赤血球ヘモグロビン濃度)、PLAT (血小板数)、RETIC (網状赤血球)、RETIC ABS (総網状赤血球数)、PT (プロトロンビン時間)、APTT (活性化部分トロンボプラスチン時間)

表3 血液生化学的検査結果

性別	投与量 (mg/kg体重/日)	GLUC ^a mmol/L	UREA ^a mmol/L	T BILI ^a umol/L	CREAT ^b umol/L	T PROT ^b g/L	TOT CHOL ^a mmol/L
雄	0	6.1±1.2	4.6±0.7	6.2±2.4	59±2	61±3	1.9±0.4
	150	6.9±1.0	3.6*±0.7	5.5±1.3	56*±3	62±2	1.8±0.3
	500	7.0±0.9	4.3±0.8	4.9±1.6	57±2	60±3	1.7±0.3
	2000	7.3*±0.9	4.8±0.6	4.4±1.6 DR*	56*±3	60±4	1.9±0.2
雌	0	4.9±0.7	5.5±1.2	5.1±2.9	63±5	63±4	1.9±0.3
	150	5.1±0.7	5.4±0.9	4.3±1.5	61±5	60±3	1.7±0.2
	500	5.3±0.5	4.9±0.7	3.8±1.4	62±4	59±5	1.7±0.2
	2000	5.3±0.4	5.5±0.9	4.6±0.7	60±1	58±3	1.7±0.2 DR*

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

DR = 用量相関性検討で有意

^a: ANOVA, regression and Dunnett's

^b: 雄-ANOVA, regression and Dunnett's, 雌-統計処理実施せず

^c: 統計処理実施せず

略号: GLUC(血糖値)、T BILI(総ビリルビン量)、CREAT(クレアチニン)、T PROT(総タンパク)、TOT CHOL(総コレステロール)

表4 雌の剖検時の平均体重および平均臓器重量(平均体重で補正)

投与量 (mg/kg体重/日)	体重 g	副腎	腎臓	脾臓	肝臓	心臓	脳
0	211.1	0.061 (0.061)	1.507 (1.485)	0.593 (0.582)	6.693 (6.573)	0.857 (0.845)	1.889 (1.886)
150	213.3	0.061 (0.060)	1.416 (1.408)	0.566 (0.562)	6.311 (6.264)	0.875 (0.870)	1.856 (1.855)
500	214.5	0.057 (0.057)	1.392 (1.390)	0.555 (0.554)	6.129* (6.119)	0.837 (0.836)	1.864 (1.864)
2000	220.7	0.059 (0.060)	1.377 (1.413)	0.555 (0.573)	5.815*** (6.011)	0.803 (0.823)	1.880 (1.886)

^a 統計処理

体重: ANOVA, regression and Dunnett's

その他: ANCOVA and Dunnett's

^b 絶対重量を()中に示した

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

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)

方法: 試験方法は、OECD、英国保健省 (UK Department of Health) のガイドラインを遵守した (8)。精製ナイシン (生物学的力価、 51.6×10^6 IU/g (MTD) と 50.6×10^6 IU/g (固定用量)) を純血種のビーグル犬 (雌雄各 2 匹のグループ) に強制経口投与した。MTD 投与期間中、投与群には 12 日間かけて、用量を 500、1,000、2,000 mg/kg 体重/日と増量

した。溶媒として蒸留水を使用し、投与は7 ml/kgの一定容量とした（1日2回、4時間間隔）。対照群には蒸留水を投与した。MTD投与期間に続いて固定用量の投与を行った。この固定用量投与期間中、MTDの対照群に7日間、2,000 mg/kg体重/日でナイシンを投与した。連日、一般状態について観察し、1週間ごとに詳細な観察を行った。また、各動物の体重、摂餌量を記録した。血液学的検査および/または血液生化学的検査のために血液を採取し、尿検査も実施した。投与期間終了時、全動物について剖検を行った。腎臓、肝臓、脾臓の重量を測定した。様々な組織サンプルを作成し、病理組織学的検査を行った。

結果：MTDおよび固定用量投与期間において、一般状態、生存率、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量、剖検所見、病理組織学的検査において投与に起因する変化はみられなかった。以上より、投与量2,000 mg/kg体重/日での精製ナイシン投与は十分に耐性があり、毒性は認められなかった。

④ イヌにおける28日間強制経口投与（精製ナイシン）

方法：試験方法は、OECD、英国保健省（UK Department of Health）のガイドラインを遵守した（9）。純血種ビーグル犬雌雄各3匹から成る群に精製ナイシン（生物学的力価、 $49.1 \times 10^6 \sim 51.1 \times 10^6$ IU/g）を強制経口投与した。用量設定試験、上記の（8）の結果に基づき、ナイシン投与量は0、150、500、2,000 mg/kg体重/日とした。健康障害（ill-health）や明らかな毒性の徴候について、連日、動物を観察し、1週間ごとに詳細な観察を行った。体重は、1週間ごとおよび剖検前に記録した。摂餌量は1週間ごとに測定した。投与前と第4週に眼科的検査を全動物に実施した。血液学的検査および/または血液生化学的検査評価のため、第2週と第4週に全動物から血液を採取した。解析のため、尿を採取した（第2週と第4週）。投与前と第4週、心電図検査を実施した。投与期間終了時、全動物を剖検し、臓器重量測定後、常法に従い病理組織学的検査を行った。

結果：一般状態、生存率、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量、剖検所見、病理組織学的検査において投与に関連した変化はみられなかった。体重増加では、雌の全投与群と雄高用量群がそれぞれ対照群に比べ低値を示した（表5）。摂餌量では、雌の中、高用量群で対照群に比べ低値を示した（表6）。以上より、28日間のナイシンの連日投与では、いずれの投与量でも十分な耐性があり、毒性は認められなかった。中用量の雌と高用量投与の雌雄において、対照群と比較して体重増加が低下したのは、この投与群で摂餌量が減少したことに起因すると考えられる。投与群において摂餌量減少を説明できる投与に関連した変化は認められないことから、摂餌量減少は被験物質による投与容量の増加と、粘度の変化に起因すると考えられる。

表5 平均体重 (g)

性別	投与量 (mg/kg体重/日)	週				
		-1	1	2	3	4
雄	0	8.95±0.90	9.22±1.06	9.22±0.90	9.30±0.97	9.50±1.02
	150	9.20±0.95	9.57±1.16	9.47±1.31	9.68±1.29	9.80±1.38
	500	9.22±0.90	9.52±0.98	9.58±1.09	9.68±1.22	9.82±1.11
	2000	8.72±1.50	8.97±1.62	8.87±1.54	9.10±1.65	9.07±1.79
雌	0	8.28±0.28	8.48±0.36	8.62±0.51	8.83±0.40	8.98±0.38
	150	8.13±0.53	8.52±0.68	8.67±0.71	8.70±0.73	8.68±0.73
	500	8.47±0.29	8.52±0.33	8.60±0.31	8.77±0.25	8.73±0.20
	2000	8.25±0.78	8.25±0.91	8.42±1.03	8.55±0.95	8.48±1.06

表6 平均摂餌量 (g/イヌ/週)

性別	投与量 (mg/kg体重/日)	週				
		-1	1	2	3	4
雄	0	2343±415	2530±353	2443±333	2550±229	2617±318
	150	2357±290	2530±468	2517±491	2637±283	2557±421
	500	2473±335	2620±167	2600±176	2677±214	2720±139
	2000	2170±277	2333±221	2250±351	2427±360	2393±333
雌	0	2293±214	2617±102	2543±189	2647±75	2530±128
	150	2177±294	2507±226	2347±373	2527±337	2507±318
	500	2203±151	2290±217	2250±236	2607±95	2343±71
	2000	2040±435	2060±308	2243±239	2367±287	2083±453

3) 亜慢性毒性試験

① 12週間ラット混餌投与試験

方法：離乳 Birmingham-Wistar 系雄性ラット 10 匹からなる 6 群に 12 週間、投与群にはナイシン含有チーズ、対照には非含有チーズを含む飼料を与えた (1)。ナイシン投与群には飼料中濃度 2.00×10^4 、 3.01×10^4 、 4.01×10^4 U/g で与えた。ラットの平均体重を 250 g、飼料の 1 日摂取量を 15 g (=60 g/kg 体重/日) として 1 日に摂取するナイシン量を算出すると、それぞれ 1.20×10^6 、 1.81×10^6 、 2.41×10^6 U/kg 体重となる。試験期間中体重、一般症状、行動を評価し、試験終了時に剖検した。

結果：対照群 (ナイシンを含有しないチーズ) と比較して、ナイシン投与群の体重、一般症状、行動に差は認められなかった (表 7)。剖検時、差および/または異常は認められなかった。