

(4) ナイシン様抗菌性物質産生菌のウシおよびヒトにおける存在

Hirsch らは、ウシ及びヒトの各種検体中に存在する微生物中の連鎖球菌に対する抗菌性物質を分泌する菌株の有無を調べた（表 22）（21）。

各種検体から分離株を単離し、培養液を得た。培養液にクロロホルムを浸した綿栓をし、42℃4 時間処理により滅菌後、綿栓を除き、さらに 42℃で数時間処理することにより、残りのクロロホルムを取り除いた。滅菌培養液について、32 及び 320 倍希釈液の *Lactococcus agalactiae* に対する増殖阻害能を調べた。

ヒト鼻咽喉粘液からは、3,414 菌株が単離され、320 倍希釈液でも阻害能を有するものは 9 菌株であった。ヒト糞便からは、966 菌株が単離され、32 倍希釈液で阻害能を有するものは 13 菌株存在し、さらに 320 倍希釈液でも阻害能を有するものは 1 菌株であった。

ヒト鼻咽喉粘液及び糞便から 320 倍希釈液で阻害能を有する 10 菌株が得られ、これらより分泌される抗菌性物質の抗菌スペクトルはナイシンと類似しており、その菌株を *L. lactis*（旧名 *Streptococcus lactis*）と同定した。その他、ウシ由来の生乳から 320 倍希釈液で阻害能を有する 3 菌株が得られ、これらより分泌される抗菌性物質の抗菌スペクトルもナイシンと類似しており、その菌株も *L. lactis* と同定した。

以上より、ナイシン様抗菌性物質産生菌 *L. lactis* は、頻度は低いが、ヒト腸内およびウシに常在していると考えられる。したがって、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。

表22 連鎖球菌に対する抗菌性物質分泌菌株数

検体	分離菌株数	阻害能を有する菌株数	
		32倍希釈液	320倍希釈液
鼻咽喉粘液（ヒト）	3,414	—	9
ヒト糞便	966	13	1
ウシ第一胃	615	5	—
ウシ糞便	837	4	—
生乳	984	—	3
殺菌牛乳	548	—	—
チーズ	652	—	—
合計	8,016	22	13

(5) 使用の歴史

ナイシンは 50 ヶ国以上で保存料として承認されている（2-3）。ナイシンを含有する食品摂取に起因する有害作用の報告はない。

(6) 食品添加物の1日摂取量に関する資料

1) 1日摂取量の推計

ナイシンは保存料である。食品中の保存料の含有量は食品ごとに大幅に異なるので、通常、保存料の摂取量の個人差は極めて大きい。ここでは、コーデックスの食品添加物一般基準案（GSFA 案）（2-5）、有効性試験結果および平成12年度国民栄養調査（22）をもとに、食品群中の最も保存料の多い食品を飲食すると仮定して、人の最大の摂取量を推定した。条件は次の通り。

1. 食品の一人当りの摂取量は平成12年国民栄養調査成績の食品群別摂取量によった。
2. 食品群ごとに保存料含量が最も高い食品を選定し、食品群ごとの摂取量とした。
3. GSFA 案において最大使用量が GMP とされている食品群については、使用基準案を 10 mg/kg とした。
4. GSFA 案の Food Cat. No. 01.0、01.6.4、07.2、08.0、12.9 の最大使用量については、ナイシン製剤で表記されているので、精製ナイシン量に換算して摂取量を算出した。
5. GSFA 案の Food Cat.No. 12.9 のたんぱく質（利用）製品類は、日本の食品群の「85：その他の食品」ならびに「29：豆腐」が該当する。豆腐においては有効性試験（p.32）で豆乳への添加量 1.25 mg/kg において有効性が示されたが、豆腐成型時に濃縮（試験結果では約 2.4～5.4 倍濃縮）されるため、使用基準案を（残存量として）10 mg/kg と設定し、摂取量を算出した。
6. 液卵においては、有効性試験（p.28）で有効であった添加量 5 mg/l を基に使用基準案を 5 mg/kg と設定し、摂取量を算出した。
7. 味噌においては、使用基準案を（残存量として）5 mg/kg と設定し、摂取量を算出した。

表 23 ナイシン使用基準比較・1日最大摂取量

CODEX GSFA(案)			日本			
Food Cat. No.	食品分類	最大使用量 (mg/kg)	国民栄養調査食品分類	摂取量 (g/日)	使用基準案 (mg/kg)	ナイシン摂取量 (mg/日)
01.0	乳製品類、但し、区分02.0の製品類を除く	500 mg/kg	84：その他の乳製品	19.4	12.5 mg/kg	0.243
01.4.3	凝乳クリーム	10 mg/kg	84：その他の乳製品		12.5 mg/kg	—
01.6.1	未熟成チーズ	12.5 mg/kg	83：チーズ	2	15 mg/kg	0.030
01.6.2	熟成チーズ	12.5 mg/kg				
01.6.3	ホエイチーズ	12.5 mg/kg				
01.6.4	プロセスチーズ	250 mg/kg				
01.6.5	チーズ類似品	12.5 mg/kg				
01.6.6	ホエイ蛋白チーズ	12.5 mg/kg				
06.5	穀類及びでん粉を主成分とするデザート（たとえば、米のプディング、タピオカプディング）	3 mg/kg	22：その他の菓子類	12.9	5 mg/kg	0.065
07.2	装飾をしたパン製品類 (sweet, salty, savoury)	250 mg/kg	6：菓子パン	8.8	6.25 mg/kg	0.055
08.0	食肉及び食肉製品類、家禽及び狩猟動物肉を含む	500 mg/kg	75-80：肉類	78.2	12.5 mg/kg	0.978
12.5.1	缶詰、瓶詰、及び冷凍したものを含め、そのまま摂取できるスープ及びブロス	GMP	85：その他の食品	5.3	10 mg/kg	—
12.9	たんぱく質（利用）製品類	200 mg/kg	85：その他の食品	5.3	5 mg/kg	0.027
			29：豆腐	38.6	10 mg/kg	0.386
新規（案）	液卵及び液卵製剤		81：卵類	39.7	5 mg/kg	0.199
	味噌		28：味噌	13.0	5 mg/kg	0.065
合計						2.05

2.05÷50（体重50 kgとして）=0.041 mg/kg体重/日

2) 1日摂取許容量（ADI）との比較

1962年発表の2年間試験（1）よりADIを設定した場合、FDAの評価結果から、最高用量 3.33×10^6 U/kg 飼料（=196,000 U/kg 体重、4.9 mg/kg 体重）をNOAELとすると、ADIは0.049 mg/kg 体重/日と設定される。

一方、1981年実施の繁殖試験（11）はナイシンの開発メーカーであるAplin&Barrett社がHuntingdon Research Centreに委託して実施したFDAのGLP（21CFR, Part 58）に準拠した試験である。既述したEUのSCF（食品科学委員会）による評価結果（p.5-6）を引用した時、ADIは精製ナイシンとして0.13 mg/kg 体重/日と設定される。

国民栄養調査を参考にして、本要請の使用基準案より算出した1日推定摂取量（EDI）は、0.041 mg/kg 体重/日であることから（表23）、EDI/ADI（%）は、ADIが0.049 mg/kg 体重/日の時83.7%、0.13 mg/kg 体重/日の時31.5%となる。

6. 使用基準案に関する資料

ナイシン（精製ナイシン）の使用量は、チーズにあっては、1kgにつき15mg以下、その他の乳製品および肉類にあっては、12.5mg以下、殺菌した缶詰又は瓶詰め野菜、スープ及びブロス、菓子パンにあっては、1kgにつき6.25mg以下、液卵、液卵製品にあっては、1kgにつき5mg以下、その他の食品にあっては、1kgにつき5mg以下とする（表23）。豆腐にあっては、1kgにつき10mg以上、味噌、米麴にあっては、1kgにつき5mg以上残存しないように使用しなければならない。但し、特別用途表示の許可又は承認を受けた場合は、この限りでない。

7. 参考資料

<2章>

- 2-1. Thomas L V, Clarkson M R, and Delves-Broughton J. Nisin. In: Natural Food Antimicrobial Systems. 2000. CRC Press. (Editors: Naidu A S). 463-524
- 2-2. Federal Register : 53 FR 11247 , Apr. 6, 1988, Food and Drug Administration, HHS.
- 2-3. 加藤丈雄 乳酸発酵の新しい系譜・食肉製品と乳酸菌その 1、ヘルスダイジェスト : Vol.16 (3) 2001年
- 2-4. FAO Nutrition Meetings Report Series : 45A 1968 Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation : some antibiotics : 33-35
- 2-5. Report of the 35th session on the codex committee on food additives and contaminants, Codex alimentarius commission (ALINORM 03/12A April 2003)
- 2-6. 21 CFR Ch.I (4-1-03 Edition) Food and Drug Administration, HHS. § 184.1538 2003
- 2-7. Federal Register : 59 FR 42277, August 17, 1994, Food and Drug Administration, HHS.
- 2-8. Federal Register, : 60 FR 64167, December 14, 1995, Food and Drug Administration, HHS.
- 2-9. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000065
- 2-10. Frazer A C, Sharratt M, Hickman J R. The Biological Effects of Food Additives. I.-Nisin. 1962. J.Sci Food&Agri 13:32-42. (=5-1)
- 2-11. Memorandum of November 9, 1984, from Alfred N. Milbert to John W. Gordon.
- 2-12. Official Journal of the European Communities 1995 L Volume
- 2-13. Food-science and techniques Reports of the Scientific Committee for Food (Twenty-sixth series). Commission of the European Communities.
 - a. Aplin & Barret Ltd., (1982). Unpublished summary document dated January 1982 submitted to EEC Commission.
 - b. Somers EB, Taylor SL, (1987). J. Fd. Protec. 50 (10), 842-848.
 - c. Chung K-T, Dickson JS, Crous JD, (1989). Appl. Envir. Microb. 55 (6), 1329-1333.

<3章>

- 3-1. FNP 52 (1992) Compendium of Food Additive Specifications Volume1 JECFA 1992 p.1001-1005
(http://apps3.fao.org/jecfa/additive_specs/docs/0/additive-0289.htm)
- 3-2. Food Chemicals Codex Fifth edition 2004 p.302 -303
- 3-3. ダニスコ社内資料 (METHOD OF MANUFACTURE, Feb 2003)
- 3-4. ダニスコ社内資料 (NISIN-AHS TEST, Feb 2003)
- 3-5. ダニスコ社内資料 (NISIN STABILITY, Feb 2003)
- 3-6. Fowler G G, Jarvis B and Tramer J. "The assay of nisin in foods". 1975. Soc Appl Bacteri Tech Ser 8: 91-105
- 3-7. Aplin&Barrett Technical Information Sheet. "Determination of the nisin content of food samples using the M. Luteus plate diffusion assay method". 1990. Ref. 32/90.

- 3-8. 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 社内報告書 ナイシンの定量法(案)による実測値、
2003年

<4章>

- 4-1. Hirsch A and Grinsted E. 'Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore formers from cheese, with observations on the effect of nisin'. 1954. J Dairy Res 21: 101-110
- 4-2. O'Brien R T, Titus D S, Devlin K A, Stumbo C R, Lewis J C. 'Antibiotics in food preservation. II. Studies on the influence of subtilin and nisin on the thermal resistance of food spoilage bacteria'. 1954. Fd. Technol 10: 352-355
- 4-3. Campbell L L and Sniff E E. 'Nisin sensitivity of *Bacillus coagulans*'. 1959. Appl Microbiol 7: 289-291
- 4-4. Campbell L L, Sniff E E, O'Brien R T. 'Subtilin and nisin as additives that lower the heat-process requirements of canned foods'. 1959. Fd Technol 12: 462-464
- 4-5. Denny C B, Sharpe L E, Bohrer C W 'Effects of tylosin and Nisin on canned food spoilage bacteria'. 1960. Appl Microbiol 9: 108-110
- 4-6. Heinemann B, Voris L, Stumbo C R. 'Use of nisin in processing food products'. 1965. Fd Technol 19 (4): 160-164
- 4-7. 森地敏樹 バイオプリザベーションー乳酸菌による食品微生物抑制ー 幸書房
1999年 p.48-56、69-70
- 4-8. Aplin & Barrett Ltd. Research Report No. 15/96. 'The bactericidal and bacteriostatic effects of ϵ poly-l-lysine and an ϵ poly-l-lysine/nisin combination system on a range of organisms'. 1996
- 4-9. Delves-Broughton J and Gasson M J. 'Nisin'. In: Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation. 1994. CAB International. (Editors: Dillon V M and Board R G). Chapter 4, 99-131
- 4-10. Cunningham F E. 'Egg product pasteurization'. In: Egg Science & Technology. Fourth Edition 1995. Food Press. (Editors: Stadelman W J and Cotterill O J). pp 289-321
- 4-11. Schafi R, Cotterill O J, Nichols M L. 'Microbial flora of commercially pasteurized egg products'. Poultry Sci 49: 578-585.
- 4-12. Payne J, Gooch J E T, Barnes E M. 'Heat-resistant bacteria in pasteurized whole egg'. 1979. J Appl Bacteriol 46: 601-613 .
- 4-13. Wood S L and Waites W M. 'Factors affecting the occurrence of *Bacillus cereus* in liquid whole egg'. 1988. Food Microbiol 5: 103-107.
- 4-14. Federal Register, August 17, 1994, Food and Drug Administration, HHS. (=2-7)
- 4-15. Delves-Broughton J, Williams G C, Wilkinson S. 'The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in pasteurized liquid whole egg'. 1992. Letters in Appl Microbiol 15: 133-136 .
- 4-16. Danisco Technical Report No 6299. Effective use of Nisaplin® for control of spoilage of

a pasteurised tofu product. November 2002.

- 4-17. 加藤文雄 抗菌性乳酸菌スターターカルチャーを利用した味噌醸造 日本食品科学
工学会誌 第47巻 p.752-759 2000年10月
- 4-18. 加藤文雄 ナイシン生成性乳酸菌を利用した米麴及び米味噌の製造方法 醸協第97
巻第9号 p.615-623 2002年

<5章>

- 5-1. Frazer A C, Sharratt M, Hickman J R. The Biological Effects of Food Additives. I.-Nisin.
1962. J.Sci Food&Agri 13:32-42. (=2-10)
- 5-2. 'Purified Nisin: Acute Oral Toxicity (Limit Test) in the Rat'. SPL Project Number:
867/002. SafePharm Laboratories, November 1995. Unpublished Confidential Report.
- 5-3. Pesquera T I. 'Nisin - Its Use, Estimation and Toxicity in Sterilised Milk'. 1966. Revista
Espanola de Lecheria No. 59, March.
- 5-4. Hara S, Yakazu K, Nakakawakji K, Takeuchi T, Kobayashi T, Sata M, Imai Z and Shibuya T.
'An Investigation of Toxicity of Nisin with Particular Reference to Experimental Studies of
its Oral Administration and Influence by Digestive Enzymes'. 1962. J Tokyo Med Coll
20 (2): 176-207.
- 5-5. Hirsch A and Mattick A T R. 'Some Recent Applications of Nisin' 1949. The Lancet.
July 30, 190.
- 5-6. 'Ambicin N (Purified Nisin): 7 Day Oral (Gavage Administration) Toxicity Study in the
Rat'. Corning Hazleton. Report number 1334/3-1050. December 1995. Unpublished
Confidential Report.
- 5-7. 'Ambicin (Purified Nisin): 28 Day Oral (Gavage Administration) Toxicity Study in the
Rat'. Corning Hazleton. Report number 1334/1-1050. April 1996. Unpublished
Confidential Report.
- 5-8. 'Ambicin N (Purified Nisin): Maximum Tolerated Dose (MTD) Toxicity Study Followed
by a 7 Day Fixed Dose Oral (Gavage Administration) Toxicity Study in the Dog'. Corning
Hazleton. Report number 1334/4-1050. December 1995. Unpublished Confidential
Report.
- 5-9. 'Ambicin (Purified Nisin): 28 Day Oral (Gavage Administration) Toxicity Study in the
Dog'. Corning Hazleton. Report No : 1334/1-1050, Corning Hazelton (Europe),
Harrogate, N. Yorkshire, England. April 1996.
- 5-10. Shtenberg A J and Ignat'ev A D. 'Toxicological Evaluation of some Combinations of Food
Preservatives.' 1970. Fd. Cosmet. Toxicol. 8: 369-380.
- 5-11. 'Effect of Nisaplin on Reproductive Function of Multiple Generations in the Rat'.
Huntingdon Research Centre. Report No. APL 1/801028, June 1981. Unpublished
Confidential Report.
- 5-12. 'Ambicin N (Purified Nisin). Bacterial Mutation Assay'. Huntingdon Life Sciences.
Report No. APM 1/952077, November 1995 and Protocol. Unpublished Confidential

- Report.
- 5-13. 'Ambicin N. Mouse Lymphoma Mutation Assay'. Inveresk Research International. Report number 12242, December 1995 and Protocol. Unpublished Confidential Report.
 - 5-14. 'Ambicin (Purified Nisin). Metaphase Chromosome Analysis of Human Lymphocytes Cultured in vitro'. Huntingdon Life Sciences. Report number APM 2/952601, April 1996 and Protocol. Unpublished Confidential Report.
 - 5-15. 'Ambicin N (Purified Nisin). Induction of Micronuclei in the Bone Marrow Treated Mice'. Corning Hazleton. Report number 1334/5-1052, January 1996 and Protocol. Unpublished Confidential Report.
 - 5-16. Claypool L, Heinemann B, Voris L and Stumbo C R. 'Residence Time of Nisin in the Oral Cavity Following Consumption of Chocolate Milk Containing Nisin'. 1966. *J Dairy Sci* **49**: 314-316.
 - 5-17. Cowell N D, Allen A R and Jarvis B. 'The in vivo Effect of Nisin on the Microflora of the Oral Cavity'. 1971. *J Appl Bact* **34** (4): 787-791.
 - 5-18. Heinemann B and Williams R. 'Inactivation of Nisin by Pancreatin'. 1966. *J Dairy Sci* **49** (3): 312-314.
 - 5-19. Jarvis B and Mahoney R R. 'Inactivation of Nisin by Alpha-Chymotrypsin'. 1969. *J Dairy Sci* **52** (9): 1448-1450.
 - 5-20. Hossack D J N, Bird M C, and Fowler G G. 'The effects of Nisin on the sensitivity of microorganisms to antibiotics and other chemotherapeutic agents.' 1983, "Antimicrobials and Agriculture", 425-433.
 - 5-21. Hirsch A and Wheater D M. 'The production of antibiotics by *Streptococci*'. 1951. *J. Dairy Res* **12**: 193-197.
 - 5-22. 健康・栄養情報研究会編：国民栄養の現状（平成12年厚生労働省国民栄養調査結果）