

ナイシンの添加物として定めることに係る 食品健康影響評価について

1 はじめに

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*) が生産する 34 個のアミノ酸から成るペプチドで、*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阻害する。

ナイシンは、現在、50 カ国以上で保存料として、チーズ、乳製品、缶詰等に使用されている。米国では、「Nisin preparation」(ナイシン製剤) は一般に安全と認められる物質 (GRAS 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等に抗菌剤として使用されている²⁻⁶⁾。EU では、ナイシンは保存料としてチーズ等への使用が認められている²⁻¹²⁾。

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) では、第 12 回 (1968 年) 会議でナイシンが評価され、2 年間のラットへの反復投与試験の結果より、無毒性量 (NOAEL) は 3,330,000 U/kg 体重*とされ、ADI は 0-33,000 U/kg 体重とされている²⁻⁴⁾。

(*原著によると、3,330,000 U/kg は飼料中濃度である。4 ページ参照)

2 背景等

厚生労働省は、平成 14 年 7 月の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会での了承事項に従い、① JECFA で国際的に安全性評価が終了し、一定の範囲内で安全性が確認されており、かつ、②米国及び EU 諸国等で使用が広く認められていて国際的に必要性が高いと考えられる食品添加物 46 品目については、企業等からの指定要請を待つことなく、指定に向けた検討を開始する方針を示している。これに該当するナイシンについては、指定の要請もあったことから、食品安全基本法に基づき食品健康影響評価が食品安全委員会に依頼されたものである。(平成 15 年 10 月 20 日、関係書類を接受)

3 添加物指定の概要

今般、ナイシンについて、チーズ、その他の乳製品、肉類、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、液状卵及び液状卵製品、豆腐、味噌、米麴等への使用に関する基準を定め、JECFA の規格等を参考に規格を定めた上で、新たに添加物として指定しようとするものである。

4 物理化学的性質等

ナイシン(別名：ナイシン A)

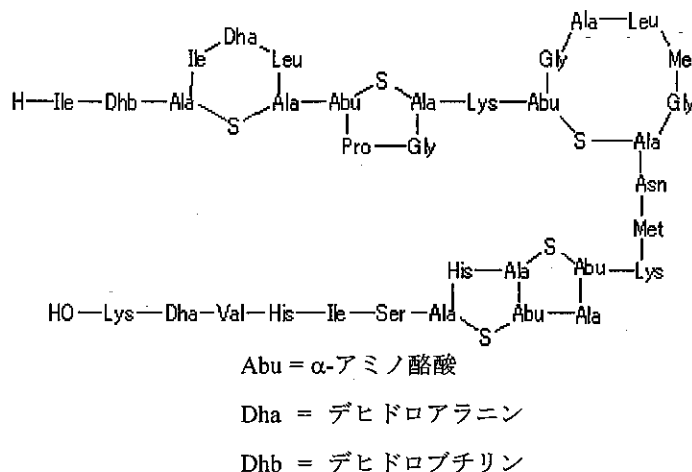
英名：Nisin

CAS 番号：1414-45-5

化学式：C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇

分子量：3354.12

性状：白色～淡黄白色の粉末
で、においがなく又
はわずかに特異なにお
いがある。



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り、1 mg 当たり 900 IU 以上のナイシンを含む。なお、精製されたナイシンは 1 mg 当たり $4 \sim 5 \times 10^4$ IU 程度のナイシンを含む。

5 安全性に関する検討

(1) 毒性試験

① 急性毒性

ラットへの経口投与での LD₅₀ は 2,000 mg/kg 体重以上⁵⁻²⁾、マウスへの経口投与での LD₅₀ は 6,950 mg/kg 体重⁵⁻⁴⁾ 等が報告されている。

② 亜急性毒性試験

CrI:CDBR 系ラット雌雄各 5 匹に、10 日間精製ナイシン（ナイシンとして 0、500、1,000、2,000 mg/kg 体重/日）を強制経口投与したところ、一般状態、生存率、体重、摂餌量、血液生化学的検査、臓器重量、剖検所見及び病理組織学的検査において投与に関連した変化は認められなかった。血液学的検査では、雄でヘモグロビン濃度、赤血球数及び血球容積に用量に相関した減少がみられ、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、用量相関性は認められていない⁵⁻⁶⁾。

CrL:CD BR 系ラット雌雄各 10 匹に精製ナイシン（ナイシンとして 0、500、1,000、2,000 mg/kg 体重/日）を 28 日間強制経口投与したところ、一般状態、体重及び体重増加量、摂餌量、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、剖検所見及び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ていない。血液学的検査では、いくつかの項目に変化がみられ、臓器重量では、雌の高用量群において、肝臓重量が対照群に比べ有意に減少したが、この週齢と動物種で通常認められる範囲の値であり、生物学的意義はないとされている⁵⁻⁷⁾。

ビーグル犬雌雄各 2 匹に精製ナイシンを最大耐量（MTD：12 日間かけて 500、1,000、2,000 mg/kg 体重/日と増量）と固定用量（MTD 投与期間に続いて 2,000

mg/kg 体重/日を 7 日間) を強制経口投与したところ、MTD 及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、尿検査、臓器重量、剖検所見及び病理組織学的検査に投与に起因する変化はみられず、精製ナイシン 2,000 mg/kg 体重/日投与で毒性は認められていない⁵⁻⁸⁾。

ビーグル犬雌雄各 3 匹への精製ナイシン (ナイシンとして 0、150、500、2,000 mg/kg 体重/日) の強制経口投与により、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、剖検所見及び病理組織学的検査に投与に関連した変化はみられていない。雌の全投与群と高用量投与の雄で、対照群と比較して体重増加が減少し、雌の中、高用量群で摂餌量が減少した⁵⁻⁹⁾。

③亜慢性毒性試験

離乳 Birmingham-Wistar 系ラット 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 ($(2.00、3.01、4.01) \times 10^4$ U/g 飼料)、対照には非含有チーズを含む飼料を与えた。ナイシン投与群の体重、一般症状、行動及び剖検時の所見に対照群と差は認められなかった⁵⁻¹⁾。

ラット雌雄各 5 匹に 12 週間、飼料中濃度 10,000 RU/g のナイシン製剤 (生物学的力価、 10^6 RU/g) を混餌投与した結果、対照群と投与群の体重増加に差は認められず、投与群には何ら異常は認められなかった。投与群と対照群の雄の生殖率は同等 (100%) で、投与群と対照群の雌も同程度であった (それぞれ 90% と 85%)。すべての出生児は正常であった⁵⁻³⁾。

各群 5 匹の雄性 Wistar 系ラットに 0.5 ~ 5,000 U/kg 体重/日のナイシン製剤を 90 日間強制経口投与したところ、一般状態、体重増加、血液学的検査、臓器重量、主要臓器の病理組織学的検査において投与に起因した変化はみられなかった⁵⁻⁴⁾。

Birmingham-Wistar 系ラット各群雄 10 匹にナイシン加水分解物 (ナイシン製剤を 1.0 N 塩酸で加水分解し、脱水して活性炭処理後に再結晶したもの)、又はナイシン (3.33×10^6 U/kg 飼料) を 10 週間混餌投与した後、さらに 25 週間混餌投与したところ、ナイシン加水分解物を混餌投与した動物の体重増加に影響はなかった。個別ケージで飼育されたラットの脾臓重量の増加がみられたが、複数でケージに入れられた飼育群にはみられず、また、評価された他の指標には影響がみられなかったため、ストレスに起因すると結論されている⁵⁻¹⁾。

クロス・ブリード白色マウス雌雄にナイシン製剤 (生物学的力価、 10^6 IU/g) を 2 ヶ月間強制経口投与 (0、0.4、4.0、400 mg/kg 体重/日) したところ、雄の全投与群で体重増加の上昇がみられたが、生存率及び摂餌量には差はみられなかった⁵⁻¹⁰⁾。

クロス・ブリード白色マウス雌雄に 4.0 mg/kg 体重/日のナイシン製剤 (生物学的力価、 10^6 IU/g) を 3 ヶ月間強制経口投与したところ、投与 2.5 ヶ月後の生

存率が低下した⁵⁻¹⁰⁾。

④慢性毒性試験

Wistar 系ラット雌雄各 10 匹に 2.0 mg/kg 体重/日のナイシン製剤（生物学的力価、 10^6 IU/g）を通常の飼料を与える前にペースト状にして混餌投与した結果、ナイシン投与群の平均摂餌量は対照群と同程度で、摂水量は雌の投与群で高値を示した。血液 pH (blood alkalinity)、C 反応性蛋白、血液形態学的評価では、対照群と同程度であった⁵⁻¹⁰⁾。

⑤慢性毒性試験（／繁殖試験）

雌雄の Birmingham-Wistar 系ラットに基礎飼料又はナイシン製剤 3.33×10^4 U/kg 含有飼料、 3.33×10^6 U/kg 含有飼料を最長約 2 年間与えた。16 週間後、同一群の雌雄を交配させ、生殖能力を評価し、各投与群の出生児 (F1) の雌 30 匹と雄 10 匹に親 (F0) と同じ食餌を与えた。F0 の対照群と投与群では生存率及び生殖能力に差はみられず、F1 の血液学的検査、肝臓、腎臓、消化管の機能検査は正常であった。F0 及び F1 とともに、雄の投与群において体重増加の有意な減少がみられたが、摂餌量のわずかな低下に起因すると考えられている。なお、雌雄両世代とも臓器重量、肉眼的及び病理組織学的所見は正常であった⁵⁻¹⁾。

非げっ歯類を用いた慢性毒性試験は実施されていない。

⑥繁殖試験

3 世代 (F0、F1B、F2B) の CrL:CD BR 系ラットにナイシン製剤 0、0.2、1.0、5.0 % を含有する基礎飼料、及び対照群に 3.8 % 塩化ナトリウム含有飼料を与えた結果、F0 の雄高用量群で体重増加抑制が観察された。食餌効率、交配行動、妊娠率、妊娠期間、肉眼的病理検査について、投与に起因した変化はみられなかった。児動物について、出産後損失、同腹児数、死亡率、剖検所見、試験終了時の臓器重量及び病理組織学的検査、並びに同腹児重量及び児体重に投与に起因した変化はみられなかった。F2B では、同腹仔重量が対照群に比べ、全ての投与群でいくつかの時点において有意に増加した⁵⁻¹¹⁾。

⑦発がん性試験

発がん性試験は実施されていない。なお、ラット 2 年間投与試験の病理組織学的所見に異常はみられていない⁵⁻¹⁾。

⑧変異原性試験

Salmonella typhimurium (TA1535、TA1537、TA98、TA100) と大腸菌 (CM881、CM891) を用いた変異原性試験において、S9mix の有無にかかわらず、試験した全ての用量 (0 ~ 1,500 mg/プレート) において変異原性を示さなかった⁵⁻¹²⁾。

マウスリンパ腫 L5178Y 細胞を用いた変異原性試験において、S9mix の有無に

かかわらず、いずれの濃度（最低濃度 25 ~ 50、最高濃度 300 ~ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ）において変異原性を示さなかった⁵⁻¹³）。

植物性血球凝集素（PHA）の添加により全血培養におけるヒトリンパ球の分裂を刺激し、精製ナイシンに曝露させたところ、S9mix の有無にかかわらず、いずれの用量（62.5 ~ 500 $\mu\text{g/ml}$ ）でも染色体異常のある分裂中期の形状の割合に有意な増加はなく、染色体異常誘発性は認められていない⁵⁻¹⁴）。

In vivo マウス骨髄小核試験では、最高 2,000 mg/kg 体重/日のナイシン強制経口投与マウスの骨髄の多染性赤血球（PCE）において小核は誘発されておらず、染色体異常も誘発されていない⁵⁻¹⁵）。

⑨抗原性試験

モルモット回腸の収縮の測定による感作性の検討において、ナイシン製剤 50,000 U を 3 ヶ月間混餌投与した 3 匹の感作性は陰性であったが、等用量を単回腹腔内投与した 3 匹では全て陽性であった。これは、ナイシンが小腸内のタンパク分解酵素やペプチダーゼによって分解されることと整合するとされている⁵⁻¹）。

⑩一般薬理試験

一般薬理試験は実施されていない。

(2) 体内動態

①ヒトにおける試験

ナイシン約 200 RU/ml 含有のチョコレートミルクを、11 名に摂取させ、残存時間と口腔内細菌叢への影響を検討したところ、投与後の唾液中のナイシンは 1 分以内に大部分が消失し、5 分後には対照と同程度になった。10 分後の唾液中濃度が低下していない例もあったが、実験誤差とされている⁵⁻¹⁶）。

ボランティアに、ナイシン含有チョコレートミルク（25,000 IU/日）を 14 日間摂取させたところ、唾液中の一般細菌数及びナイシン耐性細菌数に対照群との差は認められなかった⁵⁻¹⁷）。

② *In vitro* 試験

ナイシン製剤 100 ~ 100,000 U/ml を唾液由来プチアリン（500 U/ml、pH6.8）又はトリプシン（1,000 H.U.M/ml、pH7.1）と反応させ、阻止円に及ぼす影響が検討された。いずれの実験においても、低濃度では阻止円の縮小が認められ、ナイシンの抗菌性は低下したが、高濃度では阻止円の縮小は認められなかった⁵⁻⁴）。

ナイシン 80 RU/ml [2 $\mu\text{g/ml}$] を 37°C で、濃度 2.5 ~ 25.6 mg/100ml のパンクレアチンと反応させたところ、2.5 mg/100ml 以外の濃度において、30 分後にはナイシン活性が 0 となり、ナイシンは速やかに分解された⁵⁻¹⁸）。

ナイシンは精製パンクレアチンと α -キモトリプシンによって分解され、精製トリプシンでは分解されなかったことから、パンクレアチンによるナイシンの分解は α -キモトリプシンによると結論されている⁵⁻¹⁹⁾。

In vitro 試験から、摂取されたナイシンはタンパク分解酵素により不活性化され、ナイシン分子としては吸収されないと予測され、*in vivo* におけるナイシンの代謝は、他のポリペプチド代謝と類似していると考えられている。

(3) 交差耐性

17種の頻用される医療用抗生物質の標的となる19種の一般的な病原微生物の感受性に、ナイシンが影響を与える可能性について検討すべく、各菌株を2.5 $\mu\text{g/ml}$ のナイシン含有培地又は非含有培地で24時間培養した後、抗生物質の最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。全てのグラム陰性細菌はナイシン非感受性であった。感受性菌である *Staphylococcus* 属では、ナイシン含有培地ではナイシンに対する感受性が低下した。ナイシン以外の17種の医療用抗生物質では、変化は散見されたが、有意とはみなされなかった。以上から、ナイシンによる医療用抗生物質に対する交差耐性は認められないとされている⁵⁻²⁰⁾。

(4) ナイシン様抗生物質産生菌のウシ及びヒトにおける存在

ウシ及びヒトの各種検体を調べた結果、ヒト鼻咽喉粘膜及び糞便から320倍希釈液で *Lactococcus agalactie* に対する増殖阻害能を有する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いた。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いた⁵⁻²¹⁾。

以上より、ナイシン様抗生物質産生菌は、頻度は低いが、ヒト腸内及びウシに常在していることから、ナイシンが腸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とされている。

(5) 一日摂取量の推計等

ラット2年間試験⁵⁻¹⁾の結果より、JECFA(1968)ではラットにおける無毒性量(NOEL)を最高用量の3,330,000 U/kg (83.3 mg/kg)として、ADIは33,000 U/kg体重と設定した²⁻⁴⁾が、原著論文によるとこの値は飼料中の濃度である^{注1)}。

米国FDAでは、1984年に、JECFAが評価に用いた2年間試験⁵⁻¹⁾の結果より、ナイシンのADIを2.9 mg/人/日と設定した旨公表しており^{2-2,11)}、これは体重60

注1 「Principles for the Safety Assessment of Food Additives and Contaminants in Food(JECFA, 1987)」において示されたラット(old)の食餌中濃度の換算係数(1ppm=0.050mg/kg体重/日)を採用すると、無毒性量は4.16 mg/kg体重/日となる。

kg 換算で、0.049 mg/kg 体重/日となる^{注2}。

欧州食品科学委員会（SCF）が1990年に発表した報告書²⁻¹³によると、SCFは、ラット及びマウスの急性毒性、亜急性並びに長期試験、及び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、さらに *in vitro* 及び *in vivo* の変異原性試験、繁殖試験、生殖毒性試験についてレビューし、遺伝毒性及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とし、近年の繁殖試験⁵⁻¹¹に基づき、ADIを0.13 mg/kg 体重と設定しているが、NOAEL等の評価の詳細な内容は発表されていない。

動物種	試験種類	試験期間	飼料中濃度	NOAEL 又は NOEL	備考
ラット	慢性毒性 /繁殖 5-1)	2年間	3.33×10 ⁴ 、 3.33×10 ⁶ U/kg 飼料 (0.83、83.3 mg/kg 飼料)	3.33×10 ⁶ U/kg 飼料 (83.3 mg/kg 飼料) (4.16 mg/kg/日相当) ^{注1}	JECFA (1968) ADI=3.3×10 ⁴ units/kg
				(4.9mg/kg/日相当)	FDA (1984) ADI=0.049 mg/kg/日
	繁殖 5-11)	26週間	0、0.2、1.0、5.0%	1.0%[12.85 mg/kg/日 (精製ナイシン)]	EU/SCF (1990) ADI=0.13 mg/kg/日

国民栄養調査を参考にして算出した1日推定摂取量は0.041 mg/kg 体重/日であり、ナイシンのADIは、米国における評価結果では、0.049 mg/kg 体重/日、EUにおける評価結果では、0.13 mg/kg 体重/日であることから、要請者はADI比をそれぞれ83.7%及び31.5%としている。

注2 FDAは、実験者の仮定に基づき、高用量群の投与量が1.96 × 10⁵ units/kg 体重に相当することからADIを算出している。

【引用文献】

- 2-2) Federal Register : 53 FR 11247 , Apr. 6, 1988, Food and Drug Administration, HHS.
- 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.
- 2-6) 21 CFR Ch.I (4-1-03 Edition) Food and Drug Administration, HHS.§184.1538 2003
- 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.
- 5-1) Frazer AC, Sharratt M, Hickman JR. The biological effects of food additives. I.-Nisin. *J. Sci. Food&Agri.* (1962) 13: 32-42.
- 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 TI. Nisin - its use, estimation and toxicity in sterilised milk. *Revista Espanola de Lecheria.* (1966) 59.
- 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. *J. Tokyo Med. Coll.* (1962) 20: 176 -207.
- 5-5) Hirsch A, Mattick ATR. Some recent applications of nisin. *The Lancet.* (1949) 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 AJ, Ignat'ev AD. Toxicological evaluation of some combinations of food preservatives. *Fd. Cosmet. Toxicol.*(1970) 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, June1981. 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 CR. Residence time of nisin in the oral cavity following consumption of chocolate milk containing nisin. *J. Dairy Sci.* (1966) 49: 314-316.
- 5-17) Cowell ND, Allen AR, Jarvis B. The in vivo effect of nisin on the microflora of the oral cavity. *J. Appl. Bact.* (1971) 34: 787-791.
- 5-18) Heinemann B, Williams R. Inactivation of nisin by pancreatin. *J. Dairy Sci.* (1966) 49: 312-314.
- 5-19) Jarvis B, Mahoney RR. Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin. *J. Dairy Sci.* (1969) 52: 1448-1450.
- 5-20) Hossack DJN, Bird MC, Fowler GG. The effects of nisin on the sensitivity of microorganisms to antibiotics and other chemotherapeutic agents. *Antimicrobials and Agriculture* (1983) 425-433.
- 5-21) Hirsch A, Wheater DM. The production of antibiotics by *Streptococci*. *J. Dairy Res.* (1951) 12: 193-197.

ナイシンの安全性に関する試験結果

試験	投与期間	動物種	投与方法	1群当たりの動物数	被験物質	投与量又は濃度	試験結果	参考資料
急性毒性	単回 (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 (2週間 観察)	ラット	経口	雌雄各 5	精製ナイシン (52.2×10^6 U/g)	2000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : >2000 mg/kg 体重	5-2
	単回 (7日間 観察)	ラット	強制経口	3	ナイシン製剤 (10^6 U/g)	(0.5, 1.0, 1.5) $\times 10^6$ RU/kg 体重	LD ₅₀ : $>1.5 \times 10^6$ U/kg 体重	5-3
	単回	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	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みられたが、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
	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
	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 (平均投与量 14 ml/kg/日)	最高濃度 2000 mg/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
					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 ($(49.1-51.1) \times 10^6$ 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	
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) $\times 10^7$ IU/kg 飼料	投与群と対照群との間に体重、一般状態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
	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、受精率の差はみられず、胎児は全て正常であった。投与群に異常はみられなかった。	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	(ナイシンとして) 3.33 × 10 ⁶ U/kg 飼料	体重増加抑制はみられなかった。1 匹ごとの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	ナイシン製剤 (10 ⁶ IU/g)	0.4、4.0、400 mg/kg 体重/ 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	ナイシン製剤 (10 ⁶ IU/g)	4 mg/kg 体重/ 日	投与後 2.5 ヶ月の生存率が低下し た。	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 体重/ 日	平均摂餌量は変化なし。摂水量が雌 で若干高値を示した。血液 pH、C 反応性蛋白、血液形態学的評価は対 照群と同程度であった。	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	投与群と対照群との間に、生存率、 繁殖行動、臓器重量、肉眼的及び病 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	混餌		ナイシン製剤 (10 ⁶ IU/g)	0、0.2、1.0、 5.0%	投与群と対照群との間に、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。	5-11
変異 原性		サルモネラ 菌、 大腸菌	<i>in vitro</i>		精製ナイシン (52.2 × 10 ⁶ IU/g)	5、15、50、 150、500、 1500 µg/plate	代謝活性化の有無にかかわらず陰 性。(使用菌株: <i>Salmonella typhirium</i> TA 1535、1537、98、100、 <i>E. coli</i> CM881、891)	5-12
	(予備 試験)	マウスリンパ L5178	<i>in vitro</i>		精製ナイシン (51.6 × 10 ⁶ IU/g)	3.3-1000 µg/ ml (6 濃度)	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
	(本試 験)	Y 細胞				25-10000 µg/ ml (7 濃度)		
	処理時 間 21、 45 時間	ヒト培 養リン パ球	<i>in vitro</i>		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、及び処理時間の 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
単回 2 回 (2 日間)	マウス	経口		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	
抗原性	3 ヶ月 間	モルモ ット	混餌	各 3 (対 照 2)	精製ナイシン (10 ⁶ RU/g)	50000 U/匹	感作性は示さなかった。	5-1
	3 週間		腹腔内				投与後に感作性を示した。	

*1 対照群は雌 3 匹、雄 2 匹からなる。

*2 1 匹ごとにケ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 匹ずつケージで飼育し 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。