

ナisinを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isin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における芽胞の発芽後生育を低濃度で阻害する。

ナisin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isin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isin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isin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isin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isin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)

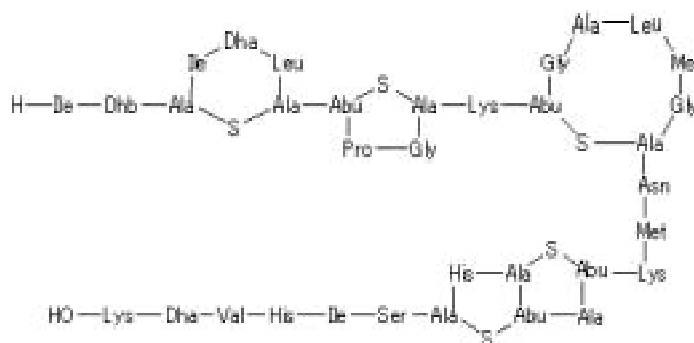
英名：Nisin

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、においがいいか又は
はわずかに特異なにお
いがある。



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

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:CD₁ 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⁾。

CrI:CD₁ 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isin 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isin (ナisin 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 雄性ラット(各群 10 匹)からなる 6 群に 12 週間、投与群にはナisin 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isin 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isin 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 ラット(各群 5 匹)に 0.5 ～ 5,000 U/kg 体重/日のナisin 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 雄性ラット(各群雄 10 匹)にナisin 加水分解物(ナisin 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isin (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isin 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⁾。

白色マウス(雑種)(雌雄各 25 匹、(体重 8 ～ 10 g 又は 15 ～ 20 g) にナisin 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。2 ヶ月間投与後に実施した 50%食餌制限では、高用量群で対照群の 43%に対して 70%と高い死亡率を示した⁵⁻¹⁰⁾。

白色マウス(雑種)(雌雄各 50 匹、(体重 8 ～ 10 g) 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。3ヶ月間投与後に実施した90%食餌制限の後では、死亡率は対照群で56.3%に対し、投与群では84.6%と高値を示した⁵⁻¹⁰⁾。

上記の白色マウス（雑種）を用いた試験については、対照群の死亡率が異常に高いこと、ナイシン投与群における死亡率が非常に高いにもかかわらず死因についての記載がないこと等から、試験自体が非常に粗雑でデータの信頼性が低いため、評価の対象とはしないこととする。

④慢性毒性試験

Wistar 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18ヶ月間混餌投与した結果、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 ラット（雌雄各10匹）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。雌の高用量群で腎臓、卵巣及び子宮の相対重量が有意に増加したが、肉眼的及び病理組織学的所見に特記すべき異常は認められなかった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 Crj:CD-1 BR 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遺伝毒性試験

Salmonella typhimurium (TA98、TA100、TA1535、TA1537) と大腸菌 (WP2/pKM101、WP2uvrA/pKA101) を用いた精製ナイシンの復帰突然変異試験において、S9mix の有無にかかわらず、試験した全ての用量 (0 ~ 1,500 µg/プレート) において遺伝毒性を示さなかった⁵⁻¹²⁾。

マウスリンパ腫 L5178Y 細胞を用いた精製ナイシンの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 µg/mL) においても遺伝毒性を示さなかった⁵⁻¹³⁾。

ヒトリンパ球初代培養細胞を用いた精製ナイシンの染色体異常試験において、S9mix の有無にかかわらず、いずれの用量 (62.5 ~ 500 µg/mL) において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 マウス骨髓小核試験では、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髓の多染性赤血球 (PCE) において小核の誘発は認められず、生体内における染色体異常誘発性はないものと考えられる示さなかった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、pH 6.8) 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 µg/mL] を 37 °C で、濃度 2.5 ～ 25.6 mg/100 mL のパンクレアチンと反応させたところ、2.5 mg/100 mL 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 µg/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。

6 国際機関等における評価

(1) JECFA における評価

JECFA では、1968 年に、ラット 2 年間試験⁵⁻¹⁾の結果よりラットにおける無毒性

量（NOAEL）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}。

なお、細菌抵抗性について、細菌においてナisin以外の抗生物質治療に影響する交差耐性が生じることを示した包括的な微生物学的研究は示されておらず、ナisinの抗菌活性は上部消化管におけるタンパク質の分解消化により即座に失われるため、腸内細菌叢に対する影響が示されることはないとされている。

（２）米国 FDA における評価

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isinの ADI を 2.9 mg/ヒト/日と設定した旨公表しており^{2-2), 2-11)}、これは体重 60 kg 換算で、0.049 mg/kg 体重/日となる^{注 2}。

なお、ナisinはパンクレアチン（腸内酵素製剤）により分解されることから、腸内細菌叢に影響はないものと考えられ、重要な病原性微生物における交差耐性が生じたという報告はないとされている。

（３）欧州食品科学委員会（SCF）における評価

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^{注 3}。

なお、本報告書中で引用されているレポートでは、感受性菌である *Staphylococcus* 属がナisin自身に耐性を示す証拠があるが、微生物がナisinに暴露されることにより、抗生物質やその他の治療薬に対し耐性を生じる可能性はほとんどないとされている。

動物種	試験 種類	試験 期間	飼料中濃度	NOAEL 又は NOEL	備考
-----	----------	----------	-------	------------------	----

注 1 ナisin 1 g は 40×10^6 units に相当し⁵⁻¹⁾、「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（1 ppm=0.050 mg/kg 体重/日）を採用すると、NOAEL は 4.16 mg/kg 体重/日となる。

注 2 FDA は、実験者の仮定（ラットの体重を 250 g、摂餌量を 15 g と仮定）に基づき、高用量群の投与量が 1.96×10^5 units/kg 体重に相当することから ADI を算出している。

注 3 注 1 で用いた換算係数を採用すると、ナisin製剤（ナisin 2.5%含有⁵⁻¹¹⁾）1.0%投与群の投与量は 12.5 mg/kg 体重/日に相当する。

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 体重/日相当) ^{注1} (4.9mg/kg 体重/日相当) ^{注2}	JECFA (1968) ADI=3.3×10 ⁴ units/kg
	繁殖 5-11)	26 週間	0、0.2、1.0、5.0%	1.0% [12.5 mg/kg 体重/日 (精製ナイシン) ^{注3}]	FDA (1984) ADI=0.049 mg/kg/日 EU/SCF (1990) ADI=0.13 mg/kg/日

7 一日推定摂取量の推計

米国では、プロセルチーズスプレッド、フランクフルトのケーシング等を使用されており、ナタマイシンの食品からの及び EU における一日推定摂取量はについて、それぞれ 2.15 mg/ヒト/日 (体重 60 kg として 0.036 mg/kg 体重/日) とされている^{2-2), 2-9), a)}。また、EU では、チーズ等に使用されており、推定摂取量は 0.008 mg/kg 体重/日との情報がある^{2-12), b) ~~2-2), 2-9), 2-12), a), b)~~}。

要請者により提案されている使用基準案に基づき、添加物として使用された場合のわが国における推定摂取量は、の国民栄養調査を参考にして算出するとした一日推定摂取量は 0.041 mg/kg 体重/日と算出されている^{2-5), 5-22)}。――

(評価結果)

ナイシンについて、in vitro 及び in vivo における遺伝毒性試験において全て陰性の結果が得られており、生体にとって問題となる遺伝毒性を有するとは考えられず、また発がん性を有するものではないと考えられる。

【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.
- 2-5) 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.
- 2-9) Agency Response Letter GRAS Notice No.GRN 000065.
- 2-11) Memorandum of November 9, 1984, from Alfred N. Milbert to Jphn 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, 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 No. 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 No. 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 No. 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, 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 No. 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 No. 1334/5-1052, January 1996 and Protocol.

Unpublished Confidential Report.

- 5-16) Claypool L, Heinemann B, Voris L, 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, Wheeler DM. The production of antibiotics by *Streptococci*. *J. Dairy Res.* (1951) 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）**
- a) DANISCO CONFIDENTIAL NISIN Feb 2003（非公開資料）
- b) Danisco **社からの E メール（非公開資料）**

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)	2,000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : >2,000 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) × 10 ⁶ RU/kg 体重	LD ₅₀ : >1.5 × 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)	6,000-8,000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : 6,950 mg/kg 体重	5-4
			腹腔内	10	ナイシン製剤 (10 ⁶ U/g)	3,500-6,000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : 4,750 mg/kg 体重	
			皮下注	10	ナイシン製剤 (10 ⁶ U/g)	3,500-5,000 mg/kg 体重	LD ₅₀ : 4,450 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 : >1,000 mg/kg 体重	
亜急性毒性	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、1,000、2,000 mg/kg 体重/日	雄でヘモグロビン濃度、赤血球数、血球容積に用量に相関した減少がみられた。雌でも低値を示したが、用量相関性はなかった。	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、1,000、2,000 mg/kg 体重/日	投与に関連した変化はみられなかった。	5-7
	12日間 (MTD Phase)/ 7日間 (Fixed Dose Phase)	イヌ	経口	雌雄各2	MTD Phase : 精製ナイシン (51.6 × 10 ⁶ IU/g) Fixed Dose Phase : 精製ナイシン (50.6 × 10 ⁶ IU/g)	500、1,000、2,000 mg/kg 体重/日と増量 2000 mg/kg 体重/日	投与に起因する変化はみられず、2,000 mg/kg 体重/日投与で毒性はみられなかった。	5-8
	28日間	イヌ	経口	雌雄各3	精製ナイシン (49.1-51.1) × 10 ⁶ IU/g)	0、150、500、2000 mg/kg 体重/日	雌の全投与群と雄の高用量投与群で体重増加が減少し、雌の中・高用量群で摂餌量が減少した。	5-9
亜慢性毒性	12週間	ラット	混餌	雄10	ナイシン製剤 (10 ⁶ U/g) (ナイシン含有チーズ混合飼料)	(0、2.00、3.00、4.01) × 10 ⁴ IU/kg 飼料 1,000、1,500、2,005 IU/kg 体重/日*4	投与群と対照群との間に体重、一般状態及び行動及び剖検時の所見に差は認められなかった。	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 500 RU/kg 体重/日*4	投与群と対照群との間に体重増加、生殖率の差はみられず、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 ~ 5,000 U/kg 体重/日	投与に起因した変化はみられなかった。	5-4

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
	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	体重増加に影響はみられなかった。個別ケージで飼育したラットの脾臓重量の増加がみられたが、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。	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)	4.0 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)	2.0 mg/kg 体重/日	平均摂餌量は変化なし。摂水量が雌で高値を示した。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 <u>$1,665$、$166,500$ U/kg 体重/日</u>	雌の高用量群で腎臓、卵巣及び子宮の相対重量が有意に増加したが、肉眼的及び病理組織学的所見に異常は認められなかった。 [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% <u>$(0.25、1.25、6.25) \times 10^6$ IU/kg 体重/日</u> *4	投与に起因した変化はみられなかった。	5-11
遺伝毒性		TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2pKM101, WP2uvrA/pKA101	in vitro		精製ナイシン (52.2×10^6 IU/g)	5、15、50、150、500、1,500 µg/plate	代謝活性化の有無にかかわらず陰性。	5-12
	(予備試験)	マウスリンパ L5178Y	in vitro		精製ナイシン (51.6×10^6 IU/g)	3.3-1,000 µg/mL (6 濃度)	予備試験では、100-1,000 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遺伝毒性は示さなかった。	5-13
	(本試験)	細胞				25-10,000 µg/mL (7 濃度)		
	処理時間 21、45 時間	ヒトリンパ球初代培養細胞	in vitro		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、1,000、2,000 mg/kg 体重	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)	50,000 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。

*4 「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) の体重 (0.40 kg) 及び摂餌量 (20 g) に基づく事務局換算。