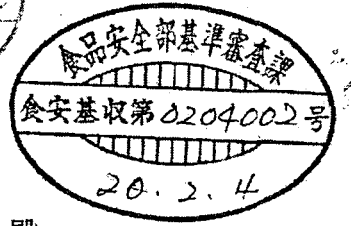
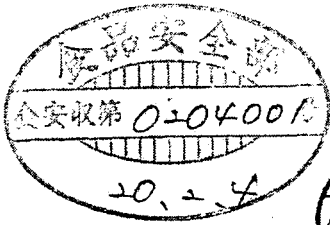




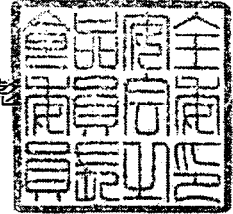
資料 1-3



府食第 00108号
平成 20年 1月 31日

厚生労働大臣
舛添 要一 殿

食品安全委員会
委員長 見上 彪



食品健康影響評価の結果の通知について

平成15年10月20日付け厚生労働省発食安第1020002号をもって貴省から当委員会に意見を求められたナイシンに係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

ナイシンの一日摂取許容量を 0.13 mg/kg 体重/日と設定する。

添加物評価書

ナイシン

2008年1月

食品安全委員会

目次

○ 審議の経緯.....	1
○ 食品安全委員会委員名簿.....	1
○ 食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿.....	1
○ ナイシンを添加物として定めることに係る食品健康影響評価に関する審議結果.....	3
・ 要約	3
1. はじめに.....	5
2. 背景等.....	5
3. 添加物指定の概要.....	5
4. 物理化学的性質等.....	6
5. 安全性.....	6
(1) 体内動態.....	6
(2) 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.....	7
(3) 微生物の耐性.....	7
(4) 毒性.....	8
①急性毒性.....	8
②亜急性毒性.....	8
③慢性毒性.....	11
④慢性毒性(/繁殖毒性).....	11
⑤発がん性.....	11
⑥繁殖毒性.....	11
⑦遺伝毒性.....	12
⑧抗原性.....	12
⑨一般薬理.....	12
6. 国際機関等における安全性評価.....	12
(1) JECFA における評価.....	12
(2) 米国食品医薬品庁 (FDA) における評価.....	13
(3) 欧州食品科学委員会 (SCF) における評価.....	13
7. 一日摂取量の推計.....	14
8. 評価結果.....	14
【引用文献】.....	17
安全性試験結果一覧.....	20
(別添)ナイシンの使用予定食品及び推定摂取量.....	23

〈審議の経緯〉

平成15年10月20日	厚生労働大臣から添加物の指定に係る食品健康影響評価について要請、関係書類の接受
平成15年10月23日	第21回食品安全委員会（要請事項説明）
平成16年4月9日	第7回添加物専門調査会
平成16年11月16日	第14回添加物専門調査会
平成17年1月26日	第17回添加物専門調査会
平成19年7月30日	第46回添加物専門調査会
平成19年8月27日	第47回添加物専門調査会
平成19年8月30日	第204回食品安全委員会（報告）
平成19年8月30日	
から平成19年9月28日	国民からの意見・情報の募集
平成19年12月25日	第52回添加物専門調査会
平成20年1月29日	添加物専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
平成20年1月31日	第224回食品安全委員会（報告） （同日付け厚生労働大臣に通知）

〈食品安全委員会委員〉

平成18年6月30日まで

寺田 雅昭（委員長）	中村 靖彦
寺尾 允男（委員長代理）	本間 清一
小泉 直子	見上 彪
坂本 元子	

平成18年12月20日まで

寺田 雅昭（委員長）	野村 一正
見上 彪（委員長代理）	畑江 敬子
小泉 直子	本間 清一
長尾 拓	

平成18年12月21日から

見上 彪（委員長）	畑江 敬子
小泉 直子（委員長代理*）	廣瀬 雅雄**
長尾 拓	本間 清一

野村 一正

*平成19年2月1日から

**平成19年4月1日から

〈食品安全委員会添加物専門調査会専門委員〉

平成15年9月25日から平成17年9月30日まで

福島 昭治（座長）	大野 泰雄
山添 康（座長代理）	西川 秋佳
井上 和秀	林 真
今井田 克己	三森 国敏
江馬 眞	吉池 信男

平成19年9月30日まで

福島 昭治（座長）	久保田 紀久枝
山添 康（座長代理）	中島 恵美

石塚 真由美
井上 和秀
今井田 克己
江馬 眞
大野 泰雄

西川 秋佳
林 眞
三森 国敏
吉池 信男

平成19年10月1日から

福島 昭治 (座長)
山添 康 (座長代理)
石塚 真由美
井上 和秀
今井田 克己
梅村 隆志
江馬 眞

久保田 紀久枝
頭金 正博
中江 大
中島 恵美
林 眞
三森 国敏
吉池 信男

〈参考人〉

河村 葉子
中澤 裕之

ナイシンを添加物として定めることに係る 食品健康影響評価に関する審議結果

要 約

保存料として使用される添加物「ナイシン」(CAS 番号: 1414-45-5)について、各種試験成績等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に供した試験成績は、ナイシン及びそれを含有する製剤もしくは加水分解物を被験物質としたものも含め、反復投与毒性、発がん性、生殖発生毒性、遺伝毒性等である。

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。

JECFA 及び米国 FDA が根拠としているラット 2 年間慢性毒性試験は、1960 年代に実施された試験であり信頼性が担保できないことから、一日摂取許容量 (ADI) 設定には用いず、あくまで評価の参考に用いることとした。

欧州 SCF の評価の根拠とされているラット 3 世代繁殖毒性試験については、親動物 F0 の 5.0% 投与群の雄群で認められた体重増加抑制、児動物 F2B の 5.0% 投与群で認められた低体重を根拠に、無毒性量 (NOAEL) は 1.0% (12.5 mg/kg 体重/日相当) と評価した。

追加資料として提出されたラットの 90 日間反復投与毒性試験では、5.0% 投与群の雌雄で認められた血液学的検査項目 (MCH、HGB 等) の変動を根拠に、NOAEL は 1.0% (45 mg/kg 体重/日相当) と評価した。

以上より、ナイシンの NOAEL の最小値は、ラット 3 世代繁殖毒性試験の 1.0% (12.5 mg/kg 体重/日相当) と考えられることから、安全係数を 100 とし、ナイシンの ADI を 0.13 mg/kg 体重/日と設定した。

現時点で得られている知見から判断して、添加物として適切に使用される場合においては、交差耐性を含む耐性菌出現による医療上の問題を生じる可能性は極めて少ないと考えられる。

なお、ナイシンを添加物として適切に使用するためには、使用基準を慎重に検討することが重要であり、欧米における使用状況を勘案した上で、耐性菌出現により有効性等に影響を及ぼすことがないよう十分な配慮が必要と考えられる。

また、新たな知見が得られた場合には、必要に応じて再評価を検討する必要があると考える。

糖培地を用いて製造されたナイシン製剤（変更工程品）は、乳培地を用いて製造されたナイシン製剤（従来工程品）と同等の力価を有し、より純度が高く、また、乳由来の不純物の含有がないことから乳アレルギーのリスクの低減化が図れると考える。以上から、従来工程品の評価結果は変更工程品の評価にも適用することが可能であると判断した。

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*) が産生する 34 個のアミノ酸から成るペプチド (ランチビオティック^{注1}系バクテリオシン^{注2}) で、*Bacillus* 属と *Clostridium* 属を含むグラム陽性菌の熱処理後における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 (Generally Recognized as Safe ; 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¹⁾。欧州連合 (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 (E234)²⁾。

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) では、第 12 回 (1968 年) 会議においてナイシンが評価され、ラットの 2 年間慢性毒性試験の結果より、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³⁾。

(*原著によると、3,330,000 U/kg は飼料中濃度である。9 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、①JECFA 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、関係企業からの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、アイスクリーム類、乳飲料、ホイップクリーム、ハム、ソーセージ類、たれ、つゆ、ドレッシング、フラワーペースト類、洋菓子、卵加工品、生菓子、魚介乾製品、魚肉練り製品、いくら、すじこ、たらこ、辛子明太子、かずのこ調味加工品、豆腐、味噌、麴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。

注1 乳酸菌バクテリオシンは一般的に 3 つあるいは 4 つのクラスに分けられ、クラス I はランチビオティックと呼ばれ、細胞膜攻撃性の耐熱性低分子ペプチド (分子量 5,000 未満) である。

注2 細菌が産生し、別の細菌を殺すことができる抗菌性タンパク質あるいはペプチド。

4 物理化学的性質等³⁾

ナイシン^{注3}

英名：Nisin

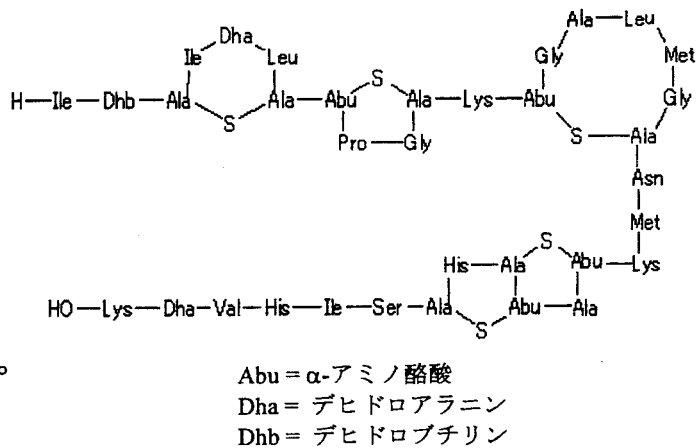
CAS 番号：1414-45-5

化学式：C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇

分子量：3354.07

性状：白色～淡黄白色の粉末で、においがいいか又はわずかに特異なにおいがある。

ナイシン製剤は、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の培養液から得られたナイシン A を主成分とした塩化ナトリウム (NaCl) との混合物であり、1 mg 当たり 900 IU^{注4} 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 4~5×10⁴ IU 程度のナイシンを含む。



乳培地を用いて製造されたナイシン製剤（従来工程品）と糖培地を用いて製造されたナイシン製剤（変更工程品）について、組成分析、HPLC 及び SDS-PAGE による分析に関する資料に基づき評価した。その結果、組成の比較から、変更工程品は従来工程品と同等の力価を有し、より純度が高く、ナイシン A 以外のタンパク質の残留物質、脂質、炭水化物及び乳糖の含有が少ないと考えられた⁴⁾。HPLC による分析により、従来工程品、変更工程品においてともに共通のピークが検出され、そのピークはナイシン A と同定された。また、従来工程品においてはナイシン A 以外にも主要なピークが認められた⁵⁾⁻⁷⁾。SDS-PAGE 分析においても同様の結果であった⁸⁾。

5 安全性

(1) 体内動態

①ヒトにおける試験

ナイシン約 200 RU^{注4}/mL [5 µg/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

^{注3} 本評価書でいうところのナイシンは、ナイシン A である。

^{注4} U : Unit

IU : International Unit

RU : Reading Unit

1 ml ミルク中の *Streptococcus agalacticae* の 1 細胞を阻害するのに必要なナイシン量 (DANISCO 社より)
H.U.M : Hoemoglobin Unit of Mochida (Anson 氏の Hoemoglobin 法による)

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⁹⁾。

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¹⁰⁾。

② *In vitro* 試験

ナイシン製剤 100~100,000 U^{注4)}/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^{注4)}/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¹¹⁾。

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¹²⁾。

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¹³⁾。

In vitro 試験から、摂取されたナイシンはタンパク質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。

(2) 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 agalactiae* 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¹⁴⁾。

ナイシン様抗生物質産生菌は、頻度は低いですがヒト及びウシの腸内や鼻腔内に常在している¹⁴⁾こと、摂取されたナイシンはタンパク質分解酵素により不活性化されると予測される¹¹⁾⁻¹³⁾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を崩す可能性は低いと考えられる。

(3) 微生物の耐性^{注5)}

ナイシンは、*L. lactis* が産生する 34 個のアミノ酸から成るランチビオティック系バクテリオシンであり、広範囲のグラム陽性菌とその芽胞に対し抗菌活性を有する。作用機序としては、細胞膜に作用して膜孔を形成することにより、膜電位や膜内外

^{注5)} 一般に、環境条件や化学物質などに対する抵抗性。抗生物質に対する細菌の抵抗力など。

の pH 勾配あるいは、その両者のバランスを崩し細胞死を引き起こすことが考えられている¹⁵⁾。

バクテリオシン感受性の *Listeria monocytogenes* などの菌を高濃度のバクテリオシン存在下で培養すると耐性変異株が出現するとの報告があり、このような耐性は、一般的に細胞膜の構造変化（特にリン脂質組成変化）に起因するとされている¹⁵⁾。

また、ナイシン耐性 *Listeria* 属の細菌が、他のクラスのバクテリオシン（ペディオシン等）に対し、感受性低下を示すとの報告もある¹⁶⁾⁻¹⁹⁾。

ナイシンへの暴露は、*L. monocytogenes* の抗生物質アンピシリンとクロラムフェニコールに対する耐性菌出現頻度に影響を与えない、種々のグラム陽性病原菌において、抗生物質多剤耐性獲得はナイシンに対する感受性に影響を与えない、ナイシンと 33 種の抗生物質間の交差耐性^{注6)}を調査した結果、*Staphylococcus aureus* のペニシリン耐性菌は野性株に比べナイシンに対して 50 倍以上の高い感受性を示した等の研究から、バクテリオシン耐性が抗生物質に対して交差耐性を示す可能性は極めて低いと考えられるとされている¹⁵⁾。

また、頻用される医療用抗生物質の標的となる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るために、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。その他の医療用抗生物質に対しては、有意な感受性の低下は認められなかった。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²⁰⁾。

ナイシンは、その化学構造、物性、作用機序、交差耐性、消化管酵素による影響などから、一般に言われる抗生物質又は抗菌性物質とは異なる範疇の物質と言える。海外における使用経験からも特段問題となる報告はなく、食品添加物として使用しても、ヒト腸内細菌をはじめとする各菌種に影響を与える可能性は極めて低いと考えられる。

(4) 毒性

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²¹⁾、マウスへの経口投与での LD₅₀ は 6,950 mg/kg 体重¹¹⁾等が報告されている。

②亜急性毒性

白色マウス（雑種）（雌雄各 25 匹、体重 8~10 g 又は 15~20 g）にナイシン製

注6 ある薬物に対して形成された耐性が、他の薬物にもみられること。

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²²⁾。

白色マウス（雑種）（雌雄各50匹、体重8~10g）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²²⁾。

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した。

CrI:CDBR ラット（雌雄各5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10日間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、赤血球数及び平均赤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²³⁾。

CrI:CDBR 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、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²⁴⁾。

離乳 Birmingham-Wistar 雄性ラット（各群10匹）に12週間、投与群にはナイシン含有チーズ（(0、2.00、3.01、4.01) $\times 10^7$ U/g 飼料；(0、1.0、1.51、2.01) $\times 10^6$ U/kg 体重/日²⁵⁾）、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、一般状態、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²⁶⁾。

ラット（雌雄各5匹）に12週間、ナイシン製剤（生物学的力価： 10^6 RU/g、飼料中濃度0、10,000 RU/g；0、 0.5×10^6 RU/kg 体重/日²⁵⁾）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²⁷⁾。

雄性 Wistar ラット（各群5匹）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、血液学的検査、臓器重量、主要