

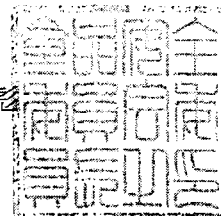
府食第00108号
平成20年1月31日

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あっては、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。

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对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、pH 7.1) 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*Listetia*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¹¹⁾。

Birmingham-Wistar雄性ラット（各群10匹）にナイシン加水分解物（ナイシン製剤を1.0N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同様の変化はみられず、また、評価された他の指標には影響がみられなかったことから、ストレスに起因すると結論されている²⁶⁾。

F344/DuCrjラット（雌雄各群10匹）にナイシンA（生物学的力価：3,000 IU/mg、飼料中濃度0、0.2、1.0及び5.0%；約0、120、600、3,000 mg/kg体重/日相当、参照対照群3.712%NaCl添加飼料（5.0%ナイシンA添加飼料中のNaCl含量；約2,200 mg/kg体重/日相当）を90日間反復投与したところ、投与期間中に死亡例はみられず、一般状態、体重、摂餌量、眼科的検査及び肉眼的病理検査において被験物質に起因すると考えられる変化は認められなかった。5.0%投与群の雌雄で血色素量（HGB）の上昇、平均赤血球色素量（MCH）の上昇、5.0%投与群の雌で平均赤血球血色素濃度（MCHC）の上昇が認められた。

ナイシンA投与群において、摂水量の高値、尿検査における尿量の高値、尿中Na及びClの高値、尿中Kの低値、血液生化学的検査におけるNaの低値、腎臓の絶対重量及び相対重量の高値、病理組織学的検査における前胃の境界線における扁平上皮過形成が観察された²⁸⁾。しかし、これらの変化は参照対照群においても観察されており、被験物質に含まれるNaClに起因する変化と考えられる。なお、血液生化学的検査の総コレステロール（T-CHO）及びリン脂質（PL）の用量相関的な減少は、参照対照群では認められておらず、ナイシンの影響による影響と考えられるが、毒性学的な意義はないと考える。

よって、ナイシンのNOAELは1.0%（ナイシン1gは 40×10^6 IUに相当することから、45 mg/kg体重/日相当）と考えられる。

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0（対照群）、あるいは500、1,000、2,000 mg/kg体重/日と増量）と固定用量（対照群について、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おいて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/日投与での毒性は認められていない²⁹⁾。

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28日間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結果では、投与に関連した変化はみられていない。2,000 mg/kg

体重/日投与群の雄及び150 mg/kg体重/日投与群以上の雌で、対照群と比較して体重増加抑制がみられ、500 mg/kg体重/日投与群以上の雌で摂餌量の減少が認められた³⁰⁾。

③慢性毒性

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反応性蛋白及び血液形態学的評価は、対照群と同程度であった²²⁾。

④慢性毒性（／繁殖毒性）

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（1,665、166,500 U/kg体重/日²⁵⁾）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、これは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。よって、ナイシンのNOAELは 3.33×10^6 U/kg含有飼料と考えられる（JECFAは、4.16 mg/kg体重/日相当と換算し、FDAは、4.9 mg/kg体重/日相当と換算している）²⁶⁾、注7、注8。

非げっ歯類を用いた慢性毒性試験は実施されていない。

⑤発がん性

発がん性試験は実施されていない。なお、ラット2年間慢性毒性試験の病理組織学的所見に異常はみられていない²⁶⁾。

⑥繁殖毒性

3世代（F0、F1B、F2B）のCrI:CDBRラット（各群雄12匹、雌24匹）にナイシン製剤0、0.2、1.0、5.0%を含有する基礎飼料（ $(0, 0.1, 0.5, 2.5) \times 10^6$ IU/kg体重/

注7 ナイシン1gは 40×10^6 Uに相当し²¹⁾、「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8 FDAは、実験者の仮定（ラットの体重を250g、摂餌量を15gと仮定）に基づき、高用量群の投与量が 1.96×10^5 U/kg体重（4.9 mg/kg体重）に相当することから、ADIを0.049 mg/kg体重/日と算出している。

日²⁵⁾)、並びに参照対照群としてNaClを3.8%含有する飼料を与えた。親動物については、F0の5.0%投与群の雄群で体重増加抑制が観察されたが、食餌効率、交配行動、妊娠率、妊娠期間、肉眼的病理検査では、投与に起因した変化はみられなかった。児動物については、生存率、同腹児数、剖検所見、試験終了時の臓器重量及び病理組織学的検査に投与に起因した変化はみられなかったが、F2Bの5.0%投与群で低体重が観察された³¹⁾。よって、ナイシンのNOAELは1.0% (12.5 mg/kg体重/日相当) と考えられる^{注9)}。

⑦遺伝毒性

Salmonella typhimurium (TA98、TA100、TA1535、TA1537) と *Escherichia coli* (WP2/pKM101、WP2uvrA/pKM101) 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) において陰性であった³²⁾。

マウスリンパ腫L5178Y細胞を用いた精製ナイシンの遺伝毒性試験において、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) においても陰性であった³³⁾。

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誘発性は認められていない³⁴⁾。

*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³⁵⁾。

⑧抗原性

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 mg (50,000 U) /日を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質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²⁶⁾。

⑨一般薬理

一般薬理試験は実施されていない。

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年間慢性毒性試験²⁶⁾の結果よりラットにおける

^{注9)} 注7で用いた換算係数を採用すると、ナイシン製剤(ナイシン2.5%含有²⁶⁾)1.0%投与群の投与量は12.5 mg/kg体重/日に相当する。

NOAELを最高用量の3,330,000 U/kgとして、ADIは33,000 U/kgと設定した³⁾が、原著論文によるとこの値は飼料中の濃度である。ヒト体重あたり、かつmg単位に換算すると、NOAELは4.16 mg/kg体重/日に相当し、ADIは0.042 mg/kg体重/日となる^{注7}。

なお、細菌抵抗性について、細菌においてナイシン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、ナイシン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。

2007年の第68回JECFA会合において、従来の乳培地を用いて製造されたナイシン製剤に加え、糖培地を用いて製造されたナイシン製剤についても成分規格に含めるための変更がなされた³⁶⁾。

(2) 米国食品医薬品庁 (FDA) における評価

米国FDAでは、1984年に、JECFAが評価に用いたラット2年間慢性毒性試験²⁶⁾の結果より、ナイシンのADIを2.9 mg/ヒト/日と設定した旨公表しており^{37), 38)}、これは体重60 kg換算で、0.049 mg/kg体重/日となる^{注8}。

なお、ナイシンはパンクレアチン(腸内酵素)により分解されることから、腸内細菌叢に影響を与えないと考えられ、病原微生物の交差耐性に影響するとの報告はないとしている。

(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³⁹⁾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、及びラットの繁殖毒性試験について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*の遺伝毒性試験、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、3世代繁殖毒性試験の結果³¹⁾に基づき、ADIを0.13 mg/kg体重/日と設定しているが、NOAEL等の評価の詳細な内容は発表されていない^{注9}。

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* 属がナイシン自身に耐性を示す証拠があるが、微生物がナイシン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している。

2006年1月、欧州食品安全機関(EFSA)のAFCパネルは、ADI 0.13 mg/kg体重/日を変更しなければならなくなるような新しいデータはないとしている。また、ナイシンはトリプシンとパンクレアチンにより不活性化されることから腸内細菌叢には影響しないと推察するとともに、食品へのナイシン使用により耐性を生じる懸念はないと指摘している⁴⁰⁾。

2006年10月にAFCパネルは、糖培地を用いて製造されたナイシン(製剤)は、

従来の乳培地を用いて製造されたナisin（製剤）と同等であるが、より純度が高く、タンパク質（ナisinA以外）の残留物質、脂肪、炭水化物及び乳糖の含有が少ないと評価している。その上で、ADI 0.13 mg/kg体重/日を変更する必要はないことを確認するとともに、乳製品に対するアレルギーのリスクを回避できるだろうと結論している⁴¹⁾。

| 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 ²⁶⁾ | 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 ⁷⁾ | JECFA(1968) ADI=3.3×10 ⁴ U/kg (0.042 mg/kg 体重/日) |
| | | | | [4.9 mg/kg体重/日相当 ⁸⁾ | FDA(1984) ADI=0.049 mg/kg 体重/日 |
| | 繁殖 ³¹⁾ | 26週間 | 0、0.2、1.0、5.0% | 1.0% [12.5 mg/kg体重/日相当 ⁹⁾ | EU/SCF(1990) ADI=0.13 mg/kg 体重/日 |

7 一日推定摂取量の推計

米国では、プロセスチーズスプレッド、フランクフルトのケーシング等に使用されており、ナisinの食品からの推定摂取量は 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^{22), 37), 42)}。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), 43)}。

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、国民健康・栄養調査を参考にして算出すると 0.045 mg/kg体重/日とされている（別添：ナisinの使用予定品目及び推定摂取量）⁴⁴⁾。

8 評価結果

ナisin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、兎動物 F2B の 5.0%投与群で認められた低体重を根拠に、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。安全係数は、繁殖毒性試験で認められている毒性が重篤なものではないことから、通常の 100 を適用することとした。

上記を踏まえ、ナイシンの ADI は、0.13 mg/kg 体重/日と評価した。

| | |
|----------------|-----------------------|
| ADI | 0.13 mg/kg 体重/日 |
| (ADI 設定根拠資料) | 3 世代繁殖毒性試験 |
| (動物種) | ラット |
| (投与方法) | 混餌投与 |
| (NOAEL 設定根拠所見) | F0 : 体重増加抑制、F2B : 低体重 |
| (NOAEL) | 12.5 mg/kg 体重/日 |
| (安全係数) | 100 |

ナイシンは、グラム陽性菌の芽胞の生育を阻害する乳酸菌バクテリオシン (ペプチド) であり、上部腸管でパンクレアチン等により分解され、不活化される。

耐性菌の選択に関する専門家の意見のポイントは以下のとおりである。

- ・経口摂取したとしても体内には吸収されず、腸管への移行も少量であり、また、移行したナイシンは腸内酵素により分解又は不活性化されと考えられ、下部腸管における腸内細菌叢への影響も極めて少ない。
- ・近年、リステリア菌のナイシン耐性及び他のバクテリオシンとの交差耐性に関する報告があるものの、医療用抗生物質との交差耐性は実験的に認められておらず、医療上の問題となったとの臨床における報告も得られていない。
- ・仮に添加物としての使用により、耐性菌が選択されるとしても、海外における長期の使用経験の中で、ヒトの健康に重大な影響を及ぼしたとする報告は現時点で得られていない。

以上、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あっては、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。