

合がある。これらの特徴を有するグラム陰性桿菌の集落が見出された場合は白金線を用いて TSI 斜面寒天培地の深部と斜面に疑われる集落を接種し、35～37℃で 18～24 時間培養する。サルモネラが存在する場合、深部は黄色となり、斜面部は赤色のまま変化しない。通常、深部でガスの産生が見られるが、硫化水素は産生される場合とされない場合がある。キット使用を含む、更に詳細な生化学的試験と血清学的試験を併用することで、サルモネラの同定、型別試験を行うことが望ましい。

培地の性能試験

試験には、非病原性又は病原性の弱いサルモネラ菌株を、乳糖ブイヨン培地を用い、30～35℃で18～24時間培養して使用する。次に、ペプトン食塩緩衝液、リン酸緩衝液、乳糖ブイヨン培地等を用いて、1ml当たり約1,000個の生菌を含む菌液を調製する。約1,000個/mlの生菌を含むサルモネラの菌液0.1mlを混和して培地の有効性を試験する。

再試験

不確定な結果やあいまいな結果が得られた場合は、初回の2.5倍量の試料を用いて再試験を行う。方法は最初の試験法と同じであるが、試料の増加に比例して、培地などの量を増加させて行う。

培地

(i) テトラチオネート液体培地

カゼイン製ペプトン	2.5g
肉製ペプトン	2.5g
デソキシコール酸ナトリウム	1.0g
炭酸カルシウム	10.0g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	30.0g
水	1,000ml

全成分を煮沸して溶かす。使用当日に水 20ml にヨウ化カリウム 5g 及びヨウ素 6g を溶かした液を加える。更に滅菌ブリリアントグリーン溶液 (1→1,000) 10ml を加え、混和する。その後は培地に熱を加えてはならない。

(ii) ラパポート液体培地

ダイズ製ペプトン	5.0g
塩化ナトリウム	8.0g
リン酸二水素カリウム	1.6g
マラカイトグリーンシュウ酸塩	0.12g
塩化マグネシウム 6 水和物	40.0g
水	1,000ml

マラカイトグリーンシュウ酸塩と塩化マグネシウム 6 水和物及び残りの成分をそれぞれ別々に水に溶かして、121℃で 15～20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後、混和して使用する。液性は pH 5.4～5.8。

(iii) ブリリアントグリーン寒天培地

ペプトン(肉製及びカゼイン製)	10.0g
酵母エキス	3.0g
塩化ナトリウム	5.0g

乳糖 1 水和物	10.0g
白糖	10.0g
フェノールレッド	0.080g
ブリリアントグリーン	0.0125g
寒天	20.0g
水	1,000ml

全成分を混和し、1 分間煮沸する。使用直前に 121℃で 15～20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の液性は pH 6.7～7.1。約 50℃に冷却してペトリ皿に分注する。

(iv) XLD(キシロース・リジン・デソキシコール酸)寒天培地

D-キシロース	3.5g
塩酸 L-リジン	5.0g
乳糖 1 水和物	7.5g
白糖	7.5g
塩化ナトリウム	5.0g
酵母エキス	3.0g
フェノールレッド	0.080g
デソキシコール酸ナトリウム	2.5g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	6.8g
クエン酸アンモニウム鉄(III)	0.80g
寒天	13.5g
水	1,000ml

全成分を混和し、煮沸して溶かす。煮沸後の液性は pH 7.2～7.6。高圧蒸気滅菌をしてはならない。過剰な加熱は避ける。約 50℃に冷却してペトリ皿に分注する。

(v) TSI(トリプルシュガーアイアン)寒天培地

カゼイン製ペプトン	10.0g
肉製ペプトン	10.0g
乳糖 1 水和物	10.0g
白糖	10.0g
ブドウ糖	1.0g
硫酸アンモニウム鉄(II)6 水和物	0.20g
塩化ナトリウム	5.0g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	0.20g
フェノールレッド	0.025g
寒天	13.0g
水	1,000ml

全成分を混和し、煮沸して溶かした後、小試験管に分注して、121℃で 15～20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の液性は pH7.1～7.5。斜面寒天培地として使用する。なお、上記の組み合わせに加えて、肉エキスや酵母エキス 3g を含むものや、硫酸アンモニウム鉄(II)6 水和物の代わりにクエン酸アンモニウム鉄(III)を含むものも使用して差し支えない。

定量法 (1) 力価

穿孔寒天平板を用いて得られる試験菌の発育阻止円の大きさを指標として、抗菌活性を測定する。水、試薬・試液及び計器・器具は、必要に応じ、滅菌したものを用いる。

- (i) 試験菌 *Micrococcus luteus* (ATCC 10240, NCIMB 8166)を用いる。
- (ii) 培地 培地の液性は水酸化ナトリウム試液又は塩酸(1→10)を用いて調整し、滅菌後の液性が規定の値になるようにする。なお、規定の培地と類似の成分を有し、同等又はより優れた菌の発育を示す他の培地を用いることができる。滅菌は高圧蒸気法で行う。

① 種層用寒天培地

トリプトン	10 g
肉汁	3 g
塩化ナトリウム	3 g
酵母エキス	1.5 g
ショ糖	1 g
寒天	15 g
水	1,000 ml

全成分を混和し、121℃、15分間滅菌する。滅菌後の液性はpH7.4～7.6とする。滅菌後、培地と同温度の50%ポリソルベート20溶液を2ml添加する。

② 試験菌移植用斜面寒天培地

ブレインハートインフュージョン寒天	52g
水	1,000 ml

全成分を混和し、121℃、15分間滅菌する。滅菌後の液性はpH7.2～7.6とする。この寒天培地9mlを内径約16mmの試験管に分注して斜面とする。

- (iii) 試験菌液の調製 試験菌を試験菌移植用斜面寒天培地を用いて30℃で48時間培養する。この菌を滅菌した生理食塩水7mlに懸濁させ、試験菌液とする。菌を移植した試験菌移植用斜面寒天培地は4℃で最大14日間保存することができる。

- (iv) 種層寒天培地の調製 試験菌液を生理食塩水で希釈した液(1→10)2mlを48～51℃に保った種層用寒天培地100mlに加え、十分に混合し、種層寒天培地とする。

- (v) 穿孔寒天平板の調製 内径90mmで高さ20mmのペトリ皿に約20mlの種層寒天培地を入れ、寒天が水平になるように広げて室温にて固化させたものを種層寒天平板とする。種層寒天平板上の半径約25～28mmの円周上に、円筒をその中心間の距離が30mm以上となるように一定間隔で4個並べる。円筒を置いた状態で種層寒天培地20mlを分注し、固化させた後、4℃にて30～60分保持し、滅菌したピンセット等を用いて培地より円筒を静かに抜き、穿孔寒天平板とする。円筒は、外径7.9～8.1mm、内径5.9～6.1mm、高さ9.9～10.1mmのステンレス製のもので、試験に支障をきたさないものを用いる。穿孔寒天平板は用時調製する。

- (vi) ナイシン標準液の調製 ナイシン標準品約0.1gを精密に量り、塩酸(1→600)80mlに懸濁する。2時間室温に置き、塩酸(1→600)を加えて100mlとし、これを標準原液とする。更に1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0(単位/ml)となるよう、標準原液を塩酸(1→600)を用いて希釈し、標準液とする。ナイシン標準液は用時調製する。

- (vii) ナイシン標準曲線の作成 穿孔寒天平板 5 枚を 1 組として用いる。 ナイシン標準液を濃度ごとに異なる穿孔寒天平板へ 0.2ml ずつ 4 箇所 の 穴 に入 入 れ る。標準液分注後、プレートに蓋をし、30℃で 18 時間培養する。培養後、形成された阻止円の直径をノギスを用いて 0.1mm 単位で測定する。ナイシン濃度 x (単位/ml) の常用対数值 $\log x$ を横軸に、阻止円の直径 y (mm) を縦軸にとり、ナイシン標準曲線 ($y = \alpha \log x + \beta$) を作成し、定数 α 及び β を求める。
- (viii) 検液の調製 本品約 0.1g を精密に量り、塩酸(1→600)80ml に懸濁する。2 時間室温に置き、更に塩酸(1→600)を加えて 100 ml とし、試料液とする。試料液 1ml を正確に量り、塩酸(1→600)を用いて 200ml とし、検液とする。検液は用時調製する。
- (ix) 力価の算出 標準曲線の作成の手法に従い、検液の阻止円の直径を測定し、以下の式により、本品の力価を求める。

$$I = \frac{\text{阻止円の直径(mm)} - \beta}{\alpha}$$

検液の力価 = 10^I (単位/ml)

$$\text{本品の力価} = \frac{\text{検液の力価(単位/ml)} \times 20}{\text{試料の採取量(g)}} \quad (\text{単位/mg})$$

(2) 塩化ナトリウムの定量

本品約 0.1g を精密に量り、水 100ml を加えて溶かし、さらに硝酸を加えて酸性とし、指示電極に銀電極、参照電極に銀・塩化銀電極を用い、0.1mol/L 硝酸銀溶液で滴定する。別に空試験を行い補正して消費量 a ml を求め、次式により含量を求める

$$\text{塩化ナトリウム (NaCl) の含量} = \frac{a \times 5.85}{\text{試料の採取量(g)} \times 10} \quad (\%)$$

試薬・試液

生理食塩水 日本薬局方生理食塩液を用いる。

ブレインハートインフュージョン寒天 微生物試験用に製造したもの。

トリプトン 微生物試験用に製造したもの

50%ポリソルベート 20 溶液 ポリソルベート 20 と水を 1 : 1 の割合で混合し、121℃で 15 分間高圧蒸気滅菌を行う。

マラカイトグリーンシュウ酸塩 $C_{52}H_{54}N_4O_{12}$ [マラカイトグリーン(しゅう酸塩), K 8878]

リトマス [K 8940:1961] 本品は、青～帯紫青色の粉末又は塊で、水又はエタノールに溶け、その溶液は青～紫青色を呈する。

確認試験 本品 0.5g を温水 50ml に溶かし、赤色を呈するまで希硫酸を滴加し、10 分間煮沸する。この間青色を呈するときは赤色となるまで希硫酸を滴加する。さらに、紫色を呈するまで水酸化バリウム飽和溶液を加えてろ過し、A 液とする。煮沸して冷却した水 100ml に A 液 0.5ml 及び塩酸(1→120)0.05mlを加えるとき、赤色を呈する。また、煮沸して冷却した水 100ml に A 液 0.5ml 及び水酸化ナトリウム(1→250)0.05mlを加えるとき、青色を呈する。

リトマスミルク 脱脂粉乳 10g, リトマス 0.05g 及び無水硫酸ナトリウム 0.05g に水 100ml を
加えて混和する。用時調製する。

リン酸一カリウム リン酸二水素カリウムを見よ

リン酸二水素カリウム KH_2PO_4 [りん酸二水素カリウム, K 9007]

リン酸三ナトリウム 12 水和物 $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ [りん酸三ナトリウム・12 水, K 9012]

ナイシン標準品 厚生労働大臣の登録を受けた者が製造する標準品

ナイシンの規格設定の根拠

主に、JECFA 規格及び FCC 規格を参考とし、EU の食品添加物規格も参考に成分規格案を設定した。なお、本品は、原体としてではなく、塩化ナトリウムを含む製剤としてのみ流通するため、ナイシンの製剤として規格を設定した。

名称、構造式、分子式及び分子量

名称は、JECFA 規格及び FCC 規格では Nisin Preparation、EU では Nisin (製剤規格) とされている。製剤としてのみ流通することから、製剤の文字を省略し、単に「ナイシン」とした。今回の指定の対象となっているのはナイシン A であるため、構造式、分子式及び分子量については、Nisin A のものを採用した。なお、分子量は、JECFA では約 3354、FCC では～3348、EU では 3354.12 としているが、2005 年の原子量表に基づき、3354.07 とした。

定義

JECFA において、ナイシンは、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が産生する関連性が高い抗菌性ポリペプチドの混合物であり、活量調整のために添加される塩化ナトリウム、及び無脂肪乳固形分又はその他の発酵源由来の固形分を含むことが定義されている。FCC では *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 菌株が産生する関連性が高いポリペプチドの混合物であり、活量調整のために、塩化ナトリウム及び固形無脂肪乳を加えると記載されている。EU においては、*Streptococcus lactis* (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* の旧菌株名) から産生される数種の関連性の高いポリペプチドから成ると定義されている。本規格案では、菌名は、JECFA 及び FCC に準拠した。また、抗菌活性の本質はナイシン A であることから、明確に定義する為、「主たる抗菌性ポリペプチドはナイシン A である。」と記載した。また、培地 (乳培地又は糖培地) 由来の成分を含むことから、そのことを記載した。

含 量

JECFA、FCC 及び EU とともに、900 国際単位/mg 以上と設定されており、これらの規格に準拠し、単位当たりのナイシン量を明確に示した。また、本品は塩化ナトリウムを加えて、活性を調整した製剤であり、JECFA、FCC 及び EU において、塩化ナトリウムの含量を規定しているため、本規格案でも採用した。

性 状

JECFA においては白～淡褐色の微粉末、FCC では白色の流動性粉末 (free-flowing powder) とされている。色については JIS 色名帳 (JIS Z 8102) に準拠した。

確認試験

JECFA 及び FCC とともに他の抗菌剤との識別を確認する為、酸に対する安定性及び *Lactococcus lactis* のナイシンに対する耐性試験を設定している。JECFA、FCC に準拠して設定した。

純度試験

- (1) 鉛 JECFA では1 mg/kg 以下, FCC では2 mg/kg 以下, EU では, 5mg/kg と設定されている。JECFA に準拠し, 1.0µg/g と設定した。
- (2) ヒ素 JECFA, FCC とともに設定されていないが, EU に As として 1mg/kg と設定されている。本規格案では EU の規格を踏まえ, As₂O₃ として 2.0µg/g とした。

乾燥減量

JECFA, FCC 及び EU とともに 3.0% で設定されている。これらの規格に準拠し, 設定した。

微生物限度

JECFA 及び FCC において, 微生物限度が設定されていることから, 本規格案でも, 採用した。JECFA では, サルモネラ陰性(試料 25g), 大腸菌群 30/g, 大腸菌陰性(試料 25g)が規定され, 一方, FCC では, 生菌数 10cfu/g, 大腸菌陰性(試料 25g), サルモネラ陰性(試料 25g)が規定されている。本規格案では, FCC 規格に準じ, 生菌数, 大腸菌及びサルモネラを設定し, 試験法は, 一般試験法及び日本薬局方に準拠した。ただし, 生菌数試験では発育阻止が認められたため, 試験液濃度を 1mg/ml とし, 100ml を試験に用い, メンブランフィルターの材質を規定した。また, 大腸菌試験では, 本品の抗菌性を考慮し, 「本品 1g を量り, 乳糖ブイヨン培地と混和して 100ml とし, 30~35℃ で 24~72 時間培養する。」とした。サルモネラ試験では, 本品の抗菌性を考慮し, 前培養にはソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 500ml を用いることとし, 選択培地は試験法の検討に用いたものに限定した。

定量法

(1) 力価

JECFA では試験菌に *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* を用い, 比色法による力価測定法を採用している。JECFA の比色法では目視により検液と標準液を比較し, 計算を行っているため, 半定量的である。一方, FCC では, *Micrococcus luteus* を試験菌として用い, 穿孔平板法により得られる発育阻止円の大きさを指標として力価測定を採用している。FCC の方法は, 発育阻止円の標準曲線に基づき定量的に力価測定ができる。本規格では, FCC の規格に準拠した。ただし, 培地の調製方法は, より感度が高く, 検量線の直線性が良好となる方法を採用した。

(2) 塩化ナトリウム

JECFA では及び FCC では, 指示薬を用いて滴定を行っているが, いずれも操作が煩雑であるため, 本規格案では, 電位差滴定を採用した。

JECFA または FCC 等に設定され, 本規格では採用しなかった項目

JECFA では, 「溶解性」として, 「水に可溶, 無極性溶媒に不溶」としているが, 確認試験として, 溶解性の項を設定する必要はないと考えられるため, 本規格案では溶解性に係る規格は採用しないこととした。

他の規格との対比表

	本規格案	JECFA	FCC	EU
品名	ナイシン	Nisin Preparation	Nisin Preparation	Nisin
CAS No.	1414-45-5	1414-45-5	1414-45-5	
Einecs No.				215-807-5
化学式	$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$	$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$	$C_{143}H_{230}O_{37}N_{42}S_7$	$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$
分子量	3354.07	約3354	~3348	3354.12
定義	本品は、 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> の培養液から得られた抗菌性ポリペプチドの塩化ナトリウムとの混合物である。無脂肪乳培地又は糖培地由来の成分を含む。主たる抗菌性ポリペプチドはナイシンAである。	<i>Lactococcus lactis</i> , subsp. <i>lactis</i> により産生される関連性の高い抗菌性ポリペプチドの混合物。ナイシンは固形無脂肪乳又は無乳培養源(酵母抽出物、炭水化物)の減菌培地で産生される。ナイシンはいろいろな方法で回収される。ナイシン製剤は、ナイシンと塩化ナトリウムからなり、900IU/mg以上の活量を持つ。活量は、塩化ナトリウムの添加によって調整する。製剤には、固形無脂肪乳又はその他の発酵源が存在する。ナイシン製剤は室温及び酸性下での加熱に安定である。	成長に適した培養液中で、ランスフィールド分類N群の <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> により産生される関連性の高いポリペプチドの混合物である。ナイシンは、いろいろな方法で回収される。製品は、ナイシンと塩化ナトリウムからなり、活性度が900IU/mg以上となるよう、塩化ナトリウムと無脂肪乳固形物の添加により調整されている。(Description)	ナイシンはランスフィールド分類N群の <i>Streptococcus lactis</i> の自然菌株から産生される数種の関連性の高いポリペプチドから成る。
含量	ナイシン 900単位 / mg 以上	ナイシン 900 IU / mg 以上	ナイシン900 IU / mg以上	ナイシン 900 IU / mg 以上
	塩化ナトリウム 50%以上	塩化ナトリウム 50%以上	塩化ナトリウム 50.0%以上 (Requirements)	塩化ナトリウム 50%以上
性状	本品は白~うすい黄赤色の粉末でにおいがなく又はわずかに特異なおいがある	白~うす茶色の微粉末	白色, free-flowing powder.	白色粉末
確認試験				
他の抗菌物質との区別	・酸に対する安定性 ・高濃度ナイシンに対する <i>Lactococcus lactis</i> の耐性	・酸に対する安定性 ・高濃度ナイシンに対する <i>Lactococcus lactis</i> の耐性	・酸に対する安定性 ・高濃度ナイシンに対する <i>Lactococcus lactis</i> の耐性	—
溶解性	設定しない	水に可溶, 無極性溶媒に不溶	—	—
純度試験				
鉛	1.0 µg/g以下	1mg/kg 以下	2mg/kg以下	5mg/kg以下
ヒ素	2.0 µg/g以下 (1g, 第3法, 装置B)	—	—	1mg/kg以下
重金属 (Pbとして)	設定しない	—	—	10mg/kg以下
水銀	設定しない	—	—	1mg/kg以下
乾燥減量	3.0%以下 (105°C, 2時間)	3.0%以下 (105°C, 2時間)	3.0%以下 (105°C, 2時間)	3%以下 (102~103°C, 恒量)
微生物限度				
細菌数	1gにつき100以下	—	10 CFU/g	—
大腸菌	陰性 (試料1g中)	陰性 (試料25g中)	陰性 (試料25g中)	—
サルモネラ菌	陰性 (試料10g中)	陰性 (試料25g中)	陰性 (試料25g中)	—
大腸菌群	設定しない	30以下/g	—	—
定量法				
(1)力価	<i>Micrococcus</i> を用いた発育阻止円サイズによる力価の測定	<i>Lactococcus</i> を用いた比色法による力価の測定	<i>Micrococcus</i> を用いた発育阻止円サイズによる力価の測定	—
(2)塩化ナトリウム	0.1mol/L硝酸銀溶液で滴定(電位差滴定)	0.1N硝酸銀で滴定(ジクロロフルオロセイン)	過剰の硝酸銀を0.2Nチオシアン酸アンモニウム溶液で滴定(硫酸アンモニウム鉄試液)	

(参考)

これまでの経緯

平成15年10月20日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに添加物の指定に係る食品健康影響評価について依頼
平成15年10月23日	第15回食品安全委員会（依頼事項説明）
平成16年4月9日	第7回食品安全委員会添加物専門調査会
平成16年11月16日	第14回食品安全委員会添加物専門調査会
平成17年1月26日	第17回食品安全委員会添加物専門調査会
平成19年7月30日	第46回食品安全委員会添加物専門調査会
平成19年8月27日	第47回食品安全委員会添加物専門調査会
平成19年8月30日	第204回食品安全委員会（報告）
～平成19年9月28日	食品安全委員会における国民からの意見聴取
平成19年9月13日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
平成19年9月26日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会
平成19年10月24日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会
平成20年1月31日	第224回食品安全委員会（報告）
	食品安全委員会より食品健康影響評価が通知
平成20年2月28日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会
平成20年4月21日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
平成20年5月20日	国際貿易機関への通報（WTO通報）
～平成20年7月18日	
平成20年5月20日	国民からの意見聴取
～平成20年7月XX日	
平成20年9月24日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会
平成20年10月10日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会

● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会

(平成19年9月26日、平成19年10月24日、平成20年2月28日開催)

[委員]

石田 裕美	女子栄養大学教授
井手 速雄	東邦大学薬学部教授
井部 明広	東京都健康安全研究センター
北田 善三	畿央大学健康科学部教授
佐藤 恭子	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部第一室長
棚元 憲一	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長
○ 長尾 美奈子	共立薬科大学客員教授
堀江 正一	埼玉県衛生研究所水・食品担当部長
米谷 民雄	国立医薬品食品衛生研究所食品部長
山内 明子	日本生活協同組合連合会組織推進本部 本部長
山川 隆	東京大学大学院農学生命科学研究科准教授
山添 康	東北大学大学院薬学研究科教授
吉池 信男	独立行政法人国立健康・栄養研究所研究企画評価主幹

(○：部会長)

(平成20年9月24日開催)

[委員]

石田 裕美	女子栄養大学教授
井手 速雄	東邦大学薬学部教授
井部 明広	東京都健康安全研究センター
北田 善三	畿央大学健康科学部教授
佐藤 恭子	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部第一室長
棚元 憲一	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長
○ 長尾 美奈子	慶應義塾大学薬学部客員教授
堀江 正一	埼玉県衛生研究所水・食品担当部長
米谷 民雄	静岡県立大学 食品栄養科学部 客員教授
山内 明子	日本生活協同組合連合会組織推進本部 本部長
山川 隆	東京大学大学院農学生命科学研究科准教授
山添 康	東北大学大学院薬学研究科教授
吉池 信男	青森県立保健大学健康科学部 栄養学科長 公衆栄養学教授
由田 克士	独立行政法人国立健康・栄養研究所 栄養疫学プログラム国民健康・栄養調査プロジェクトリーダー

(○：部会長)

食品添加物の規格基準(ナイシン)に係わるご意見の募集結果について(回答案)

	ご意見・情報の概要	回答案
1	<p>(成分規格(定量法(1)力価について))</p> <p>① (v)穿孔寒天平板の調製法が日本薬局方に記載されている方法と比較して、複雑なのですが、日本薬局方のおりでは、問題があるのでしょうか？</p> <p>② (vi)ナイシン標準液の調製において、0.02 mol/L塩酸80 mLに懸濁する。とあるのですが、実際は溶解すると思いますが、いかがでしょうか？また、その後の操作で2時間室温に置くところなのですが、この操作は必要なのでしょうか？</p> <p>③ ナイシン標準液は用時調製と記載がありますが、標準原液の保存条件及び使用期限は設定されているのでしょうか？</p> <p>④ (vii)ナイシン標準曲線の作成ですが、同一平板で同一の標準液を注入しているようですが、平板間の補正は必要ないのでしょうか？旧日本抗生物質医薬品基準に記載されている標準曲線法では、中心濃度の標準液を用いて、平板間の誤差を補正して標準曲線を作成しております。培養器内の温度分布を考慮すると、補正をしたほうが誤差がないように思いますがいかがでしょうか？</p> <p>⑤ (viii)ナイシン濃度測定についても、上記②、④と同様のことが言えないでしょうか？</p> <p>⑥ (ix)力価の算出において、中心濃度の標準液で補正するのであれば、旧日本抗生物質医薬品基準の手法を適用すべきと思います。</p>	<p>ナイシンは、国際汎用添加物であるとともに企業からの指定要請品目であったため、規格試験法は、国際規格も踏まえうえて、基本的には要請者から提出された方法を採用しました。</p> <p>① 日本薬局方の穿孔寒天平板の調製法は、穿孔装置が必要なため、規格に採用しませんでした。また、本法は指定要請者から提出された調製法ですが、FCC規格の方法に比べて、感度が高く、良好な標準曲線が得られたために採用しました。同等性が確保できれば、日本薬局方に記載されている方法を用いても差し支えありません。</p> <p>②、⑤FCCの試験法に準拠したものです。ナイシンには、製造時に用いられた培地の成分も含まれており、試料によっては溶け残りがみられることがあるため、「懸濁」としました。「2時間室温に置く」操作は、乾燥したナイシンを溶液にした時に、しばらくは活性が十分とならない場合があることから適切な状態にするために行うものです。FCCの試験法にも規定されており、必要な操作と考えています。</p> <p>③妥当性確認を行った試験方法を踏まえ規定したものであり、ナイシン標準原液も含め、用時調製とします。(参考情報:FCC規格では、標準原液は4℃で7日間まで保存、または用時調製とされています。)</p> <p>④、⑤、⑥規格試験法で問題ないことを確認しています。</p>
2	<p>(成分規格等)</p> <p>①「ナイシン」としての指定の対象は「ナイシンA」であるが、規格においてナイシンZの混入について規定されていない。このため、規格に「その他の抗菌性ポリペプチド」の項目を設け、規制対象とする抗菌性ポリペプチドとその上限を定める必要がある。</p> <p>②わが国と中国とで使用基準が異なり、使用できる品目や最大使用量に相違がある。このため、定量分析を含めた検査法を確立する必要がある。また、ナイシンZが使用される可能性があるため、これを同定する方法も確立する必要がある。</p> <p>③指定要請においては、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」(「ガイドライン」)に従い、食品中の食品添加物の分析法を国立医薬品食品衛生研究所がバリデーションチェックをした上で、食品添加物部会で審議する必要があるのではないかと。また、「ガイドライン」には、「同様の目的を持つ他の食品添加物との分離定量に留意すること。」と記載されているので、食品中のナイシンAとナイシンZの分離定量法を確立する必要がある。</p>	<p>ナイシンの成分規格については、JECFA、米国及びEUの成分規格との整合性にも配慮したうえで、その品質確保を図るうえで必要な項目を規格として設定しており、ナイシンZの混入について規定する項目を設定することは考えておりません。</p> <p>ナイシンの食品中の分析法については、ナイシンAとナイシンZを分離同定する方法も含め、国立医薬品食品衛生研究所で検討を進めており、ナイシンの添加物指定に合わせて当該分析法の通知を行うことを予定しています。</p>

3	<p>(表示)</p> <p>味噌の製造工程においてナイシンが人為的に使用された場合には、製造用剤であっても適切に表示がなされるようにしていただきたい。</p>	<p>添加物の表示については、食品衛生法第19条に基づき、原則として食品に使用した添加物は、加工助剤等の一部例外を除いては全て表示することが義務づけられており、これらの表示基準に合致しない者の販売等は禁止されております。なお、加工助剤と見なされるためには、次の条件を満たす必要があります。</p>
4	<p>(表示)</p> <p>ナイシンの用途については、既存添加物 ε-ポリリンとの整合性を保つために、保存料のみとし、製造用剤とすることを認めず、表示免除させてはならない。公衆衛生上の見地のみでなく、消費者の選択に資するために明確に表示させるべきである。</p>	<p>「食品の加工の際に添加されたが、①最終食品として包装する前に食品から除去されるもの、②食品中に通常存在する成分に変えられ、食品中に天然に存在するその成分の量を有意に増加させないもの、③最終食品中にごくわずかなレベルでしか存在せず、その食品になら影響を及ぼさないもの、のいずれかに該当すること。」</p> <p>ナイシンを味噌等の製造工程において製造用剤として使用した場合においても、その他の添加物の取扱いと同様、加工助剤の定義に該当する場合を除いては、食品への添加物表示が必要となります。</p>
5	<p>(その他)</p> <p>①使用実績の具体的データを示してください、味噌などに使用許可しないでください。</p> <p>②抗生物質を食品添加物として指定しないで下さい</p> <p>③ナイシン耐性菌に関するモニタリングを行なってください。</p>	<p>ナイシンは、国際基準であるコーデックス規格に記載されている添加物であり、既に欧米等では、クリーム製品、チーズ、小麦粉製品、食肉製品、液卵製品等での使用が認められています。</p> <p>ナイシンを添加物として指定するにあたっては、食品安全委員会における食品健康影響評価として、食品安全委員会添加物専門調査会において、微生物の専門家からご意見を伺い、耐性菌出現による医療上の問題についても検討が行われるなど十分な審議が行われたものと考えております。なお、ナイシンの指定にあたっては、耐性菌に関する情報を収集し、問題となるような新たな知見があれば速やかに報告するよう事業者等に対して周知を図るとともに、必要に応じて再評価を検討する等、適切に対処していきたいと考えております。</p>
6	<p>(その他)</p> <p>「国際汎用添加物」の「ナイシン」はナイシンAに限定されるものではないため、ナイシンZとの関係を明確にする必要がある。</p>	<p>国際汎用添加物として指定の評価・検討を行った「ナイシン」は、米国、EU及びJECFAでも評価がなされているナイシンAであり、成分規格においても「主たる抗菌性ポリペプチドはナイシンAである。」と規定しています。ナイシンZを添加物として使用する場合には、新たに指定要請を行っていただく必要があります。</p>

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会報告書及び答申の修正について(ナイシンの成分規格)

項目	旧	新
性状	本品は、白～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。	本品は、白～うすい黄赤色の粉末で、においがいいか又はわずかに特異なにおいがある。
確認試験(1)	本品0.100gを正確に量り、 <u>0.2 μmのフィルターを通して滅菌した0.02mol/L塩酸80mlに懸濁する。2時間室温に置き、更に0.02mol/L塩酸を加えて100mlする。この液1mlを正確に量り、0.02mol/L塩酸を用いて200mlとし、比較液とする。比較液20mlを5分間煮沸し、検液とする。検液及び比較液につき、定量法に示す方法により、力価を測定するとき、検液の力価は、比較液の力価の100±5%である。別に検液20mlに5mol/L水酸化ナトリウムを加えてpH11に調整した後、65℃、30分間加熱する。冷後、塩酸を加えてpH2.0に調整し、定量法に示す方法により、力価を測定するとき、その活性は失われている。</u>	本品0.100gを正確に量り、 <u>塩酸(1→600)80mlに懸濁する。2時間室温に置き、更に塩酸(1→600)を加えて100mlとし、試料液とする。</u> (i) <u>試料液を水浴中で5分間加熱する。加熱した試料液1mlを正確に量り、塩酸(1→600)を用いて200mlとし、検液とする。この検液につき、定量法に示す方法により力価を求めるとき、検液の力価は、定量法の検液の力価の100±5%である。</u> (ii) (i)の加熱した試料液の残りの液に、 <u>水酸化ナトリウム溶液(1→5)を加えてpH11に調整した後、65℃、30分間加熱する。冷後、塩酸を加えてpH2.0に調整し、この液1mlを量り、塩酸(1→600)を用いて200mlとし、検液とする。定量法に示す方法により、力価を測定するとき、その活性は失われている。</u>
確認試験(2)	滅菌した脱脂粉乳の水溶液(1→10)中でLactococcus lactis(ATCC 11454又はNCIMB 8586)を30℃、18時間培養し、試験菌液とする。...	滅菌した脱脂粉乳の懸濁液(1→10)中でLactococcus lactis(ATCC 11454又はNCIMB 8586)を30℃、18時間培養し、試験菌液とする。...
純度試験(1)鉛	Pbとして1.0 μg/g以下 本品10.0gを量り、 <u>5mlの硫酸を入れた耐熱性ビーカーに入れ、徐々に加熱し、更に硫酸少量を加え、できるだけ低温でほとんど灰化する。さらに、500℃で灰化するまで強熱した後、放冷する。...</u>	Pbとして1.0 μg/g以下 本品10.0gを量り、 <u>硫酸5mlを入れた耐熱性ビーカーに入れ、徐々に加熱し、更に硫酸少量を加え、できるだけ低温でほとんど灰化する。更に500℃で灰化するまで強熱した後、放冷する。...</u>
	...酢酸ブチル層をとり、検液とする。...	...酢酸ブチル層をとり、 <u>これを検液とする。...</u>

微生物限度試験	微生物限度試験法により試験を行うとき、本品1gにつき、細菌数は100以下である。また大腸菌は認めない。…	微生物限度試験法(発育阻止物質の確認試験を除く)により試験を行うとき、本品1gにつき、細菌数は100以下である。…
	…ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地の表面に置き、30～35℃で5日間培養する。…	…ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地の表面に置き、30～35℃で少なくとも5日間培養する。…
	試験の手順 試料10gを量り、乳糖ブイオンを加えて200mlとし、…	試験の手順 本品10gを量り、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を加えて500mlとし、
	培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験 試験には、非病原性又は病原性の弱いサルモネラ菌株を、乳糖ブイオン培地を用い、30～35℃で18～24時間培養して使用する。次に、ペプトン食塩緩衝液、リン酸緩衝液、乳糖ブイオン培地等を用いて、1ml当たり約1,000個の生菌を含む菌液を調製する。必要に応じて、約1,000個/mlの生菌を含むサルモネラの菌液0.1mlを混和して、 <u>試料の存在下及び非存在下</u> において、培地の有効性、抗菌性物質の存在等を試験する。	培地の性能試験 試験には、非病原性又は病原性の弱いサルモネラ菌株を、乳糖ブイオン培地を用い、30～35℃で18～24時間培養して使用する。次に、ペプトン食塩緩衝液、リン酸緩衝液、乳糖ブイオン培地等を用いて、1ml当たり約1,000個の生菌を含む菌液を調製する。約1,000個/mlの生菌を含むサルモネラの菌液0.1mlを混和して培地の有効性を試験する。
定量法(i)力価、(ii)培地	培地のpHは水酸化ナトリウム試液又は1mol/L塩酸を用いて調整し、滅菌後のpHが規定の値になるようにする。…	培地の液性は水酸化ナトリウム試液又は塩酸(1→10)を用いて調整し、滅菌後の液性が規定の値になるようにする。…
	…全成分を混和し、121℃、15分間滅菌する。滅菌後のpHは7.4～7.6とする。滅菌後、培地と同温度の50%ポリソルベート20溶液を2 ml添加する。	…全成分を混和し、121℃、15分間滅菌する。滅菌後の液性はpH7.4～7.6とする。滅菌後、培地と同温度の50%ポリソルベート20溶液を2 ml添加する。
	…全成分を混和し、121℃、15分間滅菌する。滅菌後のpHは7.2～7.6とする。この寒天培地9mlを内径約16mmの試験管に分注して斜面とする。	…全成分を混和し、121℃、15分間滅菌する。滅菌後の液性はpH7.2～7.6とする。この寒天培地9mlを内径約16mmの試験管に分注して斜面とする。

<p>定量法(1)力価、(v)穿孔寒天平板の調整</p>	<p>内径90mmで高さ20mmのペトリ皿に約20 mlの種層寒天培地を入れ、寒天が水平になるように広げて室温にて固化させたものを種層寒天平板とする。種層寒天平板上の半径約25～28 mmの円周上に、<u>円筒(ペニシリンカップ)</u>の中心間の距離…</p>	<p><u>シャーレ(内径90mm, 高さ20mm)</u>の場合は約20 ml, <u>大型皿</u>の場合は培地の厚さが2～3 mmとなるように種層寒天培地を入れ、寒天が水平になるように広げて室温にて固化させたものを種層寒天平板とする。種層寒天平板上の半径約25～28 mmの円周上に、<u>円筒</u>をその中心間の距離…</p>
<p>定量法(1)力価、(vi)ナイシン標準液の調製</p>	<p>ナイシン標準品0.100gを正確に量り、<u>0.2 μmのフィルターを通して滅菌した0.02mol/L 塩酸80ml</u>に懸濁する。2時間室温に置き、<u>0.02mol/L塩酸</u>を加えて100mlとし、これを標準原液(1,000 単位/ml)とする。更に1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0(単位/ml)となるよう、標準原液を<u>0.02mol/L塩酸</u>を用いて希釈し、標準液とする。ナイシン標準液は用時調製する。</p>	<p>ナイシン標準品約0.1gを精密に量り、<u>塩酸(1→600)80ml</u>に懸濁する。2時間室温に置き、<u>塩酸(1→600)</u>を加えて100mlとし、これを標準原液とする。更に1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0(単位/ml)となるよう、標準原液を<u>塩酸(1→600)</u>を用いて希釈し、標準液とする。ナイシン標準液は用時調製する。</p>
<p>定量法(1)力価、(vii)ナイシン標準曲線の作成</p>	<p>穿孔寒天平板5枚(大型皿穿孔寒天平板の場合はこれに順ずる枚数)を1組として用いる。…</p>	<p>穿孔寒天平板5枚を1組として用いる。…</p>
<p>定量法(1)力価、(viii)検液の調製</p>	<p>ナイシン濃度測定 本品0.100gを正確に量り、<u>0.2 μmのフィルターを通して滅菌した0.02mol/L 塩酸80ml</u>に懸濁する。2時間室温に置き、更に<u>0.02mol/L塩酸</u>を加えて100 mlする。この液1mlを正確に量り、<u>0.02mol/L塩酸</u>を用いて200mlとし、検液とする。<u>標準曲線の作成の手法に従い、検液の阻止円の測定を行う。</u>検液は用時調製する。また、標準液及び検液は阻止円の測定は同時に試験を行う。阻止円測定後、得られた値より標準曲線から力価(単位/mg)を求める。</p>	<p>検液の調製 本品約0.1gを精密に量り、<u>塩酸(1→600)80ml</u>に懸濁する。2時間室温に置き、更に<u>塩酸(1→600)</u>を加えて100 mlとし、<u>試料液</u>とする。試料液1mlを正確に量り、<u>塩酸(1→600)</u>を用いて200mlとし、検液とする。検液は用時調製する。</p>
<p>定量法(1)力価、(ix)力価の算出</p>	<p>以下の式により、本品の力価を求める。</p>	<p>標準曲線の作成の手法に従い、検液の阻止円の直径を測定し、以下の式により、本品の力価を求める。</p>
	<p>本品の力価 = $\frac{\text{検液の力価}}{5} \times 1,000 \text{ (単位/mg)}$</p>	<p>本品の力価 = $\frac{\text{検液の力価(単位/ml)} \times 20}{\text{試料の採取量(g)}} \text{ (単位/mg)}$</p>

試薬・試液、クエン酸アンモニウム	クエン酸アンモニウム $C_6H_{14}N_2O_7$ [K 8284]	
試薬・試液、リトマス	…0.1mol/L塩酸0.05mlを加えるとき、赤色を呈する。…	…塩酸(1→120)0.05mlを加えるとき、赤色を呈する。…
	…0.1mol/L水酸化ナトリウム0.05mlを加えるとき、青色を呈する。	…水酸化ナトリウム(1→250)0.05mlを加えるとき、青色を呈する。
試薬・試液、リトマスミルク	脱脂粉乳100g, リトマス0.5g及び無水硫酸ナトリウム0.5gに水1,000mlを加えて混和し、115°C、15分間滅菌する。	脱脂粉乳10g, リトマス0.05g及び無水硫酸ナトリウム0.05gに水100mlを加えて混和する。用時調製する。

答申（案）

ナイシンについては、食品添加物として人の健康を損なうおそれはないことから、指定することは、差し支えない。

なお、指定に当たっては、以下のとおり使用基準及び成分規格を設定することが適当である。

使用基準

使用基準の食品名	使用基準 (mg/kg)
ホイップクリーム類（乳脂肪分を主成分とする食品を主要原料として泡立てたものをいう。）	12.5 以下
チーズ（プロセスチーズを除く。）	12.5 以下
プロセスチーズ	6.25 以下
穀類及びでん粉を主原料とする洋生菓子	3.0 以下
洋菓子	6.25 以下
食肉製品	12.5 以下
ソース類、マヨネーズ、ドレッシング	10.0 以下
卵加工品	5.0 以下
味噌	5.0 以下

成分規格

部会報告書 別紙 1 (p. 21) に記載のとおり。