

## ナタマイシン及びナイシンの使用により選択される薬剤耐性に係る 食品健康影響評価について

内閣府食品安全委員会は、平成 15 年 12 月に農林水産省から飼料添加物又は動物用医薬品として使用される抗菌性物質によって選択される薬剤耐性菌について、食品を介してヒトに対する健康への悪影響が発生する可能性とその程度を、科学的に評価することを求められたことから、OIE の「抗菌剤耐性に関する国際基準 ( OIE International Standards on Antimicrobial Resistance, 2003 )」等を参考として、薬剤耐性菌の食品健康影響評価に必要であると考えられる事項を示した「家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する評価指針 ( 平成 16 年 9 月 30 日決定 )」を策定した。

本指針は、動物用抗菌性物質が家畜等に使用される場合に選定される薬剤耐性菌が、食品の摂取を介してヒトに健康上の影響を与える可能性及びその程度を評価することを目的としており、必ずしも全てが食品添加物としての抗菌性物質の評価にあてはまるものではないが、ナタマイシン及びナイシンの使用により選択される薬剤耐性に係る食品健康影響評価を行うにあたって、必要な項目と思われる部分について当該指針の考え方を参考に整理した。

- 別添 1 ナタマイシンの使用による薬剤耐性に係る食品健康影響評価について
- 別添 2 ナイシンの使用による薬剤耐性に係る食品健康影響評価について

## ナタマイシンの使用による薬剤耐性に係る食品健康影響評価について

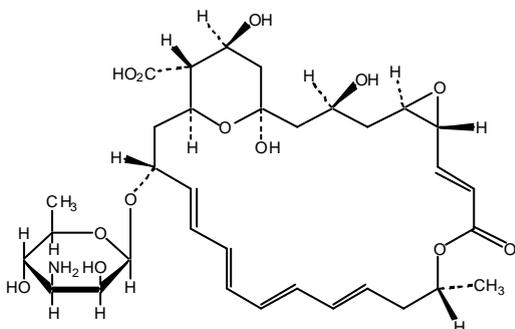
### 1 抗菌性物質に関する情報

#### (1) 名称：ナタマイシン（別名：ピマリシン）

化学名：(1*R*\*,3*S*\*,5*R*\*,7*R*\*,8*E*,12*R*\*,14*E*,16*E*,18*E*,20*E*,22*R*\*,24*S*\*,25*R*\*,26*S*\*)-22-(3-Amino-3,6-dideoxy-*b*-D-mannopyranosyloxy)-1,3,26-trihydroxy-12-methyl-10-oxo-6,11,28-trioxatricyclo[22.3.1.05,7]octacos-8,14,16,18,20-pentaene-25-carboxylic acid

CAS 番号：7681-93-8

#### (2) 構造式：



25 個の炭素原子の大きなラクトン環がマイコサミン部分（ピラノース）に結合している。4 個の共役二重結合を有するポリエンマクロライドで、テトラエン抗真菌性（かび、酵母を含む）物質として分類される。

化学式：C<sub>33</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>13</sub>

分子量：665.7

#### (3) 有効成分の系統

ポリエンマクロライド系抗生物質(マクロライド系化合物とは大環状ラクトンに数個の糖が結合したものをいう。ポリエン抗生物質はマクロライド系の subdivision として分類されている)

#### (4) 使用方法及び推定摂取量

使用量（基準）案は、以下のとおり。

「ハード、セミハード・チーズ以外の食品に使用してはならない。使用量はナタマイシンとして当該チーズの表面積 100 平方 cm 当たり 1 mg 以下でなければならない。また、使用したナタマイシンは当該チーズの深さ 5 mm の部位で存在してはならない。」

平成 13 年度のわが国における 1 人 1 年当たりのチーズの摂取量 1.9 kg (食糧需給表による) から、チーズに最大 20 mg/kg 使用するとし、体重 50 kg と仮定すると、ナタマイシンの摂取量は 0.002 mg/kg 体重/日に相当するものと考えられる。

#### (5) 抗菌性物質の体内動態

##### ヒトにおける試験

ヒトのボランティアに対し経口投与後、尿について検査が行われた。実験条件は尿の全ての偶発的汚染経路が避けうるように設定された。全てのサンプル (総数で 27) には尿中にナタマイシンが検出されなかった<sup>41)</sup>。

18 名のボランティアに 125-500 mg のナタマイシンを経口投与したところ、血清中にナタマイシンは、検出されなかった<sup>22)</sup>。これは、ナタマイシンが動物あるいはヒトの消化管から吸収されないとする報告を支持するものである。

##### ラットを用いた試験

ラットは、50 mg/kg 体重の<sup>14</sup>C-ナタマイシンの経口投与が行われた後、オートラジオグラフ及びバイオオートグラフによる分布が測定された。結腸には、抗生物質活性が観察されなかった。放射能写真による試験結果は、微量のナタマイシンが血液に吸収され、大部分は糞中に排泄されることを示している。投与後 24 時間で盲腸及び結腸に抗生物質活性が見られず放射能が存在するのは、ナタマイシンが盲腸及び結腸の菌叢によって非生物活性物質に分解されると見なすべきである<sup>39)</sup>。

放射能をラベルしたナタマイシンを正常及び胆管結紮ラットに経口投与した試験では、ほとんどの放射活性 (93-103%) は糞中で回収され、胆管結紮ラットでは正常動物より約 5% 多く尿中に排泄された。0.1 及び 1 mg/kg の投与の場合も同様の結果であった。これらから 5-7% の経口投与放射能のみが吸収されうると考えられ、少なくとも 90% のナタマイシンが胃腸を通過し吸収されずに糞中に排出されうると考えられた。薄層クロマトグラフによる分析では、胃と腸のナタマイシンは未変化体であることが示された。しかし、盲腸では急速な部分的分解により親水性の高い物質がつくられている。腎臓は吸収された放射能のバリアと考えられる。それは吸収された放射能の大部分が膀胱で検出されるからである。さらに、尿へ排泄される放射能は主としてナタマイシンの分解物及び少量のナタマイシン中に検出される。なお、腹腔内投与の場合、投与放射能の 40% が胆汁中から回収され、吸収されたもののうち、尿中に排泄されるのは約 60% 程度と推定された<sup>40)</sup>。

##### イヌを用いた試験

チーズのプラスチック被覆剤中にナタマイシンを 0.75-0.88 mg/kg 含むもの、ゼラチン・カプセル中に 1.00-1.03 mg/kg 含むもの、又は 1% デンプン溶液に 0.95-1.0 mg/kg 含むものがイヌに投与されて、ナタマイシンの吸収と排泄がオートラジオグラフで測定された。別の実験では、<sup>14</sup>C-ナタマイシンを 1 mg/ml の濃度で含む 5 ml のプロピレングリコールが静脈に注射された。チーズの実験では、約 2% のナタマイシン含量の放射性プラスチック被覆剤を 20 g のチーズ・ブロックの 1 つの面に付着させた。単独のナタマイシンは通常の発酵工程中の基質である酢酸ナトリウムをラベルして結合させた。投与後に 2-5 日にわたって毎日糞便と尿を集めて液体シンチレーション・カウンターで放射能を測定した。

経口投与では、大部分の放射能が 24 時間以内に糞便中に排泄され、尿中には投与量の 4%以下であった。この排泄パターンは 3 種の経口投与とも一定であった。プロピレングリコールに含ませたナタマイシンの静脈注射では、ほぼ等量のナタマイシンが糞便と尿で測定された。これは吸収が胆汁の排泄を伴って行われることを示している。

経口投与後の糞便中のナタマイシンの排泄は胃腸での吸収が行われなかったためか或いは胆汁を介して全体的なナタマイシンの吸収が行われるのかは、この実験からは明白でない<sup>39)</sup>。

#### (6) 抗菌活性

ポリエンマクロライド系抗生物質は、細胞膜のステロール（特にエルゴステロールは関係が深い）との間に相互作用し、Membrane Polyene Complex（メンブレン-ポリエン複合体）を形成し、細胞膜に歪みを生じさせ、膜機能に欠陥が現れ細胞内の原形質成分（Esseccial Metabolites）が漏出してしまいうため、真菌に生育阻害を生じさせると理解されている。ただし、細菌はその細胞膜にステロールを含有しないのでポリエンマクロライド系抗生物質の相互作用を受けることはなく、かび及び酵母のみが特異的に生育阻害を受ける。

#### (7) 主なかび及び酵母に対するナタマイシンの最小阻止濃度（MIC）

菌 株	最小阻止濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	菌 株	最小阻止濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Absidia glauca</i> , var. <i>paradoxa</i> 4007	10	<i>Hormodendrum compactum</i>	6
<i>Absidia</i> sp.	5	<i>Microsporum lanosum</i>	12
<i>Alternaria</i> sp.	2.5	<i>Monascus anka</i> IFO 4478	2.5
<i>Aspergillus chevalieri</i> 4298	0.63	<i>Mucor hiemalis</i> "5303	2.5
<i>Aspergillus clavatus</i>	0.1-0.5	<i>Mucor mucedo</i>	1.2-5
<i>Aspergillus columnaris</i>	50	<i>Mucor racemosus</i> "5403	2.5
<i>Aspergillus fischeri</i>	10	<i>Neurospora sitophila</i> 4596	10
<i>Aspergillus flavofurcatis</i>	50	<i>Oidium lactis</i>	10
<i>Aspergillus effuses</i>	10	<i>Paecilomyces</i> sp.	2.5
<i>Aspergillus flavus</i> 4053	40	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.6-1.3
<i>Aspergillus flavus</i> CBS 3005	6	<i>Penicillium digitatum</i> , var. <i>latum</i> 5747	2.5
<i>Aspergillus flavus</i> BB67	4.5	<i>Penicillium digitatum</i>	5
<i>Aspergillus flavus</i> Madagascar	5	<i>Penicillium expansum</i>	5
<i>Aspergillus flavus</i> Port Lamy	5	<i>Penicillium expansum</i> 5854	2.5
<i>Aspergillus flavus</i> Gaban I	5	<i>Penicillium fusiculosum</i> 5857	10
<i>Aspergillus flavus</i> Museum	50	<i>Penicillium islandicum</i>	1.1
<i>Aspergillus flavus</i> enthomophage I	10	<i>Penicillium martensii</i>	<0.6
<i>Aspergillus flavus</i> enthomophage	10	<i>Penicillium notatum</i> 4640	5
<i>Aspergillus flavus</i> Batista II	10	<i>Penicillium roqueforti</i> , var. <i>punctatum</i> 6018	10
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.2-20	<i>Penicillium</i> sp.	5

菌 株	最小阻止濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	菌 株	最小阻止濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Aspergillus fumigatus</i> 4040	5	<i>Penicillium velutinum</i> 6064	5
<i>Aspergillus fumigatus</i> E.1940	0.5	<i>Phialophora cinerescens</i>	5
<i>Aspergillus fumigatus</i> L.D.	0.1	<i>Phytophthora cactorum</i>	100
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	100
<i>Aspergillus niger</i>	1-1.8	<i>Pichia membranaefaciens</i>	2.5
<i>Aspergillus niger</i> 4066	5	<i>Pityrosporum sp.</i>	12
<i>Aspergillus ochraceus</i> 4069	2.5	<i>Podospora setosa</i>	25
<i>Aspergillus oryzae</i>	10	<i>Pythium sp.</i>	150-300
<i>Aspergillus oryzae</i> 4075	20	<i>Rhizopus javanicus</i> 5441	10
<i>Aspergillus parasiticus</i>	50	<i>Rhizopus nigricans</i> 4781	2.5
<i>Aspergillus parasiticus</i> P	6	<i>Rhizopus oryzae</i> 4758	10
<i>Aspergillus parasiticus spaere</i> 39 D	2.3	<i>Rhizopus sp.</i>	5
<i>Aspergillus spec. br.</i> 5	4.5	<i>Rhodotorula gracilis</i>	5
<i>Aspergillus sojae</i> , var. <i>gymnosardae</i> 4294	20-40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 0021	2.5
<i>Aspergillus sulphureus</i> 4299	5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , var. <i>ellipsoideus</i> 0205	2.5
<i>Aspergillus tamarii</i> 4099	20-40	<i>Saccharomyces cerevisiae sp.</i>	1-5
<i>Aspergillus terreus</i>	5	<i>Saccharomyces ludwigii</i> 0339	2.5
<i>Aspergillus ustus</i>	10	<i>Saccharomyces rouxii</i> 0562	5
<i>Aspergillus versicolor</i>	5	<i>Saccharomyces sake</i> 0305	5
<i>Aspergillus wentii</i>	5	<i>Sclerotinia fructicola</i>	1
<i>Aspergillus zonatus</i>	0.5	<i>Sporotrichum schenkii</i>	12
<i>Botrytis cinerea</i>	1-25	<i>Stemphylium consortiale</i>	25
<i>Botryotinia fuckeliana</i> 5365	2.5	<i>Stereum pupureum</i>	1.2
<i>Candida albicans</i>	1.5-20	<i>Stromatinia gladioli</i>	10-25
<i>Candida parapsilosis</i>	5	<i>Thielaviopsis sp.</i>	25
<i>Candida tropicalis</i>	3-12	<i>Trichocladium asperum</i>	10
<i>Candida utilis</i> 0396	5	<i>Trichoderma sp.</i>	1.2
<i>Chaetomium globosum</i>	25	<i>Trichophyton concentricum</i>	6-50
<i>Ceratocytis ulmi</i>	10-25	<i>Trichophyton gallinae</i>	25
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	0.9	<i>Trichophyton gypseum</i>	25
<i>Cladosporium herbarum</i>	2.5	<i>Trichophyton interdigitale</i>	25-100
<i>Cladosporium fulvum</i>	2.5	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	50-100
<i>Coccidioides immitis</i>	2.5-25	<i>Trichophyton rosaceum</i>	12
<i>Corynespora melonis</i>	10	<i>Trichophyton rubrum</i>	12-50
<i>Cryptococcus neoformans</i> ( <i>Blastomyces neof.</i> )	5-10	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	6
<i>Cylindrocarpon sp.</i>	10	<i>Trichophyton sulfureum</i>	3
<i>Epidermophyton floccosum</i>	12	<i>Trichophyton violaceum</i>	12

菌 株	最小阻止濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	菌 株	最小阻止濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Fusarium sp.</i>	10	<i>Trichophyton verrucosum</i>	>50
<i>Fsalium oxysporum</i>	25	<i>Trichosporon cutaneum</i>	12
<i>Glenospora graphii</i>	3	<i>Torulasporea rosei</i>	10
<i>Gloeosporium album</i>	2.5	<i>Verticillium cinnabarinum</i>	50
<i>Gloeosporium perennans</i>	2.5	<i>Verticillium dahliae</i>	1.2
<i>Geotrichum candidum</i> "4597	10	<i>Zygosaccharomyces barkeri</i>	1
<i>Hansenula anomela</i> 0122	5	<i>Zygosaccharomyces major</i> 0533	2.5
<i>Histoplasma capsulatum</i>	3		

## 2 関連するヒト用抗菌性物質の概要

### (1) 化学構造が類似するもの及び交差耐性を生ずる可能性のあるものの名称及び化学構造式

#### [ナタマイシン]

わが国において、医薬品「ピマリシン点眼液、眼軟膏」として角膜真菌症の治療を目的に承認されている。また、欧州においてもヒト用及び動物用医薬品等として使用が認められている。

その他、ナタマイシン同様、ポリエンマクロライド系の抗菌性物質としてナイスタチン及びアンホテリシン B があげられる。

#### [ナイスタチン]

わが国において、医薬品「ナイスタチン錠」として消化管カンジタ症の治療を目的に承認されている。

#### [アンホテリシン B]

わが国において、医薬品「ファンギゾン注、ファンギゾン錠、ファンギゾンシロップ、ハリゾン錠、ハリゾンシロップ」として、真菌による深在性感染症、消化管におけるカンジダ異常増殖の治療を目的に承認されている。

### (2) (1) の抗菌性物質の臨床現場における有効性及び重要性

#### [ナタマイシン]

点眼液及び眼軟膏が医薬品として承認されており、角膜真菌症の治療に用いられる。薬効薬理として、各種真菌に対する抗菌作用：アスペルギルス属菌、カンジダ属菌等の病原真菌及びフザリウム属菌等の植物病原菌に効菌力 (*in vitro*)、眼科臨床分離菌に対する抗菌作用：角膜真菌症患者から分離されたアスペルギルス属菌、フザリウム属菌等に効菌力 (*in vitro*)、実験的角膜真菌症に対する作用：角膜真菌症の進行の抑制、があげられている。

#### [ナイスタチン]

*in vitro* においてナイスタチンはカンジダに対して強い抗菌作用を示し、また、カンジダのナイスタチンに対する耐性獲得は困難で、*C. albicans* 及び *C. parakrusei* を 50 代継体培養後も耐

性上昇は認められないとされている。

#### [アムホテリシン B]

カンジダ属、アスペルギルス属等の病原真菌に対し抗菌力を示すが、グラム陽性菌、グラム陰性菌、ウイルス等には、ほとんど活性を示さない。カンジダに対する最小発育阻止濃度は、0.04 ~ 1.56 µg/mL。作用機序は、感受性菌の膜ステロールを含む細胞膜と結合し、膜構造に変化を与え、その透過性障害を起こさせ、細胞質成分の漏出が生じて真菌を死滅される。また、本物質は高用量でも消化管からほとんど吸収されない。

(参考) 医薬品添付文書情報 (医薬品医療機器情報提供ホームページ)、独立行政法人医薬品医療機器総合機構  
医療薬日本医薬品集 (2004)、財団法人日本医薬情報センター

### 3 薬剤耐性菌及び薬剤耐性伝達因子に関する情報

ナタマイシンは広範囲の微生物、即ち皮膚糸状菌及び他の真菌、酵母及び酵母様微生物 (人、動物及び植物に対して病原性のある株及び腐食性菌類を含む) に対して活性がある。標準試験ではナタマイシンは細菌又は放線菌には不活性である。マイコトキシン産生菌種が常にナタマイシンに耐性があるという証拠はない<sup>22)</sup>。

酵母又は酵母様微生物はナタマイシンに対して本来の耐性を示すとは報告されていないが、皮膚糸状菌のあるものはナタマイシンの活性に耐性がある。

細菌及び抗生物質と比較して、酵母にナタマイシン耐性を誘発させることは困難である<sup>23)</sup>。

食品添加物としてのナタマイシンの使用が有害な真菌にナタマイシン耐性を発生させることは、ほとんどあり得ず<sup>23), 50)</sup>、また 10 年以上もナタマイシンを使用しているチーズ保管庫及びナタマイシンを使用していない保管庫で集めた真菌叢の注意深い分析では、ナタマイシンに対する酵母とかびの感度に変化もみられなかった<sup>51)</sup>。さらにチーズ工場と倉庫での真菌叢について追加の研究が報告されており<sup>52)</sup>、時々、*in vitro* 試験で得られる、やや増加した耐性は実際に存在する条件を表しているものではないことを強く指摘している。ナタマイシンの反応方式、すなわち、細胞内容物の漏れにつながる真菌の細胞膜へのナタマイシンの物理-化学結合により、実際の条件下で耐性株を作ることが困難である点において、ナタマイシンは他の比較物質と完全に異なっている。

ナタマイシンの臨床上の使用において耐性が発生したという記録はない。他の抗菌物質に対する交差耐性は調査されていない。アンホテリシン B はナイスタチン、フィリピン、エンドマイシン及びキャンディディンには交差耐性を示すが、ナタマイシンには示さなかった<sup>25), 26)</sup>。ナイスタチン及びアンホテリシン B 耐性微生物はナタマイシンに影響を受け<sup>27)</sup>、広く選択したナイスタチン耐性酵母もナタマイシンに対して通常の反応を示した<sup>28)</sup>。さらに新しい *in vitro* 試験では、ナタマイシン及びナイスタチン及びアンホテリシン間の交差耐性が発生するかも知れないことが確認されている<sup>24)</sup>。

#### 4 使用量に関する情報

今回要請のあった使用基準案に基づくナタマイシンの使用量は、最大で 20 mg/kg チーズに相当。わが国におけるチーズの摂取量（5（1）参照）から、ナタマイシンの推定摂取量は、0.002 mg/kg 体重/日に相当するものと考えられる。

#### 5 使用される食品に関する情報

##### （1）1人当たりの年間消費量

平成 13 年度のわが国における一人当たりのチーズの年間摂取量は、1.9 kg（食糧需給表による）。

##### （2）食品のかび等による汚染状況

真菌、すなわち酵母及びかびによってもたらされる微生物的腐敗に限定すれば、食品表面及び食品中での腐敗の発生は全く普通の現象である。

真菌が現在 100 種以上も知られているマイコトキシンを産生すると結論付けられる。アフラトキシンが最もよく知られたマイコトキシンであるが、それ以外の有毒で発がん性のあるマイコトキシンの詳細な情報も公表されている。

チーズ表面に発生する有害なカビ類(不完全菌と酵母を含む)としては *Penicillium* 属、*Alternaria* 属、*Monilia* 属、*Mucor* 属、*Aspergillus* 属などの真菌が挙げられる<sup>9)</sup>。またプロセスチーズ中には、10 種類以上が見出されており、*Cl. butyricum* (酪酸菌)、*Cl. tyrobutyricum*、*Cl. perfringens* (ウェルシュ菌) 及び *Cl. sporogenes* などが主な菌種であり、中でも *Cl. perfringens* が最もガス発酵が盛んである<sup>9)</sup>。チューダーチーズの 92% はガス発酵性の *Clostridium* を含むとされている<sup>9)</sup>。チーズ貯蔵中に発生した主要カビを同定したところ、*Penicillium viridicatum* が最もしばしば出現し、*P. roquefortii* がこれに次いだ<sup>10)</sup>。

Bullermann 及び Olivigni<sup>44)</sup> は、その試験の中で、アメリカの大部分のチューダーチーズから分離した 287 株の *Penicillium* 種の中で 85 株がマイコトキシンの産生株であり、23 株の *Aspergillus* 種のうち 11 株、39 株の他の菌種のうち 6 株が同様であることを明らかにした。マイコトキシンを産生する *Penicillium* 種が多数あること及び食品におけるこれらの発育が低温で阻害されないことは、これらのかびの防止にはさらに注意が必要であることを示している。

マイコトキシンの産生は食品中に容易に侵入する菌糸体で行われ、かびた食品の表面を清掃することがマイコトキシンによる食品汚染を排除したことにはならない。

#### 6 暴露に起因して生じる可能性のあるヒトの疾病

角膜真菌症：真菌胞子のついたトゲなどで眼を刺したときに感染する。慢性、難治性の角膜炎を起し、視力障害、時に失明に至る。抗生物質やステロイド剤の使用は本症の発症を促進するため、最近のこれらの薬剤の使用の増加に伴い、本疾患も増加の傾向がある。

カンジダ症：カンジダはヒトの口腔、腸管、膣、皮膚などに常在し、日和見感染症を起こす。近年の臓器移植や HIV 感染などによる易感染性宿主の増加に伴い重要性が増大している。抗生物質の使用による菌交代症の原因菌でもある。

(参考)「戸田新細菌学(改訂 32 版)」(南山堂)

7 当該疾病のヒト用抗菌性物質による治療

角膜真菌症：アムホテリシン B や 5%ピマリシンなどが点眼で用いられる。

カンジダ症：表在性カンジダ症にはアゾール系薬剤やポリエン抗生物質及びゲンチアナ紫などが局所的に使用されるが、アゾール系薬剤や 5-フルオロシトシンの経口投与も行われる。深在性カンジダ症にはアムホテリシン B 又はこれと 5-フルオロシトシンの併用が強力である。腸管カンジダ症に対してはポリエン抗生物質の経口投与ができる。

(参考)「戸田新細菌学(改訂 32 版)」(南山堂)

## ナイシンの使用による薬剤耐性に係る食品健康影響評価について

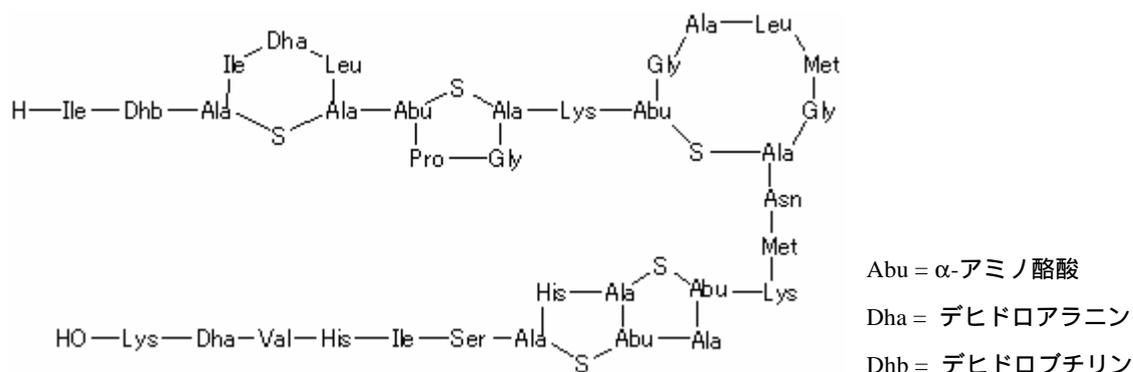
### 1 抗菌性物質に関する情報

#### (1) 名称：ナイシン（別名：ナイシン A）

英名：Nisin

CAS 番号：1414-45-5

#### (2) 構造式：



化学式：C<sub>143</sub>H<sub>230</sub>N<sub>42</sub>O<sub>37</sub>S<sub>7</sub>

分子量：3354.12

#### (3) 有効成分の系統

ランチビオティクス系バクテリオシン（ラクトコッカス・ラクティス（*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*）が産生する 34 個のアミノ酸からなるペプチド）

#### (4) 使用方法及び推定摂取量

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、米麴等への保存料としての使用を目的とする。

使用量（基準）案は、以下のとおり。

「チーズにあっては、1 kg につき 15 mg 以下、その他の乳製品及び肉類にあっては、12.5 mg 以下、殺菌した缶詰又は瓶詰め野菜、スープ及びブロス、菓子パンにあっては、1 kg につき 6.25 mg 以下、液卵、液卵製品にあっては、1 kg につき 5 mg 以下、その他の食品にあっては、1 kg につき 5 mg 以下とする。豆腐にあっては、1 kg につき 10 mg 以上、味噌、米麴にあっては、1 kg につき 5 mg 以上残存しないように使用しなければならない。但し、特別用途表示の許可又は承認を受けた場合は、この限りでない。」

平成 12 年度国民栄養調査をもとに一日推定摂取量を算出すると、0.041 mg/kg 体重/日に相当するものと考えられる。

#### (5) 抗菌性物質の体内動態

##### 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<sup>5-16)</sup>。

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<sup>5-17)</sup>。

##### *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<sup>5-4)</sup>。

ナイシン 80 RU/ml [2 µg/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<sup>5-18)</sup>。

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<sup>5-19)</sup>。

*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。

#### (6) 抗菌活性

ナイシンは広範囲に及ぶグラム陽性菌とその芽胞に対して効果がある抗菌剤である。

作用機作としては、細胞膜に作用して膜孔を形成 (N 末端と C 末端側に存在する正荷電領域がまず膜構成リン脂質の極性頭部と静電作用により結合し、次いで疎水領域が細胞膜に侵入し孔を形成するという作用モデルが提唱されている。) することにより、膜電位や膜内外の pH 勾配あるいはその両者を破壊し細胞死を引き起こす。(川本ら, *Foods Food Ingredients J. Jpn.* (2004) 209: 758-767)

ナイシンは熱処理食品の抗菌性保存料として特に有用であり、*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非常に効果的に阻害して様々な食品の細菌による腐敗を防ぐ。

ナイシンが細菌芽胞の増殖を阻害する研究が多く報告されており、これらの研究の要約は以下のとおり。

表1 ナイシンによる細菌芽胞の生育阻害

試験を行った細菌芽胞	芽胞濃度 (ml、g当たり)	結果
<i>Cl. butyricum</i> NCTC 7423 <i>Cl. sporogenes</i> 1.6 <i>Cl. bifermentans</i>	3,500 800 800	40倍以上のナイシン希釈培養液で芽胞の発芽後生育が阻害された <sup>1)</sup> 。
P.A. 3679* <i>Cl. botulinum</i> 62A <i>Cl. botulinum</i> 25B <i>C.thermosaccharolyticum</i> 3814 <i>B. coagulans</i> <i>B.stearothermophilus</i> 1518	22,500 20,000 156,000 28,000 800 4,400	濃度 14 μg/g (生物学的力価、40 × 10 <sup>6</sup> IU/g) のナイシンにより <i>Cl. thermosaccharolyticum</i> を除く芽胞の D 値**が低下した <sup>2)</sup> 。
<i>B. coagulans</i> (31株)	2 × 10 <sup>8</sup> まで	濃度 5 μg/ml のナイシンにより、全菌株が阻害された <sup>3)</sup> 。
P.A. 3679 <i>B. stearothermophilus</i> <i>B. coagulans</i>	4,230 657 9,600	様々な食品素材において、14 μg/g のナイシンにより試験を行った全芽胞の D 値が低下した <sup>4)</sup> 。
<i>B. coagulans</i>	100,000	濃度 14 μg/g のナイシンにより、大気温度で 18 ヶ月間、缶入りのトマトジュースの腐敗が予防された <sup>4)</sup> 。
<i>Cl. botulinum</i> 62A <i>Cl. botulinum</i> 213B <i>B. stearothermophilus</i> 1518	20,000 20,000 4,200	ナイシン製剤は 100 μg/g (生物学的力価、10 <sup>6</sup> IU/g) で <i>Cl. botulinum</i> 芽胞、25 μg/g (生物学的力価、10 <sup>6</sup> IU/g) で <i>B. stearothermophilus</i> 芽胞を阻害した <sup>5)</sup> 。
<i>B. stearothermophilus</i> P.A. 3679 <i>B. coagulans</i> 2273	134 まで 179 まで 241 まで	ナイシン (0.26 ~ 0.5 IU/ml 培地) は、様々な熱処理後の芽胞の発芽後生育を阻害した <sup>6)</sup> 。

\* putrefactive anaerobe (腐敗性嫌気性菌) の略

\*\* D 値とは、細菌数を 1/10 に減少させるのに要する、一定温度における加熱時間を表す。

ナイシンは特定食品中、例えばある種のソフトチーズ中の *Listeria monocytogenes* の菌数のコントロールに有効であることが明らかにされている。

英国やオーストラリアで好まれるクランペットと呼ばれるケーキでは、*B. cereus* に対して 3.75 μg/g のナイシンが顕著な効果 (10<sup>6</sup> 芽胞/g から 10<sup>3</sup> 芽胞/g に低下) を示す<sup>7)</sup>。

乳酸菌はしばしば低 pH で増殖可能であるが、ナイシンに対する感受性が高いため、サラダ用ドレッシングやアルコール飲料など熱処理されない低 pH の食品にナイシンは有用である。酵母はナイシンに対する感受性を示さないため、発酵液中の乳酸菌の増殖をコントロールするためにナイシンを酵母と共に使用する場合もある。

## 2 関連するヒト用抗菌性物質の概要

(1) 化学構造が類似するもの及び交差耐性を生ずる可能性のあるものの名称及び化学構造式該当なし

(2)(1)の抗菌性物質の臨床現場における有効性及び重要性  
該当なし

3 薬剤耐性菌及び薬剤耐性伝達因子に関する情報

ナイシンは50ヶ国以上で保存料として承認されており、ナイシンを含有する食品摂取に起因する有害作用の報告は無い。

最近、バクテリオシン感受性の *Listeria monocytogenes* などの有害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、このような獲得耐性は、一般的に細胞膜の構造変化（特にリン脂質の組成変化）に起因することが知られている。（川本ら(2004)）

4 交差耐性に関する資料

Hossack らは、17種の頻用される医療用抗生物質の標的となる19種の一般的な病原性微生物の感受性に、ナイシンが影響を与える可能性について検討した<sup>20)</sup>。菌株は、各5菌株の *Escherichia coli* と *Staphylococcus aureus*、1菌株の *Shigella flexneri*、*Sh. dysenteriae*、*Sh. sonnei*、*Sh. boydii*、*Salmonella virchow*、*Sal. dublin*、*Sal. sonnei*、*Sal. enteritidis* と *Sal. typhimurium* を使用し、抗生物質はアンピシリン、バシトラシン、ベンジルペニシリン、カルベニシリン、クロラムフェニコール、エリスロシン、ゲンタマイシリン、リンコマイシン、ナリジクス酸、ネオマイシン、ニトロフラントイン、ノボピオシン、オキシテトラサイクリン、ポリミキシン B、リファンピシン、ストレプトマイシン、スルファメラジンを用いた。各菌株を2.5 µg/mlのナイシン含有培地または非含有培地で24時間培養した後、抗生物質のMIC（最小発育阻止濃度）を測定した。

各試験菌株をナイシン非含有および含有培地で培養した時のナイシンのMICを表2に示した。全てのグラム陰性細菌はナイシン非感受性のため、MICは1000 µg/ml以上となっており、感受性菌である *Staphylococcus* 属では、ナイシン非含有培地では16 µg/mlで、ナイシン含有培地で培養した時は125-500 µg/mlとナイシンに対する感受性が低下する（表2）。その他の17種類の抗生物質についても、ナイシン感受性の5菌株および非感受性の14菌株について検討した結果を表2~6に示した。感受性変化はナイシンでのみ観察され、ナイシン以外の17種類の医療用抗生物質では、変化は散見されたが、MICの測定はある程度のバラツキを生じることから、有意とはみなされなかった。

以上より、ナイシンによる医療用抗生物質に対する交差耐性（cross-resistance）は認められないことから、抗生物質治療に影響を及ぼさないと結論される。

表2 ナイシン含有、非含有培地におけるナイシン及びその他抗生物質のMIC(μg/ml)

菌株	ナイシン		カルベニシリン		アンピリシリン		バシトラシン	
	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> HRC 113	16	125	4	4	4	2	125	250
<i>S. aureus</i> HRC 134	16	500	0.5	0.5	0.25	0.25	250	250
<i>S. aureus</i> HRC 135	16	250	0.5	1	0.5	0.25	250	250
<i>S. aureus</i> HRC 136	16	250	2	4	1	2	250	500
<i>S. aureus</i> NCTC 6571	16	250	1	1	0.5	0.5	16	32
<i>Escherichia coli</i> HRC 46	>1000	>1000	8	16	8	16	1000	1000
<i>E. Coli</i> HRC 47	>1000	>1000	32	32	8	16	>1000	>1000
<i>E. Coli</i> HRC 49	>1000	>1000	8	32	8	16	>1000	>1000
<i>E. Coli</i> HRC 51	>1000	>1000	8	32	8	8	1000	1000
<i>E. Coli</i> NCTC 8739	>1000	>1000	8	4	4	4	>1000	>1000
<i>Shigella flexneri</i> HRC 67	1000	>1000	1	2	4	4	1000	1000
<i>Sh. dysenteriae</i> NCTC 2966	1000	>1000	1	4	5	4	>1000	>1000
<i>Sh. sonnei</i> HRC 66	>1000	>1000	64	125	500	500	>1000	>1000
<i>Sh. boydii</i> NCTC 9328	>1000	>1000	2	2	8	8	500	1000
<i>Salmonella virchow</i> HRC 41	>1000	>1000	8	8	4	4	>1000	>1000
<i>Sal. dublin</i> HRC 36	>1000	>1000	2	8	4	4	>1000	>1000
<i>Sal. ararium</i> HRC 26	>1000	>1000	8	8	4	4	>1000	>1000
<i>Sal. typhimurium</i> HRC 1	>1000	>1000	8	8	4	4	>1000	>1000
<i>Sal. enteritidis</i> NCTC 6676	>1000	>1000	16	8	4	4	>1000	>1000

+ / -は、培地中のナイシンの有無を表す

表3 ナイシン含有、非含有培地におけるナイシン及びその他抗生物質のMIC(μg/ml)

菌株	バンジナルペニシリン		クロラムフェニコール		エリスロマイシン		ゲンタマイシン	
	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> HRC 113	0.5	0.25	64	64	1	0.5	4	8
<i>S. aureus</i> HRC 134	0.03	0.03	64	64	1	0.5	2	4
<i>S. aureus</i> HRC 135	0.03	0.03	125	64	1	1	4	4
<i>S. aureus</i> HRC 136	0.25	0.5	1000	1000	>1000	>1000	2	4
<i>S. aureus</i> NCTC 6571	0.03	0.06	64	64	0.5	0.5	4	8
<i>Escherichia coli</i> HRC 46	32	64	250	250	125	250	1	1
<i>E. Coli</i> HRC 47	32	64	125	250	125	125	1	1
<i>E. Coli</i> HRC 49	32	64	125	250	250	250	1	1
<i>E. Coli</i> HRC 51	32	32	125	125	64	125	1	2
<i>E. Coli</i> NCTC 8739	8	16	64	125	64	64	0.5	1
<i>Shigella flexneri</i> HRC 67	16	32	64	64	64	64	1	1
<i>Sh. dysenteriae</i> NCTC 2966	8	16	32	125	64	125	16	8
<i>Sh. sonnei</i> HRC 66	>1000	>1000	64	64	64	64	16	16
<i>Sh. boydii</i> NCTC 9328	32	32	32	32	64	64	2	2
<i>Salmonella virchow</i> HRC 41	16	8	125	125	250	250	0.25	1
<i>Sal. dublin</i> HRC 36	8	8	64	64	250	250	1	0.5
<i>Sal. ararium</i> HRC 26	16	8	125	125	250	250	0.5	0.5
<i>Sal. typhimurium</i> HRC 1	16	16	125	125	250	250	0.12	0.25
<i>Sal. enteritidis</i> NCTC 6676	16	16	125	125	250	250	0.5	0.5

表4 ナイシン含有、非含有培地におけるナイシン及びその他抗生物質のMIC(μg/ml)

菌株	ナリジクス酸		リンコマイシン		ニトロフラントイン		ネオマイシン	
	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> HRC 113	64	64	2	2	32	16	2	2
<i>S. aureus</i> HRC 134	125	125	2	2	32	16	1	2
<i>S. aureus</i> HRC 135	125	125	2	2	32	32	0.5	2
<i>S. aureus</i> HRC 136	250	250	2	1	16	16	250	1000
<i>S. aureus</i> NCTC 6571	64	64	1	1	8	16	2	2
<i>Escherichia coli</i> HRC 46	8	8	>1000	>1000	125	125	4	4
<i>E. Coli</i> HRC 47	4	4	1000	>1000	32	32	8	4
<i>E. Coli</i> HRC 49	16	8	1000	>1000	32	32	4	4
<i>E. Coli</i> HRC 51	8	4	>1000	>1000	16	16	4	4
<i>E. Coli</i> NCTC 8739	4	4	>1000	>1000	8	16	2	4
<i>Shigella flexneri</i> HRC 67	4	4	250	500	32	32	8	8
<i>Sh. dysenteriae</i> NCTC 2966	2	2	500	500	8	8	4	4
<i>Sh. sonnei</i> HRC 66	4	4	1000	>1000	8	8	4	4
<i>Sh. boydii</i> NCTC 9328	4	4	250	500	4	4	4	8
<i>Salmonella virchow</i> HRC 41	8	8	>1000	>1000	125	64	2	2
<i>Sal. dublin</i> HRC 36	8	4	>1000	1000	32	32	1	2
<i>Sal. ararium</i> HRC 26	8	8	>1000	>1000	32	32	2	4
<i>Sal. typhimurium</i> HRC 1	8	8	>1000	>1000	32	32	2	2
<i>Sal. enteritidis</i> NCTC 6676	8	8	1000	1000	32	32	2	2

表5 ナイシン含有、非含有培地におけるナイシン及びその他抗生物質のMIC(μg/ml)

菌株	ノビオシン		オキシテトラサイクリン		ホリスキシシンB		リファンピシン	
	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> HRC 113	0.25	0.25	250	250	125	250	0.06	0.12
<i>S. aureus</i> HRC 134	0.25	0.25	8	8	125	125	0.03	0.03
<i>S. aureus</i> HRC 135	0.25	0.25	8	8	125	250	0.03	0.06
<i>S. aureus</i> HRC 136	0.25	0.25	250	250	125	125	0.06	0.06
<i>S. aureus</i> NCTC 6571	0.5	0.5	4	8	125	250	0.03	0.03
<i>Escherichia coli</i> HRC 46	250	64	1000	1000	1	1	16	16
<i>E. Coli</i> HRC 47	500	250	4	8	1	1	32	32
<i>E. Coli</i> HRC 49	1000	1000	8	16	2	1	16	32
<i>E. Coli</i> HRC 51	250	250	8	8	1	1	32	32
<i>E. Coli</i> NCTC 8739	250	250	8	8	1	1	16	16
<i>Shigella flexneri</i> HRC 67	64	64	4	4	0.5	0.5	16	16
<i>Sh. dysenteriae</i> NCTC 2966	64	125	16	16	0.5	0.5	32	64
<i>Sh. sonnei</i> HRC 66	500	500	16	16	1	0.5	32	64
<i>Sh. boydii</i> NCTC 9328	64	64	2	4	0.5	0.5	16	16
<i>Salmonella virchow</i> HRC 41	1000	1000	8	8	8	4	16	16
<i>Sal. dublin</i> HRC 36	64	64	4	4	32	4	16	16
<i>Sal. ararium</i> HRC 26	500	1000	8	8	8	8	32	16
<i>Sal. typhimurium</i> HRC 1	1000	500	8	8	4	16	32	32
<i>Sal. enteritidis</i> NCTC 6676	>1000	>1000	4	8	2	2	32	32

表6 ナイシン含有、非含有培地におけるナイシン及びその他抗生物質の MIC( $\mu\text{g/ml}$ )

菌株	ストレプトマイシン		スルファメラジン	
	-	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> HRC 113	16	16	>1000	>1000
<i>S. aureus</i> HRC 134	4	8	>1000	>1000
<i>S. aureus</i> HRC 135	4	8	>1000	>1000
<i>S. aureus</i> HRC 136	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. aureus</i> NCTC 6571	8	8	>1000	>1000
<i>Escherichia coli</i> HRC 46	8	8	>1000	>1000
<i>E. Coli</i> HRC 47	16	16	>1000	>1000
<i>E. Coli</i> HRC 49	8	16	>1000	>1000
<i>E. Coli</i> HRC 51	8	16	>1000	>1000
<i>E. Coli</i> NCTC 8739	8	8	>1000	>1000
<i>Shigella flexneri</i> HRC 67	16	16	>1000	>1000
<i>Sh. dysenteriae</i> NCTC 2966	8	4	500	>1000
<i>Sh. sonnei</i> HRC 66	8	8	>1000	>1000
<i>Sh. boydii</i> NCTC 9328	8	16	32	32
<i>Salmonella virchow</i> HRC 41	32	32	>1000	>1000
<i>Sal. dublin</i> HRC 36	32	32	>1000	>1000
<i>Sal. ararium</i> HRC 26	32	32	>1000	>1000
<i>Sal. typhimurium</i> HRC 1	32	32	>1000	>1000
<i>Sal. enteritidis</i> NCTC 6676	8	8	>1000	>1000

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株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を調査した結果、*Staphylococcus aureus* のペニシリン耐性株は野性株に比べナイシンに対して50倍以上の超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。(川本ら(2004))

## 5 ナイシン様抗菌性物質産生菌のウシ及びヒトにおける存在

Hirsch らは、ウシ及びヒトの各種検体中に存在する微生物中の連鎖球菌に対する抗菌性物質を分泌する菌株の有無を調べた(表7)。

各種検体から分離株を単離し、培養液を得た。培養液にクロロホルムを浸した綿栓をし、42 4時間処理により滅菌後、綿栓を除き、さらに42 で数時間処理することにより、残りのクロロホルムを取り除いた。滅菌培養液について、32 及び320 倍希釈液の *Lactococcus agalactiae* に対する増殖阻害能を調べた。

ヒト鼻咽喉粘液からは、3,414 菌株が単離され、320 倍希釈液でも阻害能を有するものは9 菌株であった。ヒト糞便からは、966 菌株が単離され、32 倍希釈液で阻害能を有するものは13 菌株存在し、さらに320 倍希釈液でも阻害能を有するものは1 菌株であった。

ヒト鼻咽喉粘液及び糞便から320 倍希釈液で阻害能を有する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おり、その菌株を *L. lactis* (旧名 *Streptococcus lactis*) と同定した。その他、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おり、その菌株も *L. lactis* と同定した。

以上より、ナイシン様抗菌性物質産生菌 *L. lactis* は、頻度は低いが、ヒト腸内およびウシに常在していると考えられる。したがって、消化を免れたナイシンが腸に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。

表 7 連鎖球菌に対する抗菌性物質分泌菌株数

検体	分離菌株数	阻害能を有する菌株数	
		32倍希釈液	320倍希釈液
鼻咽喉粘液（ヒト）	3,414	-	9
ヒト糞便	966	13	1
ウシ第一胃	615	5	-
ウシ糞便	837	4	-
生乳	984	-	3
殺菌牛乳	548	-	-
チーズ	652	-	-
合計	8,016	22	13

## 6 使用量に関する情報

今回要請されている使用基準案によれば、チーズ、乳製品、肉類等への使用量の合計は、食品 1 kg あたり 98.75 mg/日。

平成 12 年度国民栄養調査（7（1）参照）をもとに、ナイシンの推定摂取量は 0.04 mg/kg 体重/日に相当するものと考えられる。

## 7 使用される食品に関する情報

### （1）1人当たりの消費量

わが国において想定される使用対象食品は、チーズ、乳製品、肉類、液卵、味噌等であり、それぞれの食品の一日摂取量は、平成 12 年度国民栄養調査をもとに以下のとおりとされている。

その他の乳製品類	19.4 g
チーズ	2 g
その他の菓子類	12.9 g
菓子パン	8.8 g
肉類	78.2 g
その他の食品（缶詰等）	5.3 g
その他の食品（たんぱく質製品類）	5.3 g
豆腐	38.6 g
卵類	39.7 g
味噌	13.0 g

## (2) 食品の汚染状況

ナイシンは、例えばある種のソフトチーズ中の *Listeria monocytogenes* (低温で増殖) の菌数のコントロールに有効であることが明らかにされている。*Bacillus cereus* は水分が多く小麦粉が主成分のホットプレートで作られる食品(クランペット、パンケーキ、ホットケーキ)と特に関連があり、これまでに生命に関わる食中毒の発生と関係してきた<sup>7)</sup>。

プロセスチーズの製造に使用される原料(原料チーズ、バター、脱脂粉乳、ホエイパウダー、香料、乳化剤、水)中にクロストリジウム芽胞が存在することはしばしば不可避であり、芽胞は溶解工程に用いられる高温(85~105℃)処理で生残する可能性がある<sup>9)</sup>。プロセスチーズの腐敗に関連する嫌気性芽胞形成菌は *Clostridium butyricum*、*Clostridium tyrobutyricum*、および *Clostridium sporogenes* である。

液状卵製品は、概して殻内部の汚染物質、割られた卵殻の清浄度の結果および/または液中に落ちた殻の小片(後に濾過した場合でも)からの結果、汚染される<sup>10)</sup>。通常、低温殺菌法により生の液状全卵に存在する細菌の約99%は死滅するが、生き残った細菌の大部分は耐熱性グラム陽性芽胞形成菌(*Bacillus spp.*)で、少ないがグラム陰性菌もある<sup>10),11),12),13)</sup>。これらの生き残った細菌の多くは、冷蔵庫の温度でも増殖可能である。

味噌・醤油業界では、*B. subtilis* をはじめとする有害微生物の除去が、長年の課題となっている。