

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

放射線照射食品の検知技術に関する研究

平成 18 年度 総括・分担研究年度終了報告書

主任研究者 宮原 誠

平成 19 年（2007 年）4 月

目 次

I 総括研究年度終了報告

放射線照射食品の検知技術に関する研究 5

宮 原 誠

II 分担研究報告

1 照射食品検知のための微生物学的方法に関する研究 14

分担研究者 宮 原 誠

2 放射線照射香辛料の真菌的検知法に関する研究 29

分担研究者 宮 原 誠

3 照射食品検知のための TL 法の確立に関する研究 45

分担研究者 棚 瀬 正 和

4 照射食品検知 TL 法の室内再現性に関する研究 70

分担研究者 宮 原 誠

5 照射食品検知 TL 法の室間再現性に関する研究 91

分担研究者 宮 原 誠

資料 131

別刷 135

総括研究年度終了報告書

放射線照射食品の検知技術に関する研究

主任研究者 宮原 誠

国立医薬品食品衛生研究所 食品部室長

研究要旨

昨年度に引き続き照射香辛料の検知について検討した。これらの試料に適用可能な試験法は熱発光法（Thermoluminescence, TL法と微生物法である。

微生物法については、簡便、特別な設備が不要、他の検知法に比較して迅速である点からこれを検討した。昨年の検討に基づき、一般生菌数について12種類の香辛料を準備し、10MeVの電子線処理の後、菌数を測定し、さらに熱処理後菌数測定した。これらの菌数を比較することにより、7kGyを検出下限に検知が可能であった。真菌について同様に検討したところ、初発菌数が少ない試料については判定が困難であったが、白胡椒、セージなどについては検知の可能性が示唆された。

いずれの試験においても市販香辛料の菌数は極めて少なく、菌数0個の試料もあった。これらには本試験法の適応が不可能である。

TL法については昨年得られた結果をふまえて、標準線量の精度、鉍物の結晶化度、鉍物の粒度、照射後のTL量変化、アニール温度、検出下限、鉍物の添加回収率、について検討し、基礎データを収集した。この基礎データに基づいて、試料の抽出量と照射・非照射の判定基準とされるTL比の実験室内再現性を調べた5kGy照射のラボ試料量100g程度で分析試料量を確保するのに十分な量を再現良く得られた。しかし、TL比の値の再現性はあまり安定しなかったが、いずれの試料も0.1以上の値を与え照射判定には問題がなかった。これと平行して試験法の実験室間の再現性を調べた。269試料を分析したところ、正解率は80%を越え、十分な再現を備えた分析法であると結論づけた。同時に分析実験のステップごとの再現性を調べさらに再現性向上のための解析を行った。

分担研究者	棚瀬正和	財団法人	放射線利用振興協会
研究協力者	須永博美	財団法人	放射線利用振興協会
協力研究者	武川哲也		原子燃料工業株式会社
協力研究者	小木曾基樹		日本食品分析センター

A 研究目的

EU 諸国やアジア諸国において照射食品の許可範囲が緩和され、従来の香辛料の他に、ハーブ類を中心としていわゆる健康食品に広くこの技術が用いられている。この影響を受けて、我が国の法規制を知らずに輸出された健康食品などが従来から検疫所の積み戻しの対象になっていた。

検疫所の努力により、これら違反品の流通は従来抑えられてきた。韓国の照射インスタントラーメンがヨーロッパで問題となるなどの状況の中、急増するこれら照射食品に対する対応は困難になったのか、その努力に関わらず、近年我が国の市場にも原産地が外国の照射健康食品と考えられる食品が見いだされるとの報告が散見されるようになった。

しかし、これを検出する技術の基礎研究開発は行われているものの、我が国の行政需要にあった研究は行われていない¹⁻⁵⁾。

そこで、本研究はこの現状に鑑み照射健康食品の検出技術を可急的速やかに実用化し、違法な照射食品の輸入を監視することにより、我が国における輸入食品の衛生向上に資するものと考えられる。

平成 17 年度は TL 法、微生物学的方法について文献調査並びに基礎実験を行った。種々の問題点が浮かび上がり、特に分析法の再現性はどの程度あるのか、疑問が浮上した。特にラボ試料量をどれくらいにすれば再現性の良い結果が得られるのか、TL 比の再現性は信頼できるのかなどであった。

平成 18 年度は前年度の検討に引き続いて、TL 法については基礎的な事項と再現性を調べた。微生物学的な試験方法については、熱処理、あるいは真菌的な検討を加えて、的確な検知法を探った。

B. 研究方法

B-1 照射香辛料の微生物学的検知

試料 種類異なるものを合わせて、12 種類（白胡椒、黒胡椒、赤唐辛子、オールスパイス、ナツメグ、メース、ターメリック、カシア、フェネグreek、オレガノ、セージ、パプリカ）の市販の検体について、細菌数を調べた。

放射線照射 10MeV の電子線処理

試験法 試料 25 g をとり、225mL の回収液（0.05%Tween80 + 0.1% ペプトン水）を加え、ストマッカーで 30 秒振とうして、菌を抽出した。

細菌数 使用した培地は標準寒天培地 35℃、48 時間培養して菌数を数えた。

熱処理 菌抽出液を 70℃、20 分間加熱処理し、上記生菌数と同じように処理した。

B-2 真菌学的検知の検討

試料 種類異なるものを合わせて、12 種類（白胡椒、黒胡椒、赤唐辛子、オールスパイス、ナツメグ、メース、ターメリック、カシア、フェネグreek、オレガノ、セージ、パプリカ）の市販の検体について、細菌数を調べた。

放射線照射 10MeV の電子線処理

試験法 試料 25 g をとり、225mL の回収液（0.05%Tween80 + 0.1% ペプトン水）を加え、ストマッカーで 2 分振とうして、菌を抽出した。

細菌数 使用した培地は PDA 培地 25°C、7 日間培養して菌数を数えた。

熱処理 菌抽出液を 50, 60, 70°C、20 分間加熱処理し、上記生菌数と同じように処理した。

B-3 照射食品検知のための TL 法の確立に関する研究

添加標準線量の精度

標準線量は 1kGy とした。吸収線量の精度管理はアミノグレイを用い、ESR 測定を行い、線量の決定を行った。線量は我が国の国家標準である産業総合研究所にトレーサブルとした。

鉱物の結晶化度と TL 量

未結晶及び結晶の鉱物試料① S D A (未結晶の人工二酸化珪素) と② S D C (結晶化している人工二酸化珪素に対して上記のとおり 1 k Gy となる放射線照射を行い、TL 測定装置による熱発光量の測定を 3 回行った。

鉱物の粒度と T L 量

試料として、独立行政法人医薬品基盤研究所種子島圃場の表土(種子島土壌)を 40°C 以下で乾燥させ、これを①目開き 63 μ m ~ 125 μ m (以後 125 μ m という。)と② 125 μ m ~ 250 μ m (以後 250 μ m という。)の粒子になるようステンレスのふるいで分けた 2 種類である。これらの試料に 1 k Gy となるガンマ線を照射した後、TL 測定を実施した。

照射後の時間経過と TL 量の変化

試料は①種子島の 125 μ m の土壌試料及び、② (独) 産業技術総合研究所の標準試料 JF-1 を 250 μ m ~ 125 μ m になるように粒度をそろえ、550°C で 12 時間

加熱して放冷したもの(消光標準岩石)の 2 種類。これらに 1 k Gy となるようガンマ線照射を行い、50°C、16 時間のアニールをした後 TL 測定を行った。TL 測定は照射後 2、8、15、18 日間とし、保存は遮光し冷蔵庫(約 10°C)でおこなった。

アニール温度と T L 量

試料として上記①種子島の 125 μ m 土壌試料②産総研の標準試料 JF-1 から作成した消光標準岩石を用いた。

アニールは照射後ただちに試料を恒温槽に入れ 16 時間加熱し、アニール温度はそれぞれ 30°C、40°C、50°C とした。標準線量照射条件、TL 測定条件等は上記と同じである。

検出下限線量 (鉱物試料について)

試料: ①熱発光の少ない試料である種子島の 125 μ m 土壌試料②熱発光の多い試料である産総研の標準試料 JF-1 から作成した消光標準岩石を用いた。

この試料をガンマ線で 10Gy、100Gy、1kGy となる照射をした。この試料について通常のアニール後、T L 測定を行い下限線量を求めた。

標準添加線量の最適化(T L 比への影響) 試料①種子島の 125 μ m 土壌試料②産総研の標準試料 JF-1 から作成した消光標準岩石を用いた。

目的線量 コバルト 60 のガンマ線で 1k Gy

アニール: 50°C で 16 時間

添加標準線量: 1kGy, 0.5 k Gy, 0.25kGy の 3 水準とした。

TL 測定 GL 1 と GL 2 を測定し、T L 比

を求めた。

添加回収率試験

(予試験)

試料：市販のブラックペッパー

添加量：100 g の試料 3 個にそれぞれ、10 m g、30 m g、50 m g の砂を添加した。
抽出作業：試験法試案に従い、抽出を行った。

結果、10 m g の添加では約 3 m g、30 m g の添加では約 10 m g、50 m g の添加では、約 30 m g 回収できた。

(本試験)

試料：市販のブラックペッパー、ターメリック、フェヌグreek、セロリのホール及びパプリカの 5 種類。

添加量：ブラックペッパー、ターメリック、フェヌグreek、セロリのホールの場合は試料 100 g に対し 20mg の合成鉍物質（赤玉土と川砂（1：1）の混合物）を添加。

パプリカに 5 g に対して 5mg の砂を添加した。

試行回数：各試料について 5 回

抽出作業：試験法試案に従い、抽出を行った。

食品の照射検知における線量下限

試料：ブラックペッパー、パプリカ、フェヌグreek、ターメリック、セロリの 5 種。

添加鉍物質：上記合成鉍物質

添加量と添加方法：試料 100g に対し 20mg の照射済み合成鉍物質

目的照射線量：0.25、0.5 及び 1kGy。

添加標準線量：1kGy

抽出作業：試験法試案に従い、抽出を行っ

た。

共通分析手順

試料 100g に水を加え、超音波洗浄浴に 15 分間処理する。これを 125 μ m のナイロンメッシュで濾過し、濾液を集めて、1000 x g、2 分間遠心する。これに 5 ~ 10mL のポリタングステン酸ナトリウムを加え、有機物と鉍物質を分ける。この鉍物質を酸等で処理し、乾燥し、TL 試料とした。

窒素気流中、70°C から 400°C まで加熱し、熱発光 (TL, Glow1) を測定した。

これに、1 kGy の標準線量を添加し、再び TL (Glow2) を測定した。

$$\text{TL 比} = (\text{Glow 1}) / (\text{Glow2})$$

B-4 TL 法の実験室内の再現性

(予試験)

試験実施機関：日本食品分析センター

試料：黒胡椒、パプリカ、セロリ（種）、トウガラシ 3 種類、パセリ、ショウガ、オレガノ 2 種類、オールスパイス 2 種類、ガーリック、シナモン (Zeylanicum)、シナモン (Cassia) 2 種類、シナモン (Cassia) マスターシード 2 種類、白ごま、黒ごま、たまねぎ 3 種類、ターメリック、フェヌグreek、コリアンダー、クミン、桂皮

抽出方法：昨年試験法試案による。

TL 測定：抽出した試料の TL1 のみ試案の標準法で測定。

試行回数：2 回

(本試験)

試験実施機関：日本食品分析センター、日本冷凍食品検査協会、原子燃料工業株式会社

試料：市販のターメリック（粉末）、黒胡椒、赤唐辛子、ターメリック（フィンガー）、フェネグリーク、クミン、セロリ、オールスパイス、黒ごま、パプリカ、オレガノ、コリアンダー、生姜、シナモン
目的照射線量：5kGy 電子線照射。

標準添加線量：1kGy、コバルト 60 ガンマ線

TL 測定：試験法試案に従った。

試行回数：1 試料 1 日 3 回、3 日間

報告事項：合計 9 回の抽出量と TL 比など。

B-5 TL 法の実験室間の再現性

試験実施機関：東京都立健康安全研究所、日本アイソトープ協会、食品総合研究所、日本食品衛生協会、日本食品分析センター、日本冷凍食品検査協会、横浜検疫所、神戸検疫所、原子燃料工業株式会社、放射線利用振興協会、

試料：香辛料 5 種（黒胡椒 (BP)、オレガノ (OR)、赤唐辛子 (RP)、パプリカ (PA)、ウコン (TA) (ターメリック))

目的照射線量：0.3, 1kGy 電子線照射試料と非照射試料。

標準添加線量：1kGy、コバルト 60 ガンマ線

分析手順：試案に従った。

TL 測定：試案に従った。

試行回数：1 試料 1 回 269 個の試料を分析した。

C 研究結果

C-1 照射香辛料の微生物学的検知

非照射試料の一般生菌数が 10^5 以上あったのはパプリカ、セージ、ターメツ

リック、メース、オールスパイスであった。黒胡椒、ナツメグは非照射の試料においても、ゼロであった。

菌数が多い時、熱処理後菌数測定し、熱処理前の菌数を比較することにより、7kGy を検出下限に検知が可能であった。

昨年 の 検 討 に 比 べ て 極 端 に 菌 数 が 少 なかった。

C-2 真菌学的検知の検討

真菌の菌数はもともと少なく検知が困難であった。培養温度、加熱処理放射線処理などを調べたが、照射・非照射の判定に役立った試料は白胡椒とセージであった。さらに検討が必要であった。

C-3 照射食品検知のための TL 法の確立
多くの結果が得られたが、重要な点を拾った。

標準線量の照射の精度と再現性

1kGy の目標線量に対し、平均 0.99 kGy、標準偏差 0.06 kGy という値が得られた。

結晶化度と TL

結晶化している二酸化珪素では未結晶の二酸化珪素のおよそ 30 倍の発光量があり、また良い再現性を示した。

鉱物の粒度と TL 量

粒度が大きい方は小さいものに比べ約 1.5 倍の発光量となった。

照射後の経時変化と TL 量

JF-1 試料については TL 強度にわずかな変化があるが、カーブの形について経時変化は認められない。

種子島土壌についても TL 強度にわずかな差異があるが、カーブの形につい

での経時変化は認められなかった。

アニール温度と TL 量

アニール温度 30°C から 50°C へ上昇するとともに発光量が減少し、アニール温度が 50°C の場合は 30°C や 40°C の場合に比べ各 3 回の測定における発光量のばらつきが減少した。

発光観測のための線量下限 (鉍物単体)

線量と発光量との関係は一応直線的にプロットされるが、この結果より線量下限を求めることはできなかった。

編者付記：別の実験によると 400Gy 程度と考えられている。(S/N=3 としたとき) 標準線量の最適化

JF-1 の場合は、0.25 k Gy、0.5 k Gy、1.0 k Gy のいずれも添加照射線量として適切と思われる。また、種子島土壤の場合は 0.25 k Gy ~ 1 k Gy 試料の各測定においてはバックグラウンドノイズが無視できない程度に大きかった。

添加回収

各試料の 5 回平均の回収率はブラックペッパー 32%、ターメリック 250%、パプリカ 219%、セロリ 136%、フェヌグリーク 28%であった。

食品の照射検知における線量下限

試料に照射した線量 (Glow1 を生じる線量) と TL 比との関係から線量を求める試みを行ったが、実際とはあわず、実験を重ねる必要がある。

C-4 TL 法の実験室内の再現性

予試験において 28 種類の香辛料のうち 18 種類について、100 g から熱ルミネッセンス測定に最低限必要とされる 1 mg 程度の鉍物を得ることができた。

また、ガーリック、タマネギなどは途中の加工のために、付着鉍物量は 0 に近かった。

抽出された鉍物について、TL 発光曲線を調べたところ、多くの試料は極大温度を示なかった。パプリカのように照射香辛料によく見られる TL 曲線を示すものが 2, 3 見られた。

(本試験) セロリ、ターメリック (粉末並びにホール) 黒ごまはばらつきが必要量を確保できた。クミン、オレガノ、パプリカは比較的再現良く安定して抽出が可能であった。コリアンダーはばらつきが大きく最小のラボ試料量として 100g は必要だろう。

赤唐辛子、シナモン、オールスパイス、フェネグリークは初期試料量 100g を減らすことは出来ず、むしろ 150g とか 200g とかの増量を考える必要があるだろう。

TL 比の再現性は悪く、粉末のターメリックの平均 TL 比は 25 であり、 σ 19.4 であった。セロリ、黒胡椒、クミン、コリアンダー、赤唐辛子は TL 比の平均が 2.3 から 1.5 の範囲にあった。これら試料の σ 値 (標準偏差) は日によって安定せずバラツキの大きさが変化した。しかし、コリアンダーだけは小さな σ 値を与え、安定した TL 比を示した。

赤唐辛子、黒ごま、シナモン、生姜、オールスパイス、フェネグリーク、オレガノ、パプリカの TL 比の値は平均で 1.5 以下であった。しかし、赤唐辛子とフェネグリークは大きな変動幅を与える日が散見された。

B-5 TL法の実験室間の再現性

実験の結果そのものは全体的に問題がなく、研究そのものは良好な結果を得た。

原案に示された判定基準に当てはめて、各機関が照射・非照射の判定をした結果、全体では87%の正解率であった。非照射の判定率は84%で良好であったが、黒胡椒、ターメリックは50、67%であった。その他の香辛料では、87から100と良好であった

0.3kGyの試料については黒胡椒の判定率が63%であった。全体としても79%の正解率であった。

1kGyでは100%の正解率であった

D. 考察

D-1 照射香辛料の微生物学的検知

熱処理の有無による菌数差の判定基準と、各香辛料について別途一般生菌数の判定基準を定めることにより、放射線照射の有無の判定は可能であると考えられた。

しかし、市販の香辛料の生菌数は極めて少なく、本法の適用外のものが数多く見られた。とくに菌数がゼロのものが複数あったことから、既存技術でも香辛料の菌数を十分減少できるものと考えられた。

D-2 真菌学的検知の検討

TL法などの適用が困難とされている白胡椒について適用の可能性が示されたことから、さらに検討するべきであろう。しかし、全般的には初発菌数が少ないために、市販の香辛料には適用が難し

い。しかし、昨年度の検討から未加工の試料については十分な菌量が期待できるので、本改良法の適用は十分考慮に値する。

D-3 照射食品検知のためのTL法の確立 標準線量の照射精度と再現性

今回の研究における実験で標準線量照射のための精度、再現性を調べたところ、満足する結果が得られた。照射及び線量測定を行う技術の維持向上に努める必要がある。

鉍物の結晶化度とTL量

検知を行う食品の産地や土壌の種類により回収できる鉍物は異なるため、それぞれに対応できるように検討を行う必要があるが、鉍物のTL発生に関する基礎知識として重要である。

鉍物の粒度とTL量

試料皿の大きさや試料の置き方等が関わることは明らかであり、工夫、改善していく必要がある。

照射後の経時変化とTL量

試料の保管期間が長期間にわたっても検知ができたという報告があり、調べた範囲では急激な減衰等特異的な現象は見あらず、矛盾はなかった。
(编者：しかし、一般的な論議とは矛盾するのでさらに検討が必要だろう。)

アニール温度とTL量

データのばらつきが小さくなり、検知の信頼性向上する。TL法におけるアニールは極めて照射の検知という信頼性を確保するために有用な手法といえる。

検出下限線量（鉍物試料について）

グローカーブの形において相対的にノ

イズの少ない安定な状態を呈するだけ照射された時の線量が検出下限線量というべきであろう。

標準線量の最適化 (TL 比への影響)

経験を積み重ねることにより、対象に適した最適な線量が容易に決められるようになると思われる。

添加回収

抽出回収した鉱物試料にはまだ有機物が分離しきれずに残ってしまう場合も生じる。方法の改善により有機物の入り込まない抽出法の開発が必要となる。

食品の照射検知における線量下限

今回の検討では線量下限を求めるためのデータ数が十分とはいえず、さらに多くのデータの積み重ねが必要である。

D-4 TL 法の実験室内の再現性

試料から分離できる鉱物の再現性

本研究を通じて、試験法や試験者の因子よりも、試料の不均一性や香辛料の精製度の相違などの試料固有の要素が本試験法の適用に大きく影響することが懸念された。しかし、実際には多くの試料については試験が可能であることが分かった。

TL 比の再現性

試験室内の再現性を CV% として求めた。この検知法の場合、TL 比の再現性は CV 値 40% 以下なら、安定していると考えても良いのだろう。

D-5 TL 法の実験室間の再現性

全体的には良好な成績であった。一部の黒胡椒では正解率が落ちているが、試料数が少ないこともあってこのような結果となったと考えられる。他のコラ

ボの結果と比べてもほぼ同じ結果だが、0.3kGy という設定が他の研究よりも低いにも関わらず、同等であったことは優れた分析法であると示す。

得られたデータを精査したところ、正しい判定知識や経験があれば、多くの場合、誤ることなく判定が可能であった。さらに TL 法の知識の普及が必要であろう。

E. 結論

微生物試験法については試料中の菌量に左右されて検知が出来たり出来なかったりする。今回の試料は市中に出回っているものであり、極めて菌量が少なく、検知には不向きであった。しかし、本法の完成度は高くさらにデータを集めて完成させたい。

TL 法に付いては、分析経験のある人がほとんどいないために、試行錯誤の点があるが、おおむね完成したといえよう。今後、実際の試料にあたりさらに完成度を高める必要がある。本年度の研究も極めて実り多いものであり、この分野に大きく貢献することが期待できる。

文献

1. 宮原誠：防菌防黴、30 (4)、233 - 248、2002
2. 宮原誠：食品照射、37 (1, 2)、29 - 47、2002
3. 宮原誠：食品照射、38 (1, 2)、31 - 48、2003
4. 宮原誠：食品照射、39 (1, 2)、28 - 49、2004
5. 澁谷智晃、香取佳子、淵野清彦、

柳哲郎；放射線照射食品の探知調査、食品衛生研究、55、57-62（2005）

6.

F 健康危険情報なし

G 研究発表

1 論文発表

宮原 誠 ” 照射食品検知を巡る最近の話題” 放射線と産業 111号 p31-35
2006

2 学会発表

後藤典子、等々力節子、宮原誠 「照射・非照射混合香辛料の TL 法による検知」 第 43 回 アイソトープ・放射線研究発表会 2006 年

等々力節子，齋藤希巳江，後藤典子、宮原 誠 米谷民雄、「酵素分解法による粉末コショウからの TL 測定試料の調製と照射検知への応用」 第 43 回 アイソトープ・放射線研究発表会 2006 年

宮原 誠 小嶋拓治、須永博美、米谷民雄 放射線照射食品プロセスのための ESR 法を用いる微量放射線量測定法日本薬学会第 126 年会 2006 年

武川哲也、宮原 誠、米谷民雄 微生物数による香辛料への放射線照射の判定に関する検討 日本食品衛生学会 第 91 回学術講演会 2006 年

神保勝彦、小林芳生、横田悦子、太田建爾、宮原誠、米谷民雄「放射線照射食品の微生物学的検知法の検討第 27 回日本食品微生物学会学術総会 2006 年

宮原 誠、後閑麻代、木村崇弘、須永博美、棚瀬正和、米谷民雄 照射食品の TL 法による検知 その 2 試験法の基礎的検討第 43 回アイソトープ・放射線研究発表会 東京 2006

木村 崇弘、須永 博美、棚瀬 正和、宮原 誠、米谷民雄 照射食品の TL 法による検知 その 1 基礎的検討 第 43 回アイソトープ・放射線研究発表会 東京 2006

尾作浩司、加藤 毅、小木曾基樹、渡井正俊、宮原 誠 TL 法による放射線照射香辛料の検知に関する検討 日本食品衛生学会第 92 回学術講演会 春日井 2006

宮原 誠、後藤典子、等々力節子、米谷民雄 照射食品の TL 法による検知 第 43 回全国衛生化学技術協議会

H 知的財産権の出願・登録状況
なし

放射線照射食品の微生物学的検知法に関する研究

分担研究者 宮原 誠 国立医薬品食品衛生研究所食品部室長
協力研究者 武川 哲也 原子燃料工業株式会社
実験協力者 西口葉子 原子燃料工業株式会社

研究要旨 香辛料に付着する一般生菌を対象として、放射線照射が行われた場合の、熱処理の有無による放射線損傷菌と健常菌との生育の違いについて調査し、香辛料への放射線照射の有無を検知するための微生物学的可能性について検討した。本研究では、本年度実施中の真菌を対象とした研究と同じ 12 種類の香辛料を用い、まず、3, 7, 10kGy の線量で 10MeV 電子線を照射した香辛料の一般生菌数および生残曲線を求めた。次に、この中から生残菌数、照射線量に基づいて 5 種類の香辛料を選び、各種類 2 検体の非照射試料と 3kGy, 7kGy 照射試料について、70℃, 10 分間の熱処理を行ったものと、非処理のもの菌数を測定した。この結果、非処理の菌数を A、熱処理済みの菌数を B としたとき、 $\log A - \log B$ の値（菌数差を対数表示した値）は、非照射試料で -0.08 から 0.42, 7kGy 照射試料で 0.32 から 0.98 であった。また、平均値はそれぞれ、0.11 と 0.68 であり、明らかに 7kGy 照射試料の方が非照射試料に比べて減少率が高かった。このため、5 種類の香辛料の、非照射試料と 7kGy 照射試料の照射の有無は、この菌数差の数値により大部分判定可能であると考えられた。実際に、菌数差で 0.30 を基準として、この数値未満を非照射試料、この数値以上を 7kGy 照射試料とすると、非照射試料 10 検体の内、9 検体は非照射試料として判定可能であった。また、7kGy 照射試料については、菌を確認することができた 8 検体の内、全て照射試料として判定可能であった。

一方、10 kGy 照射試料についてはほとんどの香辛料で菌が検出できず、検出できた試料についても 10^3cfu/g 以下であった。これらの結果から、菌数差の判定基準と一般生菌数の測定値による判定基準を併用することにより、放射線照射の有無の判定は可能であると考えられた。

A 研究目的 要としない簡易迅速な検査法であり、実香辛料を対象とした微生物学的検知法は 用的な方法として昨年度より検討を行っ再現性が高く、特殊な技術、設備等を必 ている。今年度は、さらに真菌による検

知法についても新たに検討を加えると共に、一般制菌群による検知法についても引続き検討を行った。

本研究は、細菌が放射線により損傷を受けた場合には、熱処理についても感度が高くなるとの知見に基づいている^{1) - 3)}。このため、本研究では香辛料に付着する一般生菌群に放射線照射が行われた場合の、熱処理の有無による健常菌と放射線損傷菌との生育の違いについての調査を行うことにより、香辛料への放射線照射検知の可能性について検討を行うこととした。

B 実験方法

1. 各香辛料の一般生菌数と放射線耐性の調査

微生物による検知法を検討するにあたって、まず香辛料の一般生菌数および一般生菌群の放射線耐性を調査した。

本年度は、真菌を用いた微生物学的検知法についても検討を行っており、本研究においても、真菌による検知法と比較、検討するために同じ試料を用いることとした。

用いた試料は、真菌の汚染が大きいと言われている 12 種類の試料⁴⁾である。それぞれの試料に対して 10MeV の電子線を照射して、各試料の生菌数の放射線耐性を測定した。

1) 供試材料

実験に供試した香辛料は、国立医薬品食品衛生研究所が、国内の卸売販売店よ

り購入した以下の 12 種類の試料である。

- ・白胡椒 2 検体
- ・黒胡椒 2 検体
- ・唐辛子 2 検体
- ・オールスパイス 2 検体
- ・ナツメグ 2 検体
- ・メース 2 検体
- ・ターメリック 2 検体
- ・カシア 2 検体
- ・フェネグリーク 2 検体
- ・オレガノ 2 検体
- ・セージ 2 検体
- ・パプリカ 2 検体

2) 電子線照射

原子燃料工業(株)のロードトロン型電子加速器⁵⁾を用い、各試料 200g に対して 10MeV 電子線で下記目標線量まで照射した。

非照射, 3kGy, 7kGy, 10kGy

3) 試料調整

試料調整および培養で用いる方法は、表 1 に示す各法が一般的である。細菌の場合には、日本薬局方の微生物限度試験法では SCDA 培地、食品衛生検査指針の生菌数測定法では標準寒天培地を用いている。しかしながら、本研究では食品業界で一般的な食品衛生検査指針に準拠しつつ、かつ適宜研究目的に沿うように変更した方法を用いた。

また、試料は各条件につき 2 検体ずつ作成した。

a. 回収液（希釈液）

0.05%Tween80, 0.1% ペプトン水* 1

* 1 後述の寒天平板塗沫法を用いる際、損傷菌に対する食塩の悪影響を排除するために生理食塩水は用いなかった。

b. 回収

試料 25g に回収液 250ml を加え、ストマッカーにより 2 分間ブレンディングした。

4) 寒天平板塗沫

a. 培地

標準寒天培地

b. 操作

回収後の原液を希釈液にて 10 倍ずつ段階希釈し、1 平板あたり 10 ~ 100cfu 得られる程度まで調整した。各段階 3 枚の寒天培地を用い、0.5ml の希釈液をコンラージ棒で均一に平板表面に塗沫した* 2。

* 2 損傷菌の場合、混釈法は生育を阻害すると言われている 6)。

5) 培養

培養温度および培養期間は 30℃、7 日間とするが、コロニーの拡大によりカウントできなくなる可能性があるため、7 日以前にも適宜カウントした。

2. 熱処理による照射検知可能性の調査

放射線処理と熱処理を 2 段階に分けて行った場合は、単独処理の場合よりもそれぞれの処理に対する感度が高くなると

言われている 1) - 3)）。このため、電子線照射した試料を熱処理し、熱処理に対する感度の違いを調査することとした。どの程度の熱処理温度および処理時間が適切であるかは不明であるので、まず 1 種類の香辛料について予備実験を行った。予備実験の試料は各熱処理条件につき 1 検体ずつとし、本実験では 2 検体とした。

a. 試料

本実験では、12 種類の香辛料の中から 5 種類を選定した。試料の選定は B- 1 項の実験結果より菌数が多く、食品衛生上重要なものとした。予備実験では 5 種類の中から 1 種類に限定した。

b. 線量

B- 1 項で用いた線量から 2 線量を選定した。選定基準は B- 1 項の実験で、十分菌数が多くかつできるだけ高線量であることとした。

c. 熱処理

予備実験では 40℃、50℃、60℃、70℃とし、処理時間は 10 分とした。

この中から、非照射と照射済みで最も差が大きい温度を選定した。熱処理は B- 1 項と同様の処理により回収された原液 5ml を試験管に入れ、所定の温度、時間加熱した後急冷した。

d. 培養条件

温度以外は B- 1 項と同条件。ただし、培養期間 7 日で不十分な場合は延長し

表 1 各規格の細菌および真菌の生菌数測定方法の比較

規格・基準	真 菌 培 地	培養温度および期間	好気性細菌 培 地	培養温度および期間	試料調整	試験法
第 15 改日本薬局方	ポテト・デキストロース寒天培地 (PDA 培地)	20～25℃, 5 日以上	ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト・寒天培地 (SCDA 培地)	30～35℃, 5 日以上	試料	寒天平板混釈法
生菓の微生物限度試験法	サブロー・ブドウ糖寒天培地				小形又は粉末; 50～250g	寒天平板塗抹法
微生物限度試験法	GP 寒天培地				大形; 250～500g	(液体培地段階希釈法) (メンブランフィルタ法)
					希釈液	
					pH7.2 のリン酸緩衝液	
					pH7.0 のペプトン食塩緩衝液	
食品衛生検査指針 生菌数	PDA 培地 麦芽エキス寒天培地 (MEA) ジクロラン・ローズベンガル・クロラムフェニコール寒天培地 (DRBC) グルコース・酵母エキス寒天培地 (GYA) YM 寒天培地 (YMA)	23～25℃, 5～7 日	標準寒天培地	35℃, 48 時間	試料 10g, 25g 希釈液	標準平板菌数測定法
					リン酸緩衝液	
					生理食塩水	
					0.1% ペプトン加生理食塩水	
					0.1% ペプトン水	
ISO11737-1 (2006) 医療用具の滅菌 - 微生物学的方法 - 第 1 部: 製品上の微生物群の推定 附属書 A	サブロー・デキストロース寒天培地 麦芽エキス寒天培地	20～25℃, 5～7 日	SCDA 培地 ニュートリエント寒天培地 血液寒天培地 グルコース・トリプトン寒天培地	30～35℃, 3～7 日	希釈液	寒天培地重層法
					リンゲル溶液	寒天培地接触法
	ローズベンガル寒天培地 SCDA 培地				0.1～1.0% ペプトン水 リン酸緩衝ペプトン水	寒天平板混釈法 寒天平板塗抹法
	ポテトデキストロース寒天培地 クロマイ寒天培地				リン酸緩衝生理食塩水	(液体培地段階希釈法) (メンブランフィルタ法)

た。

C 実験結果

1. 各香辛料の一般生菌数と放射線耐性の調査

供試香辛料 12 種類の一般生菌数とその放射線耐性を調べるため、各照射線量において菌数を測定した結果を以下に示す。

表 2 は供試香辛料の照射線量 0, 3, 7, 10kGy に伴う一般生菌数の測定値を示したものであり、図 1 はそれを、縦軸に菌数（対数表示）、横軸に照射線量の生残曲線として表したものである（黒胡椒とナツメグを除く）。

実験の結果、10kGy の線量で一般生菌が検出されたものは、12 試料中 4 試料のみであった。菌が検出された場合の最も菌数が多い試料でも 3.1×10^2 cfu / g

にすぎなかった。

なお、黒胡椒、ナツメグの菌数は非照射試料においても 0 であったが、黒胡椒では真菌の菌数測定実験においても 0 であったため、そもそも滅菌処理されていた可能性が非常に高い。ナツメグについては原因不明であり、測定に問題があった可能性がある。

参考のために、写真 1～写真 4 にセージおよびオールスパイスの非照射と 7kGy 照射時の細菌コロニーの写真を示す。

2. 熱処理による照射検知可能性の調査

1) 予備実験

まず熱処理温度を決定するための予備実験として、C-1 項で測定した各香辛料の一般生菌数およびその生残曲線から、対象香辛料としてセージを選択し、非照射試料と 3kGy, 7kGy 照射試料の回収液をそれぞれ 40℃, 50℃, 60℃, 70℃の温度で 10 分間処理し、菌

表 2 香辛料付着生菌数の線量による変化

単位 cfu / g

香辛料種類	照射線量 (kGy)			
	非照射	3	7	10
白胡椒	2.70E+04	1.30E+02	0.00E+00	0.00E+00
黒胡椒	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
唐辛子	3.00E+03	6.00E+01	0.00E+00	0.00E+00
オールスパイス	8.50E+05	9.70E+03	1.50E+02	0.00E+00
ナツメグ	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
メース	4.10E+05	2.70E+02	7.00E+01	0.00E+00
ターメリック	3.90E+07	2.90E+05	9.30E+02	1.60E+02
カシア	2.50E+03	2.80E+02	0.00E+00	0.00E+00
フェネグリーク	1.10E+03	1.40E+02	1.70E+01	0.00E+00
オレガノ	3.20E+04	3.50E+03	1.20E+02	8.30E+01
セージ	8.50E+05	1.10E+04	3.00E+03	3.10E+02
パプリカ	1.40E+07	6.80E+05	3.20E+03	9.30E+01

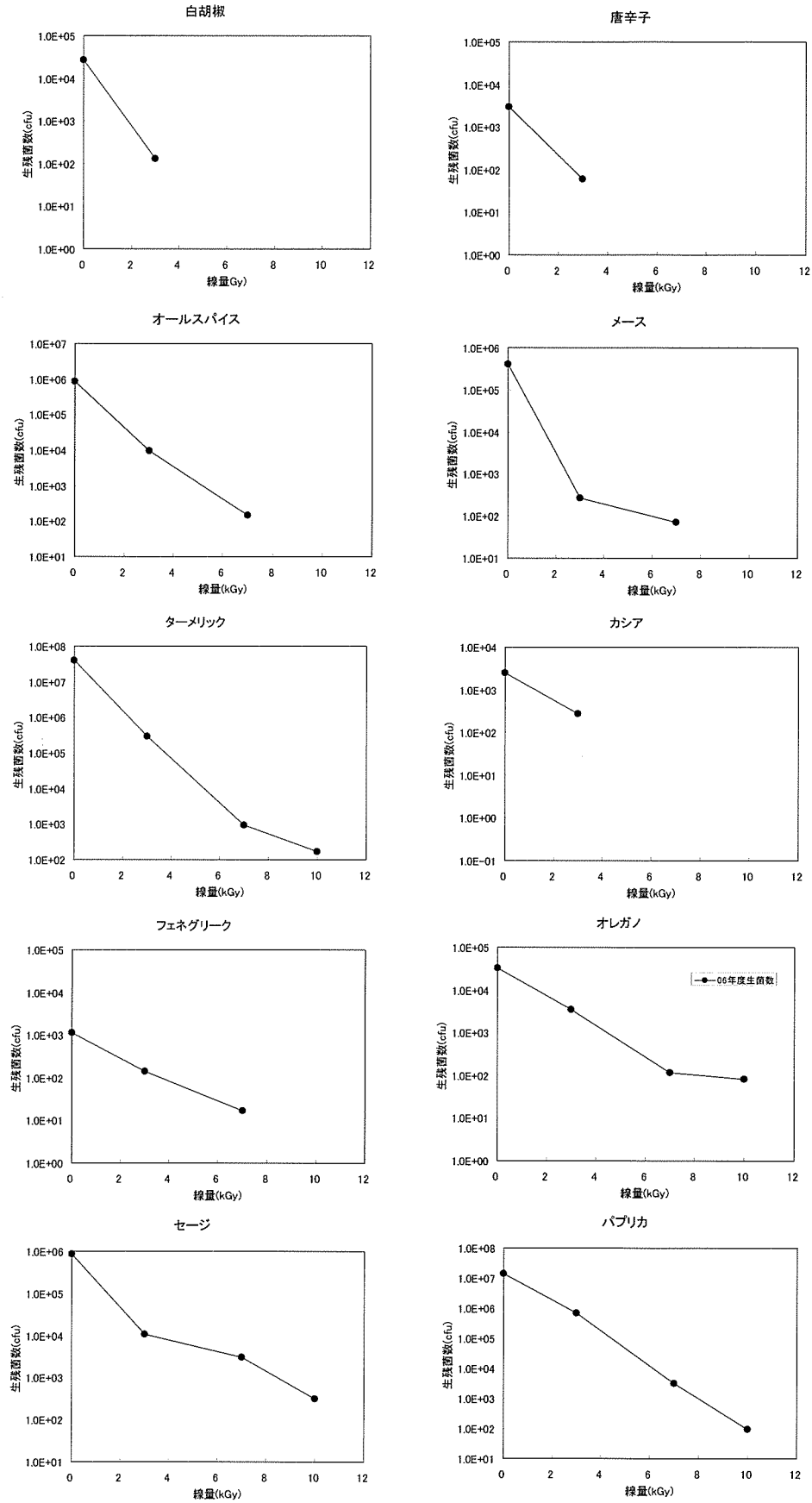


図1 各種香辛料一般生菌数生残曲線

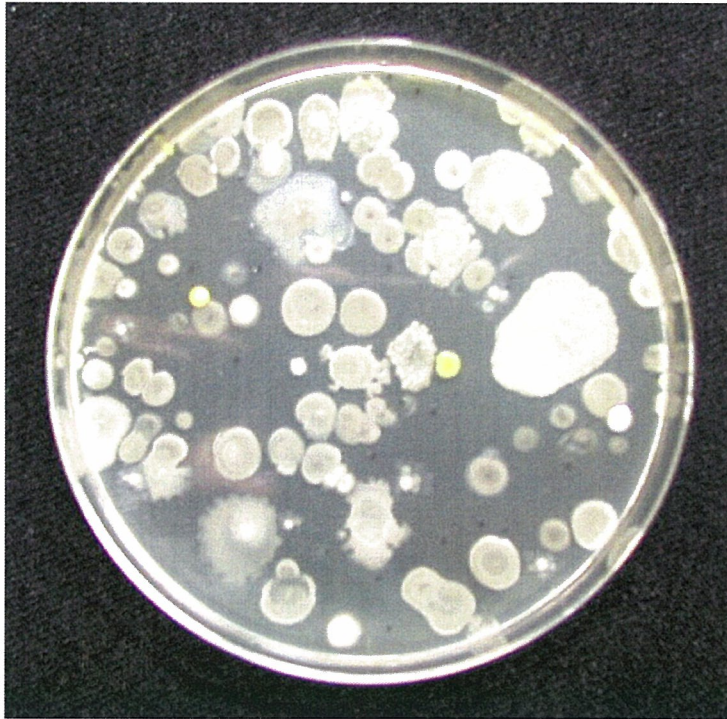


写真1 セージ非照射 2回希釈寒天平板塗沫コロニー



写真2 セージ 7kGy 照射 原液寒天平板塗沫コロニー

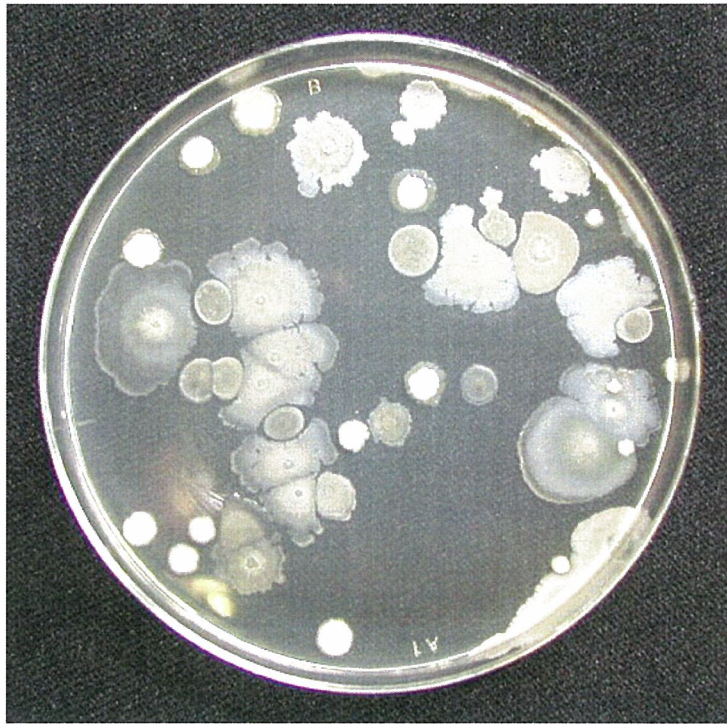


写真3 オールスパイス非照射 3回希釈寒天平板塗沫コロニー

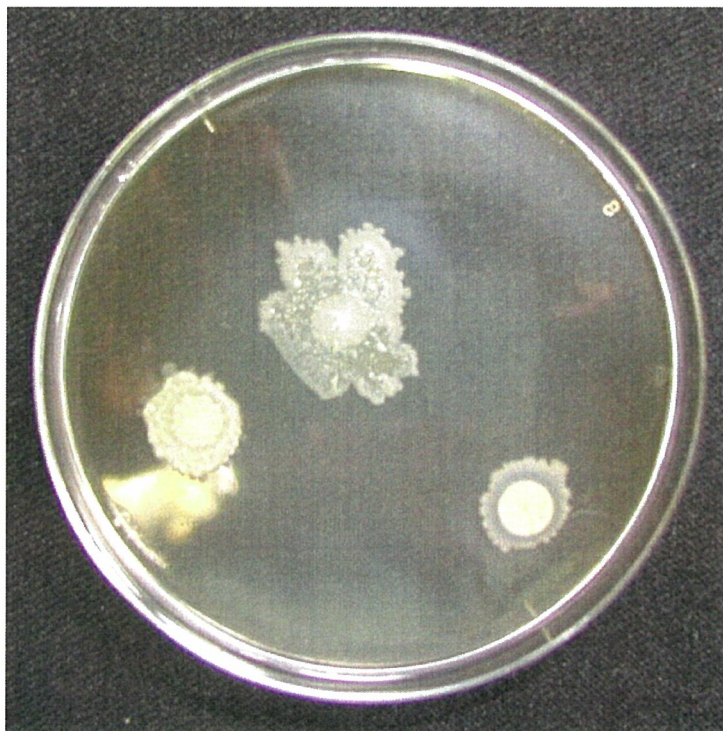


写真4 オールスパイス 7kGy 照射 原液寒天平板塗沫コロニー

数の変化を測定した。この結果を表3および図2に示す。

図より明らかのように、熱処理温度70°Cで非照射と7kGy照射の菌数差が最も大きくなったため、本実験の熱処理温度を70°Cとした。

2) 本実験

予備実験の結果より、熱処理温度を70°Cとし、C-1項で測定した各香辛料の一般生菌数およびその生残曲線から、高線量域でできるだけ菌数が増える香

辛料5種類を選び、以下の線量の組み合わせによる電子線照射と熱処理の有無による菌数変化を測定した。

この結果を表4に示す。また、図3～図7には熱処理の有無による菌数の変化をプロットした。

さらに、菌数の変化の図だけではその差の違いやばらつきが分かりにくいので、より分かりやすくするために、熱処理無しでの菌数をA、熱処理を行った菌数をBとしたとき、下記のように菌数

表3 非照射と7kGy照射セージの熱処理温度による菌数変化

熱処理温度 (10分)	非照射 菌数 (cfu/g)	3kGy 照射 菌数 (cfu/g)	7kGy 照射 菌数 (cfu/g)	非照射菌数/ 7kGy 菌数比 $\log(A/B)$
	A			B
なし	2.50E+05	2.20E+04	5.90E+02	2.6
40°C	1.80E+05	1.60E+04	5.60E+02	2.5
50°C	1.50E+05	1.40E+04	1.20E+02	3.1
60°C	1.10E+05	1.00E+04	3.40E+01	3.5
70°C	1.20E+05	1.10E+04	1.40E+01	3.9

図2 非照射と3kGy,7kGy照射セージの熱処理による菌数変化

