

E. 結論

鉍物の回収率を高めるための検討では、作業の最初に行う香辛料の入っていた袋の洗い出しが、極めて重要であることが改めて確認された。また、オレガノなどについては、塩酸を入れた際の発泡が著しく、これは、炭酸塩の量が多かったものと推定された。しかし、炭酸塩そのものの TL 測定を行っていないので、炭酸塩そのものが発光するのか、照射との関係はどうなるのかについては不明であり、今後検討したい。

TL 測定器の性能確認及び校正用標準試料の探索では、TLD 素子に代わる試料の条件として、発光量が 1000 ~ 1500 n C / m g 程度でピークが 1 つであるものを基本として検討を行った。今回実験を行った試料の中で、最もこの条件に近かった JG-1 (B) などは、モニター (编者注: 標準品?) となる可能性も期待できる。特に、標準岩石試料である JF-1 や JG-1 は、照射などの前処理なく十分な発光が得られることから、モニター (编者注: 標準品?) として利用することが期待できる。

新規香辛料の添加回収実験では、炭酸塩の除去等、考慮・検討を要することもあるが、今回実施した香辛料のほぼ全てにおいて TL 法の適用が可能であると考えられる。

鉍物分離用比重液の検討では、ポリタングステン酸ナトリウム溶液及び飽和タングステン酸ナトリウム溶液で回収率の比較検討を行った。どちらを使用した場合でも、回収率に若干の差はあるものの、抽出の支障となる

ほどではなかった。その結果、安価な飽和タングステン酸ナトリウム溶液の利用も十分可能と言える。

標準線量照射の精度と再現性向上については、照射方法の改善を今年度を実施した結果、標準線量照射の目標とする照射線量 1kGy に対して、すべて定められた 1kGy \pm 5% の値になる結果が得られた。そして、精度は昨年度の標準偏差 (σ) 0.06、変動係数 (CV%) 5.90 であった値が、今年度はそれぞれ (σ) 0.02、(CV%) 1.76 となり、理想的な結果となった。従って、今後 1kGy を目標とする標準照射を行う場合には、今年度実施した計算方法を用いて、照射位置を決定し、試験を実施することが好ましい。今後もこの精度を持続し、1kGy \pm 5% の範囲の標準線量照射を行う必要がある。

ESR 法による検知技術の検討では、照射した乾燥果実、健康食品、糖類の試料について ESR 信号の (と?) 線量との相関が確認された。また、照射後の時間経過による ESR 信号の減衰については上記試料について、照射後 6 日以内及び 1 ヶ月のデータを取得し、両者に大きな差が認められなかった。以上の結果、検知法として適用できる見通しが得られた。また、グルコース、フルクトース、スクロースの試料について、粒度を変化させ、粒度による ESR 信号の変化及び 1 ヶ月の時間経過による変化を調べた。その結果、前者については粒度が小さくなるに従って信号強度が小さくなることが観測され、また後者については粒度が経過時間による変化には影響しないことが明らかになった。

G. 研究発表

1) 杉恵理子、清水隆志、須永博美、棚瀬正和、宮原誠、米谷民雄；照射食品の TL 法による検知の為の基礎的検討その4 発光量に及ぼす種々の要素と条件、第 83 回 日本食品衛生学会 (2007)

2) 杉恵理子、川島郁男、須永博美、棚瀬正和、宮原誠；照射食品の TL 法による検知技術の検討、第 12 回 放射線プロセスシンポジウム (ポスター) (2007)

4) 杉恵理子、川島郁男、須永博美、棚瀬正和、宮原誠；照射食品の TL 法における検知対象試料の拡大と検知法普及に関する種々の検討、Radioisotopes 準備中

5) 川島郁男、杉恵理子、須永博美、棚瀬正和、宮原誠；ESR 法による糖類を含む照射食品等の測定、Radioisotopes 準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況

杉恵理子、木村崇弘、清水隆志、須永博美、棚瀬正和、宮原誠；照射食品検知用熱発光試料の輸送及び照射容器 (特許出願中)

謝辞

ESR 法の実験を行うにあたり、日本原子力研究開発機構 高崎量子応用研究所 半導体・高分子材料耐放射線性評価研究グループ 森下憲雄氏のご指導を頂きました。ここに、心より感謝の意を表します。

参考文献

1) 棚瀬正和、須永博美、杉恵理子、清水隆志；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に関する研究 平成 18 年度「照射食品検知のための TL 法確立に関する研究」、P. 45-69 (2007)

2) 後藤典子、山崎正夫；照射粉末食品の TL 測定における試料調製、照射食品、39、P. 8-12 (2004)

3) 後藤典子、玉城恵、村瀬亜紀子、深井由美子、江口美佐子；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に関する研究 平成 17 年度「照射食品検知のための TL 法に関する研究」、P51-89 (2006)

4) 小嶋拓治、田中隆一；電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いた大線量測定 Radioisotopes, Vol. 41, 320-330 (1992).

5) 田邊寛子；市販香辛料の熱ルミネッセンス特性 東京都立産業技術研究所研究報告 第 4 号 P. 149-150 (2001)

6) 田邊寛子；ESR 法による照射骨付き鶏肉の線量推定 食品照射 第 32 巻 P. 2 (1997)

7) 池谷元伺；ESR (電子スピン共鳴) 年代測定 アイオニクス (1998)

放射線照射香辛料の微生物学的検知法の試験に関する研究

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 宮原 誠

研究協力者 原子燃料工業株式会社 武川 哲也

研究要旨 香辛料に付着する一般生菌を対象とし、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。

A 研究目的

平成 18 年度の「放射線照射食品の検知技術に関する研究」において、照射香辛料に対する TL 法の有効性は確認され、昨年 7 月には本方法が公定法として通知されることとなった。しかしながら、TL 法のような特殊な技術、設備等が必要ではなく、簡易的にスクリーニングとして用いることが出来る検知法も必要とされている。このため、昨年度には微生物学的検知法として、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 1) ~ 3) に基づく実験を行い、ある処理条件において照射の有無を検知できる可能性が高いことを見出した。4)

しかし、細菌の生菌数を指標とする判定は香辛料の種類によっても変わり、同じ条件であっても各分析機関の手技によって変わる可能性がある。このため、許せる範囲で多くの分析機関に対し、同一の試料を用いて本方法の有効性についての検証を行うこととした。このため、ここでは香辛料 5 種類に 2 水準の線量 (5kGy, 7kGy) の電子線を照

射し、非照射試料と併せて 3 水準各 75 検体の試料を 10 試験研究機関に配布し、そのうち 9 機関で判定し、再現性よく判定できるかどうか調べた。(1 機関は未回収)

B 研究方法

1. 本試験の進行

本試験は、供試香辛料の購入、小分け・袋詰め、試料への電子線照射、非照射試料菌数の確認、各機関への試料配布、各機関での菌数測定および検知という手順で行われた。これらの手順の進行について以下に示す。

- ① 供試香辛料の購入：2007年8月20日納入
- ② 小分け・袋詰め：8月22日～8月29日
- ③ 試料への電子線照射：8月30日
- ④ 非照射試料菌数の確認：8月30日～9月5日（結果は表1参照）

⑤ 各機関への説明および試料配布：9月14日

⑥ 各機関での菌数測定および検知：10月中(詳細は表2参照)

2. 試料

2-1 香辛料種類

香辛料種類は以下の5種類とし、小林桂(株)より各12kgずつ購入した。

- ・黒胡椒
- ・オレガノ
- ・オールスパイス
- ・パプリカ
- ・セージ

2-2 小分け袋数

上記香辛料を各種類とも165袋ずつに小分けした。小分け量は55g～60gの範囲におさまるよう電子天秤にて秤量し、指定のナイロン袋に詰めた。

2-3 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、上記袋詰め試料に対し、5kGy、7kGyの照射を行った。

線量測定はNPLの標準線量に遡及可能なFWTラジアクロミック線量素子を用いた。

試料はそれぞれ、香辛料種類、線量別に分けて照射を行い、照射済みの試料は非照射の試料とともに、各香辛料種類、各線量別に5袋ずつ計75袋の試料が1機関分となるよう分配した。

表3の各機関配布試料一覧に照射・非照射の区分を示す。

2-4 非照射試料の菌数確認

未処理試料であることの確認のため、非照射試料について菌数測定を実施した。その結果を以下の表1に示す。これより、当該試料は殺菌処理等が行われていないことを確認した。

表1 菌数確認結果

香辛料種類	菌数 (cfu/g)
黒胡椒	1.7×10^7
オールスパイス	6.5×10^5
オレガノ	5.6×10^4
セージ	8.8×10^4
パプリカ	8.9×10^6

3. 参加機関

以下の9機関である。日本アイソトープ協会、

表2 菌数測定実施期間

機関名	黒胡椒	オールスパイス	オレガノ	セージ	パプリカ
A	10月1日～6日	10月22日～27日	10月1日～6日	10月15日～20日	10月15日～20日
B	10月23日～27日	10月24日～27日	10月23日～27日	10月25日～29日	10月24日～27日
C	10月1日～6日	10月10日～20日	10月2日～9日	10月19日～27日	10月16日～23日
D	10月3日～9日	10月11日～16日	10月9日～15日	10月17日～22日	10月15日～20日
E	10月10日～15日	10月12日～17日	10月10日～15日	10月10日～25日	10月12日～17日
F	9月26日～10月23日	9月26日～10月22日	9月26日～10月22日	9月26日～10月22日	9月26日～10月23日
G	10月9日～15日	10月12日～22日	10月3日～22日	10月11日～16日	10月3日～15日
I	10月4日～9日	10月9日～14日	10月1日～13日	10月2日～13日	10月10日～16日
K	10月31日～11月17日	11月16日～12月2日	11月28日～12月8日	12月6日～12日	12月3日～10日

日本冷凍食品検査協会，東京顕微鏡院，日本油料検査協会，日本食品衛生協会，日本食品分析センター，日本電子照射サービス，マイコトキシン検査協会，。各機関の作業の進行状況は表2に示すとおり。

4. 研究に用いた試験法

4-1 一般生菌数測定

一般生菌数測定方法は，食品業界で一般的な食品衛生検査指針を参考にしつつ，かつ適宜本研究目的に沿うように変更した方法を用いた。

(1) 培地

培地は同一ロットの粉末培地を購入し，各機関に配布する。なお，本培地の性能試験は原燃工で実施し，事前に問題の無いことを確認した。(添付資料1参照)

(2) 装置

- a. ストマッカー (サンプルバック容量 400mL, 200 ストローク/分)
- b. 孵卵器 (温度分布精度 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以内)
- c. 温度計 (最小目盛 1°C の棒状温度計または分解能 0.1°C のデジタル温度計, 温度計精度 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以内)
- d. ウォーターバス (ヒータ容量 750W 以上, 水の容量 3L 以上, 温度調節器付)

(3) 試薬等

- a. 回収液 (希釈液) 0.05% Tween80, 0.1% ペプトン水 * 1

回収液 (希釈液) に使用するペプトンは日局 15 一般試験法の項に記載されているカゼイン製ペプトン該当品とする。

- b. 培地 標準寒天培地 シャーレに分注する培地の量は約 15 ml とする * 2。

- c. 培地調整に使用する水は $1\text{M } \Omega \cdot \text{cm}$ 以上 ($1 \mu \text{S/cm}$ 以下) の純水を用いる。

- d. 試験管 ガラス製 $18 \Phi \times 160\text{mm}$

4-2 試験手順 1 (一般生菌数)

(1) 菌の回収

試料 25g に回収液 250ml を加え * 4, ストマッカーにより 2 分間ブレンディングする。回収液からの原液の採取にあたっては，不織布等のフィルターを用い，できるだけ夾雑物が混じらないように配慮する * 5。

この時熱処理を行う場合と行わない場合の原液をそれぞれ 5ml ずつ 18Φ のガラス製試験管に採取する。

(2) 希釈倍数

回収後の原液を 10 倍ずつ段階希釈する。(希釈水と回収液は同じもの)

(3) 寒天平板塗抹

各段階 3 枚の寒天培地を用い，原液のみ 0.1ml と 0.5ml の 2 ケース，それ以降の段階の希釈液は 0.1ml をコンラージ棒で均一に平板表面に塗抹する * 6。風乾後，培養を開始する。

(4) 培養

培養温度および期間は 30°C ，5 日間とする * 7。

(5) コロニーカウント

1 平板あたり 30 ~ 300cfu 程度得られた平板で計数する (6)。ただし，菌数が少なく適切なコロニー数が得られない場合は 30cfu 以下でも計数する。

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，5 日以前にも適宜カウントする。報告用の写真撮影を行う。

4-3 試験手順 2 (加熱処理後一般生菌数)

(1) 菌の回収

前項 4-2 の (1) で調整する。

(2) 熱処理

前項 4-2 の (1) で調整した 5ml の試料が入った 18 Φ のガラス製試験管を 68℃～74℃ のウォーターバスに投入する。試験管内の温度が均一となるよう継続的に振盪する。

室温から 70℃ までの温度上昇に要する時間は 3 分以下とする。

投入後、温度計の指示が 69℃ となったところで 10 分間の計測を開始し、その間温度計の指示が 70℃ ± 1℃ 以内となるよう保持する * 8。

10 分経過後、直ちに流水または冷水で室温程度まで試験管内の温度を下げる。

(加熱中の温度測定)

試料温度は、同形状で同量の水が入ったダミーの試験管に温度計を挿入し、これを試料と同時に投入して温度を連続的に測定する。このとき、1 分毎に温度計の読みを記録する。

(3) 希釈倍数

回収後の原液を 10 倍ずつ段階希釈する。

(希釈水と回収液は同じもの)

(4) 寒天平板塗抹

各段階 3 枚の寒天培地を用い、原液のみ 0.1ml と 0.5ml の 2 ケース、それ以降の段階の希釈液は 0.1ml をコンラージ棒で均一に平板表面に塗抹する * 6。風乾後、培養を開始する。

(5) 培養

培養温度および期間は 30℃、5 日間とする * 7。

(6) コロニーカウント

1 平板あたり 30 ～ 300cfu 程度得られた平板で計数する 6)。ただし、菌数が少なく適切なコロニー数が得られない場合は 30cfu 以下でも計

数する。

4-4 測定結果に基づく判定

測定結果を図 1 のフローチャートに従って判定する。

* 1 後述の寒天平板塗抹法を用いる際、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い。また、疎水性を有する芽胞を考慮し、界面活性剤である Tween80 を加える。なお、回収液 (希釈液) は滅菌したものをを用いること。

* 2 寒天平板培地は予め作製しておき、菌のコロニーがないことを確認してから使用することが望ましい。

* 3 受領後の検体の保存方法は 15℃ 以下で冷蔵すること。

* 4 食品衛生検査指針では試料 25g に回収液 225ml で 250 g となるように考慮されているが、香辛料は回収液に混濁しないため、香辛料に付着している菌がある割合で回収液に移行すると考えて、回収液の量を 250ml としている。

* 5 ブレンディング後の回収液からの試料原液の採取はできるだけすみやかに (1 時間以内程度) 実施すること。少なくとも、静置して菌が夾雑物とともに沈殿しないようにする。

* 6 損傷菌の場合、混釈法は生育を阻害すると言われている 7)。

* 7 本試験で計測する菌が基本的には損傷菌であることを考慮し、表 1 に示す各規格のうち、比較的低温、長期間の培養条件を採用する。

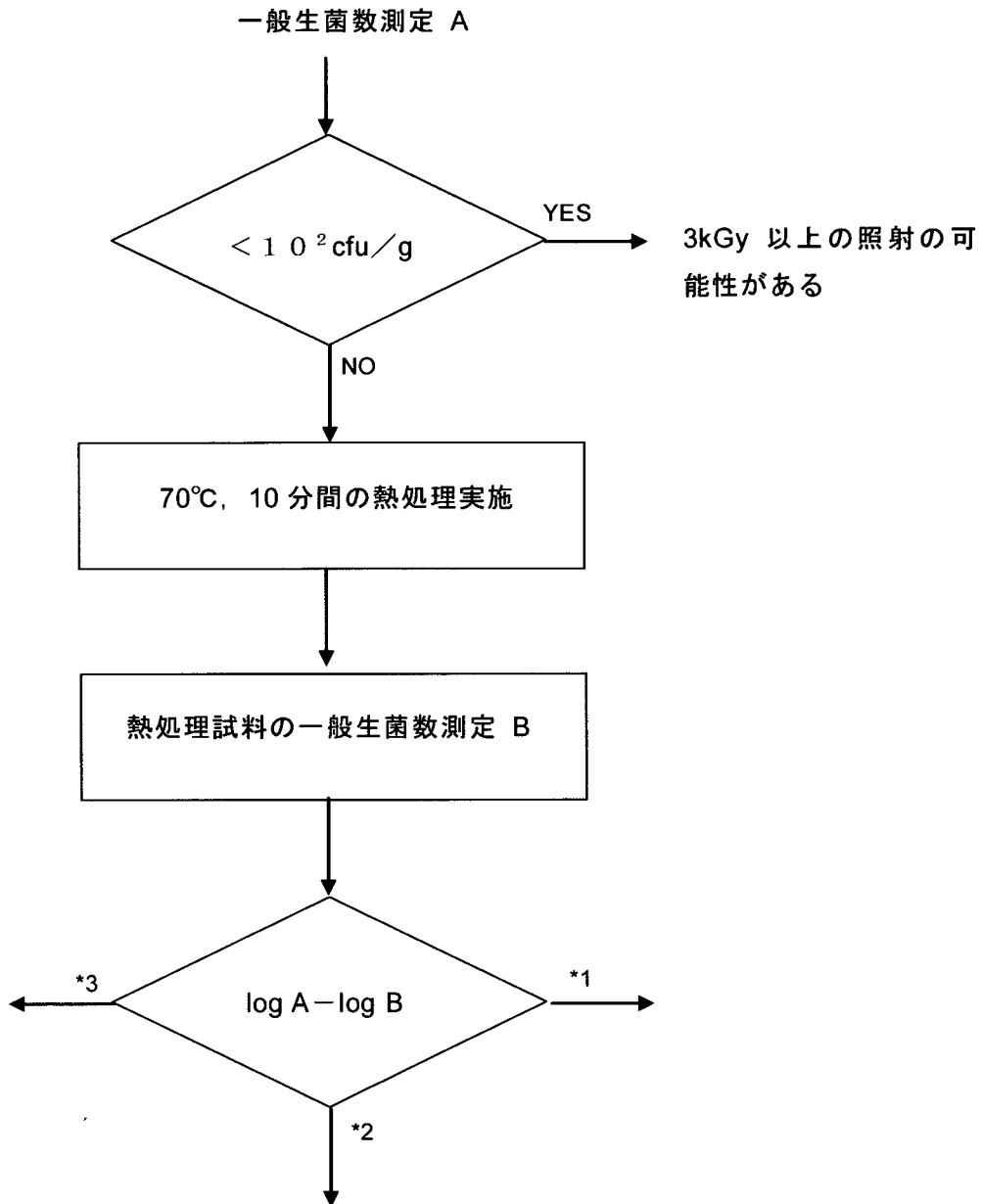
* 8 目標温度を維持するには、ウォーターバスの温度管理は手動により適宜微調整を行う必要がある。

C 研究結果および考察

1. 一般生菌数測定結果および外れ値の検討

1-1 外れ値の検討

図 1 スクリーニングのためのフローチャート



- *1 0.1 未満 : 非照射試料と判定される
- *2 0.1 以上 : どちらとも判定できない
0.3 未満
- *3 0.3 以上 : 照射されている可能性が高い

添付表 1 に香辛料別，線量別，機関別の菌数測定結果と外れ値の検定結果を示す。新しい試験法を検討するには，基本的には全ての機関の技量が十分満足すべきレベルである必要があるが，そのようなことは確認しようがないので，通常は外れ値を出す機関のデータを排除して試験法の妥当性を検証する方法がとられる。

本試験法は，参加研究機関が通常の業務で行っている微生物操作を用いる試験法であるので，著しい技量の違いはないものと推定するが，天然物の菌数は大きなばらつきが考えられるので，一般的に用いられるコクランの検定とグラブスの検定を用い，外れ値を検討した。また，これらの検定方法以外に，元々大きなばらつき

表 4 検定で棄却された測定値の試料番号および個数

黒胡椒						
検定法	非照射		5kGy 照射		7kGy 照射	
	未処理	熱処理	未処理	熱処理	未処理	熱処理
グラバス	—		111			
	—		125			
合計数	2					
コクラン		6	8			
		25	12			
		120	17			
		158	111			
		163	125			
合計数	10					
平均値との比			125			
合計数	1					

オールスパイス						
検定法	非照射		5kGy 照射		7kGy 照射	
	未処理	熱処理	未処理	熱処理	未処理	熱処理
グラバス	—	29	—	—	129	148
	—				148	156
					156	
合計数	6					
コクラン					21	
					61	
					80	
					129	
					138	
合計数	5					
平均値との比	—	29	—	—	129	148
					148	156
					156	
合計数	6					

オレガノ						
検定法	非照射		5kGy 照射		7kGy 照射	
	未処理	熱処理	未処理	熱処理	未処理	熱処理
グラバス	—	45	—	—	—	—
合計数	1					
コ克蘭	28	28				
	45	45				
	82	82				
	117	117				
	132	132				
合計数	10					
平均値との比	—	45	—	—	—	—
合計数	1					

セージ						
検定法	非照射		5kGy 照射		7kGy 照射	
	未処理	熱処理	未処理	熱処理	未処理	熱処理
グラバス	—	—	—	—	—	21
	—					33
						41
						55
						98
						115
合計数	6					
コ克蘭			11			適用不能
			19			
			119			
			143			
			145			
合計数	5					
平均値との比	—	146	119	—	33	98
合計数	4					

パプリカ						
検定法	非照射		5kGy 照射		7kGy 照射	
	未処理	熱処理	未処理	熱処理	未処理	熱処理
グラバス	—	—	45	—	16	
	—				50	
合計数	3					
コ克蘭	60, 21	60	4		16	
	88, 116	88	11		50	
	92, 120	92	45		101	
	141, 133	141	46		107	
	155, 149	155	132		131	
合計数	25					
平均値との比	—	—	—	—	—	—
合計数	0					

表5 菌数測定値のばらつきのみまとめ

			黒胡椒	オールスパイス	オレガノ	セージ	パプリカ
非照射	未処理	一般生菌数平均値	1.8E+07	2.9E+05	7.8E+04	8.3E+04	6.0E+06
		一般生菌数 / 平均値 の標準偏差	0.52	1.09	1.53	0.68	0.43
	熱処理	一般生菌数平均値	1.7E+07	2.8E+05	4.8E+04	1.8E+04	3.6E+06
		一般生菌数 / 平均値 の標準偏差	0.50	1.12	0.98	1.59	0.51
5kGy 照射	未処理	一般生菌数平均値	2.5E+04	2.2E+02	3.5E+02	1.3E+03	3.4E+03
		一般生菌数 / 平均値 の標準偏差	1.00	0.78	0.73	1.40	0.50
	熱処理	一般生菌数平均値	1.5E+04	1.2E+02	2.5E+02	1.3E+02	1.8E+03
		一般生菌数 / 平均値 の標準偏差	0.58	1.04	0.71	1.51	0.65
7kGy 照射	未処理	一般生菌数平均値	2.3E+03	3.0E+01	7.4E+01	3.1E+02	8.3E+02
		一般生菌数 / 平均値 の標準偏差	0.73	1.13	1.16	0.77	1.26
	熱処理	一般生菌数平均値	1.2E+03	2.0E+01	4.5E+01	2.0E+01	3.2E+02
		一般生菌数 / 平均値 の標準偏差	0.68	1.13	1.25	1.63	0.72

が予想されるデータであることから、これら検定法の適用性を確認するため、個々の菌数を同条件で測定した菌数の平均値で除した値による方法を使用した。

添付表1に記載した内容は、各試料の線量別の熱処理前後の菌数測定結果である。添付表1の検定の結果棄却されたデータは、太枠のデータがグラブスの検定8)で棄却されたデータ、ハッチングされたデータがコ克蘭の検定8)で棄却されたデータ、ピンクでマークされたデータが「平均値との比率」で棄却されたデータである。ちなみに黄色でマークされたデータは平均値との比率により、外れ値ではないがばらつきが大きいと判断されたデータである。

なお、これらの検定方法は以下のような手順で行った。

(1) コ克蘭の検定, グラブスの検定

菌数測定値を正規分布に変換するために対数値をとり、その値に対して JIS Z 8402-2:1999 に従って棄却検定を行った。

(2) 平均値との比率を用いた方法

各菌数測定値を平均値で割った数値(比率)を出して標準化し、その数値が0.1以上5未満のものは適正な数値とした。それ以外のデータについては以下のように取り扱った。

a. イエローデータ

上記比率が0.05以上0.1未満および5以上10未満のものは差異が大きい、ばらつきの範囲内として許容し、データとして採用した(添付表1の数値欄が黄色でマークされているもの)。

b. レッドデータ

図2 セージ7kGy照射熱処理前試料の正規確率グラフ

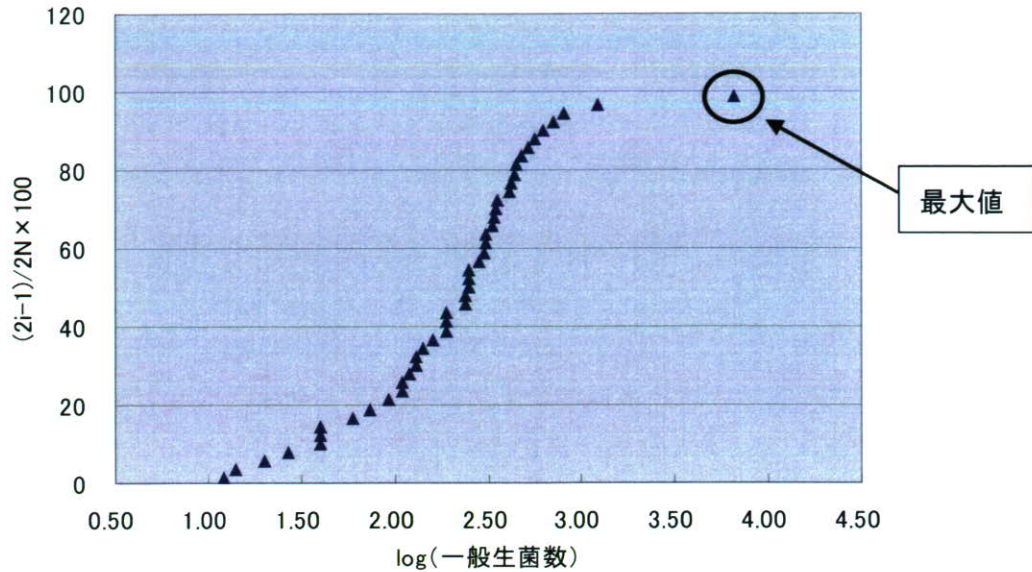


図 2

上記比率が 0.05 未満および 10 以上のものは差異が大きすぎ、外れ値とした。添付表 1 の数値欄がピンク色でマークされているもの)。これらのデータは平均値の算出にも使用していない。

注 測定値が 0 のデータの取扱い

菌数測定において、コロニーが観測されない場合機関によっては、' 0 ' としたり、' < 10 ' としている場合がある。菌数を 0 とするとデータ処理上、上記比率が 0 になってしまうこと、および判定に用いるデータの評価が対数計算のため計算することができないことが生じる。このため、本データ処理では測定値が ' 0 ' のデータはすべて 10 と見なした。なお、このようにしたとしても基本的に問題はないことを確認した。

以上のデータ検定結果のまとめを表 4 に、各測定値のばらつきをまとめを表 5 に、各機関別の検定結果を表 6 に示す。

添付表 1 と表 4、表 5 の結果から、黒胡椒とオールスパイス、オレガノについてはグラバスの検定

結果と「平均値との比率（レッドデータ）を用いる方法」はほぼ同じデータを外れ値としている。グラバスの検定では、セージの 7kGy 照射で熱処理後の試料のデータで、外れ値が多すぎ、統計的な正確性が疑わしい。また、セージの非照射熱処理後、5kGy 照射で熱処理後、7kGy 照射で熱処理前の試料のデータで「平均値との比率を用いる方法」はそれぞれ 1 点のデータを外れ値としているが、グラバスの検定では外れ値ではない。しかしながら、図 2 の 7kGy 照射熱処理前試料の正規確率紙図を見ると、最大値のデータを外れ値とする方がより妥当であると思われる。

このことより、今回のデータの検定に関しては、「平均値との比率を用いる方法」がより適切であると思われるため、本方法を用いることとする。また、コ克蘭の検定は、機関毎にデータを棄却する方法であるが、棄却するデータが多くなりすぎると共に、セージの 7kGy 照射熱処理後試料のように適用不能のデータもあるため採用しないこととした。

表7 判定結果の正答率 (%)

			黒胡椒	オールスパイス	オレガノ	セージ	パプリカ
一次判定 < 10 ²	非照射	一次判定	100	0	100	100	100
		二次判定	87.2	74.4	59.0	5.1	20.0
		総合判定	87.2	74.4	59.0	5.1	20.0
	5kGy 照射	一次判定	0	27.5	10.0	0	0
		二次判定	84.6	82.5	55.0	97.4	82.5
		総合判定	84.6	92.5	65.0	97.4	82.5
	7kGy 照射	一次判定	0	94.6	85.0	12.8	0
		二次判定	95.0	56.8	65.0	100	80.0
		総合判定	95.0	100	97.5	100	80.0
一次判定 < 10 ³	非照射	一次判定	100	100	100	100	100
		二次判定	85.0	74.4	84.6	5.1	20.0
		総合判定	85.0	74.4	84.6	5.1	20.0
	5kGy 照射	一次判定	0	100	95.0	64.1	10.0
		二次判定	84.6	82.5	55.0	97.3	82.5
		総合判定	84.6	100	97.5	100	87.5
	7kGy 照射	一次判定	7.7	100	100	97.4	80.0
		二次判定	95.0	56.8	65.0	100	97.5
		総合判定	97.5	100	100	100	100

* 総合判定は一次、二次のどちらかが照射と判定されたら照射としている

* 二次判定の正答率は不明を照射に含めている

表8 判定結果要約と結論

香辛料種類	判定結果要約	結論
黒胡椒	一次判定で判定不可。二次判定で判定可能。	一次判定と二次判定が必要
オールスパイス	一次判定で判定可能。二次判定の精度は低い 総合判定可能。	一次判定のみで可。二次判定で より確実。
オレガノ	一次判定で判定可能。二次判定のみでは判定不可。	一次判定のみで可。二次判定で より確実。
セージ	一次判定で判定可能。二次判定のみでは判定不可。	一次判定のみで可。二次判定の使 用は不可。
パプリカ	一次判定で非照射と 7kGy 照射は判定可能、 5kGy は判定不可。二次判定のみでは判定不可。	一次判定のみで 7kGy 照射以上可。 二次判定の使用は不可。

表6 研究機関別外れ値の数

機関名 (レッドデータ)	グラバス検定	平均値との比
A	0	0
B	1	1
C	3	0
D	4	3
E	4	4
F	1	1
G	4	3
I	1	0
K	0	0

1-2 測定値の評価

「平均値との比率を用いる方法」による外れ値（レッドデータ）とイエローデータの数はおおむねスパイスとセージが多かった。

オールスパイスは黒胡椒と同様芽胞菌が主と考えられるが、外れ値データのコロニー写真には芽胞菌ではない耐放射線性の菌と思われるコロニーが多く見受けられるものもあった（コンタミの可能性も考えられる）。

一方、セージは明らかに芽胞が主ではなく、放射線照射の有無にかかわらず熱処理により菌数が少なくなっている。しかしながら7kGyの照射によっても菌数は2桁～3桁減少しているにすぎず、耐放射線性は大きい。セージの場合は、試料量と回収液量のバランスの問題と耐放射線性の菌の割合のばらつきの問題があったかもしれない。

しかしながら、全体としてデータのばらつきは小さく、菌数によって判定することは可能なレベルであると考えられた。また、香辛料の付着菌数も「放射線照射食品の微生物学的検知法に関する研究」6)で得られた値とほぼ同等の菌数であり、問題ないレベルであった。なお、黒胡椒の菌数は「放射線照射食品の微生物学的検知法に関する研究」6)では測定できなかったが、今回の測定結果は、過去に測定された香辛料の一般生菌数および放射線耐性の報告9)～11)と合致するものであった。

一方、各機関の結果については表6に示すような差異があったものの、熱処理後のばらつきが大きいという訳ではなく、各機関の熱処理（添付表2参照）は概ね妥当なものであったと思われる。

2 照射の有無の判定

2-1 照射の有無の判定結果

添付表3に香辛料別、線量別、機関別の照射の有無の判定結果とその正答率を示す。また、一次判定条件を $< 10^2$ cfu/gの代わりに $< 10^3$ cfu/gとした結果を添付表4に示す。さらに、これらの結果のまとめを表7に示す。これらの判定にもちいたデータは、前記に示したように外れ値（レッドデータ）は除いている。

(1) 一次判定条件 $< 10^2$ cfu/g の場合

当初の条件の一次判定条件を $< 10^2$ cfu/gとした場合の判定結果についてまとめる。

この場合、黒胡椒とオールスパイスは判定可能なレベルであると考えられる。

セージ、パプリカは、一次判定、二次判定とも照射、非照射の区別はできなかった。

オレガノは一次判定で非照射と7kGy照射の場合に判定できたが、5kGy照射では判定できなかった。二次判定は照射、非照射ともどちらとも判断しがたい結果であった。

(2) 一次判定条件 $< 10^3$ cfu/g の場合

一次判定条件を $< 10^3$ cfu/gに変更した場合の判定結果についてまとめる。

この場合、黒胡椒とオールスパイスは殆ど変化なく判定可能なレベルであると考えられる。

セージ、パプリカは、一次判定で非照射と7kGy照射の場合に判定できたが、5kGy照射では判定できないもしくは難しかった。二次判定は照射、非照射の区別はできなかった。

オレガノは一次判定で非照射と5kGy照射、7kGy照射とも判定できた。二次判定は照射、非照射ともどちらとも判断しがたい結果であった。

D 結論

一次判定条件については、 $< 10^2$ cfu/g の場合、 10^2 cfu/g 付近においてコロニー数が少なくばらつきの大きい領域となることと、 $< 10^3$ cfu/g とした方が照射判定率が高くなることから $< 10^3$ cfu/g とした方が良いのではないかと思われた。

また香辛料の種類によって明らかに判定可能なものと不可能なものがあつた。これをまとめて結論付けると表 8 のとおりである。(表 8 は 一次判定条件が $< 10^3$ cfu/g)

これらの結果、香辛料の種類によって、一次判定と二次判定を行う必要があるものと、一次判定のみで判定が可能でありかつ二次判定を行うと判定できなくなるものに分けられることが分かつた。

一次判定のみで判定が可能でありかつ二次判定を行うと判定できなくなるものは、セージ、パプリカでいずれも芽胞菌よりはグラム陰性菌が優勢な菌相であると思われた。

これらの範疇に入るものであるかどうかの見分け方は、照射されていないことが明らかな試料について熱処理を伴う二次判定を行ったとき、照射済と判定されるような結果が得られることである。すなわち、熱処理後に菌数が大きく減少した場合に、一次判定のみで判定が可能でありかつ二次判定を行うと判定できなくなる範疇の香辛料と判断できる。

以上より、本方法は検知対象香辛料を、前記の分類に従って一次判定のみを行うものと、二次判定まで行うものとに分けて実施する必要がある、そうした場合には高い正答率が得られることが分かつた。

参考文献

1) 新谷英晴；微生物の成育に与える種々因子のバリデーションについて，防菌防黴，33，p669-675(2005)

2) Nakauma, M. , Saito, K. , Katayama, T., Tada, M. , Todoriki ,S. ; Radiation-heat synergism for inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris spores in citrus juice, Journal of Food Protection, 67, p2538-p2543 (2004)

3) Diehl, J. F. ; Effects of combination processes on the nutritive value of food, International Atomic Energy Agency , p349-p366 (1980)

4) 宮原誠，武川哲也；放射線照射食品の微生物学的検知法に関する研究，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，p14-28(2007)

5) A. .ヘレール, Y. .ヨンゲン, M. .アブス, M. .ファン・ラネケル，大越正和，梅津透；IBA 社工業用高電圧・高出力電子線加速器ロードトロン，放射線と産業，78，p27-31(1998)

6) ISO14161:2000 保健製品の滅菌—生物指標—結果の選択，使用及び解釈の指針

7) 新谷英晴，数馬昂始；日本に於ける滅菌保証達成に於ける問題点と解決法 7-(上)，防菌防黴，30，p749-758(2002)

8) JIS Z 8402-2:1999 測定方法及び測定結果の精確さ（真度及び精度）—第 2 部：標準測定方法の併行制度及び再現精度を求めるための基本的な方法

9) 宮原誠，神保勝彦；放射線照射食品の微生物学的検知法に関する研究，放射線照射食品の検知技術に関する研究平成 17 年度総括研究年度終了報告書，p31-50(2006)

10) 林徹，Mamun，等々力節子；香辛料の殺菌技術としての電子線照射とガンマ線照射の比較，食総研報，57，p1-6(1993)

11) Vajudi, M., Pereira, P.P. ; Comparative Effects of Ethylene Oxide, Gamma Irradiation and Microwave Treatments on Selected Spices., Journal of Food Sci., 38, p893-895

(1973)

培地性能試験結果

1. 使用培地

標準寒天培地 日水製薬株式会社製 製造番号：769706 使用期限：2010年5月

2. 使用菌液

Bacillus subtilis ATCC#6633 芽胞懸濁液
NAMSA 社製
製造番号：GBS006-27 使用期限：2007年10月10日
菌液濃度：< 100CFUs/0.1ml

3. 試験方法

上記培地をシャーレに15ml分注し、固まってから上記菌液0.05mlをコンラージ棒で塗抹した。その後35°Cで24時間培養した。

4. 試験結果

下記の写真の結果を得、本培地による上記菌株の生育を確認することができた。



添付表1-3

オレガノ測定値検定結果（コ克蘭検定，グラブス検定，平均値との比による検定）

非照射	5kGy						7kGy														
	試料番号	一般生菌数結果 A (CFU/g)	A/Ave	LOG A	熱処理後の一般生菌数結果 B (CFU/g)	B/Ave	LOG B	試料番号	一般生菌数結果 A (CFU/g)	A/Ave	LOG A	熱処理後の一般生菌数結果 B (CFU/g)	B/Ave	LOG B	試料番号	一般生菌数結果 A (CFU/g)	A/Ave	LOG A	熱処理後の一般生菌数結果 B (CFU/g)	B/Ave	LOG B
A	46	4.5E+04	0.57	4.65	3.4E+04	0.71	4.53	7	1.6E+02	0.45	2.20	1.0E+02	0.39	2.00	8	2.0E+01	0.27	1.30	4.0E+01	0.88	1.60
A	51	9.1E+04	1.16	4.96	1.3E+04	0.27	4.11	38	8.2E+02	2.32	2.91	3.6E+02	1.42	2.56	39	3.8E+02	5.12	2.58	1.2E+02	2.65	2.08
A	58	4.7E+04	0.60	4.67	1.1E+04	0.23	4.04	69	3.0E+02	0.85	2.48	1.4E+02	0.55	2.15	112	6.0E+01	0.81	1.78	2.0E+01	0.44	1.30
A	60	6.6E+04	0.84	4.82	1.9E+04	0.40	4.28	83	5.2E+02	1.47	2.72	4.8E+02	1.89	2.68	121	2.0E+02	2.69	2.30	1.0E+02	2.21	2.00
A	150	7.6E+04	0.97	4.88	1.6E+04	0.34	4.20	148	1.4E+02	0.40	2.15	1.6E+02	0.63	2.20	145	4.0E+01	0.54	1.60	6.0E+01	1.32	1.78
B	19	1.4E+04	0.18	4.15	1.2E+04	0.25	4.08	63	1.5E+02	0.42	2.18	2.0E+02	0.79	2.30	14	2.0E+01	0.27	1.30	1.0E+01	0.22	1.00
B	25	4.6E+04	0.59	4.66	5.6E+04	1.17	4.75	70	1.2E+02	0.34	2.08	1.1E+02	0.43	2.04	40	8.0E+01	1.08	1.90	3.3E+01	0.73	1.52
B	52	2.0E+04	0.25	4.30	2.1E+04	0.44	4.32	78	2.9E+02	0.82	2.46	3.0E+02	1.18	2.48	41	2.0E+01	0.27	1.30	2.7E+01	0.60	1.43
B	105	6.4E+04	0.82	4.81	5.8E+04	1.22	4.76	104	1.8E+02	0.51	2.26	2.3E+02	0.91	2.36	106	7.3E+01	0.98	1.86	2.7E+01	0.60	1.43
B	122	6.4E+04	0.82	4.81	1.2E+05	2.52	5.08	162	3.1E+02	0.88	2.49	3.9E+02	1.54	2.59	165	4.7E+01	0.63	1.67	2.0E+01	0.44	1.30
C	12	4.6E+04	0.59	4.66	3.9E+04	0.82	4.59	44	5.2E+02	1.47	2.72	3.3E+02	1.31	2.52	48	1.3E+01	0.17	1.10	6.0E+01	1.32	1.78
C	17	5.5E+04	0.70	4.74	3.7E+04	0.78	4.57	67	4.0E+02	1.13	2.60	2.7E+02	1.05	2.43	91	8.0E+01	1.08	1.90	4.0E+01	0.88	1.60
C	54	1.5E+05	1.91	5.18	1.5E+05	3.17	5.18	110	2.9E+02	0.83	2.47	1.7E+02	0.66	2.22	119	8.0E+01	1.08	1.90	2.0E+01	0.44	1.30
C	74	4.7E+04	0.60	4.67	3.5E+04	0.73	4.54	111	6.3E+02	1.79	2.80	3.9E+02	1.55	2.59	137	1.1E+02	1.52	2.05	4.7E+01	1.03	1.67
C	133	5.7E+04	0.73	4.76	4.4E+04	0.92	4.64	113	3.7E+02	1.05	2.57	2.4E+02	0.95	2.38	153	8.7E+01	1.17	1.94	4.0E+01	0.88	1.60
D	28	1.1E+04	0.14	4.04	1.5E+04	0.31	4.18	5	5.4E+02	1.53	2.73	4.2E+02	1.66	2.62	6	7.3E+01	0.98	1.86	8.0E+01	1.76	1.90
D	45	7.2E+05	9.18	5.86	7.9E+05	16.57	5.90	75	7.3E+01	0.21	1.86	1.1E+02	0.43	2.04	9	2.0E+01	0.27	1.30	3.3E+01	0.73	1.52
D	82	4.9E+03	0.06	3.69	9.9E+03	0.21	4.00	109	9.3E+01	0.26	1.97	8.0E+01	0.32	1.90	61	1.3E+01	0.18	1.11	2.0E+01	0.44	1.30
D	117	1.3E+04	0.17	4.11	1.3E+04	0.27	4.11	138	6.7E+01	0.19	1.83	1.7E+02	0.67	2.23	64	2.7E+01	0.36	1.43	1.3E+01	0.29	1.11
D	132	8.2E+04	1.04	4.91	7.9E+04	1.66	4.90	152	1.3E+02	0.37	2.11	1.6E+02	0.63	2.20	98	1.3E+01	0.18	1.11	7.3E+01	1.61	1.86
E	15	3.5E+05	4.46	5.54	2.3E+05	4.82	5.36	115	2.9E+02	0.82	2.46	2.0E+02	0.79	2.30	3	4.0E+01	0.54	1.60	6.7E+00	0.15	0.83
E	85	6.5E+04	0.83	4.81	2.9E+04	0.61	4.46	126	2.6E+02	0.73	2.41	1.5E+02	0.59	2.18	35	2.0E+01	0.27	1.30	4.0E+01	0.88	1.60
E	96	6.2E+04	0.79	4.79	2.2E+04	0.46	4.34	131	4.0E+02	1.13	2.60	1.2E+02	0.47	2.08	36	8.7E+01	1.17	1.94	2.7E+01	0.60	1.43
E	100	6.0E+04	0.76	4.78	3.8E+04	0.80	4.58	146	9.1E+02	2.57	2.96	6.7E+02	2.64	2.83	68	7.3E+01	0.98	1.86	2.7E+01	0.60	1.43
E	157	6.0E+04	0.76	4.78	6.1E+04	1.28	4.79	154	1.6E+02	0.45	2.20	1.6E+02	0.63	2.20	143	5.3E+01	0.71	1.72	2.7E+01	0.60	1.43
F	34	2.1E+04	0.27	4.33	1.9E+04	0.40	4.28	62	2.9E+02	0.83	2.47	1.5E+02	0.60	2.18	11	6.0E+01	0.81	1.78	5.3E+01	1.18	1.73
F	79	5.2E+04	0.67	4.72	5.0E+04	1.04	4.70	80	1.3E+02	0.38	2.12	1.7E+02	0.68	2.24	129	2.7E+01	0.36	1.42	6.7E+00	0.15	0.82
F	108	2.5E+04	0.31	4.39	2.3E+04	0.47	4.35	89	2.3E+02	0.64	2.35	7.3E+01	0.29	1.87	134	1.3E+01	0.18	1.12	1.0E+01	0.22	1.00
F	118	2.2E+04	0.28	4.34	2.0E+04	0.41	4.29	120	1.0E+02	0.28	2.00	4.7E+01	0.18	1.67	135	1.3E+01	0.18	1.12	6.7E+00	0.15	0.82
F	158	1.2E+05	1.52	5.08	8.6E+04	1.80	4.93	125	9.3E+01	0.26	1.97	1.1E+02	0.45	2.06	136	6.7E+01	0.90	1.82	2.0E+01	0.44	1.30
G	2	4.5E+04	0.57	4.65	1.9E+04	0.40	4.28	65	3.4E+02	0.96	2.53	3.0E+02	1.18	2.48	21	3.4E+01	0.46	1.53	2.0E+01	0.44	1.30
G	32	1.7E+04	0.22	4.23	1.1E+04	0.23	4.04	81	3.0E+02	0.85	2.48	2.1E+02	0.83	2.32	42	1.9E+02	2.56	2.28	6.6E+01	1.46	1.82
G	33	3.9E+04	0.50	4.59	4.4E+04	0.92	4.64	103	1.1E+03	3.11	3.04	5.3E+02	2.09	2.72	73	7.4E+01	1.00	1.87	2.6E+01	0.57	1.41
G	49	3.5E+04	0.45	4.54	3.4E+04	0.71	4.53	124	5.9E+02	1.67	2.77	3.6E+02	1.42	2.56	147	5.4E+01	0.73	1.73	2.0E+01	0.44	1.30
G	99	9.6E+04	1.22	4.98	8.3E+04	1.74	4.92	127	5.0E+02	1.41	2.70	2.9E+02	1.14	2.46	151	2.0E+01	0.27	1.30	2.6E+01	0.57	1.41
I	47	2.9E+04	0.37	4.46	3.0E+04	0.62	4.47	10	2.9E+02	0.83	2.47	2.5E+02	0.97	2.39	56	8.0E+01	1.08	1.90	8.0E+01	1.76	1.90
I	55	3.3E+04	0.42	4.52	3.4E+04	0.71	4.53	27	5.3E+02	1.50	2.72	1.4E+02	0.55	2.15	88	3.4E+01	0.46	1.53	2.0E+01	0.44	1.30
I	86	4.5E+04	0.58	4.66	4.8E+04	1.00	4.68	31	3.7E+02	1.03	2.56	2.1E+02	0.84	2.33	140	1.1E+02	1.43	2.03	2.0E+01	0.44	1.30
I	94	5.1E+04	0.65	4.71	3.4E+04	0.71	4.53	66	1.6E+02	0.45	2.20	1.8E+02	0.71	2.26	160	5.4E+01	0.73	1.73	7.4E+01	1.63	1.87
I	95	1.9E+05	2.46	5.29	1.6E+05	3.42	5.21	130	1.0E+03	2.83	3.00	1.0E+03	3.94	3.00	163	4.1E+02	5.57	2.62	3.5E+02	7.81	2.55
K	1	1.6E+04	0.21	4.21	1.8E+04	0.37	4.25	37	1.0E+02	0.28	2.00	4.0E+01	0.16	1.60	24	2.0E+01	0.27	1.30	6.0E+01	1.32	1.78
K	4	1.4E+04	0.17	4.13	1.6E+04	0.33	4.20	57	3.6E+02	1.02	2.56	4.0E+02	1.58	2.60	76	1.4E+01	0.19	1.15	1.4E+01	0.31	1.15
K	18	1.1E+04	0.14	4.05	7.8E+03	0.16	3.89	77	8.0E+01	0.23	1.90	1.0E+02	0.39	2.00	139	3.4E+01	0.46	1.53	4.0E+01	0.88	1.60
K	72	8.5E+04	1.08	4.93	6.5E+04	1.36	4.81	93	1.2E+02	0.34	2.08	1.2E+02	0.47	2.08	144	2.0E+01	0.27	1.30	1.0E+01	0.22	1.00
K	141	6.5E+04	0.83	4.81	5.3E+04	1.11	4.72	114	3.8E+02	1.07	2.58	3.8E+02	1.50	2.58	164	1.4E+01	0.19	1.15	3.4E+01	0.75	1.53
		平均			平均				平均			平均				平均			平均		
		7.8E+04			4.8E+04				3.5E+02			2.5E+02				7.4E+01			4.5E+01		

平均値との比が0.05未満と10以上の外れ値

平均値との比が0.05以上0.1未満と5以上10未満の外れ値

グラブス検定による外れ値

コ克蘭検定による外れ値（機関）

