

ターシード2検体、生姜2検体、シナモン2検体およびセロリ、パセリ、コリアンダー、クミン、フェヌグリーク、白ゴマ、黒ゴマ、ローレル各1検体の計39検体である。

2) 照射香辛料

スパイス協会から提供された1)の香辛料39検体をコバルト60のガンマ線で各々3kGy、7kGyおよび10kGyで照射した計117検体を用いた。

2. 方法

1) 試料の調製

香辛料および照射香辛料を25g採取し、ストマッカー用の滅菌ビニール袋に入れ、これに希釈水を225mL加え、ストマッキングしたものを試料原液とした。

試料原液は必要に応じて、希釈水で10倍段階希釈して希釈試料液を調製した。

2) 細菌数(生菌数)

試料原液および希釈試料液1mLずつを滅菌2.2mLピペットでとり、それぞれ滅菌ペトリ皿に注入した。

45～50℃に保温した滅菌した標準寒天培地または食塩(3, 5, 7%)加標準寒天培地約15～20mLを滅菌ペトリ皿に加え、混合した。培地が凝固したら、滅菌した標準寒天培地または食塩(3, 5, 7%)加標準寒天培地約4mLを重層した。

35℃で48時間培養し、発生したコロニー

数を計測した。

3) 大腸菌群

試料原液および希釈試料液1mLずつを滅菌2.2mLピペットでとり、それぞれ滅菌ペトリ皿に注入した。

45～50℃に保温したデスオキシコーレイト寒天培地約15～20mLを加え、混合した。培地が凝固したらデスオキシコーレイト寒天培地約4mLを重層した。

35℃で22時間培養し、暗赤色集落が形成されたら大腸菌群推定陽性とした。次に、暗赤色集落は定法に従って確定試験、完全試験を行い大腸菌群か否かを判定した。

4) 芽胞数

試料原液10mLを中試験管に入れ、70℃の恒温水槽で20分間加熱処理し、直ちに冷却した後、2)の細菌数と同様に操作し、35℃で48時間培養後、発生したコロニー数を計測して、芽胞数とした。

[平成18年度]

1. 各香辛料の汚染状況と放射線耐性の調査

1) 供試材料(香辛料)

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、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検体である。

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 9) を用い、各試料 200g (真菌を対象とした試料は各試料 100g) に対して 10MeV 電子線で下記目標線量まで照射した。

(一般生菌を対象とした試料)

非照射, 3kGy, 7kGy, 10kGy

(真菌を対象とした試料)

非照射, 1kGy, 3kGy, 5kGy, 7kGy

3) 試料調整

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、ストマッカードにより 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 (一般生菌)

クロラムフェニコール添加ポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地 (真菌)

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 10)。

5) 培養

培養温度および培養期間は一般生菌数では 30°C、真菌では 25°C で 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. 培養温度の違いによる照射検知可能性の調査 (本実験は真菌を対象とした場合のみ実施)

一般的に加熱等により損傷を受けた菌は、培養期間が長期化するとともに、より低い温度で生育すると言われている 11) 12)。太田らによると真菌の好適培養温度は 25 ~ 28°C で、培養温度としては 30°C が上限である 13)。このため、25°C (コントロール) と 30°C で、電子線照射の有無による生育の差異 (コロニー数および生育期間) が生じるかどうかを調査した。また、試料は 1 項と同様各条件につき 2 検体ずつ作成した。

a. 試料

12 種類の中から 3 種類を選定した。試料の選定は真菌汚染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。

b. 線量

1項で用いた線量から1線量を選定した。選定基準は1項の実験で非照射と大きな差がなく、十分菌数が多くかつ高線量であることとした。

c. 培養条件

温度以外は1項と同条件とした。ただし、培養期間7日で不十分な場合は培養期間を延長した。

3. 熱処理による照射検知可能性の調査 (本実験は一般生菌および真菌の双方とも実施)

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(6) - (8)。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

1項で用いた線量から2線量を選定した。選定基準は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℃(真菌対象試料では50℃、60℃、70℃、80℃)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た。

[平成19年度]

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. 供試材料と試料の作成

2-1 香辛料種類

香辛料種類は黒胡椒、オレガノ、オールスパイス、パプリカ、セージの5種類とし、小林桂(株)より各12kgずつ購入した。

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9)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

表2 平成19年度研究室間共同研究菌数測定実施期間

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	2月6日～12日	12月3日～10日

3. 参加機関

以下の9機関である。日本アイソトープ協会，日本冷凍食品検査協会，東京顕微鏡院，日本油料検定協会，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，大阪府立大学。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。

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±1.0℃以内）
- c. 温度計（最小目盛1℃の棒状温度計または分解能0.1℃のデジタル温度計，温度計精度±0.5℃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収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15mlとする*2。

c. 培地調整に使用する水は1MΩ・cm以上（1μS/cm以下）の純水を用いる。

d. 試験管 ガラス製18Φ×160mm

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℃, 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 14)。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 14)。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、菌のコンタミ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 10)。

*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。

5. 照射した香辛料からの生残菌の同定

1) 生残菌の回収

照射した香辛料を 10 g 秤量して、フィルター付きホモジナイザー袋に移し、0.05% Tween80 を含む 0.1% ペプトン水 100ml を加えた。バッグミキサーで 1 分間処理した（ストローク回数：8 回/秒）。

2) 生残菌の単離

バッグミキサーで処理した菌液を滅菌した 5ml のメスピペットで回収し、滅菌した試験管に移した。この菌液を標準寒天培地の入ったシャーレ各 2 枚に 0.1ml 及び 0.5ml ずつ培地の上に塗布し、コンラージ棒で培地表面に塗布した。

培養は 30℃で 3～5 日間行った。培養後、コロニーの形態や色調を基に菌を釣菌し、ソイビーンカゼインダイジェスト寒天培地 (SCDA) に画線培養し、菌を単離した。

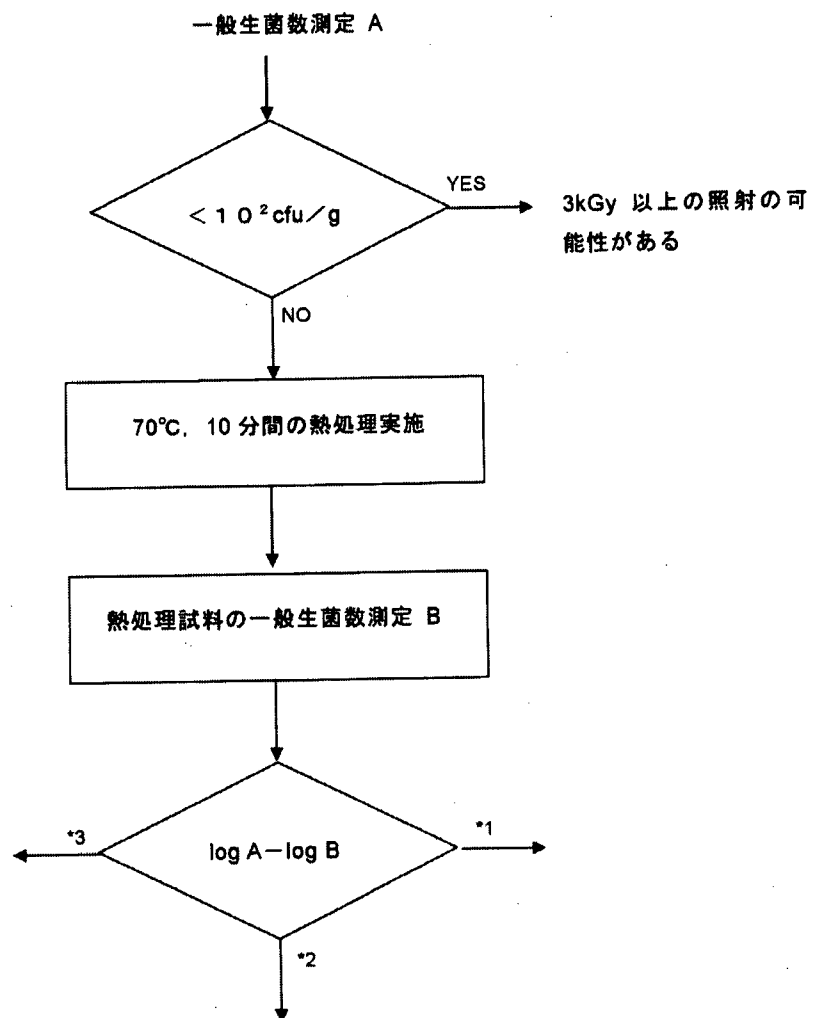
3) 生残菌のグラム染色性と位相差顕微鏡による観察 15) 16)

生残菌をグラム染色し、グラム染色性と菌の形態を調べた。また、位相差顕微鏡による観察で、芽胞形成菌であるか否かを芽胞の形成有無を基に識別した。芽胞形成菌である *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. circulans* 及び *B. licheniformis* はコロニーや栄養型細胞の大きさ、芽胞の形や前駆芽胞の形成する位置に特徴があるので、この方法で識別した。

4) 同定キットによる同定 17) 18)

グラム陽性菌は BBL クリスタル G P 同定キットを適用し、グラム陰性菌は BBL

クリスタルE/NF 同定キットを適用した。液を接種し、37°Cで24時間培養し、BBL
 キットに接種する菌濃度は、グラム陽性 クリスタルオートリーダーで判定し、得
 菌がマックファーランド0.4～0.6、グ られたプロファイル番号をコンピューター
 ラム陰性菌がマックファーランド0.3～ コードブック（検索ソフト）で菌名を検
 0.4になるように調整した。キットに菌 索した。



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

図1 スクリーニングのためのフローチャート

C 研究結果

1. 香辛料および照射香辛料の一般生菌数 (平成 17 年度実施)

各香辛料種類別の一般生菌数測定結果を表 3 に示す。この結果より、香辛料を 7kGy 以上で照射すると照射前の菌数に関係なく、菌数は 10^3 cfu / g 以下に減少した。このことから、今回我々が採用した方法で細菌数を調べ、計測した菌数が 10^3 cfu / g 以下であれば、その香辛料は 7kGy 以上の放射線で照射された可能性があることが分かった。

2. 食塩加標準寒天培地による菌数変化の調査 (平成 17 年度実施)

標準寒天培地と 3%, 5% 食塩加標準寒

天培地による一般生菌数の変化を調査したが、非照射試料、3kGy 照射試料では標準寒天培地と食塩加標準寒天培地間に有意な菌数の差は無かった。また、7kGy 照射試料の標準寒天培地では、39 検体中 20 検体で菌が検出されなかったが、5% 食塩加標準寒天培地ではそれが 26 検体とわずかに増加した。同じく 10kGy 照射試料では、菌が検出されなかったのは標準寒天培地で 29 検体、5% 食塩加標準寒天培地で 37 検体であった。

この結果、放射線損傷菌の生育は標準寒天培地中の食塩添加にある程度影響されることが示唆されるが、これにより照射の有無を検知することは困難であると考えられる。

表 3 一般生菌数測定結果

単位 : cfu / g

香辛料	非照射	3kGy	7kGy	10kGy
黒胡椒	$10^5 \sim 10^7$	$10^3 \sim 10^6$	$10^2 \sim 10^3$	10^2 以下
オールスパイス	$10^4 \sim 10^6$	$10^3 \sim 10^5$	10^2 以下	10^2 以下
唐辛子	$10^3 \sim 10^6$	$10^2 \sim 10^4$	10^2 以下	10^2 以下
タマネギ	$10^3 \sim 10^4$	$10^2 \sim 10^3$	10^2 以下	10^2 以下
パプリカ	$10^3 \sim 10^6$	$10^3 \sim 10^4$	10^2 以下	10^2 以下
ターメリック	$10^3 \sim 10^6$	$10^2 \sim 10^4$	10^2 以下	10^2 以下
オレガノ	$10^3 \sim 10^6$	$10^2 \sim 10^3$	10^2 以下	10^2 以下
ガーリック	$10^3 \sim 10^6$	10^2 ～	10^2 以下	10^2 以下
カシア	$10^3 \sim 10^6$	10^2 以下	10^2 以下	10^2 以下
マスターシード	$10^3 \sim 10^4$	10^2 以下	10^2 以下	10^2 以下
生姜	$10^2 \sim 10^5$	10^2 以下～ 10^4	10^2 以下	10^2 以下
シナモン	$10^2 \sim 10^3$	$10^2 \sim 10^3$	10^2 以下	10^2 以下
セロリ	$10^4 \sim 10^5$	$10^4 \sim 10^5$	10^2 以下	10^2 以下
パセリ	$10^3 \sim 10^4$	10^2 以下	10^2 以下	10^2 以下
コリアンダー	10^5	10^4	10^2 以下	10^2 以下
クミン	10^4	10^4	10^2 以下	10^2 以下
フェヌグreek	$10^3 \sim 10^4$	10^2 以下	10^2 以下	10^2 以下
白ゴマ	$10^5 \sim 10^6$	$10^4 \sim 10^5$	10^2 以下	10^2 以下
黒ごま	$10^5 \sim 10^6$	$10^4 \sim 10^5$	10^2 以下	10^2 以下
ローレル	10^2 以下	10^2 以下	10^2 以下	10^2 以下

3. 香辛料および照射香辛料の芽胞数 (平成 17 年度実施)

各香辛料の種類別の芽胞数を測定した。この結果、黒胡椒、オールスパイス、唐辛子、タマネギ、パプリカ、ターメリック、生姜、セロリ、コリアンダー、クミン、フェヌグリークは一般生菌数と芽胞数がほぼ同数であり、汚染菌の殆どを芽胞が占めていることが分かった。その他の香辛料も、白ゴマ、黒ゴマ、マスターシード以外は芽胞が優勢であった。3kGy 照射した香辛料の芽胞数は $10^2 \sim 10^5$ cfu / g の範囲であり、照射しない物よりも 1～3 桁少なかったが細菌数とほぼ同じ数であった。7kGy 照射した香辛料では大幅に芽胞数は少なくなり、20 検体から検出できなかった。検出された芽胞数は 10^2 cfu / g レベルであった。10kGy 照射した香辛料には芽胞菌は殆ど残存しなくなり、検出されたのは 2 検体のみであった。

4. 香辛料および照射香辛料の大腸菌群 (平成 17 年度実施)

香辛料と照射香辛料で大腸菌群が検出されたのは、黒胡椒 3 検体、オールスパイス 2 検体、パプリカ 2 検体、マスターシード 1 検体、セロリ 1 検体および白ゴマ 1 検体の計 10 検体であった。検出された菌数は $10 \sim 10^3$ cfu / g であり、細菌数よりも 1～5 桁低い値であった。3kGy 照射した香辛料では、パプリカ、セロリおよびオールスパイスの 3 検体から大腸菌群が検出された。菌数はパプリカが 1 桁低い値であったが、セロリとオールスパイスの菌数は減少しなかった。7kGy および 10kGy で照射するといずれの香辛料からも大腸菌群は検出されなかった。このことから、香辛料を 7kGy 以上で照射すると大腸菌群は死滅し、検出されないものとする。

5. 熱処理法に供する香辛料の一般生菌数および真菌数と放射線耐性の調査 (平成 18 年度実施)

表 4 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	2.7E+04	1.3E+02	0.0E+00	0.0E+00
黒胡椒	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
唐辛子	3.0E+03	6.0E+01	0.0E+00	0.0E+00
オールスパイス	8.5E+05	9.7E+03	1.5E+02	0.0E+00
ナツメグ	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
メース	4.1E+05	2.7E+02	7.0E+01	0.0E+00
ターメリック	3.9E+07	2.9E+05	9.3E+02	1.6E+02
カシア	2.5E+03	2.8E+02	0.0E+00	0.0E+00
フェネグリーク	1.1E+03	1.4E+02	1.7E+01	0.0E+00
オレガノ	3.2E+04	3.5E+03	1.2E+02	8.3E+01
セージ	8.5E+05	1.1E+04	3.0E+03	3.1E+02
パプリカ	1.4E+07	6.8E+05	3.2E+03	9.3E+01

[一般生菌数]

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表 4 に示す。表 4 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。

[真菌数]

供試香辛料 12 種類の真菌汚染状況と放射線耐性を調べるため、各照射線量において真菌菌数を測定した結果を以下に示す。

表 5 は供試香辛料の照射線量 0, 1, 3, 5, 7kGy に伴う真菌菌数の測定値を示したものである。

実験の結果、3kGy の線量で真菌が検出されたものは、12 試料中 3 試料にすぎなかった。なお、黒胡椒の真菌数は非照射試料においても 0 であった。

6. 熱処理による照射検知可能性の調査
(平成 18 年度実施)

1) 予備実験

[一般生菌数]

熱処理温度を決定するための予備実験のために、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 5 香辛料付着真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	1	3	5	7
白胡椒	5.0E+03	1.8E+03	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
黒胡椒	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
唐辛子	2.6E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
オールスパイス	7.2E+04	1.5E+04	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
ナツメグ	2.5E+03	6.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
メース	4.6E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
ターメリック	6.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
カシア	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
フェネグリーク	3.9E+02	5.4E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
オレガノ	4.5E+03	8.5E+02	4.6E+01	0.0E+00	0.0E+00
セージ	3.7E+04	5.7E+03	7.4E+01	2.0E+01	1.4E+01
パプリカ	7.9E+03	4.8E+03	2.1E+03	1.0E+03	8.0E+01

数の変化を測定した。

この結果、熱処理温度 70℃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℃とした。

[真菌数]

熱処理温度を決定するための予備実験のために、対象香辛料としてオールスパイスを選択し、非照射試料と 1kGy 照射試料の回収液をそれぞれ 50℃、60℃、70℃、80℃の温度で 10 分間処理し、真菌菌数の変化を測定した。

この結果、熱処理温度 60℃において非照射と 1kGy 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 60℃とした。

2) 本実験

[一般生菌数]

予備実験の結果より、熱処理温度を 70℃とし、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。

・非照射と 3, 7kGy 照射のセージ、オールスパイス、ターメリック、オレガノ、パプリカ (検体 1)、(検体 2)

この結果を、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、下記のように菌数差を対数表示したときの値を図 2 に示した。

対数表示の差異 : $\log A - \log B$

[真菌数]

予備実験の結果より、熱処理温度を 60℃とし、各香辛料の真菌汚染状況および真菌の生残曲線から、できるだけ真菌数が増える組み合わせとして、下記の線量と香辛料の組み合わせを用いて電子線照射と熱処理の有無による菌数変化を測定した。

・非照射と 1kGy 照射の白胡椒、オールスパイス、セージ (検体 1)、(検体 2)
この結果を、一般生菌と同様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、下記のように菌数差を対数表示したときの値を図 3 に示した。

対数表示の差異 : $\log A - \log B$

7. 真菌の培養温度の違いによる照射検知可能性の調査 (平成 18 年度実施)

25℃と 30℃の培養温度の違いによる非照射と照射香辛料の真菌菌数の変化を、以下の組み合わせにより調査した。この結果を表 6～表 8 に示す。

この結果、いずれの場合においても培養

温度による有意な差は見出されなかった。

① 実験 1 : 非照射と 3kGy 照射のオレガノ、セージ、パプリカ

② 実験 2 : 非照射と 1kGy 照射の白胡椒、オールスパイス、セージ (検体 1)、(検体 2)

図2 照射線量による非処理と熱処理の一般生菌数の対数差

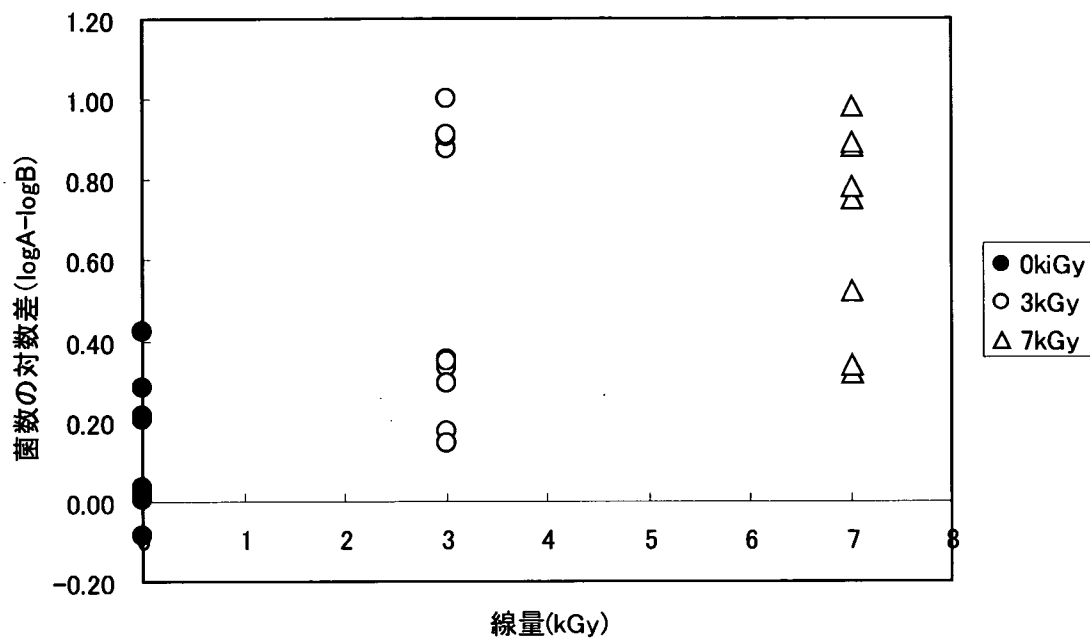


図3 非処理と熱処理の真菌数の対数差

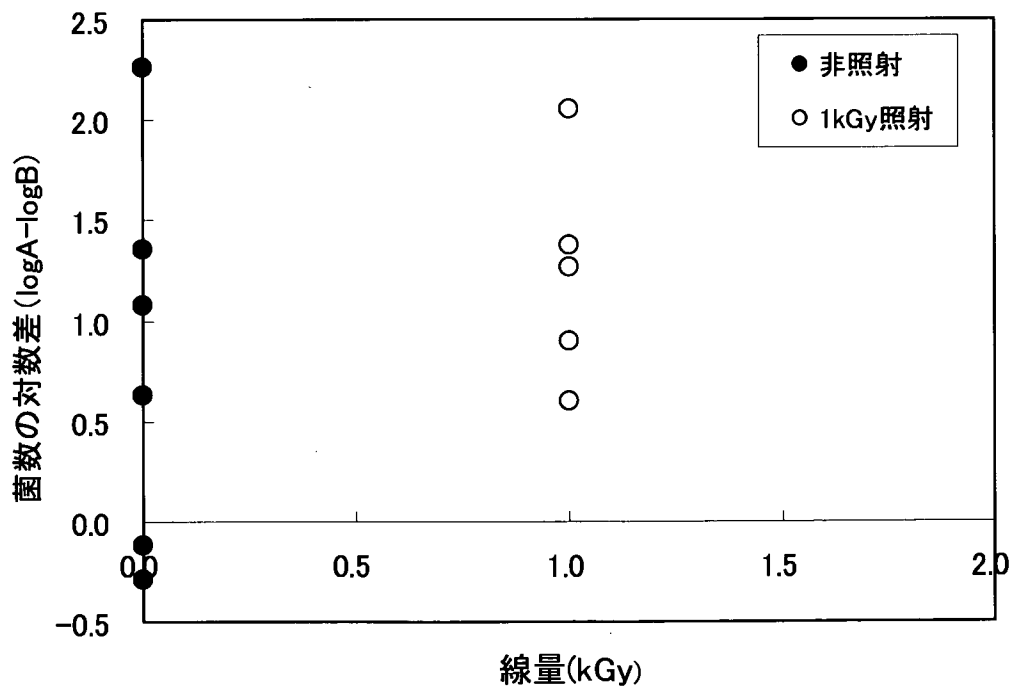


表6 非照射と 3kGy 照射オレガノ, セージ, パプリカの培養温度による

真菌菌数変化

照射線量		非照射		3 kGy		菌数比率 *1	
		25℃	30℃	25℃	30℃	非照射	3kGy
培養温度		25℃	30℃	25℃	30℃	25℃ /30℃	25℃ /30℃
菌数 (cfu/g)	オレガノ	3.7E+03	3.4E+03	1.3E+01	1.3E+01	1.09	1.00
	セージ	1.4E+04	1.6E+04	7.4E+01	3.4E+01	0.86	2.18
	パプリカ	3.5E+03	5.1E+03	8.0E+02	1.0E+03	0.70	0.80

* 1 本項目は香辛料の各照射線量での 25℃と 30℃で培養した菌数の比を示したものである

表7 非照射と 1kGy 照射白胡椒, オールスパイス, セージの培養温度による

真菌菌数変化 (検体 1)

照射線量		非照射		1 kGy		菌数比率 *1	
		25℃	30℃	25℃	30℃	非照射	1 kGy
培養温度		25℃	30℃	25℃	30℃	25℃ /30℃	25℃ /30℃
菌数 (cfu/g)	白胡椒	1.0E+04	1.3E+04	1.7E+03	1.0E+03	0.78	1.64
	オールスパイス	8.3E+04	1.0E+05	7.5E+02	2.4E+03	0.81	0.31
	セージ	5.7E+04	3.9E+04	1.1E+03	4.0E+02	1.44	2.75

* 1 本項目は香辛料の各照射線量での 25℃と 30℃で培養した菌数の比を示したものである。

表8 非照射と 1kGy 照射白胡椒, オールスパイス, セージの培養温度による

真菌菌数変化 (検体 2)

照射線量		非照射		1 kGy		菌数比率 *1	
		25℃	30℃	25℃	30℃	非照射	1 kGy
培養温度		25℃	30℃	25℃	30℃	25℃ /30℃	25℃ /30℃
菌数 (cfu/g)	白胡椒	1.5E+04	1.3E+04	1.1E+03	7.3E+02	1.12	1.53
	オールスパイス	2.9E+03	3.3E+03	6.6E+01	2.0E+01	0.88	3.30
	セージ	1.4E+04	6.4E+03	5.2E+02	2.6E+02	2.25	2.00

* 1 本項目は香辛料の各照射線量での 25℃と 30℃で培養した菌数の比を示したものである。

8. 一般生菌数測定結果および外れ値の検討 (平成 19 年度実施)

8-1 外れ値の検討

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、確認することは困難であるので、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。

本試験法では、著しい技量の違いはないものと推定するが、天然物である香辛料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 (19) とグラブスの検定 (19) を用い、外れ値を検討した。また、これらの検定方法以外に、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。

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、それ以外のデータについては外れ値として取り扱った。

以上のデータ検定結果のまとめを表9に、各機関別の検定結果を表10に示す。表9より黒胡椒とオールスパイス、オレガノについてはグラブスの検定結果と「平均値との比率を用いる方法」はほぼ同じデータを外れ値としている。一方、グラブスの検定では、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、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があった。このため、外れ値の検定方法としては、「平均値との比率を用いる方法」を用いた。

8-2 測定値の評価

「平均値との比率を用いる方法」による外れ値数はオール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。

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えた。また、香辛料の付着菌数も平成18年度の研究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。一方、各機関の結果については表10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、各機関の熱処理は概ね妥当なものであったと思われる。

9. 照射の有無の判定

(平成19年度実施)

9-1 照射の有無の判定結果

照射の有無の判定結果については、表

11にこれらの結果のまとめを示す。なお、表 11 には一次判定条件を $< 10^2$ cfu/g の代わりに $< 10^3$ cfu/g とした結果についても記載した。これらの判定に用いたデータは、前記に示したように外れ値は除いている。

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

表 9 検定で棄却された測定値の個数

黒胡椒						
	0kGy		5kGy		7kGy	
	未処理	熱処理	未処理	熱処理	未処理	熱処理
グラフス	—	—	2	—	—	—
コ克蘭	—	5	5	—	—	—
平均値との比	—	—	1	—	—	—

オールスパイス						
	0kGy		5kGy		7kGy	
	未処理	熱処理	未処理	熱処理	未処理	熱処理
グラフス	—	1	—	—	3	2
コ克蘭	—	—	—	—	5	—
平均値との比	—	2	—	—	3	2

オレガノ						
	0kGy		5kGy		7kGy	
	未処理	熱処理	未処理	熱処理	未処理	熱処理
グラフス	—	1	—	—	—	—
コ克蘭	5	5	—	—	—	—
平均値との比	—	1	—	—	—	—

セージ						
	0kGy		5kGy		7kGy	
	未処理	熱処理	未処理	熱処理	未処理	熱処理
グラフス	—	—	—	—	—	6
コ克蘭	—	—	5	—	—	適用不能
平均値との比	—	1	1	—	1	1

パプリカ						
	0kGy		5kGy		7kGy	
	未処理	熱処理	未処理	熱処理	未処理	熱処理
グラフス	—	—	1	—	2	—
コ克蘭	10	5	5	—	5	—
平均値との比	—	—	—	—	—	—

表 10 研究機関別外れ値の数

機関名	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

表 11 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

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
える。

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 照射では判定ができないもしくは
難しかった。二次判定は照射、非照射の
区別はできなかつた。

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。

10. 照射香辛料の生残菌の同定

1) 黒胡椒の生残菌の菌種

照射した黒胡椒の生残菌を 12 株分離し、
菌の同定を行った結果を表 12 に示した。
検出された生残菌は全てグラム陽性菌
の *Bacillus* 属の菌であり、*B.subtilis*、
B.megaterium、*B.cereus* 及び *B.pumilus*
の 4 菌種であった。

2) オールスパイスの生残菌の菌種

照射したオールスパイスの生残菌を
16 株分離し、菌の同定を行った結果を
表 13 に示した。生残菌は全て *Bacillus*
属の菌で *B.pumilus*、*B.subtilis*、*B.cereus*、
B.megaterium 及び *B.circulans* の 5 菌種
であった。

3) オレガノの生残菌の菌種

照射したオレガノの生残菌を 24 株
分離し、菌の同定を行った結果を表 14
に示した。生残菌の中でグラム陽性菌
は *Bacillus* 属の菌である *B.cereus*、
B.megaterium、*B.coagulans* 及び
B.circulans の 4 菌種と球菌である
M.kristinae 1 菌種であった。グラム
陰性菌はブドウ糖非発酵型の *Methylobacterium*
属の菌とブドウ糖非発酵型のものであ
った(菌種不明)。合計 7 菌種が検出
された。

4) セージの生残菌の菌種

照射したセージの生残菌を 10 株分離
し、菌の同定を行った結果を表 15 に
示した。生残菌の中でグラム陽性菌は
Bacillus 属の菌である *B.megaterium* 1
菌種と球菌である *M.sedentarius* の 2
菌種であった。グラム陰性菌はブドウ
糖発酵型の *Enterobacter sakazaki*、
Escherichia hermannii 及び *Pantoea*
agglomerans(*Enterobacter agglomerans*)
の 3 菌種であった。合計 5 菌種が検出
された。

5) パプリカの生残菌の菌種

照射したパプリカの生残菌を 29 株分
離し、菌の同定を行った結果を表 16 に
示した。表 16 には示していないが真
菌も検出された。生残菌の中でグラム
陽性菌は *Bacillus* 属の菌である *B.subtilis*、
B.licheniformis 及び *B.pumilus* の 3
菌種と球菌である *M.sedentarius* 1 菌
種であった。更に酵母菌も検出された。
グラム陰性菌はブドウ糖非発酵型の
Methylobacterium 属の菌 1 菌種とブ
ドウ

糖発酵型の *E. sakazaki* と *E. cloacae* の 2 菌種で合計 3 菌種であった。パプリカの生残菌は合計で真菌を含めると 9 菌種であった。

表 12 照射した黒胡椒の生残菌の同定結果

菌株番号	グラム染色性	菌の形態	芽胞形成	同定結果	グループ
1	陽性	桿菌	する	<i>B.subtilis</i>	①
2	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
3	陽性	桿菌	する	<i>B.subtilis</i>	①
4	陽性	桿菌	する	<i>B.subtilis</i>	①
5	陽性	桿菌	する	<i>B.pumilus</i>	③
6	陽性	桿菌	する	<i>B.pumilus</i>	③
7	陽性	桿菌	する	<i>B.subtilis</i>	①
8	陽性	桿菌	する	<i>B.subtilis</i>	①
9	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
10	陽性	桿菌	する	<i>B.cereus</i>	④
11	陽性	桿菌	する	<i>B.subtilis</i>	①
12	陽性	桿菌	する	<i>B.subtilis</i>	①

表 13 照射したオールスパイスの生残菌の同定結果

菌株番号	グラム染色性	菌の形態	芽胞形成	同定結果	グループ
1	陽性	桿菌	する	<i>B.pumilus</i>	①
2	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
3	陽性	桿菌	する	<i>B.subtilis</i>	③
4	陽性	桿菌	する	<i>B.pumilus</i>	①
5	陽性	桿菌	する	<i>B.pumilus</i>	①
6	陽性	桿菌	する	<i>B.pumilus</i>	①
7	陽性	桿菌	する	<i>B.subtilis</i>	③
8	陽性	桿菌	する	<i>B.pumilus</i>	①
9	陽性	桿菌	する	<i>B.cereus</i>	④
10	陽性	桿菌	する	<i>B.pumilus</i>	①
11	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
12	陽性	桿菌	する	<i>B.subtilis</i>	③
13	陽性	桿菌	する	<i>B.subtilis</i>	③
14	陽性	桿菌	する	<i>B.cereus</i>	④
15	陽性	桿菌	する	<i>B.pumilus</i>	①
16	陽性	桿菌	する	<i>B.circulans</i>	⑤

表 14 照射したオレガノの生残菌の同定結果

菌株番号	グラム染色性	菌の形態	芽胞形成	同定結果	グループ
1	陽性	桿菌	する	<i>B.cereus</i>	①
2	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
3	陽性	桿菌	する	<i>B.coagulans</i>	③
4	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
5	陽性	桿菌	する	<i>B.cereus</i>	①
6	陽性	桿菌	する	<i>B.circulans</i>	④
7	陽性	桿菌	する	<i>B.circulans</i>	④
8	陽性	桿菌	する	<i>B.cereus</i>	①
9	陽性	桿菌	する	<i>B.circulans</i>	④
10	陰性	桿菌	しない	グラム陰性ブドウ糖非 醗酵菌	⑤
11	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
12	陽性	桿菌	する	<i>B.circulans</i>	④
13	陽性	桿菌	する	<i>B.cereus</i>	①
14	陽性	桿菌	する	<i>B.circulans</i>	④
15	陽性	球菌	しない	<i>M.kristinae</i>	⑥
16	陰性	桿菌	しない	<i>Methylobacterium</i> 属	⑦
17	陽性	桿菌	する	<i>B.cereus</i>	①
18	陽性	桿菌	する	<i>B.circulans</i>	④
19	陽性	桿菌	する	<i>B.cereus</i>	①
20	陰性	桿菌	しない	<i>Methylobacterium</i> 属	⑦
21	陽性	桿菌	する	<i>B.circulans</i>	④
22	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
23	陽性	桿菌	する	<i>B.cereus</i>	①
24	陽性	桿菌	する	<i>B.cereus</i>	①

表 15 照射したセージの生残菌の同定結果

菌株番号	グラム染色性	菌の形態	芽胞形成	同定結果	グループ
1	陽性	球菌	しない	<i>M.sedentarius</i>	①
2	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
3	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
4	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
5	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
6	陽性	桿菌	する	<i>B.megaterium</i>	②
7	陰性	桿菌	しない	<i>E.sakazaki</i>	③
8	陰性	桿菌	しない	<i>E.hermannii</i>	④
9	陰性	桿菌	しない	<i>P.agglomerans</i>	⑤
10	陰性	桿菌	しない	<i>E.sakazaki</i>	③