

表 3 Savannah の  $\gamma$  線照射施設における照射食品の放射化 (dpm/lb/5Mrad)

食品	生成元素			
	塩素 38	カリウム 42	ナトリウム 24	リン 32
ベーコン	2800	30	720	—
ビーフシチュー	3000	60	1210	—
にんじん		30	240	—
キャベツ		60	110	—
鶏		80	230	50
鶏シチュー		60	480	—
たら		150	130	—
とうもろこし		60	90	—
小麦粉		20	20	—
果物の砂糖漬け		210	360	—
ソラマメ		30	70	—
挽き牛肉		90	310	—
挽き豚肉		100	250	—
牛乳		70	470	20
みかん		60	—	10
もも		40	60	—
パイナップルジャム		10	60	—
小エビ		50	500	2
サツマイモ		160	250	—
マグロ		50	280	20
ジャガイモ		60	180	20

Krugar, P., Wilson, C.R. "Study to Determine Neutron Fluxes in Food Irradiation Facilities", DA-19-129-QM-741, 1960.

誘導放射能の値はバックグラウンドを差し引いた比放射能として示されている。

この方法は照射技術上いくつかの難点を持っていた。

- 1) 線源に含まれる放射線に種々のエネルギーのガンマ線とベータ線が含まれる複雑な線源で、エネルギー的に弱い放射線が多いので表面線量だけが上昇し、食品内部までその効果を及ぼすことが難しい。
- 2) 種々の核種の混合物なので吸収線量の計算は複雑

であり、急速に減衰する放射能のために、毎日線源の位置を変えねばならないなど照射時に複雑な操作を必要とする。

- 3) 残留中性子放出のため、食品が放射化される可能性がある。
- 1), 2) は照射の工夫や労力で何とかしのげても 3) は

実験する必要があり、表1に示した方法を用いて中性子量を測定した。中性子の速度に応じて反応しやすいターゲットに補足し、 $(n, \gamma)$  反応で発生するガンマ線を測定し、熱中性子、エピサーマル中性子、速中性子の量を測定した。ターゲットには半減期の比較的短く測定しやすい元素を用いた。表1から用いる元素により算出される中性子量が異なり、およその値しかわからない。

空气中あるいは水中の使用済み燃料棒を使う4つの照射施設における中性子量を測定した。表2の結果が示すように、中性子フラックスが小さいものから、大きなものまで存在した。核燃料作成時の濃縮度合いや原子炉から外されたあとの経過時間によって、燃料棒に残存する放射性元素の種類と量が異なり、そのために中性子量に大きな差があったと考えられる。表によれば、中性子の持つエネルギーは熱振動程度のいわゆる熱中性子が主成分であった。食品照射にとって、誘導放射能を惹起させる中性子は不要で危険な要素なので、使用済み燃料棒を水中に沈め、この熱中性子をさらに減速し、その影響を少なくして、2.5MeVのガンマ線源として使用しようとしたのだろう。

表3に示すように食品を照射した時に発生する誘導放射能のデータを示した。上述のように水を使う工夫はしたが、ほとんどの食品が放射化することが判明した。ホウ素のような吸収剤がないのだから、水によって反射された熱中性子が食品中に進入することが、この結果から考えられる。たとえば、ベーコン、ビーフシチューの誘導放射能を現代の単位に変換すると50kGy照射で、それぞれ101,110Bq/kgの放射能が生じる計算である。塩素38は $Cl^{37}(n, \gamma) Cl^{38}$ で生じ、ベータ線を放出し、37分あまりの半減期をもつ。

燃料棒から出る中性子の問題を主な理由として、1958年FDAは中性子成分の多い使用済み燃料棒の線源を食品照射に用いることを禁じた。しかし、最新のWHOの資料でもこの線源を用いた昔の実験結果を掲載している<sup>19)</sup>。

#### 4-2 コバルト60などのガンマ線源による誘導放射能

コバルト60とセシウム137による $(\gamma, \gamma')$  反応や4-24MeVのエネルギーを持つX線による $(\gamma, n)$  反応が調べられた。

$(\gamma, \gamma')$  反応による放射化を測定した。表4に水溶液をコバルト60などの線源を用い、5Mrad (50kGy) 照射した時の核アイソマーのデータを示す。

コバルト60が出す比較的低いエネルギーのガンマ線でも、核種によっては吸収したガンマ線と似たようなエネルギーの放出が起こり、たとえば、インジウムやカドミニウムにそれぞれ1.0 MeV, 1.4 MeVのガンマ線を照射すると $(\gamma, \gamma')$  反応が起こることなどが報告された。さらに、ストロンチウム、インジウムなどの化合物にコバルト60で11kGyから18kGy照射したところ、 $(\gamma, \gamma')$  反応が検出されたという<sup>19)</sup>。光子吸収の反応断面は小さくても、吸収線量が10 kGyを超えるとこの反応が検出できるようになることを意味しており、コバルト60による大量照射の際には留意が必要だ。

表5にはセシウム137, コバルト60, 使用済み燃料棒(FE)のガンマ線を実際の食品に5Mrad (50kGy) 照射したあと、測定できた誘導ベータ線の計測数(バックグラウンドを差し引いた計測数)を示す。コバルト60照射の場合、牛肉とベーコンの誘導されたカウント数は110と30cpm/gで、バックグラウンドの2.5, 3.1倍で、その他はバックグラウンドの2倍以下であった。核種が同定されていないので、どのような核反応で生成した元素が放射能を示すのか不明である。しかし、幸い計測効率が示されているので、ベクレルに換算した値を表に示した。この計算が正しければ、コバルト60による照射食品では125Bqから4.5kBqの誘導されたベータ線が観測されており、チェルノブイリ食品汚染対策で示された370Bq/kgという量から考えると大きな量である。

$(\gamma, n)$  反応を起こすのに必要な最低限のガンマ線のエネルギーはベリリウム1.6, 2.2MeVとされている。2.5MeVのエネルギーを持つ使用済み燃料棒のガンマ線は $(\gamma, \gamma')$  反応を起こし、表5にあるように同時にベータ線量も増大した。これは食品中に大量に存在する重水素が $(\gamma, n)$  反応を起こし、中性子を発生させ、この中性子が周りの水により減速され、熱中性子となり、食品中の元素と $(n, \gamma)$  反応などを起こし、種々の放射性核種を生成したためと考えられる。

重水素に $(\gamma, n)$  反応を起こさせないガンマ線源として選定された元素がコバルト60やセシウム137であった。これらから出るガンマ線を線源に使う限り通常元素は $(\gamma, n)$  反応を起こさないで、照射食品は放射化されないとされたが、実際には $(\gamma, \gamma')$  反応や正体不明のベータ線放出核種が生じることがNatick研究所の一連の実験で明らかとなった。

表 4 コバルト 60 やセシウム 137 の  $\gamma$  線照射で生成する核アイソマー  
( $\gamma$  線測定) ( $\mu\text{Ci}/\text{g}$  元素 / 5 Mrad)

核異性体	半減期	線源		
		Cs137	Co60	使用済み核燃料棒
Ba-135m	(28.7h)	$<1 \times 10^{-6}$	$<3 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-6}$
Pb-204m	(67m)	$<2 \times 10^{-6}$	$<4 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-7}$
Hg-199m	(42m)	$<3 \times 10^{-7}$	$<2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-4}$
Fe		$<2 \times 10^{-7}$	$<3 \times 10^{-5}$	—
Zn		$<4 \times 10^{-7}$	$<3 \times 10^{-8}$	—
Ag107m	(44s)	$<1 \times 10^{-4}$	$<7 \times 10^{-3}$	—
Ag109m	(40s)			
Cd111m	(7.7m)	$<2 \times 10^{-2}$	$6 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$
Cd113m	(14.6y)			
Sn117m	(13.6d)	$<4 \times 10^{-8}$	$<3 \times 10^{-9}$	$6 \times 10^{-8}$
Sn119m	(293d)			
Sr-87m	(2.8h)	$<4 \times 10^{-6}$	$6 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$
Nb-93m	(12y)	$<1 \times 10^{-7}$	$<2 \times 10^{-9}$	$<3 \times 10^{-6}$
In-113m	(1.67h)	—	—	$1 \times 10^{-3}$
In-115m	(4.5h)	$2 \times 10^{-6}$	$9 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-3}$
Te-123m	(104d)	—	$<8 \times 10^{-9}$	$9 \times 10^{-8}$
Te-125m	(58d)	$<7 \times 10^{-6}$	—	—
Lu-178m	(23m)	—	—	$4 \times 10^{-5}$
Hf-160m	(5.5h)	$4 \times 10^{-7}$	—	$8 \times 10^{-5}$

Glass, R.A. & Smith, H.D., "Radioactive Isomers Produced in Foods by Gamma Rays and X Rays",  
Contract No DA-19-129-QM-1511 Report 3, 1960.

誘導放射能の値はバックグラウンドを差し引いた比放射能として示されている。

表5 セシウム137、コバルト60などによる食品の放射化 ( $\beta$ 線測定) (カウント/分/g)

試料		バックグラウンド		Cs137	Co60	使用済み燃料
			ド			
牛肉	cpm/g	75	—		110	86
	Bq/kg	3125			4583	3583
ベーコン	cpm/g	14	—		30	110
	Bq/kg	583			1250	4583
エビ	cpm/g	50		87	40	80
	Bq/kg	2083		3625	1667	3333
鶏肉	cpm/g	31		26	24	25
	Bq/kg	1292		1083	1000	1042
ソラマメ	cpm/g	34		14	3	29
	Bq/kg	1417		583	125	1208

a) 照射条件: Cs137, Co60, 使用済み燃料を用いたときの吸収線量はそれぞれ100kGy, 80 k Gy, 140kGyであった。

b) 測定条件: 試料量は0.1~0.4 g、バックグラウンド: 0.5カウント/分、元の表はcpm/g  
各食品の誘導放射能の量はバックグラウンドを差し引いた値。従ってバックグラウンド値は不要であるが、原表にあるので書き添えた。

c) ガンマ線、ベータ線の計測効率はいずれも5%、40%として、筆者が計算した。

d) Glass, R.A. & Smith, H.D., "Radioactive Isomers Produced in Foods by Gamma Rays and X Rays", Contract No DA-19-129-QM-1511 Report 3, 1960.

#### 4-3 大きいエネルギーのX線による食品中の誘導放射能 ( $\gamma$ , $\gamma'$ ) 反応と ( $\gamma$ , n) 反応

エネルギーの比較的強いガンマ・X線を照射した時は、( $\gamma$ ,  $\gamma'$ ) 反応と ( $\gamma$ , n) 反応がある割合で同時に起きた。彼らは種々の核種を含む水溶液をX線で照射し、その中に誘導される核種を分析した。表6はこのうち ( $\gamma$ ,  $\gamma'$ ) 反応の結果を示す。食品に関連する元素の多くはこの反応を起こさないことがわかる。

表7は実際の食品に種々のエネルギーのX線を照射したときの誘導放射能 (バックグラウンドを差し引いた放射能) を示す。食品をそのまま何の処理もせずに $\gamma$ 線を測定した場合、ベーコンに8~24MeVのX線を照射するとバックグラウンドの5倍~10倍ほどの誘導ガンマ線が測定された。その他の食品では誘導されたガンマ線は観測されなかった。

つぎに照射食品を灰化して、低エネルギーのガンマ線測定すると、大きいエネルギーのX線で照射された食品からは多くの誘導されたガンマ線が観測される様になった。特に牛肉とベーコンに24MeVのX線を照射した場合、

バックグラウンドの4倍と130倍の誘導ガンマ線をそれぞれ観測した。

灰化後のベータ線を測定すると4から24MeV照射したソラマメはバックグラウンドの6倍程度のカウントがあった。ベーコンは同様な照射で2.5倍から8倍の誘導ベータ線を観測している。

表5と同様にベクレルに換算した値を表に示した。やはりX線は強力で多くの誘導放射能を生み出し、筆者の計算が正しければ、灰化後の誘導ベータ線の量は4や8MeVのX線ですら、牛肉で3kBq、エビで2kBq、鶏肉で1kBq、ソラマメで3.4から6.3kBqであった。

この領域は10MeVの電子加速器からでる電子が作りうるX線のエネルギーであるので、留意する必要がある。

植物や加工食品の場合、含まれる元素が広範でかつ高濃度であるためと考えられるが、この実験では核種の解析がされていない。一方、この結果はアイソトープ協会の行った一連の研究結果と一致しており、電子線あるいはX線照射による放射化反応は顕著なものと考えられる。

表 6 各核種を含む水溶液を種々のエネルギーの X 線で照射したとき生成する核アイソマー  
( $\gamma$ 線測定) ( $\mu\text{Ci}/\text{g}$  元素 / 5Mrad)

核異性体	半減期	X 線のエネルギー			
		4	8	16	24
Ba-135m	(28.7h)	$1 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-3}$	0.3	1
Pb-204m	(67m)	$1.4 \times 10^{-3}$	-	200	200
Hg-199m	(42m)	$9 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-3}$	-	-
Fe		$< 1 \times 10^{-5}$	$< 3 \times 10^{-6}$	( $\gamma$ , n)	( $\gamma$ , n)
Zn		$< 1 \times 10^{-5}$	$< 3 \times 10^{-6}$	-	( $\gamma$ , n)
Ag107m	(44s)	$< 2 \times 10^{-3}$	( $\gamma$ , n)	( $\gamma$ , n)	( $\gamma$ , n)
Ag109m	(40s)				
Cd111m	(7.7m)	$1 \times 10^{-2}$	2	( $\gamma$ , n)	( $\gamma$ , n)
Cd113m	(14.6y)				
Sn117m	(13.6d)	$3 \times 10^{-6}$	-	$3 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-4}$
Sn119m	(293d)				
Sr-87m	(2.8h)	$2 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-2}$	63	$8 \times 10^2$
Nb-93m	(12y)	-	-	-	( $\gamma$ , n)
In-113m	(1.67h)			( $\gamma$ , n)	8
In-115m	(4.5h)	$6 \times 10^{-3}$	1	9	16
Te-123m	(104d)	-	-	$2 \times 10^{-5}$	-
Te-125m	(58d)	-	-	-	$6 \times 10^{-5}$
Lu-178m	(23m)	0.2	$2 \times 10^{-4}$	0.4	0.5
Hf-160m	(5.5h)	-	$9 \times 10^{-6}$	-	-

a) Zn, Fe はエネルギーが安定せず、核種を決定できなかった。

b) Glass, R.A. & Smith, H.D., "Radioactive Isomers Produced in Foods by Gamma Rays and X Rays",  
Contract No DA-19-129-QM-1511 Report 3, 1960.

c) 誘導放射能の値はバックグラウンドを差し引いた比放射能として示されている。

表7 X線照射による食品の放射化

試料		バックグラウンド	X線源(MeV)			
			4	8	16	24
未処理でγ線測定						
牛肉	cpm/g	3	2	8	0	6
	Bq/kg	1000	667	2667	0	2000
ベーコン	cpm/g	9	10	40	7	80
	Bq/kg	3000	3333	13333	2333	26667
エビ	cpm/g	1	0	4	8	5
	Bq/kg	333	0	1333	2667	1667
鶏肉	cpm/g	2	0	5	4	6
	Bq/kg	667	0	1667	1333	2000
ソラマメ	cpm/g	3	0	0	0	0
	Bq/kg	1000	0	0	0	0
灰化後γ線測定						
牛肉	cpm/g	21	21	22	21	63
	Bq/kg	7000	7000	7333	7000	21000
ベーコン	cpm/g	3	1	0	14	400
	Bq/kg	1000	333	0	4667	133333
エビ	cpm/g	16	14	18	16	63
	Bq/kg	5333	4667	6000	5333	21000
鶏肉	cpm/g	4	7	4	5	28
	Bq/kg	1333	2333	1333	1667	9333
ソラマメ	cpm/g	27	19	22	26	51
	Bq/kg	9000	6333	7333	8667	17000
灰化後β線測定						
牛肉	cpm/g	75	86	100	73	80
	Bq/kg	3125	3583	4167	3042	3333
ベーコン	cpm/g	14	23	14	19	94
	Bq/kg	583	958	583	792	3917
エビ	cpm/g	50	51	57	59	70
	Bq/kg	2083	2125	2375	2458	2917
鶏肉	cpm/g	31	26	25	25	30
	Bq/kg	1292	1083	1042	1042	1250
ソラマメ	cpm/g	34	83	150	150	170
	Bq/kg	1417	3458	6250	6250	7083

- a) 照射条件：4, 8, 16, 24MeVのX線を用いたときの吸収線量はそれぞれ0.1kGy, 0.5kGy, 2kGy, 3kGyであった。
- b) 元の表はcpm/g 各食品の誘導放射能の量はバックグラウンドを差し引いた値。従ってバックグラウンドの値は不要であるが、原表にあるので書き添えた。
- c) ガンマ線、ベータ線の計測効率はそれぞれ5%、40%として、筆者が計算した。
- d) Krugar, P., Wilson, C.R. "Study to Determine Neutron Fluxes in Food Irradiation Facilities", DA-19-129-QM-741, 1960.

4-4 電子線照射による中性子の発生

使用済み燃料棒の中性子フラックスを測定したのと同じ方法で各種の電子線照射装置の中性子線量を測定した。その結果を表8に示す。中性子の発生量は加速電圧が高い電子線照射装置ほどまた電流値が大きい装置ほど中性子線量が大きいことがわかる。電流値が数mAの装置は加速電圧が3MeV程度でも多くの中性子を発生した。一方、10MeV以上の装置ではきわめて小さな電流値でも多くの中性子を発生した。

反応断面の大きさは電子線のエネルギーと共に変化す

るが、各元素の巨大共鳴領域をさけ、照射時の加速電圧は25MeVを最大とした。一方、15MeVを超えてようやく誘導放射能を観測する場合もあった。理論と合わないことから、加速電圧の測定に問題があったかもしれない。2003年、AOACの席でUSDAの担当者と議論したときにも、話題となり当時加速器のエネルギーを正確に測定するのは難しかったようだ。

いずれにしても、このように高速に加速された電子線は種々の核反応を食品中で起こす可能性があるだけでなく、施設の建設費が高価なことや、装置が安定して作動

表 8 電子線照射施設の中性子量 (個/cm<sup>2</sup>・sec)

施設名	加速電圧 MeV (電流値 μA)	熱中性子				測定素子 エピソード 中性子					
						エピソード 中性子		高速中性子			
		Mn	In	Dy	Au	In	Au	P	Al	Al	V
						Φ <sub>r</sub>	Φ <sub>f</sub>	Ee	Ee	Ee	Ee
						(1.46)	(4.9)	(2.5)	(4.6)	(8.1)	(11.5)
GE	2 (1800)	<1.8	<1.8	<5.4	—	0.0063	—	—	—	—	—
GE	3.5 (4000)	318	330	316	—	3.2	—	<20000			
Barnes	8 (11-44)	<25	20	20	—	0.1	—	<8000			
ARCO	6 (11-46)	<16	19	19	—	0.3	—	<5000	<10000	<20000	<20000
MRH	15-35 (0.28)	97000	150000	98000	89000	670	1700	310000	530000	36000	<16000
Stanford U	30 (0.02- 0.05)	1900	<2000	1600	<4300	17	14	190000	1700000	<26000	31000

\*Meyer, R.A., "Induced Radioactivity in Food and Electron Sterilization", US. Army Natick Laboratories, 1965 Glass, R.A. & Smith, H.D., "Radioactive Isomers Produced in Foods by Gamma Rays and X Rays", Contract No DA-19-129-QM-1511 Report 3, 1960.

バックグラウンド：元の報告書には記載がないが、中性子なので基本的にはゼロと考えられる。

しないことなどから、近年になるまで工場稼働する装置は少なかったと考えられる。

このデータは表7のX線のデータと矛盾がある。8MeVのエネルギーで比較するとX線照射の場合多く食品について誘導放射能を観測したのに対し、理論的に最高8MeVのX線発生している電子線では誘導放射能を全く観測しなかったのである。変換効率が悪いとはいえ、これは後者の実験に問題があった可能性が高く、電子線加速器の加速電圧の測定が正しかったか疑問がある。

## 5. まとめと結論

現在照射食品に国際的に認められているコバルト60、10MeVまでの電子線、並び5MeVまでのX線を用いても、食品に含まれる元素によっては、放射能を帯びることが報告されている。

誘導放射化は原理的に起きないとされているコバルト60を50kGy照射した牛肉、ベーコンからバックグラウンドの2.4倍、3倍の誘導放射能を検出した。また、核種は示されていないが、牛肉でも4.5kBq、ベーコン2.3kBq、2.7kBqなどの誘導放射能が観測されている。さらに20kGy以下10kGy以上の照射でもカドミウムなどで( $\gamma$ ,  $\gamma'$ ) 反応が観察された。

Natick研究所のガンマ/X線照射による放射化実験の結果、2.5MeV(使用済み燃料)ではベーコン、ビーフシチューから塩素38が観測され、ベーコンやソラマメからベータ線、ガンマ線を検出し、その放射化を確かめた。

8MeVの電子線は同程度のX線を伴うので、これを原因とする放射化物の生成が予想された。しかし、電子線の場合、全く放射化物を観測せず<sup>1)</sup>、同じエネルギーのX線の結果と矛盾する。

実際に生成する誘導放射能の量は照射装置の構造や運転の方法により異なる。従って、中性子量は個々の施設について調査をする必要がある。IAEAの勧告に基づき<sup>13)</sup>、放射化しにくい環境と条件で電子線照射すれば問題がすくなくなると考えられる。

誘導放射能の量が少ないので、ベータ線などの検討には無機塩類の水溶液を照射してその結果に基づきデータを出す必要があった。しかし、モデルはあくまでモデルで、実際の食品とは異なった結果を与える可能性はゼロではない。実際、Natick研究所の報告にもあるが、食品汚染物に由来すると考えられる核種が存在し、それが照射により放射化することや、あるいは包装容器が中性子源になり放射化が促進されるなど実際はモデルとは異なる結果を与えている。個別の条件を考慮しないと放射化の危険が増す場合がある。

安全性については当時の人々が考えなかった生物・生体内濃縮をするような化学形、アルファ線などを出す核

種を想定すると<sup>20)</sup>、体内カリウムより放射能が少ないからとかあるいは誘導放射能を測定できないからすなわち安全との結論は得られない。

毒性実験の中に、照射直後の照射食品に問題ありとする研究があるので、半減期の短い放射性物質による体内被曝の確定影響と確率影響を見積もる必要があるが、今後の課題である。例えば、インドにおける照射小麦の安全性を調べる実験で、照射直後の小麦を食べたグループの子供の末梢血中に倍数体細胞が多く検出されたという。各国でこれについて動物実験が繰り返されたが、それら複数の追試の間ですら一致した結果が得られていない<sup>21,22)</sup>。原因についても、統計的におかしい、栄養の不足、実験の失敗などに帰着され明確でない。このような現象を誘導放射能の確定影響等の観点から精査した論文を持ち合わせない。

現在照射食品を認めている各国において、照射食品の安全性を論議した1990年頃、本稿で示したようなデータの存在は一般に知られておらず、誘導放射能のリスクについて厳密な議論は避けられてきた経緯がある。従って、外国の例を参考にしても、これら誘導放射能が社会的に容認できるのか否か、直ちに判断することは難しい。

照射食品を安全に流通させるためには、一般に食品添加物が必要である。食品照射は多くのラジカルを食品中に発生させ、食品中のビタミンEなどの抗酸化成分を極端に減少させるので、これらの影響を防止する必要がある。実際に実験動物用の照射餌料には多くの添加剤が使用されていること<sup>23)</sup>からも、それが必要不可欠であることは明らかだ。一般的に食品添加物のマイナスの面を食品照射は補えるかはケース・バイ・ケースで、これら保護的な添加剤を必要としない食品も考えられるので、それらについては食品照射技術のメリットは大きい。

最後に本稿とは目的が異なるので論じなかったが、筆者らは、誘導放射化が照射食品の検知に使用できないかとの観点から10MeVの電子線照射による誘導放射能を予備的に測定した<sup>24)</sup>。Natick研究所の研究よりもっと広い範囲の元素について、放射化が観測されており、50年後の理論と高い測定技術に基づき、この問題はさらに精査が必要だろう。

一つ一つに引用ページを記さなかったが、核反応については村上らのデータブックを使用し、反応の解析を行った。<sup>25)</sup>

## 謝辞

本論を書くにあたっては、マイクロフィッシュを読み取り、その書かれた核反応を現在の知識で評価する作業が必要で、このためにもとデータであるスタンフォード大グループのデータについての解説と必要な作業につ



いてご助言をいただいた元東京都立産業技術研究所 谷崎良之博士に感謝する。JCOの事故のあと対応に追われる中 ( $\gamma$ , n) 反応, 中性子捕獲反応や加速器の仕組みなどの原子物理学についての詳細を丁寧に教授してくれた原子燃料工業NFI室の諸氏に衷心より感謝する。

#### 参 考 文 献

- 1) 宮原 誠 誘導放射能の確認とその安全性 食品照射 41, 32-48 2006.
- 2) 三菱総合研究所 食品への放射線照射技術の安全性に関する欧米の取り組み状況調査報告書 内閣府食品安全委員会 平成15年度食品安全確保総合調査 2004年
- 3) 食品総合研究所 放射線照射食品の安全性に関する文献等の収集・整理等の調査報告内閣府食品安全委員会 平成16年度食品安全確保総合調査 2005年
- 4) Krugar, P., Wilson, C.R. "Study to Determine Neutron Fluxes in Food Irradiation Facilities", DA-19-129-QM-741, 1960.
- 5) Smith, D.H., "Radioactivities Produced in Foods by High-Energy Electrons", DA19-129-QM-1100, 1962.
- 6) Meyer, R.A., "Induced Radioactivity in Food and Electron Sterilization", US. Army Natick Laboratories, 1965.
- 7) Becker, R.L., "Radioactivity Induced in Food by 10-MeV Electron Irradiation", DAAGI7-76-0060, US. Army Natick Research and Development Command 1977.
- 8) Becker, R.L., A Determination of the Radioactivity Induced in Food as a Result of Irradiation by Electron of Energy between 10 to 16 MeV", DAAK60-78-R-0007, US. Army Natick Research and Development Command 1979
- 9) National Radiological Protection Board, "Report on the Radiological Implication of Irradiated Foods", ANCIF, "Report on the Safety and Wholesomeness of Irradiated Foods" Appendix B 1985.
- 10) 武田篤彦, 古田雅一 "10MeV電子線照射食品中の誘導放射能について", 食品照射研究会 "研究成果最終報告書" 日本アイソトープ協会, 1992.
- 11) 橋爪 朗 "ガンマ線による誘導放射能 (10MeV以下の光核反応) 食品照射研究会 "研究成果最終報告書" 日本アイソトープ協会, 1992.
- 12) ICGFI "The Development of X-ray Machines for Food Irradiation" Joint FAO/IAEA/WHO Consultant's Meeting on the Food irradiation 1995 Vienna.
- 13) IAEA "Natural and Induced Radioactivity in Food", IAEA-TecDoc-1287, 2002, Austria.
- 14) Glass, R.A. & Smith, H.D., "Radioactive Isomers Produced in Foods by Gamma Rays and X Rays", Contract No DA-19-129-QM-1511 Report 3, 1960.
- 15) Glass, R.A. & Smith, H.D., "Radioactivities Produced in Foods by High-Energy Electrons", Contract No DA-19-129-QM-1100 Report 10, 1960.
- 16) Krugar, P., Wilson, C.R. "Determination of Neutron Dosages by Food Irradiation Devices" Contract No DA-19-129-QM-741, Report 12 final 1960.
- 17) Jarrett, Sr, R.D., Isotope Radiation Sources, Josephson, E.S. & Peterson, M.S, Ed. Preservation of Food by Ionization Radiation Voll, Chap6, CRC, Boca Raton, 1982.
- 18) WHO, "High-dose Irradiation: Wholesomeness of Food irradiated with Doses above 10kGy", WHO Technical Report Series 890, 1999, Geneva. pp.83.
- 19) 橋爪 朗, 八巻 務, 唐司定吉, 広庭隆行, 樋口進, "Co-60の大線量 $\gamma$ 線照射によるアイソマーの励起と食品照射" 第36回理工学における同位元素・放射線研究発表会要旨, 日本アイソトープ協会, 1999, 東京.
- 20) 松岡 理, 放射性物質の人体摂取障害の記録 "日刊工業社, 1995, 東京; 近藤宗平 "低線量放射線の健康影響" 近畿大学出版局, 2005.
- 21) 世界保健機構 "照射食品の安全性と栄養適性" コープ出版, 東京1994, pp157~pp163. (原文WHO, "Safety and nutritional adequacy of irradiated food", WHO, Geneva, 1994 pp.94-pp101.)
- 22) Science Committee for Food, "Report of the Scientific Committee for Food", EUR.10840EN, Directorate-General, Commission of the European Communities 1986, pp 5.
- 23) IAEA, "Decontamination of Animal Feeds by Irradiation", Vienna, 1979, pp. 81.
- 24) Miyahara, M., Maitani, T., Nakamura, M., Tanizaki, Y., Kobayashi, A New Photon Activation Reaction Method for Detection of Irradiated Foods Which Treated with High Energy Electron Beam. A Fundamental Approach. "The 117th Annual AOAC International Meeting and Exposition, 2003.
- 25) 村上悠紀雄, 團野皓文, 小林威夫編 "放射線データブック", 地人書館, 1982, 東京.

【報文】

## 食品照射検知の LAL/GNB 法の測定条件の検討

越川富比古<sup>1\*</sup>, 松島 昌子<sup>1</sup>, 廣庭 隆行<sup>1</sup>, 宮原 誠<sup>2</sup>

### Examination of the Experimental Conditions in Using the LAL/GNB Method for Judging Food Irradiation

Tomihiko KOSHIKAWA<sup>1\*</sup>, Masako MATSUSHIMA<sup>1</sup>,  
Takayuki HIRONIWA<sup>1</sup> and Makoto MIYAHARA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Koka Laboratory, Japan Radioisotope Association,  
19-121 Torino, Koka-cho, Koka, Shiga 520-3403, Japan

<sup>2</sup>Food Division, National Institute of Health Sciences,  
1-18-1 Kamiyoga Setagaya-ku, Tokyo 158-8501 Japan

We examined the use of the Limulus amoebocyte lysate (LAL) test in conjunction with a Gram negative bacteria (GNB) plate count to judge whether food had been irradiated or not, and compared the experimental conditions with those for the European Standard EN 14569:2004. The cultivation temperature at 30°C (EN:21°C) and period for 72 hours (EN:24±1 hours) was suitable for total bacteria (TB) and GNB counts. The calculation of number of TB and GNB on the basis of the colonies in each dish containing 30 to 300 colonies was necessary to perform accurate evaluations. In the endotoxin determination, because of the difficulty of determining whether the gel formed or not by using the European Standard method, the initial cell suspension was diluted with endotoxin-free water by using microtiter plate.

The LAL test was applied to each diluted solution in the test tube. Gel formation was confirmed easily. Confirmation of irradiation was possible by using the "A-value" expressed by  $[\log_{10}(\text{Endotoxine/g}) - \log_{10}(\text{GNB/g})]$ . Positive A-values were judged to indicate the sample was properly "irradiated", and negative A-values, when the total (or GN) bacteria count was over 10<sup>3</sup> CFU/g, to indicate the sample was "unirradiated". When negative A-values were obtained with a bacterial count less than 10<sup>3</sup> CFU/g, a strong possibility of irradiation was suggested. (Accepted 8 January 2008)

Key words : Food irradiation (食品照射)/Irradiated food detection (食品照射検知)/Limulus test (リムルス試験)/Gram negative bacteria (グラム陰性菌).

### 緒 言

食品照射は電離放射線の生物作用を利用して、食品の殺菌、殺虫、発芽抑制などの目的で利用され、わが国では、ばれいしょの適用にのみ許可されている。また、海外では、現在、50ヶ国以上の国で100品目以上の食品について食品照射が許可されており、それらの国では、食品が放射線照

射されているか否かを調べるための物理的、化学的及び微生物学的検知法が開発され、使用されている。

微生物学的検知法<sup>1, 2)</sup>として、鶏肉を対象とした LAL/GNB 法 (EN14569:2004) がヨーロッパでスクリーニング法として採用されている。

この方法は、試料に存在する総菌数とグラム陰性菌数 (GNB) の測定、及びグラム陰性菌に由

<sup>1</sup>財団法人アイトープ協会甲賀研究所 〒520-3403 滋賀県甲賀市甲賀町島居野121-19 ☎0748-88-3121

<sup>2</sup>国立医薬品食品衛生研究所食品部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 ☎03-3700-1141 (内線332)

来するエンドトキシン量 (EU) の測定とから構成され、それぞれの測定値の対数値を用い、 $\{\log_{10}(\text{エンドトキシン量/g}) - \log_{10}(\text{グラム陰性菌数/g})\}$  の計算値 (以下、A 値と略記) を指標に照射の有無を判定する検知法である。照射有無の判定基準には以下①～③の3通りがある。①は照射された場合で、エンドトキシン量が多く、グラム陰性菌数が少なくなり (あるいは検出されない)、A 値が 0 より大きい値を示す。②は未照射の場合で、エンドトキシン量とグラム陰性菌数が多く、A 値は 0 より小さいマイナスの値、又は 0 に近い値を示す。③は判定不可能な場合で、エンドトキシン量とグラム陰性菌数 (200個/g 以下) が非常に少ない試料である。このような場合には他の検知法で調べる必要がある。

本稿では、この LAL (Limulus amoebocyte lysate)/GNB 法が実際に検知法として適用できるのか否かを鶏肉を用いて検証するとともに、鶏肉以外の肉や香辛料等にも適用可能であるか否かについて検討した。

検討項目は、①総菌数及びグラム陰性菌数測定における培養温度と培養期間、②総菌数及びグラム陰性菌数測定での菌数評価、③エンドトキシン測定方法、④ LAL 試薬の感度、⑤照射による菌数及びエンドトキシン量の影響、⑥鶏肉以外の肉や香辛料への適用、及び、⑦検知法としての照射有無の判定基準である。

## 実験方法

### 1. 総菌数・グラム陰性菌数の測定方法の検討

#### 1) 供試材料

実験に供試した鶏肉、豚肉及び牛肉のミンチは滋賀県甲賀市のスーパーマーケットより購入した。

#### 2) 試薬・培地

ポリペプトンは日本製薬製、酵母エキスは Difco 製、肉エキスは入手できなかったため、ニュートリエントプロス (Difco 製) を代用した。ミルク寒天培地は Oxoid CM21 及び Fluka 製を使用した。Nisin は Sigma 製、ペニシリン G カリウム (1430単位/mg) は和光純薬製、クリスタル

バイオレットはナカライテスク製を使用した。エンドトキシンプリー注射用蒸留水 (100ml) は大塚製薬製を使用した。

### 3) 培地の調製

#### ①希釈液

塩化ナトリウム 8.5 g、ポリペプトン 1 g を秤量し、蒸留水 1000 ml に溶解し、試験管に 4.5 ml ずつ分注し、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

#### ②ニュートリエント寒天培地 (NA 培地)

EN14569 ではポリペプトン 5 g、肉エキス 1 g となっているが、肉エキスが入手できなかったため、ニュートリエントプロス 8 g を代用した。酵母エキス 2 g、塩化ナトリウム 5 g 及び寒天末 15 g を秤量して、蒸留水 1000 ml に溶解後、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。滅菌後、滅菌シャーレに 20 ml ずつ分注し、平板培地を作成した。

#### ③グラム陰性菌選択培地 (GNBSM 培地)

##### (1) 基本培地

ミルク寒天培地 (Oxoid CM21) 24 g、Nisin 40 mg を秤量し、蒸留水 997 ml に溶解し、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。滅菌後、55°C の温浴で保温した。

##### (2) クリスタルバイオレット溶液

クリスタルバイオレット 10 mg を秤量し、蒸留水 10 ml に溶解後、濾過滅菌し、滅菌した容器に保存した。この溶液を基本培地に 2 ml 加えた。

##### (3) ペニシリン G カリウム溶液 (20,000 IU/L)

ペニシリン G カリウム 280 mg を秤量し、蒸留水 10 ml に溶解後、濾過滅菌し、滅菌した容器に保存した。この溶液を基本培地に 1.2 ml 加えた。

##### 4) 試料からの菌の回収

試料のミンチ肉を 10 g 秤量して、フィルター付きホモジナイザー袋に移し、注射用蒸留水 90 ml 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)。

##### 5) 総菌数及びグラム陰性菌数の測定

バッグミキサーで処理した菌液を滅菌した 5 ml のメスピペットで回収し、滅菌した試験管 (乾熱滅菌条件: 250°C で 2 時間) に移した。この菌液を 10 倍の段階希釈を行った。原液及び各希釈液について NA 培地の入ったシャーレ 4 枚に 0.1 ml 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。シャーレ4枚の内2枚を総菌数測定用に用いた。残りの2枚はグラム陰性菌測定用とし、90分間室温に置いた後、培地の上にGNBSM培地10mlを積層した。培養は30°Cで72時間行った。培養後、菌数を計測した。

6) ガンマ線照射

当研究所のガンマ線照射装置（ノルディオン製JS-7500型）を用い、各試料30gを滅菌したシャーレに移し、下記目標線量まで静置照射した。照射線量はアラニン線量計を用いた。照射線量は2.5 kGy及び5 kGyである。

2. エンドトキシン定量の検討

1) 試薬

ライセート試薬は、生化学工業㈱より購入したパイロテル<sup>®</sup>マルチテスト感度0.03EU/mlを使用した。ライセート試薬の溶解液はLAL Regent Water (LRW)を使用し、5 mlで溶解した。また、菌液の希釈には注射用蒸留水（大塚製薬製：20mlアンプル入り）を使用した。

2) 測定器具

菌液の希釈は生化学工業製トキシペットプレートLPを用い、エンドトキシンのゲル化による定量ではアルミキャップを付けたテルモ製洗浄試験管ラルボ（12.5×7.5mm）を250°Cで2時間乾熱滅菌して使用した。

3) エンドトキシンの定量

トキシペットプレートLPの穴に注射用蒸留水185µlずつ分注した。次に乾熱滅菌した試験管にライセート試薬を90µlずつ分注した。最初の穴に菌液を90µl移した。最初の穴に入れた菌液を混ぜ、90µlを取り、つぎの穴に移し、また更に

90µlを取りライセート試薬の入った試験管に移した。同様な希釈操作を行った（最高10回）。試料の入った試験管を37°Cの温浴で1時間反応させた。1時間後、試験管を温浴から取り出し、逆さまにしたときにゲル化しているものを陽性、ゲル化していないものを陰性とした。ゲルが直ぐに崩れたものや液状のものは陰性と判定した。ゲル化した希釈回数を基に次式（1）を用いてエンドトキシン量を算出した。1回希釈の希釈係数（Titer）は0.5で、2回目希釈の場合は1.0となり、希釈回数が増えるにつれて希釈係数は0.5ずつ増える。

$$\text{エンドトキシン量 (EU/g)} = 10^{(Titer)} \times 0.03 \times 10 \dots \dots \dots (1)$$

実験結果

1. 総菌数・グラム陰性菌数の測定方法の検討

1) 総菌数及びグラム陰性菌数測定での培養温度と培養期間

EN14569：2004での総菌数及びグラム陰性菌数測定では、培養温度21±1°C、培養期間24±1時間と記載されているが、Table 1及びTable 2に示したように24時間培養の場合、総菌数は培養温度21°Cで4日間培養の約40%、30°Cで約50%、また、菌数も21°Cに比べ増加していた。グラム陰性菌数は培養温度21°Cで4日間培養の約数%、30°Cで約60%であった。グラム陰性菌数は培養3日間では培養温度が21°Cでも30°Cでも同じであった。

以上の結果から、総菌数及びグラム陰性菌数の

Table 1. Effect of the cultivation temperature and time on total bacteria counts

Cultivation temperature (°C)	Sample	Cultivation time (h)							
		24		48		72		96	
		TBC (CFU)	(%)	TBC (CFU)	(%)	TBC (CFU)	(%)	TBC (CFU)	(%)
21	No.1	102	(40.2)	218	(85.8)	248	(97.6)	254	(100)
	No.1	93	(41.5)	196	(87.5)	221	(98.7)	224	(100)
	No.2	99	(41.3)	226	(94.2)	237	(98.8)	240	(100)
	No.2	85	(29.0)	252	(87.5)	287	(98.0)	293	(100)
30	No.1	159	(56.4)	266	(94.3)	281	(99.6)	282	(100)
	No.1	178	(52.1)	288	(87.3)	329	(99.7)	330	(100)
	No.2	167	(48.5)	306	(89.0)	334	(97.1)	344	(100)
	No.2	188	(51.2)	328	(89.4)	356	(97.0)	367	(100)

TBC: Total bacteria count

Table 2. Effect of the cultivation temperature and time on Gram negative bacteria counts

Cultivation temperature (°C)	Sample	Cultivation time (h)							
		24		48		72		96	
		GNBC (CFU)	(%)	GNBC (CFU)	(%)	GNBC (CFU)	(%)	GNBC (CFU)	(%)
21	No.1	3	(2.3)	126	(96.9)	129	(99.2)	130	(100)
	No.1	0	(0)	140	(95.9)	146	(100)	146	(100)
	No.2	2	(1.1)	166	(95.4)	174	(100)	174	(100)
	No.2	6	(2.7)	197	(90.0)	219	(100)	219	(100)
30	No.1	83	(61.5)	117	(86.7)	133	(98.5)	135	(100)
	No.1	75	(62.5)	111	(92.5)	120	(100)	120	(100)
	No.2	122	(59.0)	178	(93.7)	190	(100)	190	(100)
	No.2	113	(61.1)	173	(93.5)	185	(100)	185	(100)

GNBC: Gram negative bacteria count

Table 3. Results of colony counts and calculation samples

Dilution	Sampling volume (ml)	Counts/Petri dish (CFU)		Total (CFU)	Comment
		1	2		
10 <sup>-1</sup>	0.1	1091	939	2030	• Number of colony is more than 300 CFU
10 <sup>-2</sup>	0.1	168	165	333	• Number of colony is between 30 and 300 CFU
10 <sup>-3</sup>	0.1	10	9	19	• Number of colony is less than 30 CFU
Calculation using EN14569 method				(2030+333)/[0.1×(2+0.1×2)×10 <sup>-1</sup> ]=1.07×10 <sup>6</sup> CFU/g	
Calculation using colony counts between 30 and 300CFU				[(168+165)/2]×10 <sup>1</sup> ×10=1.67×10 <sup>6</sup> CFU/g	

培養温度は21°Cよりも30°Cの方が適していることが判明した。

培養期間も同様に24±1時間よりも3日間(72時間)の方が適していることが判明した。

総菌数及びグラム陰性菌数の培養温度は30°Cで、培養期間は3日間(72±1時間)を採用した。

2) 総菌数及びグラム陰性菌数測定での菌数評価  
EN14569:2004での総菌数及びグラム陰性菌数の算出には以下の計算式を適用している<sup>1)</sup>。

$$\text{菌数} = \Sigma c / \nu \cdot [n_1 + (0.1 \cdot n_2) \cdot d] \cdots (2)$$

ここで、

$\Sigma c$ : 連続した希釈液から得られる菌数の合計

$\nu$ : 菌液の塗布量

$n_1$ : 連続した希釈の最初に使用したシャーレ数

$n_2$ : 連続した希釈の次に使用したシャーレ数

$d$ : 希釈率

である。

この式を用いて求めた結果例を Table 3 に示した。一般に平板混釈・塗抹法による微生物数の計測では、希釈液の菌数が30~300個の範囲であるものを基に算出する方法<sup>1)</sup>が採用されているが、(2)式に示すように、EN14569の算出方法では希釈操作段階の中の連続したステップでの希釈液から生じたコロニー数を計測することになる。こ

の場合、連続した希釈液の最初の希釈液から生じたコロニー数が300個以上になる場合があり、正確に計測できないことが難点であった。

したがって、本稿では、菌数評価は、希釈液の菌数が30~300個の範囲であるものを基に算出する方法を採用した。

## 2. エンドトキシン定量の検討

### 1) エンドトキシン測定方法

EN14569:2004でのエンドトキシン測定方法では、菌液のエンドトキシン希釈に使用するエンドトキシンプリーの蒸留水65 $\mu$ l、菌液30 $\mu$ l、ライセート試薬30 $\mu$ lの混合液系で、菌液の希釈及びゲル化の反応を96穴のマイクロプレートを用いて判定している。実際に、この操作条件ではゲル化の発現判定が難しく、エンドトキシン定量法としての採用が難しい。そこで、上記の操作条件を測定に使用する蒸留水、菌液及びライセート試薬の量を3倍とし、菌液(エンドトキシン)の希釈に96穴のマイクロプレートを用い、ゲル化の反応は250°Cで2時間乾熱滅菌した試験管(12.5×75mm)を用いることとして、測定条件の改良を行ったところ、この系でゲル化の反応を識別できることが判明した。

以下、エンドトキシンの定量には上記の条件を採用した。

## 2) LAL (ライセート) 試薬の感度

ライセート試薬には3種類の感度があり、0.125, 0.06及び0.03EU/mlである。そこで、どの感度のライセート試薬を使用すればよいのかを検討した。

感度0.125と0.03EU/mlのライセート試薬を用いて比較した。

ライセート試薬の感度を比較した結果、鶏肉ミンチ(総菌数:  $4.4 \times 10^4$ 個/g, グラム陰性菌数:  $2.03 \times 10^4$ 個/g)の場合、ライセート感度0.125EU/mlでのエンドトキシン量は3.95EU/g, 感度0.03EU/mlでは3EU/gであった。

豚肉ミンチ(総菌数:  $9.9 \times 10^5$ 個/g, グラム陰性菌数:  $5.1 \times 10^5$ 個/g)の場合、グラム陰性菌数は鶏肉ミンチよりも多く、感度0.125EU/mlでのエンドトキシン量は39.5EU/g, 感度0.03EU/mlでは30EU/gであった。グラム陰性菌数の少ない試料でエンドトキシンを定量(ゲル化反応を見る場合)するには、感度の高いライセート試薬の方が適していたので、感度0.03EU/mlのライセート試薬を採用した。

## 3. 測定試料の検討

菌数測定及び菌数評価条件が確立できたため、

測定試料の検討を行った。LAL/GNB法を用いて照射の有無を検知する実験試料としては、生きたグラム陰性菌が存在することが必須である。そこで、まず、市販されている鶏肉の総菌数及びグラム陰性菌数を測定した。その結果、Table 4の線量0 kGyの欄に示すように、総菌数は $10^4 \sim 10^6$ 個/g, グラム陰性菌数は $10^4 \sim 10^6$ 個/gであり、グラム陰性菌の総菌数に対する含有率は15~55%であった。ミンチ肉の場合は採取場所に関係なくほぼ同じ菌数であった。

市販鶏肉の中には凍結・解凍処理されたものがあるので、この処理が行われていない肉を購入し、 $-20^\circ\text{C}$ で1日間冷凍した。これを用いて冷凍前後での菌数の変化を調べた結果、凍結による総菌数及びグラム陰性菌の含有率には著しい差が認められず、凍結による菌数への影響はないことが確認された。

一方、豚肉ミンチの場合にも、Table 5の線量0 kGyの欄に示すように、総菌数は $10^5 \sim 10^7$ 個/g, グラム陰性菌数は $10^5 \sim 10^7$ 個/gであり、グラム陰性菌の総菌数に対する含有率は50~90%であった。

また、牛肉ミンチ(牛100%)の場合にも同じようにTable 6に示すように、総菌数は $10^4 \sim 10^5$ 個/g, グラム陰性菌数は $10^3 \sim 10^5$ 個/gであり、グラム陰性菌の総菌数に対する含有率は低く、

Table 4. TBC, GNBC and endotoxin levels in unirradiated or irradiated minced chicken

Sample	Irradiation dose (kGy)	TBC (CFU/g)	GNBC (CFU/g)	Endotoxin (EU/g)	$\log_{10}$ (GNBC) (a)	$\log_{10}$ (EU) (b)	A (b-a)	Sign +, - or -
C1	0	$1.67 \times 10^4$	$3.7 \times 10^4$	9.5	4.57	0.98	-3.59	-
	2.5	$2 \times 10^3$	0	9.5	$\log_{10}(0)$	0.98	0.98	+
	5	$1.5 \times 10^3$	0	9.5	$\log_{10}(0)$	0.98	0.98	+
C2	0	$2.42 \times 10^4$	$1.12 \times 10^4$	3000	6.05	3.48	-2.57	-
	2.5	$2.7 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	950	2.3	2.98	0.68	+
	5	$1.35 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	300	2	2.48	0.48	+
C3	0	$3.8 \times 10^4$	$1.01 \times 10^4$	3000	6	3.48	-2.52	-
	2.5	$2.15 \times 10^3$	$1.5 \times 10^3$	300	2.18	2.48	0.3	+
	5	$2.45 \times 10^3$	0	300	$\log_{10}(0)$	2.48	2.48	+
C4	0	$4.45 \times 10^4$	$6.95 \times 10^4$	3	4.84	0.48	-4.36	-
	2.5	$2 \times 10^3$	0	3	$\log_{10}(0)$	0.48	0.48	+
	5	$3 \times 10^3$	0	0.95	$\log_{10}(0)$	-0.02	-0.02	-
C5	0	$1.36 \times 10^4$	$4.1 \times 10^4$	0.95	4.61	-0.02	-4.63	-
	2.5	$3.5 \times 10^3$	0	0.95	$\log_{10}(0)$	-0.02	-0.02	-
	5	0	0	0.95	$\log_{10}(0)$	-0.02	-0.02	-

$\log_{10}(0)=0$

TBC: Total bacteria count, GNBC: Gram negative bacteria count

A:  $\log_{10}(\text{EU}) - \log_{10}(\text{GNBC})$

Table 5. TBC, GNBC and endotoxin levels in unirradiated or irradiated minced pork

Sample	Irradiation dose (kGy)	TBC (CFU/g)	GNBC (CFU/g)	Endotoxin (EU/g)	$\log_{10}$ (GNBC) (a)	$\log_{10}$ (EU) (b)	A (b-a)	Sign	
								+	- or -
P1	0	$1.24 \times 10^7$	$1.33 \times 10^7$	9500	7.12	3.98	-3.14	-	-
	2.5	$1.14 \times 10^7$	0	9500	$\log_{10}(0)$	3.98	3.98	+	+
	5	$6 \times 10^7$	0	3000	$\log_{10}(0)$	3.48	3.48	+	+
P2	0	$1.95 \times 10^7$	$2.03 \times 10^7$	9500	7.31	3.98	-3.33	-	-
	2.5	$2.03 \times 10^7$	$5 \times 10^7$	950	1.7	2.98	1.28	+	+
	5	$3.9 \times 10^7$	0	950	$\log_{10}(0)$	2.98	2.98	+	+
P3	0	$6.75 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	9.5	5.6	0.98	-4.62	-	-
	2.5	$1.8 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	30	1.7	1.48	-0.22	-	-
	5	$2.5 \times 10^5$	0	9.5	$\log_{10}(0)$	0.98	0.98	+	+
P4	0	$4.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	30	5.3	1.48	-3.82	-	-
	2.5	$6 \times 10^7$	0	30	$\log_{10}(0)$	1.48	1.48	+	+
	5	$2 \times 10^7$	0	30	$\log_{10}(0)$	1.48	1.48	+	+

 $\log_{10}(0)=0$ 

TBC : Total bacteria count, GNBC : Gram negative bacteria count

A :  $\log_{10}(EU) - \log_{10}(GNBC)$ 

Table 6. TBC, GNBC and endotoxin levels in unirradiated or irradiated minced beef

Sample	Irradiation dose (kGy)	TBC (CFU/g)	GNBC (CFU/g)	Endotoxin (EU/g)	$\log_{10}$ (GNBC) (a)	$\log_{10}$ (EU) (b)	A (b-a)	Sign	
								+	- or -
B1	0	$5.7 \times 10^3$	$2.55 \times 10^3$	3	5.41	0.48	-4.93	-	-
	2.5	$2.0 \times 10^3$	0	3	$\log_{10}(0)$	0.48	0.48	+	+
	5	0	0	3	$\log_{10}(0)$	0.48	0.48	+	+
B2	0	$1.97 \times 10^4$	$6.55 \times 10^3$	0.3	3.82	-0.52	-4.34	-	-
	2.5	$5 \times 10^4$	0	0.3	$\log_{10}(0)$	-0.52	-0.52	-	-
	5	0	0	0.3	$\log_{10}(0)$	-0.52	-0.52	-	-
B3	0	$1.54 \times 10^5$	$3.2 \times 10^5$	3	4.51	0.48	-4.03	-	-
	2.5	$3.0 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	3	2	0.48	-1.52	-	-
	5	0	0	3	$\log_{10}(0)$	0.48	0.48	+	+
B4*	0	$1.07 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	9.5	5.08	0.98	-4.1	-	-
	2.5	$3.1 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	9.5	2.54	0.98	-1.56	-	-
	5	$9.5 \times 10^5$	0	9.5	$\log_{10}(0)$	0.98	0.98	+	+

 $\log_{10}(0)=0$ 

\* : Beef : Pork = 70 : 30

TBC : Total bacteria count, GNBC : Gram negative bacteria count

A :  $\log_{10}(EU) - \log_{10}(GNBC)$ 

20~45%であった。更に、同 Table 中の \* 印試料に示すように、牛豚合びきミンチ肉の場合にもグラム陰性菌が存在した。

#### 4. 照射による総菌数、グラム陰性菌数及びエンドトキシン量への影響

先の Table 4 には、鶏肉ミンチ試料を用いて照射条件を未照射、2.5kGy 及び 5kGy と変えた場合の総菌数、グラム陰性菌数及びエンドトキシンの測定値を列記したが、これらの結果から、総菌数及びグラム陰性菌数は照射線量に依存して減少し、特にグラム陰性菌は殆ど死滅することが分かった。

一方、エンドトキシン量については、照射して

も変わらない場合と減少する場合とがあることが分かった。特に、Table 6 に示したように、牛肉ではエンドトキシン量（グラム陰性菌数）の少ない試料では変わらないが、エンドトキシン量（グラム陰性菌数）の多い試料では減少する傾向が認められた。この傾向は Table 4 と 5 に示した鶏肉や豚肉でも観察された。照射によるエンドトキシン量の減少は総菌数やグラム陰性菌数の減少に比べて少なかった。

#### 5. 検知法としての照射有無の判定基準

LAL/GNB 法での照射有無の判定は A 値によって行われている。鶏肉、豚肉及び牛肉のミンチ肉を試料として照射有無の判定を Table 4~6 の各

Sign 欄にまとめた。これらの Table において A 値が+ (正の値) の場合は照射されたものと判定できる。A 値が- (負の値) の場合には 2 通りの判定基準があり、総菌数及びグラム陰性菌数を加味して評価する必要がある。総菌数やグラム陰性菌数が $10^3$ 個/g以上で A 値が- の場合は、照射されていないと判定できる。

一方、総菌数やグラム陰性菌数が $10^3$ 個/g 以下 (あるいはグラム陰性菌数が検出されない場合) で A 値が- の場合は、照射された可能性が高いと判定できた (Table 4 から Table 6 で A 値の符号が- を示した試料)。

## 6. 香辛料への適用

未照射香辛料について総菌数、芽胞菌数及びグラム陰性菌数を測定した結果を Table 7 に示したが、香辛料ではグラム陰性菌は検出されず、検出された菌の殆どが芽胞形成菌であった。本実験に使用した香辛料のように、グラム陰性菌が検出されない試料では、この LAL/GNB 法を検知法として適用することができなかった。

## 考 察

### 1. 総菌数及びグラム陰性菌数の測定

LAL/GNB 法 (EN14569:2004) での総菌数及びグラム陰性菌数測定に採用されている培養温度 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、培養期間 $24 \pm 1$ 時間の条件は、本実験結果から考えると適切ではないと思われる。

特に培養温度が $21^\circ\text{C}$ 、培養期間24時間でのグラム陰性菌数は同温度で72時間培養したときの菌数の数パーセントであり、培養温度 $30^\circ\text{C}$ で培

養期間72時間の培養条件がグラム陰性菌数の評価に必要と考えられる。その一つの理由として、培養温度及び培養期間の相違は試料に付着しているマイクロフローラの相違に基づくと推察される。結果として、培養条件を培養温度 $30^\circ\text{C}$ 、培養期間72時間に変更することが望ましく、また、菌数の計測・算出方法もコロニー数30~300個を基に評価する方がより適切であると考えられる。

### 2. エンドトキシン測定<sup>4)</sup>

LAL/GNB 法 (EN14569:2004) でのエンドトキシン測定では、試料液及びライセート試薬 $30 \mu\text{l}$ 及び希釈液 $65 \mu\text{l}$ の系でマイクロプレートで試料の希釈とゲル化の反応を行っているが、ゲル化の判定が非常に難しい。ゲル化の判定を確実なものにするためには、上記の反応系の3倍量を用いる系を採用し、試験管を用いてゲル化の反応を行うことによって、ゲル化の判定を容易に識別できることが判明した。

### 3. 検知法としての照射有無の判定基準

LAL/GNB 法 (EN14569:2004) での照射有無の判定には、緒言に記載した3通りの判定基準がある。

これに対して、鶏肉、豚肉及び牛肉を用いて本実験で得られた A 値から照射有無の判定を考察すると、判定①に相当する照射されていた場合は、Table 4~6 に示した Sign 欄の A 値において、+を示す場合と-を示す場合とがあった。特に-を示す場合には総菌数及びグラム陰性菌数を考慮して判定する必要があった。グラム陰性菌数が $10^3$ 個/g以下の場合やグラム陰性菌が検出され

Table 7. Levels of TBC, SFBC and GNBC in unirradiated spices

Spices	TBC	SFBC		GNBC
	(CFU/g)	(CFU/g)	(%)	(CFU/g)
Turmeric	$2.51 \times 10^7$	$2.39 \times 10^7$	(95.2)	0
Sage	$6.85 \times 10^6$	$4.1 \times 10^6$	(59.9)	0
Allspice	$1.35 \times 10^8$	$7.45 \times 10^7$	(55.2)	0
Oregano	$9.75 \times 10^2$	$9.5 \times 10^2$	(97.4)	0
Oregano	$1.1 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	(100)	0
Oregano	$1.045 \times 10^4$	$1.15 \times 10^4$	(110)	0

TBC : Total bacteria counts

SFBC : Spore forming bacteria counts

GNBC : Gram negative bacteria counts



Table 8. Summary of judgments obtained from experimental results

Sign	Criterion	Judgment
+	A value is positive	Irradiated
-	A value is negative TBC and GNBC are more than $10^3$ CFU	Unirradiated
-	A value is negative TBC and GNBC are less than $10^2$ CFU GNBC is not detected	Irradiated

A :  $\log_{10}(\text{EU}) - \log_{10}(\text{GNBC})$

TBC : Total bacteria count, GNBC : Gram negative bacteria count

ない（放射線抵抗性が感受性であるため）場合には、照射された可能性があると考えられた。判定②に相当する照射されていない場合にもA値が-（マイナスの値）を示し、更に総菌数及びグラム陰性菌数が $10^3$ 個/g以上の場合であった。EN 14569 : 2004の判定③に相当する照射有無の判定ができないものは、照射する前での総菌数とグラム陰性菌数が非常に少ない場合であると考えられる。

本実験結果からの判定基準を Table 8 にまとめた。EN14569 : 2004と本実験結果からの判定基準をA値に関して比較すると、A値が+の値を示せば、間違いなく照射されている可能性が大きい（両者共通）。A値が-の値の場合、EN規格では照射されていないと判定するが、-の値を示すものの中に照射されたと判定できる場合があるので、注意する必要がある。このような場合には総菌数とグラム陰性菌数を考慮して判定しなければならない。

LAL/GNB法の欠点は、他の殺菌処理によっても同様の結果が得られることがある。したがって、この方法のみで放射線照射の有無を判断することは危険であり、他の方法での検知と合わせて確認する必要がある。

牛肉ミンチ（100%）の場合、グラム陰性菌数の総菌数に対する割合が少ないので、試料の採取量を増やしてエンドトキシン測定を実施すれば、照射有無の判定が可能であると思われる。また、牛肉に比べると、鶏肉や豚肉のミンチ肉はグラム陰性菌数が同レベルでも、エンドトキシン量が多いので、鶏肉や豚肉及び牛肉でのマイクロフローラが異なると推察される。その結果、エンドトキシンとの反応性も異なると考えられるので、牛肉の

照射有無の検知は他の肉に比べ、判定し難いと思われる。

#### 4. LAL/GNB法を検知に適用する場合の条件

現在、食品照射検知のための分析方法<sup>5-12)</sup>には、物理的な方法（電子スピン磁気共鳴法、熱ルミネッセンス法、光励起ルミネッセンス法）、化学的な方法（シクロプタノン法、炭化水素法）、スクリーニング法としてDNA Comet Assay法、微生物学的方法（DEFT/ACP法及びLAL/GNB法）などが使用されている。しかし、食品照射の対象となる試料も多種多様であるので、すべての食品種にわたって網羅できるような単一の検知方法は原則的に存在しない。LAL/GNB法を用いて検知の対象となる食品照射試料としては、未照射の状態である程度のグラム陰性菌（ $10^3$ 個/g以上）が存在し、加工されても菌が生存していることが必須である。

一般にグラム陽性菌の芽胞形成菌や球菌は乾燥状態に強いが、グラム陰性菌は乾燥に弱い。

香辛料のように乾燥されたものは芽胞形成菌（芽胞の状態）が多く含まれていたが、生存したグラム陰性菌は検出されなかったので、LAL/GNB法での照射有無の検知には適用できないことが再確認された。

最後に、LAL/GNB法による検知では、エンドトキシン存在量とグラム陰性菌数の対数値の差の大きさを放射線照射の有無を判定するため、検知の対象となる試料は、未照射の状態で生きたグラム陰性菌が存在することが必須であることを再確認しておきたい。

## 文 献

- 1) EN 14569 (2004) Foodstuffs-Microbiological screening for irradiated food using LAL/GNB procedures.
- 2) Scotter L. S., Wood R. and McWeeny J.D. (1990) Evaluation of the limulus amoebocyte lysate test in conjunction with a gram negative bacterial plate count for detecting irradiation of chicken. *Radiat. Phys. Chem.*, 36, 629-638.
- 3) 森地敏樹/監修；食品微生物検査マニュアル《新版》(2002), 微生物数測定法, pp.56-70, 栄研器材株式会社
- 4) 川村邦夫, 佐々木次雄, 棚元憲一/編；新訂版 GMP 微生物試験法 (2000), エンドトキシン試験法, pp. 303-335, 講談社サイエンティフィク
- 5) EN 1786 (1996) Foodstuffs-Detection of irradiated food containing bone-Method by ESR spectroscopy.
- 6) EN 1785 (2003改定) Foodstuffs-Detection of irradiated food containing fat-Gas chromatographic/mas spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones.
- 7) EN 1784 (2003改定) Foodstuffs-Detection of irradiated food containing fat-Gas chromatographic analysis of hydrocarbones.
- 8) EN 1788 (2001) Foodstuffs-Thermoluminescence detection of irradiated food from which silicated minerals can be isolated.
- 9) EN 13751 (2002) Foodstuffs-Detection of irradiated food using photostimulated luminescence.
- 10) EN 1787 (2000) Foodstuffs-Detection of irradiated food containing cellulose by ESR spectroscopy.
- 11) EN 13783 (2002) Foodstuffs-Detection of irradiated food using Direct Epifluorescent Filter Technique/Aerobic Plate Count (DEEFT/APC) -Screening method.
- 12) 関口正之 (2006) 照射食品の管理と検知技術, 2006年日本食品照射研究協議会学術講演会要旨集, pp.7-14.