

200837042A

厚生労働科学研究費補助金

食の安心・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20年度 総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者

国立医薬品食品衛生研究所

宮原 誠

平成21年（2009年）4月

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20年度 総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者

国立医薬品食品衛生研究所

宮原 誠

平成21年（2009年）年4月

目次

I 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	4
研究代表者 宮原 誠 国立医薬品食品衛生研究所	
II 分担研究年度終了報告書	
1 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	11
研究分担者 武川哲也 原子燃料工業株式会社	
2 放射線照射検知の微生物学的検知法に関する研究	31
研究協力者 越川富比古 社団法人 日本アイソトープ協会	
3 各種香辛料の吸収線量による発光極大温度及びTLC比の変化と検知結果	62
研究分担者 棚瀬 正和 (財)放射線利用振興協会	
4 香辛料の二次加工品及び乾燥野菜並びに生鮮野菜等をもちいる放射線照射食品の検知法(TL法)の実用性検証研究	88
研究協力者 佐藤信彦、竹叢史紀、豊留敏郎	
5 香辛料、その2次加工品及び乾燥野菜、並びに生鮮野菜等を用いる放射線照射食品検知法(TL法)の実用性検証研究(2)	106
研究協力者 加藤 毅、財団法人 日本食品分析センター	
6 放射線照射食品のESR検知法(骨)の試験に関する研究	128
研究分担者 増水 章季 学校法人 君が洵学園 崇城大学	
7 放射線照射食品のESR検知法(糖)の試験に関する研究	186
研究協力者 吉田哲生 赤土雄美 原子燃料工業株式会社	
9 放射線照射食品のESR検知法(セルロース)の試験に関する研究	215
研究協力者 廣庭隆行社団法人 日本アイソトープ協会 甲賀研究所	
10 GC/MS法による照射食品中の炭化水素法並びにシクロブタン法の適用に関する検討	252
研究協力者 中澤 浩之 星薬科大学	

## 放射線照射食品の検知技術に関する研究

研究代表者 宮原 誠 国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

照射食品の検知法として、種々の食品に適用するため、微生物学的検知法、熱発光法（TL法）、ESR法（骨、糖、セルロース）GC法の検討を行った。

微生物学的な検知法について、今年度は、食品中の生菌数と放射性耐性菌との比率を指標に、複数の実験室において再現性を検討した。実験室の技量が優秀な5カ所の実験室において、本法で確定的に照射食品の検知を実施可能であることが分かった。

TL法については、既に食品安全部長通知法となり、我が国の検疫所等で利用され、外国で照射された香辛料の輸入を未然に防止することに役立っている。しかしながら、その適用範囲はヨーロッパ諸国特にドイツのそれに比べて狭いので、その拡大をはかり、同時に検出感度を下げ、1mgの分析試料から0.1mgにするなどの改善が図られた。さらに、種々の加工食品、生鮮食品にも適用が可能であることが分かった。

ESR法については、鶏、牛、ハマグリ、鯖、蛙の骨、さらにパイナップル、リンゴなどの乾燥果実の糖、並びにイチゴ、ビスタチオなどのセルロースを対象に、それらが照射されたときに生じるラジカルのESRシグナルを検出する方法を検討した。いずれの方法も、照射試料を検知可能であることがわかった。

GC法については高純度の標準品を入手する試みを行ったがいずれ目的を達しなかった。そこで、手持ちの標準品を用いて基礎的な検討を行った。HC法は放射線分解で生じる4つの炭化水素を指標にすることで検知が可能であるとの結果を得た。一方、CB法は入手可能な2つの標準品を用いて、基礎的な検討を行ったが、十分な感度が得られず、さらに検討が必要であった。ただ、これら2つの方法はカバーする範囲はほぼ同じであり、比較的感度の低いCB法の検討が必要か疑問がある。

照射食品の線量管理に関する研究は実際に食品照射を行っている北海道札幌市農協の施設で行われた。世界に類のないユニークなシステムをそのまま35年以上使用されており、線量管理の方法についての刷新を急がれてきた。線量測定の方法として、フリック線量計を採用されているが、個人差が大きいことをアラニン線量計システムに置き換える検討を行った。費用の問題をのぞくと問題なく新しい方法が適用可能であることが分かった。

## A 目的

照射食品は我が国ではジャガイモの芽止めを目的とし、コバルト60を用いて150Gyの照射が認められている。世界的な規制緩和の流れから、我が国のこの規制にかかわらず照射食品を輸出してくる事案が続いている。また、照射を認める国の数並びに食品の種類は新興国を中心に急速に増加しており、これに対処するために新たな放射線照射食品検知法が求められている。しかし、これら検知法は原理的に照射食品を検知することは可能であるが、非照射食品であることを確定できない。食品を試験したときグレーな結果を得た場合に、通常、原理の異なる試験法など、他の試験法によって確認する必要がある。このような場合を想定して、照射食品検知試験の場合も同じ食品に対して複数の検知法が用意されている。

本研究ではこのような背景のもと、照射食品の検知法として、種々の食品に適用するため、微生物学的検知法、熱発光法(TL法)、ESR法(骨、糖、セルロース)GC法の検討を行った。いずれも、試験室間の試験が行われたコーデックスの方法なので、我が国の公定法としてのバリデーションを行い、所期の結果が得れば良いとされている。

しかし、これら検知法はいわゆる定性試験法あるいは半定量試験法なので、非常に多くの試料を分析することが、国際的に求められているが、いずれの国際機関においてもその方法が確定されていない。そこで、本研究では、EUがこれら検知法を構

表1 AOACの試験法評価法(定性試験)

食品数	5
線量水準	3
検体あたりのn	5
機関数	10

築したときに用いた計画を参考に、AOAC国際ナショナルが推薦するガイドラインに従い実験を進めた。

初年度に当たる本年度において、微生物法は、コーデックス法と基本的な点についての変更はないが、検知の方法と基準に若干の変更を加えたので、実験室間の試験をおこない、ESR法とGC法については、すでに基本的な検討が済んでいるので、一試験室における繰り返し試験と測定条件の検討を行った。TL法については、対象品目の拡大を目指した。

## B 研究方法

B-1試験の計画 AOAC国際ナショナルのピアバリデーション法に準拠した。すなわち、5種の食品、3水準の線量、一水準の試料数5としている。実施機関数はAOAC法では10機関となっている。これをすべて実施するとすれば、 $5 \times 3 \times 5 \times 10 = 750$ となり、膨大な数の試料分析を行うことになり、期間並びに費用とも厚労科研の領域を超える。

そこで、各試験法の進行状況、実用線量等を勘案して表のような試験を行った。

表2 試験法と分析試料

試験法	食品の数	食品の種類	線量 k Gy	一水準あたりの試料数	試験室の数
微生物法	5	黒胡椒、白胡椒、ジンジャー、ターメリック、コリアンダー	0, 3, 5, 7	8から11	8
ESR骨	5	牛、鶏、さば、ハマグリ、カエル	0, 0.05, 0.1, 3, 5	5	1
ESR糖	5	バナナ、パイナップル、アップル、マンゴー、ココナッツ	8	5	1
ESRセルロース	5	イチゴ、ピスタチオ、パプリカ、フェネグリーク、コリアンダー	0, 4, 7	5	1
GC炭化水素	5	牛、鶏、さば、ブタ	0, 1, 2, 5	3	1
GC CB	5	鶏、マグロ、サバ、カキ	0	5	1
TL	65	香辛料(12)、乾燥野菜(34)、生野菜(10)、加工食品(8)その他1	5, 0.5, 0.15, 0	2	2

## B-2 各試験法の検討事項

①微生物学的な検知法 今年度は、食品中の生菌数と放射性耐性菌との比率を指標に、判定基準の設定並びに7機関における試験を実施した。基準設定に、放射性耐性菌 (B. メガテリウム、B. セレウス) の生菌数の対する割合を非照射試料と照射試料について調べて決定した。なお、試験室間の試験については、秦野研究所の方式により、生菌数の検査結果を用いて外れ値を外した。

②ESR法 コーデックスで定めている方法の骨、糖、セルロースのいずれの試験法についても、ESRの測定条件、乾燥条件等前処理法の検討等を行った。同時に単一試験室における繰り返し試験を行い、その再現性を確かめ、検出下限を確かめた。

③GC法 必要な標準品の合成を依頼した。炭化水素法については、原子力試験研究により、基礎的な検討がなされているので、コーデックスで定めている方法の追試を行った。11種の手持の標準品を用いて、添加回収試験と照射試料について検討をおこない、検出下限を求めた。シクロブタノン法についてはクロマトのピーク純度の向上を目指して、マス条件、GC条件の検討を行った。検出感度を向上させる目的でアルキルシクロブタノン (TCB、DCB) のほか不飽和アルキルシクロブタノン (DeCB、TeCB) について同時に検討を行った。照射された試料についても、検討を行った。

④ TL法 すでに確立されている香辛料について、監視安全課要望により必要試料量、発光ピークのS/N比の設定変更が行われたが、これに伴いそれに見合った検知が可能か検討した。新たに乾燥野菜、生野菜、香辛料の加工品について、その前処理方法を検討した。

## C 結果

①微生物学的な検知法 判定基準は9種の非照射香辛料の菌相試験から、放射性耐性菌数の生菌数に対する割合が30%以上あると照射と判定する。試験室間試験の結果を表2、3に示す。

実験者と主催者による同定判定の結果が、若干異なっていたが、高い確度で、照射を判定できた。

表3 正解率 (%) のまとめ (見直し後)

香辛料	0kGy	3kGy	5kGy	7kGy
黒胡椒	100	—	70	90.9
白胡椒	100	50	90	—
ジンジャー	100	—	60	90
ターメリック	100	—	30	50
コリアンダー	100	—	60	44.4

表4 上位5機関正解率 (%) のまとめ (見直し後)

香辛料	0kGy	3kGy	5kGy	7kGy
黒胡椒	100	—	85.7	83.3
白胡椒	100	71.4	85.7	—
ジンジャー	100	—	66.7	75
ターメリック	100	—	40	57.1
コリアンダー	100	—	85.7	80

②ESR法については表4に示す結果が得られた。

表5 ESR法の結果

試験法	乾燥条件	食品	g	幅 mT	下限値
骨	真空、P、 RT、2日	カエル	2.003	0.36	1
		サバ		0.33	1
		ハマグリ		0.54	0.003
		鶏		0.34	0.5
		牛		0.38	0.1
糖	真空、P、 RT、2日	マンゴー	2.0046	2.67	2.5mg・ kGy
		パイナップル		2.67	2.5mg・ kGy
		アップル		2.67	2.5mg・ kGy
		バナナ		2.0028	3.39
セルロース	真空、40 °C、2時間	イチゴ	2.004 6.05		1.5
		ビスタチ			1
		オ			4
		パプリカ			4
		フェネグ リーク コリアン ダー			4

\* P:5酸化リン; RT:室温

③GC法 炭化水素法については 検知に必要な炭化水素 (C14:1、C15:0、C16:2、C17:1) の添加回収試験の結果、鶏肉 (58.2-98.4%)、豚肉 (68.1-101.7%)、牛肉 (65.5-99.0%) 非照射試料中のそれらの量は鶏肉 (0.2ppm 以下)。

表6 TL総合結果①

#	分類	試料名	試料の形状等	相当A			相当B				
				照射条件 k Gy	鉱物 回収	TL比> 0.1	照射 判定	照射量 k Gy*	鉱物回 収	TL比> 0.1	照射 判定
1	香辛料	黒胡椒 WG-1	○	非照射	○	×	×	5	○	○	○
2		黒胡椒 YELLOW	○	非照射	○	×	×	5	○	○	○
3		黒胡椒 (ベトナムスペシャル)	○	非照射	○	×	×	5	○	○	○
4		白胡椒GRFEN	○	非照射	○	×	×	5	○	○	○
5		パプリカ (スペイン)	▲	非照射	○	×	×	5	○	○	○
6		フェスグリーク	○	非照射	○	×	×	5	○	○	○
7		コリアンダー (キロッコ)	○	非照射	○	×	×	5	○	○	○
8		コリアンダー (インド)	○	非照射	○	×	×	5	○	○	○
9		ジンジャーホール 雲南	○	非照射	○	×	×	5	○	○	○
10		ジンジャーホール (インド)	○	非照射	○	×	×	5	○	○	○
11		ターメリックフィンガー 中国	○	非照射	○	×	×	5	○	○	○
12		ターメリックフィンガー マドラスラージ	○	非照射	○	×	×	5	○	○	○
13	乾燥野菜等	乾燥キャベツ	○	5	×			非照射	×		不能
14		乾燥白菜	○	5	○	○	○	非照射	○	×	×
15		乾燥コーン	○	5	○	○	×	非照射	○		不能
16		乾燥味付け野菜	○	5	○	○	○	非照射	○	×	×
17		乾燥りんご	○	5	○	○	○	非照射	×		不能
18		乾燥いちご	○	5	○	○	○	非照射	○	×	×
19		乾燥梅フレーク	○	5	×			非照射	×		不能
20		乾燥味付けグリーンピース	○	5	○	○	○	非照射	○	○	○
21		乾燥豆類	○	5	×			非照射	×		不能
22		ほうれん草粉末	▲	5	○	○	○	非照射	○	×	×
23		にんじん粉末	▲	5	×			非照射	×		不能
24		かぼちゃ粉末	▲	5	×			非照射	×		不能
25		れんこん粉末	▲	5	×			非照射	×		不能
26		ごぼう粉末	▲	5	○	○	○	非照射	×		不能
27		小松菜粉末	▲	5	○	○	○	非照射	○	×	×
28		アヤムラサキ芋粉末	▲	5	×			非照射	×		不能
29		スイートコーン粉末	▲	5	×			非照射	×		不能
30		ゆず皮粉末	▲	5	×			非照射	×		不能
31		紫芋粉末	▲	5	×			非照射	×		不能
32		黒米粉末	▲	5	×			非照射	×		不能
33		乾燥ほうれん草	○	5	○	○	○	非照射	○	×	×
34		乾燥青しそ	○	5	○	○	○	非照射	○	×	×
35		乾燥ねぎ	○	5	○	○	○	非照射	○	○	○
36		乾燥大根葉	○	5	○	○	○	非照射	○	○	○
37		乾燥にら	○	5	○	○	○	非照射	○	○	○
38		乾燥キャベツ	○	5	○	○	○	非照射	○	×	×
39		乾燥人参	○	5	×			非照射	×		不能
40		乾燥ごぼう	○	5	○	○	○	非照射	○	×	×
41		乾燥大根	○	5	○	○	○	非照射	○	×	×
42		乾燥玉ねぎ	○	5	○	○	○	非照射	○	×	×
43		乾燥トマト	○	5	×			非照射	×		不能
44		乾燥南瓜	○	5	×			非照射	×	○	○
45		乾燥ゆず	○	5	○	○	○	非照射	×		不能
46		乾燥茗わさび	○	5	○	○	○	非照射	○	×	×
47	その他	マカ加工食品 (タブレット)	?	?	○	○	○	?	○	○	○

形状=○ 粉末=▲

照射 ○ 非照射×

鉱物回収&gt;1 mg ○

TL比&gt;0.1 ○

表6 TL総合結果②

#	分類	試料名	試料の形状等	相当A				相当B			
				照射条件 k Gy	放射線 照射	TL比> 0.1	照射 判定	検量 k Gy*	放射線 照射	TL比> 0.1	照射 判定
48	生鮮野菜等	しいたけ	○試料調製した	0.5	×			0.125	○	○	○
49		しょうが	○試料調製した	0.5	○	○	○	0.125	○	○	○
50		大根	○試料調製した	0.5	○	○	○	0.125	○	×	×
51		玉ねぎ	○試料調製した	0.5	○	○	○	0.125	○	○	○
52		長ねぎ	○試料調製した	0.5	○	○	○	0.125	○	○	○
53		ほうれんそう	○試料調製した	0.5	○	○	○	0.125	○	○	○
54		レタス	○試料調製した	0.5	○	○	○	0.125	○	×	×
55		レンコン	○試料調製した	0.5	○	○	○	0.125	○	○	○
56		小ねぎ	○試料調製した	0.5	○	○	○	0.125	○	○	○
57		ジャガイモ(生観)	○試料調製した	0.15	○	○	○	0.04- 0.05	○	○	○
58	加工食品	ハンジロドレッシング	液状	非照射	○	×	×	分相外			
		バジロドレッシング	液状	5	○	○	○				
59		焼肉のたれ	液状	非照射	×						
		焼肉のたれ	液状	5	×						
60		コチジャン	半固形	非照射	○	×	×				
		コチジャン	半固形	5	○	○	○				
61		おろしニンニク	半固形	非照射	○	×	×				
		おろしニンニク	半固形	5	○	○	○				
62		ホットチリソース	液状					非照射	×		
		ホットチリソース	液状					5	×		
63		イエローカレーペースト	半固形					非照射	○	×	×
		イエローカレーペースト	半固形					5	○	○	○
64		キムチの素	液状					非照射	○	×	×
		キムチの素	液状					5	○	○	○
65		カレー粉	▲					非照射	○	×	×
		カレー粉	▲					5	○	○	○

粉状=○ 粉末=▲

照射 ○ 非照射×

放射線照射1 mg ○

TL比&gt;0.1 ○



豚肉 (0.2ppm 以下)、牛肉 (0.1ppm 以下)、各食品における検出下限は 1.5kGy から 2 k Gy 程度。

④シクロブタノン法 イオン化電圧調整、ガスクロ条件の調整を行い、標準品の分析では安定した結果を与えた。しかし、ウナギ、サケ、ブタ油での添加回収試験の結果、0.02ppm 添加 (100 ~ 146%)、0.2ppm 添加 (110 ~ 183%)、2ppm (113 ~ 187%) と大きな与えており、さらに検討が必要であった。この条件で照射試料について、検知に必要な最低線量で予備的に検知を試みたところ、豚、マグロで CB が 0.1 ~ 0.05ppm、程度の下限值とすると、それぞれ 0.75ppm と 0.15ppm 生成する TeCB を指標に用いると検知が可能であるとの示唆を得た。サバとカキについては検出下限は DCB で 0.05ppm 程度で、それぞれの生成量は 0.06ppm、0.1ppm でようやく検出できる程度であった。

⑤ TL 法 表 6 に結果を示す。香辛料 12 種類については鉍物の抽出、TL 測定とも問題なく実施できることが確認され、乾燥野菜では粒状のものについては大部分で鉍物回収、TL 測定が可能であったが、粉末状では鉍物回収が困難なものが大部分であった。生鮮野菜については大部分のもので鉍物回収、TL 測定が可能であったが、いくつかは困難なものもあった。カレーペースト、焼肉のたれなどの加工食品についてはいかにして鉍物を回収するかの取り組みが検討され、その結果大部分のもので回収でき、TL 測定も行った結果、検知が可能なが確認できた。

## D 考察

①微生物法 このような生物学的な試験法にしては、十分な結果が出ておりスクリーニング法から確定試験法へと変わった。TL 法などの試験法で検知の難しかった白胡椒、フェネグリークなどに対応が可能となり、TL 法の死角を埋めることが可能になった。しかし、実際に実行するには技量について十分な研修が必要であろう。

② ESR 法 三つの ESR 試験法は単一実験室での結果はきわめて再現性が高く、行政試験に十分な試験法と考えられる。問題があるとすれば、

ESR 装置間の取り扱いが同じように可能か否かと感度等が同じか等の点がある。しかし、これらは基準試料を作成することで解決できる。

③ GC 法 炭化水素法には全く問題が無いので行政試験に十分な試験法と考えられる。さらに純粋な標準品が得られる見込みがあるとすれば、検出下限等の見直しが可能であろう。CB 法は入手可能な 4 つの標準品を用いて、基礎的な検討を行ったが、添加回収の結果きわめて不満足な結果となっており、GC のピーク純度が不十分である事が推察される。また、十分な感度が得られず、さらに検討が必要であった。これら 2 つの方法はカバーする範囲はほぼ同じであり、比較的感度の低い CB 法の検討が必要か疑問がある。

④ TL 法 試料量を減じても十分な感度が得られるし、S/N 比を 3 と設定することにより、検知不能な試料が減少し、通知法の完成度がさらに高まった。さらに加工品についても前処理を付け加えることにより、従来の通知法がそのままつかえることがわかり、さらに適用食品が拡大された。

## E 学会発表等

- 1) 武川哲也、越川富比古、宮原誠 (防菌防黴誌に受理) 照射食品検知のための微生物法 (熱処理法) の開発と実験室再現性について。
- 2) 越川富比古、松島昌子、廣庭隆行、武川哲也、宮原誠 (2009) 照射香辛料の生残菌の同定による照射判定の向上、防菌防黴誌、37、印刷中。
- 3) 越川富比古、松島昌子、廣庭隆行、宮原誠 (2008) 食品照射検知の LAL/GNB 法の測定条件の検討、防菌防黴誌、36、213-221。
- 4) 佐藤信彦、竹歳史紀、豊留敏郎、須永博美、棚瀬正和、宮原 誠：“市販香辛料及びその 2 次加工品、乾燥野菜等を用いる“放射線照射食品検知法 (TL 法) の実用性検証研究、第 97 回 日本食品衛生学会学術講演会、平成 21 年 5 月 14 日 (木) ~ 15 日 (金)、東京 (2009)
- 5) ○増水章季、竹下啓蔵、吉田哲生、武川哲

也 廣庭隆行宮原 誠 放射線被曝線量計としての ESR の適用について基礎的検討 第 12 回 ESR フォーラム 2008 年 7 月 5～6 日：宮崎大学医学部

6) Toshiki Masumizu, Tetsuo Yoshida, Tetsuya Takekawa, Masahito Okano, Hideyuki Hara, Takayuki Hironiwa, Makoto Miyahara

On the Use of ESR (Electron Spin Resonance) Spectroscopy Method for Detection of Irradiated Foods Joint Conference of the 13th In Vivo ESR/EPR Spectroscopy & Imaging and the 10th International EPR Spin Trapping/Spin Labeling: Biomedical Redox Navigation (EPR2008)

7) ○吉田 哲生・武川 哲也・廣庭 隆行・岡野和史・原 英之・増水 章季・宮原 誠：ESR による照射乾燥果実の検知に関する基礎的研究その 1 照射糖類の ESR シグナルについて、第 47 回電子スピンスサイエンス学会年会 (SEST2008)、2008 年 10 月 1 日 (水)～3 日 (金) 会場：九州大学医学部百年講堂

8) ○増水 章季・吉田 哲生・武川 哲也・岡野和史・原 英之・廣庭 隆行・宮原 誠、骨付き肉および魚介類の照射食品検知に関する ESR 法の研究、第 47 回電子スピンスサイエンス学会年会 (SEST2008)、2008 年 10 月 1 日 (水)～3 日 (金) 会場：九州大学医学部百年講堂

9) ○廣庭 隆行・吉田 哲生・岡野 和史・原 英之・増水 章季・宮原 誠、ESR を用いたセルロースを含む照射食品検知に関する研究 第 47 回電子スピンスサイエンス学会年会 (SEST2008)、2008 年 10 月 1 日 (水)～3 日 (金) 会場：九州大学医学部百年講堂

10) Toshiki Masumizu, Tetsuo Yoshida, Tetsuya Takekawa, Masahito Okano, Hideyuki Hara, Takayuki Hironiwa, Makoto Miyahara, On the Use of ESR (Electron Spin Resonance) Spectroscopy Method : A Step Towards The Improvement of Sensing Technique for Irradiated Foods, SFRBM's 15th Annual Meeting, November 19 - 23, 2008 · Marriott Hotel Indianapolis, Indiana USA, (Thurs -

Sat.)  
11) 増水章季、吉田哲生、武川哲也、岡野和史、原 英之、廣庭隆行、宮原 誠 放射線照射食品に対する ESR を用いた照射検知の検討：薬学会・九州支部会総会 12/6-7 (発表は 7 日)

12) T. Takekawa, T. Koshikawa, M. Miyahara, M. Furuta, S. Oda, T. Akiba, T. Mori, T. Mimura, C. Sawada, T. Yamaguchi, S. Nishioka, M. Tada Verification of the new detection method for irradiated spices based on microbial survival by collaborative blind trial, Radiation Physics 78(2009) 印刷中

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）  
分担研究年度終了報告書

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 武川 哲也 原子燃料工業株式会社

研究協力者 越川 富比古 社団法人日本アイソトープ協会

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、微生物の菌数変化、微生物の放射線耐性の違いによる菌叢の変化および熱処理の有無による放射線損傷菌と健全菌との生育の違いを組み合わせ、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検知法を開発し、8機関によるコラボ実験を行って、本検知法についての可能性を評価した。この結果、5種類の香辛料のうち、白胡椒は5kGy、黒胡椒とジンジャーは7kGy以上の照射線量については判定可能であることが分かった。また、コリアンダーは、上位5機関についてみれば判定が可能であるとの結果となり、検知スキルの向上により、判定可能と考えられた。これより、本検知法はなお改良の余地はあるが、非照射時の一般生菌数が1.0<sup>5</sup> cfu/g程度以上の一般的な香辛料について本検知法は広く適用可能であると考えられる。

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、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)。また、平成19年度には分析機関に対し、同一の試料を用いて本方法（以下、「熱処理法」という）の

有効性についての検証を行い、香辛料の種類によっては非常に有効であることを確認した。

本年度は、熱処理法に加え、より多くの香辛料に適用できることが期待される方法として、微生物の放射線耐性の違いによる菌叢の変化を開発し（「照射香辛料の生残菌の同定による照射判定の向上」の研究参照）、検知手順を策定して8試験研究機関による実験室間の再現性試験を実施した。

## 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：2008年7月1日納入
- ② 小分け・袋詰め：9月15日～9月23日
- ③ 試料への電子線照射：9月27日
- ④ 非照射試料菌数の確認：7月（結果は表1参照）
- ⑤ 各機関への説明：9月19日
- ⑥ 試験法の講習会開催：10月9日
- ⑦ 各機関へ試料配布：10月8日
- ⑧ 各機関での菌数測定および検知：10月～1月

### 2. 試料

#### 2-1 香辛料種類

香辛料種類は以下の5種類とし、小林桂樹より各10kgずつ購入した。

- ・黒胡椒
- ・白胡椒
- ・ジンジャー
- ・ターメリック
- ・コリアンダー

#### 2-2 小分け袋数

上記香辛料を各種類とも40袋ずつに

小分けした。小分け量は30g～35gの範囲におさまるよう電子天秤にて秤量し、指定のポリ袋に詰めた。

#### 2-3 照射

原子燃料工業㈱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 (白胡椒のみ3kGy, 5kGy)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、各香辛料種類毎に4袋ずつ(1機関につき1種類の香辛料は3袋)計19袋の試料が1機関分となるよう分配した。

表2に各機関配布試料番号一覧とその照射線量を示す。

#### 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	$7.2 \times 10^6$
白胡椒	$5.1 \times 10^4$
ジンジャー	$5.6 \times 10^5$
ターメリック	$6.0 \times 10^6$
コリアンダー	$4.8 \times 10^4$

研究に用いた試験法

3. 参加機関

以下の8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、日本食品衛生協会、日本食品分析センター、食品環境検査協会、日本電子照射サービス、原子燃料工業、大阪府立大学(順不同) 4.

4-1 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. 超音波洗浄器
- c. 孵卵器(温度分布精度±1.0℃以内)

表2-1 各機関配布試料番号

機関	黒胡椒	白胡椒	コリアンダー	ジンジャー	ターメリック
A	11	11	13	22	19
A	17	9	10	3	27
A	2	6	25	26	1
A	10	27	15	7	9
B	1	7	23	6	12
B	6	1	22	15	13
B	18	3	24	17	21
B	20	4	20	8	8
C	13	5	9	10	6
C	26	21	8	20	17
C	24	20	14	16	15
C	7	2	1	13	—
D	12	19	18	4	20
D	19	25	26	5	10
D	3	8	5	19	7
D	21	26	16	—	26
E	25	13	3	24	3
E	23	14	21	27	4
E	9	24	4	14	22
E	14	17	—	2	11
F	16	15	2	1	25
F	27	12	27	18	24
F	4	16	11	12	18
F	15	—	7	21	14
G	5	18	12	23	2
G	22	22	6	11	5
G	8	23	17	25	16
G	—	10	19	9	23
H	101	101	101	101	101
H	102	102	102	102	102
H	103	103	103	103	103
H	104	—	104	104	104

表2-2 試料番号照射線量一覧

非照射					中線量 (3 or 5kGy)					高線量 (5 or 7kGy)				
黒胡椒	白胡椒	コリアンダー	ジンジャー	ターメリック	黒胡椒	白胡椒	コリアンダー	ジンジャー	ターメリック	黒胡椒	白胡椒	コリアンダー	ジンジャー	ターメリック
1	3	1	3	3	2	1	5	2	1	9	6	3	1	1
3	4	2	4	7	5	2	8	5	2	10	8	4	6	3
4	9	13	8	9	6	5	9	10	4	15	11	6	7	4
8	10	15	14	10	7	7	12	13	5	17	13	7	9	8
13	12	16	16	12	11	15	21	15	6	19	14	10	11	13
18	22	17	17	15	12	17	23	19	18	20	16	11	12	18
23	24	20	18	16	14	18	24	23	19	22	19	14	22	23
24	25	22	20	21	16	20	26	25	20	26	21	18	24	24
25	27	25	21	24	21	26	27	26	25	27	23	19	27	25
101	103	104	—	101	102	102	102	103	102	103	101	101	101	103
—	—	—	—	—	—	—	—	104	104	104	—	103	102	—

d. BBLクリスタルオートリーダー及び検索ソフト等

#### 4-2 試薬等

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

b. 培地 標準寒天培地 シャーレに分注する培地の量は12~15ml程度を目安とする\*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×180mm

e. BBLクリスタル同定キット(クリスタルGPキット(グラム陽性菌用))等

#### 4-3 試験手順1 (一般生菌数)

図1の実験スキームに従って試験を実施する。

##### (1) 菌の回収

検体\*3から、10gを秤量してス

トマッカーバッグに袋詰めする作業はクリーンベンチ等を用いて無菌的に実施する。

試料10gに回収液100ml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。また、検体の種類(ターメリックホールおよびジンジャーホール)によってはストマッカーの代わりに超音波洗浄器を使用して菌を回収する(処理時間20分間)。処理後、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

菌液の原液5mlを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、0.1ml(あるいは0.5ml)の希釈液をコンラージ棒で均一に平板表面に塗抹する\*6。

#### (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。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。

### 4-4 試験手順2(加熱処理後一般生菌数)

図1の実験スキームに従って試験を実施する。

#### (1) 菌の回収

前項4.3の(1)で調整する。

#### (2) 熱処理

前項4.3の(1)で調整した5mlの試料が入った18Φ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、0.1ml(あるいは0.5ml)の希釈液をコンラージ棒で均一に平板表面に塗抹する\*6。

#### (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。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。

#### (7) 判定

熱処理前後の一般生菌数より、図2の判定フローに従って判定する。

### 4-5 試験手順3(菌の同定)

図1の実験スキームに従い同定を行う。対象試料の一般生菌数を測定した際のコロニーについて、*B.megaterium*および*B.cereus*を対象として同定を行う。なお、同定対象プレートのコロニー数は、一般生菌数測定時の各希釈段階において

適切な数（10cfu～30cfu程度）となるものを選定すること。ただし、原液においてもコロニー数が非常に少ない場合はこの限りではない。

#### (1) 菌の釣菌及び画線培養

一般生菌数のコロニーの形態、色調等を基準におおむね同一菌種と考えられるものをグループ化する。この中から同定するコロニー（主要なグループおよび上記の菌種と思われるもの）を選定する。同定するグループについては全体のコロニー数に占める割合を算出する。

釣菌する菌種は3株以下とする。一般生菌数のコロニーを釣菌し、標準寒天培地に画線後、一晚培養して菌を分離する。3枚のシャーレのコロニー数が20cfu以下の場合は、3枚のシャーレについて行う。1枚のシャーレのコロニー数が20cfu以上の場合は、3枚のシャーレのうち1枚を対象とする。

#### (2) 一般生菌数がゼロの場合の釣菌及び増菌培養

上記の3枚のシャーレのコロニー数が0cfuの場合は、たまたま採取した菌液に菌がいなかった可能性がある。このため、一般生菌数を測定した検体から余分の試料5グラムをソイビーンカゼインダイジェストブロス（SCDB）200mlで増菌培養（30℃で5日間）し、培養液をソイビーンカゼインダイジェスト寒天平板培地（あるいは標準寒天平板）で画線培養して菌を分離し同定する。

#### (3) グラム染色

分離した菌をグラム染色し、グラム染色性と菌の形態を調べる。あるいは、

位相差顕微鏡を使用する場合にはグラム染色を省略し、芽胞の存在を確認しても良い。

#### (4) 同定

BBLクリスタルを用いる場合、BBLクリスタルGPキットにマックファーランド0.4～0.6の菌濃度の菌液を接種して、37℃で20～24時間培養後、BBLクリスタルオートリーダーとそれに連動した検索ソフトで菌種を決定する。

#### (5) 判定

菌種の同定結果およびコロニーに占める割合より、表3の判定条件に従って判定する。

\*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。

表3 同定後の照射判定条件

試料名	照射判定条件
黒胡椒 インド	A
白胡椒 マレーシア	A
コリアンダー インド	A
ジンジャー インド	A
ターメリック インド	A

A: *B.megaterium*+*B.cereus* が全コロニーの30%以上を占める



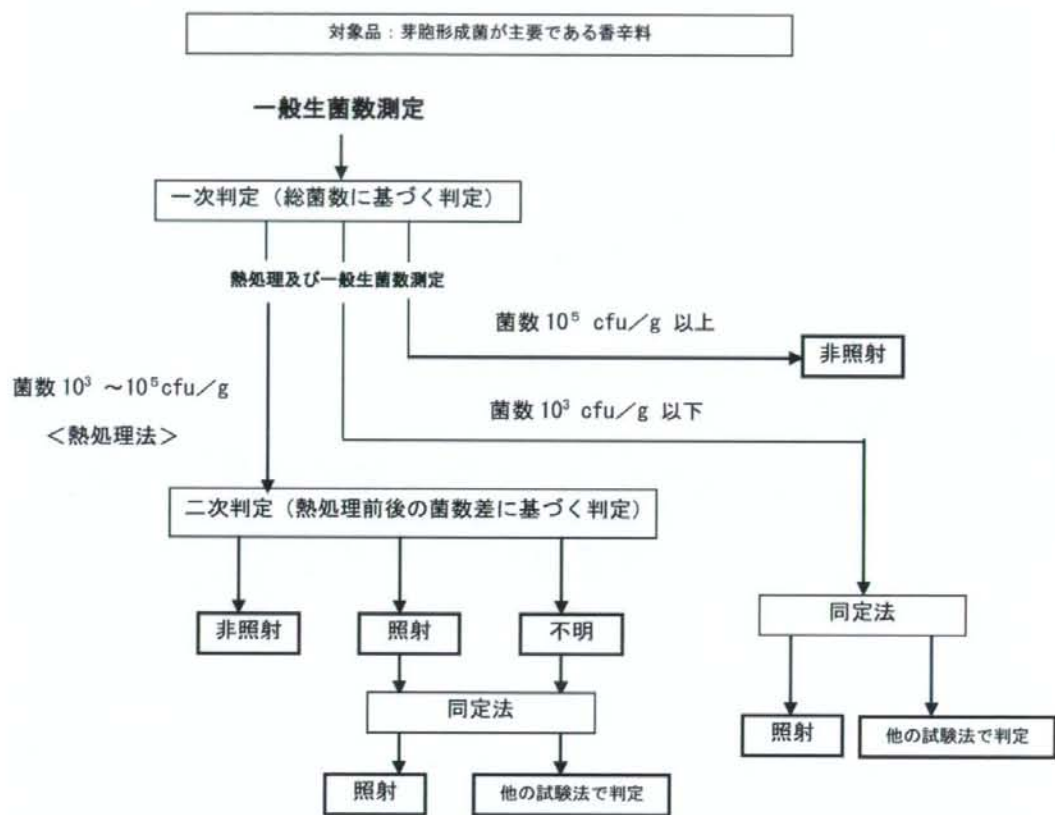
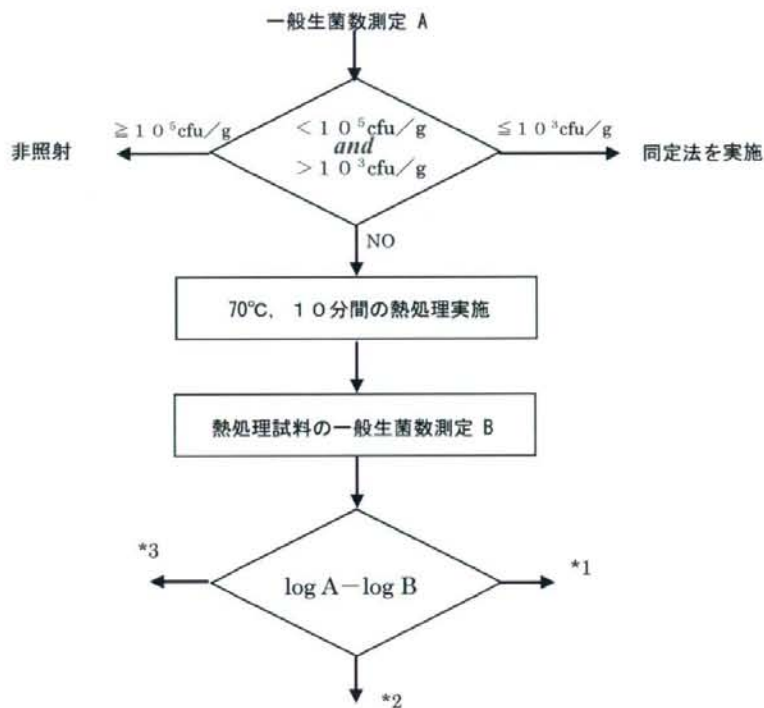


図1 実験全体スキーム



- \*1 0.1未満：照射試料の0%が存在  
非照射試料の60%が存在 } 非照射試料と判定
- \*2 0.1以上：照射試料の11%が存在  
0.3未満 非照射試料の30%が存在 } 判定不明
- \*3 0.3以上：照射試料の89%が存在  
照射試料の100%が存在  
非照射試料の10%が存在 } 照射されている可能性が高い

図2 熱処理法判定フロー

\*4 食品衛生検査指針では試料 25g に回収液 225ml で 250g 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。今回は回収液 100ml とした。

\*5 プ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、混積法は生育を阻害すると言われている。

\*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。

## 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

本試験について、どのようなデータを外れ値の対象とするかを検討したが、基本的には各線量についての一般生菌数が各検体の妥当性および試験方法の妥当性を確認するの最も適切であると考えた。他に、各菌叢の菌種別のコロニー数等があるが、あまりにも検体ごとのばらつきが大きく適切な対象ではない。

香辛料に付着する各線量別の一般生菌数の検定については、平成 19 年度の「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 6」でも行っており、

ここではコ克蘭の検定 7)、グラバス 7) の検定および独自に「平均値との比率を用いる検定」を検討した。この結果、グラバスの検定と「平均値との比率を用いる検定」を用いており、今回も対象食品の種類および線量が同じであることから同様にグラバスの検定と「平均値との比率を用いる方法」を用いた。

添付 1 の各表に香辛料別、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。

添付 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、ピンクでマークされたデータがグラバスの検定で棄却されたデータ、ブルー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。なお、これらの検定方法は以下のような手順で行った。

#### (1) グラバスの検定

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 0.05 未満および 10 以上のものは外れ値とした。

#### (3) 検定結果

グラバスの検定で外れ値となったデータはターメリックで 2 点、平均値との比率を用いた方法では、ジンジャーで 6 点、

表4 各検査機関判定結果（正解数および正解率）まとめ

検査機関	A	B	C	D	E	F	G	H	正解数	正解率 (%)	線量別平均 (%)	
照射線量	香辛料											
0kGy	黒胡椒	—	2/2	2/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	10/10	100	84.8
	白胡椒	0/2	2/2	—	0/1	1/1	1/1	1/2	1/1	6/10	60	
	ジンジャー	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	2/2	—	—	8/8	100	
	ターメリック	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	—	8/8	100	
	コリアンダー	1/3	1/2	1/1	1/1	—	1/1	1/1	1/1	7/10	70	
	白胡椒	—	1/2	2/3	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	5/10	50	50.0
5kGy	黒胡椒	2/2	0/1	1/1	2/2	1/1	0/1	0/1	1/1	7/10	70	55.8
	白胡椒	1/2	—	0/1	2/2	2/2	1/1	1/1	1/1	8/10	80	
	ジンジャー	0/1	1/1	1/2	1/2	1/1	—	2/2	0/2	6/11	54.5	
	ターメリック	1/2	—	0/1	0/1	1/1	0/2	0/2	0/2	2/11	18.2	
	コリアンダー	—	1/2	2/2	2/2	1/1	0/1	0/1	0/1	6/10	60	
	黒胡椒	2/2	0/1	0/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	9/11	81.8	65.0
7kGy	ジンジャー	2/2	—	—	—	1/2	2/2	2/2	2/2	9/10	90	
	ターメリック	0/1	1/2	1/1	1/1	1/2	0/1	0/1	1/1	5/10	50	
	コリアンダー	0/1	—	0/1	1/1	2/2	0/2	0/1	0/1	3/9	33.3	
	正解数	11/20	12/18	13/19	15/18	17/19	11/19	10/18	11/17	99/147	67.3	
	正解率 (%)	55.0	66.7	68.4	83.3	89.5	57.9	55.6	57.9	67.3		