

(ア) Kamata, Y., Saito, M., Irikura, D.,  
Yahata, Y., Ohnishi, T., BEsso, T., Inui,  
T., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y. A  
toxin isolated from *Sarcocystis feyeri* in  
raw horsemeat may be responsible for  
food poisoning. J. Food Prot. in press,  
2014

なし。

2. 実用新案取得  
なし。

3. その他  
なし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

表1 食中毒統計項目「その他」の届出の詳細と分析のための項目整理

厚生労働省へ届出のあった項目名

|            |  |
|------------|--|
| 寄生虫性       | アニサキス  |
|            | アニサキス属線虫   |
|            | クドア  |
|            | <i>Sarcocystis fayeri</i>  |
|            | 住肉胞子虫<br>(ザルコシステイス・フェアリー)  |
|            | ウェステルマン肺吸虫   |
|            | 旋尾線虫(推定)   |
| 細菌性        | カンピロバクター   |
| 毒素性        | エンテロトキシンB  |
| ウイルス・細菌複合性 | ノロウイルス、<br>病原性大腸菌O169  |
|            | ノロウイルスGⅡ・セレウス菌   |
| その他        | 大豆レクチン   |
|            | その他(備考参照)<br>病因物質3種類:カンピロバクター・コリ、サルモネラ属菌(サルモネラ・ティフィムリウム)、病原大腸菌O145 |
|            | 未記載  |

集計に用いる項目名

|      |  |
|------|--|
| 寄生虫性 | アニサキス属   |
|      | クドア  |
|      | サルコシステイス   |
|      | ウェステルマン肺吸虫   |
|      | 旋尾線虫   |
| 細菌性  | カンピロバクター   |
| 毒素性  | エンテロトキシンB  |
| その他  | ノロウイルス、<br>病原性大腸菌O169  |
|      | ノロウイルスGⅡ・セレウス菌   |
|      | 大豆レクチン   |
|      | その他(備考参照)<br>病因物質3種類:カンピロバクター・コリ、サルモネラ属菌(サルモネラ・ティフィムリウム)、病原大腸菌O145 |
| その他  | 未記載  |

表2 厚生労働省食中毒統計 事件数の推移

|      | 事件数   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|      | 2003  | 2004  | 2005  | 2006  | 2007  | 2008  | 2009  | 2010  | 2011  | 2012  |
| 総数   | 1,585 | 1,666 | 1,545 | 1,491 | 1,289 | 1,369 | 1,048 | 1,254 | 1,062 | 1,100 |
| 細菌   | 1,110 | 1,152 | 1,065 | 774   | 732   | 778   | 536   | 580   | 543   | 419   |
| ウイルス | 282   | 277   | 275   | 504   | 348   | 304   | 290   | 403   | 302   | 432   |
| 化学物質 | 8     | 12    | 14    | 15    | 10    | 27    | 13    | 9     | 12    | 15    |
| 自然毒  | 112   | 151   | 106   | 138   | 113   | 152   | 92    | 139   | 69    | 97    |
| その他  | 1     | 5     | 8     | 7     | 8     | 17    | 17    | 28    | 68    | 107   |
| 不明   | 72    | 69    | 77    | 53    | 78    | 91    | 100   | 95    | 68    | 30    |

表3 厚生労働省食中毒統計 事件数の分布率：2003-2010 および 2011-2012 に区分しての分析

|      | 事件数 (総数に対する%) |        |           |        |           |        |
|------|---------------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
|      | 2003-2012     |        | 2003-2010 |        | 2011-2012 |        |
| 総数   | 13,409        |        | 11,247    |        | 2,162     |        |
| 細菌   | 7,689         | (57.3) | 6,727     | (59.8) | 962       | (44.5) |
| ウイルス | 3,412         | (25.4) | 2,683     | (23.9) | 734       | (34)   |
| 化学物質 | 135           | (1.0)  | 108       | (1.0)  | 27        | (1.2)  |
| 自然毒  | 1,169         | (8.7)  | 1,003     | (8.9)  | 166       | (7.7)  |
| その他  | 266           | (2.9)  | 91        | (0.8)  | 175       | (8.1)  |
| 不明   | 733           | (5.5)  | 635       | (5.6)  | 98        | (4.5)  |

表4 厚生労働省食中毒統計 患者数の推移

|      | 患者数    |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|      | 2003   | 2004   | 2005   | 2006   | 2007   | 2008   | 2009   | 2010   | 2011   | 2012   |
| 総数   | 29,355 | 28,175 | 27,019 | 39,026 | 33,477 | 24,303 | 20,249 | 25,972 | 21,616 | 26,699 |
| 細菌   | 16,551 | 13,078 | 16,678 | 9,666  | 12,964 | 10,331 | 6,700  | 8,719  | 10,948 | 5,964  |
| ウイルス | 10,702 | 12,537 | 8,728  | 27,696 | 18,750 | 11,630 | 10,953 | 14,700 | 8,737  | 18,637 |
| 化学物質 | 218    | 299    | 111    | 172    | 93     | 619    | 552    | 55     | 222    | 136    |
| 自然毒  | 308    | 433    | 285    | 511    | 355    | 387    | 290    | 390    | 171    | 267    |
| その他  | 1      | 8      | 8      | 23     | 20     | 47     | 19     | 29     | 522    | 491    |
| 不明   | 1,575  | 1,820  | 1,209  | 958    | 1,295  | 1,289  | 1,735  | 2,079  | 1,016  | 1,204  |

表5 厚生労働省 食中毒統計 患者数の分布率

|      | 患者数（総数に対する％） |        |           |        |           |        |
|------|--------------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
|      | 2003-2012    |        | 2003-2010 |        | 2011-2012 |        |
| 総数   | 275,891      |        | 227,576   |        | 48,315    |        |
| 細菌   | 111,599      | (40.5) | 94,687    | (41.6) | 16,912    | (35.0) |
| ウイルス | 143,070      | (51.9) | 115,696   | (50.8) | 27,374    | (56.7) |
| 化学物質 | 2,477        | (0.9)  | 2,119     | (0.9)  | 358       | (0.7)  |
| 自然毒  | 3,397        | (1.2)  | 2,959     | (1.3)  | 438       | (0.9)  |
| その他  | 1,168        | (0.4)  | 155       | (0.1)  | 1,013     | (2.1)  |
| 不明   | 14,180       | (5.1)  | 11,960    | (5.3)  | 2,220     | (4.6)  |

表6 「その他」に分類された食中毒の原因分析

| その他の食中毒 (2003-2012) |  | 発生件数<br>累計 | 発生割合 |
|---------------------|--|------------|------|
| その他の食中毒 (2003-2012) |  | 266        | 100% |
| 寄生虫性                |  | 258        | 97%  |
|                     | アニサキス属   | 178        |      |
|                     | クドア  | 74         |      |
|                     | サルコシステイス   | 3          |      |
|                     | ウェステルマン肺吸虫   | 2          |      |
|                     | 旋尾線虫   | 1          |      |
| 細菌性                 |  | 1          | 1%   |
|                     | カンピロバクター   | 1          |      |
| 毒素性                 |  | 1          | 0%   |
|                     | エンテロトキシンB  | 1          |      |
| その他                 |  | 6          | 2%   |
|                     | ノロウイルス、<br>病原性大腸菌O169  | 1          |      |
|                     | ノロウイルスGⅡ・セレウス菌<br>大豆レクチン   | 1          |      |
|                     | その他 (備考参照)<br>病因物質3種類：カンピロバクター・<br>コリ、サルモネラ属菌 (サルモネラ・<br>ティフィムリウム)、病原大腸菌O1<br>45 | 1          |      |
|                     | 未記載  | 2          |      |

表7 「その他」に分類された食中毒の患者数割合

| その他の食中毒(2003-2012) |  |
|--------------------|--|
| 寄生虫性               |  |
|                    | アニサキス属   |
|                    | グドア  |
|                    | サルコシステイス   |
|                    | ウェステルマン肺吸虫   |
|                    | 旋尾線虫   |
| 細菌性                |  |
|                    | カンピロバクター   |
| 毒素性                |  |
|                    | エンテロトキシンB  |
| その他                |  |
|                    | ノロウイルス、<br>病原性大腸菌O169  |
|                    | ノロウイルスGⅡ・セレウス菌   |
|                    | 大豆レクチン   |
|                    | その他(備考参照)<br>病因物質3種類:カンピロバク<br>ター・コリ、サルモネラ属菌(サル<br>モネラ・ティフィムリウム)、病原大<br>腸菌O145 |
|                    | 未記載  |

| 発生患者数 | 発生割合  |
|-------|-------|
| 1168  | 100%  |
| 1099  | 94.1% |
| 188   |       |
| 890   |       |
| 14    |       |
| 6     |       |
| 1     |       |
| 1     | 0.08% |
| 1     |       |
| 17    | 1.5%  |
| 17    |       |
| 51    | 4.4%  |
| 17    |       |
| 12    |       |
| 1     |       |
| 15    |       |
| 6     |       |



表8 寄生虫性食中毒の発生件数の推移

|            | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 寄生虫性       | 1    | 5    | 7    | 5    | 7    | 14   | 17   | 28   | 67   | 107  |
| アニサキス属     | 1    | 4    | 7    | 5    | 6    | 14   | 16   | 28   | 32   | 65   |
| クドア        | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 33   | 41   |
| サルコシステイス   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 2    | 1    |
| ウェステルマン肺吸虫 | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 旋尾線虫       | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    |

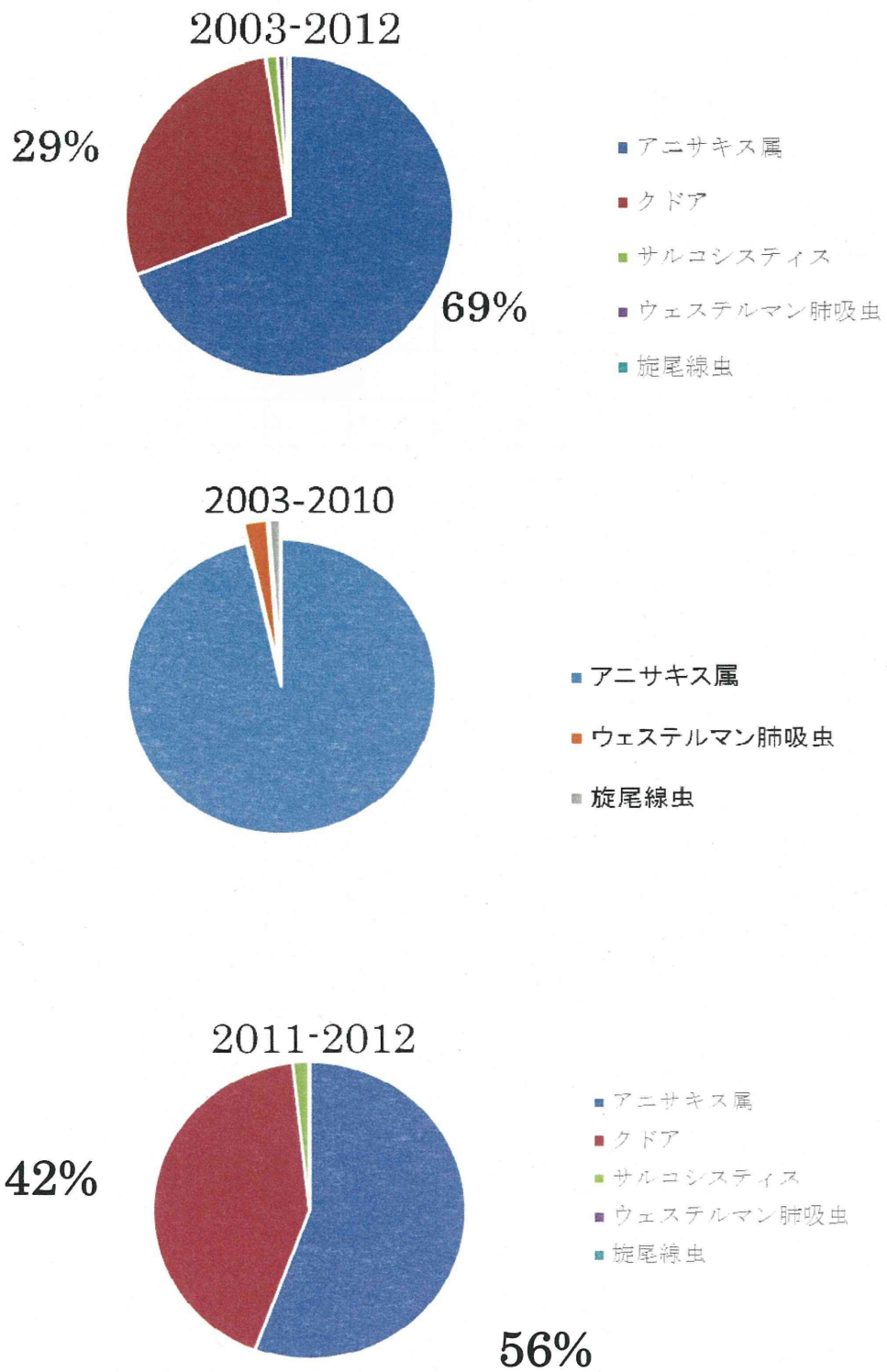


図1 寄生虫性食中毒の事件数 原因寄生虫割合：年度区分

表9 寄生虫性食中毒の患者数の推移

|            | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 寄生虫性       | 1    | 8    | 7    | 5    | 8    | 14   | 19   | 29   | 517  | 491  |
| アニサキス属     | 1    | 4    | 7    | 5    | 6    | 14   | 18   | 29   | 33   | 71   |
| クドア        | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 473  | 417  |
| サルコシステイス   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 11   | 3    |
| ウェステルマン肺吸虫 | 0    | 4    | 0    | 0    | 2    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 旋尾線虫       | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    |

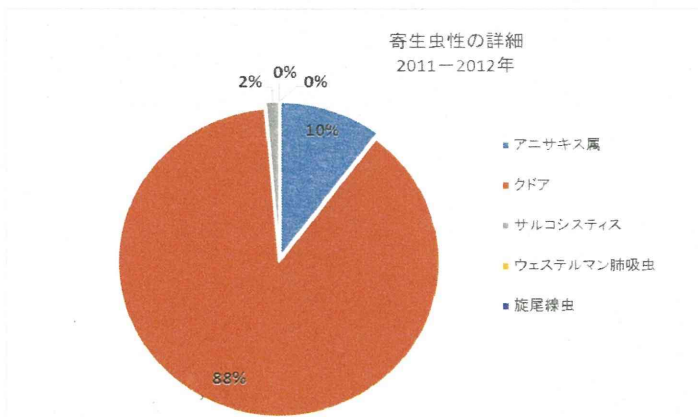
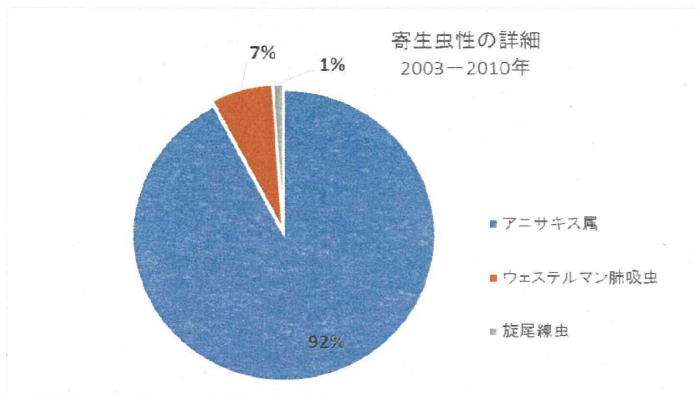
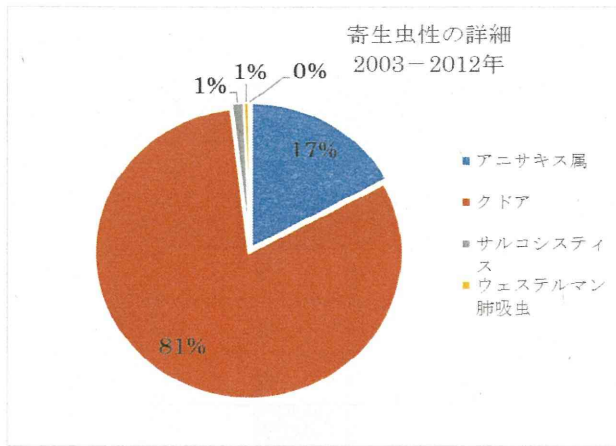


図2 寄生虫性食中毒 患者数 原因寄生虫の割合：年度区分

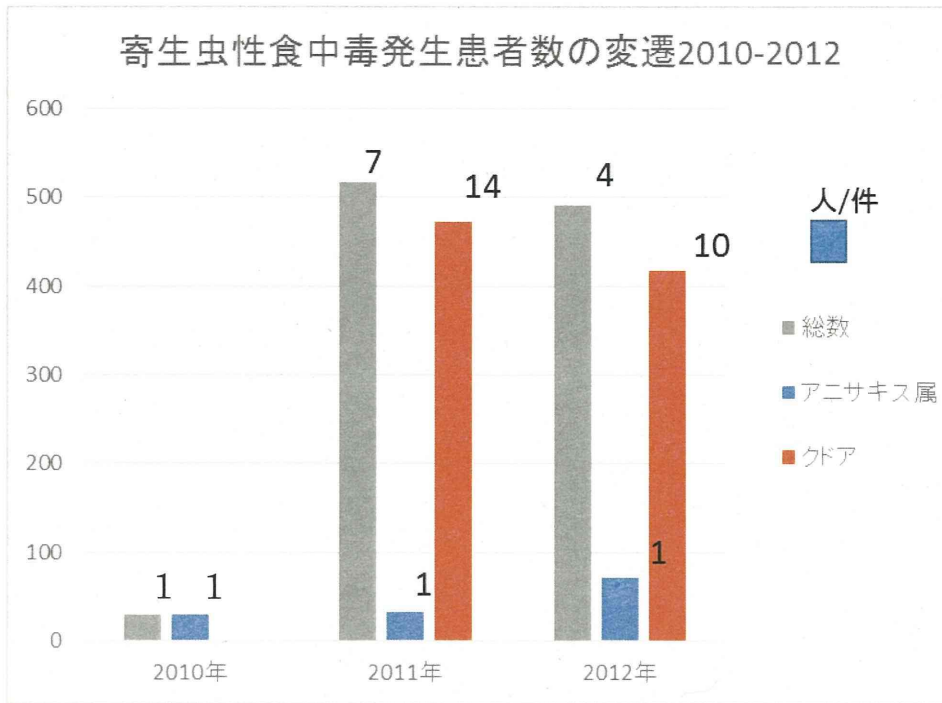


図3 寄生虫性食中毒の患者数と事件あたりの患者数：アニサキス属とクダアとの比較

分担研究報告書

分担課題名 放射線照射による微生物除去

研究分担者：等々力 節子 (独) 農研機構 食品総合研究所  
研究協力者：川崎 晋 (独) 農研機構 食品総合研究所  
研究協力者：都築和香子 (独) 農研機構 食品総合研究所

研究要旨：牛肝臓中での腸管出血性大腸菌の $\gamma$ 線照射による殺菌効果について、照射温度（冷凍・冷凍）包装条件を変えて検証を行った。牛肝臓中での *E.coli* O157 DT-66 株の  $D_{10}$  値は、冷蔵(0℃)含気条件で 0.36 kGy、脱気条件で 0.38 kGy、冷凍(-80℃)含気条件で 0.80 kGy、脱気条件で 0.96 kGy であった。また、牛肝臓を汚染する可能性のあるサルモネラについて、 $\gamma$ 線に対する菌株の感受性の違いを *Salmonella* Enteritidis および *S. Typhimurium* の複数株について検討したところ、リン酸緩衝液中の  $D_{10}$  は、*S. Enteritidis* IFO3313 株が最も大きかった。*S. Enteritidis* IFO3313 株を、牛肝臓中に接種した際の生残曲線から求めた  $D_{10}$  値は、牛挽肉中での値よりも大きく、また、この菌株の殺菌には、*E. coli* よりも高い線量が必要であった。照射による副生成物として、2-アルキルシクロブタノン類の生成を確認し、また、照射により不飽和脂肪酸のトランス異性体がわずかに増加する可能性が示された。さらに、殺菌レベルの線量の照射によって、牛肝臓中に増加する可能性のある臭気成分の探索を行い、可能性のある物質としてベンジルメルカプタン、フェニエチルアルコール、スカトールを認めた。

A. 研究目的

近年、食習慣の変化や高齢化などの社会状況の変化を反映し、わが国における細菌性あるいはウイルス性の食中毒の発生状況に変化が生じている。2011 年にはユッケを原因食材とする腸管出血性大腸菌による集団食中毒が発生し、それを契機に畜産物の生食による食中毒リスクが議論された。特に、牛肝臓については、薬事・食品衛生審議会において、牛肝臓の内部が腸管出血性大腸菌により汚染さ

れる可能性があるとともに、それらを除去する手法が見いだせないことから、牛肝臓を生食用として販売することを禁止する規格基準を設定された。この規制には解除の要望も多く、その決定の際には、今後、生食の安全性を確保する新たな知見が得られれば、必要な管理措置を改めて審議することも答申された。<sup>1)</sup>

そこで、放射線照射のような新たな微生物制御法についてもその有効性につい

での検討が必要となり、平成 24 年度より研究が開始された。

本分担当課題では、前研究課題を継続して、放射線照射による牛肝臓の殺菌条件を明らかにし、その際に生成する副産物及びその安全性を検討することを目的とする。

本年度は、牛肝臓中での腸管出血性大腸菌 O157 についての殺菌線量の決定と、 $\gamma$ 線によるサルモネラの菌数低減効果の検証を行った。また、照射による副生成物について、2-アルキルシクロブタノン類の生成や脂肪酸のトランス異性化の可能性についての検討を行うとともに、照射で変化する可能性のある臭気についても、原因物質の探索を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

微生物試験用の牛肝臓試料は、①つくば市内の精肉店より凍結状態の牛肝臓塊（約 1.0 kg）、もしくは②東京芝浦食肉処理場にて屠殺直後に凍結した牛肝臓塊（約 6.0 kg）を用いた。これらは購入後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。牛挽肉も①同様に、つくば市内の精肉店より購入し、実験に供した。試料は 25 g の塊となるよう無菌的に切り分け、各々ガスバリア性の袋に移した後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

品質評価用の牛肝臓試料は、東京芝浦食肉処理場より、屠殺した翌日または翌々日に、冷蔵状態で入手した。肝臓は入手日のうちに 100~200g 程度の塊に切り分けて、ガスバリア袋（PTS 袋、三菱ガス化学製、PB180250P 180×250mm）にいれ、含気状態で包装し、 $0^{\circ}\text{C}$ での照射

処理、あるいは、 $-80^{\circ}\text{C}$ の超低温槽での凍結処理を行った。包装後の試料は、冷蔵（ $0^{\circ}\text{C}$ ）照射では照射水中に 3 時間、凍結（ $-80^{\circ}\text{C}$ ）照射では超低温槽に一晩保管し、照射前の温度を恒温とした。

### 2. 供試菌株

供試菌は、研究機関および研究協力機関が所有する *Escherichia coli* O157 DT66 株（stx-1、2 陰性）と *Salmonella* Enteritidis (IFO3313、他牛糞便由来株 4 株) および *S. Typhimurium*(IFO12529、他牛糞便由来株 2 株)を用いた。

これらは、Trypticase Soy Broth(Difco)を用いて、 $37^{\circ}\text{C}$ 一昼夜振とう培養した後、遠心分離（4000 g、5 min）により菌体を収集、培地成分を除去した。菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、 $10^{10}$  CFU/mL となるように調整、これを供試菌液として以降の試験に用いた。

### 3. $\gamma$ 線照射

$\gamma$ 線照射はコバルト 60 線源を装填した Gamma Cell 220 (Nordion、Canada)を用いた。照射時の温度は、氷冷（ $0^{\circ}\text{C}$ ）および冷凍（ドライアイス下）（ $-80^{\circ}\text{C}$ ）の 2 条件を設定した。照射中の温度を一定に保つため、照射チャンバーと同形状の筒状型発泡スチロール箱を作成し、この中央に予冷した検体を入れ、周囲に氷（ $0^{\circ}\text{C}$ ）もしくはドライアイス（ $-80^{\circ}\text{C}$ ）を封入した。

吸収線量は試料に装着したアラニンペレット（ES200-2106：ブルッカーバイオスピン社製）の信号を ESR 装置（Bruker EMX-Plus）で測定して決定した。検量線

は英国の National Physical laboratory の標準アラニンペレットで作成した。

#### 4. サルモネラの $\gamma$ 線感受性試験

サルモネラ供試菌 8 株について菌株差の検討ならびに殺菌実験に用いる代表株を選択するため、前項のとおりで作成した供試菌液を適宜リン酸緩衝溶液で希釈し、 $10^7$  CFU/mL となるよう調整し、プラスチック試験管中で氷冷して 1 kGy の  $\gamma$  線を照射後、生菌数を求め、菌株間の生残率を比較した。

#### 5. 牛肝臓・挽肉の $\gamma$ 線殺菌試験

菌体の接種は、自然解凍後した 25g 塊の牛肝臓あるいは牛挽肉の内部に、供試菌液 100  $\mu$ L を注射針により注入することで行った。菌体濃度は終濃度で、 $10^8$  CFU/g となるように調製した。菌体接種後の試料は、直ちに、ガスバリア袋 (PTS 袋、三菱ガス化学製、PB180250P 90×120mm) を用いて含気あるいは真空包装を行った。含気条件では、ヘッドスペースに空気を残し、脱気条件では、真空包装機を用いて、袋内の空気を抜いてヒートシールした。包装後の検体は、氷中もしくは  $-80^\circ\text{C}$  の冷凍庫内で 2 時間以上放置して温度を一定にした後、冷蔵では 0~3.0 kGy、冷凍では 0~5.0 kGy の範囲の線量を照射した。照射後の検体は直ちに、もしくは解凍後直ちに、菌数計測した。

#### 6. 生菌数測定

$\gamma$  線照射後の検体は、滅菌緩衝ペプトン水 (BPW: Difco) を加えて 10 倍乳剤とし、必要に応じてその 10 倍段階希釈試料液を調製した。各 10 倍段階希釈試料液は、標準寒

天平板 (Merck) および VRBG 寒天平板 (Oxoid) にスパイラルプレーティング法で塗抹した。35 $^\circ\text{C}$  24 時間培養し、その出現集落数から 1g 当たりの一般生菌数ならびに大腸菌群数を求めた。

#### 7. 牛肝臓の脂肪酸分析

含気条件で照射した牛肝臓 (約 200g) から、約 3g の肝臓を秤量し、メタノール 50mL を加えてホモジナイザー (AM-8 型、Nissei) で 1 分間攪拌後、抽出液をろ過した。さらに残渣を 50 mL のクロロホルム / メタノール (2:1) (C/M) 溶液で 2 回抽出し、最後に 20mL の C/M 溶液で洗浄した。集めた抽出液に 0.88% KCl 溶液 93 mL を加えて分液ロト中で混和し、1 晩放置後、クロロホルム層を集め、硫酸ナトリウムで脱水した後に濃縮し、C/M 溶液で 25mL に定容した。

脂質溶液から 25mg 分の脂質を秤取り、2mg のトリデカン酸を内部標準として添加し、3 フッ化ホウ素メタノール試薬 (和光純薬 (株)) により脂肪酸をメチルエステル化し、GC で分析した。<sup>2)</sup>

< GC 条件 >

装置 : Shimadzu GC-2010

カラム : SP-2560 (100m×0.25m×0.2  $\mu$ m、SUPELCO Inc.)

カラム温度 : 175 $^\circ\text{C}$  (60min)  $\rightarrow$  1 $^\circ\text{C}/\text{min}$   $\rightarrow$  215 $^\circ\text{C}$

注入口温度 : 250 $^\circ\text{C}$

検出器温度 : 250 $^\circ\text{C}$

注入量 : 1 $\mu\text{L}$

スプリット比 : 1/100

キャリアガス流量 : 1ml/min



## 8. 2-アルキルシクロブタノン分析

牛肝臓 5g を秤量し、硫酸ナトリウム 20g を加え乳鉢中で均一に混和し、30 分放置した。これをステンレス製遠心チューブに移し、40mL のヘキサンを加え、高速ホモジナイザー(ヒスコトロン NS-52 型、マイクロテック社製)で 1 分間攪拌後、10,000 x g で 10 分間遠心し、ヘキサン画分を集めた。この抽出操作をもう一度繰り返し、集めたヘキサン溶液に硫酸ナトリウムを加えて脱水した。ヘキサン抽出液の溶媒を留去後、抽出物をアセトン 2mL に再溶解し、さらにアセトニトリル 2mL を加えて-20℃で 30 分以上冷却して脂肪分を析出させた。これを 0℃、1,680 x g で 10 分間遠心して取り除き、2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)が含まれる上清を濃縮して、2mL のヘキサンに再溶解した。この溶液を 1mL ずつ、ガラス製の 1g のシリカゲルカラム (Merck Silica gel 60 70-230 mesh) 2 本に添加し、10mL のヘキサンで洗浄後、ヘキサン/ジエチルエーテル (98:2) 15mL で溶出し、その 5-15mL 画分を集めた。<sup>3)</sup> この試料を濃縮して GC-MS で分析し、2-ドデシルシクロブタノン (2-dDCB) および 2-テトラデシルシクロブタノン (2-tDCB) を定量した。

<GC-MS 条件>

GC 装置: GC : GC-2101、

検出器 : MS : QP2010+ Shimadzu  
200℃

カラム : DB-5MS(60m × 0.25mm  
0.25μm)

カラム温度 : 55℃ (2min) → 20℃/min →  
175℃、 2℃/min → 250℃、 10℃/min  
→ 270℃(20min)

注入口 250℃

注入モード : パルスドスプリットレス

注入サンプル量 1μL

モード : EI (70eV) SIM 測定

定量イオン : m/z=98、確認イオン m/z  
=112

## 9. 臭気成分の分析

牛肝臓は、左葉部分を約 100g の塊に切り分け、ガスバリア袋 (PTS 袋、三菱ガス化学製、PB180250P 180×250mm) に入れ、含気状態のままヒートシールし、予冷の後、3 kGy (0℃)、または 6kGy (-80℃) を照射した。照射後の試料は分析に供するまで、-80℃で凍結保管した。

異臭分析は、大和製罐(株)総合研究所に依頼して実施した。具体的には解凍直後の試料(40g)を細かく刻み、純水 (300mL) とともに減圧蒸留 (55℃ 90hPa) し、留分をジエチルエーテルで抽出し、0.4mL に濃縮後、臭い嗅ぎ GC 及び GC-MS で分析した。

<臭い嗅ぎ GC 条件>

装置 : Agilent 5890A

カラム : DB-5MS(30m × 0.53mm ×  
1.0μm)

カラム温度 : 100℃ (5min) → 10℃/min →  
250℃ 注入量 : 4μL

<GC-MS 条件>

装置 : 日本電子 JMS-Q1000GC

検出器 : MS 検出器温度 : 230℃

GC : Agilent7890A

カラム：DB-5MS (30m × 0.32mm × 0.5μm)

カラム温度：50℃ (2min) → 10℃/min → 250℃

注入口温度：250℃

注入量：2 μL、パルスドスプリットレス注入

### C. 研究結果および考察

#### 1. 牛肝臓中の腸管出血性大腸菌の殺菌効果

前年度研究結果から、当研究所が保有する *E. coli* O157 の中で、DT66 株が最も  $\gamma$  線照射に対する抵抗性が高い傾向が得られていた。また、牛挽肉の既存殺菌データと比較して抵抗性が異なる結果を得たため、これを被検菌として、より詳細なデータ取得を試みた。牛肝臓および牛挽肉中において DT66 株を接種し、 $\gamma$  線照射を行った際の殺菌効果を表 1 に示した。

冷蔵・冷凍もしくは含気・真空包装いずれの試験区においても、牛肝臓における  $\gamma$  線殺菌では牛挽肉と比較して高い線量を必要とする結果となった。特に冷凍下では挽肉と比較して  $D_{10}$  値が高く算出された。また、冷蔵区と冷凍区を比較した場合、冷凍区の  $D_{10}$  値の方が高く観測された。さらに含気包装区と真空包装区においても比較したところ、殺菌のためには真空包装区の方が含気包装区と比較して高い線量が必要であった。

#### 2. サルモネラの $\gamma$ 線感受性

サルモネラ供試菌 8 株に対し、 $\gamma$  線の感受性について比較したところ、1kGy

照射後の生残率は *S. Enteritidis* IFO3313 株が供試菌株の中で最も高かった(図 1)。そこで、この株を被検菌として選択し、以降の実験に用いた。

#### 3. 牛肝臓中のサルモネラの殺菌効果

*S. Enteritidis* IFO3313 株を被検菌として、牛肝臓および牛挽肉中に接種し、 $\gamma$  線照射を行った際の  $D_{10}$  値を表 2 に示した。また、一例として、凍結真空包装下での  $\gamma$  線照射による生残曲線を図 2 に示した。表 2 で示すように、サルモネラの場合では大腸菌 O157 の結果(表 1)と比較して、より高い線量が殺菌に必要となった。また、大腸菌 O157 と同様、牛肝臓における  $\gamma$  線殺菌では牛挽肉と比較して高い線量を必要とする結果となった。しかし、サルモネラにおいては、含気包装区と真空包装区を比較しても、 $D_{10}$  値はほぼ変わらない、もしくは含気包装がやや高めに観測された。(ただし、このサルモネラの結果は 2 回の試験結果の平均値を示しており、この差が有意なものであるか誤差範囲であるのかの判断には、より詳細な追加の反復試験が必要と考える。) さらに、図 2 に示したように、 $\gamma$  線による生残曲線は大腸菌 O157 で観察されたような指数関数的な生残曲線にはならず、シグモイド型の生残曲線となった。今回、表 2 で示した  $D_{10}$  値は便宜的に指数関数的に死滅したと仮定して求めたが、いずれにせよ、牛肝臓内のサルモネラを 5 桁死滅させるには、凍結(-80℃)照射の場合でおおよそ 7kGy 前後の照射線量が必要となると考えられ、上記試験の追試ならびに、決定した目標線量に曝

露した際に、期待される程度の殺菌効果が認められるかの繰り返し確認試験を、今後行う必要がある。

#### 4. $\gamma$ 線照射による牛肝臓脂質の変化

##### 4.1 脂肪酸組成とトランス異性化

非照射および 3 kGy (0°C)、5 kGy (-80°C)で照射した牛肝臓の脂質含量はそれぞれ、 $4.83 \pm 0.06$ 、 $4.67 \pm 0.11$ 、 $4.77 \pm 0.06$  (% FW) であった。表 3 に主な構成脂肪酸の含量を、表 4 に不飽和脂肪酸の総量やトランス脂肪酸の含量をまとめた結果を示す。

この試験に用いた牛肝臓には主な構成脂肪酸として、ステアリン酸(18:0)、オレイン酸(18:1-9c)、パルミチン酸(16:0)、リノール酸(18:2-9c、12c)、アラキドン酸(20:4)などが含まれていた。また、含有量は少ないが、不飽和脂肪酸では、バクセン酸(18:1-11t)のほか 18:1-6t、18:1-8t、18:1-9t、18:1-10t、18:1-12t、18:1-13t、18:2-7t、13c、18:2-8t、12c、18:2-9c、12t、18:2-8t、13c、18:2-9c、12t、18:2-8t、13c、18:2-9t、12c、18:3-9t、12c、15c、など多種のトランス異性体が非照射及び照射のいずれの検体にも含まれていた。

3 kGy(0°C)および 5 kGy(-80°C) のガンマ線照射によって、トランス異性体が増加し、18:2 のトランス酸の総量や炭素数 18 のトランス酸の総量、炭素数 16 のトランス酸も加えた総トランス脂肪酸量については、非照射試料と比較して統計的な有意差が認められた。国際機関の推奨するトランス脂肪酸摂取量(総摂取エネルギーの 1 %未満<sup>4)</sup>、1800kcal 摂取する人のトランス脂肪酸摂

取推奨量は 2g 未満)を考慮すると、照射による牛肝臓のトランス脂肪酸量の増加は、一日のトランス脂肪酸摂取量に大きな影響を与えないと考えられる。

##### 4.2 2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)の生成

最初に、今回採用した前処理法について、肝臓からの 2-ACBs の抽出効率と再現性の検討を行った。ヘキサン溶媒での繰り返し抽出回数について、高濃度の 2-ACBs を含有する 30 kGy の照射試料を用いて検討すると、40mL ヘキサンの抽出操作を 5 回繰り返しても、3 回目以降に検出される 2-ACBs は、全体量の 3%未満であったので、繰り返し回数は 2 回とした。非照射の肝臓試料に、2-dDCB および 2-tDCB を 2 ng/g FW、スパイクして行った添加回収試験の回収率は、 $88.7 \pm 2.1$ 、および  $82.3 \pm 3.1\%$ であった。

3 kGy(0°C)及び、5kGy (-80°C) の照射試料では、標準試料の 2-ABCs の  $\pm 0.02\text{min}$  以内の保持時間に 2-ACBs の同定条件を満たす、m/z 98 および m/z 112 の面積比のピーク<sup>5)</sup>が観測され、目的とする 2-ACBs を検出することができた。表 5 に、2 種の 2-ACBs の定量結果を示す。同一線量あたりに換算した 2-dDCB 及び 2-tDCB 生成量は、0°C照射の方が、-80°Cにおける照射に比べて高かった。

放射線照射食品中の脂質の変化については、これまでも、不飽和脂肪酸のトランス異性化<sup>6)</sup>や放射線照射に特異的な分解生成物である 2-ACBs<sup>7)</sup>の生成が報告されている。本年度の研究で、殺菌レベル

の線量で照射した牛肝臓についてもこれらの化合物の変化が確認された。牛肝臓の脂質含量は 5%未満と少ないが、今後、殺菌のために想定される最大の線量範囲において、包装条件(酸素条件)や照射温度を変えた場合の生成量を明確にしておく必要がある。

#### 5. 照射牛肝臓の臭気成分の探索

牛肝臓試料から減圧蒸留により抽出した臭気成分をにおい嗅ぎ GC で分析した結果、照射試料(0°C 3 kGy、および-80°C 6 kGy) では、保持時間 8.5min 付近に硫黄系の甘い臭気を感じられたが、コントロールである非照射試料からはこの臭気は感じられなかった。この臭気の特徴から、臭気物質としてベンジルメルカプタンが、1つの候補と考えられた。

図 3 に減圧蒸留による肝臓臭気成分の GC-MS の分析結果を示す。ベンジルメルカプタンの特徴的なフラグメントイオンである、 $m/z : 91$  のマスクロマトグラムにおいて、ベンジルメルカプタン標準品の保持時間と、照射品に特有の臭気を持つピークの保持時間とが一致した。このピークの相対強度比は、非照射 : 3kGy(0°C) : 6kGy(-80°C) = 1.0 : 3.0 : 2.0 となり、照射品の中では 3kGy (0°C) の試料の方が 6kGy(-80°C) に比べて大きかった。また、 $m/z : 91$  のマスクロマトグラムにおいては、臭気化合物であるフェニルエチルアルコールと同定されるピークについても、非照射と照射試料の間にピーク強度の差が認められ、その相対強度は、非照射 : 3kGy(0°C) : 6kGy(-80°C) = 1.0 : 4.7 : 5.8 であった。さらに図 4 に

示すように、スカトールの特徴的フラグメントイオンである  $m/z 130$  のマスクロマトグラムにおいても、対応するピーク強度が、3kGy(0°C) で非照射試料の 1.8 倍、6 kGy(-80°C) で 1.4 倍に増加しており、これら 2 つの化合物も照射による臭気の変化に影響している可能性が考えられた。

ただし、ここで候補とした化合物の照射による臭気変化への寄与を明確にするためには、より定量性のある分析法を確立した上で、非照射試料におけるこれらの化合物の変動範囲と線量や照射温度に対する生成量の依存性とをさらに詳細に検討する必要がある。

#### D. 結論

牛肝臓内部に接種した腸管出血性大腸菌 O157:H7 DT-66 株の  $D_{10}$  値は、冷蔵(0°C) 含気条件で 0.36 kGy、脱気条件で 0.38 kGy、冷凍(-80°C) 含気条件で 0.80 kGy、脱気条件で 0.96 kGy であった。

また、放射線に対する抵抗性が強い菌株として *Salmonella* Enteritidis、IFO3313 を選択し、牛肝臓での  $\gamma$  線に対する殺菌効果を検討した。この菌株の殺菌には、*E.coli* DT-66 よりも大きな線量 ; 冷蔵で 3.5 kGy 前後、冷凍(-80°C) で 7 kGy 前後が必要と予測された。線量決定にはさらに、再現性を考慮した確認実験が必要である。

放射線特異的分解生成物とされる 2-ACB 類が 冷蔵、冷凍照射いずれの試料においても検出された。

脂肪酸組成について、不飽和脂肪酸の有意な減少は無かったが、照射によるトラ