

量で 2-アルキルシクロブタノン類 (2-ACBs) の生成量について、抽出法を替えて再検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

微生物試験用の牛肝臓試料は、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。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。

2-ACBs 定量用の牛肝臓試料は、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 50g 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) に入れ、含気状態または脱気状態で包装した。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、研究機関が保有する *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を用いた。

供試菌は Trypticase Soy Broth (TSB; Difco) にて  $35^{\circ}\text{C}$  一昼夜静置培養した後、遠心分離 ( $4000 \times g$ , 10 分間) により菌体を収集、培地成分を除去した。おのおの菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、 $10^9$  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. ガンマ線照射

ガンマ線照射はコバルト 60 線源を充填した 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。線量率は約 2.97 kGy/h であった。

正確な吸収線量は模擬試料に装着したアラニンペレット (ES200-2106: ブル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. 牛肝臓のガンマ線殺菌効果確認試験

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  $100 \mu\text{L}$  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 程度 (生残曲線作成用)、あるいは  $10^5$  CFU/g 程度 (殺菌効果確認用) 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、 $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫内で 2 時間以上放置して温度を一定にした後、

ガンマ線照射に供した。

生残曲線を作成するための試料は、目標線量として、冷凍下で 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 kGy の線量を照射した。また、殺菌効果確認用の試料は、冷凍条件下で、目標線量、6、7、8 kGy の 3 段階の線量を照射した。

照射後の検体は、解凍後直ちに菌数計測した。

#### 5. 生菌数測定および標的微生物の検出

ガンマ線照射後の検体は、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 平板 (Oxoid) にスパイラルプレーティング法で塗抹した。これらの平板は 35°C で各々 24 時間培養し、その出現集落数から 1 g 当たりの一般生菌数ならびに *Salmonella* 数を求めた。さらに VRBG 平板上の集落については、平板あたり 5 つの集落を選択し、これらをイムノクロマト法による *Salmonella* 同定キット (Singlepath *Salmonella*; Merck) に供し、典型集落が *Salmonella* 属であることを確認した。

別途、殺菌線量を求める実験では、目標線量 (6、7、8 kGy) を照射した後、検体に滅菌緩衝ペプトン水を加えて 10 倍乳剤とした後、35°C で一昼夜培養した。培養した菌液は標準寒天平板および VRBG 平板 (Oxoid) に一白金耳を各線し、35°C で一昼夜培養した。出現した集落は、それぞれ釣菌し、イムノクロマト法による *Salmonella* 同定キット

(Singlepath *Salmonella*; Merck) に供し、典型集落が *Salmonella* 属であることを確認した。

#### 6. 2-アルキルシクロブタノン分析

照射および非照射の牛肝臓 (約 50g) 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 2 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、4°C の冷蔵庫中で 1 晩放置後、クロロホルム層を集めた。この抽出物の溶媒を留去後、アセトニトリル 2mL に再溶解させた。これを 2 回繰り返して、アセトニトリル溶液を合わせ、-20°C で 30 分以上冷却して脂肪分を析出させた。これを 0°C、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、10 mL のヘキサンで洗浄後、ヘキサン/ジエチルエーテル (98:2) 15 mL で溶出し、その 5-15mL 画分を集めた<sup>2)</sup>。この試料を濃縮して、内部標準物質として、2-cyclohexylcyclohexanone、0.05 µg / mL を含むヘキサン 200 µL に溶解した。この試料を 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)、2-テトラデセニルシクロブタノン

(2-tDeCB)を定量した。なお、検量線は、2-ACBsの標準試料に、非照射の牛肝臓からの抽出精製物を添加したマトリックススタンダードを用いて作成した。

#### <GC-MS 条件>

GC 装置: GC : GC-2101,

検出器 : MS : QP2010+ Shimadzu  
200°C

カラム : DB-5MS(60m × 0.25mm  
0.25µm) カラム温度 : 55°C(2min)→20°C  
/min → 175°C, 2°C/min → 250°C,  
10°C/min → 270°C(20min)

注入口 250°C

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

#### 7. 電子線照射に関する予備試験

電子線照射は、(株)原子燃料工業 NFI 照射サービスに委託し、同社が保有する電子加速装置 Rhodotron (10 MeV 200 kW, IBA 社製)を用いて実施した。

10 MeV 電子の深部線量分布 (depth-dose)を確認するため、比重約 1 g/cm<sup>3</sup> 厚さ約 20 mm の板状こんにやくを模擬試料とし、4枚重ねにしたこんにやくに斜めに切り込みを入れ、テープ状の CTA フィルム線量計 (FTR-125 富士フィルム社製)をはさみ、10 MeV、12 mA の電子を照射した。片面照射時の試料厚さは 86.4mm コンベア速度は、5.71 m/min, 両面照射時の試料厚さは 81.5 mm コンベア速度は、7.61 m/min であっ

た。CTA フィルムの書く長さ方向の 280 nm における吸光度から、試料表面からの深さ方向における吸収線量 (kGy) を算定した。

殺菌効果の予備試験としては、前項と同様に 25g の肝臓試料に、10<sup>5</sup> CFU/g となるように、*Salmonella* の供試菌株を接種し、ガスバリア袋で包装して凍結 (-80°C) した試料を、発泡スチロール製の箱に入れたドライアイスの上に重ならないように並べ、両面から 10 MeV、4 mA の電子で両面照射した。コンベア速度は、目標線量 6、7、8 kGy に対し、それぞれ、13.68、11.73、10.26 kGy/m とした。肝臓試料の照射方向に対する厚みは、10 ~ 15 mm 程度であった。照射条件ごとに、ラジオクロミックフィルム線量計 (FWT-60) を試料表面に装着した常温の肝臓試料を同時に照射し、吸収線量の確認を行った。

#### C. 研究結果および考察

##### 1. 凍結した牛肝臓中での *Salmonella* の殺菌効果

25年度の実験では、*Salmonella* について凍結 (-80°C) 含気条件で 1.33、脱気条件で 1.21 kGy と得られていたが、既存論文との整合性が取れなかったため、追試を実施した。追試を実施したところ、含気条件で 1.43、脱気条件で 1.58 kGy と得られ、結果の整合性を確認した。すなわち、本条件下で *Salmonella* 菌数を 1/10<sup>5</sup> とするには含気条件で 7.2、脱気条件で 7.9 kGy が必要と推察された。ただし、これは指数関数型として殺菌されたと仮定

した場合の線量であり、シグモイド型による殺菌効果として考えた場合には上記殺菌線量は過大となる可能性も考えられた。このため、規定線量による *Salmonella* の殺菌効果確認試験を試みた。上記の検討結果から、おおよそ 6~8 kGy の照射により、*Salmonella* の菌数を  $1/10^5$  に減少させることが死滅曲線から予想されたため、約  $10^5$  CFU/g となるよう *Salmonella* を接種した検体 (n=5) を作成し、牛肝臓中の線量が 6、7、8 kGy となるような照射した場合の不活性化(5 log cfu/g 低減の可能性)について検討を行った。その結果、凍結含気包装下においては 7 kGy で、凍結脱気包装下においては 8 kGy で、5 検体中全てから *Salmonella* は非検出となった。本試験にて接種した菌数は  $3.0 \times 10^5$  CFU/g と求められており、これまで作成した死滅曲線から得られた D<sub>10</sub> 値と併せても、妥当な結果と推察された。

牛肝臓中を汚染する可能性のある食中毒起因菌としては、*E. coli* O157、*Campylobacter*、*Salmonella* を本研究では取り上げた。この中で *Salmonella* が最も放射線抵抗性であった。これまで、ユッケに代表される生食用牛肉の規格基準においては、その衛生基準として腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) を指標菌として、これが規定のサンプリング・検査法において陰性であることを規定している<sup>3)</sup>。そこで、殺菌効果の検証に腸内細菌科を想定した際、*Salmonella* より放射線抵抗性が強い腸内細菌科の細菌が存在する可能性について、文献調査を行った。Farkas<sup>4)</sup>の総説によれば、腸内細菌科細菌の放射線抵抗性は、*Yersinia*

*enterocolitica* < *Shigella* spp. < *Escherichia coli* (O157:H7 を含む) < *Salmonella* spp. の順に大きくなると報告されている。また、2014年に公表された、オーストラリア農務省の調査報告書<sup>5)</sup>に整理された細菌の放射線感受性のデータを参照に、腸内細菌科の D<sub>10</sub> 値を整理すると、*Salmonella* と並んで、*Enterobacter* sp.の放射線耐性が高かった(表3)。*Enterobacter* 属菌について、Osaili ら<sup>6)</sup>は、ブレインハートインフュージョン培地中、加水ミルクパウダー中および、乾燥ミルクパウダー中での *E. sakazakii* ATCC 51329 他5株の D<sub>10</sub> 値はそれぞれ、0.21-0.29 kGy、0.24-0.37 kGy、1.06-1.71 kGy の範囲であったと報告している。また、Lee ら<sup>7)</sup>は、TSB 中および、乾燥ミルクパウダー中での *E. sakazakii* strain ATCC 29544 の D<sub>10</sub> 値をそれぞれ、0.27 及び 0.76 kGy と報告している。細菌の放射線感受性は、同一菌株であっても、照射時の雰囲気、温度あるいは共存物等によっても修飾をうけるため、*Enterobacter* 属菌について既報の D<sub>10</sub> 値だけから、本研究で試験した *Salmonella* との比較において、牛肝臓中での放射線抵抗性について議論することは難しい。しかしながら、*E. sakazakii* についての放射線抵抗性に関する情報を考慮すると、牛肝臓中での *Enterobacter* 属菌の汚染可能性や放射線感受性について、今後さらに検討を要すると考えられる。

2. 牛肝臓のガンマ線照射による 2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)の生成

前年度の研究における 2-ACBs の定量結果では、線量依存的な 2-ACBs の生成を確認したものの、用いた分析法の添加回収率が 59%~68%と低かった。原因として、肝臓中の酵素による 2-ACBs の代謝反応が抽出中に進行する可能性が考えられた。そこで、肝臓を無水硫酸ナトリウムと混和後に高速ホモジナイザーを用いてヘキサンで抽出する方法から、硫酸ナトリウムによる脱水操作を止めてタンパク質が変性しやすいクロロホルム/メタノール溶媒を使って一気に抽出する方法に変更した。その結果、本年度用いた方法での添加回収率は、低濃度添加、2-dDCB および 2-tDCB を 3.3 ng/g FW、2-テトラデセニルシクロブタノン (2-tDeCB) を 8.1 ng/g FW で、 $96.2 \pm 5.7$ ,  $88.3 \pm 2.5$  および  $116.2 \pm 6.0\%$  (n=7) であった。また、高濃度添加として 2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB を 33 ng/g FW、33 ng/g FW、81 ng/g FW で添加した際の回収率は  $79.3 \pm 1.6$ ,  $73.5 \pm 3.1$  および  $77.4 \pm 2.1\%$  (n=7) であった。抽出方法を変更することで、回収率が向上し、回収率の標準偏差も小さくなった。

表 4 に、異なる温度包装条件で照射した際の 3 種の 2-ACBs の定量結果を示す。非照射のコントロール試料からはいずれの 2-ACBs も検出されなかった。また、同一条件での分析値を線量に対して直線回帰した傾きから、1 kGy あたりに換算した 2-ACBs の生成量を求めて表 5 にまとめた。この際の相関係数は、0.88~0.99 であった。

肝臓生重量 1g・1 kGy あたりの 2-dDCB および 2-tDCB の生成量は、2-tDCB の

含量が 2-dDCB の含量に比べて大きく、-80°C に比べて 0°C の照射の方がやや大きな値となった。一方、オレイン酸を前駆体とする 2-tDeCB は、-80°C 照射における生成量が 0°C 照射の場合に比べて著しく大きくなった。また、-80°C 照射においては、含気包装時の 2-tDeCB の生成量は脱気包装より有意に大きかった。分析方法の変更により、昨年報告値より、総じてやや高い値が得られたが、これまでの文献値にある他の畜肉での生成量<sup>9),10)</sup>に比べて著しく多量の 2-ACBs が照射牛肝臓中に生成することは無いと判断された。

#### 4. 電子線照射に関する予備試験

##### 4.1 透過力の確認

放射線照射殺菌では、コバルト 60 ガンマ線のみならず、10 MeV 以下の電子が利用されている。電子線は線量率がガンマ線に比べて著しく大きい、その透過力はガンマ線に比べて劣っている。そこで牛肝臓に対する電子線の照射効果を検討する予備試験として、10 MeV 電子照射時の深部線量分布を確認した。

図 1 に示すように厚さ 86.4 mm (比重 約  $1\text{g/cm}^3$ ) の模擬試料に線量計を設置し、上面方向から 10 MeV 電子を照射した際の、線量分布の結果から、図 2 に示すような深度-線量分布曲線を得た。この場合、試料厚さ 86.4 mm は、線量計の長さ 113.9 mm に相当する。図 2 に示すように、片面照射における電子の有効な透過厚さを、試料表面とほぼ同等の線量となる厚さと考え、試料厚さで約 36 mm が片面照射の上限厚さと考えられた。

図3に、片面照射時と同様に4枚重ねの模擬試料を両面照射した際の深度-線量分布を示す。照射した模擬試料の厚さは、81.5 mmであった。実測した、線量分布から、最大/最小線量比 (Dose Uniformity Ratio) は約1.5程度であった。また、図3に示したように中央部の線量が表面線量と同等の線量となる厚さを両面照射で透過可能な厚さであるとして、片面照射の深度線量分布のデータから両面照射において透過可能な厚さを推定すると、約85 mmであった。

#### 4.2. 殺菌効果の予備試験

前項の結果を参考に、重量 25g、厚み 10~15 mm 程度の牛肝臓の中心に  $3.1 \times 10^5$  CFU/g の *S. Enteritidis* IFO3313 株を接種して、含気、凍結状態 (-80°C) で 10 MeV 電子を両面から照射した (n=5)。目標線量 6、7、8 kGy に対して、ラジオクロミック線量計で測定した同形のダミー試料の吸収線量は、6.3、7.2、8.2 kGy (両面の平均) であった。含気条件、凍結状態 (-80°C) において 8 kGy で、5 検体中全てから *Salmonella* は増菌培養を行っても非検出となった。7 kGy では、5 検体中 3 検体が陽性であった。この結果は、上述したガンマ線における殺菌効果とは一致せず、電子線の効果の方がガンマ線に比べて、やや劣る可能性を示唆している。ガンマ線と電子線の殺菌効果については、同等とするもの<sup>11)</sup> 電子線の効率が低いとするもの<sup>12)</sup>、ガンマ線の効率が低いとするもの<sup>13)</sup> など、異なる傾向が報告されている。ただし、これらの差異は極端なものではなく、また、殺菌効率の異なる理由も線量率の違いや、照射時の環

境の影響の可能性も考察されておりガンマ線、電子線の作用が本質的に異なるとは解釈されていない。牛肝臓の電子線照射については、今後、標的菌株の生残曲線を作成しての  $D_{10}$  値の算出など、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 *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株のガンマ線殺菌を行い、 $D_{10}$  値として、凍結 (-80°C) 含気条件で 1.43、脱気条件で 1.58 kGy を得た。また、*Salmonella* を  $10^5$  CFU/g 接種した検体について、目標線量、6、7、8 kGy となるよう 3 段階の線量のガンマ線を照射した場合、含気条件では 7、脱気条件では 8 kGy で *Salmonella* が非検出となった (n=5)。

抽出法を変更して回収率を向上させた分析法により、冷凍 (0°C) 6 kGy、凍結 (-80°C) 10 kGy までの牛肝臓のガンマ線照射における、2-アルキルシクロブタノン類 (2-ACBs)、2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB の生成量を再確認した。

#### E. 文献

- 1) 厚生労働省、薬事・食品衛生審議会、食品衛生分科会 2012年6月12日、<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002fsbi.html>
- 2) Kitagawa, Y., *et al.*, A Rapid and Simple Method for the Determination of 2-Alkylcyclobutanones in Irradiated Meat and Processed Foods. *Food Analytical Methods* 7(5), 1066-1072, (2014).

- 3) 厚生労働省：生食用食肉の腸内細菌科菌群の試験法について，食安発0926第1号 平成23年9月26日
- 4) J. Farkas, C. Moha'csi-Farkas, Trends in Food Science & Technology, 22, 121-126 (2011).
- 5) Australian Department of Agriculture (2014), Gamma irradiation as a treatment to address pathogens of animal biosecurity concern, Department of Agriculture, Canberra, pp 95-96 Table9.
- 6) Osaili, T.M., *et. al.* Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula by gamma irradiation: determination of D10-value. J Food Sci 72, M85-M88 (2007).
- 7) LEE J. W. *et.al.*, Gamma Radiation Sensitivity of *Enterobacter sakazakii* in Dehydrated Powdered Infant Formula, Journal of Food Protection, Vol. 69, No. 6, 1434-1437(2006).
- 9) Ndiaye, B. *et al.*, 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs II. The CEN method: field of application and limit of utilization., Radiation Physics and Chemistry 55437-445, (1999).
- 10) Marchioni, E. *et al.*, Production Yields of 2-alkylcyclobutanones in irradiated foods. Proceedings of International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2009. [http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/41/072/41072628.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/41/072/41072628.pdf).
- 11) Tallentire, A. and Miller, A, A comparison of the microbicidal effectiveness of gamma rays and high and low energy electron radiations., Radiation Physics and Chemistry, 79, 701-704 (2010).
- 12) Kathleen, T. *et. al.* Effect of Gamma or Beta Radiation on Salmonella DT 104 in Ground Pork, Journal of Food Protection, 69(6), 1430-1433 (2006)
- 13) Qian, J. *et. al.*, Effects of gamma and electron beam irradiation on the microbial quality of steamed tofu rolls., Radiation Physics and Chemistry, 82, 119-121 (2013).
- F. 健康危機情報  
なし
- G. 研究発表  
論文発表  
なし  
講演・研修会等  
1. 川崎晋, 持田麻里, 等々力節子, 五十君静信. ガンマ線照射による牛肝臓・挽肉中での腸管出血性大腸菌の殺菌効果、第19回腸管出血性大腸菌研究会(東京), H27/7/9-10.
- H. 知的財産権の出願, 登録状況  
なし

表 1. 牛肝臓中における *S. Enteritidis* IFO3313 株のガンマ線照射による殺菌効果

-80°C	D <sub>10</sub> 値 (kGy)	
	含気	脱気
牛肝臓	1.43	1.58

表 2. 牛肝臓中において *S. Enteritidis* IFO3313 株を 3.0x10<sup>5</sup> CFU/g 接種した検体に 6, 7, 8 kGy の線量を照射した際の検出結果 (n=5)

牛肝臓	6.0kGy	7.0kGy	8.0kGy
含気	5/5	0/5	0/5
脱気	5/5	2/5	0/5



表 3. 主な腸内細菌科細菌の D10 値

細菌名	D10 値 (kGy)
<i>E coli K99</i>	0.02
<i>E coli</i>	0.04 - 0.70
<i>Enterobacter sp.</i>	0.36 - 1.5
<i>Klebsiella species</i>	0.4 - 0.45
<i>Proteus mirabilis</i>	0.24 - 0.5
<i>Proteus vulgaris</i>	0.07
<i>Salmonella anatum</i>	0.45 - 0.67
<i>Salmonella dublin</i>	0.02
<i>Salmonella Enteritidis</i>	0.25 - 0.7
<i>Salmonella Gallinarum</i>	0.13 - 0.56
<i>Salmonella Heidelberg</i>	0.33
<i>Salmonella Meleagridis</i>	0.93
<i>Salmonella Panama</i>	0.41 - 0.66
<i>Salmonella Paratyphi</i>	0.19 - 1.07
<i>Salmonella Senftenberg</i>	0.13 - 1.34
<i>Salmonella Stanley</i>	0.61 - 0.78
<i>Salmonella Typhi</i>	0.2 - 0.78
<i>Salmonella Typhimurium</i>	0.1 - 1.58
<i>Serratia marcescens</i>	0.02 - 0.1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.04 - 0.38

Australian Department of Agriculture (2014),  
 Gamma irradiation as a treatment to address pathogens of animal biosecurity  
 concern, Department of Agriculture, Canberra, pp 95-96 Table9 より作成

<http://www.agriculture.gov.au/biosecurity/risk-analysis/reviews/final-animal/ba-2014-13-gamma-irradiation>

表 4. ガンマ線照射した牛肝臓中の 2-アルキルシクロブタノン含量

照射条件	dDCB (ng/g FW)	tDeCB (ng/g FW)	tDCB (ng/g FW)
脱気包装 0 °C			
3 kGy	4.26 ± 0.33	6.34 ± 1.13	9.92 ± 0.69
6 kGy	7.67 ± 0.66	15.50 ± 0.46	20.8 ± 1.83
含気包装 0 °C			
3 kGy	4.72 ± 0.33	6.54 ± 0.09	10.2 ± 0.30
6 kGy	7.43 ± 0.16	14.9 ± 0.8	22.3 ± 0.5
脱気包装 -80 °C			
5 kGy	4.93 ± 0.25	20.1 ± 2.1	13.2 ± 1.0
10 kGy	10.1 ± 0.23	44.7 ± 1.0	30.4 ± 1.3
含気包装 -80 °C			
5 kGy	4.88 ± 0.14	21.4 ± 1.6	13.2 ± 0.2
10 kGy	10.3 ± 0.30	55.5 ± 1.6	30.7 ± 0.5
Mean ± SD (n = 3)			

表 5 2-ACBs の生成効率

(1kGy あたりの生成量)		ng / g FW / kGy		
		2-dDCB	2-tDeCB	2-tDCB
照射条件				
脱気包装	0°C	1.3	2.5	3.4
含気包装	0°C	1.3	2.4	3.7
脱気包装	-80°C	1.0	4.4	3.0
含気包装	-80°C	1.0	5.3	3.0

(先駆脂肪酸 1mmol、1kGy あたりの生成量)		nmole / mmole FA/		
		2-dDCB	2-tDeCB	2-tDCB
照射条件				
脱気包装	0°C	0.33	0.41	0.44
含気包装	0°C	0.32	0.40	0.46
脱気包装	-80°C	0.26	0.72	0.38
含気包装	-80°C	0.26	0.87	0.38

kGy

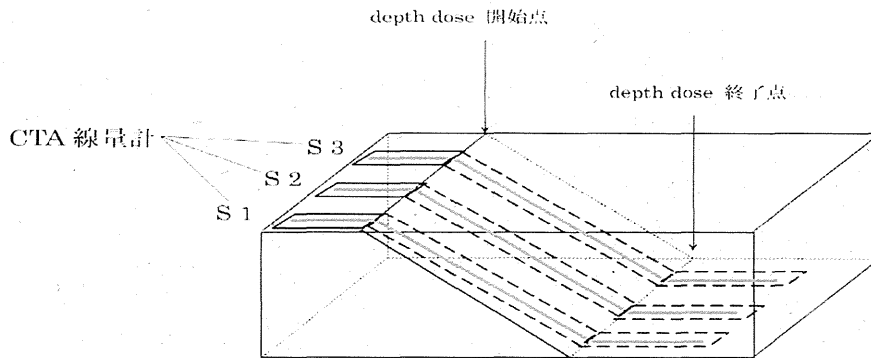


図1. 電子線片面照射時の線量計配置図

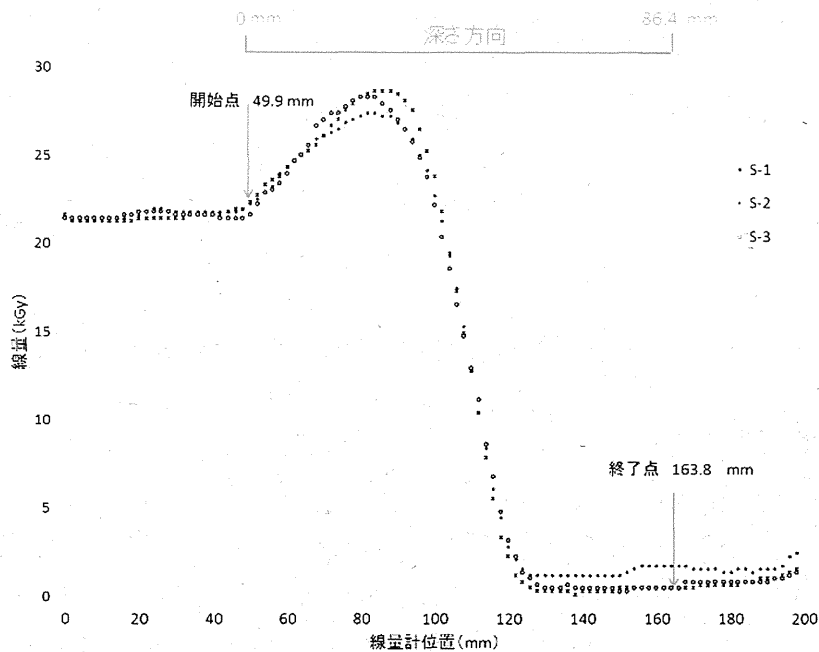


図2. 10 MeV 電子 片面照射における線量深度分布

x 軸は図1のように配置した線量計の長さ位置を表している。  
 実際の深さ距離は図中の開始点位置 (49.9 mm) を 0 mm (試料最上面)、  
 終了点位置 (163.8 mm) を 86.4 mm (試料最下面) として補正される。

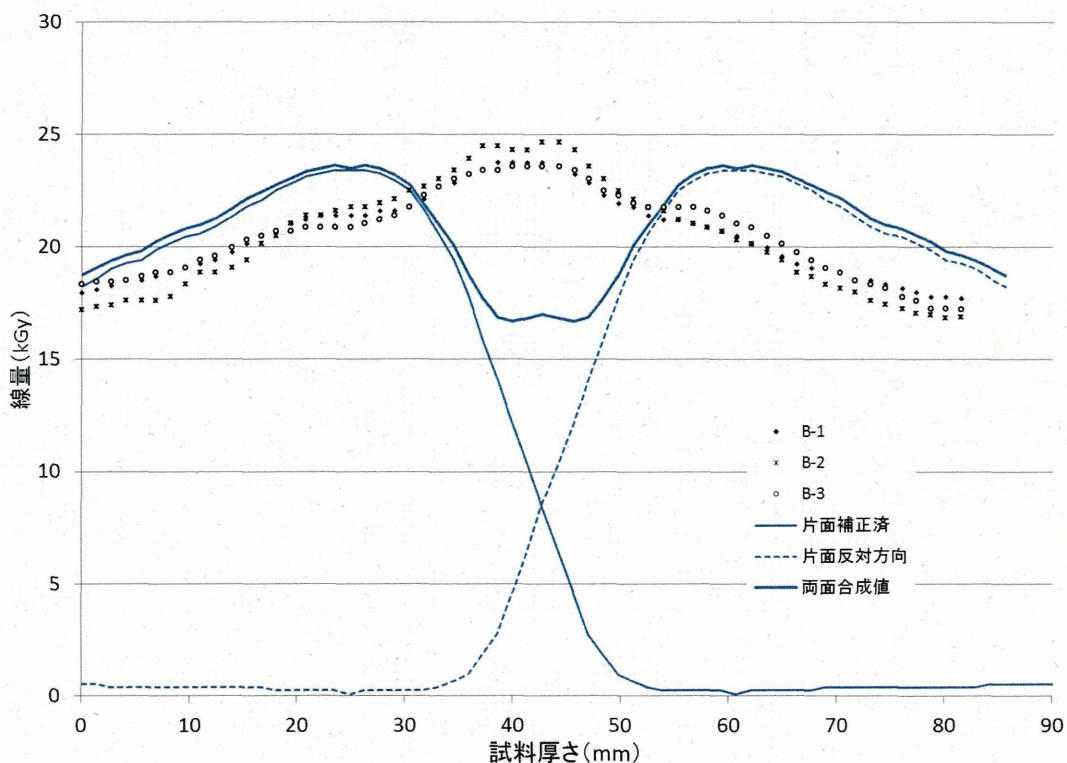


図3. 10 MeV 電子 両面照射における線量深度分布 (試料厚さ:81.5 mm)

x 軸は試料表面(照射方向に向かって最上面)からの試料厚さを表す。  
 プロットは、図1のように3本のテープ状線量計を厚さ 81.5 mmの試料に取り付け両面照射(試料の表裏を反転させて1回ずつ照射)した際の実測値  
 実線(細)は、図2で得た片面照射の深度線量分布曲線の最上面(表面)線量を両面照射時の最上面線量と同等になるように補正して描画したもの。点線はこれを反対方向から照射と仮定し、厚さ方向の座標を反転させて描画したもの。  
 実線(太)は両者を合成し、片面照射の深度分布曲線から、厚さ 85.6 mmの試料の両面照射時の線量分布をシミュレーションしたもの。

分担研究者	岡田 由美子	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	吉田 麻利江	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	鈴木 穂高	国立医薬品食品衛生研究所
分担研究者	荻原 博和	日本大学生物資源科学部

研究要旨：鶏肉の生食及び不十分な加熱状態での喫食による健康被害は、日本国内でしばしば起こっており、その防止手法の確立が求められている。本研究では、非加熱殺菌法のひとつである高圧殺菌法を用いて、鶏ササミ中の食中毒原因菌の低減について検討した。過去の報告で牛内臓の高圧処理に用いられ、有効とされた 300MPa 5 分間の処理を 6 回反復する処理により、鶏ササミに接種したサルモネラが 2~5log の低減を示し、カンピロバクターでは 7log 以上が低減し、定量法では検出限界以下となった。今回の処理条件においては、肉色は白化する傾向を示した。サルモネラにおいて、高圧処理後の発育集落数は選択分離培地と非選択培地上で異なっている場合が見られ、高圧処理により損傷菌が発生していると思われた。以上の結果から、高圧処理により鶏ササミ中の食中毒菌の菌数低減が可能であり、特にカンピロバクターに高い効果を示したが、高圧処理後の鶏肉を生食用として提供することを可能とするには、サルモネラに対する殺菌効果を高めると共に、肉質の変化を最小限にとどめうる条件の検討が必要と思われた。

#### A. 研究目的

鶏肉による食中毒は、サルモネラ及びカンピロバクターを原因菌とするものが中心となっている。市販鶏肉におけるカンピロバクターの汚染率は 2008 年の調査で 41.8%、サルモネラは 46.7% と高率であり、現在食中毒事件数で 1, 2 位を占めるカンピロバクター食中毒と、サルモネラ食中毒の発生を減らすには、それらの原因食品となることが多い鶏肉の汚染低減が重要である。しかしながらこれらの細菌は、鶏肉の表面のみならず内部にも存在していることが知られており、食鳥処理における衛生管理の向上のみでは、汚染率の低減は困難と思われる。本来これらの細菌は、加熱により死滅するものであるが、菌が内部にも存在しているため、加熱不十分な鶏肉の喫食による食中

毒事例がしばしば起こっている。更に、一部国民の生食嗜好により、鶏肉やその内臓肉を刺身やたたきとして生食または部分的な加熱のみで喫食することによる食中毒事例も多発している。鶏肉の喫食、特に生食による食中毒発生を減少させるためには、これらの病原菌に対し加熱によらない殺菌を行い、感染リスクの低減を図る必要がある。

非加熱殺菌法には、放射線、高電圧パルス、パルス光等があるが、なかでも静水圧を利用した高圧処理は、果実等の生の香り、色、風味が保持されるとして、近年注目を集めている。初年度及び昨年の本研究では、牛肝臓に添加した大腸菌の高圧処理による不活化の検討を行った。初年度の検討では 400MPa 及び 500MPa の処理により 5log の低減が可能であった。一方で、肝臓の肉色及び

肉質変化が著しいことが明らかとなった。次年度は、250MPa180分の処理による肝臓中の *E. coli* への不活化効果と、肝臓の肉色及び肉質に及ぼす影響について検討を行ったところ、肝臓の変化は抑えられたものの、菌数の低減は2logにとどまった。今年度は、300MPa5分を6回反復する高圧処理条件による、鶏ササミ肉に人工的に接種したサルモネラ及びカンピロバクターへの菌数低減効果について検討した。

## B. 研究方法

### (1) 供試菌株

*Salmonella* Typhimurium LT2 株と *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 株を用いた。サルモネラ菌株は-80℃に保存し、Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地に植え、単一集落を BHI 液体培地に接種して 37℃で 20-24 時間培養したものを添加試験に供した。カンピロバクター菌株は-80℃に保存し、Muller Hinton (MH) 寒天培地上でアネロパック及び嫌気ジャーを用いて 37℃で 2 代培養したものを、MH 液体培地に懸濁した菌液を添加試験に用いた。

### (2) 検体

高圧処理を行う食品検体は、市販の鶏ささみ肉を用いた。接種試験用の検体は 10g 片に切断し、滅菌した高圧処理用袋に分包後、調整菌液を接種した。バキュームシーラーを用いて袋をシールしたのち、滅菌蒸留水を入れた外袋内で更にシールして密封した。硬度及び色彩を測定する検体と病理組織学的検索に用いる検体は、1本のササミを滅菌済み高圧処理用袋に入れて密封したのち、滅菌蒸留水と共に外袋に密封した。

### (3) 高圧処理

高圧処理は、上記の二重包装済み検体を、TSF6-50 (東洋高圧)を用いて 300MPa、5分を6

回反復する条件で行った。処理温度は 10℃から 20℃の範囲であった。

### (4) 菌数測定

カンピロバクターに対する殺菌効果の測定は、高圧処理後の検体を 4 倍量の MH 液体培地中で 5 倍乳剤を作成し、各 100µl を MH 寒天平板及び CCDA 寒天平板に塗布後、MH 培地は 37℃、CCDA 培地は 42℃にてアネロパック及び嫌気ジャーを用いた微好気培養を行い、48 時間後に定型集落の計数を行った (定量試験)。また、一部検体を Bolton 培地で処理し、37℃で 4 時間、41.5℃で 44 時間微好気培養後に CCDA 培地に塗布し、42℃48 時間培養後に定型集落の確認を行った (定性試験)。サルモネラ属菌では、高圧処理後の検体を 4 倍量の滅菌生理食塩水中でストマッカー処理して 5 倍乳剤を作成し、各 100µl を BHI 寒天平板及び CHROMagarSalmonella 平板に塗布後、37℃で好気培養を行い、48 時間後に定型集落の計数を行った (定量試験)。また、5 倍乳剤の残りは 37℃で 18 時間前増菌培養後、RV 培地に接種して 42℃ 22 時間増菌培養ののち、CHROMagarSalmonella 平板に塗布する定性試験を実施した。定量試験では、平板に発育した定型集落数と希釈倍率から、高圧処理前及び処理後の検体中の菌数を算出した。

### (5) 硬度及び色調

高圧処理による鶏ササミ肉の硬度及び色調の変化を測定するため、菌を接種しないササミ検体に (3) と同様の高圧処理を行った。未処理、300MPa 5 分の高圧処理を 1 回、3 回及び 6 回かけた検体について、レオメーター TP-10 (ヤマデン) を用いて硬度を、色差系 (コニカミノルタ) を用いて色調を計測した。

### (6) 病理組織学的検索

(5) と同時に高圧処理した検体を 10%中性緩

衝ホルマリンで固定し、定法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。作成した病理組織標本を光学顕微鏡で観察し、高圧処理による組織の変化を観察した。

## C. 結果

### 1. 高圧処理による鶏ササミ中に接種したサルモネラとカンピロバクターへの菌数低減効果

300MPa、5分6回反復の高圧処理を行った結果の菌数を図1及び2に示した。高圧処理は3回実施し、平均及び標準偏差を求めた。

高圧処理前の鶏ササミにおけるサルモネラ及びカンピロバクターの菌数は、約  $1.04 \times 10^8$  CFU/g 及び約  $7.2 \times 10^7$  CFU/g であった。高圧処理後のサルモネラ菌数は、非選択培地である BHI 培地上に形成された集落数で、1回目が  $8.5 \times 10^2$  CFU/g、2回目が  $1.05 \times 10^6$  CFU/g、3回目が  $9 \times 10^2$  CFU/g であった(図1)。3回の試験のいずれにおいても、BHI 培地上の集落数は、選択分離培地である CHROMagarSalmonella 上の集落数よりも多く、高圧処理により損傷菌が発生している事が示された。高圧処理後のカンピロバクター菌数は3回の処理全てにおいて、菌が検出されず、検出限界以下となった(図2)。但し、データは示していないが、いずれにおいても増菌培地を用いた定性試験においては、高圧処理後の検体からカンピロバクターが検出された。

### 2. 高圧処理が鶏ササミの色調と硬さに及ぼす影響

300MPa、5分の高圧処理による鶏ササミの肉色及び硬さの変化を測定した結果を表1及び2に、写真を図3に示した。未処理の鶏ササミの肉色は、明るさを示すL値が14.5、赤みを示すa値が2.3、黄色みを示すb値が6.3であった。300MPaの高圧処理の反復を行うと、1回の処理でL値が22.8となり、3回及び6回の処理においても1回目を超える値を示し、高圧処理の反復により、色

調の明るさが増す結果となった(表1)。一方a値は高圧処理により、未処理のものよりも小さい値となり、高圧処理により赤みが失われることが示された。b値は高圧処理により数値が上昇していた。いずれの値も、処理回数に比例しての増加ではないものの、1回の処理で色調の変化を起こすことが示され、肉眼的な観察と相関する数値となった。硬さについては、最大破断点の加重により評価したところ、未処理のササミでは7.54065Nであったものが、1回の高圧処理により9.29252N、3回の処理で8.57844Nとなり、6回の処理後には12.55822Nの値を示し、実際の触感と高い相関を示していた(表2)。

### 3. 組織学的検索

300MPa、5分の高圧処理による鶏ササミの組織学的変化を図4、5に示した。

高圧処理を行っていない鶏ササミでは筋線維が密に存在しているのに対し、1回でも高圧処理をかけた鶏ササミでは、筋線維の分布が疎となっていた(図4)。筋線維のそれぞれが若干縮小しており、筋線維間には好酸性の微細な線維状物質が認められた(図5)。

## D. 考察

鶏ササミ中のサルモネラ及びカンピロバクターの、高圧処理による不活化を検討した。過去の論文において、高圧条件を300MPaに設定し、5分間の処理を6回反復させることにより、同じ圧力で30分連続の処理を行うよりも高い殺菌効果が得られるとされており、同様の条件での検討を実施した。その結果、カンピロバクターに対しては7log削減という高い菌数低減効果を示した。また、3回の試験におけるばらつきも見られなかった。増菌培養により菌が検出されたため、完全な除菌には至らなかったものの、今回の条件が鶏肉中のカンピロバクター削減に効果的であることが示された。一方サルモネラに対しては、平均して



3log の削減にとどまり、試験間のばらつきも大きかった。また、サルモネラについては損傷菌の発生が見られたことから、処理後の保存条件によってはより多くの菌が蘇生する可能性があると思われる。これらの結果から、本菌がカンピロバクターよりも高圧処理に対する抵抗性が高く、今回の高圧条件はサルモネラに対しては効果が限定的であることが明らかとなった。一方、肉質の変化については、高圧処理により肉色に変化しており、硬さも増加して、6 回の処理を行ったものについては、加熱処理したものと類似した肉質となっていた。以上の結果から、鶏ササミにおいて十分な殺菌効果を確保しつつ肉質変化を最低限に抑えた実用的な高圧処理条件を見いだすには、圧力条件と処理回数の組み合わせを変えた検討、高圧処理後の保管温度による生残性等の検討を追加する必要があるが、生食用としての提供には、更なる検討が必要であるが、最終的な包装形態で殺菌処理を行うため、処理以後の工程で微生物汚染を受けることなく流通が可能な高圧殺菌は、畜産食品における衛生保持や品質保持期限の延長に有用であると思われる。

#### E. 結論

鶏ササミに人工的に添加した食中毒原因菌の高圧処理による不活化を検討したところ、300MPa で5分を6回反復する処理により、カンピロバクターは7log、サルモネラは2-5log の菌数低減が可能であった。一方、鶏ササミの肉質については、高圧処理により色調や硬さに変化が見られたため、生食用としての提供を可能にするには更なる条件検討が必要と思われた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

図1. 高圧処理による鶏ササミ中のサルモネラ菌数の変化

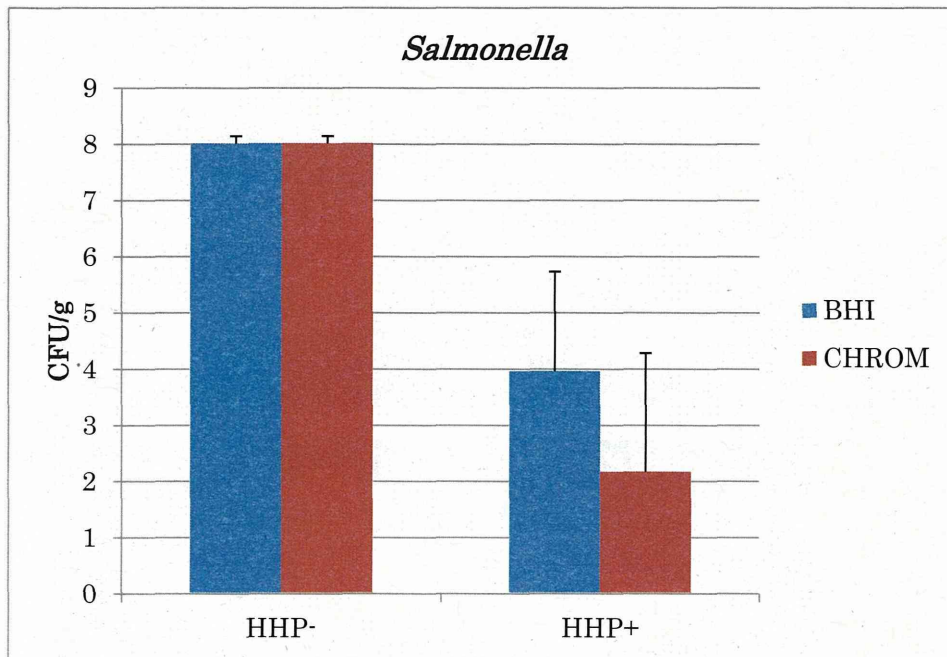


図2. 高圧処理による鶏ササミ中のカンピロバクター菌数の変化

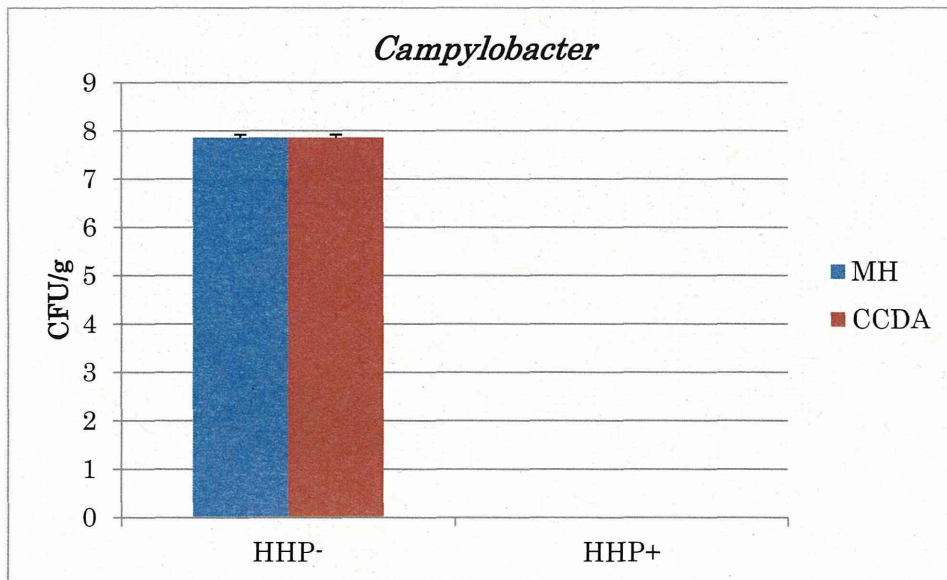
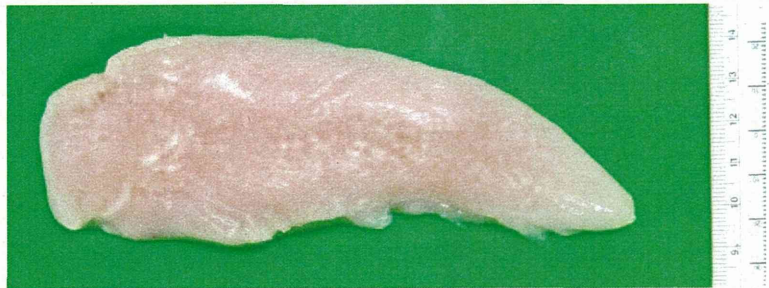


図3. 高圧処理による鶏ササミ肉色の変化

0回



1回



3回



6回



表1. 高圧処理による鶏ササミの色調の変化

	L 値	a 値	b 値
0 回	14.5	2.3	6.3
1 回	22.8	1.7	8.0
3 回	25.3	1.8	7.0
6 回	23.4	2.1	7.1

表2. 高圧処理による鶏ササミの硬さの変化

	荷重[N]
0 回	7.54065
1 回	9.29252
3 回	8.57844
6 回	12.55822