

係している可能性が考えられた。大腸菌群が高濃度に検出された検体があったことを踏まえつつ、今後、さらに検体数を増やして検討して行く必要がある。

F. 健康危機情報

牛の肝臓内から直接 STEC の存在は確認できなかったが、大腸菌群及び腸内細菌科菌群が検出され、また、塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせた方法で完全に殺菌することができなかった。現状では、牛の肝

臓内には大腸菌群の汚染率が高く、牛肝臓を生で食べることは免疫力の弱い小児やお年寄りでは大きなリスクとなる可能性がある。

G. 研究発表

無し

H. 知的財産権の出願、登録状況

無し

表 1. 牛の各消化管部位における *stx* 遺伝子の分布

採取部位 [検体数]	<i>stx1</i> 陽性数	<i>stx2</i> 陽性数	<i>stx1/2</i> 陽性数	合計 (%)
舌 [46]	1	1	1	3 (6.5)
唾液 [41]	1	3	5	9 (22)
胆汁 [232]	0	0	0	0 (0)
肝臓内部 [253]	0	3	0	3 (1.2)
肝臓表面 [181]	0	15	1	16 (8.8)
第一胃内容物 [46]	2	1	1	4 (8.7)
十二指腸組織 [68]	1	2	1	4 (5.9)
十二指腸内容物 [68]	2	6	2	10 (15)
盲腸組織 [69]	4	12	2	18 (26)
盲腸内容物 [69]	4	12	2	18 (26)
肛門組織 [220]	10	116	56	182 (83)
肛門内容物 [65]	6	16	7	29 (45)

表 2. 肝臓内部、表面、胆汁及び肛門組織における *stx* 遺伝子の分布 (0.5 g/1.0 g 相当)

	正常 (%)				Sawdust (%)
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1/2</i>	合計	<i>stx2</i>
部位 1	0*/201# (0)	0/201 (0)	0/201 (0)	0/201 (0)	0/20 (0)
部位 2	0/205 (0)	0/205 (0)	0/205 (0)	0/205 (0)	0/20 (0)
部位 3	0/200 (0)	1*/200 (0.5)	0/200 (0)	1/200 (0.5)	1/20 (5)
部位 4	0/191 (0)	3*/191 (1.6)	0/191 (0)	3/191 (1.6)	0/20 (0)
部位 5	0/191 (0)	1*/191 (0.5)	0/191 (0)	1/191 (0.5)	1/20 (5)
肝臓表面	0/133 (0)	9/133 (6.8)	1/133 (0.8)	10/133 (7.5)	ND
胆汁	0/196 (0)	0/196 (0)	0/196 (0)	0/196 (0)	0/20 (0)
肛門組織	7/190 (3.7)	104/190 (55)	155/190 (23)	155/190 (82)	ND

*1 検体で、部位 3、4、5 全てで *stx2* 遺伝子が陽性となった。#総検体数、*陽性検体数

表 3. 肝臓内部、表面、胆汁及び肛門組織における *stx* 遺伝子の分布 (50 g 相当)

遺伝子	肝臓左葉 (%)	肝臓右葉	肝臓表面	胆汁	肛門組織
<i>stx1</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (10)
<i>stx2</i>	0 (0)	0 (0)	6 (13)	0 (0)	12 (40)
<i>stx1/2</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	12 (40)
合計	0*/48# (0)	0/48 (0)	6/48 (13)	0/36 (0)	27/30 (90)

#総検体数、*陽性検体数

表 4. 各種消毒薬で殺菌消毒した場合の部位ごとの肝臓内大腸菌群陽性率

消毒薬	部位 1 (%)	部位 2	部位 3	部位 4	部位 5	胆汁
A* [61#]	16* (26)	14 (23)	34 (56)	31 (51)	38 (62)	11 (18)
B** [16]	12 (75)	11 (69)	14 (88)	16 (100)	16 (100)	4/15# (27)
C*** [7]	5 (71)	6 (86)	5 (71)	7 (100)	7 (100)	0/4# (0)
D## [9]	5 (56)	6 (67)	7 (88)	9 (100)	9 (100)	0 (0)
E\$\$ [14]	0 (0)	0 (0)	13 (93)	11 (79)	12 (86)	0 (0)

調査時期:*H27/1-H27/9, **H27/5-H27/8, ***H27/6-H27/8, ##H27/8-H27/9, \$\$H26/10-H26/12,

#総検体数、*陽性検体数

表 5. 部位 1 と 2 を各種消毒薬で消毒後、凍結無・有、凍結後 2 回増菌後の細菌陽性率

消毒薬	部位 1 (%)			部位 2		
	凍結無+	凍結有+	凍結 2 次増菌&	凍結無+	凍結有+	凍結 2 次増菌&
A## [25#]	ND	2 (8)	10 (40)	ND	1 (4)	12 (48)
A* [30]	13 (43)	11 (37)	18 (60)	12 (40)	8 (27)	18 (60)
B** [16]	12 (75)	9 (56)	15 (94)	11 (69)	9/15# (60)	15/15# (100)
C*** [7]	5 (71)	4 (57)	7 (100)	6 (86)	4 (57)	7 (100)
D## [9]	5 (56)	3 (33)	9 (100)	6 (67)	3 (33)	8 (89)
E\$\$ [14]	0 (0)	NA	10 (71)&&	0 (0)	NA	13 (93)##

調査時期：##H27/1-H27/3, *H27/4-H27/9, **H27/5-H27/8, ***H27/6-H27/8, ##H27/8-H27/9, \$\$H26/10-H26/12, +大腸菌群, &腸内細菌科菌群, #総検体数、&&凍結後 BPW による 1 次増菌の結果

表 6. 各種消毒薬の部位ごとの肝臓内大腸菌群、腸内科細菌菌群の殺菌効果

消毒薬	左葉：部位 1 と 2 (%)			右葉：部位 3-5	胆汁
	凍結無+	凍結有+	凍結 2 次増菌&	凍結無+	凍結無+
A 500 ppm [18#]§	8§ (44)	6 (33)	16 (89)	18 (100)	6/14# (43)
A 2,000 ppm [22]§	10 (45)	5 (23)	19 (86)	21 (95)	2/15# (13)
E 400 ppm [12]\$\$	1 (8)	1 (8)	6 (50)	4 (33)	1/10 (10)

#総検体数、§陽性検体数、+大腸菌群, &腸内細菌科菌群, §H27/10-H27/12、\$\$H28/1

図1. 牛肝臓及び消化管各部位における大腸菌群細菌の
検出率と細菌数(通年)

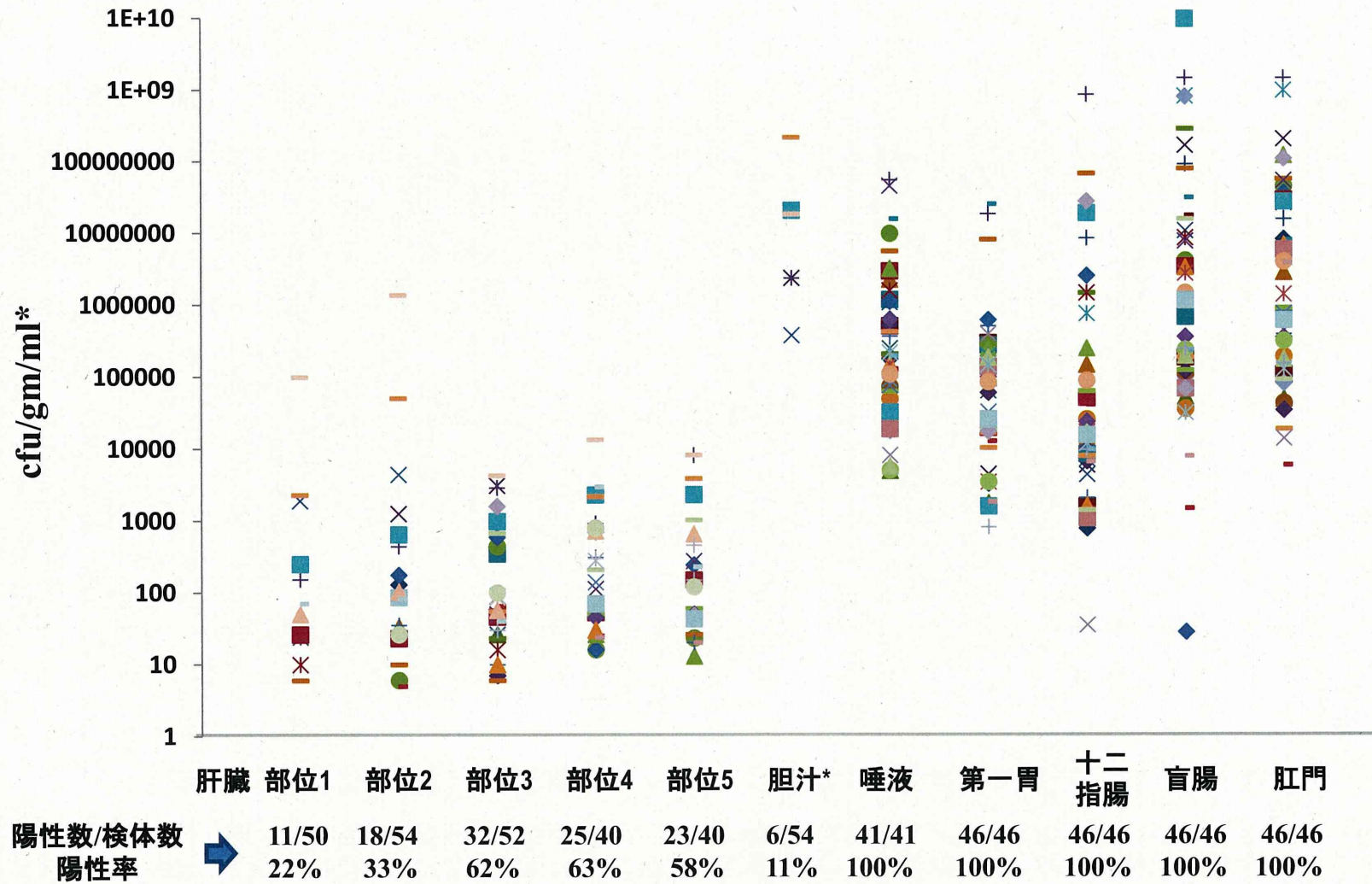


図2. 冬場の牛肝臓内における大腸菌群細菌の陽性率と細菌数
(2013年10月-2014年3月)

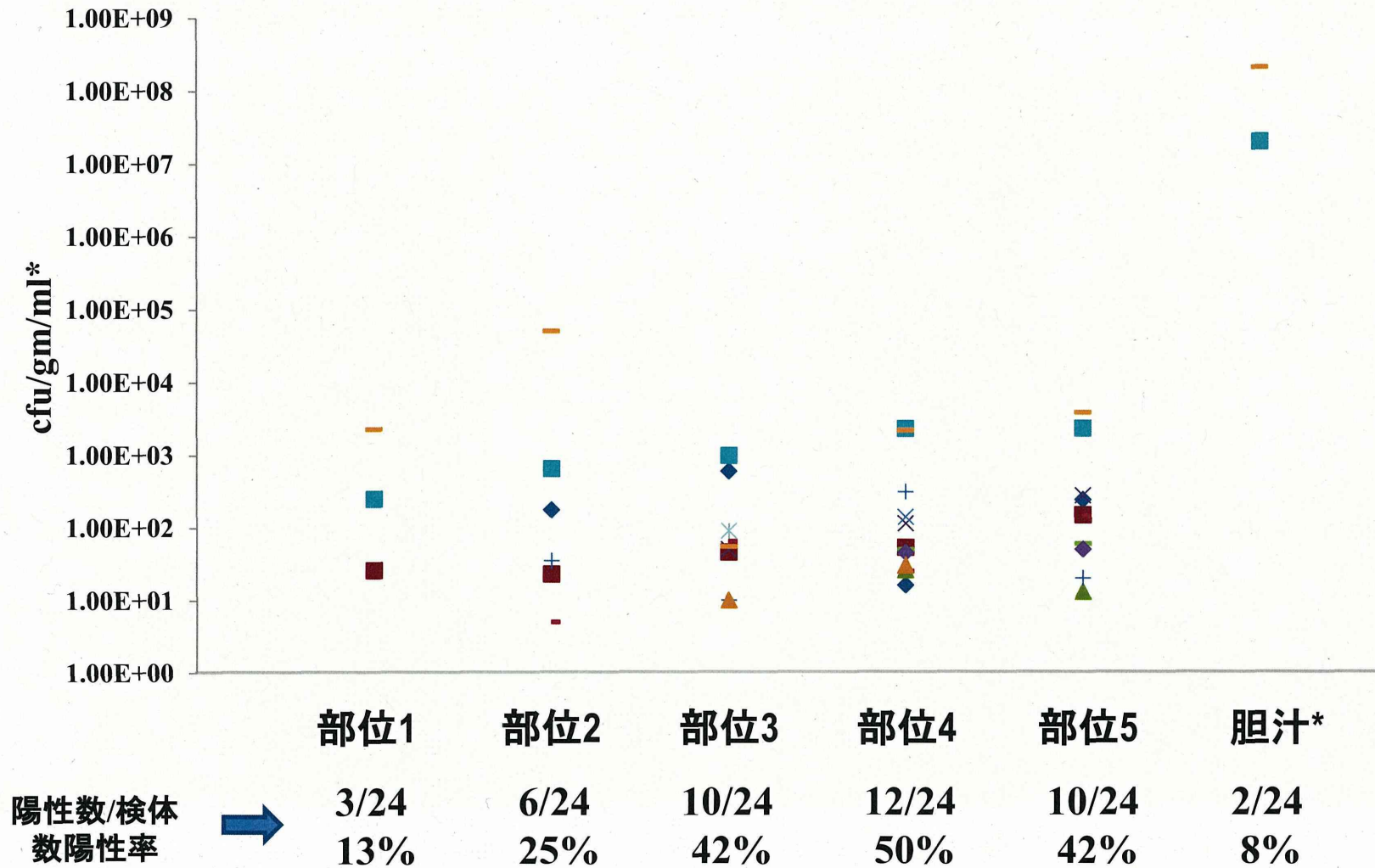


図3. 夏場の牛肝臓内における大腸菌群細菌の陽性率と細菌数
(2013年5月-9月、2014年4月-8月)

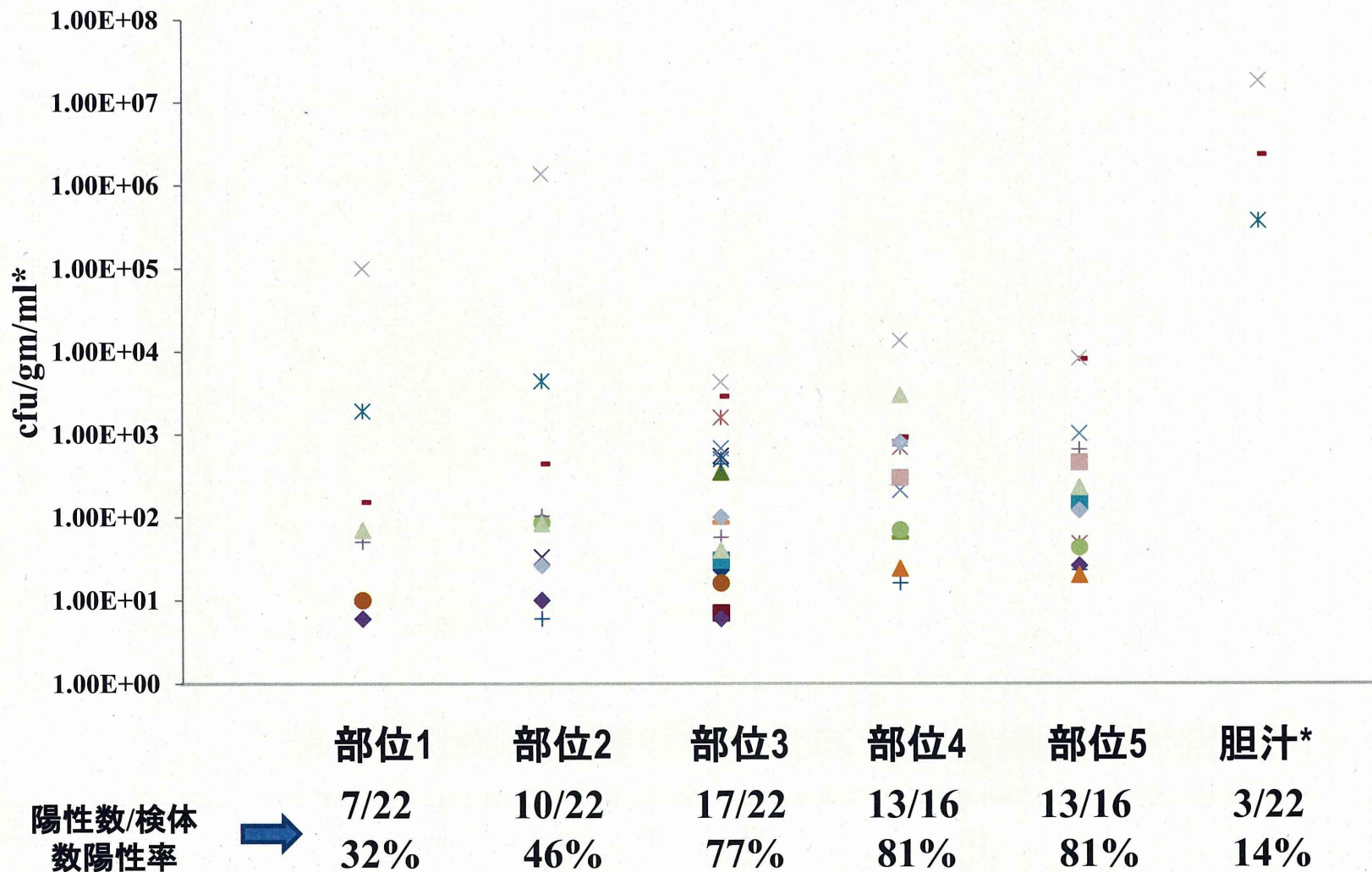
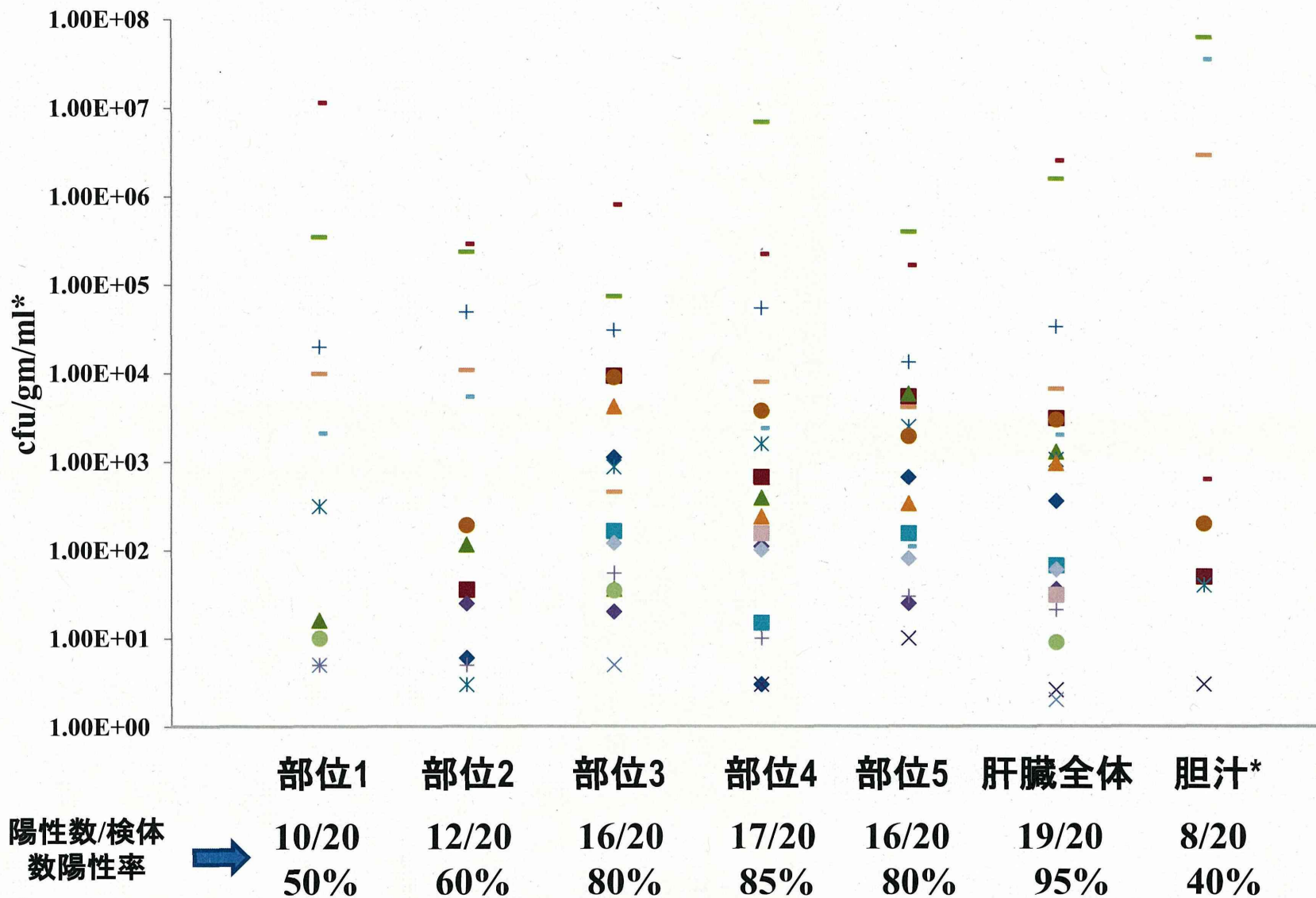
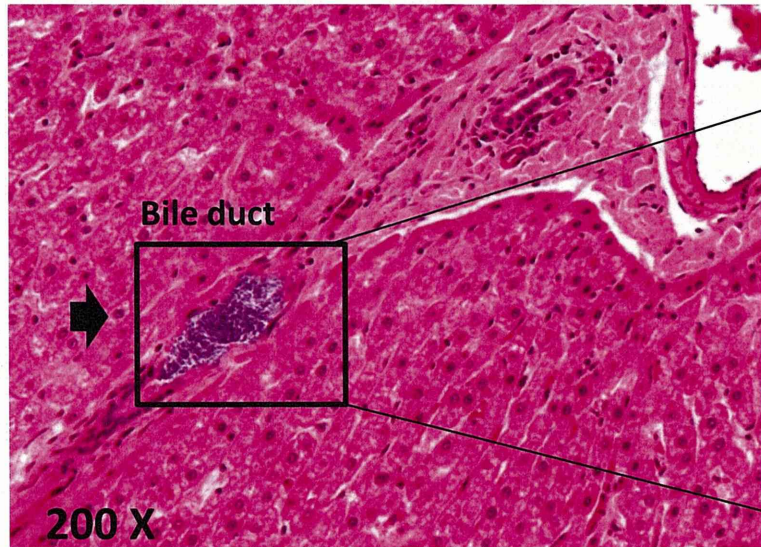


図4. Sawdustの牛肝臓における大腸菌群細菌の陽性率と細菌数
(2013年9月~2014年4月)





部位4

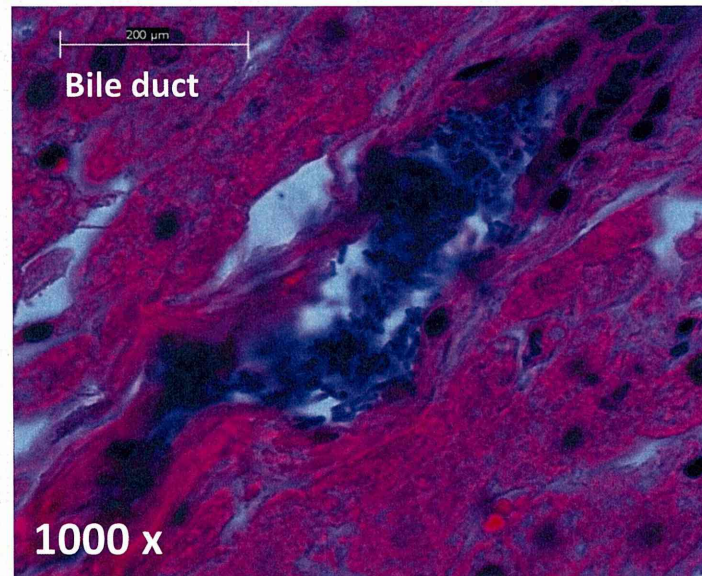
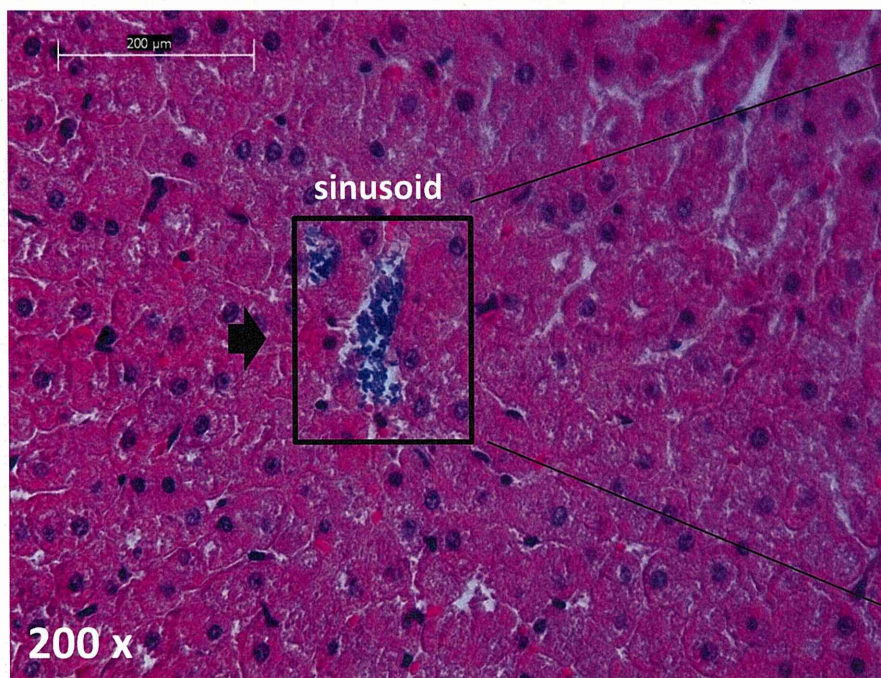


図5-1. 牛肝臓胆管内に検出された細菌



部位3

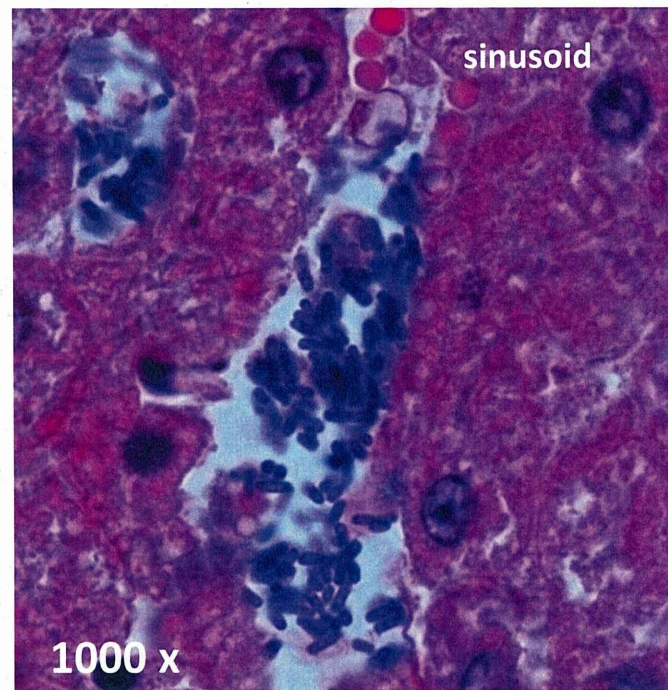


図5-2. 牛肝臓類洞内に検出された細菌

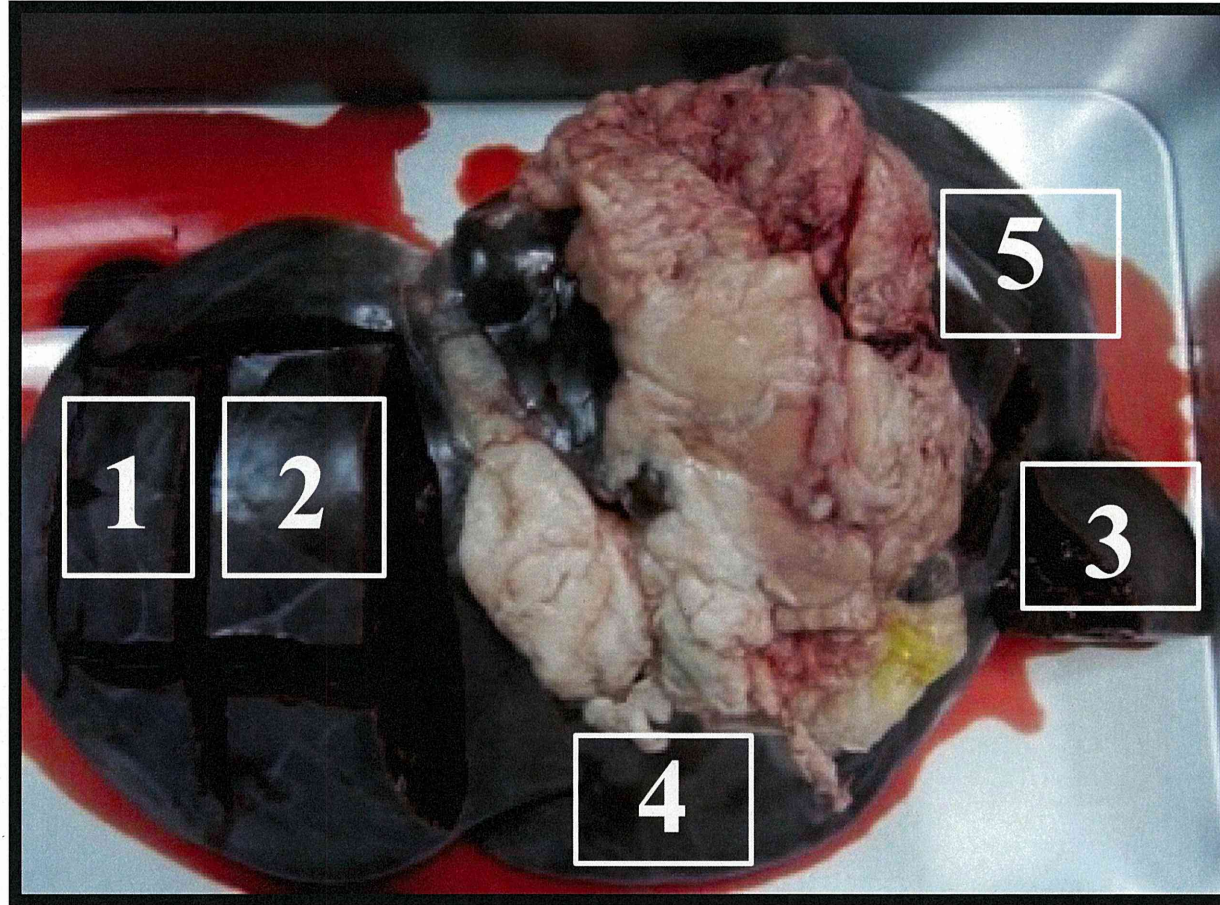


図6. 牛肝臓から採取した部位(1-5)を示す
左葉(部位1と2)、右葉(部位3-5)

厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業
畜産食品の安全性確保に関する研究

総合分担研究報告書

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 国立研究開発法人 農研機構 食品総合研究所

研究協力者：川崎 晋 国立研究開発法人 農研機構 食品総合研究所

研究協力者：都築 和香子 国立研究開発法人 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、カンピロバクター、サルモネラのガンマ線照射による殺菌効果について、照射時の温度（氷冷・凍結）と包装条件（含気・脱気）を変えて検証を行った。牛肝臓中での *E. coli* O157 DT-66 株の D₁₀ 値は、氷冷（0℃）含気条件で 0.36 kGy、脱気条件で 0.38 kGy、凍結（-80℃）含気条件で 0.80 kGy、脱気条件で 0.96 kGy であった。ガンマ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、リン酸緩衝液中での抵抗性は *S. Enteritidis* IFO3313 株が最も高かった。*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 D₁₀ 値は、氷冷（0℃）含気条件で 0.62 kGy、脱気条件で 0.63 kGy、凍結（-80℃）含気条件で 1.43 kGy、脱気条件で 1.58 kGy で、*E. coli* O157 より抵抗性が強かった。牛肝臓内部に接種した *Campylobacter jejuni* 5096 株の D₁₀ 値として、氷冷（0℃）脱気条件で 0.33 kGy、凍結（-80℃）脱気条件で 0.69 kGy を得た。凍結融解によって *C. jejuni* は 1 桁程度の死滅があることと合わせると、*Salmonella* 属の殺菌を達成出来る条件で十分制御が可能になると判断された。最終的に、*S. Enteritidis* IFO3313 株を 10⁵CFU/g 接種した検体について、6、7、8 kGy の 3 段階の線量のガンマ線を照射して死滅効果を確認したところ、含気条件では 7 kGy、脱気条件では 8 kGy で *Salmonella* が非検出となった（n=5）。

照射による副生成物について検討を行い、脂質の放射線分解物である 2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)、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)が、氷冷(0℃) 6 kGy、凍結(-80℃)10 kGy までの照射によって線量依存的に生成することを確認した。前駆脂肪酸 1 mmole から 1 kGy の照射で生成する 2-ACBs 量は、1 nmole 未満で、これまで畜肉等で報告されている値より小さかった。また、氷冷(0℃) 6 kGy、凍結(-80℃) 10 kGy までの照射により、包装条件によらず、トランス脂肪酸が線量に依存して僅かに増加した。一方、脂質酸化の指標である TBA 値は、含気包装、0℃での照射では増加が認められたが、脱気包装下や凍結下(-80℃)の照射では、ほとんど変化が無かった。フランについては、氷冷(0℃)、

凍結 (-80°C) の照射で、それぞれ 6 kGy、10 kGy 照射をしても検出されないことを確認した。さらに、照射により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、スカトールを検出した。

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が設定された。この規制には解除の要望も多かったことから、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¹⁾。

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て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した。

3 年間の研究期間において、牛肝臓を汚染する可能性のある食中毒起因菌として、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラの 3 種に着目して、これらを牛肝臓内部に接種した際のガンマ線による殺菌

効果を検討するとともに、照射により牛肝臓中に生成する可能性のある副生成物について検討を行った。

B. 研究方法

1. 材料

微生物試験用の牛肝臓試料は、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°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°C で凍結保存した。

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 50 g 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、氷冷 (0°C) 照射では照射水中に 3 時間、凍結 (-80°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)、*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)、*Campylobacter jejuni* 5096 株を用いた。

E. coli および *Salmonella* は、Trypticase Soy Broth (Difco)を用いて、37°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。

*C. jejuni*は Brucella Broth(Difco)を用いて、微好気条件下で 41.5°C一昼夜静置培養した後、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。それぞれの菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、 10^9 ~ 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. ガンマ線照射

ガンマ線照射はコバルト 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°C)および凍結(ドライアイス下)(-80°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°C)もしくはドライアイス(-80°C)を封入した。

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. 牛肝臓の殺菌試験

菌体の接種は、自然解凍後した 25 g 塊の牛肝臓あるいは牛挽肉の内部に、供試菌液 100 μ 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、氷水中あるいは、-80°Cの凍結庫内で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。

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

ガンマ線照射後の牛肝臓は、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。

E. coli および *Salmonella* の計数は、各10倍段階希釈試料液を、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、これを35°Cで24時間培養し、その出現集落数から1g当たりの一般生菌ならびに腸内細菌科の菌数を求めた。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、標的菌種であることをPCR法もしくはイムノクロマト法にて確認した。

*C. jejuni*の計数は、10倍段階希釈試料液をmCCDA平板(Oxoid)にスパイラルプレーティング法で塗抹した。mCCDA平板は41.5°Cで各々48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*C. jejuni*の数を求めた。mCCDA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 *Campylobacter* 同定キット (Singlepath *Campylobacter*; Merck) に供し、典型集落が *Campylobacter* 属であることを確認した。

別途、*Salmonella* の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、37°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) に一白金耳を画線し、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. TBA 価の測定

TBA (チオバルビツール酸) 価の測定は、衣巻らの方法に従い、水蒸気蒸留法により、(一財) 日本食品分析センターに委託して実施した。

7. 牛肝臓の脂肪酸分析

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、クロロホルム/メタノールにより総脂質を抽出した。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、ガスクロマトグラフにより分析した。(詳細条件は、平成 26 年度分担研究報告書参照)

8. 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、クロロホルム/メタノール (2:1) (C/M) 溶液で、脂質を

抽出し、これを、アセトニトリルに再溶解させた後、1g のシリカゲルカラム (Merck Silica gel 60 70-230 mesh) 2 本に添加し、精製したものを GC-MS の分析試料とした。内部標準としてシクロヘキシルシクロヘキサノンを用い、規定濃度の 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) にマトリックスを添加した標準溶液で作成した検量線を用いて定量した。(試料調製の手順と GC-MS による分析条件の詳細は、本研究の平成 27 年度分担研究報告書参照)

9. フランの分析

フランの分析は、Yoshida らの方法により、(一財) 日本食品分析センターに委託して実施した。ガスバリア性のポリエチレンバック (PTS 袋、三菱ガス化学製、PB180250P 90×120mm) 含気状態で包装した牛肝臓 (50g 程度) を、氷冷状態 (0°C) で 6kGy、ドライアイス下 (-80°C) で 10kGy の 2 条件でガンマ線照射し、照射後の試料は -80°C で保管した。分析時には、未開封の状態の試料を冷蔵庫 (約 4°C) 中に移して解凍し、冷蔵庫から取り出した後、速やかに塩化ナトリウム 4g を入れた 20 ml ヘッドスペースバイアルに 1g 採取した。(分析条件の詳細については、平成 26 年分担研究報告書を参照)

10. 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) にいれ、含気状態のままヒートシールし、予冷の後、

3 kGy (0°C)、または 6kGy (-80°C) を照射した。照射後の試料は分析に供するまで、-80°C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。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°C 90hPa) し、留分をジエチルエーテルで抽出して濃縮後、臭い嗅ぎ GC 及び GC-MS で分析した。(詳細条件は H25 年度分担研究報告書参照)

C. 研究結果

1. 各種細菌に対するガンマ線の殺菌効果

1.1 *E. coli* O157

牛肝臓および牛挽肉中に、*E. coli* O157 DT66 株を接種し、段階的に線量を変えて照射し、生残曲線を得た。牛肝臓及び挽肉中の DT66 株は、氷冷条件 (0°C) 0~3 kGy、凍結条件 (-80°C) 0~5 kGy の範囲で、線量に対して指数関数的に減少し、生残菌数の線量に対するプロットは、ほぼ直線となった。このプロットの傾きから、D₁₀ 値を求めた結果は、平成 25 年度報告書分担研究報告書 表 1 に示した。牛肝臓内部に接種した *E. coli* O157:H7 DT-66 株の D₁₀ 値は、氷冷 (0°C) 含気条件で 0.36 kGy、脱気条件で 0.38 kGy、凍結 (-80°C) 含気条件で 0.80 kGy、脱気条件で 0.96 kGy であった。氷冷・凍結もしくは含気・脱気包装いずれの試験区においても、牛肝臓におけるガンマ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。特に凍結下では挽肉と比較して D₁₀ 値が高く算出された。また、氷冷区と凍結区を比較した場合、凍結区の D₁₀ 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。

1.2 *Salmonella*

サルモネラ供試菌 8 株に対し、リン酸緩衝液中におけるガンマ線の感受性について比較したところ、1 kGy 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(平成 25 年 分担研究報告書 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。

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、ガンマ線照射を行った際の生残曲線は、低線量域で肩が見られるシグモイド型となったが、(平成 25 年度分担研究報告書 図 2)、便宜的に指数関数型であるとして D₁₀ 値を、直線回帰より求めた。(平成 25 年度分担研究報告書 表 2 および 平成 27 年度分担研究報告書 表 1)。研究期間を通じての結果を統合すると *S. Enteritidis* IFO3313 株を、牛肝臓中での D₁₀ 値は、氷冷 (0°C) 含気条件で 0.62 kGy、脱気条件で 0.63 kGy、凍結 (-80°C) 含気条件で 1.43 kGy、脱気条件で 1.58 kGy と求められた。これらの値は、前項で示した *E. coli* O157 の値よりも高く、サルモネラの殺菌にはより大きな線量が必要であった。また、*E. coli* O157 と同様、牛肝臓におけるガンマ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。照射温度、包装条件による放射線感受性の違いについても、*E. coli* O157 と同様、凍結下、脱気条件の方が、放射線抵抗性が強く (D₁₀ が大きく) なった。

1.3 *Campylobacter*

牛肝臓および牛挽肉中において *C. jejuni*

5096株を接種し、ガンマ線照射を行った際のD₁₀値を求めた(平成26年度分担研究報告書表1)。C. jejuniの牛肝臓中のD₁₀値は、氷冷(0℃)含気条件で0.26 kGy、脱気条件で0.33 kGy、凍結(-80℃)含気条件で0.58 kGy、脱気条件で0.69 kGyであり、大腸菌株よりも低い結果を得た。また、牛肝臓におけるD₁₀値はいずれの条件においても、牛挽肉中での値よりも大きかった。なお、-80℃で凍結した検体では、凍結および解凍の時点で本菌の菌数が1ケタ低下し、これは牛肝臓・挽肉共に観察された。

1.4 ガンマ線によるSalmonella死滅効果

前項までで最も放射線抵抗性が強いと考えられたS. Enteritidis IFO3313株を約10⁵ 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となるようガンマ線照射した場合の不活性化について検討を行った。各条件における、5検体中の検出(陽性)数は、平成27年分担研究報告書表2に記載した。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。なお、本試験にて接種した菌数は3.0 x 10⁵ CFU/gと求められた。

2. 牛肝臓のガンマ線照射による副生成物

2.1 TBA値

牛肝臓を含気あるいは脱気条件で包装し、氷冷(0℃)で3、6 kGy、凍結状態(-80℃)で5、10 kGyのガンマ線照射を行い、脂質の過酸化と相関があるとされるTBA値を測定した。含気包装では、氷冷(0℃)照射においてTBA値の線量に応じた有意な増

加が認められた。含気包装、凍結状態(-80℃)の照射においても統計的に有意なTBA値の増加がみられたが、その変化量は非常に小さかった。また、脱気包装では、氷冷、凍結照射ともに、最高線量の照射でも有意なTBA値の増加は認められなかった。(H26年度分担研究報告書表3)

2.2 脂肪酸組成、トランス脂肪酸含量

前項と同様の照射条件において、主な脂質構成脂肪酸の含量を測定した。供試した牛肝臓には、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18:1,18:2などの炭素数18(C18)のトランス異性体の他、C14~C17のモノエンのトランス異性体も非照射及び照射のいずれの検体にも含まれていた。照射による不飽和脂肪酸の有意な減少は、いずれの検体においても認められなかった。(H26年分担研究報告書表3)

ガンマ線照射によって、いずれの照射条件の試料でもトランス異性体がわずかに増加した。特に0℃の照射では線量に応じた増加が顕著で、6 kGyの照射では18:1および18:2のトランス異性体の総量やC18のトランス異性体の総量、より短鎖のトランス異性体も加えた総トランス脂肪酸量について、非照射試料と比較して統計的な有意差が認められた。脱気包装、0℃、6 kGy照射における、C18総トランス脂肪酸の含量は、1.40 ± 0.03 g / 100 g 脂質(非照射コントロールは1.04 ± 0.08 g / 100 g 脂質)、その他の脂肪酸も合わせた総トランス脂肪酸量は、2.51 ± 0.10 g / 100 g 脂質(非照射

コントロールは 2.18 ± 0.12 g /100 g 脂質) となった。また、凍結下の照射でも氷冷下に比べ変化量は小さいものの照射によるトランス異性体の増加の傾向が認められた。脱気包装 10kGy での増加量は統計的に有意で、C18 総トランス脂肪酸の含量は、 1.26 ± 0.05 g/ 100 g 脂質、その他の脂肪酸も合わせた総トランス脂肪酸量は、 2.42 ± 0.10 g/ 100 g 脂質であった。なお、本研究で使用した牛肝臓の脂質含量は、5.03 g/ 100 g 生肝臓重量 であった。含気包装と脱気包装の同一温度、同一線量での間のトランス異性体含量を比較しても、統計的な有意差は認められず、TBA 価の場合と異なり、包装条件の違いによる影響はほとんど認められなかった。(H26 年分担研究報告書 表 2)

2.3 2-アルキルシクロブタノン類

肝臓成分の寄与による分解反応を考慮して、抽出溶媒をクロロホルム/メタノールとし、定量時にマトリックス検量線を用いる方法により、照射した牛肝臓 (凍結(-80°C) 照射、5、10 kGy、氷冷 (0°C) 照射 3、6kGy) において、3 種の 2-ACBs (2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB) の定量を実施した。添加回収試験による回収率は 73~116% で、繰り返し標準偏差は 6% 未満であった。非照射の肝臓には、いずれの 2-ACBs も検出されず、照射した肝臓では、パルミチン酸由来の 2-dDCB、ステアリン酸由来の 2-tDCB、オレイン酸由来の 2-tDeCB が線量に依存して生成し、たとえば含気包装、凍結状態 (-80°C) 10 kGy における、含量は、 10.3 ± 0.30 、 30.7 ± 0.5 、 55.5 ± 1.6 ng /g 生重量であった。他の条件の照射においても、照射肝臓中の 3 種の 2-ACBs の含量は、元の脂質の脂肪酸組成を反映し、

2-tDeCB、2-tDCB、2-dDCB の順に高い含量の 2-ACBs が検出された。(詳細生成量については H27 分担研究報告書 表 4 参照) 肝臓生重量 1g・1 kGy あたりの生成量は、2-tDCB が 2-dDCB 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。前駆脂肪酸 1 mmole あたり 1 kGy の照射で生成する 2-ACBs の分子数は、0.3~0.9 nmole 程度であった。(H27 分担研究報告書 表 5 参照)

2.4 フラン生成の可能性の確認

今回採用した分析条件において、繰り返し測定標準偏差に基づいて求めた、フランの定量下限値 (LOQ) および検出限界値 (LOD) はそれぞれ 2 ng/g-FW および 0.5ng/g であった。牛肝臓を分析した結果、照射(6 kGy 0°C、10 kGy -80°C) および未照射試料のいずれにおいても、定量下限を超える濃度のフランは検出されなかった。

3. ガンマ線照射による臭気成分

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 (GC-O) で分析した結果と GC-MS による分析の結果を統合し、照射試料(含気包装 0°C 3 kGy、および-80°C 6 kGy) において、照射により増加する臭気成分としてベンジルメルカプタンが示唆された。なお、GC-MS 分析において、これらの化合物の該当ピークは非照射のコントロール試料においても検出された。(H25 分担研究報告書 図 3、4)

D. 考察

先行研究(厚生労働科学研究 平成 24 年度 特別研究「食品に対する放射線照射による殺菌手法及び効果判定手法の開発並びに安全性に関する研究」)の結果から、当研究所が保有する *E. coli* O157 の中で、DT66 株が最もガンマ線照射に対する抵抗性が高いという結果が得られていた。また、これまでに報告されている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、ガンマ線による殺菌効果について、より詳細なデータ取得を試みた。

本研究で被験菌株に対して得た牛肝臓中でのガンマ線照射による D₁₀ 値は、牛挽肉における D₁₀ 値に比較して高い値となった。本研究での牛挽肉の値は、既報の牛挽肉における D₁₀ の範囲にあることから、実験は妥当に行なわれていると考えられ、牛挽肉中に比べて高い D₁₀ 値は、牛肝臓中というマトリクス環境によると考えられた。一般に細菌の放射線抵抗性は、ラジカルスカベンジャーの共存により上昇すると考えられている。牛肝臓中には、牛挽肉に比較してきわめて高い濃度のビタミン C やビタミン A が含まれており、他にも OH ラジカル等に対するラジカル補足活性を有する化合物が豊富に存在している可能性がある。本研究の結果から牛肝臓における、放射線抵抗性の増加に寄与する因子を具体的に特定することは出来ないが、過去の放射線生物学的な文献情報を考慮すると、牛肝臓中の成分に細菌に対する放射線殺菌の効果を低減する作用を持つものがあることが推察された。

牛肝臓を汚染する可能性がある、食中毒起因菌として、*E. coli* O157 の他には、*Campylobacter* 属菌や *Salmonella* 属菌の存在が懸念される。そこで、これらの菌についても、牛肝臓中におけるガンマ線殺菌効果を検討した。

C. jejuni の D₁₀ 値は大腸菌株よりも低い結果を得た。この菌種による違いは、過去の研究事例報告からも示唆された通りであった。なお、本研究で得られた牛挽肉中における *C. jejuni* の D₁₀ 値は、先行研究における値に比較して若干高めに観察されたが、この要因としては、これは本研究で用いた供試菌の抵抗性が高いというよりも、現在の *Campylobacter* 検出培地の高性能化および微好気培養条件の発達により検出率が改善したためと推察された。なお、本研究において、-80℃で冷凍保存した検体では、凍結および解凍の時点で本菌の菌数が 1 ケタ低下したことから、冷凍保存された牛肝臓試料中の *Campylobacter* 属の殺菌には、ガンマ線に加えて凍結融解ストレスによる死滅の効果も加えて考慮することが出来ると考えた。以上のことから、牛肝臓においてはガンマ線抵抗性の試験指標菌として *C. jejuni* の挙動を詳細に検討する必要はないと考えた。

Salmonella 属菌は、本研究課題で検討した 3 つの菌種のうち、最も放射線抵抗性が強く、このことは、これまでに菌種による放射線抵抗性の違いについて緩衝液中や他の食品において報告されている結果と一致していた。本研究において、凍結下の *S. Enteritidis* IFO3313 株の牛肝臓中での D₁₀ 値は含気条件で 1.43 kGy、脱気条件で 1.58 kGy と求められたことから、同条件下

で *Salmonella* 菌数を $1/10^5$ 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、これは同菌株の生残曲線を指数関数型として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。実際の規定線量による *Salmonella* の殺菌効果確認試験を試みたところ、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 3.0×10^5 CFU/g と求められており、これを不検出のレベルとするためには、 $5.5 \log$ CFU/g の菌数を低減することが理論上必要となる。本研究において得られた、*S. Enteritidis* IFO3313 株の生残曲線をシグモイド型であるとして、菌数の対数と線量の関係を二次曲線で回帰し、その回帰式に沿って計算した際の必要線量は、含気、脱気それぞれ 7.08 kGy および 7.12 kGy と算出された。従って、 10^5 CFU/g オーダーの *Salmonella* 接種による死滅効果確認試験の結果は、より多くの菌を接種して得た殺菌試験（生残曲線）の結果と照らし合わせて妥当なものと推察された。

本実験で検討した腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラいずれの菌種においても、牛肝臓中及び牛挽肉中での D_{10} 値は、凍結状態 (-80°C) での照射の方が氷冷状態 (0°C) より大きく、また、脱気状態の方が含気状態より大きい結果となった。これは、放射線による微生物の死滅に、酸素が関与する水の放射線分解反応により生成する活性酸素種を介した間接的な反応が大きく寄与しているという、放射線

の“間接効果”による解釈と矛盾しない結果である。間接効果に寄与する、活性酸素種の生成を妨げる低酸素状態や、生成した活性種の運動が制限される凍結状態では、殺菌効果が小さく（放射線が効きにくく）なることは、実用面において、目的とする殺菌効果を達成する上で、照射温度や包装条件に注意を要することを示唆している。

2. 照射による副生成物

放射線照射による食品成分の分解反応生成物は、加熱など他の食品加工処理の際に生成するものと共通しており、照射した食品の動物投与試験の結果も考慮し、「意図した技術上の目的を達成するために適正な線量を照射した食品は、いかなる線量でも適正な栄養を有し安全に摂取できる。」というのが、現在の国際機関の見解である。(WHO 1999)。一方で、近年、フランやアクリルアミドのように加熱調理や他の食品加工において非意図的に生成する化合物のリスクについての知見の集積も進んでいる。そこで本研究では、2011 年の EFSA の照射食品全般にかかる評価や、近年の FDA や FSANZ の個別の照射食品の評価で取り上げられている、脂質成分の変化（過酸化反応、トランス異性化、2-アルキルシクロブタノン類生成）、フランを着目すべき副生成物として、牛肝臓の照射における生成量を検討した。その際、最高線量は、氷冷 (0°C) 6 kGy、凍結 (-80°C) 10 kGy と、十分な殺菌効果の見込める条件を設定した。脂質の過酸化の指標である TBA 値については、氷冷含気包装の照射で増加したが、脱気包装や凍結下の照射では、著しい増加は認められなかった。

本研究における牛肝臓では脂質含量が約5%であり、肝臓100gあたりに含まれるトランス脂肪酸の総量は、0.110g/100g生重量であった。これを凍結(-80°C)状態で10kGy照射すると、0.122g/100g生重量となり、肝臓100gを摂取する場合、10kGy照射によって増加するトランス脂肪酸量は、元の含量の10%、0.012g程度と推察された。一方、国際機関の推奨するトランス脂肪酸摂取量は総摂取エネルギーの1%未満とされており(WHO 2003)、1800kcal摂取する人のトランス脂肪酸摂取推奨量は2g未満となる。牛は反芻動物であり、肝臓も含めた牛肉中の脂肪には、一定量のトランス脂肪酸が含まれており、牛肉100g中のトランス脂肪酸含量は、0.005~1.5g/100g生重量の範囲にあると報告されている。(農林水産省 リスクプロファイル トランス脂肪酸 http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/140214_tfa.pdf)したがって、殺菌レベルの線量の照射による牛肝臓のトランス脂肪酸量の僅かな増加は、上記の国際機関の推奨値との比較において、一日のトランス脂肪酸摂取量に大きな影響を与えるものではないと考えられる。

不飽和脂肪酸の含量については、常温(20°C)で、6.74kGy以上を照射した牛肉でアラキドン酸(20:4)等の多価不飽和脂肪酸の含量の有意な低下も報告されているが(Li, 2012)しているが、本研究の照射条件の範囲内では、統計学的に有意な飽和脂肪酸の割合の増加や、多価不飽和脂肪酸の減少は認められなかった。

2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)は照射より特異的に生成する脂質の放射線分解物であるとして、照射食品の検知の指

標物質として利用されている。この化合物の照射食品中での安全性に関しては多くの議論もあるが、その含量が微量であること、エームス試験等の変異原性試験が陰性であること等を理由に、ヨーロッパ食品安全機関(EFSA)では、照射食品摂取の際の健康影響は無視できると結論している(EFSA 2011)。また、最近の論文では、2-dDCBおよび2-tDCBの遺伝毒性を否定され(Yamakage 2014)、2-tDCBの発がんプロモーション活性も検出出来なかった(Sato 2015)とされている。ただし、わが国では、照射食品の安全性に関する評価が定まっていないことから、照射により生成する可能性のある2-ACBsを定量的に把握する必要があると考えた。

本研究の結果から、凍結状態の牛肝臓の照射では、10kGyの照射において、牛肝臓100gあたり10 μ g程度の2-ACBsが生成すると推察される。これまでの研究においては、6-8°Cで照射した牛肉の、2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCBの生成効率は、1.33、1.59、1.67 nmol/mmole/kGyと報告されている(Marchioni 2009)今回の肝臓の分析結果は、生成効率はやや低めであった。この理由としては、照射温度の違いが大きく影響していることが予測される。いずれにせよ、今回の実験で用いた条件下の牛肝臓の1kGyの照射で、多くの畜肉類で報告されている前駆脂肪酸1mmoleあたり1~2nmoleという生成効率を大きく超えるようなことは無いと判断された。以上より、牛肝臓の脂質含量が牛挽肉等の畜肉に比べて低いことを考慮すると、殺菌に必要な線量が牛挽肉に比べて大きくなったとしても、

すでに米国等で許可されている牛挽肉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ものと予測された。

フランについては、糖液や果汁の照射において生成が報告されている例があるが、今回の研究における牛肝臓試料の照射では、不検出（定量下限未満）であった。

E. 結論

牛肝臓中での腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラのガンマ線照射による殺菌効果について検討したところ、3種の細菌の中では、サルモネラが最も放射線抵抗性が強く、次いで腸管出血性大腸菌、カンピロバクターとなった。サルモネラの中でも、放射線抵抗性が強い *S. Enteritidis* IFO3313 株を殺菌効果の指標として、凍結（-80℃、ドライアイス下）条件下で、牛肝臓に接種した 10⁵ CFU/g の菌数低減が可能なガンマ線の線量を確認したところ、含気包装条件では 7 kGy、脱気包装条件では、8 kGy の照射で、供試した 5 検体のすべてが陰性となった。

氷冷 6kGy、凍結 10 kGy までの牛肝臓のガンマ線照射で、不飽和脂肪酸の有意な減少は無かったが、照射によるトランス異性化が認められ、トランス脂肪酸含量は僅かな増加、脂質の放射線分解物である 2-アルキルシクロブタノン類として、2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB の線量依存的な生成を確認した。氷冷(0℃)、凍結 (-80℃) の含気条件下で、十分な殺菌効果を得られる 6kGy、10 kGy でガンマ照射をしても、定量下限を超える濃度のフランは検出されなかった。

F. 健康危機情報
なし

G. 研究発表
論文発表

1. 等々力節子, 川崎晋, 放射線殺菌, 食品衛生学雑誌, 55(6)J215-218(2014)

講演・研修会等

1. 川崎 晋, 持田 麻里, 等々力 節子, 五十君 静信, 牛肝臓中における腸管出血性大腸菌のガンマ線照射による殺菌効果, 日本食品衛生学会第 106 回学術講演会
2. 等々力 節子, 都築 和香子, 亀谷 宏美, 齋藤 希巳江, 川崎 晋, 五十君 静信, 牛肝臓のガンマ線照射による品質変化, 日本食品衛生学会第 106 回学術講演会
3. 等々力節子, 放射線殺菌, 第 107 回日本食品衛生学会学術講演会シンポジウム H26. 5.16
4. 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