

平成 28 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業
畜産食品の生物学的ハザードとその低減手法に関する研究
(H28-食品-一般-005)

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 食品総合研究部門

研究協力者：川崎 晋
国立研究開発法人 農研機構 食品総合研究部門

研究要旨： 牛肝臓に 2×10^6 cfu/g の *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を接種し、9.65 ~ 10.2 kGy の範囲のガンマ線を照射したところ、脱気試料は、5 検体中 2 検体、含気試料は、5 検体中 1 検体で *Salmonella* が非検出となったが、残りの検体では *Salmonella* が検出された。先行研究で得た生残曲線に 95% 予測信頼区間を設けた結果を基に曝露線量を検討することは妥当と考えられた。

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 年度より先行研究が開始された。

本分担研究課題では、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確立することを目的とする。

これまでの研究の報告では、牛肝臓の大腸菌群の最高汚染菌数が 10^6

cfu/g オーダーであった。一方、牛生肉の衛生確保の規格基準は衛生指標菌の腸内細菌科を陰性とする 것과されているが²⁾、現時点では牛肝臓の腸内細菌科菌群の自然汚染の程度に関する十分なデータが得られておらず、殺菌目標の設定が困難である。そこで、本年度は、まず、腸内細菌科菌群に属し、先行研究の範囲において、最も放射線抵抗性の強い *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を用い、 10^6 cfu/g オーダーを肝臓に接種した際、凍結状態における殺菌効果の確認を実施した。その際、より、実用的な照射条件を想定して、板状のガンマ線源から一方向に照射を行い、試料内の線量分布についても検討を行った。

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 5.3 kg）を用いた。これらは購入後、 -80 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 で冷凍保存した。

2. 供試菌株

供試菌は、*Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を用いた。

供試菌を Trypticase Soy Broth(TSB; Difco)にて 35 一昼夜静置培養した後、遠心分離(4000 x 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. ガンマ線照射と線量分布確認

ガンマ線照射は、(一財)放射線利用振興協会に委託し、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構、高崎量子応用研究所のガンマ線照射施設を用いて行った。照射時の温度は、冷凍(ドライアイス下： -80)とし、照射中の温度を一定に保つため、肝臓試料の背面にドライアイスを当て、全体を発砲スチロールの容器に入れ、前面から照射を行った。線量率は約 2.5 kGy/h であった。

吸収線量の分布は、殺菌試験に用いたものと同型の肝臓試料を模擬試料とし、試料内部と表面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)とともに、常温照射を行った。照射後アラニンペレットの信号を 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 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、 $10^5 \sim 10^7$ CFU/g 程度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 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 (目標線量 10 kGy) で照射した。

5. 標的微生物の検出

ガンマ線照射後の検体は、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 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 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。

C. 研究結果および考察

1. 照射試料の配置と線量分布

牛肝臓試料 (25g, 厚さ約 14mm) の中心に、アラニンペレットを封入し、ガスバリア袋で包装後、発砲スチロール容器 (外径 (436 mm(縦) × 276 mm(横) × 136 mm(奥行き))、内径 (400 mm(縦) × 240 mm(横) × 100mm(奥行き)) の蓋の裏側に密着するように 10 配置し、背面からドライアイス当てることを想定してクッションで押さえた (図 1)。これを模擬

試料として肝臓試料の距離方向の中心位置を、図 2 に示すように、照射室内の線量率の基準線とあわせて設置した。

模擬試料の照射による線量分布の検討は A: 試料箱を図 1, 2 に示すような縦長に設置し、試料を反転させずに一方向から照射、B: 試料箱を横長に設置して、照射時間の半分の時間で、同位置に置いて試料の前後を 180 度回転させ両面から照射 (その際の試料の高さの中心位置はコバルト線源の中心位置 (22.5cm) に合わせた) の 2 通りの方法で実施した。

A、B、2 種類の照射方法で、約 10kGy を目標として実施した際の、各位置の牛肝臓の中心および背面での吸収線量 (kGy) を図 3 に示す A に示した、縦長方向での配置では、コバルト線源中心 (高さ 22.5cm) から上下方向に離れるにつれ、線量が低下し、肝臓中心の線量測定した 10 個の試料の線量の最大/最小比は、1.08 であった。また、試料の向きを変えない一方向からの照射では、線源に対して、後方となる試料表面の線量は、肝臓の中心位置に対して、90~95% に減少していた。そこで、殺菌効果検討における線量分布の幅をより小さくするため、図 3 の B のように試料箱を横長方向に設置し、さらに距離方向の線量のばらつきを緩和するため、照射時間が半分経過したところで、肝臓試料を反転させて、両面照射を行った。その結果、肝臓中心における 10 個の試料の線量の最大/最小比は 1.05 に減少し、1

つの試料内の線量はほぼ均一で、表面に対する中心の線量は、最も離れている場合でも、98%に減少する程度であった。10個の試料の中心部および試料表面も含めた全体の分布は、9.65～10.2 kGyの範囲であり、最大/最小線量比は1.06であった。

2. 牛肝臓中における *Salmonella* の死滅効果

牛肝臓に接種した 10^6 cfu/g オーダーの *Salmonella* をドライアイス下、10kGy までの線量で低減させることができるか否かを検討した。接種菌数を 2×10^6 cfu/g ($6.3 \log$ cfu/g) とし、試料箱の上段に脱気試料5検体、下段に含気試料5検体を取り付け、前項で検討したB(横置き、両面照射)の方法で模擬試料を照射したときと同等の配置、時間で10kGyを目標として照射を行った。図4に、各照射位置での検出結果を示す。脱気試料は、5検体中2検体、含気試料は、5検体中1検体で *Salmonella* が非検出となった。なお、この時の照射では、幅約47cmの試料箱を板上線源の正面に平行に設置して左右方向にほぼ均一の線量を得ている。参考として、この箱の両脇に同様に箱蓋裏に同型の試料を取り付けた試料箱を設置して照射したときの各試料の線量は、試料中心で、9.8～12.3 kGy と広範な分布となった。これは、照射室内の線量分布ライン(曲線)と箱内試料の試料位置(直線)が合わず、同一線量分布の曲線より、線源に近い部分の線量が高くなったた

めである。この線量分布域に、 2×10^5 cfu/g ($5.3 \log$ cfu/g) の *Salmonella* 接種試料10個において、ガンマ線照射を行った結果は、10検体すべてで不検出となった。また、 2×10^7 cfu/g ($7.3 \log$ cfu/g) 接種試料では、線量の高い位置(模擬試料の中心線量、12.3、11.8、11.7 kGy)において、3検体が、*Salmonella* 非検出となった。

先行研究において、 10^8 cfu/g オーダーの *Salmonella* を接種した脱気試料を、ドライアイス下5kGyまで照射して、生残菌数を計数し、その対数を直線回帰して得た生残曲線と、その95%予測信頼区間のプロットを図5に示す。この生残曲線に95%予測信頼区間を考慮して、10kGyの線量で死滅が期待できる菌量は、 $6.2\sim 7.5 \log$ cfu/g、また $6.0 \log$ cfu/g の菌数低減が可能な予測値の範囲は、8.0～9.8 kGy と予測される。

今回の実験の条件、線量9.65～10.2 kGy、接種菌数 $6.3 \log$ cfu/g、において、非検出の検体と検出の検体が混在する結果はほぼ妥当なものと推測された。今後、さらに、この予測曲線の境界を挟んで、照射試験を行い、 $10^5\sim 10^7$ cfu/g オーダーの *Salmonella* を不活性化させる線量を、明確にして行く必要がある。なお、 $10^5\sim 10^7$ cfu/g オーダーの *Salmonella* を死滅させる線量の研究結果を踏まえ、流通を念頭に置いた試料の形態による殺菌効果の検証も必要である。

D. 結論

牛肝臓に 2×10^6 cfu/g の *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を接種し、9.65 ~ 10.2 kGy の範囲のガンマ線を照射したところ、脱気試料は、5 検体中 2 検体、含気試料は、5 検体中 1 検体で *Salmonella* が非検出となったが、残りの検体では *Salmonella* が検出された。先行研究で得た生残曲線に 95% 予測信頼区間を設けた結果を基に線量を検討することは妥当と考えられた。

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) 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

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

なし

H. 知的財産権の出願，登録状況

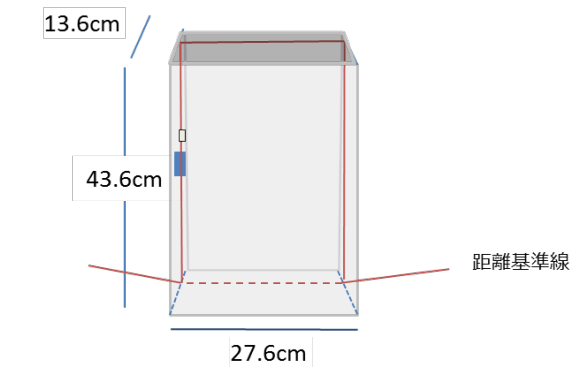
なし



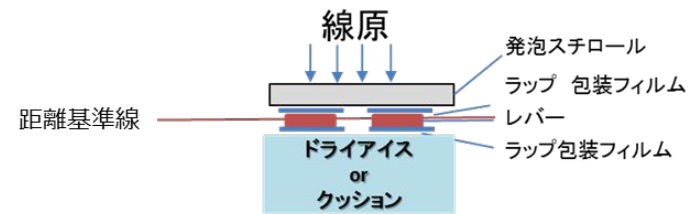
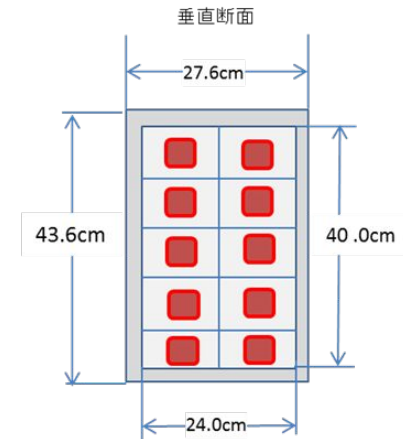
図 1. 発砲スチロール容器に貼り付けたレバー試料（写真）と箱内での模式図

奥行き 10mm の箱の空隙には、模擬試料照射時（室温）ではクッション材を
試料照射時（冷凍）条件では、ドライアイスを詰めた。
レバー中心と表面には、密封したアラニンペレット線量計を装着。

線源



[試料箱]
外形 436 x 276 x 136 mm
内形 400 x 240 x 100 mm
発泡スチロール厚さ 18mm

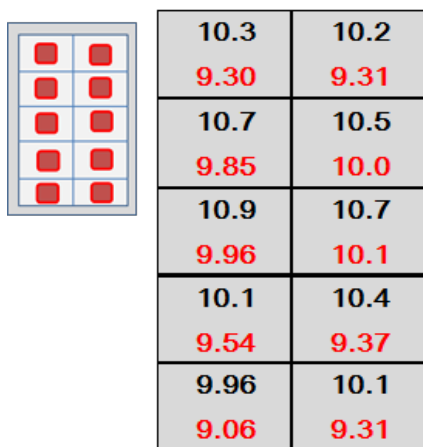


水平断面(上から見た図)

図 2 照射室内での試料箱の設置と基準位置(線源からの距離方向の位置合わせ)

容器蓋裏に密着させた牛肝臓の距離方向(奥行き方向)の中心線を線源からの照射距離位置にあわせている

A. 試料を縦置きして片面照射
射



B. 試料を横置きして両面照射

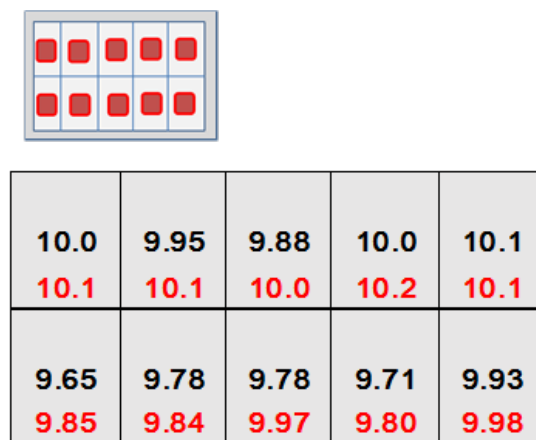


図3. 牛肝臓試料(25g 厚さ約 14mm)を 10 個配置した際の線量分布の比較

厚さ約 14mm 25g の牛肝臓を、24cmx40cm の範囲に 10 個配置、高さ方向の中心は、A.B いずれも 22.5cm とした。

A.B.図内の数字は、黒字(試料中心)赤字(試料表面:A においては線源より遠方)に装着した線量計の吸収線量(kGy)

位置番号	①	②	③	④	⑤
青 (表面)	10.1	10.2	10.1	10.1	10.2
中心	10.0	9.95	9.88	10.0	10.1
赤 (表面)	10.1	10.1	10.0	10.2	10.1
位置番号	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
青 (表面)	9.78	9.87	9.94	9.91	9.97
中心	9.65	9.78	9.78	9.71	9.93
赤 (表面)	9.85	9.84	9.97	9.80	9.98

図 4 . *Salmonella* 摂取牛肝臓試料の殺菌試験の結果
(接種菌数 : 2×10^6 cfu/g)

上段 (~) : 脱気試料、下段 (~) : 含気試料
色付けしたセルの場所の試料で、*Salmonella* 不検出となった。

各番号のセルは試料箱内の試料位置を示し、セル内の数値は、
模擬試料を照射した際の吸収線量 (kGy) を示す。

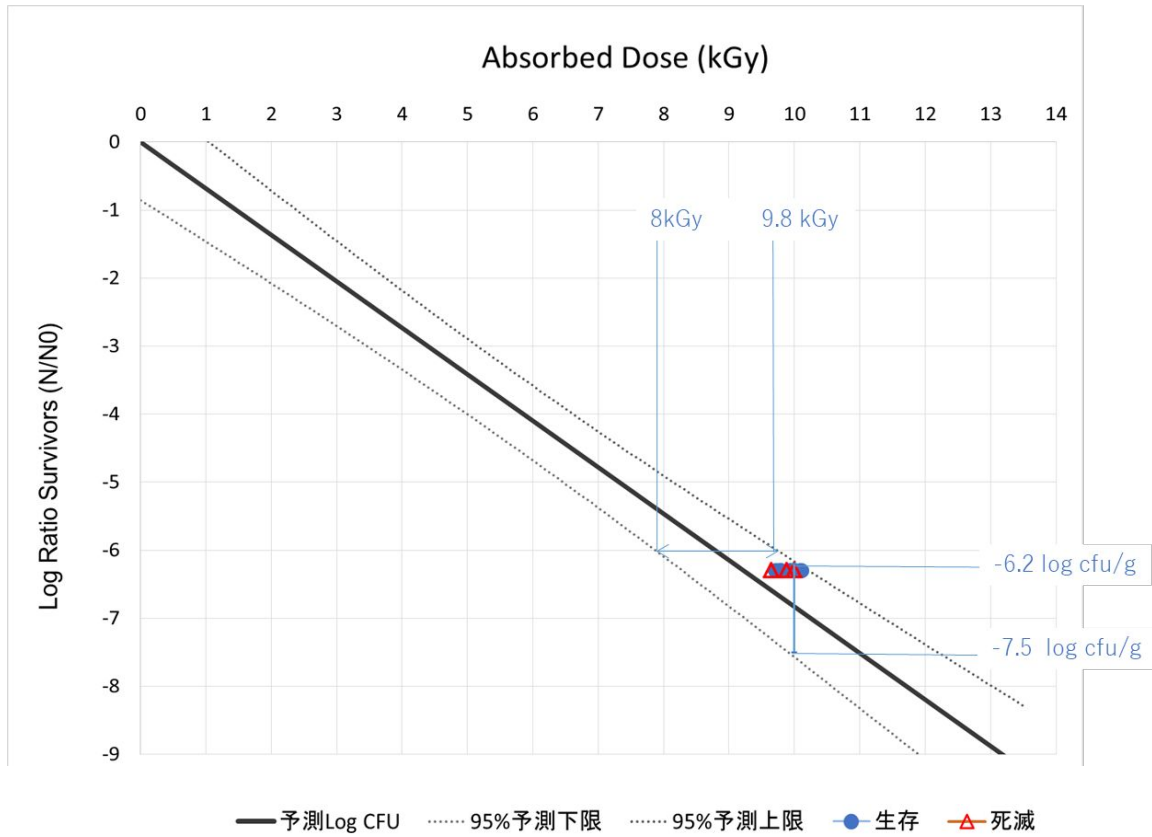


図5 *Salmonella* の死滅予測曲線

図中プロットは、図4で示した、 2×10^6 cfu/g を接種した牛肝臓の吸収線量と殺菌試験結果