

平成 29 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

研究協力者：清藤 一 国立研究開発法人 量研機構 高崎量子応用研究所

研究要旨： 牛肝臓に  $10^5 \sim 10^7$  CFU/g の *Escherichia coli* O157 DT66 株もしくは *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を接種し、4.0~8.1、8.0~12.3 kGy の範囲のガンマ線を照射した場合での生残試験を行った。昨年度までの研究で得た生残曲線に予測信頼区間を設け、その予測信頼区間上限の結果から、*E. coli* O157 の場合は、5.3~5.5 kGy、*S. Enteritidis* の場合 8.2~8.5 kGy の照射により 95% から 99% の信頼度で  $10^5$  CFU/g を低減させることが可能であると考えられ、ガンマ線による照射試験の結果はその予測を反映していた。

#### 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。これまでの研究において *E. coli* O157 ならびに *S. Enteritidis* の牛肝臓中での線照射に対する生残曲線について検討してきており、既

知の線照射量でどのくらいの殺菌効果が認められるかを推定可能とした。

本研究では、仮に *E. coli* O157 ならびに *S. Enteritidis* が高濃度汚染として牛肝臓内に存在した場合、推定されたガンマ線量で低減化が可能となるのか、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、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、*E. coli* O157 DT66 株ならびに *S. 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、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(量研、高崎研)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当て、全体を発泡スチロールの容器に入れ、前面から照射を行った。照射時

間の半分で肝臓試料を裏返し、両面照射を行った。線量率は約 2.5 kGy/h であった。

毎時の吸収線量の確認は、照射試料の外箱の基準位置にアラニン線量計(アミノグレイ、日立電線株式会社)取り付け、量研、高崎研が校正した検量線を用いた線量測定システムにより行った。このシステムにおける線量測定の不確かさは 3% である。

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 25 g 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、 $10^5 \sim 10^7$  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 x 120mm)を用いて脱気包装を行った。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 4 ~ 12 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 *E. coli* O157 および *Salmonella* 同定キット (Singlepath *E. coli* O157; Merck Singlepath *Salmonella*; Merck) に供し、典型集落が *E. coli* O157 もしくは *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 (25 g, 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、発泡スチロール容器 (外径 (436 mm(横) × 276 mm(縦) × 136 mm(奥行き))、内径 (400 mm(横) × 240 mm(縦) × 100 mm(奥行き)) の蓋の裏側に密着するように 2 段に 5 個ずつ計 10 個配置し、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)。この模擬試料入れた 3 つの試料箱 ~ それぞれを、肝臓試料の距離方向の中心位置を、図 2 上に示すように、照射室内の線量率の基準線とあわせ、試料箱の高さ方向の中心位置はコバルト線源の中心位置 (22.5 cm) に合わせて設置した。この模擬資料について約 10 kGy の照射を行った。その際、均等な照射を行うため、照射時間の半分の時間で、同位置において肝臓試料の前後を 180 度回転させ、両面から照射を行った。

図 2 下段に、各試料箱中に配置した、各資料箱中の 10 個の試料の中心部および試料表面の線量測定の結果を示す。試料中心および両表面に取りつけた線量計の吸収線

量はほぼ等しく、肝臓試料の厚さ方向を中心反転させる両面照射で、いずれの肝臓試料 (25 g) においても、ほぼ均一な線量分布が得られていることが確認された。

照射室の両脇に配置した箱 および箱では、肝臓試料中心の線量は、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。

線源正面に配置した試料箱 における 10 個の肝臓試料の中心部および表面も含めた全体の分布は、9.65~10.2 kGy の範囲であり、箱内での線量分布の最大/最小線量比は 1.06 と得られた。また、箱外側の基準位置で測定した線量は、9.88 kGy であり、これを 1 とすると、肝臓試料の線量比は 0.977~1.03 となり、箱 の設置位置での照射は、十分に均一な線量分布が確保出来るものと判断し、以降、基本的にこの設置位置を使って両面照射による微生物試験を行った。

#### 2. 牛肝臓中における *E. coli* O157 ならびに *Salmonella* のガンマ線による殺菌効果

牛肝臓に接種した  $10^4 \sim 10^7$  CFU/g の *E. coli* O157 ならびに  $10^5 \sim 10^7$  CFU/g の *Salmonella* をドライアイス下、脱気包装条件において規定の線量で死滅が可能を検討した。図 3, 4 に *E. coli* O157 および *Salmonella* の線照射による推定死滅曲線と、その 95% および 99% 予測信頼区間を示した。すなわちこの信頼区間以上の条件で線を曝露すると、その信頼度で低減可能であると予想された。これを確認するため、*E. coli*

O157 ならびに *Salmonella* の菌液を  $10^{5-7}$  CFU/g の濃度となるよう接種した牛肝臓について、様々な線量で曝露した際の検出結果を同図上に示した。

図 3 に *E. coli* O157 の検出結果を示した。予想通り、95%信頼区間内では生残する検体が確認され、この区間内では死滅と生存の境目にあると考えられた。また、95%信頼区間外の高い線量曝露域では全ての検体で不検出となった。図 4 では *Salmonella* についての検出結果を示した。ここでは、前項の箱の設置位置で接種菌数と線量を変えた 5 検体の判定結果に加え、箱

の位置に  $2 \times 10^5$  または、 $2 \times 10^7$  CFU/g の *Salmonella* を接種した際の 1 検体ごとの検出結果を合わせてプロットしている。*Salmonella* においても同様に 95%信頼区間内では生残する検体が確認され、99%信頼区間外の高い線量曝露域では全ての検体で不検出となった。

仮に  $10^5$  CFU/g の *Salmonella* を 95%および 99%予測信頼区間で低減するのであれば、8.2~8.5 kGy の照射により達成が可能であり、この現象を接種回収試験により確認できた。

このようにこれまでの研究成果にて得られた生残曲線に 95%および 99%予測信頼区間を設け、その結果を基にガンマ線曝露線量を決定することが妥当と考えられた。

### 3. 自然汚染試料におけるガンマ線照射予備試験

非接種区においてもガンマ線の菌数低減効果を確認するため、その予備的検討を行った。1 頭分の牛肝臓から切り分けた 5 個の非接種検体について、ドライアイス下脱

気包装にて 7 kGy 照射し、1 晩増菌後に、標準寒天平板および VRBG 平板で検出した結果は、すべて陰性であった。なお、この肝臓の照射前の微生物試験結果は、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数について、それぞれ、 $3.8 \times 10^4$ 、 $3.8 \times 10^4$ 、 $9.7 \times 10^4$ 、 $3.6 \times 10^4$  CFU/g、であった。今後、さらに、自然汚染試料についての殺菌効果の確認を行うとともに、流通を念頭においた試料の形体における商業照射施設での照射における線量分布の検証が必要である。

### D. 結論

牛肝臓に  $10^5 \sim 10^7$  CFU/g の *Escherichia coli* O157 DT66 株もしくは *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を接種し、4.0~8.1、8.0~12.3 kGy の範囲のガンマ線を照射し、死滅するか否かの確認を行った。昨年度までの研究で得た生残曲線に予測信頼区間を設け、その予測信頼区間上限の結果から、*E. coli* O157 の場合は、5.3~5.5 kGy、*S. Enteritidis* の場合 8.2~8.5 kGy の照射により 95%から 99%の信頼度で  $10^5$  CFU/g を死滅させることが可能であると考えられ、ガンマ線による曝露試験の結果はその予測を反映していた。

### 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

- 1)川崎晋、齋藤美枝、持田麻里、等々力節子、牛肝臓内部における *Campylobacter jejuni* の線照射による殺菌効果, 日本食品科学工学会誌、印刷中

講演・研修会等

なし

H. 知的財産権の出願，登録状況

なし

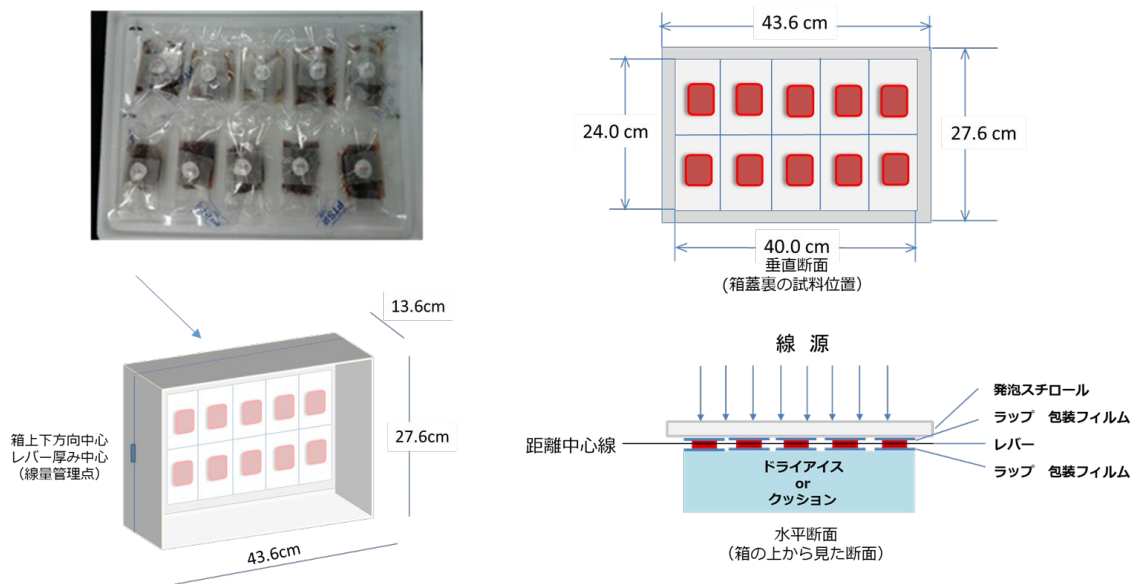
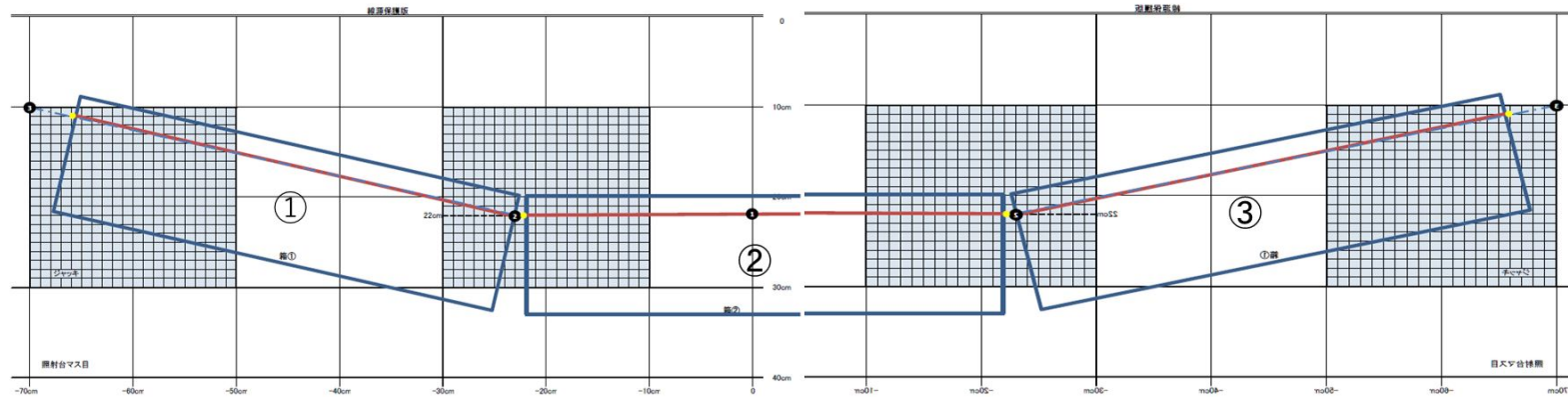


図 1. 発泡スチロール容器に貼り付けたレバー試料(写真)と箱内での模式図

奥行き（深さ）10cm 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、ドライアイスを含めた。

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  
試料中心の位置を線源からの距離の基準位置に合わせた。

# 線 源



箱①

| 位置番号 |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|
| 表面   | 12.5 | 12.4 | 11.9 | 11.2 | 10.5 |
| 中心   | 12.1 | 12.1 | 11.4 | 10.8 | 10.4 |
| 表面   | 12.4 | 12.3 | 11.7 | 11.0 | 10.6 |
| 位置番号 |      |      |      |      |      |
| 表面   | 11.7 | 12.0 | 11.3 | 10.8 | 10.2 |
| 中心   | 11.4 | 11.7 | 11.3 | 10.8 | 10.2 |
| 表面   | 11.7 | 11.7 | 11.4 | 10.9 | 10.2 |

箱

| 位置番号 |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|
| 表面   | 10.1 | 10.2 | 10.1 | 10.1 | 10.2 |
| 中心   | 10.0 | 9.95 | 9.88 | 10.0 | 10.1 |
| 表面   | 10.1 | 10.1 | 10.0 | 10.2 | 10.1 |
| 位置番号 |      |      |      |      |      |
| 表面   | 9.78 | 9.87 | 9.94 | 9.91 | 9.97 |
| 中心   | 9.65 | 9.78 | 9.78 | 9.71 | 9.93 |
| 表面   | 9.85 | 9.84 | 9.97 | 9.80 | 9.98 |

箱

| 位置番号 |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|
| 表面   | 10.5 | 11.1 | 11.9 | 12.6 | 12.8 |
| 中心   | 10.5 | 10.8 | 11.7 | 12.2 | 12.3 |
| 表面   | 10.4 | 11.0 | 11.7 | 12.6 | 12.7 |
| 位置番号 |      |      |      |      |      |
| 表面   | 10.1 | 10.5 | 11.3 | 11.7 | 12.1 |
| 中心   | 9.80 | 10.3 | 11.0 | 11.6 | 11.8 |
| 表面   | 10.1 | 10.4 | 11.2 | 11.7 | 12.1 |

図2. 試料箱 ~ の設置位置と試料箱内に配置した肝臓試料(10個)の中心および表面での吸収線量

箱 の外箱に取りつけた基準位置の線量計の吸収線量は 9.88 kGy これを 1 とすると箱内の肝臓試料の線量比は 0.977 ~ 1.03 の範囲。

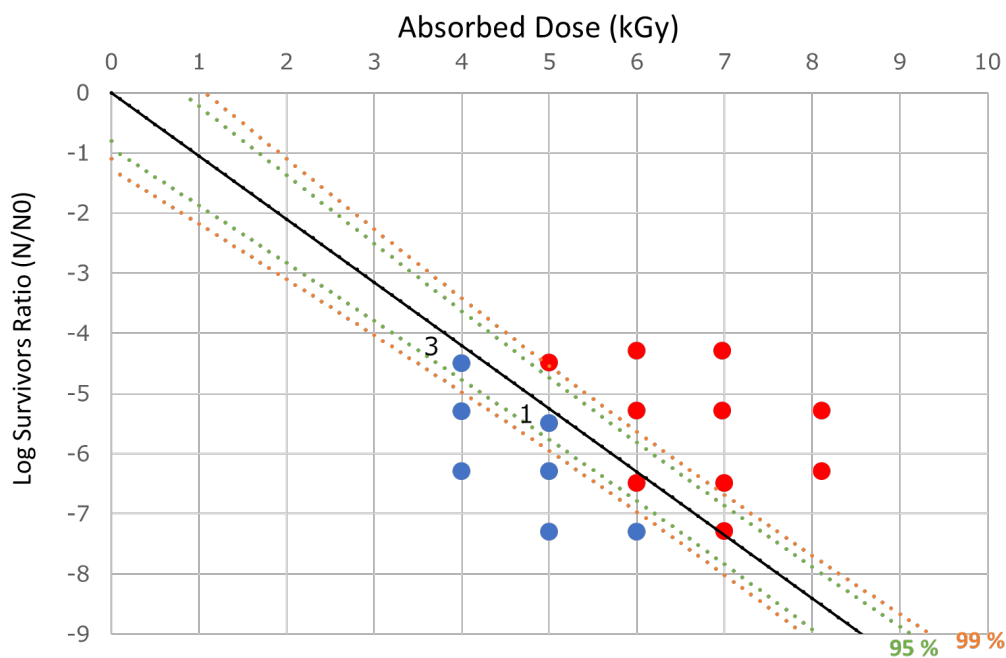


図3. *E. coli* 0157 の推定死滅曲線およびその95% ( ... ) , 99% ( ... ) 予測信頼区間と、実際の接種試験区での生残判定結果.

... 95%, ... 99%予測信頼区間

供試5検体中のすべてから検出されず

供試5検体中、生残検体有り。添え数字は生残検体数、無記載は5検体生残



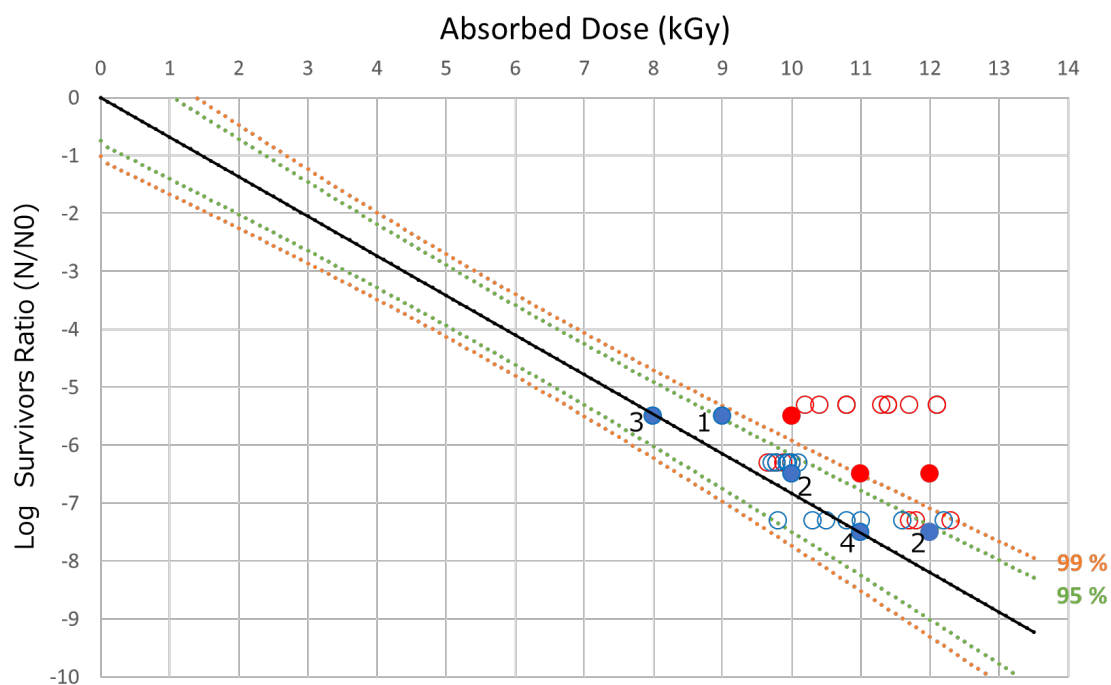


図 4. *Salmonella* の推定死滅曲線および 95%, 99% 予測信頼区間による死滅曲線と、実際の接種区での生残判定結果.

..... 95%, ..... 99% 予測信頼区間

供試 5 検体中のすべてから検出されず (設置位置 )

供試 5 検体中生残有り。添え数字は生残検体数 (設置位置 )

不検出 (1 検体ごとの判定)

生残 (1 検体ごとの判定)

