

42 放射線照射食品の微生物学的安全性に関する研究（第1報）

照射および非照射魚肉におけるボツリヌスE型菌の汚染レベルについて

北海道立衛生研究所

安藤 芳明 亀山 邦男
唐島田 隆

緒 言

近年原子力平和利用の一環として、放射線照射による食品の殺菌貯蔵の研究開発が進み、アメリカをはじめとしてカナダ・ソ連などにおいてはすでに実用化の段階に達している。例えば発芽防止を目的とする玉ねぎ・馬鈴しょの照射、あるいは完全殺菌を目的とするハムおよびベーコンの照射などがそれである。

通常食品の殺菌を目的とする照射においては、それぞれの目的と照射線量に応じて次の3通りの処理法が考えられている。

(1) 完全殺菌 (Radappatization)；あらゆる細菌の殺滅を目的とする。線量、4~6 Mrad*。

(2) 病原菌殺菌 (Radicization)；主として病原細菌（サルモネラ・赤り菌等）の殺滅を目的とする。線量、0.3~1.0 Mrad。

(3) 放射線パスツーリゼイション (Radurization)；通常腐敗菌の殺滅ないし減少を目的とする。線量、0.05~1.0 Mrad。

放射線殺菌法の最大の利点は、温度をかけないいわゆる冷殺菌法であり、従来の缶詰食品にみられた高温処理による変性がみられないことである。しかしながら上記(1)の完全殺菌においては、ボツリヌスA型菌芽胞の殺滅を基準にしたいいわゆる12D線量を用いているので、かなりの高線量を必要とし、それにともなう電離放射線による食品成分の二次的変化（例えば照射臭の発生など）は避けられない。そこで最近では(3)による処理、すなわちパスツーリゼイションによって、一般腐敗細菌を殺滅または減少するに十分な低線量を照射することによって、食品の成分変化をなるべく少なくすると同時に保存効果を高めようとする研究が行なわれている。

水産食品の照射においては、この放射線パスツーリゼイションがもっとも効果的かつ実用的とされている。したがってこの分野における研究開発は、今後日本においても大いに期待されねばならない。ただここで問題となるのは、そのような低線量照射食品の微生物学的安全性——とくにボツリヌスE型菌の危険性に関して——についてである。

ボツリヌスE型菌が、照射水産食品の安全性の上でとく

に重要性をもつと思われる理由は、いうまでもなく本菌がA型またはB型菌と同様にもっとも危険な食中毒原因菌であり、しかも水産食品と密接な関係を有しているからである。すなわち、わが国におけるE型中毒発生例のほとんどが魚の「いすし」によるものである。またボツリヌスE型菌の北海道における分布調査結果¹⁾によると、海岸砂試料中に18.8%の検出率で本菌の存在が証明されている。したがって魚が本菌によって汚染される可能性はきわめて大きいといわねばならない。

一方E型菌芽胞は、A型またはB型菌芽胞にくらべて放射線抵抗性が低いといわれている^{2) 3) 4)}。しかし実際食品中においては、E型菌は0.5 Mrad程度の低線量照射ではなお生き残る可能性が大きく、また比較的の低温においても発育し得ることから、照射後の保存温度や安全性の点でお多くの問題点があると思われる。

本研究は水産食品の低線量照射において、とくにボツリヌスE型菌に対する安全性を明らかにするため着手されたものである。今回はその手始めとして、北海道産魚類数種について、低線量照射(0~0.3 Mrad)を行なった後一定温度に保存して、E型毒素の発生検出率をしらべたので以下これについて報告する。

実験材料と方法

1. 実験材料 北海道沿岸各地で漁獲された直後の新鮮な魚（カレイ・ハタハタ・スケトウタラ・ニシン）を、同一種について各10匹（ハタハタのみ20匹）を採取し、おののおのポリエチレン袋に入れた上アイスボックスに容れて実験室に持ち帰り、直ちに照射用試料を調製した。各魚種による採取場所、採取日、体重差などを示すと第1表のとおりである。

2. 照射用試料の調製 試料の調製においては、無菌操作を行なうため、使用する容器・器具類はすべてあらかじめ高圧滅菌しておいた。採取した魚はおののおの肉質部と内臓にわけ、肉質部50gを秤取してホモジナイザーカップに入れる。これに故意に汚染させるため胃および腸内容物を少量加える。さらに滅菌水50mlを加えて氷冷下数分間ホモジナイズする。このホモジエネート（2倍）を綿栓付試験管（18×150mm）に10gずつ分注し、1個体より全部で6本の試料を作製する。調製した試料は翌朝照射するまで0~4°Cに保存した。

* 照射線量の単位。1 Mrad=10⁶ rad

第1表 魚類採取データ

魚種 No.	採取場所	採取年月日	平均体重 g
カレイ 1	稚 内	43. 7. 26	153
" 2	釧 路	43. 8. 10	198
" 3	函 館	43. 8. 24	367
" 4	紋 別	43. 9. 7	144
" 5	浦 河	43. 9. 15	201
ハタハタ 1	函 館	43. 9. 7	79
" 2	釧 路	43. 9. 28	108
" 3	小 樽	43. 10. 24	109
" 4	浦 河	43. 10. 29	54
" 5	紋 別	43. 11. 21	79
スケトウタラ 1	稚 内	43. 11. 2	481
" 2	浦 河	43. 12. 3	591
" 3	札幌(市販)	43. 12. 9	377
ニシメ 1	釧 路	43. 11. 14	164
" 2	"	43. 12. 12	184

3. 照射 北海道大学 RI センター所属コバルト60(約1,800 Ci) 照射装置を用いてガムマ線照射を行なった。線量測定は Fricke 法によった。照射量は 0, 0.1, 0.3 Mrad とし、照射中の温度は 0 ~ 4 °C に保った。

4. 保存条件 照射の終了した試料は、各線量ごとに 2 群に分け、10°C および 20°C の恒温器に容れ、それぞれ 2 週間および 3 日間保存した。

5. 毒性試験 一定期間保存した試料に、0.1 M リン酸バッパー (pH 6.0) 10 ml を加えてよくかき混ぜ、さらに、2,000 rpm、20 分間遠心分離する。上清をとりこれに同量の 0.2% トリブシン (Difco 1 : 250) 液を加えて、37°C で 1 時間インキュベートする。次に同量の 0.2% ゼラチン加・リン酸バッパー (pH 6.0) でうすめて、その 0.5 ml を 2 匹ずつのマウスに腹腔内注射する。48 時間まで観察して典型的のボツリヌス中毒症状を呈して死亡したものについては、あらためて E 型抗毒素血清による中和試験を行ない、E 型毒素によるものであることを確認した。

6. 接種試験 *Clostridium botulinum* type E Strain Iwanai を TPG 培地* に 40 時間培養して得た非洗浄芽胞を、非加熱ショックのまま使用した。芽胞数のカウントには、ポークインフュージョン寒天を入れた試験管 (18 × 180 mm) を用いた。あらかじめ一定菌数となるように稀釀しておいた芽胞液を、等量のカレイ肉 (ボツリヌス E 型菌による汚染のないことを前もってチェックしておく) とホモジナイズして、前述のようなホモジェネートを調製する。これをそれぞれ 10 g ずつ分注した試験管を、前述の条

件で照射および保存する。同様に毒性試験を行ない E 型毒素の有無を確かめる。

結果および考察

1. 接種試験 魚肉試料を照射した場合、どの位の数の芽胞で汚染されていたとき、毒素産生が検知されるかを知るため、まずボツリヌス E 型菌芽胞を接種したカレイ肉を用いて照射および保存試験を行ない、E 型毒素の発生有無をしらべた。その結果は第 2 表に示すとおりである。

第2表 接種試験

芽胞数 個/管	照射量 Mrad	マウス 毒性 *			
		10 °C		20 °C	
		a.	b.	a.	b.
0	0	○ ○		● ●	● ●
	0.1	○ ○		○ ○	○ ○
	0.3	○ ○		○ ○	○ ○
	0	○ ○		● ●	● ○
	0.1	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
	0.3	○ ○		○ ○	○ ○
1	0	● ●	○ ○	● ●	● ○
	0.1	● ●	○ ○	● ●	○ ○
	0.3	○ ○		● ●	○ ○
	0	● ●	○ ○	● ●	● ○
	0.1	● ●	○ ○	● ●	○ ○
	0.3	○ ○		● ●	○ ○
10	0	● ●	○ ○	○ ○	● ○
	0.1	● ●	○ ○	● ●	○ ○
	0.3	○ ○		● ●	○ ○
	0	● ●	○ ○	○ ○	● ●
	0.1	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
	0.3	○ ○		○ ○	○ ○
10^2	0	● ●	○ ○	○ ○	● ○
	0.1	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
	0.3	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
	0	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
	0.1	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
	0.3	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
10^3	0	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
	0.1	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
	0.3	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
	0	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
	0.1	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
	0.3	● ●	○ ○	○ ○	○ ○

* a ; 試料のみの毒性, b ; 中和抗血清添加試料の毒性

○ ; マウス生, ● ; マウス死

室温(20°C)に保存した試料では、中和試験においてもマウスの死亡するものがあったが、その発症状況からみて明らかに非ボツリヌス性毒素によるもので、これらはとくに非照射試料にみられた。これは Segner ら¹³ も指摘するように、細菌の二次的感染症によるものと考えられる。本実験においては、本試験で 2 匹とも死亡し、かつ中和試験により 2 匹とも生き残ったものを、一応 E 型毒素陽性とした。第 2 表の結果によると、芽胞数が 1 個/管では、20°C 保存の場合どの線量でも毒素は検出されなかつたが、10°C 保存の場合 0.1 Mrad で毒素が検出され、0.3 Mrad では検出されなかつた。さらに芽胞数が 10 個/管以上では、両温度とも 0.1 Mrad ではすべて毒素が検出され、0.3 Mrad では、芽胞数 10 個/管、10°C 保存の場合を除いてすべて毒素が検出された。

以上の実験結果から考察すると、本実験に使用する魚肉ホモジネートに少なくともグラム当り 1 個 (10 個/管) 以上の芽胞が存在すれば、本実験の条件下では毒素産生の起

* TPG 培地 : BBL Trypticase 5%, Difco Bactopeptone 0.5%, Glucose 0.4%, Na-thioglycollate 0.05%

ることが分る。

ボツリヌスE型菌芽胞のD値*について、実験者によって値がかなり違うが、岩内株について次の値が報告されている。

(D値)	(媒体)	(報告者)
0.125 Mrad	ビーフンチュー	Schmidt ら ²⁾
0.075 "	水	Roberts ら ³⁾
0.156 "	水	著者ら ⁴⁾

これらの値を採用して0.3 Mradにおける生残数を算出すれば、接種数10個/管の試料では1個/管以下に減少するはずである。そしてこの程度の芽胞数では、非照射試料でさえ毒素産出は認められなかった。ところが実際10個/管以上の接種試料で毒素産生が認められるることは、照射により生き残った芽胞がかなりあり、それが発育して毒素を產生したものと考えられる。このことは実際問題として重要である。その原因の一つとしては、魚肉中に存在する放射線保護作用物質の影響が考えられる。

また本実験の結果から明らかのように、0.1 Mrad照射試料では非照射試料にくらべて毒素産生が起りやすいようである。これについてはすでにCannら⁵⁾によても報告されている。著者ら⁴⁾によると、これは照射中の魚肉における酸化還元電位の低下に関係するものと考えられる。

2. 各種魚肉の照射および保存試験 北海道産魚類4種について、照射および保存試験を行ない、ボツリヌスE型毒素の発生率をしらべた。その結果は第3、4表に示すとおりである。

これらの結果によると、どの魚でも0.3 Mrad照射したものでは毒素はまったく検出されなかった。しかし非照射および0.1 Mrad照射試料ではE型および非E型毒素とも検出された。検出率は照射量によって明らかに異なるが、今回の実験では非照射と0.1 Mrad照射試料との間に有意差は認められなかった。また同一照射量でも保存温度による有意差もみられなかった。魚種別にみると、ハタハタがもっとも高く(8%)、次いでカレイ、ニシンの順で、ス

第3表 各種魚類照射試験*

試料名 No.	照射量Mrad	0		0.1		0.3	
		10	20	10	20	10	20
カ レ イ	1	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)
	2	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)
	3	0/10 (0/10)	2/10 (2/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)
	4	0/10 (1/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	1/10 (1/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)
	5	0/10 (1/10)	0/10 (3/10)	0/10 (1/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)
ハ タ ハ タ	1	0/20 (20/20)	0/20 (20/20)	4/20 (10/20)	2/20 (4/20)	0/10 (0/20)	0/20 (0/20)
	2	0/20 (12/20)	0/20 (16/20)	6/20 (2/20)	12/20 (12/20)	0/20 (0/20)	0/20 (0/20)
	3	0/20 (0/20)	0/20 (0/20)	0/20 (0/20)	0/20 (0/20)	0/20 (0/20)	0/20 (0/20)
	4	4/20 (10/20)	2/20 (8/20)	0/20 (0/20)	0/20 (0/20)	0/20 (0/20)	0/20 (0/20)
	5	0/20 (0/20)	0/20 (4/20)	0/20 (0/20)	0/20 (0/20)	0/20 (0/20)	0/20 (0/20)
ス ケ ト ウ タ ラ	1	0/10 (1/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)
	2	0/10 (0/10)	0/10 (2/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)
	3	0/10 (0/10)	0/10 (2/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)
ニ シ ン	1	1/10 (3/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)
	2	0/10 (0/10)	0/10 (1/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)

* E型毒素証明個体数／総個体数(管数)

() 内は毒性個体数(マウス2匹共死)／総個体数(管数)

* 90%致死線量

第4表 各種魚類におけるボツリヌスE型毒素検出度

試料名	照射量Mrad	0		0.1		0.3	
		10	20	10	20	10	20
カレイ	0/ 50	2/ 50	0/ 50	1/ 50	0/ 50	0/ 50	0/ 50
ハタハタ	4/100	2/100	4/100	8/100	0/100	0/100	0/100
スケトウタラ	0/ 30	0/ 30	0/ 30	0/ 30	0/ 30	0/ 30	0/ 30
ニシン	1/ 20	0/ 20	0/ 20	0/ 20	0/ 20	0/ 20	0/ 20
計	5/200	4/200	4/200	9/200	0/200	0/200	0/200

ケトウタラからは検出されなかった。

E型菌芽胞が魚肉にどの程度自然汚染されているかについては、あまり研究されていないが、最近 Goldblith ら⁸⁾がタラ肉についてしらべたところ、試験した試料の20%が0.17個/gの芽胞で汚染されていたという。われわれの今回の実験において、0.3 Mrad 照射で毒素が検出されず、0.1 Mrad 照射で検出される接種芽胞数より類推すると、第3表で毒素の検出された魚は、少なくとも0.5個/g以上の芽胞で汚染されていたものと考えられる。ハタハタは北日本沿岸で多獲される季節魚で、わが国においてボツリヌスE型中毒発生原因食品中もっとも多い「いわしお」としての主な原料魚である。本魚がE型菌による汚染度の高いことは、今回の著者らの実験によても裏付けられた。中毒発生防止の観点より、本魚とE型菌との関係について、さらに生態学的ならびに疫学的調査の望まれるところである。

結論

(1) ボツリヌスE型菌芽胞を0, 1, 10, 10², 10³個ずつ接種したカレイ肉2倍ホモジネート(10 g)入試験管を、それぞれ0, 0.1, 0.3 Mrad で照射した後、10°Cに2週間、20°Cに3日間保存してE型毒素の検出を試みた。その結果10²個/管以上の試料のすべてに毒素が認められたが、それ以下の試料では毒素の認められないものがあった。

(2) 北海道沿岸産魚類4種(カレイ、ハタハタ、スケトウタラ、ニシン)について、低線量照射(0, 0.1, 0.3 Mrad)を行ない、10°Cに2週間、20°Cに3日間保存してボツリヌスE型毒素の検出を試みた。その結果総数200匹中、非照射または0.1 Mrad 照射試料に平均2~4.5%の割合で毒素が含有されていた。最高は、ハタハタの8%であった。しかし0.3 Mrad 照射試料からはいづれも毒素は検出されなかった。

本研究は昭和43年度科学技術庁原子力利用委託研究(食品照射に関する基礎的試験研究)委託費の一部によって行なわれたものである。

本実験の照射実験は、北海道大学理工系ラジオアイソotopeセンター(主任坂本三郎教授)において実施された。

ここに深く謝意を表する次第である。

文 献

- 1) 小野悌二他: 北海道立衛生研究所報, 17, 1~12, 1967
- 2) Schmidt, C. F. et al.: J. Food Sci., 27, 77-84, 1962.
- 3) Roberts, T. A. & Ingram, M.: J. appl. Bact., 28, 125-141, 1965.
- 4) Ando, Y. et al.: Food Irradiation, Japan, Vol. 3, No. 1, 5-12, 1968.
- 5) Segner, W. P. & Schmidt, C. F.: Appl. Microbiol., 16, 1105-1109, 1968.
- 6) Cann, D. C. et al.: J. appl. Bact., 28, 431-436, 1965.
- 7) Ando, Y. et al.: Proc. of the UJNR Conference on Botulism, Hawaii 1968, (in press).
- 8) Licciardello, J. J. et al.: Appl. Microbiol., 15, 249-256, 1967.

42 Studies on Microbiological Safety of Irradiated Foods (Part 1)

On the Natural Level of Contamination of Irradiated and Non-irradiated Fish Flesh with *Clostridium botulinum* Type E.

Yoshiaki Ando, Kunio Kameyama,
and Takashi Karashimada
(Hokkaido Institute of Public Health)

Studies have been initiated to clarify the microbiological safety of irradiated fish, with special reference to *Clostridium botulinum* type E.

The present paper deals with the natural level of contamination of irradiated and non-irradiated fish flesh with this organism.

The results are summarized as follows:

- 1) Tubes of flat fish homogenate (2:1) inoculated

with 0, 1, 10^2 , 10^3 , and 10^4 spores of *Clostridium botulinum* type E, Iwanai were irradiated at 0, 0.1, and 0.3 Mrads. Toxin assay of each sample was carried out after storage at 10°C for two weeks and at 20°C for three days. Production of toxin was demonstrated in all of the samples inoculated with more than 10^2 spores, but was not in some of the samples inoculated with 10 and 1 spores.

2) Total 200 fish including four species (flat fish, Hata-hata, Alaska pollack, and herring) were collected from the coastal districts in Hokkaido. Tubes of homogenates made from each of these fish were subjected to gamma-irradiation at dosages of 0, 0.1, and 0.3 Mrads and subsequently storaged at 10°C for two weeks and at 20°C for three days. Average 2-4.5% of the total samples irradiated at either 0 or 0.1 Mrads were found to contain type E toxin and the highest percentage found in Hata-hata was 8%. No toxin was detected in any of the samples irradiated at 0.3 Mrad.