

放射線照射食品の微生物学的安全性 に関する研究 (第3報)

タラ切身におけるボツリヌスE型菌の接種試験

安藤 芳明 唐島 田隆

緒 言

前報¹⁾において、著者らはタラすり身にボツリヌスE型菌芽胞を接種して300Kradに照射した後、一定温度に保存して毒素産性状態を調べた結果、5℃保存の場合、照射および非照射試料とも毒素産性は全くみられないが、10℃保存の場合、非照射試料には毒素産生がみられないにもかかわらず、照射試料にこれがみられた。この際保存中のpHの変化をみると、非照射試料では急速に酸性側に低下するのに対して、照射試料ではあまり低下しないことから、おそらく照射による微生物相の変化に基づく糖→酸性成度の差異が、ボツリヌスE型菌の発育に影響を及ぼすのであろうと推察した。

今回の実験においては、すり身のような糖を人工的に加味した材料でなく、なまのタラ肉を用いて同様の実験を試み、ボツリヌスE型菌の発育と毒素産性に対する低線量照射効果を検討したので、以下これについて報告する。

実験方法

芽胞液の調製：使用ボツリヌスE型菌株、および芽胞液は、すべて前報¹⁾記載の方法により調製した。

照射用試料の調製：実験に供したタラ肉は、冷凍品または生鮮品で、いずれも市販の鮮度きわめて良好なものを使用した。厚さ約1cmの切身を作製し、これをあらかじめ紫外線殺菌したポリエチレン袋(70×100mm)に30gずつ無菌的に詰めた。袋に全部詰め終わった後、一旦0℃に冷却してから芽胞を接種した。ツベルクリン注射筒を用いて芽胞液を0.1mlずつ注射し、芽胞数が魚肉に対して10%および10%となるようにした。接種の終わった袋は直ちに熱シールした後、水を詰めたアイスボックスに入れて照射室に運んだ。

照射条件：上記接種試料はコバルト60ガンマ線照射装置を用いて、照射温度を5℃以下に保ちながら照射した。照射線量は300Kradとした。照射の終わった試料は、再びアイスボックスに入れて実験室に持参した。

保存条件：照射および非照射試料は、それぞれ2分して、一方は5℃、他方は10℃の恒温器に入れて保存した。

毒性試験：保存試料(袋詰3個につき1試料とする)は、一定時間毎にとり出してボツリヌスE型毒素の検出を行なった。まず毒素の抽出を行なうため、1袋の切身(30g)をホモジナイザーカップに全部あげ、これに冷0.2Mリン酸塩バッファー(pH 6.0)45mlを加えて氷冷下ホモゲナイズする。そのまゝ、一夜氷室に保存して毒素を完全に抽出する。翌朝冷却下遠心分離(10,000rpm, 10分)して透明な上清(2.5倍抽出液)を得る。さらにトリプシン活性化処理を行うためその2mlに2.5%(トリプシン1:250)0.5Mリン酸塩バッファー(pH 6.0)溶液0.5mlを加えて37℃に1時間インキュベートする。直ちに氷水をつけて反応を中止させた後、反応液の1mlに0.1%セラチン加0.1Mリン酸塩バッファー(pH 6.0)1mlを加えて毒性試験液とし、残りの1mlにはE型抗毒素血清(予研製)稀釈液1mlを加えて室温に1時間放置して中和試験液とした。両試験液は同時にDDY系マウス2匹ずつに、それぞれ0.5mlずつ腹腔内注射して72時間までの生死を判定した。本法においては、少くとも12.5MLD/gのE型毒素の検出が可能である。

品質試験：保存中における試料の品質変化を知るため、任意の試料1個について、一般生菌数、揮発性塩基性窒素、pH等を測定した。これらの測定方法は、すべて前報¹⁾記載の方法によった。

実験結果

実験1：照射用材料は、冷凍タラ切身を通気性ポリエチレン袋(市販普通品、厚さ0.03mm)に詰めた。

5℃保存の場合、照射および非照射試料の毒性試験の成績は、第1表に示すように、両者とも6週間を経過するも毒素産生は全く認められなかった。この期間中の品質試験の成績は、第2表に示すとおりである。これによると、pHは照射および非照射試料ともいちじるしい変化は認められないが、揮発性塩基性窒素は、非照射試料では1週間前後に、照射試料では4週間後

にいずれも急激に増加しており、また生菌数は照射によってかなり減少するが、2週間以後両者にあまり差はみられなくなった。

10℃保存中における毒性試験および品質試験の成績は、おのおの第3表および第4表に示すとおりである。10℃保存の場合、腐敗速度は5℃保存に比べてきわめて速く、非照射試料では5日以内に、照射試料では8日後に腐敗徴候が認められた。しかし、毒性試験の結果では、5℃の場合と同様に、照射および非照射試料とも20日間を経過するも毒素産生は全くみられなかった。

実験2：照射用材料は、生鮮タラ切身を非通気性ポ

リエチレン袋（ハイゼックス、厚さ0.07mm）に詰めた。

5℃保存中における毒性試験および品質試験の成績は、おのおの第5表および第6表に示すとおりである。前実験1の5℃保存の場合とは、同様の結果が得られ、毒素産生は両試料とも6週間を経過するも全く認められなかった。

10℃保存の場合、前実験とは全く異なる結果が得られた。すなわち、第7表に示す毒性試験の成績をみると、非照射試料では21日を経過するも毒素産生はみられないが、照射試料の方は12日目まで3個のうち1個に毒性が認められ、18日後では全部に毒性が認められて

第1表 照射および非照射タラ切身の5℃保存中における毒性試験（包装材；通気性ポリエチレン）

保存日数 (週)	非照射試料		照射試料	
	10 ² /g*	10 ⁴ /g	10 ² /g	10 ⁴ /g
2	0/3**	0/3	0/3	0/3
3	0/3	0/3	0/3	0/3
4	0/3	0/3	0/3	0/3
5	0/3	0/3	0/3	0/3
6	0/3	0/3	0/3	0/3

* 接種芽胞数/魚肉

** ボツリヌスE型毒素陽性個体/全試験個体数

第3表 照射および非照射タラ切身の10℃保存中における毒性試験（包装材；通気性ポリエチレン）

保存日数 (日)	非照射試料		照射試料	
	10 ² /g	10 ⁴ /g	10 ² /g	10 ⁴ /g
5	0/3	0/3	0/3	0/3
8	0/3	0/3	0/3	0/3
11	0/3	0/3	0/3	0/3
14	0/3	0/3	0/3	0/3
17	0/3	0/3	0/3	0/3
20	0/3	0/3	0/3	0/3

第2表 照射および非照射タラ切身の5℃保存中における品質変化（包装材；通気性ポリエチレン）

保存日数 (週)	非照射試料			照射試料		
	一般生菌数 (g当り)	揮発性塩基 性窒素(mg%)	pH	一般生菌数 (g当り)	揮発性塩基 性窒素(mg%)	pH
0	7.0×10 ⁵	10.1	6.5	1.7×10 ²	12.9	6.5
1	2.1×10 ⁸	87.0	7.3	1.0×10 ⁵	16.8	6.7
2	8.8×10 ⁸	154	6.7	1.2×10 ⁸	30.8	6.3
3	1.1×10 ⁹	202	7.7	2.0×10 ⁸	28.6	6.6
4	1.6×10 ⁹	213	7.3	7.0×10 ⁸	70.2	7.4
5	1.1×10 ⁹	216	7.9	5.1×10 ⁸	73.0	6.9
6	1.1×10 ⁹	278	7.6	1.0×10 ⁹	87.0	7.4

第4表 照射および非照射タラ切身の10℃保存中における品質変化（包装材；通気性ポリエチレン）

保存日数 (日)	非照射試料			照射試料		
	一般生菌数 (g当り)	揮発性塩基 性窒素(mg%)	pH	一般生菌数 (g当り)	揮発性塩基 性窒素(mg%)	pH
0	7.0×10 ⁵	10.1	6.5	1.7×10 ²	12.9	6.5
5	1.6×10 ⁹	140	7.3	2.8×10 ⁷	17.9	6.4
8	1.4×10 ⁹	154	6.5	3.0×10 ⁸	44.9	7.1
11	1.2×10 ⁹	151	6.8	5.9×10 ⁸	45.5	6.6
14	2.2×10 ⁹	207	7.0	2.9×10 ⁸	—	6.3
17	1.9×10 ⁹	207	7.2	6.4×10 ⁸	103	7.5
20	2.5×10 ⁹	280	7.6	7.0×10 ⁸	—	6.8

いる。一方品質試験の成績では、保存中のpHは、両試料とも同じ位の値で、しかも急激な変動を示していない。揮発性塩基性窒素、生菌数、官能検査等より判定すると、非照射試料は3日以後明らかに腐敗徴候が認められ、照射試料では9日目よりアミン臭が感ぜられ、12日目では明らかに腐敗徴候が認められた。(第8表)。

考 察

今回の2回の接種試験において、用いた包装材の性状によって明らかに異なる結果が得られた。通常のポリエチレン袋を用いた場合、照射後通気性があるため、

好気性菌の発育に有利な状態となるが、ポツリヌスE型菌の発育にはやゝ不利と考えられる。実験1ではこれを裏書きするように、5℃および10℃いずれの保存温度でも毒素産生はみられなかった。これに反して、非通気性ポリエチレン袋を使用した実験2においては、照射試料に好適な温度条件では毒素産生がみられた。

低線量照射した魚肉において、ポツリヌスE型菌の発育と毒素産生が促進される原因については、既に前報において論ぜられた。前回の実験においては、pHの低下による発育抑制効果と考えられたが、今回の実験結果では、pHの低下はみられないから、この現象に

第5表 照射および非照射タラ切身の5℃保存中における毒性試験(包装材;非通気性ポリエチレン)

保存日数 (週)	非照射試料		照射試料	
	10 ² /g	10 ⁴ /g	10 ² /g	10 ⁴ /g
2	0/3	0/3	0/3	0/3
3	0/3	0/3	0/3	0/3
4	0/3	0/3	0/3	0/3
5	0/3	0/3	0/3	0/3
6	0/3	0/3	0/3	0/3

第7表 照射および非照射タラ切身の10℃保存中における毒性試験(包装材;非通気性ポリエチレン)

保存日数 (日)	非照射試料		照射試料	
	10 ² /g	10 ⁴ /g	10 ² /g	10 ⁴ /g
6	0/3	0/3	0/3	0/3
9	0/3	0/3	0/3	0/3
12	0/3	0/3	0/3	1/3
15	0/3	0/3	0/3	2/3
18	0/3	0/3	1/3	3/3
21	0/3	0/3	2/3	3/3

第6表 照射および非照射タラ切身の5℃保存中における品質変化(包装材;非通気性ポリエチレン)

保存日数 (週)	非照射試料			照射試料		
	一般生菌数 (g当り)	揮発性塩基性窒素(mg%)	pH	一般生菌数 (g当り)	揮発性塩基性窒素(mg%)	pH
0	4.8×10 ⁴	16.0	6.7	1.1×10 ²	15.7	6.7
1	1.0×10 ⁸	105	7.4	3.8×10 ⁷	20.7	6.7
2	4.5×10 ⁸	129	7.3	1.6×10 ⁸	59.8	7.2
3	5.9×10 ⁸	134	7.4	3.6×10 ⁸	61.7	7.3
4	5.8×10 ⁸	154	7.3	2.7×10 ⁸	84.2	7.1
5	9.0×10 ⁸	112	7.4	3.3×10 ⁸	117	7.7
6	9.7×10 ⁸	196	7.6	2.6×10 ⁸	106	7.3

第8表 照射および非照射タラ切身の10℃保存中における品質変化(包装材;非通気性ポリエチレン)

保存日数 (日)	非照射試料			照射試料		
	一般生菌数 (g当り)	揮発性塩基性窒素(mg%)	pH	一般生菌数 (g当り)	揮発性塩基性窒素(mg%)	pH
0	4.8×10 ⁴	16.0	6.7	1.1×10 ²	15.7	6.7
3	2.7×10 ⁷	109	7.5	1.3×10 ⁶	17.4	6.7
6	1.4×10 ⁸	120	7.4	7.1×10 ⁷	27.5	6.8
9	1.7×10 ⁸	151	7.6	1.4×10 ⁸	36.2	7.0
12	2.2×10 ⁸	146	7.3	1.9×10 ⁸	68.2	7.2
15	6.8×10 ⁸	151	7.3	3.5×10 ⁸	117	7.6
18	1.0×10 ⁹	129	7.2	4.2×10 ⁸	—	7.2
21	1.0×10 ⁹	182	7.4	2.5×10 ⁸	126	7.6

よっては説明がつかない。これに関連して、Ekulundら²⁾(1970)は照射および非照射魚肉中の糖の保存中変化に着目し、これがボツリヌスE型菌の発育に影響を与えている。彼らの実験によると、イングリッシュソール切身を200 Kradに照射した後、5.6°Cに保存した場合、肉中グルコースおよびリボースの消失速度は、非照射コントロールに比べてきわめて遅いことがわかった。この現象は、照射による微生物相の変化に由来するもので、ボツリヌスE型菌に対して拮抗的に糖の消費が行なわれるため、照射と非照射試料における毒素産生に差異が生ずるものと説明している。

ボツリヌスE型菌芽胞の発芽には、アラニン、グルコース、乳酸、イノシン、重炭酸塩等が必要であり³⁾また発育には窒素源、糖または核酸系物質、ビタミン類等が必要である⁴⁾。魚肉におけるボツリヌスE型菌の発育と毒素産生には、これらの物質が有効且必要量含有されていなければならない。従って、微生物の拮抗現象を論ずる場合、当然これらの物質について考慮されなければならない。しかし、これらの物質のうちで、魚肉に存在して、毒素産生に最も影響を与えるものとしては、糖(グルコースおよびリボース)および核酸系物質があげられる。そしてこの両者が照射による微生物相の変化にともなって、早い速度で消費されるため、ボツリヌスE型菌の発育に影響を及ぼすものと思われる。

次に低線量照射魚肉のボツリヌスE型菌に対する安全性の問題であるが、これに関してShewanら⁵⁾(1970)は次のように述べている。一般に300 Krad照射した魚肉は、5°C以下に保存した場合、ボツリヌスE型菌の毒素産生速度はきわめて遅く、たとえ毒素が検出されても、その時は官能検査で受け入れられない程腐敗しているから、安全性に問題はない。また10°C以上の室温に保存した場合、魚の種類によっては、腐敗の始まる少し前に毒素産生が起る場合もあるが、一般的にはshelf lifeと毒素産生開始時期との間にはかなりの開きがあるから問題はないと。

われわれの今回の実験においては、5°C保存では、照射および非照射試料とも毒素産生は全くみられなかったが、10°C保存では、照射試料のみにこれがみられた。しかも毒素産生開始時期と腐敗感知時期は、大体同じであった。このことはタラの低線量照射の微生物学的安全性を論ずる上に、さらに検討を要する点といえよう。

結 論

タラ切身にボツリヌスE型菌芽胞を $10^2/g$ または $10^4/g$ の割合に接種して300 Krad照射した後、5°Cまたは10°C

に保存して毒素産生状態を調べた。

1) 包装材として通気性ポリエチレン袋を使用した場合、照射および非照射試料とも、5°Cでは6週間、10°Cでは20日間を経過するも毒素産生は全く認められなかった。

2) 包装材として非通気性ポリエチレン袋を使用した場合、5°C保存では6週間を経過するも毒素産生は認められなかったが、10°C保存では、照射試料のみが12日目に毒素産生が認められた。

3) 10°C保存の場合、腐敗の始まる時期と毒素産生の起こる時期との間にあまり差がなかった。

文 献

- 1) 安藤芳明他：本誌，21，176 (1971).
- 2) Ekulund, M. W. and Poysky, F. T. : "Preservation of Fish by Irradiation" IAEA, Vienna, 125 (1970).
- 3) Ando, Y. : Japan. J. Microbiol., 15, 515 (1971).
- 4) 安藤芳明・井上勝弘：日水誌，24，682 (1958).
- 5) Shewan, J. M. and Hobbs, G. : "Preservation of Fish by Irradiation", IAEA, Vienna, 117 (1970).

Studies on Microbiological Safety of Irradiated Foods (Part 3) Inoculated Pack Tests on Clostridium botulinum type E in Cod Fillets

Yoshiaki Ando and Takashi Karashimada

The toxin production of *Clostridium botulinum* type E has been studied in unirradiated and irradiated cod fillets stored at 5°C or 10°C. Triplicate samples were inoculated with 10^4 and 10^2 of spores of Iwanai strain per g of fillets, then irradiated at a dosage of 300 Krads. The results are as follows :

1) With fillets packaged in oxygen-permeable films, both the unirradiated and irradiated samples were non-toxic either after 6 weeks of storage at 5°C or after 20 days of storage at 10°C.

2) With fillets packaged in oxygen-impermeable films, one of the irradiated samples inoculated with 10^4 spores/g were toxic after 12 days of storage at 10°C, whereas the unirradiated samples were non-toxic even after 21 days of storage at the same temperature. at 5°C storage, however, both the unirradiated and irradiated samples were

non-toxic after 6 weeks of storage.

3) At 10°C storage, a safety margin between shelf life and toxin production does not exist for the irradiated samples.