

JAERI-M  
83-161

飼料および飼料原料の放射線処理  
に関する基礎的研究

1983年10月

久米 民和

JAERI-M レポートは、日本原子力研究所が不定期に公刊している研究報告書です。

入手の問合わせは、日本原子力研究所技術情報部情報資料課（〒319-11 茨城県那珂郡東海村）あて、お申しこしください。なお、このほかに財団法人原子力弘済会資料センター（〒319-11 茨城県那珂郡東海村 日本原子力研究所内）で複写による実費頒布をおこなっております。

JAERI-M reports are issued irregularly.

Inquiries about availability of the reports should be addressed to Information Section, Division of Technical Information, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-11, Japan.

© Japan Atomic Energy Research Institute, 1983

---

編集兼発行 日本原子力研究所  
印刷 日立高速印刷株式会社

飼料および飼料原料の放射線処理に関する基礎的研究

日本原子力研究所高崎研究所開発部

久米 民和

(1983年9月10日受理)

飼料および飼料原料の損失を防止し安全性を確保することを目的として、殺菌および成分変化に対する放射線照射効果を明らかにするとともに、各種成分変化を利用した未利用資源の飼料化への応用について検討した。

飼料原料や配合飼料中の汚染微生物のうち問題となるのは主としてサルモネラ菌や大腸菌などの病原性細菌と、貯蔵中の養分損失やマイコトキシン産生の危険性のある好浸透圧性糸状菌である。サルモネラ菌は0.5~0.6 Mrad, 大腸菌群は0.5~0.8 Mradで殺菌でき、好浸透圧性糸状菌は0.7~0.75 Mradで完全殺菌できることが明らかとなった。これらの結果から、飼料および飼料原料の放射線殺菌のための必要線量は0.8 Mradであると結論した。

飼料原料に5 Mradまでの過剰の線量を照射しても成分変化はほとんどなく、照射飼料は長期間養分損失を防止した状態で貯蔵可能であった。飼料の安全性や健全性上好ましくないと考えられるヒスタミンやリジノアラニンといった物質が照射によって蓄積することはなく、また照射にともなう成分や栄養価の変化も問題とならないことを明らかにした。また照射によるタンパク質の凝集および多糖類の分解を利用した未利用資源飼料化への応用について検討し、放射線処理法が飼料原料の確保、保存のために有効な手段であることを明らかにした。

Irradiation Effect on Animal Feeds and Feedstuffs

Tamikazu KUME

Department of Development

Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, JAERI

(Received September 10, 1983)

Aiming to secure the safety of animal feeds and develop the new resources, the effect of  $\gamma$ -irradiation on disinfection and the changes in components were investigated. Salmonellae and coliforms contaminating in animal feeds and feedstuffs were eliminated by 0.5~0.6 Mrad and 0.5~0.8 Mrad, and osmophilic moulds were sterilized by 0.7~0.75 Mrad. From these results, it is concluded that the dose for disinfection of animal feeds is 0.8 Mrad.

The main components were hardly changed by irradiation up to 5 Mrad, and the component changes in irradiated samples could be suppressed during storage while the components in unirradiated samples were markedly changed with the growth of osmophilic moulds. Histamine and lysinoalanine, which may cause the feed poisoning, were never accumulated in feedstuffs by irradiation. The nutritional value of chick feeds was not changed by 1.0 Mrad

irradiation. From these results, it is considered that no problem for wholesomeness of animal feeds occurs by irradiation. Therefore, the irradiation is effective for disinfection and keeping the nutritional value of animal feeds during storage.

Irradiation promotes the recovery of proteins in the wastewater by coagulation of proteins and improves the property of coagulants due to the degradation of polysaccharides. These results indicate that irradiation is effective to develop the new resources for animal feeds.

Keywords: Disinfection of Animal Feeds, Feedstuffs, Osmophilic Moulds, Wholesomeness, Changes in Components, Nutritional Value, Mycotoxin, Histamine, Lysinoalanine, Coagulation of Proteins, Degradation of Polysaccharides, Recovery of Organic Wastes.

## 目 次

1. 緒 論 .....	1
2. 飼料原料の微生物分布と放射線殺菌 .....	4
2.1 緒 言 .....	4
2.2 実験方法 .....	4
2.3 実験結果および考察 .....	6
2.3.1 各種飼料原料中の微生物分布 .....	6
2.3.2 飼料用魚粉の放射線殺菌 .....	6
2.3.3 魚粉中のサルモネラ菌の放射線殺菌 .....	9
2.4 要約 .....	11
3. 配合飼料の放射線殺菌と貯蔵期間の延長 .....	12
3.1 緒 言 .....	12
3.2 実験方法 .....	12
3.3 実験結果および考察 .....	13
3.3.1 配合飼料中の微生物分布 .....	13
3.3.2 配合飼料の放射線殺菌 .....	13
3.3.3 照射による配合飼料の貯蔵期間の延長 .....	15
3.4 要 約 .....	24
4. 飼料より分離されたマイコトキシン産生糸状菌 <u>Aspergillus versicolor</u> の放射線感受性 .....	25
4.1 緒 言 .....	25
4.2 実験方法 .....	25
4.3 実験結果および考察 .....	27
4.3.1 <u>A. versicolor</u> のステリグマトシスチン産生能 .....	27
4.3.2 ステリグマトシスチンの放射線分解 .....	27
4.3.3 <u>A. versicolor</u> の放射線感受性 .....	29
4.4 要 約 .....	33
5. 放射線照射による飼料原料の主要成分の変化 .....	34
5.1 緒 言 .....	34
5.2 実験方法 .....	34
5.3 実験結果および考察 .....	35
5.3.1 照射による飼料用魚粉の成分変化 .....	35
5.3.2 照射による飼料用魚粉貯蔵中の成分変化の抑制 .....	38
5.4 要 約 .....	41

6. 放射線照射による飼料原料中のリジノアラニンおよびヒスタミン含量の変化 .....	42
6.1 緒言 .....	42
6.2 実験方法 .....	43
6.3 実験結果および考察 .....	44
6.3.1 照射によるリジノアラニン含量の変化 .....	44
6.3.2 照射によるヒスタミン含量の変化 .....	50
6.4 要約 .....	55
7. 放射線照射飼料の育雛効果 .....	56
7.1 緒言 .....	56
7.2 実験方法 .....	56
7.3 実験結果および考察 .....	56
7.3.1 育雛効果に及ぼす照射の影響 .....	56
7.3.2 貯蔵および照射した飼料の育雛効果 .....	57
7.4 要約 .....	64
8. 飼料の照射技術に関する検討 .....	65
8.1 緒言 .....	65
8.2 実験方法 .....	65
8.3 実験結果および考察 .....	66
8.3.1 Fricke 線量計の測定精度に及ぼす使用水の影響 .....	66
8.3.2 飼料を詰めたパッケージ内の吸収線量分布 .....	66
8.3.3 コンベヤによる飼料の連続照射に関する検討 .....	68
8.4 要約 .....	73
9. 廃液からの飼料用タンパク質の回収に対する放射線照射と キトサン添加の影響 .....	74
9.1 緒言 .....	74
9.2 実験方法 .....	74
9.3 実験結果および考察 .....	76
9.3.1 キトサンによる廃液タンパク質の凝集と放射線殺菌 .....	76
9.3.2 廃液中のタンパク質凝集に対する照射とキトサン添加の効果 .....	79
9.3.3 照射によるモデルタンパク質の凝集 .....	82
9.3.4 照射によるキトサンの物理化学的諸性質の変化 .....	84
9.4 要約 .....	84
10. 総括 .....	87
謝辞 .....	90
引用文献 .....	91

## CONTENTS

1.	Introduction .....	1
2.	Distribution of microorganisms in feedstuffs and their disinfection by irradiation .....	4
2.1	Preface .....	4
2.2	Experimental procedure .....	4
2.3	Results and discussion .....	6
2.3.1	Distribution of microorganisms in various feedstuffs .....	6
2.3.2	Disinfection of fish meals .....	6
2.3.3	Disinfection of Salmonellae in fish meal .....	9
2.4	Summary .....	11
3.	Disinfection and storage effect on mixed feeds by irradiation .....	12
3.1	Preface .....	12
3.2	Experimental procedure .....	12
3.3	Results and discussion .....	13
3.3.1	Distribution of microorganisms in mixed feeds .....	13
3.3.2	Disinfection of mixed feeds .....	13
3.3.3	Storage effect on mixed feed .....	15
3.4	Summary .....	24
4.	Radiosensitivity of <u>Aspergillus versicolor</u> isolated from animal feeds and its ability of sterigmatocystin production .....	25
4.1	Preface .....	25
4.2	Experimental procedure .....	25
4.3	Results and discussion .....	27
4.3.1	Ability of sterigmatocystin production of <u>A. versicolor</u> .....	27
4.3.2	Decomposition of sterigmatocystin .....	27
4.3.3	Radiosensitivity of <u>A. versicolor</u> .....	29
4.4	Summary .....	33
5.	Change in components of feedstuffs by irradiation .....	34
5.1	Preface .....	34
5.2	Experimental procedure .....	34
5.3	Results and discussion .....	35
5.3.1	Change in Components of fish meal .....	35
5.3.2	Depression of components change during storage .....	38
5.4	Summary .....	41



6.	Change in lysinoalanine and histamine contents of feedstuffs by irradiation .....	42
6.1	Preface .....	42
6.2	Experimental procedure .....	43
6.3	Results and discussion .....	44
6.3.1	Change in lysinoalanine contents .....	44
6.3.2	Change in histamine contents .....	50
6.4	Summary .....	55
7.	Change in nutritional value of feeds for chicks by irradiation .....	56
7.1	Preface .....	56
7.2	Experimental procedure .....	56
7.3	Results and discussion .....	56
7.3.1	Effect on Chick performance of irradiated feeds .....	56
7.3.2	Chick performance with stored and irradiated feeds .....	57
7.4	Summary .....	64
8.	Package irradiation of animal feeds .....	65
8.1	Preface .....	65
8.2	Experimental procedure .....	65
8.3	Results and discussion .....	66
8.3.1	Effect of water quality on Fricke dosimetry .....	66
8.3.2	Dose distribution in package .....	66
8.3.3	Dose uniformity and throughput capacity by continuous package irradiation .....	68
8.4	Summary .....	73
9.	Effect of irradiation and chitosan treatment on recovery of proteins from wastewater .....	74
9.1	Preface .....	74
9.2	Experimental procedure .....	74
9.3	Results and discussion .....	76
9.3.1	Disinfection of coagulants by irradiation .....	76
9.3.2	Coagulation of protein in wastewater by irradiation and chitosan treatment .....	79
9.3.3	Aggregation of proteins by irradiation .....	82
9.3.4	Change in physicochemical properties of chitosan by irradiation .....	84
9.4	Summary .....	84
10.	Conclusion .....	87
	Acknowledgments .....	90
	References .....	91

## 1. 緒 論

放射線の生物に対する作用が発見されたのは古く、RöntgenによるX線の発見(1895年)とBecquerelによる放射能の発見(1896年)後間もなくのことである。その後、放射線の種々の作用が明らかにされてきたが、本格的な放射線照射の利用についての開発研究がはじめられたのは第2次大戦以後のことである。戦後、 $^{60}\text{Co}$ などの放射性同位元素の線源や各種の加速器の開発により大線量照射が可能になるとともに、食品や医療分野で広範な研究が進められてきた。現在では、がんの治療をはじめ、医療器具の殺菌<sup>1,2)</sup>植物の品種改良<sup>3,4)</sup>不妊虫放飼法によるウリミバエの根絶<sup>5,6)</sup>などに、実際に放射線が利用されている。食品照射の分野では、放射線の殺虫、殺菌作用や発芽防止、熟度調整などの生物効果を利用した食品の保蔵技術に関する研究が世界各国で進められており、19カ国で25品目が許可されるに至っている<sup>7)</sup>。わが国では1950年代に基礎研究が始められ、1967年からは原子力委員会指定の特定総合研究として、実用化のための総合的研究が進められてきた。特定総合研究では、馬鈴薯、玉ネギ、米、小麦、ウィンナーソーセージ、かまぼこ、ミカンの7品目が取上げられ、このうち馬鈴薯の発芽防止は1972年に許可され、北海道士幌町農協で大型コンテナを用いた実用照射が続けられている<sup>8,9)</sup>。

食品照射の関連分野として、殺虫、殺菌を目的とした飼料および飼料原料への放射線照射の利用がある。近年わが国では、家畜や家禽の集団多頭羽飼育が盛んになるにつれて、配合飼料への依存度はますます高まっている。配合飼料にはこれまで多量の抗生物質が使用されてきており、薬剤耐性菌の出現や人体への移行などの問題点が指摘されている。また飼料中のサルモネラ菌や大腸菌あるいはマイコトキシン産生糸状菌などは単に家畜に対する有害菌というだけでなく、畜産製品を通じて食中毒の原因ともなる可能性がある。1976年に「飼料安全法」<sup>10)</sup>が施行され、その中で飼料一般の製造あるいは使用方法に関して「有害な物質を含み、若しくは病原微生物により汚染され、またはこれらの疑いがある原料または材料を用いてはならない」と規定されている。従来家畜の飼料は主として栄養素の供給源としての考慮しかなされていなかったが、微生物汚染対策が要求されるようになり適当な殺菌法の確立が必要となってきた。わが国では輸入飼料穀類中の微生物や害虫を防除するため、陸揚げの際メチルブロマイドによる燻蒸処理が行われてきた。しかし、燻蒸処理による殺菌効果は殺虫効果に比べて小さく、またガスの浸透が不十分などの欠点もある。さらに燻蒸剤の吸着による飼料価値の低下、作業に時間を要する、有毒ガスが作業員や周囲の環境に悪影響を及ぼす恐れがあるなどの問題点が指摘されている<sup>11)</sup>。また蒸気による加熱殺菌の場合には、再包装のさい工場内のホコリや空気や包装機による再汚染、あるいは飼料の硬化や嗜好性の悪化といった問題点が指摘されている<sup>12)</sup>。これら従来からの処理法に対して、放射線処理法は、(1)品温の上昇が少ない、(2)透過力が大きく包装したまま処理できる、(3)殺虫、殺菌剤など残留農薬の心配がなく、環境汚染の防止に役立つ、(4)連続的な大量処理が可能である、(5)省エネルギー型技術である、などの利点を有しており、放射線処理法が実用化されれば、安全性、確実性も高まり、処理時間の短縮や労力の削

滅が可能となる。これらの放射線処理法の特徴を生かして、わが国をはじめ、英国、カナダ、オーストリア、ハンガリーなどで実験動物用飼料の放射線殺菌が実用化されている。<sup>13,14)</sup> これら無菌実験動物用飼料の殺菌には通常 2.5 Mrad 以上の高線量の照射が行われている。しかし飼料に高線量の照射を行うと、飼料成分に好ましくない変化が生ずる可能性があり、また経済性の面からできるだけ低線量の照射で目的を達することが望ましい。一般動物用飼料の場合には完全殺菌の必要はなく、特定の病原菌や腐敗性微生物等の部分殺菌を行えば十分である。イスラエル<sup>15)</sup>やドイツ<sup>16)</sup>では、サルモネラ菌や大腸菌などの病原性細菌を殺菌した SPF (Specific Pathogen Free) 動物用飼料製造への放射線照射の利用に関する研究がすでに進行中である。一方、わが国は高温多湿な気候条件のため糸状菌が増殖しやすい環境にあり、飼料中の養分損失やマイコトキシン生産の原因となる糸状菌の殺菌も重要である。したがって、放射線照射による一般動物用飼料の殺菌を実用化するためには、病原性細菌ばかりでなく糸状菌について殺菌効果を検討していくことが、とくにわが国では必要である。

放射線殺菌を実用化するには、殺菌効果の他に被照射物の安全性の問題がある。これまでに照射食品の健全性に関して、(1)誘導放射能、(2)毒性物質、(3)発がん物質、(4)食品成分の破壊、(5)子孫に及ぼす影響(催奇形性)、について検討が行われてきた。<sup>17)</sup> このうち誘導放射能に関しては、5 MeV以下のX線や $\gamma$ 線、10 MeV以下の加速電子線では食品中に放射能が誘起されることは理論的にもなく、また実際にも検出されないことが明らかにされている<sup>18,19)</sup> また1980年に開催されたFAO/IAEA/WHOの専門家委員会で「毒物学的、栄養学的、微生物学的、および技術的な観点から総合的に判断して、平均線量1 Mrad以下でいかなる食品を照射しても全く問題はない」との勧告が出された。<sup>19)</sup> この勧告は、間接食品である一般動物用飼料の放射線殺菌にも適用されるものと考えられる。また同勧告では、1 Mrad以上の照射はデータが不十分であるとして健全性の評価は行われておらず、今後さらに研究を続行する必要があるとの判断が下されている。飼料の放射線処理の実用に際しても、さらに飼料の安全性の上で問題となる物質の生成の有無や成分変化などについて検討していく必要がある。

一方、わが国は産業経済活動の基礎となるエネルギー、原材料、食飼料など資源の大部分を海外に依存しており、エネルギーは約20%、食飼料はオリジナル・カロリーベースで約50%の自給率しかない。資源保有国の資源戦略が苛烈となりつつある現在、輸入飼料原料の備蓄法の確立や未利用資源の飼料化技術の開発を行うことはわが国にとって重要な課題である。<sup>20,21)</sup> とくに食品工業や畜産業からの廃棄物を回収して飼料化することは、未利用資源や低利用資源の有効利用のみならず、環境汚染問題の解決にも役立つと考えられる。しかしこれらの産業廃棄物は病原菌などの微生物に汚染されている可能性が高いので、これら未利用資源を飼料化するためには殺菌する必要がある、放射線処理法が有効に利用できる可能性がある。

このような背景のもとに、本研究では、一般動物用飼料の安全性の確保ならびに貯蔵性の向上に放射線照射を利用するための基礎として、各種飼料および飼料原料の汚染微生物の放射線殺菌効果、照射にともなう成分変化、実用規模での照射技術、未利用資源飼料化への応用等について検討を行った。

本論文は全10章より構成され、第1章と第10章に緒論および総括を、第2章から第9章にわたり研究成果を記した。

第2章から第4章においては、まず飼料原料および配合飼料の微生物汚染の状況を調べ、そのうちとくに飼料の安全性および貯蔵性の上で問題となる病原性細菌や好浸透圧性糸状菌について放射線感受性を明らかにし、殺菌に必要な線量の確立について述べた。

第5章から第7章においては、照射した飼料原料の健全性を確認するための基礎研究として、主に魚粉について照射および貯蔵による主要成分の変化や毒性物質の生成の有無についての放射線化学的研究と、育雛試験による照射飼料の栄養価の変化について検討を行った結果について述べた。

第8章においては、飼料の放射線処理実用化の基礎として、パッケージに詰めた飼料中の吸収線量分布を調べ、実用規模での処理量、処理コストについて資料を提供した。さらに第9章においては、飼料用新資源確保への応用研究として、廃液からのタンパク質の回収と殺菌に対する照射効果について検討し、未利用資源飼料化への放射線利用の可能性について述べた。

#### 〔付記〕 本論文で使用した放射線の単位

1978年に計量法改正が公布され、放射線関係では放射能単位としてBq（ベクレル）、吸収線量単位としてGy（グレイ）、照射線量単位としてクーロン毎キログラムが導入された。これらの新しいSI単位を主計量単位として、従来用いられてきた単位は補助計量単位として、その関係が定義されている。これらの関係および新旧単位の換算係数を以下に記す。

量	計量単位	補助計量単位
放射能	壊変毎秒 (dps) または ベクレル (Bq)	壊変毎分 (dpm) キュリー (Ci)
吸収線量	グレイ (Gy)	ラド (rad)
照射線量	クーロン毎 キログラム (C/kg)	レントゲン (R)

新旧単位の換算関係：

$$1 \text{ Bq} = 2.70_2 \times 10^{-11} \text{ Ci} \quad (3.7 \times 10^{10} \text{ Bq} = 1 \text{ Ci})$$

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg} = 10^4 \text{ erg/g} = 100 \text{ rad}$$

$$1 \text{ C/kg} = 3876 \text{ R} \quad (2.58 \times 10^{-4} \text{ C/kg} = 1 \text{ R})$$

本論文では従来から用いられてきた補助計量単位を用いた。

## 2. 飼料原料の微生物分布と放射線殺菌

### 2.1 緒言

わが国で消費されている飼料原料のうち植物性原料はほぼ100%を輸入に依存しており、これら輸入穀物の主要部分を占めるトウモロコシ、マイロの輸入量は年間1700万トンに達している。<sup>21)</sup> 一方、動物性飼料原料の消費量は年間約90万トンであり、その約70%は魚粉、約30%が畜産副産物とされている。<sup>22)</sup> これら飼料原料の輸送および貯蔵中の微生物あるいは害虫による損失を防止し安全性を確保するためには、放射線処理法が適していると考えられる。

主要植物性飼料原料であるトウモロコシ、マイロに関しては、すでに渡辺ら<sup>23)</sup>により汚染微生物および放射線殺菌効果が検討されており、1.0 Mrad 以下の照射で貯蔵期間の延長が可能であることが明らかにされている。また飼料原料中の各種害虫の放射線抵抗性が検討されており、コクゾウ、ココクゾウは10 krad,<sup>24)</sup> ノシメコクガは20 krad,<sup>25)</sup> ケナガコナダニは50 krad<sup>26)</sup> で不妊化され、300~500 kradで即死するとされている。<sup>27)</sup> したがって殺虫線量は一般に殺菌線量より低く、放射線殺菌を行う場合には殺虫を考慮する必要はないと考えられる。<sup>28)</sup>

一方、動物性飼料原料に関しては、サルモネラ菌の汚染状況<sup>22,29)</sup> や放射線殺菌効果<sup>30)</sup> について報告されているが、一般の微生物汚染の状況に関する報告は少ない。そこで本章では動物性飼料原料、とくに魚粉の微生物汚染の実態を明らかにするとともに、放射線照射による殺菌効果について検討した。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 供試試料

市販の近海産魚粉(褐色魚粉)6種、北洋ミール(白色魚粉)4種、アラ粕(魚加工残渣)1種、混合ミール(動植物性タンパク質を混合したもの)2種、調整魚粉(魚粉に羽毛粉や肉粉を混ぜたもの)2種、フィッシュソリュブル(魚類の内臓の消化タンパク質液または魚汁を濃縮してペースト状にしたもの)3種を入手し実験に供した。また市販の骨粉3種、羽毛粉1種、大豆粕2種も併せて実験に供した。

#### 2.2.2 微生物検査

各供試飼料原料はステンレス製小型粉砕器(協立理工製)で20秒間無菌的に粉砕した後、その20gを50mlの殺菌水とともに滅菌ポリ袋に投入し、ストマッカーで1分間乳化処理を行った。この乳化液および $10^2$ 、 $10^4$ 倍希釈液0.2mlを各種平板培地3枚にそれぞれ塗布した。微生物検査は総細菌数、大腸菌群、一般糸状菌、好浸透圧性糸状菌の4項目について調べた。各微生物群の分離用培地および培養条件は次のようであった。

- a) 総細菌数 : Difco-nutrient agar 23g, glucose 5g, Difco-yeast extract 5g,  $K_2HPO_4$  2g, 水 1ℓ (pH 7.0), 30℃で2~3日培養。
- b) 大腸菌群 : Difco-MacConkey agar 50g, agar 6g, 水 1ℓ (pH 7.0), 37℃で18時間培養。
- c) 一般糸状菌 : Difco-malt extract 10g, Difco-yeast extract 4g, glucose 4g, agar 20g, 水 1ℓ (pH 6.0) にクロラムフェニコールを10~20mg添加, 30℃で3日培養。
- d) 好浸透圧性糸状菌 : Difco-malt extract 50g, NaCl 80~150g, agar 20g, 水 1ℓ (pH 6.0), 30℃で5日培養。

### 2.2.3 照射条件

試料の放射線照射は日本原子力研究所高崎研究所の食品照射ガンマー線照射棟,  $^{60}Co$  板状線源 (80 kCi) を用い線量率  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  rad/hr で, 線量 1.0 Mrad までを室温で照射した。線量率の測定はFricke 線量計を用いて行った。

分離されたサルモネラ菌および *E. coli* は, Nutrient broth中, 30℃で18時間振とう培養した菌体を遠心分離して集菌し, 1/15 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄後同緩衝液に懸濁して, 室温, 空気平衡下で照射した。

### 2.2.4 サルモネラ菌検査

魚粉試料各 25g を 225ml のペプトン-リン酸液 10本に投入し, 43℃で24時間培養を行った。この培養液 1ml をテトラチオネートブロスおよびセレナイトシスチンブロスを用いた選択培地各 9ml に加え, 43℃で24時間培養した。この培養液を白金耳でブリリアントグリーン寒天平板培地の表面に塗布し 37℃で18~24時間培養し, 赤色または桃色のコロニーをTSI (Triple sugar iron agar) 半高層培地に釣菌, 培養後, スラント部が赤色となり底部が黄色に変化し  $H_2S$  による黒変が認められたものをサルモネラ菌として検出した。

なお本実験で用いた培養液および培地の組成は以下に示すとおりであった。

ペプトン-リン酸液 : meat extract 3g, polypeptone 5g,  $Na_2HPO_4$  6.45g,  $KH_2PO_4$  2g, 水 1ℓ。

テトラチオネートブロス : polypeptone 18g, bile salts 1g,  $CaCO_3$  25g,  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  38g, D-mannitol 2.5g, yeast extract 2.0g, NaCl 5.0g, brilliant green 12.5mg, 水 1ℓ を加温溶解後, 45℃以下に冷却しヨウ素溶液 20ml を添加。

セレナイトシスチンブロス : polypeptone 5g, lactose 4g,  $Na_2SeO_3$  4g,  $Na_2HPO_4$  5.5g,  $KH_2PO_4$  4.5g, L-Cystine 0.01g, 水 1ℓ。

ブリリアントグリーン寒天平板培地 : yeast extract 3g, polypeptone 10g, NaCl 5g, lactose 10g, sucrose 10g, phenol red 0.08g, brilliant green 12.5mg, 水 1ℓ。

## 2.3 実験結果および考察

### 2.3.1 各種飼料原料中の微生物分布

各種近海産魚粉および北洋ミール中の菌数分布をTable 2.1 に示した。またフィッシュソリュブル、アラ粕、混合ミールおよび調整魚粉中の菌数分布をTable 2.2 に示した。近海産魚粉の総細菌数は1g 当り  $2.4 \times 10^4 \sim 5.3 \times 10^5$  個、大腸菌群は  $8 \sim 4.5 \times 10^3$  個、好浸透圧性糸状菌は  $7.5 \times 10^1 \sim 6.3 \times 10^3$  個、一般糸状菌は  $8.8 \times 10^1 \sim 2.5 \times 10^3$  個検出された。一方北洋ミールでは総細菌数  $2.3 \times 10^2 \sim 2.8 \times 10^3$  個、好浸透圧性糸状菌は  $2.5 \times 10^1$  個以下、一般糸状菌は  $2.5 \times 10^1 \sim 1.4 \times 10^2$  個検出されたにすぎず、大腸菌群は検出限界以下であった。このように、北洋ミールは近海産魚粉に比べて微生物汚染は少なかった。

混合ミールや調整魚粉はとくに微生物汚染が著しく、総細菌数は  $3.4 \times 10^5 \sim 8.0 \times 10^6$  個、大腸菌群は  $2.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^5$  個、好浸透圧性糸状菌は  $5.2 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^5$  個、一般糸状菌は  $9.1 \times 10^1 \sim 7.0 \times 10^5$  個検出された。アラ粕は汚染菌数が少なかったが、これは加工時に蒸気殺菌処理が十分ほどこされているためと思われる。フィッシュソリュブルでは近海品、北洋品ともに大腸菌群は検出されず、糸状菌もわずかに検出される程度であった。総細菌数は高い値を示したが、大部分は乳酸菌と考えられるものであった。

輸入羽毛粉および骨粉の場合Table 2.3 に示したように、総細菌数は1g 当り  $2.3 \times 10^2 \sim 2.2 \times 10^5$  個、大腸菌群は  $4 \sim 4.3 \times 10^3$  個、好浸透圧性糸状菌は  $3.3 \times 10^1 \sim 4.6 \times 10^2$  個、一般糸状菌は  $5.0 \times 10^1 \sim 4.0 \times 10^2$  個であり、汚染菌数は近海産魚粉より少なかった。大豆粕の場合、輸入品にはかなりの微生物汚染が認められたが、国産品は比較的汚染菌数が少なかった。

これら各種飼料原料中の主要微生物は、以下のように同定されている。すなわち、総細菌数として検出される細菌類は主として Micrococcus, Bacillus などで構成されており、好浸透圧性糸状菌の主要構成菌は A. glaucus 群, A. gracilis, A. candidus である。一般糸状菌は Rhizopus が主要構成菌であるが、東南アジア産調整魚粉からは A. flavus なども検出されている。大腸菌群は Enterobacter, Klebsiella, Escherichia, Citrobacter に属する細菌で主に構成されているが、近海産魚粉、混合ミール、調整魚粉では分離株の30%以上が糞便由来の Escherichia および Citrobacter で占められていることが明らかになっている。

以上のように動物性飼料原料にはかなり著しい微生物汚染が認められ、とくに近海産魚粉では病原性細菌による汚染の可能性が高いことが明らかとなった。

### 2.3.2 飼料用魚粉の放射線殺菌

各種飼料用魚粉のうち近海産魚粉に比較的著しい微生物汚染が認められたので、魚粉Aを例にとり放射線殺菌効果を検討した。Fig. 2.1 に各種微生物の殺菌曲線を示した。照射前の試料1g 当りの菌数は、総細菌数  $3.5 \times 10^5$  個、大腸菌群  $1.4 \times 10^3$  個、好浸透圧性糸状菌  $4.8 \times 10^2$  個、一般糸状菌  $2.8 \times 10^2$  個であり、Table 2.1 に示した試料とは異なる袋から試料を採取したため多少菌数が異なっていた。総細菌数は0.5Mrad で3桁程度減少したが1.0Mrad でもなお生存菌が検出された。大腸菌群および一般糸状菌は各々0.5Mrad および0.3

Table 2.1 Distribution of Microorganisms in Fish Meals.

Sample	Number of microorganisms per gram				Moisture content(%)
	Total aerobic bacteria	Coliforms	Osmophilic moulds	Fungi	
A	$5.1 \times 10^5$	$3.1 \times 10^3$	$4.0 \times 10^2$	$1.8 \times 10^2$	8.5
B	$1.2 \times 10^5$	$4.4 \times 10^2$	$7.5 \times 10^1$	$8.8 \times 10^1$	9.7
D	$5.3 \times 10^5$	$3.0 \times 10^2$	$6.3 \times 10^3$	$2.5 \times 10^3$	8.0
E	$2.4 \times 10^4$	$5.6 \times 10^1$	$1.3 \times 10^3$	$1.0 \times 10^2$	8.5
F	$3.3 \times 10^5$	$4.5 \times 10^3$	$6.1 \times 10^2$	$3.7 \times 10^2$	10.2
I	$4.8 \times 10^4$	8	$2.2 \times 10^2$	$3.7 \times 10^2$	9.0
J*	$1.4 \times 10^3$	-	$2.5 \times 10^1$	$2.5 \times 10^1$	9.5
K*	$2.3 \times 10^2$	-	-	$2.5 \times 10^1$	13.5
L*	$2.8 \times 10^3$	-	8	$1.4 \times 10^2$	4.0
M*	$5.9 \times 10^2$	-	-	$1.1 \times 10^2$	9.3

\* obtained from the northern-sea fisheries.

- : below detectable limit.

Table 2.2 Distribution of Microorganisms in Fish Solubles, Fish Scrap, Mixed Meals and Modified Fish Meals.

Article	Number of microorganisms per gram				Moisture content(%)
	Total aerobic bacteria	Coliforms	Osmophilic moulds	Fungi	
Fish soluble A	$1.8 \times 10^7$	-	-	4	46.4
Fish soluble B	$2.5 \times 10^7$	-	-	$3.2 \times 10^1$	
Fish soluble C*	$6.5 \times 10^5$	-	$1.3 \times 10^1$	4	
Fish scrap N	$1.0 \times 10^3$	4	-	-	10.0
Mixed meal C	$3.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^5$	$9.4 \times 10^2$	$5.4 \times 10^3$	8.0
Mixed meal G	$8.4 \times 10^5$	$2.0 \times 10^3$	$5.2 \times 10^2$	$9.1 \times 10^1$	9.0
Modified fish meal H**	$8.0 \times 10^6$	$1.4 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$	$7.0 \times 10^5$	8.0
Modified fish meal T	$3.4 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4$	$6.0 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3$	9.2

\* obtained from the northern-sea fisheries.

\*\* obtained from south east Asia.

- : below detectable limit.



Table 2.3 Distribution of Microorganisms in Various Feedstuffs.

Article	Number of microorganisms per gram				Moisture content(%)
	Total aerobic bacteria	Coliforms	Osmophilic moulds	Fungi	
Feather meal <sup>1)</sup>	$3.3 \times 10^4$	$1.0 \times 10^3$	$4.6 \times 10^2$	$2.8 \times 10^2$	8.1
Bone meal A <sup>2)</sup>	$1.6 \times 10^3$	4	$3.0 \times 10^2$	$4.0 \times 10^2$	7.6
Bone meal B <sup>3)</sup>	$2.3 \times 10^2$	$2.0 \times 10^2$	$3.3 \times 10^1$	$6.3 \times 10^1$	7.3
Bone meal C <sup>2)</sup>	$2.2 \times 10^5$	$4.3 \times 10^3$	$4.2 \times 10^1$	$5.0 \times 10^1$	8.0
Soybean meal A <sup>1)</sup>	$3.4 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$4.9 \times 10^2$	$1.3 \times 10^2$	13.8
Soybean meal B <sup>4)</sup>	$1.2 \times 10^4$	-	8	8	13.6

- : below detectable limit.

1) imported from U.S.A.

2) imported from New Zealand.

3) imported from Australia.

4) domestic.

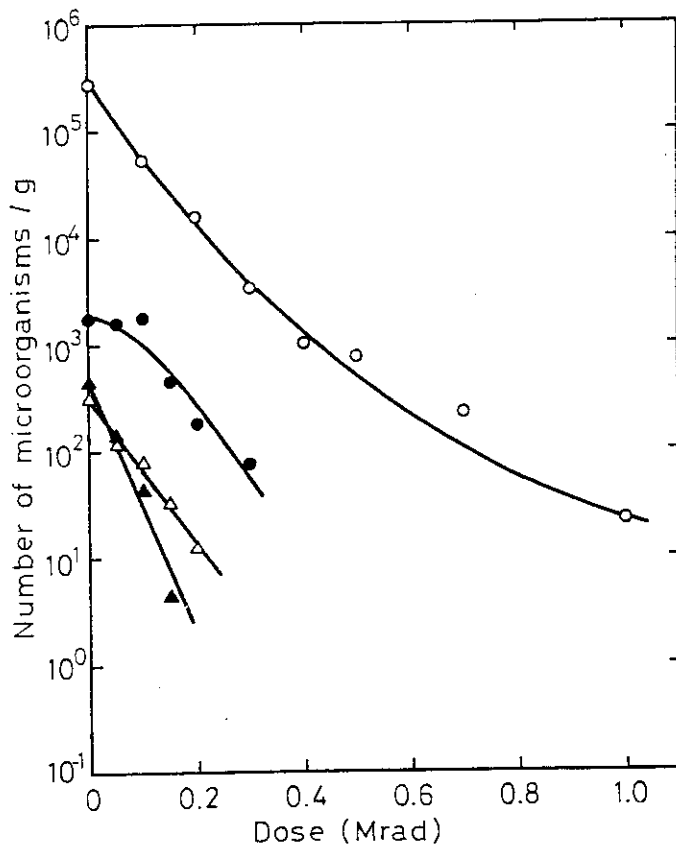


Fig.2.1 Decrease in Number of Microorganisms Contaminating in Fish Meal A by Irradiation.

Symbols: ○, total aerobic bacteria; ●, coliforms;  
▲, osmophilic moulds; △, fungi.

Mrad で検出限界以下となった。好浸透圧性糸状菌は放射線感受性が高く、0.2 Mrad で検出限界以下となった。また他の混合ミールなどでも魚粉の場合とほぼ同様の殺菌曲線が得られた。

### 2.3.3 魚粉中のサルモネラ菌の放射線殺菌

近海産魚粉や混合ミールなどのサルモネラ菌汚染をしらべたところ、Table 2.4 に示したように近海産魚粉5種のうち3種からサルモネラ菌が試料250g当り1~20個検出された。また混合ミールおよび調整魚粉各1種からもサルモネラ菌が250g当り各々15個および10個検出された。なお、検出されたサルモネラ菌の生化学的性質およびO群血清試験が検討されており、全株が亜属Iに属し、血清型はC<sub>1</sub>型およびE型にほとんどの株が属することが明らかにされている。

次に、分離された代表的なサルモネラ菌分離株および*E. coli*を18時間培養後、1/15 Mリン酸緩衝液中での放射線感受性を調べた。用いた菌株全てがシグモイド型の殺菌曲線を示し、サルモネラ菌の方が*E. coli*より若干放射線抵抗性が強かった(Table 2.5)。また魚粉中のサルモネラ菌A 1-1株の菌体を1%ペプトン水に懸濁後魚粉Aと混合し、真空常温乾燥して水分含量7%、1g当りの菌数 $3 \times 10^9$ 個の状態に照射した。この結果、Fig. 2.2に示したように約0.2 Mradまで肩を有するシグモイド型の殺菌曲線が得られ、この曲線の直線部分から得られたD<sub>10</sub>値は0.11 Mradであった。

放射線による殺菌線量は、以下に示すような種々の条件によって著しい違いが生ずることが知られている。細胞は一般に定常期の方が対数期より抵抗性が強く、また栄養細胞に比べ孢子の方が抵抗性が強い。緩衝液中又は水懸濁液中よりも、凍結や乾燥状態で抵抗性が強い。したがって、最も強い抵抗性を示す場合のD<sub>10</sub>値を用いて殺菌線量を求めることが必要である。一方、完全殺菌の目安としては、 $10^{-6}$ 個/gが医療品殺菌などの場合に一般的に用いられている。<sup>23)</sup>そこで、魚粉中のサルモネラ菌の殺菌線量を、最も抵抗性の高い乾燥状態のD<sub>10</sub>=0.11 Mradを用い、1g当りの菌数を $10^{-6}$ 個にまで減少させるのに必要な線量として求めた。初期菌数により殺菌線量は異なるので、最もサルモネラ菌数の高かった魚粉Aの20個/250gすなわち0.08個/gを初期菌数として用いた。この値は、Mossel<sup>30)</sup>の報告している飼料中のサルモネラ菌は0.1個/g以下であるという値と一致していた。この結果、必要線量は0.53 Mradと計算され、魚粉中のサルモネラ菌殺菌に必要な線量は0.5~0.6 Mradであると求められた。伊藤ら<sup>32)</sup>は*S. typhimurium*の乾燥状態の殺菌線量は0.6 Mrad、Mossel<sup>30)</sup>は腸内細菌群、ことにサルモネラ菌の殺菌線量は0.75 Mradと報告しており、本実験結果でもほぼ一致した結果が得られた。またMossel<sup>30)</sup>はペレット加工時の加熱処理との組み合わせによりサルモネラ菌の殺菌線量を低減することが可能であると報告している。

なお、飼料の主要な植物性原料であるトウモロコシやマイロの汚染菌は*Aspergillus*属などの糸状菌と*Bacillus*属などの細菌で占められており、病原性細菌は検出されていない。<sup>23)</sup>したがって、飼料中の病原性細菌の汚染源は主として動物性飼料原料であると考えられ、0.5~0.6 Mradの照射により殺菌処理した動物性飼料原料を用いることにより、飼料の病原性細菌による汚染は防止できるであろう。

Table 2.4 Distribution of Salmonella in  
Various Fish Meals.

Article	Number of <u>Salmonella</u> per 250g
Fish meal A	20
Fish meal B	0
Fish meal D	0
Fish meal E	6
Fish meal F	1
Fish scrap N	0
Mixed meal C	15
Mixed meal G	0
Modified fish meal H*	0
Modified fish meal T	10

\* obtained from south east Asia.

Table 2.5 Radiosensitivity of Salmonella and E. coli Isolated  
from Fish Meal, Mixed Meal and Modified Fish Meal.

Strain	D <sub>10</sub> value (krad)	Induction dose (krad)
<u>Salmonella</u> sp. A1-1	12	32
<u>Salmonella</u> sp. C1-2	12	18
<u>Salmonella</u> sp. T1	12	10
<u>S. typhimurium</u> YK-1*	11	29
<u>E. coli</u> Fa-8*	10	22
<u>E. coli</u> B	10	0

Suspensions in 1/15 M phosphate buffer, pH 7.0 were irradiated  
in air.

\* type strain.

## 2.4 要 約

動物性飼料原料のうちとくに近海産の魚粉を中心として、汚染菌数および放射線殺菌効果について検討した結果、以下の点が明らかとなった。

- (1) 各種動物性飼料原料のうち、とくに近海産の魚粉、混合ミールおよび調整魚粉の微生物汚染が著しく、総細菌数は1g当り  $2.4 \times 10^4 \sim 8.0 \times 10^6$  個、大腸菌群は  $8 \sim 1.0 \times 10^5$  個、好浸透圧性糸状菌は  $7.5 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^5$  個、一般糸状菌は  $8.8 \times 10^1 \sim 7.0 \times 10^5$  個検出された。
- (2) 近海産の魚粉、混合ミールおよび調整魚粉中の大腸菌群は糞便由来の大腸菌群の占める割合が高く、またサルモネラ菌も10検体中5検体から250g当り1~20個検出され、病原性細菌による汚染が明らかとなった。
- (3) 魚粉に放射線を照射した場合、総細菌数は0.5Mradで3桁程度減少したが、1.0Mradでもなお生存菌が検出された。また大腸菌群、一般糸状菌および好浸透圧性糸状菌は各々0.5, 0.3 および0.2Mradで検出限界以下となった。
- (4) 分離された代表的なサルモネラ菌A 1-1株の $D_{10}$ 値は緩衝液中で0.012Mradであるのに対し、魚粉中では0.11Mradと約10倍高い値を示した。また1g当り $10^{-6}$ 個まで殺菌するためには0.5~0.6Mradの線量が必要であった。

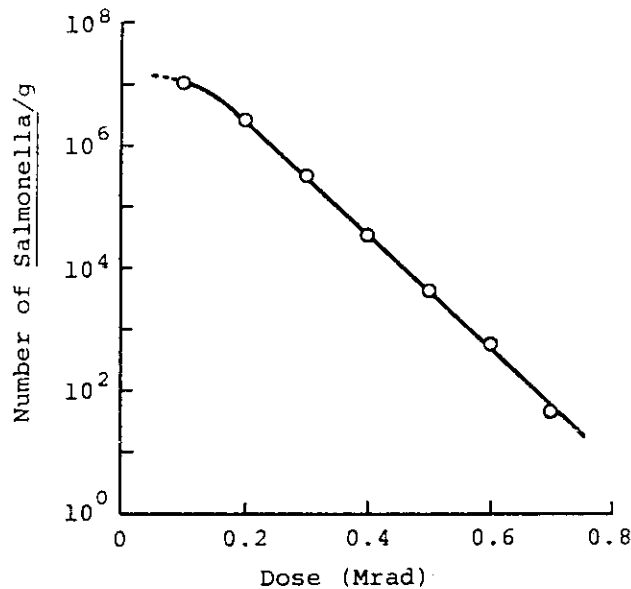


Fig.2.2 Survival Curve of *Salmonella* sp. Al-1 in Fish Meal Irradiated in Dry State.

### 3. 配合飼料の放射線殺菌と貯蔵期間の延長

#### 3.1 緒言

飼料の放射線殺菌の対象としては、実験用無菌動物飼料、SPF動物用飼料（特定病原菌不在）、一般の家畜および家禽用飼料、養魚用飼料などが考えられる。飼料に2.5～5.0 Mradの照射を行えば通常完全殺菌が可能であるとされており、実験用無菌動物飼料の放射線殺菌法が実用化されている。しかし高線量の照射を行うと成分に好ましくない変化が生ずる可能性があり、また経済性の面からもできるだけ照射線量を低く抑えることが望ましい。一般の家畜用飼料の場合、Radicidation（特定病原菌の殺菌）やRadurization（腐敗性微生物等の部分殺菌）を行えば十分であると考えられる。

本章では、一般の家畜用飼料の放射線殺菌の実用化をはかる基礎として、各種配合飼料の微生物汚染状況を明らかにするとともに、放射線殺菌のための必要線量を確立することを目的として検討を行った。

#### 3.2 実験方法

##### 3.2.1 供試飼料

市販の成鶏用粉末飼料3種、ブロイラー用ペレット状飼料3種、子豚育成用粉末およびペレット状飼料6種、肉牛肥育用粉末飼料1種、幼雛用粉末飼料8種を実験に供した。また農林水産省畜産試験場で調製された幼雛用粉末飼料（市販飼料と区別するため、以後調製飼料と呼ぶ）も用いた。各供試飼料は製造後1カ月以内のものを入手し、使用時まで4℃に保管した。

##### 3.2.2 照射条件

各供試飼料の照射は第2章に述べた方法と同様に行った。貯蔵試験用飼料の場合、飼料各2kgを三重のクラフト紙袋（20×37cm）に入れて密封し、反転照射により所定の線量照射した。

##### 3.2.3 貯蔵試験

クラフト袋に入れた照射および非照射飼料は、平山製作所製恒温恒湿槽FH80-Lを用いて各種湿度条件下30℃で貯蔵した。また7月中旬から11月中旬までの4カ月間、室温での貯蔵試験を行った。この期間、温度は15～34℃、湿度は60～90%RHの範囲で変動した。貯蔵中の微生物数の変化は、好浸透圧性糸状菌を中心に経時的に測定した。また飼料中の水分含量は135℃、2時間加熱乾燥して求めた。<sup>33)</sup>

### 3.3 実験結果および考察

#### 3.3.1 配合飼料中の微生物分布

一般動物用配合飼料における微生物汚染の状況や衛生対策についての報告は少なく、朝井、飯塚<sup>34)</sup>の配合飼料の微生物学的障害およびその鑑定方法の研究、朝井、飯塚<sup>35)</sup>の薬剤等による濃厚飼料の品質保全に関する研究、赤池ら<sup>36)</sup>、柏崎ら<sup>37)</sup>の豚用配合飼料や高鳥ら<sup>38)</sup>の牛用配合飼料に関する報告がある程度である。そこで、まず市販の各種配合飼料中の菌数分布を調べた。Table 3.1 および Table 3.2 に示したようにかなりの微生物汚染が認められ、また粉末飼料とペレット状飼料では異なる微生物分布を示した。市販の粉末飼料では、総細菌数は1g 当り  $5.3 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^6$  個、大腸菌群は、 $5.1 \times 10^3 \sim 6.8 \times 10^5$  個、好浸透圧性糸状菌は  $9.6 \times 10^2 \sim 3.5 \times 10^5$  個、一般糸状菌は  $2.1 \times 10^3 \sim 4.5 \times 10^5$  個検出された。ペレット状飼料では、総細菌数は  $5.3 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^6$  個検出され、粉末飼料と大差なかった。大腸菌群はブロイラー用飼料からは検出されず、子豚育成用飼料に  $8 \sim 2.3 \times 10^3$  個認められる程度で菌数は比較的少なかった。好浸透圧性糸状菌は  $2.5 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^3$  個、一般糸状菌は  $1.6 \times 10^3$  個以下と少なかった。以上のように、市販配合飼料ではかなり著しい微生物汚染が認められたが、ペレット状飼料の場合には加工時の加熱処理のため比較的微生物汚染は少なかった。配合飼料中の水分含量は、粉末、ペレット状飼料とも11～13%のものが多かった。しかし、中には14～15%と水分含量が高く、夏期の高温・高湿の条件下での糸状菌の増殖が予想される製品もあった。

なお、市販の配合飼料中の主要微生物は以下のように同定されている。すなわち、総細菌数として検出される細菌類の主要構成菌は Bacillus や Micrococcus であり、大腸菌群は土壌由来と思われる Enterobacter や Klebsiella である。糞便由来の大腸菌群はわずかししか検出されていない。一般糸状菌は主に穀類由来の Fusarium, Cladosporium, Rhizopus が検出されている。好浸透圧性糸状菌は Aspergillus glaucus 群に属する A. pseudoglaucus, A. ruber, A. repens, A. chevalieri, A. mangini とそれ以外の群に属する A. gracilis, A. candidus が主要構成菌であり、A. versicolor や Penicillium もかなり検出されている。

以上のように、配合飼料中には病原性の細菌は余り検出されなかったが、貯蔵中の主要変敗菌となると考えられる好浸透圧性糸状菌を含めてかなり著しい微生物汚染の現状が明らかとなった。

#### 3.3.2 配合飼料の放射線殺菌

各種配合飼料の放射線殺菌効果について検討した。飼料中の微生物数や種類が異なると、放射線による殺菌効果も変化してくる。そこで製造時期が異なる飼料について、菌数分布にどの程度の変化があるのか調べた。1978年7月から1980年2月までの各製造時期における同一メーカーの幼雛用飼料中の微生物分布、および0.2 Mrad 照射した場合の菌数変化をTable 3.3 に示した。非照射試料中の総細菌数は年間を通して1g 当り  $2.4 \times 10^5 \sim 3.9 \times 10^6$  個、大腸菌群  $4.1 \times 10^4 \sim 9.0 \times 10^5$  個、好浸透圧性糸状菌  $1.1 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^3$  個、一般糸状菌  $1.8 \times 10^4$

Table 3.1 Distribution of Microorganisms in Mixed Feeds on the Market.

Kind of feed	Number of microorganisms per gram				Moisture content(%)
	Total aerobic bacteria	Coliforms	Osmophilic moulds	Fungi	
Piglets, mash A	$5.5 \times 10^5$	$6.8 \times 10^4$	$1.5 \times 10^3$	$1.5 \times 10^4$	12.8
Piglets, mash B	$5.2 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$5.8 \times 10^4$	$4.1 \times 10^4$	15.0
Piglets, mash C	$1.7 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$9.6 \times 10^2$	$6.6 \times 10^3$	13.3
Piglets, creep	$2.7 \times 10^5$	$1.9 \times 10^4$	$6.2 \times 10^3$	$1.7 \times 10^4$	12.5
Cattle, mash	$2.2 \times 10^6$	$6.8 \times 10^5$	$2.4 \times 10^3$	$2.1 \times 10^3$	13.0
Hens, mash A	$1.0 \times 10^6$	$5.8 \times 10^5$	$4.0 \times 10^4$	$6.3 \times 10^4$	13.5
Hens, mash B	$9.0 \times 10^5$	$6.7 \times 10^4$	$3.5 \times 10^5$	$4.5 \times 10^5$	12.5
Hens, mash C	$5.3 \times 10^4$	$9.7 \times 10^3$	$1.2 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$	11.2
Piglets, pellet A	$5.3 \times 10^3$	8	$2.5 \times 10^1$	—	12.5
Piglets, pellet B	$8.9 \times 10^4$	$2.3 \times 10^3$	$7.6 \times 10^2$	$5.9 \times 10^2$	13.7
Broiler, pellet A	$1.0 \times 10^6$	—	$8.3 \times 10^1$	—	12.5
Broiler, pellet B	$7.9 \times 10^4$	—	$2.5 \times 10^1$	$4.4 \times 10^1$	12.5
Broiler, pellet C	$6.0 \times 10^4$	—	$1.5 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3$	12.5

— : below detectable limit.

Table 3.2 Distribution of Microorganisms in Chick Feeds in Mash on the Market.

Article	Number of microorganisms per gram				Moisture content(%)
	Total aerobic bacteria	Coliforms	Osmophilic moulds	Fungi	
A	$3.6 \times 10^5$	$3.6 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$	$8.1 \times 10^4$	12.5
B	$9.9 \times 10^5$	$4.1 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	12.5
C	$1.5 \times 10^5$	$5.1 \times 10^3$	$6.8 \times 10^3$	$6.6 \times 10^4$	12.6
D	$1.3 \times 10^5$	$1.9 \times 10^4$	$2.5 \times 10^3$	$4.6 \times 10^3$	12.0
E	$2.3 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$2.3 \times 10^3$	$1.1 \times 10^4$	12.5
F	$2.1 \times 10^5$	$3.3 \times 10^4$	$1.3 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	12.8
G	$1.9 \times 10^5$	$4.8 \times 10^4$	$2.6 \times 10^3$	$1.8 \times 10^4$	12.0
H	$1.3 \times 10^5$	$6.4 \times 10^4$	$7.5 \times 10^3$	$4.2 \times 10^3$	11.8
I*	$3.1 \times 10^5$	$2.5 \times 10^2$	$1.7 \times 10^3$	$4.5 \times 10^2$	11.5
J*	$1.5 \times 10^5$	$1.0 \times 10^2$	$1.8 \times 10^3$	$4.5 \times 10^2$	11.5

\* prepared at laboratory.

～ $1.1 \times 10^5$  個検出された。水分含量はいずれの場合も13%前後であった。このように製造時期による大きな菌数の変動は認められなかった。また Table 3.2 に示したように、種々のメーカーの幼雛用試料中の微生物分布にも余り大きな相違は認められなかったことから、市販幼雛用飼料中の微生物分布にはメーカー、製造時期が異なってもさほど大きな変化はないものと考えられた。0.2 Mrad 照射した場合には、総細菌数は $1/10 \sim 1/20$ 、大腸菌群は $1/20 \sim 1/50$ に減少した。好浸透圧性糸状菌はいずれの場合にも検出限界以下となり、一般糸状菌は $1/10 \sim 1/1000$ 程度に減少した。一般糸状菌の場合、殺菌効果にバラツキが認められたが、他の微生物はいずれの場合もほぼ同様の殺菌効果が得られた。1979年6月の幼雛用配合飼料に放射線を照射した場合の殺菌曲線をFig.3.1に示した。総細菌数は0.5 Mrad の照射で3桁程度減少したが、1.0 Mrad 照射してもなお1g 当り36個程度の生存菌が認められた。大腸菌群および一般糸状菌は0.7 Mrad で検出限界以下となった。好浸透圧性糸状菌は比較的放射線感受性が高く、0.2 Mrad で検出限界以下となった。また高湿度条件下で貯蔵(30℃, 85%RH で2カ月間)して糸状菌が増殖した状態の飼料に対する殺菌効果を調べた結果をFig. 3.3に示した。総細菌数、一般糸状菌とも貯蔵前とほぼ同様の殺菌曲線が得られた。大腸菌群は貯蔵中に菌数が減少したため、0.2 Mrad ではほぼ検出限界となった。好浸透圧性糸状菌は貯蔵中に $10^7$ 個/g 近くにまで菌数が増大しており、0.2 Mrad の照射で約5桁減少したが、なお $10^2$ 個/g 程度の生存菌が認められた。このように、照射前の好浸透圧性糸状菌数が多い場合には、検出限界以下にするための線量は0.2 Mrad では不十分であった。ペレット状飼料について、比較的微生物汚染の著しかった子豚育成用ペレット状飼料Bの殺菌効果を検討した結果をFig. 3.3に示した。総細菌数、大腸菌群、好浸透圧性糸状菌ともに、粉末配合飼料とほぼ同様の殺菌曲線が得られた。

粉末およびペレット状いずれの配合飼料においても、総細菌数の減少は0.5 Mrad まで著しかったが、それ以上の線量では菌数減少はゆるやかとなった。そして、1.0 Mrad 照射しても1g 当り $10 \sim 10^2$ 個程度の生存菌が検出された。高線量照射した場合に主に残存している細菌は黄クリーム色のコロニーを形成する *Pseudomonas marginata* や赤色コロニーの *P. radiora* および red *Micrococcus* であることが明らかにされている。*P. radiora* や red *Micrococcus* は放射線抵抗性の細菌であるが、*P. marginata* は通常のリン酸緩衝液中での照射条件では放射線抵抗性は弱い。したがって、飼料中での何らかの保護作用の関与も考えられる。また主として *Enterobacter* や *Klebsiella* で構成されていた大腸菌群を検出限界以下にするためには0.5～0.8 Mrad 必要であったが、糞便由来の大腸菌群は魚粉の場合と同様0.5 Mrad で検出限界以下となった。したがって、配合飼料の菌数低減化および糞便由来の大腸菌群の殺菌を目的とする場合は0.5 Mrad 程度の線量が必要で、変敗糸状菌の発生を遅らせ貯蔵期間を延長させるためには0.2 Mrad 以上の照射が必要と考えられた。

### 3.3.3 照射による配合飼料の貯蔵期間の延長

#### (1) 好浸透圧性糸状菌の検出に及ぼす食塩濃度の影響

飼料の貯蔵試験を行うに先だち、好浸透圧性糸状菌用培地中の食塩濃度の影響について検討した。食塩濃度を8, 10, 15% とかえた好浸透圧性糸状菌用培地を用いて配合飼料の貯蔵



Table 3.3 Distribution of Microorganisms in Chick Feeds at Various Seasons.

Article	Number of microorganisms per gram				Moisture content(%)	
	Total aerobic bacteria	Coliforms	Osmophilic moulds	Fungi		
'78, 7 Unirradiated	$9.9 \times 10^5$	$4.1 \times 10^4$	$1.3 \times 10^3$	$1.1 \times 10^5$	12.5	
'79, 1	Unirradiated	$3.9 \times 10^6$	$9.0 \times 10^5$	$1.1 \times 10^3$	$2.5 \times 10^4$	13.0
	0.2 Mrad	$2.5 \times 10^5$	$3.8 \times 10^4$	—	$5.0 \times 10^3$	
'79, 6	Unirradiated	$2.4 \times 10^5$	$7.9 \times 10^4$	$1.5 \times 10^3$	$8.6 \times 10^4$	13.0
	0.2 Mrad	$1.9 \times 10^4$	$3.6 \times 10^3$	—	$3.3 \times 10^2$	
'79, 6	Unirradiated	$2.5 \times 10^5$	$7.7 \times 10^4$	$2.2 \times 10^3$	$7.0 \times 10^4$	13.4
	0.2 Mrad	$1.3 \times 10^4$	$1.6 \times 10^3$	—	$2.1 \times 10^3$	
'79, 11 Unirradiated	$3.0 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$1.4 \times 10^3$	$2.8 \times 10^4$	13.3	
'80, 2	Unirradiated	$2.9 \times 10^5$	$4.9 \times 10^4$	$1.1 \times 10^3$	$1.8 \times 10^4$	12.6
	0.2 Mrad	$2.8 \times 10^4$	$2.5 \times 10^3$	—	$3.8 \times 10^1$	

— : below detectable limit.

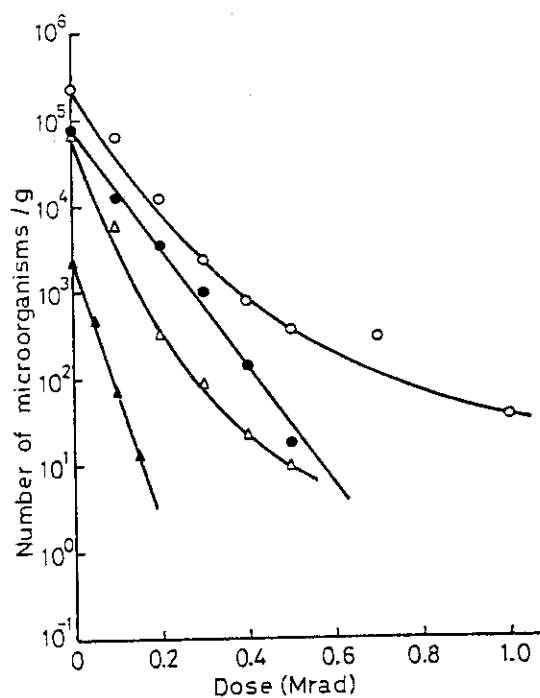


Fig.3.1 Decrease in Number of Microorganisms Contaminating in Chick Feed by Irradiation.

Symbols: ○, total aerobic bacteria; ●, coliforms;  
▲, osmophilic moulds; △, fungi.

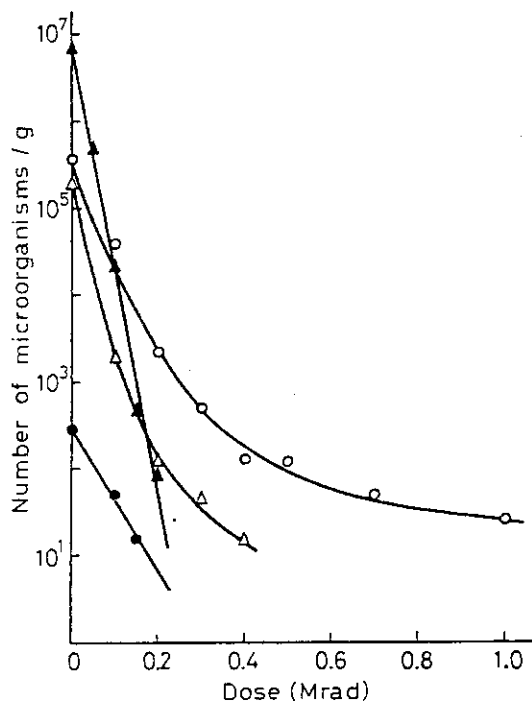


Fig.3.2 Decrease in Number of Microorganisms in Moulded Chick Feed by Irradiation.

Chick feed in kraft paper bag was stored at 30°C, 85%RH for 2 months before irradiation.

Symbols: ○, total aerobic bacteria; ●, coliforms; ▲, osmophilic moulds; △, fungi.

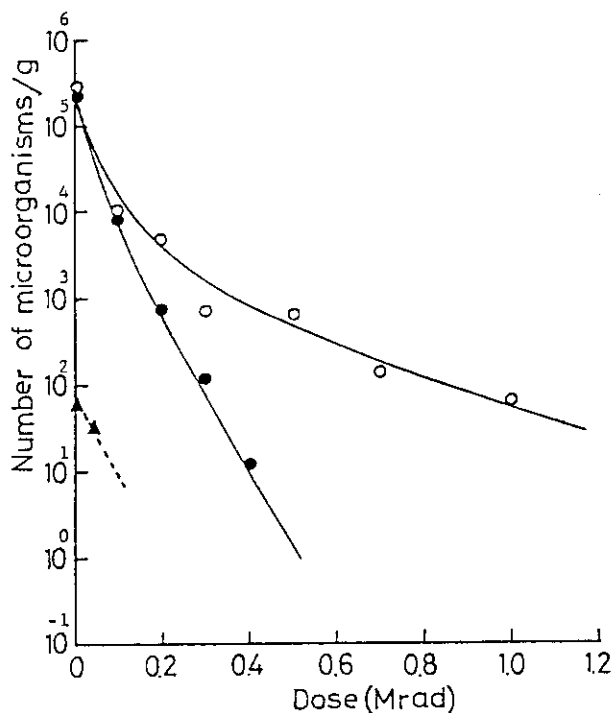


Fig.3.3 Decrease in Number of Microorganisms Contaminating in Pelleted Feed for Piglets by Irradiation.

Symbols: ○, total aerobic bacteria; ●, coliforms; ▲, osmophilic moulds.

前および 30℃, 85%RH で 1 カ月間貯蔵して糸状菌が生育した後の菌数を計測した結果を Table 3.4 に示した。なお、この場合は培地上に生育してくる全ての糸状菌数を計測した。貯蔵前の飼料 A の場合、8%の食塩濃度では 1g 当り  $1.3 \times 10^4$  個の菌数が検出されたのに対し、10%で  $1.4 \times 10^4$  個、15%で  $1.1 \times 10^3$  個となった。8%濃度では Fusarium などの一般糸状菌が多数含まれていたが、15%濃度では Fusarium などの生育が抑えられることが認められた。一方、高湿度下での貯蔵により好浸透圧性糸状菌が増殖したと考えられる飼料の場合には、食塩濃度 8%よりも 15%濃度でむしろ菌数が多いという結果が得られた。他の配合飼料 B を用いた場合にもほぼ同様の結果が得られた。好浸透圧性糸状菌用の培地としては通常 8%程度<sup>39)</sup>の食塩濃度が使用されているが、配合飼料の場合には好浸透圧性糸状菌以外の Fusarium などが生育してくるため菌数計測上困難な点があった。しかし培地中の食塩濃度を 15%まで上げることによりこの問題は解決された。したがって、以後の貯蔵試験では、好浸透圧性糸状菌用培地の食塩濃度は 15% を用いることとした。

## (2) 貯蔵飼料中の各種微生物の菌数変化

幼雛用配合飼料を高湿度条件下 (30℃, 85%RH) で貯蔵したときの非照射飼料中の菌数変化を Fig. 3.4 に示した。総細菌数および一般糸状菌は 1 カ月後までは多少減少し以後増大したが、2 カ月の貯蔵期間中あまり大きな変動は認められなかった。大腸菌群数は 2 カ月の貯蔵期間中しだいに減少していくことが認められた。好浸透圧性糸状菌数は貯蔵中に急激に増大し、2 カ月後には  $5.6 \times 10^6$  個/g にまで達した。また室温で 4 カ月間貯蔵した場合の菌数変化を Fig. 3.5 に示した。この場合も非照射飼料では総細菌数、大腸菌群数、一般糸状菌数ともに貯蔵中に減少する傾向が認められ、とくに大腸菌群数の減少が著しかった。0.2 Mrad 照射飼料では、一般糸状菌数および総細菌数が 3~4 カ月貯蔵後にわずかに増加する傾向が認められたが、全般的には非照射の場合と同様、貯蔵中に減少傾向を示した。これらの結果から、総細菌数の中に検出された一般細菌、大腸菌群、一般糸状菌は飼料の貯蔵中の変敗にはあまり関与していないと考えられる。一方、好浸透圧性糸状菌は貯蔵中に著しく増殖することが認められ、飼料貯蔵中の主要変敗菌であると考えられた。好浸透圧性糸状菌数の変化は以下で詳しく述べるため、Fig. 3.5 の結果からは除いた。

## (3) 各種湿度条件下で貯蔵した飼料中の好浸透圧性糸状菌数の変化

各種湿度条件下に飼料を貯蔵した場合の好浸透圧性糸状菌数の変化を検討するに先だち、まずモデル実験として綿栓した三角フラスコによる貯蔵試験を行った。水分含量を 17% にまで上げた飼料を綿栓三角フラスコに入れ、0.2~1.0 Mrad の各線量照射後 30℃, 85%RH の恒温恒湿槽で貯蔵した。貯蔵中の好浸透圧性糸状菌数の変化を Fig. 3.6 に示した。この結果、非照射飼料では著しい菌数の増大が認められ、0.2 Mrad では多少増殖が遅れたが急激な菌数の増大が認められた。0.5 Mrad 照射飼料では 10 日間は糸状菌は検出されず、以後菌数が増大したが非照射、0.2 Mrad 照射飼料に比べその増加はゆるやかであった。一方、0.75 Mrad および 1.0 Mrad 照射飼料では 40 日後でも糸状菌は検出されず、好浸透圧性糸状菌は 0.75 Mrad の照射で、ほぼ完全に殺菌されるものと考えられた。

次に、飼料流通に用いられている三重のクラフト紙袋を用いて、各種湿度条件下での貯蔵試験を行った。30℃, 85%RH および 80%RH の条件下で貯蔵したときの好浸透圧性糸状菌

Table 3.4 Effect of NaCl Concentration on Growth of Osmophilic Moulds (counts per gram).

Article	Concentration of NaCl		
	8%	10%	15%
A Control	$1.3 \times 10^4$	$1.4 \times 10^4$	$1.1 \times 10^3$
A Stored*	$2.2 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$3.4 \times 10^5$
B Control	$6.2 \times 10^4$		$2.9 \times 10^3$
B Stored*	$2.5 \times 10^5$		$3.3 \times 10^5$

\* stored at 30°C, 85%RH for 1 month.

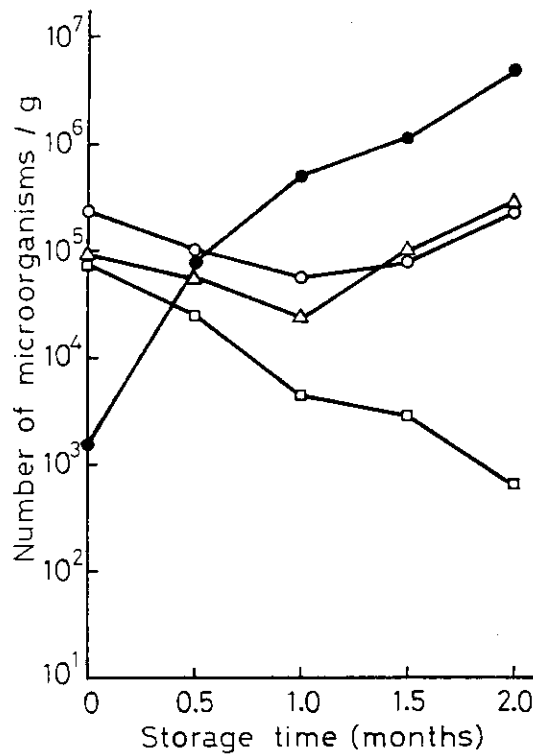


Fig.3.4 Growth of Microorganisms in Chick Feed Stored at 30°C, 85%RH, in Kraft Paper Bag.

Symbols: ○, total aerobic bacteria; □, coliforms;  
●, osmophilic moulds; △, fungi.

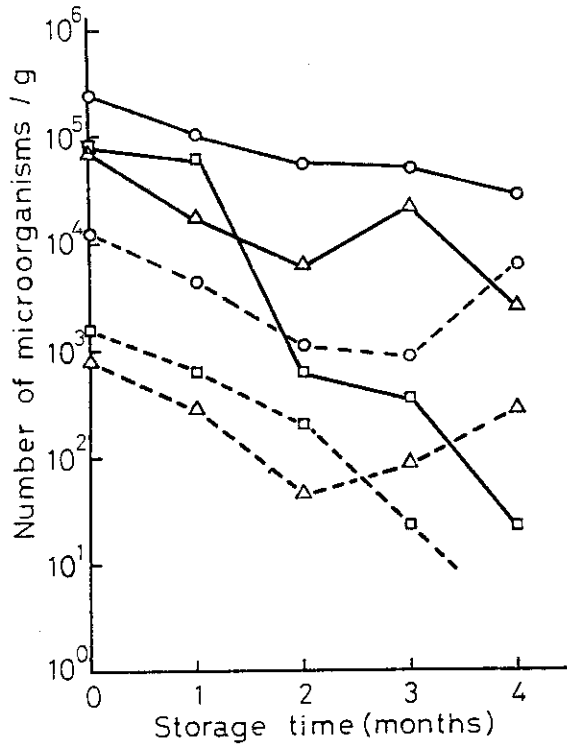


Fig.3.5 Growth of Microorganisms in Unirradiated and Irradiated Chick Feed Stored at Ambient Temperature, in Kraft Paper Bag.

Symbols: O, total aerobic bacteria; □, coliforms; Δ, fungi;  
 —, unirradiated; ----, irradiated with 0.2 Mrad.

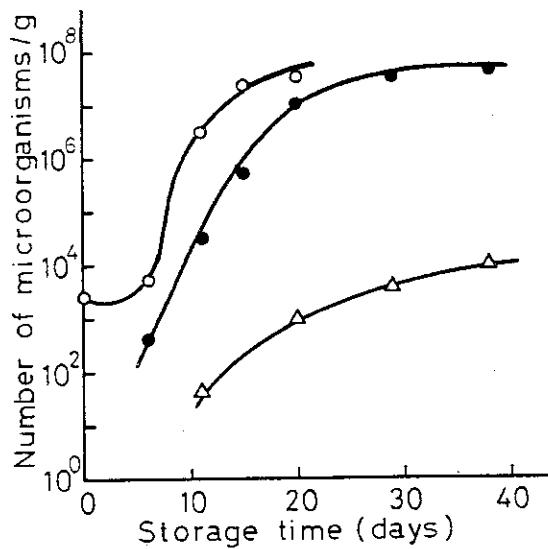


Fig.3.6 Effect of Irradiation on Growth of Osmophilic Moulds in Chick Feed Stored at 30°C in Vial Stuffed with a Cotton Plug (17% moisture content).

Symbols: O, unirradiated; ●, irradiated with 0.2 Mrad;  
 Δ, irradiated with 0.5 Mrad.

数の変化を Fig. 3.7 および Fig. 3.8 に示した。非照射飼料では、85%RH の場合も 80%RH の場合も、ともに貯蔵初期から著しい菌数の増大が認められた。0.2 Mrad 照射飼料では、85%RH の場合 0.5 カ月後から著しい菌数の増大が認められたのに対し、80%RH では 1 カ月後に著しい増大が認められた。0.5 Mrad 照射飼料では、85%RH の場合 1 カ月間は糸状菌は検出されず、1.5 カ月以後菌数が増大した。80%RH の場合は、2 カ月後にわずかに検出され、3 カ月後に多少菌数の増大が認められたが貯蔵前の非照射飼料中の菌数より低い値であった。また 75%RH の湿度条件下で 3 ヶ月間貯蔵した場合には、非照射飼料で菌数が多少増大したが、0.2 Mrad および 0.5 Mrad 照射飼料では顕著な糸状菌発生遅延効果が認められた。

#### (4) 夏期条件下で貯蔵した飼料中の好浸透圧性糸状菌数の変化

日本では梅雨時から夏期にかけて糸状菌の増殖に適した季節となる。そこで夏期の実際の飼料貯蔵条件下での好浸透圧性糸状菌の変動を調べることを目的として、外気条件に近い部屋での貯蔵試験を行った。7月中旬から11月中旬までの4カ月間、室温で貯蔵した場合の菌数変化を Fig. 3.9 に示した。非照射飼料では2～3カ月後に菌数が著しく増大したのに対し、0.2 Mrad では2カ月間糸状菌は検出されず3カ月以降増大した。0.5 Mrad 照射飼料では、3カ月間検出されず、4カ月後になって生育が認められた。したがって、飼料中の好浸透圧性糸状菌は照射により発生を抑制することが可能であり、0.5 Mrad の照射で夏期条件下でも3～4カ月間貯蔵できるものと考えられた。

以上のように、配合飼料中の総細菌数、大腸菌群および一般糸状菌は貯蔵中に減少傾向を示したことから、貯蔵中の変敗には余り関与していないものと考えられた。一方、好浸透圧性糸状菌は貯蔵中に著しく増殖することが認められ、その主要菌は A. glaucus 群、A. restrictus 群、A. candidus、A. versicolor などであった。これら Aspergillus 属は低水分で生育可能<sup>40)</sup> であるため、飼料の貯蔵中に優先的に増殖したのと考えられる。好浸透圧性糸状菌は比較的放射線抵抗性が弱く、Fig. 3.1 および Fig. 3.2 の殺菌曲線から求めた  $D_{10}$  値はおのおの 66 krad および 40 krad であった。Fig. 3.1 と Fig. 3.2 で求めたこれら  $D_{10}$  値にかなりの差が認められたが、これは構成糸状菌種、水分含量、生育状態等が異なるため、このような相違が生じたものと考えられる。この結果から、 $12D_{10}$  として完全殺菌線量を求めると、0.5～0.8 Mrad と計算された。実際の貯蔵試験の結果でも 0.5 Mrad では完全殺菌されず 0.75 Mrad の線量が必要であり、計算から求めた線量とはほぼ一致した。したがって、飼料中の好浸透圧性糸状菌の完全殺菌のためには 0.75 Mrad の線量が必要であると結論できる。また水分含量が 11～14% の通常の市販飼料を夏期条件下で数カ月間貯蔵するための必要線量としては 0.5 Mrad で十分であろう。

滝川<sup>41)</sup> は糸状菌の生えた飼料は嗜好性や消化性が悪くなり、動物の発育が悪くなることがあると指摘している。したがって、飼料中の糸状菌の放射線殺菌を行うことは、単に飼料の変敗防止やマイコトキシン生産の防止のみならず、嗜好性や消化性の低下防止にも寄与できるものと考えられる。

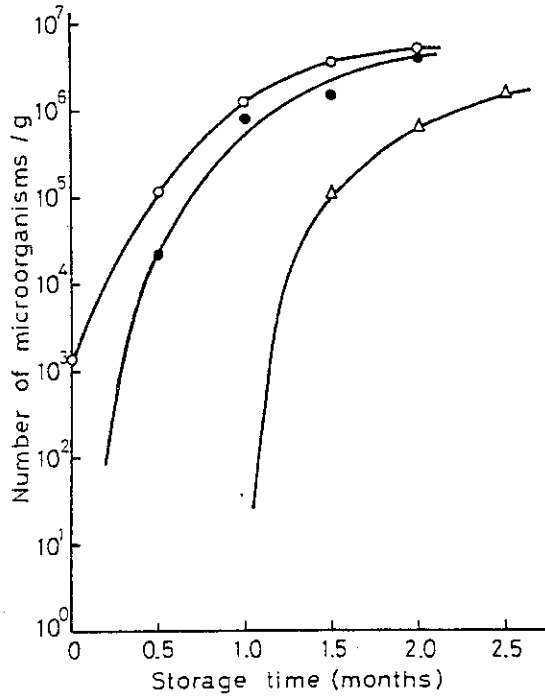


Fig.3.7 Effect of Irradiation on Growth of Osmophilic Moulds in Chick Feed Stored at 30°C, 85%RH, in Kraft Paper Bag.

Symbols: O, unirradiated; ●, irradiated with 0.2 Mrad; Δ, irradiated with 0.5 Mrad.

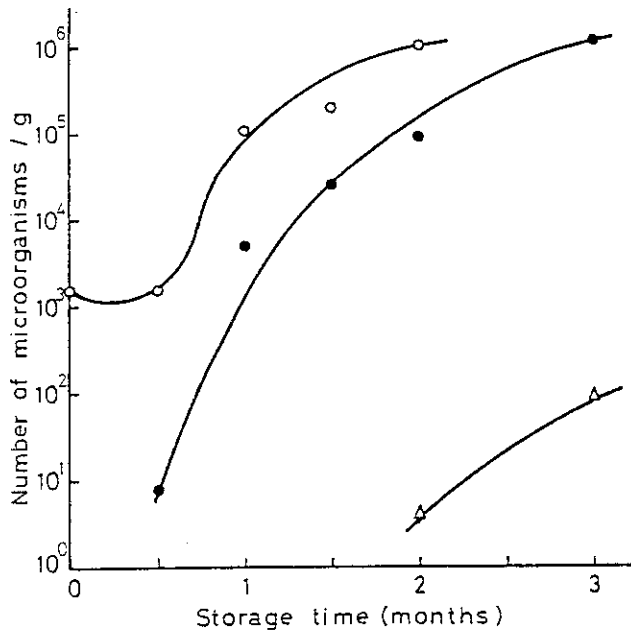


Fig.3.8 Effect of Irradiation on Growth of Osmophilic Moulds in Chick Feed Stored at 30°C, 80%RH, in Kraft Paper Bag.

Symbols: O, unirradiated; ●, irradiated with 0.2 Mrad; Δ, irradiated with 0.5 Mrad.

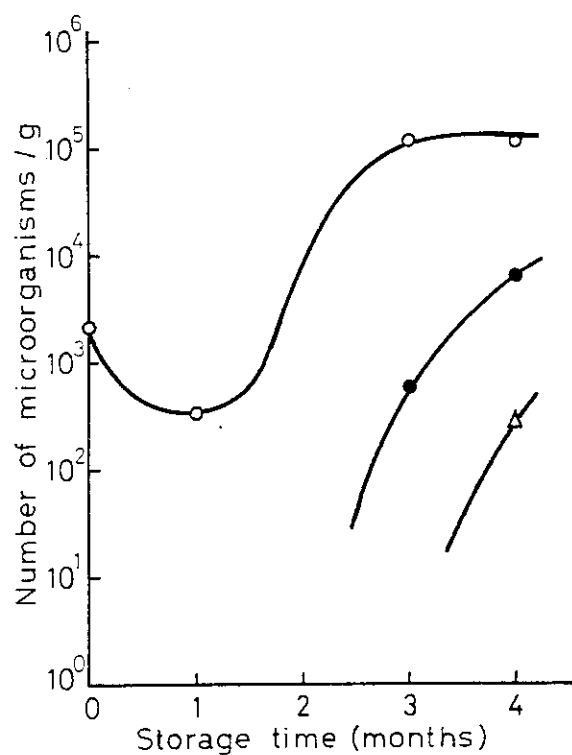


Fig.3.9 Effect of Irradiation on Growth of Osmophilic Moulds in Chick Feed Stored at Ambient Temperature, in Kraft Paper Bag.

Symbols: ○, unirradiated; ●, irradiated with 0.2 Mrad;  
 △, irradiated with 0.5 Mrad.



## 3.4 要 約

配合飼料の微生物分布，放射線殺菌効果および貯蔵効果について検討し，以下の結果を得た

- (1) 市販の粉末飼料中の総細菌数は 1 g 当り  $5.3 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^6$  個，大腸菌群は  $5.1 \times 10^3 \sim 6.8 \times 10^5$  個，好浸透圧性糸状菌は  $9.6 \times 10^2 \sim 3.5 \times 10^5$  個，一般糸状菌は  $2.1 \times 10^3 \sim 4.5 \times 10^5$  個検出された。
- (2) ペレット状飼料中の総細菌数は  $5.3 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^6$  個，大腸菌群は  $0 \sim 2.3 \times 10^3$  個，好浸透圧性糸状菌は  $2.5 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^3$  個，一般糸状菌は  $0 \sim 1.6 \times 10^3$  個と粉末飼料より少ない菌数が検出されたが，これはペレット加工時の加熱の効果と考えられた。
- (3) 幼雛用配合飼料中の汚染微生物は製造時期，メーカーが異なっても余り大きな菌数の変動は認められなかった。0.2 Mrad の照射により，総細菌数は  $1/10 \sim 1/20$  に，大腸菌群は  $1/20 \sim 1/50$  に，好浸透圧性糸状菌は検出限界以下に，一般糸状菌は  $1/10 \sim 1/1000$  に減少した。
- (4) 粉末，ペレット状いずれの飼料においても，総細菌数は 0.5 Mrad の照射で  $1/1000$  程度に減少したが，1.0 Mrad 照射してもなお 1 g 当り  $10 \sim 10^2$  個の生存菌が検出された。大腸菌群を検出限界以下とするための必要線量は 0.5～0.8 Mrad であり，一般糸状菌および好浸透圧性糸状菌は各々 0.7 Mrad および 0.2 Mrad で検出限界以下にできた。
- (5) 飼料中の好浸透圧性糸状菌数は，高湿度条件下で貯蔵中に著しく増大した。これに対し，総細菌数，大腸菌群，一般糸状菌は貯蔵中に著しく増加することはなく，むしろ減少傾向を示した。
- (6) 0.2 Mrad 照射飼料中の好浸透圧性糸状菌数は貯蔵中に著しく増大したが，0.5 Mrad 照射飼料では顕著な抑制効果が認められ，夏期条件下 ( $15 \sim 34^\circ\text{C}$ ， $60 \sim 90\% \text{RH}$ ) でも 3～4 カ月間貯蔵可能であった。0.75 Mrad 照射飼料では好浸透圧性糸状菌はほぼ完全に殺菌された。
- (7) 飼料の殺菌曲線から得られた好浸透圧性糸状菌の  $D_{10}$  値 40 および 66 krad から  $12 D_{10}$  として求めた完全殺菌線量は 0.5～0.8 Mrad であり，実際の貯蔵試験結果から求められた必要線量とほぼ一致した。

#### 4. 飼料より分離されたマイコトキシン産生糸状菌 Aspergillus versicolor の放射線感受性

##### 4.1 緒言

わが国は高温多湿な気候条件のため糸状菌が増殖しやすい環境にあり、糸状菌による家畜の飼料中毒発生例が佐々木ら<sup>42,43)</sup> 角田ら<sup>44,45)</sup> によって報告されている。糸状菌による中毒の原因物質であるマイコトキシンに関しては、1960年に英国で発生した七面鳥雛の大量中毒死がA. flavus 産生のアフラトキシンによることが明らかにされて以来、数多くの研究が行われている。これまでに知られているマイコトキシンの一つに、Fig. 4.1 に示した構造式を有するステリグマトシスチンがある。<sup>46)</sup> ステリグマトシスチンの発がん作用はアフラトキシンB<sub>1</sub> の1/125 程度と低いが、産生菌であるA. versicolor は穀類に広く分布しており、とくにわが国ではアフラトキシン以上に重視する必要があるマイコトキシンであると指摘されている。<sup>47)</sup>

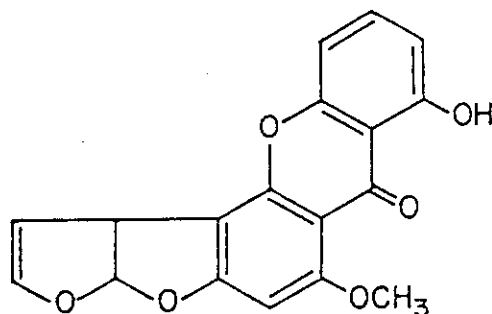


Fig.4.1 Chemical Structure of Sterigmatocystin.

前章において、配合飼料中の好浸透圧性糸状菌の主要構成菌としてA. glaucus 群、A. gracilis, A. candidus の他A. versicolor が検出されている。そこで本章では、配合飼料から分離されたマイコトキシン産生菌の代表例として、A. versicolor についてステリグマトシスチン産生能を明らかにするとともに、ステリグマトシスチンの放射線照射による変化を検討した。また代表的な好浸透圧性糸状菌の放射線感受性について、A. versicolor を中心に検討した。

##### 4.2 実験方法

###### 4.2.1 供試菌株

配合飼料から分離されたA. versicolor M13, M26, C132, A. gracilis M7, A. candidus M15 およびA. glaucus 群の代表としてA. pseudoglaucus M17 を用いた。またステリグマトシスチン産生株として知られているA. versicolor MYA - 0056を比較のため用いた。

#### 4.2.2 分生子および子ノウ胞子懸濁液の調製

分生子および子ノウ胞子は伊藤ら<sup>40)</sup> および渡辺ら<sup>23)</sup> によって報告されている方法に準じて調製した。すなわち分離された菌株を 7.5% NaCl - malt extract agar 培地で 30℃, 10 ~ 14 日培養後, No. 2 glass filter により菌糸を除いた。ろ液中の分生子を遠心分離により集め, 0.02% の Tween 20 を含む 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁したものを供試液とした。乾燥状態の分生子は, 1% ペプトン水に懸濁した分生子を凍結乾燥して調製した。

A. pseudoglaucus の子ノウ胞子は, malt - salt 液体培地で 30℃, 10 日培養後黄色の被子器部分を白金鉤でかきとり, 70% アツコール中に 10 分間懸濁し, ガーゼでろ過後直ちに東洋ろ紙 No. 2 を用いてろ過した。ろ紙上に残った被子器を 1/15 M リン酸緩衝液で洗浄後懸濁し, 0℃ で 30 kHz, 3 分間超音波処理し, No. 2 glass filter でろ過した液を子ノウ胞子懸濁液とした。

#### 4.2.3 照射条件

上記のようにして調製した分生子懸濁液, 分生子乾燥品および子ノウ胞子懸濁液各試料の照射は, 第 2 章で述べた方法と同様に行った。またステリグマトシスチン (Makor Chemicals Ltd., Israel) は酢酸エチルに溶解 (0.1 mg/ml) 後, 内径 15mm のパイレックス試験管に各 1 ml とり真空乾燥したものを, 空気平衡下, 室温で 50 Mrad まで照射した。

#### 4.2.4 ステリグマトシスチンの抽出, 精製

A. versicolor のステリグマトシスチン産生能は, 真鍋ら<sup>48)</sup> および武田ら<sup>49)</sup> の方法に準じて調べた。まず, 綿栓殺菌済み 300 ml 三角フラスコに, 精白米 30g と水 15ml を入れ, 米に十分吸水させてからコッホ釜で 100℃, 1 時間殺菌処理した。冷却後 A. versicolor の各菌株を接種し, 30℃ で 10 日間培養した。培養後メタノール - 1% NaCl 溶液 (55:45) 200 ml を加え, 30 分間振とうしろ過後, ろ液 100 ml をとり, n - ヘキサン 150 ml を加えて 5 分間振とうし, 油状の分析妨害物を除去した。この操作において, ステリグマトシスチンの一部は n - ヘキサン部分に移行するので, メタノール - 1% NaCl 溶液で逆抽出を 2 回行った。これらのメタノール - 1% NaCl 溶液からクロロホルム 50 ml で各 2 回, 5 分間振とう抽出し, 抽出液を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後減圧乾固した。抽出乾固物を 1 ml のアセトンに溶解し, Sephadex LH-20 カラム (8φ×450 mm) による精製を行った。

#### 4.2.5 薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析

抽出精製されたステリグマトシスチンの TLC 分析<sup>50)</sup> は, 東京化成工業のシリカゲル - スポットフィルムを用いて行った。トルエン - 酢酸エチル - ギ酸 (5:4:1) により展開後, 20% 塩化アルミニウム - メタノール溶液を噴霧, 加温後, UV ランプ (波長 365nm) 照射下でステリグマトシスチンによる黄色蛍光の有無, 標品との R<sub>f</sub> 値を比較した。

#### 4.2.6 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析

ステリグマトシスチンの定量は, 島津 LC-3A 型 HPLC 分析装置を用いて, 五十畑ら<sup>51)</sup>

の方法に準じて行った。カラムとしてはシリカゲル(6φ×300mm)を用い、330nmにおける紫外吸収により検出した。溶出液としてはクロロホルム300mlに50%酢酸2mlを加えて振とう後得られたクロロホルム層を用いて調製したクロロホルム-n-ヘキサン(40:60)を用い、毎分2mlの速度で溶出した。

### 4.3 実験結果および考察

#### 4.3.1 A. versicolor のステリグマトシスチン産生能

好浸透圧性糸状菌は飼料の変敗菌として問題であるばかりでなく、そのマイコトキシン産生能が重要な問題となる。飼料からA. chevalieri, A. ruber, A. candidus, A. versicolor などマイコトキシンを産生する可能性のある好浸透圧性糸状菌が検出された。これら糸状菌の中でA. versicolorはとくに高い頻度でステリグマトシスチンを産生することが知られている<sup>47,50)</sup>ので、飼料から分離された3株についてその産生能を調べた。A. versicolorを精白米上で培養後、抽出、精製してTLC分析を行った結果をFig. 4.2に示した。ステリグマトシスチン産生株として知られるMYA-0056株抽出精製液およびステリグマトシスチン標品も同時に展開した結果、M13, C132およびMYA-0056株に標品と同じR<sub>f</sub>値をもつ黄色の蛍光スポットが得られた。しかしM26株にはこの黄色スポットは見られなかった。したがって、M26株以外の菌株はステリグマトシスチン産生能を有するものと考えられた。次にこの抽出液中のステリグマトシスチン含量をHPLCにより定量した。TLCの分析結果と同様、M26株を除く3株は標品と同じ溶出位置にピークを有することが認められた。Table 4.1に示したように、飼料からの分離株M13およびC132のステリグマトシスチン産生能は、MYA-0056株の約1/2~1/3であった。これらの値は、真鍋ら<sup>48)</sup>が米から分離したA. versicolorについて報告している値の範囲内に含まれていた。なお、Fig. 4.3に示したようにMYA-0056株の場合、ステリグマトシスチンのピークの後もう一つの溶出ピークが認められたが、これは武田ら<sup>49)</sup>が報告しているようなステリグマトシスチン誘導体の一つであると考えられる。飼料からの分離株には、このピークは検出されなかった。

以上のように、飼料からのA. versicolorの検出率は高く、ステリグマトシスチン産生株も多い。一方、飼料および飼料原料から検出されたA. flavusは東南アジア産調整魚粉からの1種のみで検出頻度は極めて低く、またアフラトキシン産生能を有する株は少ないと報告されている。<sup>47)</sup> A. versicolorに比してA. flavusの検出頻度が低い原因として、生育に必要な最少水分活性 $a_w$ の相違(A. versicolor: 0.76, A. flavus: 0.86)<sup>47)</sup>が関与していると考えられる。したがって、配合飼料のように水分含量が少なく $a_w$ も低い試料では、低 $a_w$ 下で生育可能な好浸透圧性糸状菌のマイコトキシンが重要な問題となるであろう。

#### 4.3.2 ステリグマトシスチンの放射線分解

各種マイコトキシンのうち、アフラトキシンについての放射線分解に関する報告<sup>52,53)</sup>があるが、ステリグマトシスチンについての報告は見当たらない。そこでステリグマトシスチン標品を用いて、放射線照射による変化について検討した。乾燥状態、空気平衡下で25Mrad照射

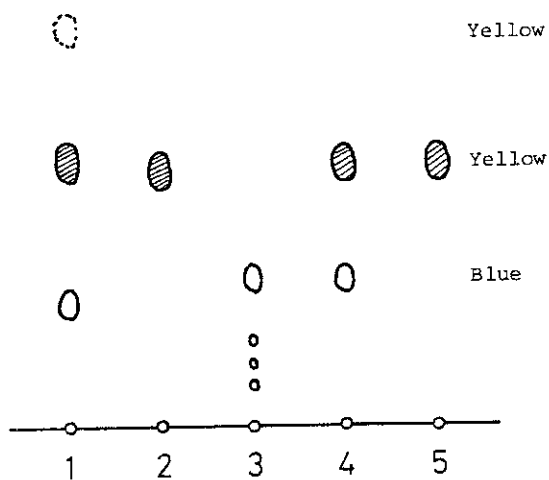


Fig.4.2 Fluorescent Spots of Extracts from Various Strains of A. versicolor on TLC.  
 1, MYA-0056; 2, M13; 3, M26; 4, C132; 5, sterigmatocystin.



Fig.4.3 HPLC Chromatogram of Extract of A. versicolor MYA-0056.

Table 4.1 Sterigmatocystin Production by A. versicolor on Rice Incubated at 30°C for 10 days.

Strain	Sterigmatocystin content(μg)
<u>A. versicolor</u> M13	410
M26	ND*
C132	280
MYA-0056	730

\* not detected.

した場合の吸収スペクトルの変化をFig. 4.4に示した。ステリグマトシスチンは319nmに吸収ピークを有するが、25 Mrad 照射しても吸収ピークがわずかに低下する程度の変化しか認められなかった。Fig. 4.5にはHPLC分析によるステリグマトシスチン定量値と線量との関係を示した。ステリグマトシスチン量は照射により直線的に減少することが認められた。しかしステリグマトシスチンは乾燥状態では放射線に対して安定で、完全に分解するには52 Mradの高線量を要することが明らかとなった。栗飯原ら<sup>52)</sup>は、アフラトキシンは乾燥状態、18.2 Mradの照射で約10%が分解すると報告している。このようにマイコトキシンは乾燥状態では放射線に対して極めて安定で、分解のためには50 Mrad以上の高線量が必要であった。

#### 4.3.3 A. versicolorの放射線感受性

飼料から分離されたA. versicolor M13 および比較のために用いたMYA-0056株について、1/15 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)中および乾燥状態での放射線感受性について検討した結果をFig. 4.6に示した。分生子の死滅曲線は、緩衝液中でも乾燥状態でもともにシグモイド型であり、他の分離株M26, C132でもほぼ同様の死滅曲線が得られた。また配合飼料から分離された他の代表的な好浸透圧性糸状菌の放射線感受性を調べた。Fig. 4.7にA. candidus M15 およびA. gracilis M7の分生子、Fig. 4.8にA. pseudoglaucus M17の分生子および子ノウ胞子の死滅曲線を示した。A. candidus およびA. gracilisの分生子は、A. versicolorとほぼ同様の死滅曲線を示したが、A. pseudoglaucusの分生子の死滅曲線は緩衝液中、乾燥状態ともに肩を有さず、指数関数的に減少した。一方、A. pseudoglaucusの子ノウ胞子はシグモイド型の死滅曲線を示した。これら各菌株の放射線感受性を比較するため、 $D_{10}$ 値およびInduction dose(死滅曲線の直線部分を延長しsurviving fraction 1.0の線に外挿して得られる線量)を求めた結果をTable 4.2に示した。A. pseudoglaucusを除く菌株の $D_{10}$ 値は緩衝液中で32~37krad, 乾燥状態で50~56kradであり、菌種による大きな相違は認められなかった。A. pseudoglaucusだけは $D_{10}$ 値21krad, Induction dose 0であり、他の菌株に比べて多少放射線抵抗性が弱かった。しかし、A. pseudoglaucusは子ノウ胞子を形成し、この子ノウ胞子の $D_{10}$ 値50krad, Induction dose 17kradは他の菌株の乾燥状態の分生子の値とほぼ同じであった。子ノウ胞子の場合には緩衝液中でも乾燥状態でもほぼ同様の放射線感受性を示すことが明らかにされている<sup>40)</sup>ことから、本実験では乾燥状態での感受性はとくに調べなかった。

配合飼料の水分含量は通常15%以下(Table 3.1~3.3)であるので、飼料を照射した場合の糸状菌の放射線感受性は乾燥状態の値に近いものと考えられる。そこで放射線抵抗性が最も強かったA. gracilis M7の値を用いて、完全殺菌線量を $12D_{10} + \text{Induction dose}$ として計算すると683kradとなった。したがって、飼料中の好浸透圧性糸状菌は、0.7 Mradで殺菌できるといえる。伊藤ら<sup>40)</sup>は米から分離された好浸透圧性糸状菌の $D_{10}$ 値およびInduction doseについて検討しており、今回の実験では用いなかったA. ruber, A. repens, A. chevalieriといった他のAspergillus群でもほぼ同様の値が得られている。また第3章で述べたように、飼料中の好浸透圧性糸状菌の殺菌のためには0.5 Mradでは不十分で0.75 Mrad必要であるとの貯蔵結果も得られている。これらの結果を総合して、飼料の好浸透圧性糸状菌の殺菌

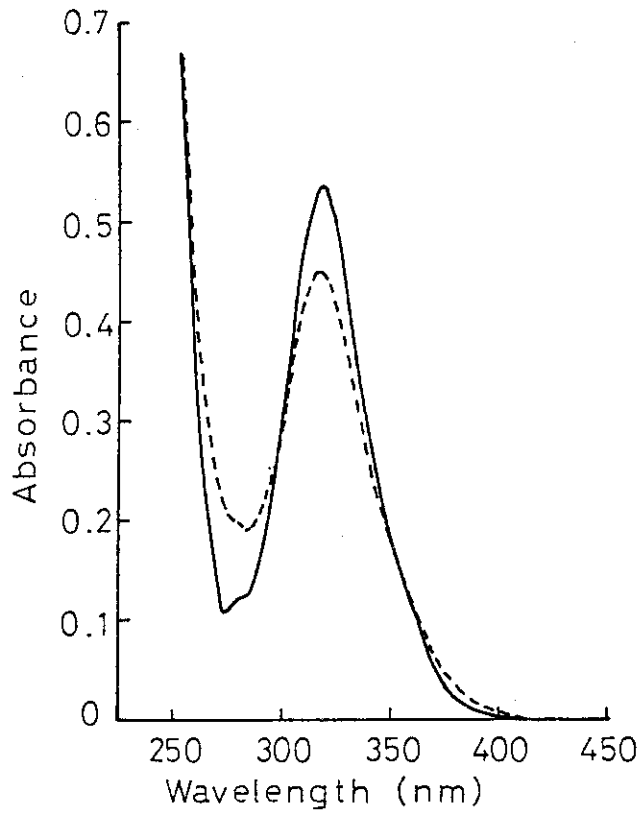


Fig.4.4 Absorption Spectra of Unirradiated and Irradiated Sterigmatocystin.

—, unirradiated; ---, irradiated with 25 Mrad.

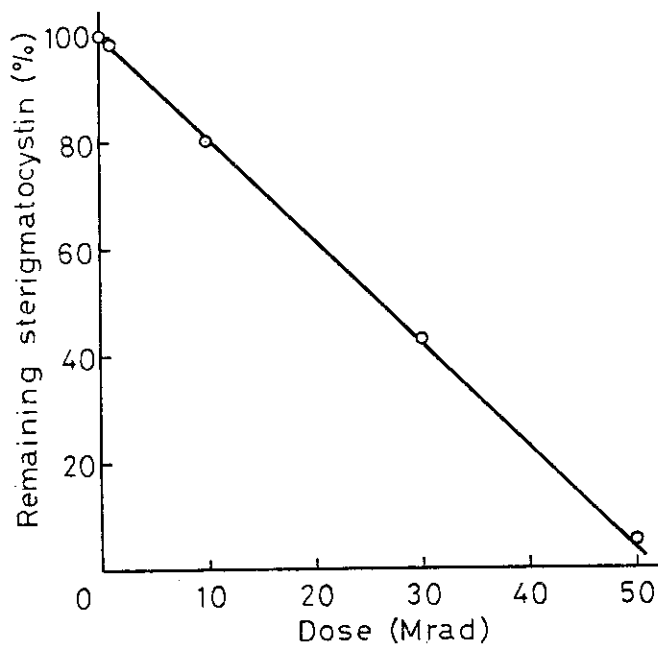


Fig.4.5 Decomposition of Sterigmatocystin in Dry State by Irradiation.

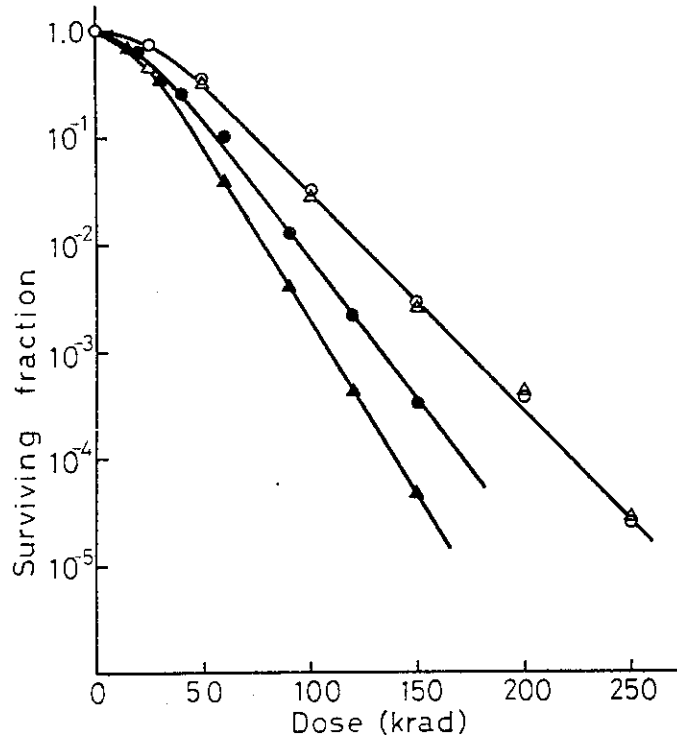


Fig.4.6 Survival Curves of Conidia of *A. versicolor* M13 and MYA-0056 Irradiated in the Wet and Dry States.

Symbols: wet(●) and dry(○) conidia of M13,  
 wet(▲) and dry(△) conidia of MYA-0056.

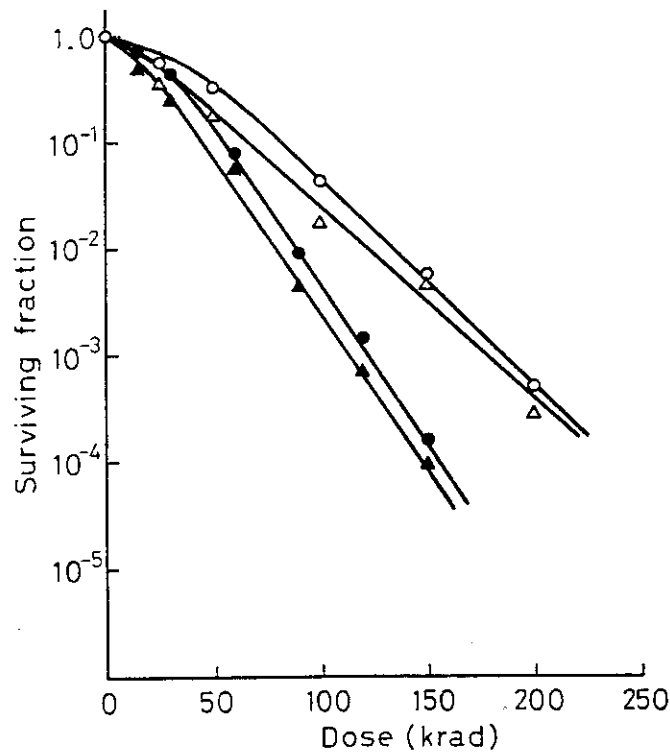


Fig.4.7 Survival Curves of Conidia of *A. candidus* M15 and *A. gracilis* M7 Irradiated in the Wet and Dry States.

Symbols: wet(●) and dry(○) conidia of *A. candidus* M15,  
 wet(▲) and dry(△) conidia of *A. gracilis* M7.



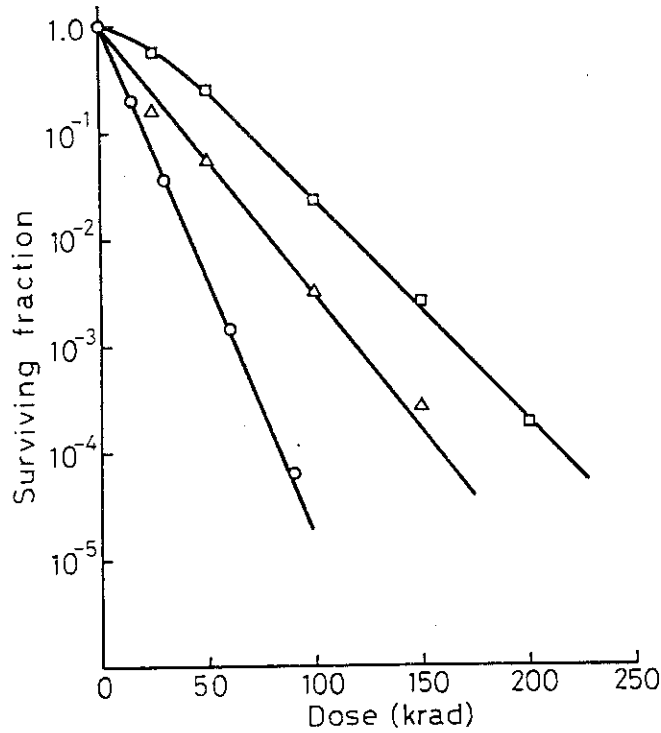


Fig.4.8 Survival Curves of *A. pseudoglaucus* M17 Irradiated at Various Conditions.  
 Symbols: O, conidia in wet state; Δ, conidia in dry state; □, ascospore in wet state.

Table 4.2 Radiosensitivity of *A. versicolor* and Other Osmophilic *Aspergillus* Isolated from Animal Feeds.

	Conidia (Ascospore <sup>*</sup> )			
	Wet		Dry	
	D <sub>10</sub> value (krad)	Induction dose (krad)	D <sub>10</sub> value (krad)	Induction dose (krad)
<i>A. versicolor</i> M13	37	17	50	25
M26	37	18	54	32
C132	37	17	51	48
MYA-0056	32	17	50	25
<i>A. candidus</i> M15	34	22	51	30
<i>A. gracilis</i> M7	35	11	56	11
<i>A. pseudoglaucus</i> M17	21	0	40	0
<i>A. pseudoglaucus</i> M17	50 <sup>*</sup>	17 <sup>*</sup>		

線量は0.7~0.75 Mrad であると結論できるであろう。なお、通常 $D_{10}$  値から殺菌線量を求める場合12D の必要はなく、病原菌では $10^{-6}$ 個/gが目安とされている。<sup>2,31)</sup> しかし好浸透圧性糸状菌の中には放射線抵抗性の強い被子器<sup>23)</sup> を形成するものもあり、また実際の貯蔵試験でも0.5 Mrad では殺菌不十分であったことから判断すると、好浸透圧性糸状菌の殺菌線量としては12D を適用するのが妥当であると考えられる。

以上のように、ステリグマトシスチンなどのマイコトキシンは乾燥状態では放射線に対して安定であり、分解のためには高線量を必要とするのに対し、産生菌である好浸透圧性糸状菌は0.7 Mrad の線量で殺菌される。したがって、マイコトキシンが産生される前に糸状菌を殺菌することが効果的である。

#### 4.4 要 約

飼料から分離された代表的な好浸透圧性糸状菌、とくにA. versicolor を中心にステリグマトシスチン産生能および放射線感受性について以下の点を明らかにした。またステリグマトシスチン標品の放射線分解についても検討し以下の結果を得た。

- (1) 飼料からの分離株A. versicolor M13, C132はステリグマトシスチン産生能を有し、産生量はMYA-0056 株の1/2 ~ 1/3 程度であった。一方、M26 株には産生能は認められなかった。
- (2) ステリグマトシスチン標品は乾燥状態で照射すると線量に比例して分解したが、放射線に対して安定であり完全分解のためには52 Mrad の高線量を必要とした。
- (3) A. versicolor は全てシグモイド型の死滅曲線を示し、 $D_{10}$  値およびInduction doseは緩衝液中で37 krad および17~18 krad, 乾燥状態で50~54 krad および25~48 krad であった。
- (4) 他の好浸透圧性糸状菌A. candidus, A. gracilis およびA. pseudoglaucus もA. versicolor とほぼ同様の放射線感受性を示し、完全殺菌線量は0.7 Mrad と求められた。

以上第2章から第4章で得られた結果を総合して、配合飼料および飼料原料の汚染病原性細菌および好浸透圧性糸状菌を殺菌して、飼料の安全性を確保し、長期貯蔵を行うための必要線量は0.8 Mrad と結論された。

## 5. 放射線照射による飼料原料の主要成分の変化

### 5.1 緒言

飼料や飼料原料の放射線殺菌を行う場合、飼料効果からみた成分劣化が生ずるかどうかが重要な問題となる。食品や飼料の主要構成成分であるタンパク質、脂肪、炭水化物の照射による変化についてはこれまでに多数の研究が行われており、以下のような反応がおこることが知られている。<sup>54,55)</sup>

タンパク質の構成成分であるアミノ酸類は水溶液中無酸素下で照射すると還元的脱アミノ、脱炭酸反応がおこり、カルボン酸およびアミンを生ずる。酸素存在下では酸化的脱アミノ反応によりケト酸が生成する。タンパク質を固体状態で照射すると一部分解や架橋がおこるが、5 Mrad 以下の線量では顕著な変化はおこらない。水溶液中の照射では、分子間架橋などにより比較的低線量で顕著な変化がおこる。また構成アミノ酸の中では、含硫アミノ酸や芳香族アミノ酸に変化が生じやすい。その他、酵素では活性に著しい変化がみられる。

脂肪は酸素下の照射で、自動酸化の場合と同様ヒドロペルオキシドを生成する。また飽和脂肪酸の無酸素下照射では脱炭酸がおこることも知られている。

炭水化物に関しては、単糖類、オリゴ糖、多糖類ともに照射により主として分解し、低分子化、還元性物質や酸の生成などがおこる。

これらは主として単純系、希薄水溶液系で得られた結果であり、濃厚な複合系である食品や飼料に直接応用することは困難である。

主要な植物性飼料原料である大豆粉、<sup>26)</sup> 澱粉粕、<sup>26)</sup> コーンコブミール、<sup>26)</sup> トウモロコシ、<sup>56)</sup> 米ぬか、<sup>57)</sup> ふすま<sup>57)</sup> などは、3 Mrad あるいはそれ以上の照射を行うと脂肪の酸化がおこるが、粗タンパク質、粗脂肪、粗灰分含量はほとんど変化せず、粗繊維含量は分解が生ずるため低下し消化率が増加すると報告されている。動物性飼料原料に関しては、魚粉のタンパク質の栄養価やアミノ酸組成に関する報告<sup>58,59)</sup> があるが、それ以外はほとんど見当たらない。とくに貯蔵中の成分変化に対する照射効果に関する検討は行われていない。本章では魚粉を例にとり、照射による各種成分変化を明らかにするとともに、貯蔵中の微生物による成分変化ならびに照射による成分変化の抑制効果について検討した。

### 5.2 実験方法

#### 5.2.1 照射および微生物試験

試料としては、Table 2.1 に示した近海産の魚粉Aを用いた。試料の照射および微生物試験は、第2章に述べた方法と同様に行った。

### 5.2.2 成分分析

魚粉中の各種成分ならびにその性質（粗タンパク質含量，ペプシン消化率，粗脂肪含量，酸価，過酸化物価，水分含量）はAOAC法<sup>60)</sup>および「実用飼料検査法」<sup>33)</sup>に基づいて定量した。アミノ酸分析は，6N塩酸中で110℃，24時間加水分解後，島津LC-3A型HPLC分析装置を用いて行った。

### 5.2.3 貯蔵試験

試料の水分含量を15.5%にまで高くした後，綿栓三角フラスコに入れて0.5および1.0 Mrad照射した。照射および非照射試料を30℃，85%RHの条件下で貯蔵し，一定期間ごとに微生物数および各種成分の変化を測定した。

## 5.3 実験結果および考察

### 5.3.1 照射による飼料用魚粉の成分変化

飼料および飼料原料中の微生物の殺菌は0.8 Mradで十分であることを前章までに明らかにした。しかし本章では照射による成分変化を明らかにするため，5.0 Mradまで大過剰の線量を照射した。Fig. 5.1に示したように粗タンパク質含量，ペプシン消化率，粗脂肪含量は，5.0 Mradまで照射してもほとんど変化は認められなかった。またアミノ酸組成にもほとんど変化は認められなかった（Table 5.1）。一方，Fig. 5.2に示したように酸価は照射によりわずかに増加した。過酸化物価も照射によりわずかに増加したが，4 Mrad以上の高線量では多少減少した（Fig. 5.3）。脂肪の酸化が照射によりおこることが認められたので，脱酸素下での照射を行った。三菱瓦斯化学の脱酸素剤“エージレス”を用いて脱酸素下で照射した場合の過酸化物価の変化をFig. 5.3に示した。0.5 Mradまでの照射ではわずかな増加が認められたが，それ以上の線量では減少することが認められた。

魚粉に対する照射に関しては，1.5 Mrad照射しても有効性リジンやタンパク質の栄養価に変化はない，<sup>59)</sup> 5 Mradの照射で有効性リジンが9%減少，セリンが16%減少という程度の変化を除いてアミノ酸組成，粗タンパク質含量，タンパク質消化性に変化はない，<sup>58)</sup> といった報告がある。本実験結果でも同様の結果が得られており，魚粉を5.0 Mradまで照射してもタンパク質に著しい変化は生じないと結論できるであろう。

一方，脂肪は照射により酸化されやすいことが知られている。滝川らは10%の大豆油を含む飼料<sup>61)</sup>およびトウモロコシ<sup>56)</sup>を用いて，照射による過酸化物の生成と糞に対する影響を調べている。過酸化物価は線量とともに増大し，0.6 Mradでは糞に対する影響は認められないのに対し3 Mrad以上照射した大豆油を含む飼料では消化率や飼料効率の低下が認められている。実験動物用飼料の場合脂肪含量は3~6%であり問題はないが，脂肪含量の高い飼料では真空包装や抗酸化剤の使用が望ましいと指摘されている。<sup>62)</sup> Wills<sup>63)</sup>は10%の油脂を含む合成飼料を照射した場合の過酸化物生成に対する抗酸化剤の効果について報告している。魚粉中の脂肪含量は9%程度であり，また空気中で1.0 Mrad照射しても過酸化物価の上昇はわずかである（Fig. 5.3）ことから，殺菌線量照射した魚粉を配合飼料のタンパク源として添加し

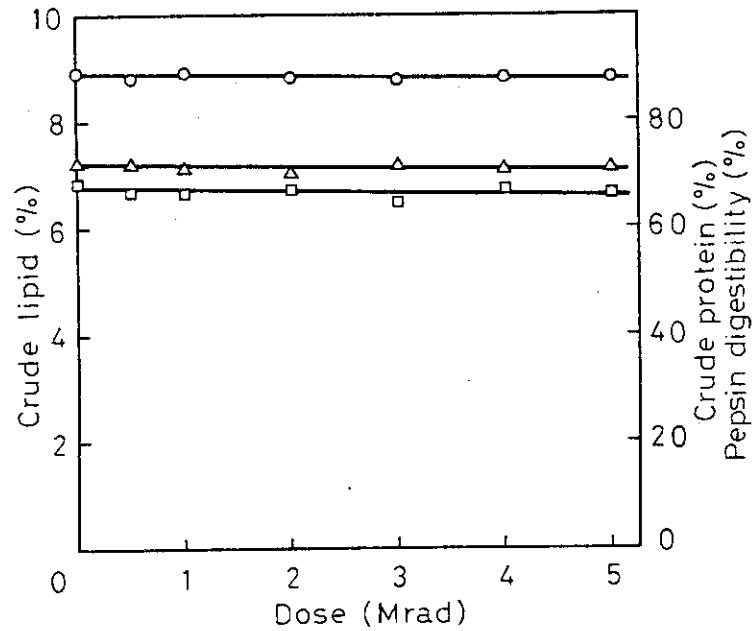


Fig.5.1 Effect of Irradiation on Crude Lipid Content, Crude Protein Content and Pepsin Digestibility of Fish Meal.

Symbols: O, crude lipid; □, crude protein;  
 Δ, pepsin digestibility.

Table 5.1 Change in Amino Acid Composition of Fish Meal by Irradiation.

Amino acid	Composition ( $\mu\text{mol}/100\text{mg}$ protein)		
	Unirradiated	1.0 Mrad	5.0 Mrad
Aspartic acid	29.4	30.2	30.2
Threonine	19.6	20.5	19.7
Serine	37.3	40.8	39.2
Glutamic acid	57.1	56.6	57.3
Glycine	72.2	74.1	71.9
Alanine	37.8	38.0	38.2
Valine	30.4	31.1	30.3
Methionine	46.2	45.5	46.3
Isoleucine	19.2	19.1	19.3
Leucine	35.0	35.2	35.2
Tyrosine	9.7	9.6	9.3
Phenylalanine	16.2	16.3	15.8
Lysine	17.6	17.8	18.8
Histidine	11.3	11.4	12.0
Arginine	22.5	21.8	22.4

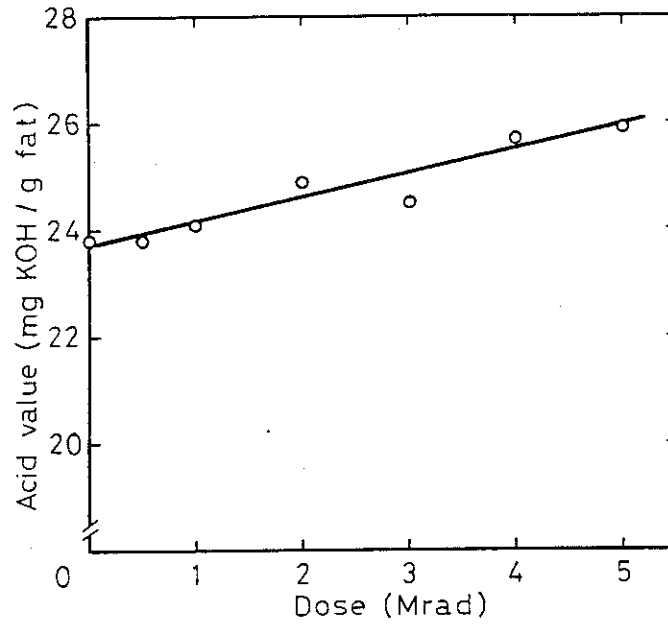


Fig.5.2 Increase in Acid Value of Fish Meal by Irradiation.

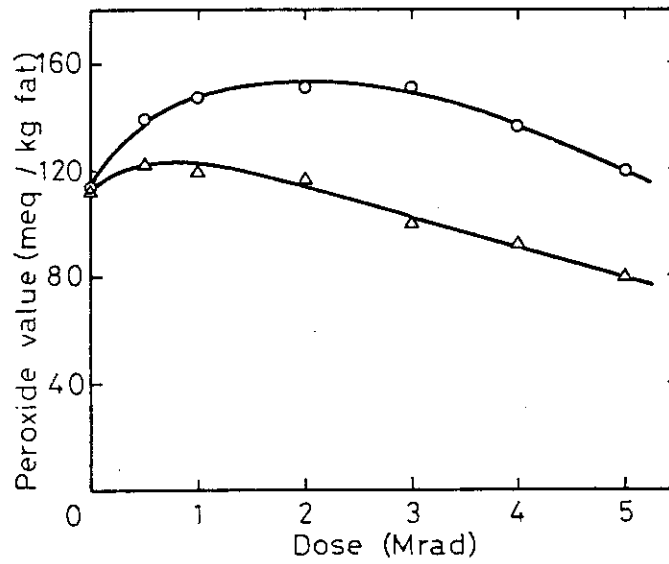


Fig.5.3 Change in Peroxide Value of Fish Meal by Irradiation.

Symbols: O, in air-equilibrium;

Δ, in deoxygenated condition.

でも飼料としての品質を低下させることはないと考えられる。しかし過酸化物価の上昇を完全に防止する必要のある場合には、本実験で行ったような脱酸素状態あるいは抗酸化剤存在下で照射して過酸化物の生成を防ぐことが必要である。

### 5.3.2 照射による飼料用魚粉貯蔵中の成分変化の抑制

#### (1) 貯蔵中の好浸透圧性糸状菌の増殖

配合飼料を高湿度条件下で貯蔵すると、汚染微生物のうち好浸透圧性糸状菌数だけが増大することはすでに述べた (Fig. 3.4~3.9)。魚粉の水分含量を15.5%と高くして貯蔵した場合にも、飼料の場合と同様の結果が得られた。すなわち、総細菌数、大腸菌群、一般糸状菌は貯蔵中に減少傾向を示し、好浸透圧性糸状菌だけが増殖した。Fig. 5.4 に30℃, 85%RHで2カ月間貯蔵したときの好浸透圧性糸状菌数の変化を示した。非照射試料中の好浸透圧性糸状菌は貯蔵中に急激に増殖し、38日後には $10^8$ 個/gに達した。0.5 Mrad 照射試料では貯蔵28日後にはじめて検出され、以後急激に増殖して58日後に $10^8$ 個/gに達した。1.0 Mrad 照射試料では58日間の貯蔵後も好浸透圧性糸状菌は検出されなかった。魚粉は通常8%程度の水分含量しかないので、0.5 Mrad の照射で夏期条件下クラフト袋中で3~4カ月は十分貯蔵できるものと考えられる。

#### (2) 貯蔵中の成分変化

魚粉を貯蔵したときの水分含量の変化をFig. 5.5に示した。非照射試料の水分含量は貯蔵10日以後に増加しはじめ、58日後には24%に達した。0.5 Mrad 照射試料では38日まで変化はなく、1.0 Mrad 照射試料では58日間変化は認められなかった。Fig. 5.6には粗脂肪含量の変化を示した。非照射試料では18日後に粗脂肪含量は著しく減少し、0.5 Mrad 照射試料では48日後に急激に減少したが、1.0 Mrad 照射試料では58日の貯蔵期間中顕著な変化は認められなかった。過酸化物価は、非照射試料で18日以後急激に増大したのに対し、照射試料では貯蔵中減少傾向を示した (Fig. 5.7)。しかし0.5 Mrad 照射試料では48日後に多少増加した。これらの水分含量、粗脂肪含量、過酸化物価の貯蔵中の変化は、好浸透圧性糸状菌の増殖と対応していた。一方、酸価はFig. 5.8に示したように、照射、非照射いずれの試料においても貯蔵中に増大することが認められた。また、粗タンパク質含量、ペプシン消化率は、照射、非照射試料とも貯蔵期間中ほとんど変化は認められなかった。

以上の結果から、大腸菌や好浸透圧性糸状菌の殺菌のため魚粉に0.5~1.0 Mrad 照射しても、成分変化はほとんどおこらないと結論できるであろう。照射により脂肪の酸化がわずかにおこることが認められたが、非照射試料を貯蔵した場合の変化よりずっと小さく、問題にならないと考えられた。とくに貯蔵中の好浸透圧性糸状菌の増殖によってひきおこされると考えられる過酸化物価の上昇、脂肪の消費といった魚粉の品質劣化は、照射によって効果的に解決されることが明らかとなった。

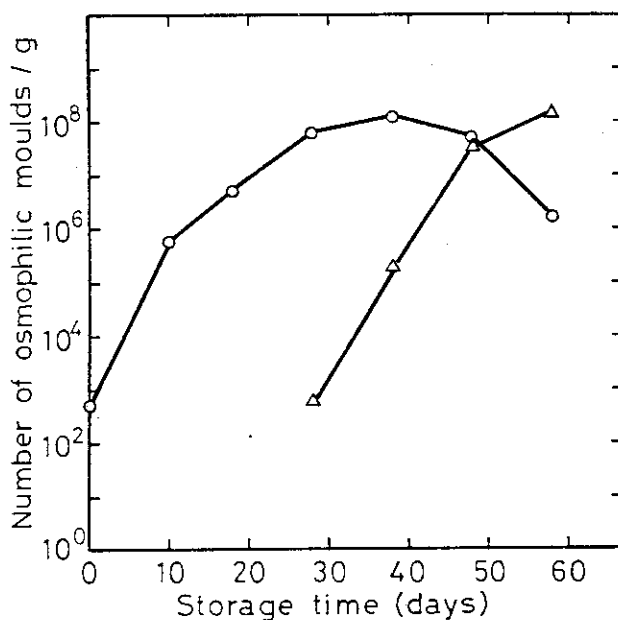


Fig.5.4 Change in Number of Osmophilic Moulds in Fish Meal Stored at 30°C.

The initial moisture content of the fish meal was adjusted to 15.5%, and samples were stored in vial stuffed with a cotton plug.

Symbols: O, unirradiated; Δ, 0.5 Mrad.

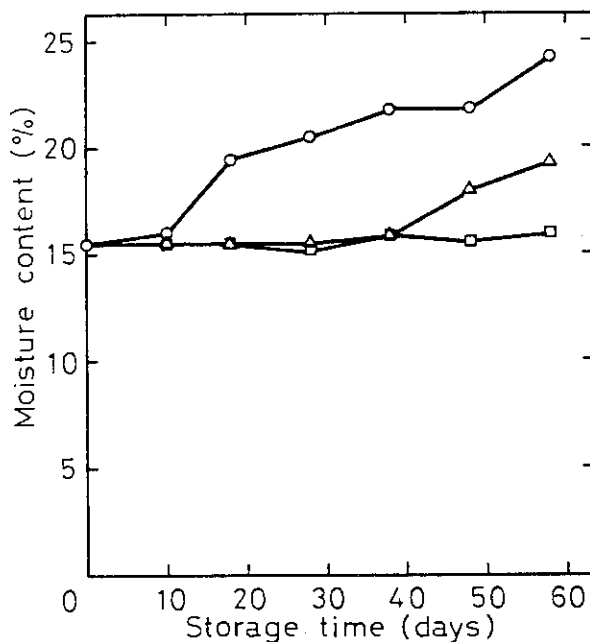


Fig.5.5 Change in Moisture Content of Irradiated and Unirradiated Fish Meal During Storage.

Symbols: O, unirradiated; Δ, 0.5 Mrad; □, 1.0 Mrad.



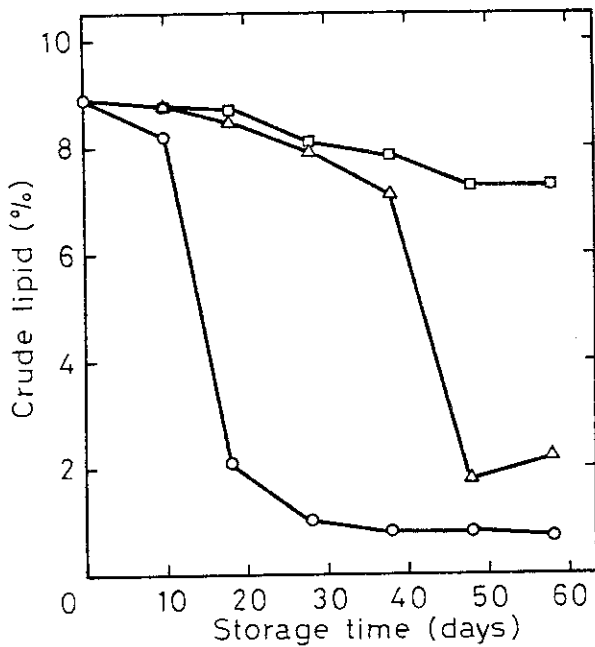


Fig.5.6  
Change in Crude Lipid Content of Irradiated and Unirradiated Fish Meal During Storage.  
Symbols: ○, unirradiated; △, 0.5 Mrad;  
□, 1.0 Mrad.

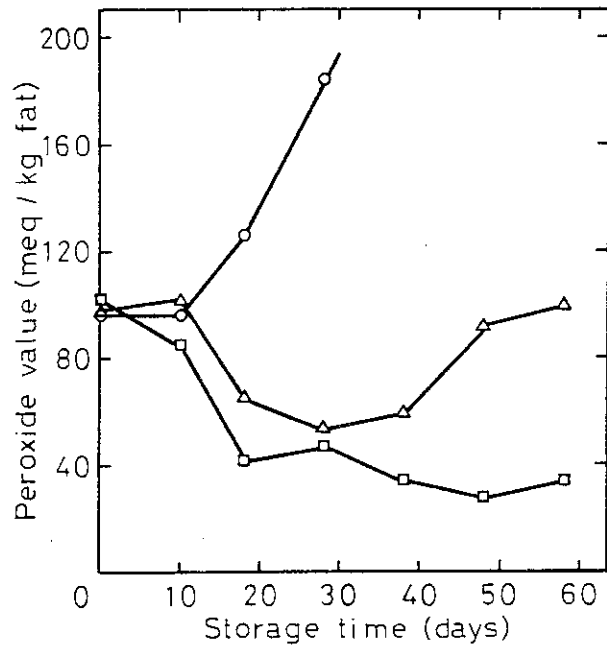


Fig.5.7  
Change in Peroxide Value of Irradiated and Unirradiated Fish Meal During Storage.  
Symbols: ○, unirradiated; △, 0.5 Mrad;  
□, 1.0 Mrad

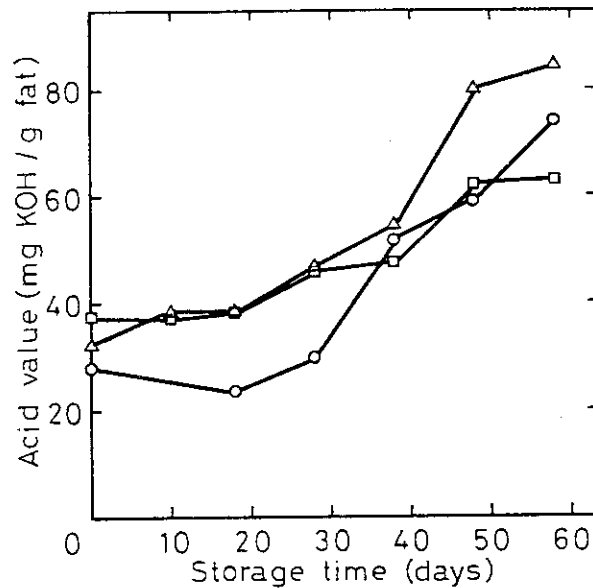


Fig.5.8 Change in Acid Value of Irradiated and Unirradiated Fish Meal During Storage.  
Symbols: ○, unirradiated; △, 0.5 Mrad; □, 1.0 Mrad.

#### 5.4 要 約

魚粉中の各種成分について、照射による変化および貯蔵中の変化について検討し以下の結果を得た。

- (1) 5.0 Mrad まで大線量の照射を行っても、粗タンパク質含量、ペプシン消化率、アミノ酸組成、粗脂肪含量には変化は認められなかった。
- (2) 脂肪の酸価および過酸化物価は照射によってわずかに増加したが、脱酸素下で照射することにより過酸化物価の増加はほとんど防止できた。
- (3) 魚粉の水分含量を15.5% と高くして30℃で貯蔵した場合、総細菌数、大腸菌群、一般糸状菌は減少傾向を示したのに対し、好浸透圧性糸状菌だけは著しく増殖した。貯蔵中の好浸透圧性糸状菌数は、非照射試料では38日後に $10^8$ 個/gに達したが、0.5 Mrad 照射試料では28日後にはじめて検出され58日後に $10^8$ 個/gに達した。1.0 Mrad 照射試料では58日間の貯蔵期間中検出されず完全殺菌されていた。
- (4) 粗タンパク質含量、ペプシン消化率は、照射、非照射いずれの試料においても貯蔵期間中ほとんど変化は認められなかった。
- (5) 貯蔵中の好浸透圧性糸状菌の増殖に対応して、魚粉中の水分含量、過酸化物価は上昇し、粗脂肪含量は急激に減少したが、照射して好浸透圧性糸状菌を殺菌することによりこれらの成分変化を防止することが可能であった。

## 6. 放射線照射による飼料原料中のリジノアラニン およびヒスタミン含量の変化

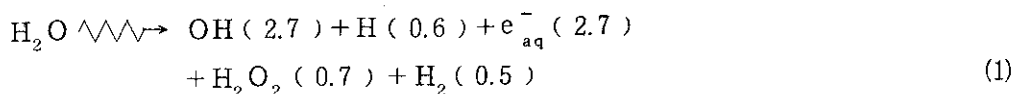
### 6.1 緒言

リジノアラニン ( $N^{\epsilon}$ -(DL-2-アミノ-2-カルボキシエチル)-リジン) は、タンパク質のアルカリ処理や加熱処理によって生ずる非通常型アミノ酸であり、<sup>64,65)</sup> ラットに対する毒性が指摘されている。<sup>66,67)</sup> 現在のところ、リジノアラニンの人体や家畜に対する毒性は不明であるが、有効性リジンの損失による栄養価の低下を防止する意味でも、生成を抑制することが必要な物質である。放射線処理によりタンパク質に架橋や変性がおこることが知られており、<sup>68,69)</sup> 照射による非通常型アミノ酸生成の可能性が指摘されている。<sup>64,70)</sup> 飼料用タンパク質原料の殺菌を目的として放射線処理を行う場合にもリジノアラニン生成の可能性が考えられるが、照射によるリジノアラニンの変化に関する報告は見当たらない。

一方、飼料用魚粉中のヒスタミンは、ニワトリの筋胃潰瘍をひきおこすと指摘されている物質であり、Harryら<sup>71,72)</sup> は4 mg/g のヒスタミンを含む飼料で雛を飼育すると潰瘍の発生と生育障害がおこると報告している。またヒスタミンは、ヒスチジン溶液の照射により生成することが知られている。<sup>73)</sup> しかしヒスチジン溶液の照射によるヒスタミンの生成<sup>74)</sup> やヒスタミンの照射による分解<sup>75)</sup> は主として生物試験法により定量されたものであり、詳細には不明な点が多く、さらに放射線化学的に検討する必要がある。

これらリジノアラニンやヒスタミンなど飼料原料として好ましくないと考えられる物質の生成について放射線化学的に研究することは、飼料成分に対する放射線の作用の解明ばかりでなく、動物を用いた健全性試験の一助ともなり得る。

飼料や食品中の成分分子に対する放射線照射効果には、成分分子に直接エネルギーが吸収されて反応がおこる直接効果と、水分子にエネルギーが吸収されて生じたラジカルなどが成分分子と反応して変化をもたらす間接効果とがあり、水溶液中での反応には主として間接効果が寄与している。放射線による水分子の分解生成物と生成のG値<sup>54,76)</sup> (100eV のエネルギーが吸収されたときに生成または分解される分子の数) は、以下のような簡単な式(1)で示される。



これら分解生成物のうち成分分子に変化をもたらす主要な活性種は、OH ラジカル、H 原子、 $e_{\text{aq}}^-$  である。

そこで本章では、放射線照射した飼料原料の健全性確認の基礎として、タンパク質やアミノ酸を用いたモデル水溶液中での照射によるリジノアラニンやヒスタミンの生成の有無および関与する活性種を明らかにするとともに、飼料原料中での含量の変化について検討した。

## 6.2 実験方法

### 6.2.1 供試試料

各種飼料原料（魚粉，フィッシュソリュブル，大豆粕，骨粉，羽毛粉）は市販品をそのまま実験に供した。タンパク質試料としては，オボアルブミン（Sigma, grade V），ウシ血清アルブミン（Sigma, 結晶凍結乾燥品），リゾチーム（生化学工業，6回結晶）を用いた。リジン，ヒスタミンおよびL-ヒスチジンは和光純薬製特級試薬を用い，またリジノアラニンおよびポリ-L-セリンはMiles社製のものを入手し実験に供した。

### 6.2.2 照射条件

各種飼料原料は第2章で述べた方法と同様に，室温，空気平衡下で $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 線を照射した。タンパク質および各種アミノ酸は主として0.01 Mリン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解して試料溶液とした。リジンとポリ-L-セリンの混合液は各20 mgを蒸留水に溶解後pHを7.0に調整し，20 mlに定容した。これら各試料溶液は，空気平衡下，氷水中で照射した。ヒスタミンおよびL-ヒスチジン水溶液の照射を行う場合には， $\text{N}_2$ ガスを30分間通気して $\text{N}_2$ 置換した状態あるいは $\text{O}_2$ および $\text{N}_2\text{O}$ を通気しながら照射した。

### 6.2.3 アミノ酸分析

各供試試料は所定の線量照射後，6 N塩酸中で110℃，24時間加水分解してアミノ酸分析用試料とした。各アミノ酸の分析は島津LC-3A型HPLC分析装置を用いて，次のような条件で行った。すなわち，ISC-07/S 1504カラム（4.0  $\phi$  × 150 mm）を用い，5%エタノールを含む0.2 Nクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 3.21），0.2 Nクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 4.25），0.9 Nクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 5.20）により順次溶出した。溶出速度は0.5 ml/min，カラム温度は55℃とし，アミノ酸の定量はo-フタルアルデヒドによる蛍光検出により行った。

### 6.2.4 ヒスタミンの定量

ヒスタミン定量用の試料抽出液は「食品衛生検査指針」<sup>77)</sup>に従って調製した。均質化した魚粉およびフィッシュソリュブル10 gに蒸留水20 mlを加えて混和し，10% TCA 20 mlを加えて10分間放置後ろ過する。ろ液10 ml（pH 4.5~7に調整）を0.2 N酢酸緩衝液（pH 4.6）で処理したAmberlite CG-50カラム（8  $\phi$  × 55 mm）に吸着・洗浄後，0.2 N塩酸にて溶出して試料抽出液とした。

抽出液中のヒスタミン含量はHPLC分析により定量した。カラムとしてはヌクレオシルC<sub>8</sub>カラム（4.6  $\phi$  × 250 mm）を用い，37℃，1.0 ml/minで溶出した。移動相としては4%エタノールを含む0.05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  - 0.1 M p-トルエンスルホン酸ナトリウム溶液のpHをリン酸で3.0に調整した溶液を用いた。ヒスタミンの検出はo-フタルアルデヒドを用いた蛍光法により行った。

### 6.3 実験結果および考察

#### 6.3.1 照射によるリジノアラニン含量の変化

##### (1) 各種飼料原料中のリジノアラニン含量と照射の影響

リジノアラニンは、アルカリ処理によりFig. 6.1に示した機構で生成するとされている。<sup>64,65)</sup> すなわち、シスチンや $\alpha$ -ホスホセリン、 $\alpha$ -グリコシルセリンなどの残基(I)から、 $\beta$ 開裂によりデヒドロアラニン(II)が生じる。次いで、このデヒドロアラニン残基の不飽和二重結合部位が、近接するリジン残基(III)のアミノ基と反応してリジノアラニン(IV)の交差結合が形成される。この架橋は塩酸加水分解を受けず、消化酵素によっても分解されない。<sup>78)</sup> 一方、アルカリ処理をしていない各種タンパク質で、単なる加熱処理によるリジノアラニンの生成が認められている。<sup>79)</sup> 飼料用の各種タンパク質原料は調製時に加熱処理されているものが多く、リジノアラニンが生成している可能性がある。そこで、種々の飼料原料中のリジノアラニン含量を調べるとともに、5.0 Mradの大線量の照射を行ったときのリジノアラニン含量の変化について検討した。Table 6.1に各種飼料用タンパク質原料中のリジノアラニン含量と、5.0 Mrad照射後の含量を示した。魚粉C、Dおよび骨粉Bにはリジノアラニンが各々0.6、0.3および2.9  $\mu\text{mol}/100\text{mg}$ 含まれており、大豆粕および羽毛粉からは検出されなかった。5.0 Mrad照射試料からも非照射試料と同程度のリジノアラニンが検出され、照射によるリジノアラニン含量の変化は認められなかった。

魚粉AおよびフィッシュソリュブルAを照射したときの塩基性アミノ酸含量をTable 6.2に示した。非照射の魚粉およびフィッシュソリュブル中には各々0.3および1.0  $\mu\text{mol}/100\text{mg}$ のリジノアラニンが検出されたが、1.0 Mradおよび5.0 Mradの照射を行っても他のアミノ酸と同様ほとんど変化は認められなかった。飼料原料は種々の成分を高濃度で含んでおり、また一般に水分含量も低いため、照射による成分変化は少ない。したがって、前章Table 5.1でも示したように5 Mrad程度の照射では構成アミノ酸にほとんど変化はおこらず、リジノアラニンの分解も蓄積も生じなかったものと考えられる。

##### (2) タンパク質溶液の照射によるリジノアラニン含量の変化

###### a) ウシ血清アルブミンおよびオボアルブミン溶液の照射

リボヌクレアーゼ、<sup>80-82)</sup> リゾチーム、<sup>81,82)</sup> 大豆タンパク質、<sup>83,84)</sup> カゼイン<sup>85,86)</sup>をはじめ、種々のタンパク質<sup>87-91)</sup>のアルカリ処理や加熱処理によりリジノアラニンが生成することが知られている。そこで照射によるタンパク質溶液中でのリジノアラニン生成の有無について検討した。0.2%濃度のウシ血清アルブミンおよびオボアルブミン溶液を照射したときの塩基性アミノ酸含量の変化をTable 6.3に示した。ウシ血清アルブミン、オボアルブミンとも5.0 Mradまでの照射により、リジン、ヒスチジン、アルギニンの各含量が減少したが、リジノアラニンの生成は認められなかった。またオボアルブミンの濃度を1.0%および10%にまで高くして照射すると、各アミノ酸含量の変化はタンパク質濃度が高い程小さくなり、10%濃度ではわずかな減少が認められるだけとなった。しかしいずれの濃度でもリジノアラニンの生成は認められなかった。一般にリジノアラニンの生成にはタンパク質濃度は関係ないとされている。<sup>92)</sup>しかし大豆タンパク質のdope調製時におけるリジノアラ

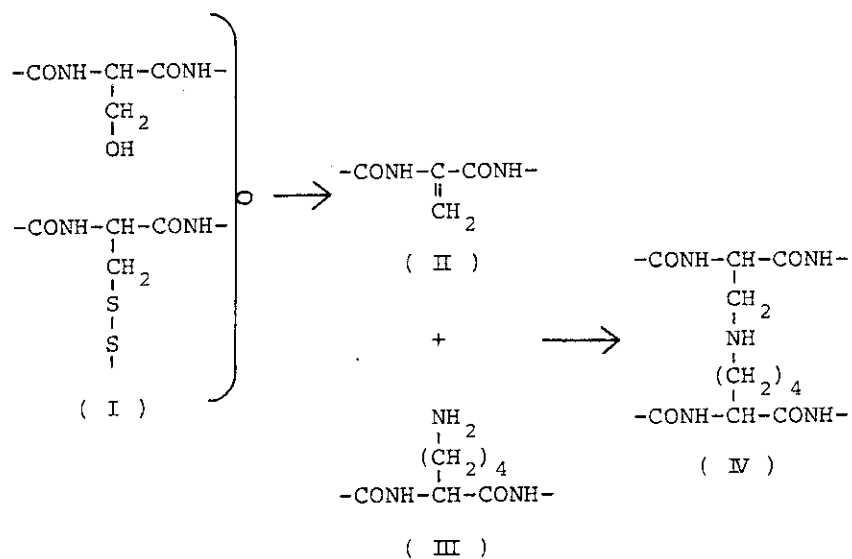


Fig.6.1 Mechanism for Alkali-Induced Lysinoalanine Formation.

Table 6.1 Lysinoalanine Content of Various Feedstuffs and Irradiation Effect.

Article	Moisture content (%)	Lysinoalanine content (μmol/100mg)	
		Unirradiated	5.0 Mrad
Bone meal B	7.3	2.9	3.0
Fish meal C	8.0	0.6	0.6
Fish meal D	8.0	0.3	0.4
Soybean meal A	13.8	ND*	ND
Feather meal A	8.1	ND	ND

\* not detected.

Table 6.2 Effect of Irradiation on Lysinoalanine(LAL) and Basic Amino Acid Content of Fish Meal and Fish Soluble.

Article	Moisture content(%)	Dose (Mrad)	Amino acid content ( $\mu\text{mol}/100\text{mg}$ )			
			LAL	LYS	HIS	ARG
Fish meal A	8.5	Unirradiated	0.3	17.6	11.3	22.5
		1.0	0.4	17.8	11.4	21.8
		5.0	0.4	18.8	12.0	22.4
Fish soluble A	46.4	Unirradiated	1.0	8.0	4.2	7.8
		1.0	0.9	7.8	4.1	7.3
		5.0	1.0	8.2	4.2	7.3

Table 6.3 Change in Basic Amino Acid Content of Bovine Serum Albumin(BSA) and Ovalbumin(OVA) by Irradiation.

Protein	Concentration	Dose (Mrad)	Amino acid content (residues/mol)			
			LAL	LYS	HIS	ARG
BSA	(0.2 %)	Unirradiated	ND*	59.4	16.8	24.6
		1.0	ND	50.5	14.1	21.2
		5.0	ND	33.5	11.9	14.7
OVA	(0.2 %)	Unirradiated	ND	17.8	7.4	12.9
		1.0	ND	16.3	5.4	11.6
		5.0	ND	11.1	5.2	7.9
	(1.0 %)	1.0	ND	17.0	6.6	12.7
		5.0	ND	13.4	6.6	9.1
	(10 %)	1.0	ND	17.6	7.6	13.1
5.0		ND	17.4	6.9	13.0	

\* not detected.

ニンの生成は攪拌時の摩擦熱の効果もあり、高タンパク質濃度で増加すると報告されており<sup>93)</sup>、また分子内架橋の他に分子間架橋の関与も指摘されている。<sup>94)</sup> したがって、リジノアラニンが分子間架橋によって形成される場合には、タンパク質濃度が高い程生成量が増加する可能性がある。しかし照射時のタンパク質濃度を10%にまで高くしてもリジノアラニンが生成することはなかった。

#### b) リゾチーム溶液の照射

照射時のpHの効果について、リゾチームを用いて検討した。タンパク質濃度を0.3%とし、pH8.0およびpH13.0で照射したときの塩基性アミノ酸の変化をTable 6.4に示した。リジン、アルギニンに対しては照射時のpHはさほど影響しないが、ヒスチジンはpH13.0での変化が小さく、pHによってアミノ酸の変化は異なる。しかしいずれのpHにおいてもリジノアラニンの生成は認められなかった。

リゾチームを0.2N NaOHに溶解し、40℃で4時間加熱処理してリジノアラニンを生成させた後、照射したときのアミノ酸の変化をTable 6.5に示した。リジノアラニン含量は照射により減少したが、他のアミノ酸(リジンやアルギニン)の減少と同程度であり、放射線に対する感受性が特に異なることはなかった。

以上のようにタンパク質の水溶液を照射した場合、タンパク質の種類(ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、リゾチーム)、タンパク質濃度(0.2~10%)、照射時のpH(7~13)の変化に関係なく、用いた全ての条件下でリジノアラニンの生成は認められなかった。一方、タンパク質中にアルカリ加熱により生成させておいたリジノアラニンは照射により減少した。したがって、タンパク質水溶液の照射でリジノアラニンが生成することはなく、むしろタンパク質中に含まれるリジノアラニンは照射により分解するという結果が得られた。

#### (3) リジノアラニンの放射線分解

リジノアラニン標品を用いて、放射線による分解について検討した。リジノアラニン溶液(35  $\mu\text{mol}/100\text{ml}$  0.01 Mリン酸緩衝液, pH 7.4)を照射したときの残存リジノアラニン含量の変化をFig. 6.2に示した。照射によってリジノアラニンは指数関数的に減少し、 $D_{37}$ 線量から求めた分解のG値は2.84となった。一般にアミノ酸の分解のG値は1~10と報告されており<sup>95)</sup>、リジノアラニンも他の通常のアミノ酸と同様の放射線感受性を示した。一方、Fig. 6.3に示したように、乾燥状態の照射では放射線に対して安定である。線量に対し直線的に減少することが認められるが、50 Mrad照射してもなお27%が残存していた。以上のように、リジノアラニンは他のアミノ酸と同様、乾燥状態では分解され難いが、希薄溶液中では容易に分解されることが明らかとなった。

#### (4) アミノ酸混合液の照射によるリジノアラニンの生成

ポリ-L-リジンとポリ-L-セリンの混合液<sup>96)</sup>あるいはリジンとポリ-L-セリンの混合液<sup>97)</sup>をアルカリ加熱処理することにより、リジノアラニンが生成すると報告されている。そこで、リジンとポリ-L-セリンの混合液をモデルとして、照射によるリジノアラニン生成の有無について検討した。照射液のアミノ酸分析の結果、リジノアラニン、アラニン、グリシンと見なされるアミノ酸が主として検出された。Fig. 6.4にこれらアミノ酸の照射による生



Table 6.4 Effect of Irradiation on Basic Amino Acid Content of Lysozyme.

	Dose (Mrad)	Amino acid content (residues/mol)			
		LAL	LYS	HIS	ARG
	Unirradiated	ND*	5.7	1.0	10.6
pH 8.0	0.1	ND	6.0	1.1	10.8
	1.0	ND	5.4	0.8	9.8
	5.0	ND	4.4	0.3	8.7
pH 13.0	0.1	ND	5.6	1.2	10.6
	1.0	ND	5.3	1.1	9.9
	5.0	ND	4.2	1.0	6.5

\* not detected.

Table 6.5 Effect of Irradiation on Lysinoalanine(LAL) and Basic Amino Acid Content of Heat Denatured Lysozyme at pH 13.0.

Dose (Mrad)	Amino acid content (residues/mol)			
	LAL	LYS	HIS	ARG
Unirradiated	2.8	3.1	1.2	10.9
0.1	2.7	2.9	1.0	11.3
1.0	2.1	2.1	1.1	9.4
5.0	1.5	1.5	0.9	5.5

Lysozyme was heated at 40°C for 4 hr before irradiation.

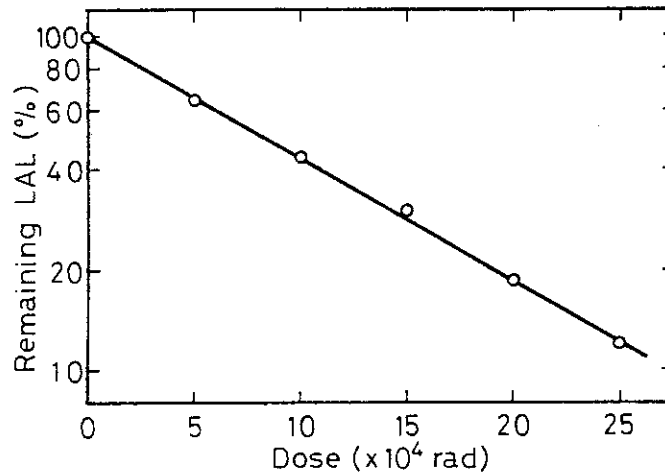


Fig.6.2 Decomposition of Lysinoalanine Irradiated in Solution.

Lysinoalanine (35  $\mu$ mol/100 ml 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4) was irradiated at 0°C in air.

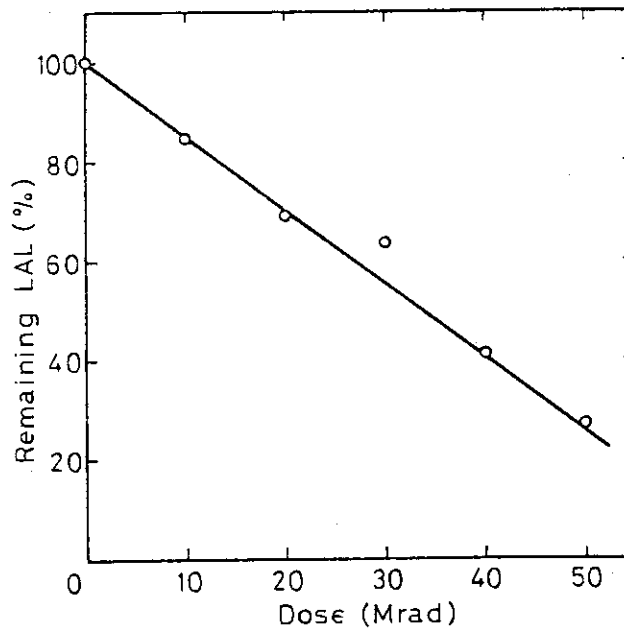


Fig.6.3 Decomposition of Lysinoalanine Irradiated in Dry State.

Lyophilized lysinoalanine was irradiated at room temperature in air.

成量の変化を示した。リジノアラニン、アラニン、グリシンともにほぼ同様の生成曲線を示し、1 Mrad での生成量はわずかであるが以後増大し、3 Mrad でほぼ飽和値に達した。

以上のように、アミノ酸の希薄混合液を用いたモデル系では、照射によるリジノアラニン生成の可能性が示された。しかしながら、飼料原料やタンパク質溶液の照射ではリジノアラニンの生成は認められず、実際の飼料や飼料原料の複合系の照射ではリジノアラニンの生成が問題となることはないと考えられた。

一方、各種飼料原料中に調製時の加熱処理によって生成したと考えられるリジノアラニンが検出された。飼料原料の加熱処理は乾燥など殺菌以外の目的もあるため必ずしも省略できるとは考えられないが、殺菌という点からだけみれば放射線処理法で代用することができ、リジノアラニン生成の防止も可能と考えられる。

### 6.3.2 照射によるヒスタミン含量の変化

#### (1) 魚粉およびフィッシュソリュブル中のヒスタミン含量の変化

ヒスタミンは細菌によるヒスチジンの脱炭酸により生成され、遊離ヒスチジン含量の多い回遊性の魚での蓄積が多いと報告されている。<sup>98,99)</sup> そこで照射によるヒスタミン含量の変化を検討するに先だち、飼料原料中のヒスタミン含量を調べた。種々の魚粉およびフィッシュソリュブル中のヒスタミン含量を Table 6.6 に示した。魚粉中のヒスタミン含量は 0.1~50.1mg/100g であり、北洋ミール(サンプル J, K)中のヒスタミン含量は近海産魚粉に比べ少なかった。フィッシュソリュブルの場合にも同様の傾向が認められ、北洋品では 0.6mg/100g のヒスタミン含量であるのに対し、近海品では 29.4 および 54.5mg/100g と高い値を示した。本実験で用いた 14 種の試料のうち 5 つの試料でヒスタミン含量が 10mg/100g のレベル(水産食品の許容限界とされているレベル<sup>100)</sup>)を越えていたが、100mg/100g のレベル(中毒症状が現われるとされるレベル<sup>101)</sup>)を越えるものはなかった。

魚粉 A とフィッシュソリュブル A 中のヒスタミン含量の照射による変化を Fig. 6.5 に示した。魚粉中のヒスタミン含量は 5 Mrad まで照射しても変化は認められなかったが、フィッシュソリュブル中のヒスタミンは照射により減少傾向を示した。このように両試料とも照射によりヒスタミン含量が増加することはなかった。

Table 6.7 に前章で述べた魚粉 A の貯蔵試験におけるヒスタミン含量の変化を示した。0.5 Mrad, 1.0 Mrad 照射試料および非照射試料(水分含量 15.5%)を 30℃で 48 日間貯蔵すると、ヒスタミン含量はいずれの試料でも減少しとくに非照射試料での減少が著しかった。ヒスタミンは大腸菌など種々の細菌のヒスチジン脱炭酸酵素により生産されることが知られている。<sup>98)</sup> 非照射の魚粉 A には  $1.4 \times 10^3$  個/g の大腸菌群を含め  $3.5 \times 10^5$  個/g の細菌が検出され、貯蔵中にヒスタミン含量が増加する可能性があると考えられたが、Table 6.7 の結果では逆に減少することが認められた。魚粉中の大腸菌群などの細菌類は貯蔵中に増殖することではなく好浸透圧性糸状菌だけが著しく増殖することから、好浸透圧性糸状菌などによりヒスタミンが消費されたものと考えられる。1.0 Mrad 照射試料ではヒスタミンの減少が少なかったが、これは照射により好浸透圧性糸状菌の増殖が抑えられたことによるであろう。なお、1.0

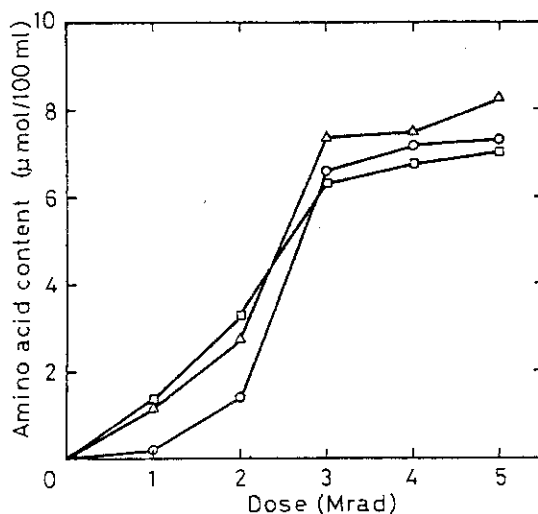


Fig.6.4 Amino Acid Formation from Mixed Solution of Lysine and Poly-L-Serine by Irradiation.

Lysine 20 mg and poly-L-serine 20 mg were dissolved in 20 ml of distilled water and the pH was adjusted to 7.0. The solution was irradiated at 0°C in air.

Symbols: ○, lysinoalanine; Δ, alanine; □, glycine.

Table 6.6 Histamine Content of Fish Meals, Fish Scrap, Mixed Meals and Fish Solubles.

Article	Histamine content (mg/100g)
Fish meal A	0.4
Fish meal B	50.1
Fish meal D	1.4
Fish meal E	0.6
Fish meal F	2.9
Fish meal I	27.3
Fish meal J*	0.1
Fish meal K*	0.1
Fish scrap N	10.6
Mixed meal C	3.7
Mixed meal G	3.7
Fish soluble A	54.5
Fish soluble B	29.4
Fish soluble C*	0.6

\* obtained from the northern-sea fisheries.

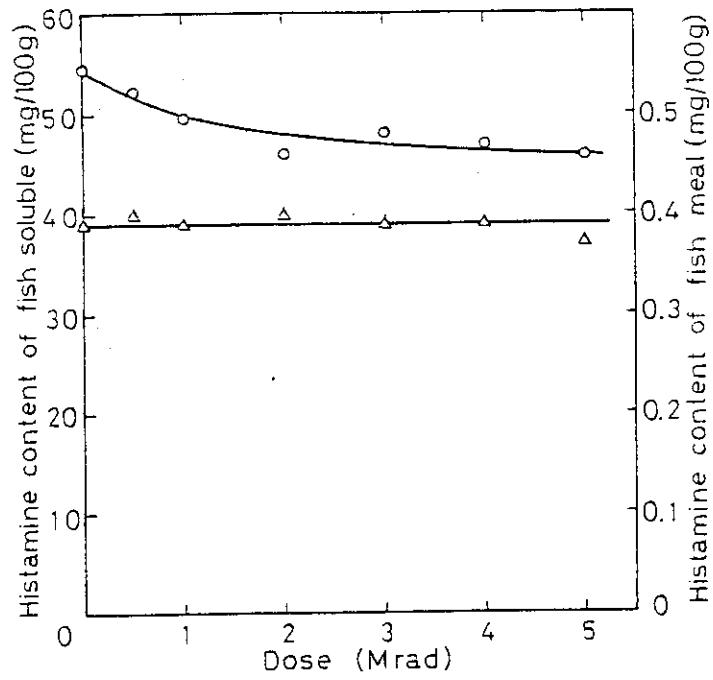


Fig.6.5 Change in Histamine Content of Fish Meal A and Fish Soluble A by Irradiation.  
 Symbols:  $\Delta$ , fish meal;  $\circ$ , fish soluble.

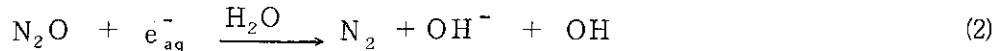
Table 6.7 Change in Histamine Content of Fish Meal During Storage after Irradiation.

Storage time (days)	Dose (Mrad)	Histamine (mg/100g)
0	Unirradiated	0.39
	0.5	0.40
	1.0	0.39
48	Unirradiated	0.06
	0.5	0.12
	1.0	0.19

Mrad 照射試料でも貯蔵前に比べヒスタミン含量が減少したが、この原因は不明である。

(2) 希薄水溶液中での照射によるヒスタミンの生成と分解

ヒスタミン溶液 (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.4) を  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  中で照射したときの変化を Fig. 6.6 に示した。いずれの場合にも指数関数的にヒスタミン量が減少することが認められ、 $\text{N}_2$  中に比べ  $\text{N}_2\text{O}$  中での減少が著しかった。 $\text{O}_2$  中ではわずかに分解が増大したが、 $\text{N}_2$  中の結果とほとんど同じであった。 $\text{N}_2\text{O}$  中では、 $e_{\text{aq}}^-$  は次に示す反応式により等モルの OH ラジカルに変換される。<sup>102)</sup>



したがって、 $\text{N}_2$  中に比べ  $\text{N}_2\text{O}$  中でヒスタミンの分解が増強されたことは、ヒスタミンの放射線分解には主として OH ラジカルが関与していることを示している。 $\text{N}_2$  中での  $D_{37}$  線量からヒスタミンの分解の G 値を求めると 1.90 となった。

一方、ヒスチジン溶液を照射するとヒスタミンが生成する。0.01 M のヒスチジンを 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、 $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  中で照射したときのヒスタミン生成量を Fig. 6.7 に示した。 $\text{N}_2$  中での照射によりヒスタミン量は増大し、約 3 Mrad で飽和値に達した。 $\text{O}_2$  中では痕跡程度のヒスタミンが検出されただけでほとんど生成されなかった。 $\text{O}_2$  中での照射では主として酸化的脱アミノ反応<sup>54)</sup>がおこるため、ヒスタミンの生成が阻害されたものと考えられる。 $\text{N}_2\text{O}$  中でのヒスタミン生成は  $\text{N}_2$  中に比べて少なく、しかも 1 Mrad 以上の線量域では減少した。 $\text{N}_2\text{O}$  中でヒスタミン生成が抑制された原因としては、 $e_{\text{aq}}^-$  のヒスタミン生成への関与や OH ラジカルによる分解増強効果による蓄積の阻害が考えられる。 $e_{\text{aq}}^-$  はヒスチジンのイミダゾール環との反応性が高く、<sup>103,104)</sup> また脱アミノ反応に関与<sup>105)</sup> することが知られており、 $e_{\text{aq}}^-$  によるヒスタミンの生成は考え難い。一方、OH ラジカルがヒスタミンの分解に寄与していることは Fig. 6.6 の結果から明らかである。したがって、 $\text{N}_2\text{O}$  中でのヒスタミン生成の減少は、 $\text{N}_2\text{O}$  中で生成された OH ラジカルによりヒスタミンの分解が増大し蓄積が阻害されたことによると考えられる。

ヒスチジン溶液からのヒスタミン生成の G 値を求めるために、 $\text{N}_2$  中低線量域での生成について検討し Fig. 6.8 の結果を得た。線量とヒスタミン生成量との間には直線関係が得られ、G 値は 0.077 と求められた。ヒスタミン生成の G 値 0.077 は分解の G 値 1.90 に比べ著しく小さかった。放射線照射によりおこると考えられるヒスチジンの脱炭酸、脱アミノ、イミダゾール環の開裂など種々の反応のうち、脱炭酸されたものだけしかヒスタミンとして検出されないため生成の G 値は小さく、一方分解の G 値が大きいのは全ての反応が寄与し得るためと考えられる。またヒスタミンの分解収率が高いことから、生成したヒスタミンがさらに分解され、蓄積が抑制されたものと考えられる。

以上のように放射線照射では種々の反応が同時におこり複雑である。これら単純水溶液系での反応に比べ、複合系である飼料原料や配合飼料中では各成分間の相互作用なども関与しさらに複雑となる。しかし魚粉や配合飼料は水分含量が低く乾燥状態に近いいため照射による間接作

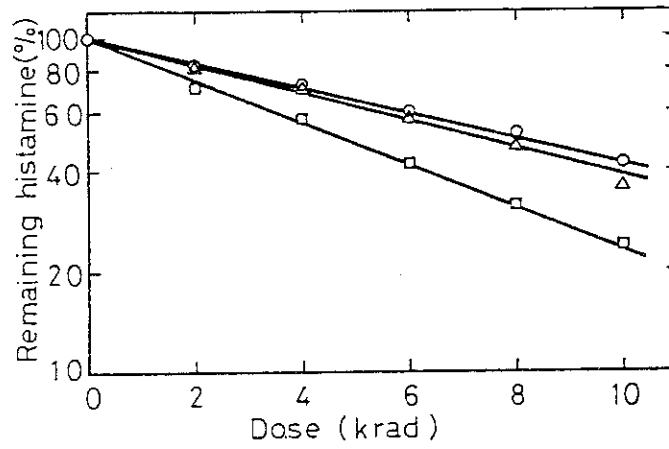


Fig.6.6 Decomposition of Histamine Irradiated in 2.5 µg/ml Solution at pH 7.4.

Symbols: ○, N<sub>2</sub>; △, O<sub>2</sub>; □, N<sub>2</sub>O.

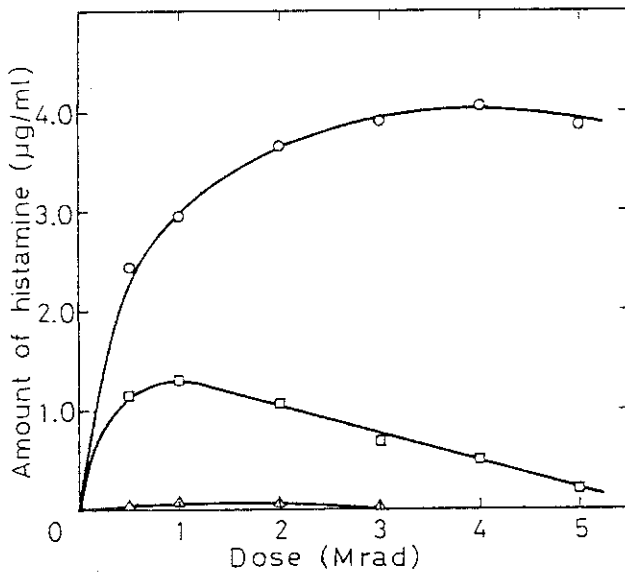


Fig.6.7 Effect of Irradiation on Histamine Formation from 0.01 M Histidine Solution at pH 7.4.

Symbols: ○, N<sub>2</sub>; △, O<sub>2</sub>; □, N<sub>2</sub>O.

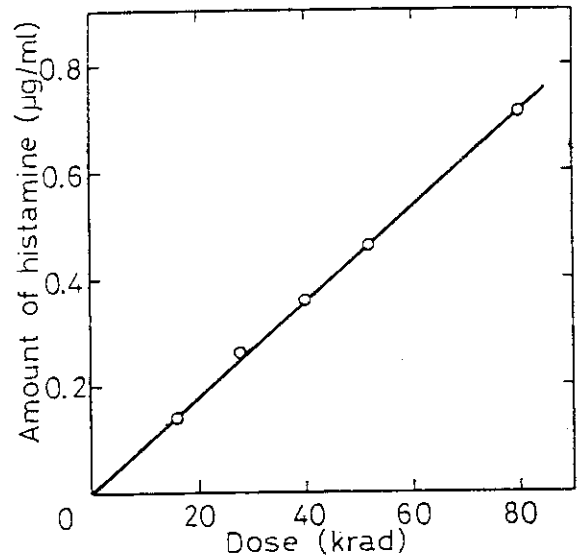


Fig.6.8 Formation of Histamine from 0.01 M Histidine Solution (pH 7.4) by Irradiation at Low Dose Range in N<sub>2</sub>.

用を受け難いこと、多数の成分が高濃度で存在するためお互いに保護効果を示すこと、ヒスタミンは生成に比べ分解の方がはるかに起こりやすいことなどから判断して、飼料の安全性の上で問題となるような量のヒスタミンが照射によって蓄積することはおこり得ないと結論できるであろう。

#### 6.4 要 約

飼料中の有効性リジンの損失を招き、また毒性も示す可能性のあるリジノアラニンおよびニワトリの筋胃潰瘍の原因物質と考えられているヒスタミンについて、照射による飼料用タンパク質原料中の含量の変化およびタンパク質やアミノ酸を用いたモデル水溶液系での照射による生成と分解について基礎的検討を行い、以下の結果を得た。

- (1) リジノアラニンは、魚粉3種、フィッシュソリュブル、骨粉中に各々0.3~0.6, 1.0, 2.9  $\mu\text{mol}/100\text{mg}$  検出されたが大豆粕および羽毛粉からは検出されなかった。ヒスタミンは魚粉およびフィッシュソリュブル14種中に0.1~54.5  $\text{mg}/100\text{g}$  検出されたが、北洋品に比べ近海産試料中の含量が高かった。
- (2) これら飼料原料を5 Mrad まで照射しても、リジノアラニン含量、ヒスタミン含量ともにほとんど変化せず、照射によって蓄積することはなかった。
- (3) リジノアラニン生成の可能性がアミノ酸混合液を用いたモデル溶液の照射で示されたが、タンパク質溶液では生成しなかった。またリジノアラニンは他の通常アミノ酸と同様、希薄水溶液中での照射により著しく分解(G値2.84)するが、乾燥状態では放射線に対して強い抵抗性を示した。
- (4) ヒスタミンは希薄溶液中で照射すると、指数関数的に分解することが認められ、 $\text{O}_2$  中では $\text{N}_2$  中とほぼ同様の分解曲線を示したが、 $\text{N}_2\text{O}$  中では分解が増強された。一方、ヒスチジン溶液の照射によりヒスタミンが生成するが、 $\text{N}_2\text{O}$  中での生成量は $\text{N}_2$  中より少なく、 $\text{O}_2$  中ではほとんど検出されなかった。これらの結果から、 $\text{O}_2$  はヒスタミンの生成を阻害し、またOHラジカルがヒスタミン蓄積の抑制に寄与していると考えられた。
- (5)  $\text{N}_2$  中中性希薄水溶液でのヒスタミンの分解およびヒスチジン溶液からの生成のG値は各々1.90 および0.077 であり、分解の方がはるかに起こりやすいことが明らかとなった。

以上のように、飼料の安全性からみて好ましくないと考えられるリジノアラニンやヒスタミンは、単純なモデル系での照射により生成する可能性はあるが、複合系である飼料原料中では放射線的作用を受け難く、飼料原料中にリジノアラニンやヒスタミンが蓄積することはないとの結論が得られた。



## 7. 放射線照射飼料の育雛効果

### 7.1 緒言

前章までに飼料原料および配合飼料中の病原性細菌や好浸透圧性糸状菌の殺菌には、0.8 Mrad の照射で十分なことを明らかにした。また 0.8 Mrad 程度の照射では飼料原料中の成分に変化はほとんど認められず、毒性物質の蓄積といった問題が生ずることはないとの結果が得られた。また実験用無菌動物飼料について、これまでに成分変化に関する数多くの検討が行われており、タンパク質は 6～8 Mrad 照射しても栄養学的性質やアミノ酸組成はほとんど変化しない、<sup>58,106)</sup> 有効性リジンは多少減少する、<sup>26,107)</sup> 脂溶性のビタミン A, E, K が分解しやすいが加圧蒸気滅菌法による分解に比べて少ない<sup>106～108)</sup> と報告されている。しかし飼料としての価値を総合的に判断するためには、動物の飼育試験を行うことが必要である。

一方、微生物汚染の著しい飼料を家畜、家禽に給与すると、生産性の低下、中毒等の病気発生の原因となることが知られている。<sup>41)</sup> そこで本章では各種配合飼料を用いて育雛試験を行い、放射線殺菌処理が雛の成長に及ぼす影響について検討した。

### 7.2 実験方法

#### 7.2.1 照射条件

供試飼料約 10 kg をクラフト紙袋に包装し、線量率 0.25 Mrad/hr の位置で反転照射した。照射線量は 0.5 Mrad および 1.0 Mrad とした。

#### 7.2.2 育雛試験

白色レグホン種の雄雛を用い、1週齢から3週齢までの14日間試験飼料を給与して成長試験を行った。照射飼料による育雛効果の検討の場合には1区9羽を用い、貯蔵飼料による育雛効果検討の場合には1区15羽を用い、1試験飼料に2区ずつ割当てて飼育試験を行った。

調整魚粉を配合した貯蔵飼料による試験では、飼育後各試験区から10羽を選び肝臓重量を測定した。また成長試験終了前の2日間排泄物を採取し、酸化クロム法<sup>109)</sup>により代謝エネルギー(ME)を測定した。

### 7.3 実験結果および考察

#### 7.3.1 育雛効果に及ぼす照射の影響

各種幼雛用飼料を用いて育雛試験を行い、飼料の放射線処理がその栄養価に及ぼす影響について検討した。供試飼料としては、第3章で微生物検査を行った飼料(Table 3.2)のうち、実験室で調製した飼料IおよびJと製造元の異なる市販の幼雛用飼料3種類(A, B, E)の

計5種類を用いた。調製飼料I およびJ の組成はTable 7.1に示したとおりであり、日本飼養標準を満たすように設計した。飼料Jには抗生物質として0.05%のエンラマイシンと0.025%の硫酸コリスチンを添加した。これら各飼料中の微生物汚染はすでに第3章Table 3.2に示した。実験室調製飼料に比べて市販飼料A, B, Eの方が微生物汚染が著しく、また実験室で調製した抗生物質添加飼料Jでは無添加飼料Iよりも、総細菌数および大腸菌群数は少なかった。

試験飼料の粗タンパク質含量および飼育効果についての結果をTable 7.2に示した。試験飼料の粗タンパク質含量は、1.0 Mradまで照射しても変化は認められなかった。抗生物質を添加した調製飼料では無添加の場合に比べ、増体量および飼料摂取量は有意ではないが高い値を示した。しかし照射、非照射飼料とも抗生物質添加の有無にかかわらず、飼料効率に有意の影響は認められなかった。市販飼料Eでは調製飼料と同様に良好な飼育効果が得られたが、市販飼料A, Bでは増体量および飼料効率が有意に劣った。これら市販飼料3種類のうち2種類については放射線処理を行っても有意の影響は認められなかったが、飼料Aでは照射により雛の成長および飼料効率が有意に減少した。

以上のように、5種類の飼料のうち市販の1飼料にのみ照射区で雛の成長および飼料効率の減少が認められた。しかし雛の成長の低下は線量に比例しておらず、必ずしも照射による悪影響とは考え難かった。また他の4種類の飼料では何ら照射による悪影響は認められておらず、本実験で用いた1.0 Mrad以下の照射では飼料の栄養価に悪影響はないものと考えられる。なお、1.0 Mrad照射飼料では照射臭が感じられたが、雛の嗜好性に対する影響は認められなかった。

### 7.3.2 貯蔵および照射した飼料の育雛効果

高温多湿下に貯蔵した配合飼料を用いて放射線処理による栄養価の変化について検討した。まず良質の魚粉とされる北洋ミールを5または10%配合した飼料による育雛試験を行った。これらの飼料の組成はTable 7.3に示したとおりであり、次に示す4種類の処理を行って試験飼料とした。

- 1) 30℃, 85%RHで1ヶ月間貯蔵した非照射飼料
- 2) 1.0 Mrad照射後、1)の条件で貯蔵した飼料
- 3) 1)の条件で貯蔵後、1.0 Mrad照射した飼料
- 4) 4℃の低温下で1ヶ月間保存した非照射飼料

各試験飼料中の微生物数はTable 7.4に示したように、両配合飼料ともほぼ同様の菌数が検出された。非照射飼料では大腸菌群がわずかに検出されたが、糞便由来と考えられる大腸菌はほとんど含まれていなかった。貯蔵した非照射飼料では糸状菌数が70~100倍程度増加していたが、総細菌数にはほとんど変化なく、大腸菌群数は減少していた。1 Mrad照射飼料では、わずかに検出されるものもあったが、大部分の微生物は検出限界以下であった。これらの飼料を用いた雛の成長試験の結果をTable 7.5に示した。雛の成長、飼料摂取量および飼料効率は、いずれも魚粉の配合率および飼料の処理条件による有意差は認められなかった。したがって、放射線処理を行っても育雛効果に何らの悪影響も認められなかった。

Table 7.1 Composition of Chick Feed Prepared  
at Laboratory.

Component	Content(%)
Corn	60.0
Soybean meal	13.0
Fish meal (white)	10.0
Defatted rice bran	11.5
Alfalfa meal	3.0
Sodium chloride	0.4
Calcium carbonate	1.0
Dicalcium phosphate	0.7
Trace mineral premix <sup>1)</sup>	0.05
Vitamin A,D,E premix <sup>2)</sup>	0.1
Vitamin B premix <sup>3)</sup>	0.15
Chromium oxide	0.1
Crude protein (%)	21.0
ME (kcal/g)	2.8

1) containing 8% Mn, 0.6% Fe, 0.06% Cu, 5.0% Zn  
and 0.1% I.

2) vitamin A 10,000 IU, D<sub>3</sub> 2000 IU and E 10 IU  
per gram.

3) thiamine 2mg, riboflavin 10mg, pyridoxin 2mg,  
pantothenic acid 4mg, nicotinic acid 2mg, choline  
chloride 120mg and folic acid 1mg per gram.

Table 7.2 Effect of Irradiation on Chick Performance of Various Feeds.

Chick feed	Dose	Crude protein(%)	Body weight gain(g)		Feed intake (g)		Feed efficiency	
I <sup>1)</sup>	Unirradiated	23.4	149.7 ± 12.8		257.0 ± 10.6		0.581 ± 0.028	
	0.5 Mrad	23.7	153.7	1.5	267.8	5.4	0.574	0.006
	1.0 Mrad	24.1	155.3	4.9	274.5	0	0.566	0.018
	(Average)	23.7	152.9	2.9	266.4	8.8	0.574	0.007
J <sup>2)</sup>	Unirradiated	23.8	154.9 ± 4.7		274.9 ± 3.8		0.564 ± 0.025	
	0.5 Mrad	24.1	157.5	1.2	272.0	1.0	0.579	0.006
	1.0 Mrad	23.8	159.3	1.5	274.2	3.8	0.581	0.003
	(Average)	23.9	157.2	2.2	273.7	1.5	0.575	0.009
A <sup>3)</sup>	Unirradiated	21.5	145.1 ± 0.4		277.8 ± 1.0		0.523 ± 0.001	
	0.5 Mrad	21.6	133.9	3.7 <sup>*4)</sup>	272.9	2.9	0.491	0.008 <sup>*4)</sup>
	1.0 Mrad	20.3	136.3	1.8 <sup>*4)</sup>	280.7	4.6	0.486	0.002 <sup>**4)</sup>
	(Average)	21.1 <sup>*5)</sup>	138.4	5.9 <sup>*5)</sup>	277.1	3.9 <sup>*5)</sup>	0.500	0.019 <sup>**5)</sup>
B <sup>3)</sup>	Unirradiated	22.4	135.6 ± 1.1		261.7 ± 5.5		0.518 ± 0.007	
	0.5 Mrad	22.4	141.7	4.0	270.3	5.0	0.525	0.005
	1.0 Mrad	22.1	143.9	3.3	278.1	5.2	0.518	0.002
	(Average)	22.3 <sup>*5)</sup>	140.4	4.3 <sup>*5)</sup>	270.0	8.2	0.520	0.004 <sup>**5)</sup>
E <sup>3)</sup>	Unirradiated	23.1	158.5 ± 1.8		269.9 ± 1.3		0.587 ± 0.004	
	0.5 Mrad	23.1	153.4	0.3	265.2	1.1	0.578	0.001
	1.0 Mrad	23.7	153.3	4.0	267.4	8.4	0.574	0.003
	(Average)	23.3	155.1	3.0	267.5	2.4	0.580	0.007

Chicks were grown from 1 to 3 weeks age.

1) prepared without antibiotics.

2) prepared with antibiotics.

3) commercial.

4) \*, \*\*, significantly different (P<0.05, <0.01) respectively from unirradiated sample.

5) \*, \*\*, significantly different (P<0.05, <0.01) respectively from sample I.

Table 7.3 Composition of Chick Feeds Prepared  
at Laboratory with 5% and 10% Fish Meal.

Component	Content(%)	
	FM-5%	FM-10%
Corn	60.0	60.0
Soybean meal	25.0	15.0
Fish meal (white)	5.0	10.0
Defatted rice bran	4.1	10.0
Alfalfa meal	3.0	3.0
DL-methionine	0.05	-
Sodium chloride	0.4	0.4
Calcium carbonate	0.9	0.8
Dicalcium phosphate	1.25	0.5
Trace mineral premix <sup>1)</sup>	0.05	0.05
Vitamin A,D,E premix <sup>2)</sup>	0.05	0.05
Vitamin B premix <sup>3)</sup>	0.1	0.1
Chromium oxide	0.1	0.1
Crude protein (%)	20.8	20.8
ME (kcal/g)	2.8	2.8

1), 2), 3), see Table 7.1.

Table 7.4 Effect of Irradiation and Storage on Number of Microorganisms in Chick Feeds Containing 5% and 10% Fish Meal.

Chick feed	Treatment <sup>1)</sup>	Number of microorganisms per gram				Moisture content(%)
		Total aerobic bacteria	Coliforms	Osmophilic moulds	Fungi	
FM-5%	1	$3.1 \times 10^4$	$1.3 \times 10^1$	$8.1 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	14.2
	2	$1.7 \times 10^1$	-	8	-	13.8
	3	8	-	-	-	13.9
	4	$3.2 \times 10^4$	$2.1 \times 10^2$	$1.4 \times 10^3$	$9.8 \times 10^2$	13.4
FM-10%	1	$5.1 \times 10^4$	-	$1.6 \times 10^5$	$6.0 \times 10^4$	14.3
	2	4	-	4	-	13.4
	3	-	-	-	-	14.0
	4	$6.2 \times 10^4$	$1.9 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$	$8.4 \times 10^2$	13.4

-: below detectable limit.

- 1) treatment 1: unirradiated feed after storage for 1 month at 30°C, 85%RH;  
 2: 1 Mrad irradiated feed before storage;  
 3: 1 Mrad irradiated feed after storage;  
 4: unirradiated feed keeping at 4°C.

Table 7.5 Effect of Irradiation and Storage on Chick Performance of Feeds Containing 5% and 10% Fish Meal.

Chick feed	Treatment <sup>1)</sup>	Body weight gain(g)		Feed intake(g)		Feed efficiency	
FM-5%	1	151.2 ± 0.6		284.7 ± 4.7		0.531 ± 0.007	
	2	150.7	1.7	285.9	2.8	0.527	0.011
	3	150.2	3.1	285.9	4.9	0.526	0.002
	4	151.6	2.5	287.3	5.9	0.529	0.002
FM-10%	1	153.7 ± 0.6		292.2 ± 3.7		0.526 ± 0.004	
	2	149.1	3.5	280.7	0.7	0.531	0.011
	3	152.6	2.5	286.1	0	0.533	0.008
	4	153.5	1.8	287.7	1.6	0.531	0.009

Chicks were grown from 1 to 3 weeks age.

- 1) see Table 7.4.

次に市販配合飼料および品質のよくないとされている調整魚粉を10%配合した飼料(CP 60%飼料)を用いて、同様の条件下で飼育試験を行った。各試験飼料中の微生物分布をTable 7.6に示した。本実験で用いた両飼料の微生物汚染は良質の魚粉を用いた調製飼料の場合(Table 7.4)に比べて著しく、とくに市販飼料中の菌数が多かった。調整魚粉配合飼料中の大腸菌群は50%以上が糞便由来と思われる大腸菌で占められていたのに対し、市販飼料では大腸菌群数は多かったが糞便由来の大腸菌はほとんど含まれていなかった。30℃, 85%RHで1カ月間貯蔵した飼料では総細菌数、大腸菌群数は減少したが、好浸透圧性糸状菌数は増大し、市販飼料では $3.3 \times 10^5$ 個/gに達していた。1.0 Mrad 照射飼料では総細菌数を除いて検出限界以下となった。しかし1.0 Mrad 照射後1カ月貯蔵飼料では糸状菌も多少検出され、とくに市販飼料の総細菌数は $1.7 \times 10^4$ 個/gと高い値を示した。

これらの試験飼料を用いた雛の成長試験の結果をTable 7.7に示した。調整魚粉配合飼料では市販飼料に比べて、処理法のいかんにかかわらず、すぐれた成長および飼料効率を示し飼料摂取量も多いという結果が得られた。30℃, 85%RHで1カ月間貯蔵した場合、両配合飼料とも非照射低温保存飼料に比べて成長および飼料効率が劣ったが、飼料摂取量には差異が認められなかった。貯蔵前に1 Mrad 照射した飼料では、両配合飼料とも成長が有意に改善された。しかし、飼料効率は市販飼料において有意に改善されたが、調整魚粉配合飼料では有意の影響がなかった。1カ月貯蔵後に照射した市販配合飼料では成長および飼料効率が有意に改善されたが、調整魚粉配合飼料においては改善効果は認められなかった。以上のように30℃, 85%RHで1カ月間貯蔵した飼料では、低温保存した飼料に比べて増体量および飼料効率が劣った。好浸透圧性糸状菌が増殖した魚粉では著しい粗脂肪含量の減少(Fig. 5.6)や過酸化物質の増加(Fig. 5.7)が認められ、またカビを接種したトウモロコシを配合した飼料で雛の生育が悪くなることも知られている。<sup>41)</sup>したがって、30℃, 85%RHで貯蔵した飼料での雛の増体量および飼料効率の低下には、貯蔵中に増殖した好浸透圧性糸状菌による飼料の成分の劣化や養分の損失などが関与しているものと考えられる。一方、貯蔵前に1 Mrad 照射した飼料では雛の成長は非照射飼料に比べて有意に改善され、低温保存飼料を給与した場合と類似のすぐれた成績が得られた。これは貯蔵中の好浸透圧性糸状菌の増殖による飼料中の成分の劣化や養分の損失が照射により抑制されたためと考えられる。本実験で用いた飼料は1カ月の貯蔵しか行っておらず好浸透圧性糸状菌の増殖もさほど著しくなかったが、さらに長期間の貯蔵を行えば、照射、非照射飼料間の育雛効果にはさらに顕著な差が生ずるものと考えられる。

調整魚粉配合飼料を給与した雛の肝臓重量は、貯蔵飼料、照射飼料いずれの場合にも同一であり、外観も異常は認められなかった。30℃, 85%RHで1カ月貯蔵した飼料のME価は、低温保存飼料に比べて有意に低くなった。1.0 Mrad の照射を行ってもME価に有意の影響はなかったが、貯蔵前に照射した飼料では若干高いME価が得られ、貯蔵後に照射した飼料ではやや低い値が得られた。幼雛用飼料に3 Mrad 以上照射するとME価が低下することが報告されているが、<sup>56)</sup> 1.0 Mrad 照射飼料を用いた本実験結果ではME価に変化は認められなかった。したがって、1 Mrad 以下の照射ではME価に悪影響はないものと考えられる。

以上の一連の飼育試験の結果、飼料の1 Mrad の照射は育雛効果に悪影響はなくまた好浸透

Table 7.6 Effect of Irradiation and Storage on Number of Microorganisms in Commercial and Prepared Chick Feeds.

Chick feed	Treatment <sup>1)</sup>	Number of microorganisms per gram				Moisture content(%)
		Total aerobic bacteria	Coliforms	Osmophilic moulds	Fungi	
Commercial feed	1	$4.6 \times 10^5$	$7.8 \times 10^4$	$3.3 \times 10^5$	$3.7 \times 10^4$	13.5
	2	$1.7 \times 10^4$	-	$3.9 \times 10^2$	-	14.0
	3	$2.5 \times 10^2$	-	-	-	13.5
	4	$2.8 \times 10^6$	$4.1 \times 10^5$	$2.9 \times 10^3$	$6.6 \times 10^4$	12.2
Prepared feed with CP 60% fish meal	1	$7.4 \times 10^4$	$6.2 \times 10^3$	$5.9 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$	13.3
	2	$7.9 \times 10^1$	-	$5.4 \times 10^1$	$8.3 \times 10^1$	13.6
	3	$4.6 \times 10^1$	-	-	-	13.3
	4	$5.2 \times 10^5$	$3.6 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	12.2

- : below detectable limit.

1) see Table 7.4.

Table 7.7 Effect of Irradiation and Storage on Chick Performance of Commercial and Prepared Feeds.

Chick feed	Treatment <sup>1)</sup>	Body weight gain(g)		Feed intake(g)		Feed efficiency		Liver weight (g/100g BW)		ME <sup>2)</sup> (kcal/g)
		Commercial feed	1	121.0	±0.6	265.4	±0.4	0.456	±0.001	2.41
	2	131.0	2.0*	274.5	0.4	0.478	0.006*	-	-	-
	3	133.1	4.9*	274.9	4.5	0.484	0.010*	-	-	-
	4	134.7	6.3*	265.0	8.3	0.509	0.008*	2.53	0.02	-
Prepared feed with CP 60% fish meal	1	137.7	±0.6	274.1	±4.1	0.503	±0.005	2.49	±0.04	3.27±0.02
	2	144.8	0.8**	285.9	1.1	0.507	0.004	-	-	3.32 0.03
	3	137.6	2.1	276.6	1.6	0.498	0.005	2.50	0.06	3.20 0.02
	4	147.1	0.5**	279.0	1.4	0.527	0.004*	2.48	0.06	3.37 0.02*

Chicks were grown from 1 to 3 weeks age.

1) see Table 7.4.

2) based on dry matter.

\*, \*\*, significantly different (P<0.05, <0.01) respectively from treatment 1.



圧性糸状菌を殺菌できるため、高温多湿な夏期条件下に長期間飼料を貯蔵する場合に飼料の栄養価を維持する上で有効な手段であるとの結論が得られた。

なお、一般的な殺菌法である加圧蒸気滅菌法との比較が無菌動物用飼料について行われており、繁殖成績ならびに発育成績ともに照射処理飼料の方がすぐれていることが明らかにされている。<sup>110,111)</sup>

#### 7.4 要 約

各種配合飼料を用いて、放射線殺菌処理が雛の成長に及ぼす影響について検討し、以下の結果を得た。

- (1) 市販の配合飼料に 0.5 および 1.0 Mrad の照射を行っても、雛に対する栄養価にはほとんど影響が認められなかった。
- (2) 各種調製飼料中の魚粉の品質（北洋ミールと CP 60%調整魚粉）、魚粉の配合率（5%と 10%）および抗生物質添加の有無にかかわらず、雛の成長に対する照射の影響は認められなかった。
- (3) 30℃、85%RH で 1 カ月間貯蔵し好浸透圧性糸状菌が増殖した飼料では、ME 価、雛の成長および飼料効率が有意に低下した。
- (4) 貯蔵前に 1 Mrad 照射した飼料では、貯蔵中の好浸透圧性糸状菌の増殖が抑制され、雛の成長および飼料効率の低下をほぼ防止することができた。

## 8. 飼料の照射技術に関する検討

### 8.1 緒言

飼料および飼料原料の放射線処理の一般的な方法としては、パッケージを用いた $\gamma$ 線照射処理が考えられる。しかしパッケージには一定の厚みがあるため試料中の吸収線量が不均一になるという問題点があり、パッケージを用いた照射の実用化に際しては適正線量をより均一にかつ効率よく照射するための条件を確立することが必要である。馬鈴薯等の試料を詰めたパッケージ中の吸収線量分布の実測値は、半無限均一媒質中に平行ビームが垂直入射する系における計算値とは一致せず、<sup>112)</sup>現状では飼料や飼料原料のような不均一媒質中の吸収線量分布を求めためには実測しなければならない。そこで本章では、飼料や飼料原料の実用照射を行う上で必要となる基礎データを得ることを目的として、パッケージに詰めた飼料中の吸収線量分布を測定し、線量均一度(最大線量と最小線量の比)や処理量などコンベヤによる大量処理の条件について検討した。

### 8.2 実験方法

#### 8.2.1 Fricke 線量計の調製

Fricke 線量計は市販の特級試薬をそのまま用いて調製した。すなわち、3回蒸留水あるいは Milli-Q 水を用いて調製した硫酸第1鉄溶液(鉄濃度  $1 \times 10^{-3}$  M, 食塩濃度  $1 \times 10^{-3}$  M の 0.4 M 硫酸酸性水溶液)を酸素飽和し、これを内径 15 mm, 長さ 50 mm, 肉厚 1.5 mm の共栓付パイレックス試験管に入れて線量計とした。

#### 8.2.2 照射条件

市販の粉末およびペレット状の配合飼料を  $30 \times 35 \times 45$  cm の段ボール箱に詰め、その中に Fricke 線量計を入れて照射した。定置照射には第2章に示した線源を用い、コンベヤを用いた移動照射には高さ 30 cm, 長さ 250 cm の  $^{60}\text{Co}$  板状線源(25,000 Ci)を用いた。コンベヤによる移動照射は、線源からパッケージ表面までの距離を 10 cm, コンベヤ速度 70 cm/min に設定して行った。なお、粉末およびペレット状飼料を充填したパッケージ内の平均密度は、各々 0.71 および  $0.59 \text{ g/cm}^3$  であった。

#### 8.2.3 吸収線量の測定

照射液の 304 nm における吸光度変化を日立 239 型分光光度計を用いて測定し、次式<sup>113)</sup>により換算して吸収線量を求めた。

$$\text{吸収線量 (rad)} = \frac{\Delta A \cdot N}{d \epsilon [1 + 0.007(T - 25)] \rho G} \times \frac{b}{k} \quad (1)$$

- $\Delta A$  : 304nmにおける吸光度変化  
 $N$  : アボガドロ数 ( $6.023 \times 10^{23}$  molecules  $\cdot$  mol $^{-1}$ )  
 $d$  : セルの長さ (1 cm)  
 $\epsilon$  : 分子吸光係数 ( $2196 \ell \cdot$  mol $^{-1} \cdot$  cm $^{-1}$  at 25 $^{\circ}$ C)  
 $T$  : 測定液の温度 ( $^{\circ}$ C)  
 $\rho$  : 溶液の比重 ( $1.025$  g  $\cdot$  cm $^{-3}$ )  
 $G$  : Fe $^{3+}$ の放射線収率 (15.5)  
 $b$  : エネルギー換算係数 ( $1.602 \times 10^{-14}$  rad  $\cdot$  g  $\cdot$  eV $^{-1}$ )  
 $k$  : 容量換算係数 ( $10^3$  cm $^3 \cdot$  l $^{-1}$ )

(1)式の係数を計算すると次式(2)となる。

$$\text{吸収線量 (rad)} = \frac{2.77 \times 10^4 \Delta A}{1 + 0.007 (T - 25)} \quad (2)$$

### 8.3 実験結果および考察

#### 8.3.1 Fricke線量計の測定精度に及ぼす使用水の影響

種々の化学線量計のうちFricke線量計は現在最も広く使用されている測定精度の高い線量計である。<sup>113,114)</sup>しかしFricke線量計は不純物の影響を受け易く、厳密な水の精製が必要であるとされている。このため通常3回蒸留水が用いられているが、3回蒸留水の調製には長時間を要するなどの問題点がある。そこで、精製水の調製を簡略化することを目的として、種々の水を用いた場合の測定精度を検討した。Table 8.1に3回蒸留水、蒸留水、水道水、Milli-Q水を用いて調製したFricke線量計の測定精度を示した。蒸留水はヤマト科学Autostil WA-510により、Milli-Q水はイオン交換樹脂とミリポアフィルターを用いた純水製造装置(Millipore社)により得られた水を用いた。4.32~17.9kradの線量域における測定誤差は、3回蒸留水、Milli-Q水ともに1.5%以内であった。蒸留水や水道水では誤差は大きくなったが、最大値で4%でありさほど大きくなかった。本実験で用いた水道水には10ppmのCl $^{-}$ 、2ppmの有機物および少量の金属イオン(Fe, Znなど)を含んでいたが、食塩の添加効果により測定誤差が抑えられていたものと考えられる。Fricke線量計の測定誤差としては、Fricke & Hartの1~2%<sup>115)</sup>ICRUレポートの1.5%<sup>116)</sup>IAEAマニュアルの1%<sup>113)</sup>などの報告がある。本実験で用いたMilli-Q水を用いた測定結果でも1.5%以内の誤差であり、十分な測定精度が得られていると考えられる。したがって、Milli-Q水を用いた場合にも3回蒸留水を用いた場合と同様の誤差範囲で測定でき、Fricke線量計に用いることが可能である。そこで以下の飼料中の吸収線量測定では、Milli-Q水を用いて調製したFricke線量計を用いることとした。

#### 8.3.2 飼料を詰めたパッケージ内の吸収線量分布

線源の中心線上にパッケージを置いて照射したときの線源と平行方向における吸収線量分布

Table 8.1 Effect of Water Quality on Fricke Dosimetry.

Irradiation time (min)	Dose (krad)	OD <sub>304</sub> (calc.)	Triple distilled water		Single distilled water		Tap water		Milli-Q water	
			OD <sub>304</sub> (exp.) (%)	Error (%)	OD <sub>304</sub> (exp.) (%)	Error (%)	OD <sub>304</sub> (exp.) (%)	Error (%)	OD <sub>304</sub> (exp.) (%)	Error (%)
2	4.32	0.151	0.149	1.3	0.148	2.0	0.145	4.0	0.149	1.3
3	6.01	0.210	0.213	1.4	0.218	3.8	0.206	1.9	0.208	1.0
4	7.69	0.269	0.270	0.4	0.274	1.6	0.266	1.1	0.270	0.4
5	9.41	0.329	0.331	0.6	0.334	1.6	0.323	1.8	0.329	0
6	11.10	0.388	0.390	0.5	0.395	1.8	0.380	2.1	0.388	0
7	12.81	0.448	0.449	0.2	0.457	2.0	0.441	1.6	0.446	0.4
8	14.50	0.507	0.505	0.4	0.511	0.8	0.496	2.2	0.505	0.4
9	16.19	0.566	0.568	0.4	0.574	1.4	0.561	0.9	0.565	0.2
10	17.90	0.626	0.627	0.2	0.630	0.6	0.613	2.1	0.624	0.3

Optical density at 304 nm was measured at 20.5°C.

をFig. 8.1 に示した。いずれの高さにおいても、線源と平行方向における吸収線量分布にはほとんどバラツキは認められず均一であった。線源の中心線から離れた位置で照射する場合には、線源と平行方向の吸収線量分布が不均一になるが、コンベヤを用いた照射では線源と平行方向にパッケージを移動するので問題とならない。

高さ方向における線量分布をFig. 8.2 に示した。本実験で用いた線源は高さ 30 cm で、両端部分の比放射能を高くして高さ方向の線量分布ができるだけ均一になるように調整してある。しかし各線量率位置での高さ方向の線量は、高さの中心 15 cm の位置で最も高く、両端の線量が低いという結果が得られた。またこの高さ方向における線量均一度は、線量率が高い程すなわち線源に近づく程悪くなった。したがって、高さ方向の吸収線量分布の均一化をはかるためには、低線量率位置で照射するかあるいは線源の比放射能分布や高さ等をかえて調整することが必要である。

飼料を詰めたパッケージ内の高さ方向および線源と平行方向における吸収線量分布には照射野の線量分布が直接関与しているのに対し、奥行方向では飼料による $\gamma$ 線の吸収が問題となる。Fig. 8.3 に各線量率位置で照射したときの奥行方向の吸収線量分布および空間線量分布を示した。空間線量分布に比べ飼料中の吸収線量の減少が著しく、また線量率が高い程パッケージ前面と後面の空間線量の差が大きくなるため飼料中の吸収線量の不均一性が大きくなる。したがって、パッケージ内の飼料の吸収線量を求める場合、線源のCi数、配列、線量率が異なるとその都度線量測定を行わなければならない。しかし飼料の吸収による線量減衰率を求めておけば、吸収線量や線量均一度は空間線量分布から計算で求めることが可能となる。点線源と測定点Pの間に厚さx cmの吸収物質がある場合のP点における吸収線量Dは次の式<sup>117)</sup>で求められる。

$$D = D_0 \cdot B(x) e^{-\mu x} \quad (3)$$

$D_0$  : P点における空間線量

$B(x)$ : 線量ビルドアップ係数

$\mu$  : 吸収物質の $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線に対する線吸収係数

点線源から平行ビームが照射されたとみなせる場合には、吸収物質(試料)の種類、詰め方を同一にすれば $B(x)$ 、 $\mu$ は一定の値となり、 $D/D_0$ は試料による線量減衰率を示すことになる。そこで、Fig. 8.3の結果から飼料中の線量減衰率、すなわち空間線量( $D_0$ )に対する飼料中の吸収線量(D)の比をパッケージ奥行方向の各点について求めた。Fig. 8.4に、線量率 $1 \times 10^5$ および $5 \times 10^4$  rad/hrの位置における粉末飼料およびペレット状飼料中の線量減衰率曲線を示した。線量率 $1 \times 10^5$ および $5 \times 10^4$  rad/hrの位置ではほぼ一致した線量減衰率曲線が得られた。しかし線量率 $5 \times 10^5$  rad/hrの位置では線源に近いため線源の上昇・下降時にパッケージ下方からの照射の寄与が大きく一致した結果が得られなかった。

### 8.3.3 コンベヤによる飼料の連続照射に関する検討

高さ 30 cm、長さ 250 cm の $^{60}\text{Co}$ 板状線源(25,000 Ci)を備えた照射装置を用いて、コンベヤによる大量処理法について検討した。本実験で用いたコンベヤによる連続照射処理装置

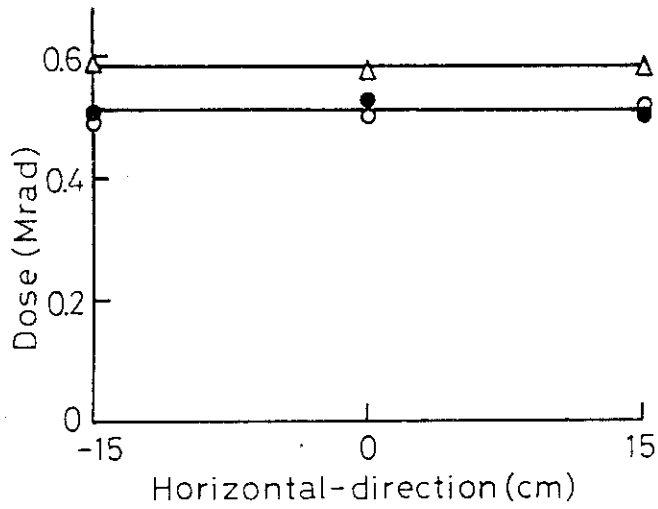


Fig.8.1 Dose Distribution in Horizontal-direction on the Surface of Package.

Distance of the package was 39 cm from the center of slab source (height: 30cm, length: 250cm).

Symbols: ○, height 0 cm; △, height 15 cm; ●, height 30 cm.

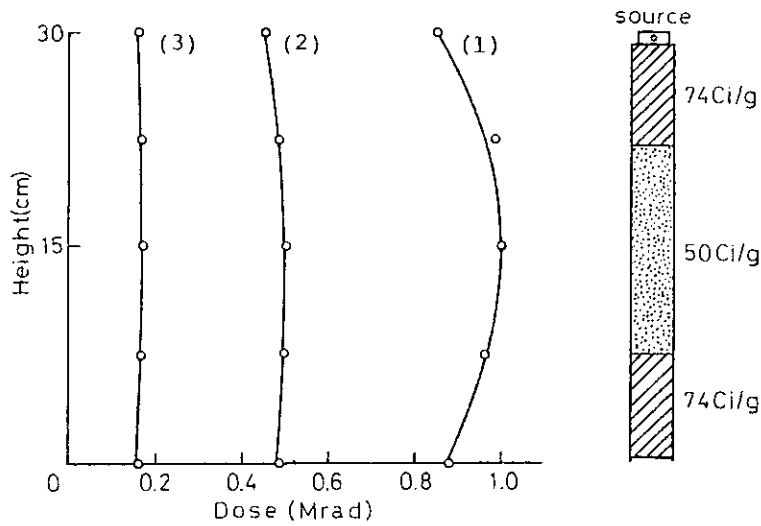


Fig.8.2 Dose Distribution in Vertical-direction of Irradiation Field and Distribution of Specific Activity of Source Rod.

Distance from source: (1) 19cm ( $1 \times 10^6$  rad/hr), (2) 39cm ( $5 \times 10^5$  rad/hr), (3) 85cm ( $1.7 \times 10^5$  rad/hr).

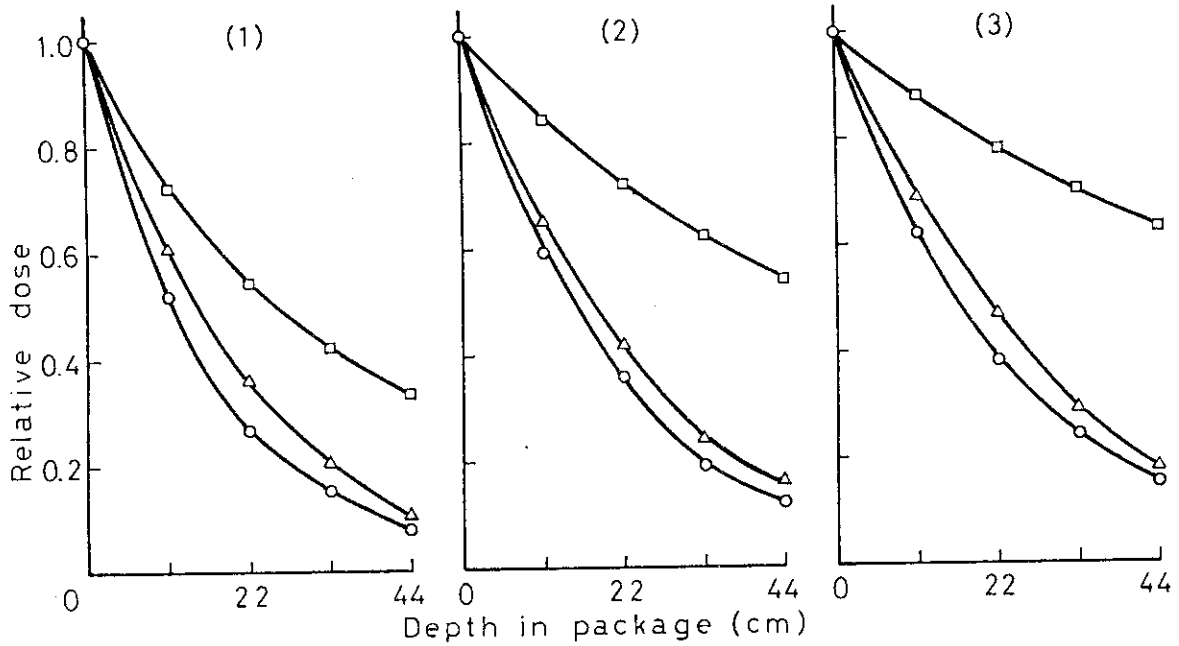


Fig.8.3 Dose Distribution in Depth-direction of Package Filled with Chick Feed.

Dose rate: (1)  $5 \times 10^5$ , (2)  $1 \times 10^5$ , (3)  $5 \times 10^4$  rad/hr.

Symbols:  $\square$ , dose in irradiation field;  $\Delta$ , dose in pellet type chick feed;  $\circ$ , dose in powder type chick feed.

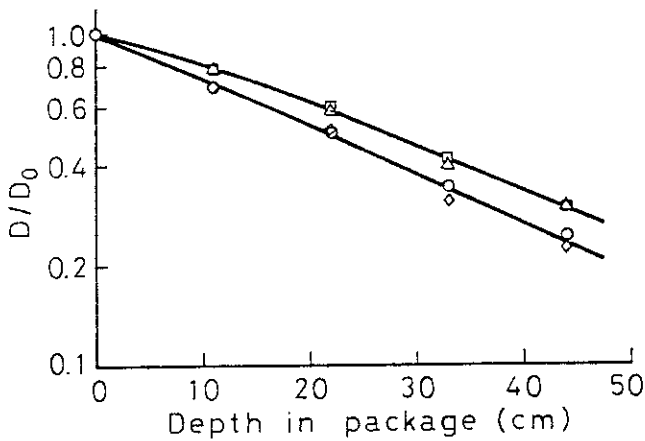


Fig.8.4  $D/D_0$  at Various Depth in Package Filled with Chick Feed.

Symbols:  $\Delta$ , pellet at  $5 \times 10^4$  rad/hr;  
 $\square$ , pellet at  $1 \times 10^5$  rad/hr;  
 $\diamond$ , powder at  $5 \times 10^4$  rad/hr;  
 $\circ$ , powder at  $1 \times 10^5$  rad/hr.

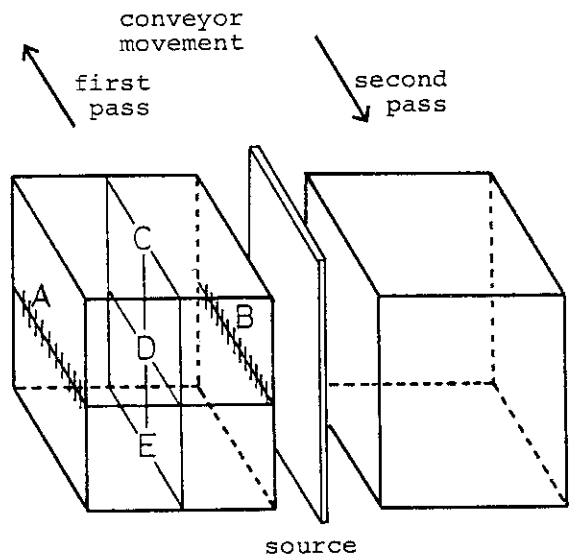


Fig.8.5 Scheme of Irradiation Package on Conveyor System.

では、Fig. 8.5 に示したようにまず片面からの照射を行った後反転してもう一方の面から照射し、両面照射が行えるようになっている。まずコンベヤによる処理条件を決定するため、Fig. 8.4 に示した線量減衰率 ( $D/D_0$ ) を用いて飼料パッケージ内の線量均一度を計算した。飼料パッケージの厚さを変えたときの線量均一度をTable 8.2 に示した。奥行方向の線量均一度 ( $U_D$ ) は次式(4)を用いて計算し、この値に高さ方向の空間線量均一度 1.22 を乗じて、パッケー

$$U_D = \frac{(\text{前面の線量} + \text{後面の線量})}{2 \times (\text{中心の線量})} \quad (4)$$

ジ全体の線量均一度 ( $U_0$ ) を求めた。この結果、線量均一度 2.5 以内で照射するためには、ペレット状飼料では 40 cm、粉末飼料では 35 cm までの厚さのパッケージを用いることが可能と考えられた。そこで高さ 30 cm、長さ 45 cm の飼料パッケージの厚さを 35 cm とし、コンベヤを用いて照射したときの吸収線量分布を実測した。Fig. 8.5 に示した各点における吸収線量の実測値および線量均一度をTable 8.3 に示した。また必要最小線量を 0.8 Mrad として求めた処理量を同時にTable 8.3 に示した。吸収線量は通常パッケージ表面の A または B で最大となり、中心線の C または E で最小となる。しかし実際にはコンベヤの振動等により飼料の充填密度が上面に比べ下面で高くなるため、E 点で最小線量を示したものと考えられる。以上の結果、25,000 Ci の線源を用いたコンベヤ照射において、ペレット状飼料では線量均一度 2.23 で 27.7 kg/hr の処理が可能であり、粉末飼料では線量均一度 2.42 で 31.1 kg/hr の処理が可能であった。ペレット状飼料では粉末飼料に比べて処理能力が小さかったが、これは充填密度が低い (ペレット:  $0.59 \text{ g/cm}^3$ , 粉末:  $0.71 \text{ g/cm}^3$ ) ためである。しかし同一の線量均一度で照射する場合、ペレット状飼料では粉末飼料より厚いパッケージの使用が可能であり、処理能力に差はないと考えられる。

本実験結果をもとに、実用規模の装置によるコストの試算を行った。照射施設としては本実験装置と類似のものを想定し、 $^{60}\text{Co}$  線源は 100 万 Ci とした。建築費、照射装置、線源購入費の合計 8 億 3400 万円を 18 年で償却するものとし、線源強度を維持するため毎年 12% の補充を行うものとして以下のように試算した。

年間償却費	4640 万円
維持費	5500 万円
線源補充費	3360 万円
人件費等必要経費	4700 万円
合計	1 億 8200 万円

通年照射 (年間 1 カ月はオーバーホールのため休止) とすると、処理時間は 8000 時間と見込まれる。25,000 Ci の施設での処理量は、ペレット状飼料で 222t/年、粉末飼料で 249t/年となる。したがって、100 万 Ci の施設での処理量はペレットおよび粉末飼料で各々 8880t/年 9960t/年 となり、処理コストは各々 20円/kg、18円/kg と求められた。なお、 $^{60}\text{Co}$  線源のかわりに電子線照射装置を用いて大量処理を行えば、処理コストを低減することが可能である。



Table 8.2 Dose Uniformity in Chick Feed Package Calculated from  $D/D_0$  Curve.

Type of feed	Depth of package(cm)	Distance from surface(cm)	$D_I^{1)}$	$D/D_0^{2)}$	$D_F^{3)}$	$U_D^{4)}$	$U_0^{5)}$	
Pellet	30	0	29.0	1.00	29.0			
		15	16.0	0.71	11.4	1.46	1.78	
		30	9.5	0.45	4.3			
	35	0	29.0	1.00	29.0			
		17.5	14.5	0.66	9.6	1.69	2.07	
		35	8.3	0.42	3.5			
	40	0	29.0	1.00	29.0			
		20	13.0	0.62	8.1	1.94	2.37	
		40	7.3	0.33	2.4			
	Powder	30	0	29.0	1.00	29.0		
			15	16.0	0.62	9.9	1.64	2.00
			30	9.5	0.37	3.5		
35		0	29.0	1.00	29.0			
		17.5	14.5	0.57	8.3	1.92	2.34	
		35	8.3	0.34	2.8			
40		0	29.0	1.00	29.0			
		20	13.0	0.53	6.9	2.25	2.75	
		40	7.3	0.27	2.0			

- 1) dose in irradiation field( $\times 10^4$  rad/hr).
- 2) obtained from Fig. 8-4.
- 3) calculated dose in chick feed package( $D_I \times D/D_0$ ).
- 4) dose uniformity in depth.
- 5) overall dose uniformity calculated by  $U_D \times 1.22$ (dose uniformity in vertical direction).

Table 8.3 Dose Uniformity and Throughput Capacity on Chick Feed by Continuous Package Irradiation with 25,000 Ci  $^{60}\text{Co}$  Source.

Type of feed	Dose ( $\times 10^5$ rad)					Dose uniformity ( $D_{\max}/D_{\min}$ )	Throughput capacity (kg/hr) **
	A*	B*	C*	D*	E*		
Pellet	1.96	1.96	0.88	1.02	0.88	2.23	27.7
Powder	1.96	1.93	0.84	0.97	0.81	2.42	31.1

\* see Fig. 8.5.

\*\* calculated as the minimum dose of 0.8 Mrad.

## 8.4 要 約

飼料を詰めたパッケージ内の吸収線量分布をFricke 線量計を用いて測定し、以下の結果を得た。

- (1) Milli-Q 水を用いて調製したFricke 線量計の測定誤差は、3回蒸留水を用いた場合と同様1.5%の範囲内であり、十分な測定精度が得られた。
- (2) このFricke 線量計を用いて飼料パッケージ内の吸収線量分布と空間線量分布を測定し、この結果から飼料による吸収線量減衰率を求めた。得られた線量減衰率曲線は $1 \times 10^5$ および $5 \times 10^4$  rad/hr の位置ではほぼ一致した。
- (3) この線量減衰率曲線を用いた吸収線量分布の計算結果から飼料パッケージ内の線量均一度を推測し、コンベアによる連続照射処理条件を決定した。
- (4) 最低必要線量を0.8Mradとした場合、25,000Ci の $^{60}\text{Co}$  板状線源を用いたコンベアによる連続照射により、ペレット状飼料では線量均一度2.23 で27.7kg/hr、粉末飼料では線量均一度2.42 で31.1kg/hr の処理が可能であった。
- (5) 以上の結果をもとに、100万Ci の $^{60}\text{Co}$  線源を用いた実用規模での照射処理量およびコストを試算した結果、ペレット状飼料では8880t/年、20円/kg、粉末飼料では9960t/年、18円/kg と求められた。

## 9. 廃液からの飼料用タンパク質の回収に対する放射線照射とキトサン添加の影響

### 9.1 緒言

飼料原料の大部分を海外に依存しているわが国にとって、未利用資源の有効利用などによる飼料用新資源の開発は重要な課題である。とくにタンパク質資源が不足しており、食品工業や畜産業で廃棄されるタンパク質を回収してそのまま飼料として用いることは有望であると考えられている。<sup>118)</sup>しかしこれら廃棄物は希薄な状態で廃液中に含まれているものが多く、有効な濃縮法あるいは回収法が必要である。沈澱剤を用いた方法は有効な手段の一つであるが、一般的に用いられている化学的沈澱助剤はその毒性の面から飼料用資源の回収には適さない。これに対してキトサンは、水産廃棄物であるキチンの脱アセチル化によって得られる天然高分子凝集剤であり、飼料用資源の有望な回収剤であると考えられる。<sup>119,120)</sup>これら廃水からの回収物は微生物により汚染されている可能性が高く、飼料原料として用いるためには殺菌する必要がある。放射線処理法は汚染微生物の殺菌に有効な方法であるが、キトサンと照射処理を併用したときの効果は不明であり検討が必要である。

そこで本章では、廃水からの飼料用タンパク質回収への放射線利用の可能性を明らかにすることを目的として、馬鈴薯澱粉廃液や血液廃液について照射による殺菌効果ならびにタンパク質回収に対する照射とキトサンの併用効果について検討し、さらに照射にともなうキトサンの物理化学的諸性質の変化について検討した。

### 9.2 実験方法

#### 9.2.1 供試試料

澱粉廃液および血液廃液を供試試料とした。澱粉廃液としては、馬鈴薯澱粉工場で採取した廃水を用いた。この澱粉廃液はデカンタ廃水の混合液であり、主として馬鈴薯の希釈汁液である。血液廃液としては、と殺場の血液処理場で採取した廃水を用いた。これは豚のと殺体からの血液をポンプで輸送後処理場で蒸煮（90～100℃、5分程度）し、生じた血粉を篩別した後の廃液である。また処理場で篩別された血粉は微生物検査用試料として用いた。

凝集剤用多糖類としては、市販のキトサン（共和油脂、フローナックN）を用いた。

タンパク質溶液は、第6章で用いたウシ血清アルブミンおよびオボアルブミンを0.01Mリン酸緩衝液（pH 6.0）に濃度0.2%となるよう溶解して調製した。

#### 9.2.2 照射条件

各供試試料の照射は、第2章に述べた方法と同様に室温、空気平衡下で行った。タンパク質溶液の場合には、N<sub>2</sub>置換あるいはO<sub>2</sub>を通気しながら水中で照射した。

### 9.2.3 キトサンによる凝集試験

キトサンを0.5%酢酸に溶解し、2N NaOHを用いてpH 6.0 に調整してキトサン溶液とした。各試験液の凝集試験は、10 ml 容の円錐形遠心沈澱管に試験液9 ml をとり、キトサン溶液1 ml を添加して混合後室温に放置し、凝集後の上澄液の濁度を測定した。

### 9.2.4 放射線殺菌試験

所定の線量照射した各試料中の総細菌数および大腸菌群について、第2章に述べた方法を用いて残存菌数を測定した。

### 9.2.5 タンパク質含量の測定

廃水中のタンパク質含量はCoomassie Brilliant Blue G-250 を用いて測定した。<sup>121)</sup> 標準タンパク質としてはウシ血清アルブミンを用い、595 nm における吸光度変化からタンパク質含量を求めた。

### 9.2.6 GPC分析

照射タンパク質溶液のGPC(ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー)分析は、島津LC-3A型HPLC分析装置を用いて行った。カラムとしては東洋曹達のTSK-G 4000SW およびG 3000SW(7.5φ×600mm)を連結して用い、0.2M リン酸緩衝液(pH 7.0)にて1.0 ml/min の流速で溶出した。タンパク質は280 nm の吸光度変化を測定することにより検出した。

### 9.2.7 キトサン溶液の粘度の測定

キトサンを2%酢酸溶液に溶解して濃度1%の溶液を調製し、室温に一晩放置後35℃で粘度(cP)を測定した。粘度の測定には、Brookfield 型粘度計(東京計器B 8 L-HM)を用いた。

### 9.2.8 キトサンの表面電荷の測定

表面電荷の測定はコロイド滴定法<sup>122)</sup>により行った。濃度0.1%のキトサン溶液5 ml をN/400 ポリビニル硫酸カリウム溶液で滴定し、指示薬としてはトルイジンブルー溶液を用いた。

### 9.2.9 キトサンの溶解度の測定

照射後のキトサンの溶解度は、1.0g のキトサンを40 ml の0.005%酢酸溶液に懸濁し室温に24時間放置後、東洋ろ紙Na 5c を用いてろ過したろ液20 mlを120℃、4時間減圧乾燥して求めた。

### 9.2.10 グルコサミンの定量

照射によりキトサンから遊離したグルコサミンは、0.1%キトサン溶液4 ml に1N NaOH

0.1mlを加え 3500rpm で 15 分間遠心分離した上澄液を用いて、Elson-Morgan 法<sup>123)</sup>により定量した。

### 9.3 実験結果および考察

#### 9.3.1 キトサンによる廃液タンパク質の凝集と放射線殺菌

##### (1) 澱粉廃液

種々の濃度のキトサン溶液を用いて、澱粉廃液に対する凝集試験を行った。試験液中のキトサン濃度を  $10^{-3}\%$  にまであげるとわずかなフロックの形成があり、 $10^{-2}\%$  では顕著なフロック形成および凝集物の沈降が肉眼的に観察された。これら試験液を室温に 30 分放置後、500rpm, 5 分間遠心分離して、上澄液の濁度を 660nm で測定した結果を Fig. 9.1 に示した。この結果、上澄液の濁度はキトサン濃度が  $10^{-3}\%$  から増大するにしたがって減少した。 $0.8\sim 1.0\times 10^{-2}\%$  の濃度で濁度は最小となり、澱粉廃液の凝集のためには  $0.8\sim 1.0\times 10^{-2}\%$  のキトサン濃度が必要であるという結果が得られた。

本実験で用いた澱粉廃液中には大腸菌群は検出されなかったが、総細菌数は 1ml 当り  $8\times 10^7$  個検出された。そこで、廃液およびキトサン凝集物中の汚染微生物に対する放射線殺菌効果を検討した。キトサン凝集物としては、上述の実験結果に基づき、 $10^{-2}\%$  のキトサンを添加して得られた凝集沈澱物の懸濁液（原液の約 8 倍に濃縮）を用いた。Fig. 9.2 に示したように、廃液、キトサン凝集物ともにほぼ同様の殺菌曲線が得られた。廃液中の総細菌数  $8\times 10^7$  個/ml は、1.0 Mrad の照射で 11 個/ml に減少した。キトサン凝集物では、照射前には  $3.5\times 10^8$  個/ml の菌数が検出されたが、1.0 Mrad の照射により 45 個/ml に減少した。このように照射による著しい殺菌効果が得られ、1.0 Mrad の照射で 6 桁程度菌数を減少させることが可能であった。またキトサン凝集物でも廃液の場合とほぼ同様の殺菌曲線が得られたことから、キトサンの有無は殺菌効果にはほとんど関与しないと考えられる。

##### (2) 血液廃液

キトサンによる血液廃液の凝集効果について、澱粉廃液と同様に検討した。用いた廃液の pH は約 7 であり、未回収の血粉がかなり含まれていた。Fig. 9.3 に種々の濃度のキトサンを添加後 7 時間放置した上澄液の 540nm における濁度変化を示した。キトサン濃度  $6\sim 8\times 10^{-3}\%$  で上澄液の濁度は最小となり、それ以上のキトサン濃度ではわずかではあるが、濁度はむしろ上昇する傾向を示した。この結果から、血液廃液の凝集に対するキトサンの最適濃度は  $6\sim 8\times 10^{-3}\%$  と求められた。しかし 1 時間放置後では上澄液の濁度減少はわずかであり、形成されたフロックの沈降にはかなりの時間を要した。

照射した血液廃液を用い、 $10^{-2}\%$  濃度のキトサンを添加して凝集 1 時間後の上澄液の濁度変化を Fig. 9.4 に示した。照射によるフロック形成促進、沈降時間短縮の効果が認められた。この効果は 3 Mrad で最大となり、それ以上の線量では濁度の減少が少なく凝集が悪くなることが認められた。したがって、血液廃液に 3 Mrad 程度の線量を照射することにより、キトサンによる凝集効果を促進させることが可能であった。

放射線による殺菌効果について、 $10^{-2}\%$  のキトサン添加により得られた血液廃液凝集物を

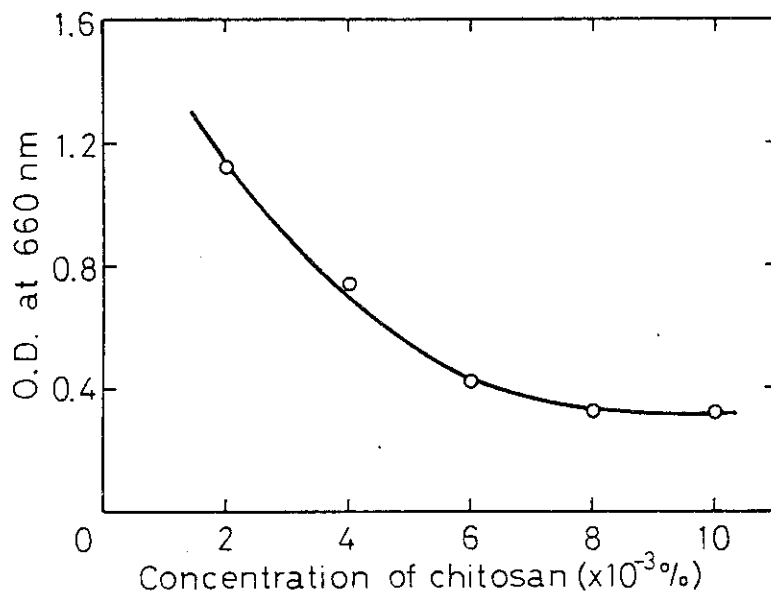


Fig.9.1 Effect of Chitosan Concentration on Coagulation of Suspended Solids in Potato Starch Wastewater. O.D. at 660 nm of the supernatant was measured after centrifugation at 500 rpm for 5 min.

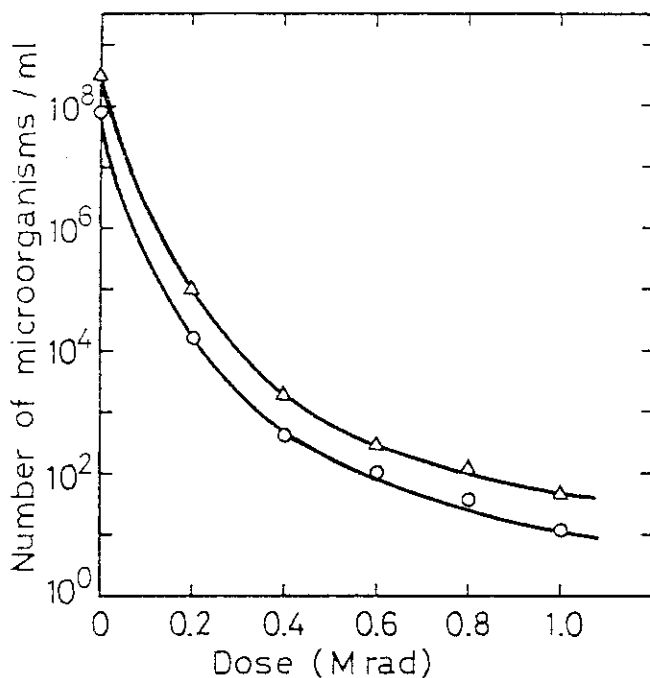


Fig.9.2 Decrease in Number of Total Aerobic Bacteria in Potato Starch Wastewater by Irradiation. Symbols: O, wastewater;  $\Delta$ , coagulum with chitosan.

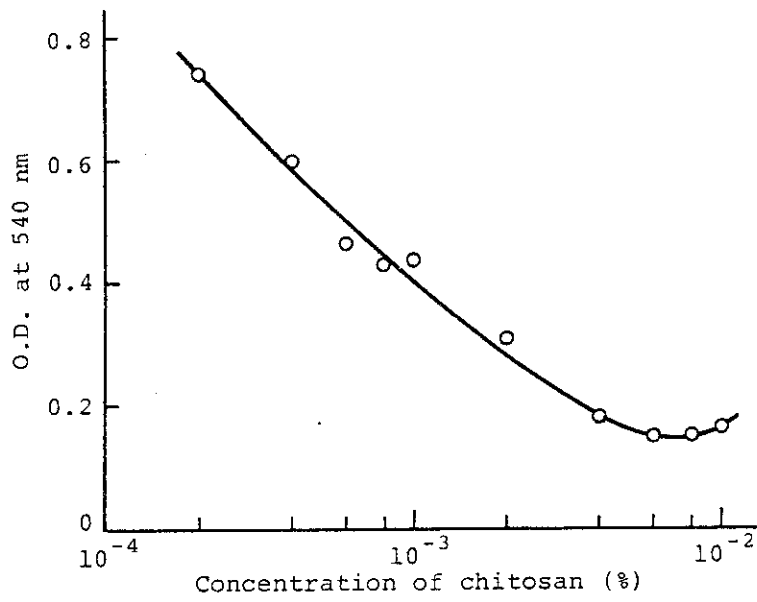


Fig.9.3 Effect of Chitosan Concentration on Turbidity of Blood Wastewater.

O.D. at 540 nm of supernatant was measured after standing for 7 hr.

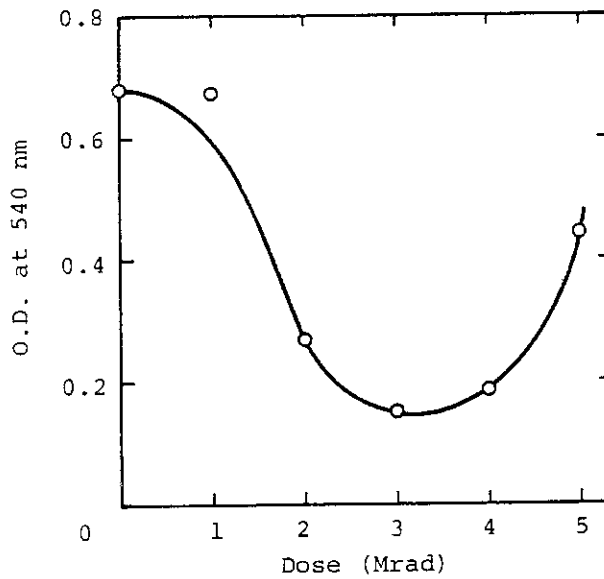


Fig.9.4 Change in Coagulation Property of Irradiated Blood Wastewater with Chitosan.

O.D. at 540 nm of supernatant treated with chitosan was measured after standing for 1 hr at room temperature.

用いて検討した。また処理場で節別された血粉についても殺菌効果の検討を行った。照射による総細菌数および大腸菌群数の変化をFig. 9.5に示した。廃液凝集物の水分含量は93%であり、血粉は70%であった。総細菌数に関しては、廃液凝集物、血粉ともにほぼ同様の殺菌曲線が得られた。1 Mradの照射で6~7桁程度の生菌数減少が認められたが、検出限界以下にするためには1.5~2 Mradの線量が必要であるという結果が得られた。一方、大腸菌群は放射線により殺菌され易く、廃液凝集物の場合0.2 Mradの照射で検出限界以下となった。血粉の場合には初期菌数が $3.3 \times 10^7$ 個/gと高かったため0.2 Mradの照射ではなおかなりの生存菌が検出されたが、0.5 Mradの照射で検出限界以下となった。このように、血液廃液のキトサン凝集物、血粉ともに顕著な放射線殺菌効果が得られ、澱粉廃液の場合と同様キトサンの存在が殺菌効果に影響を及ぼすことはないと考えられた。また1 Mradの照射を行っても総細菌数を検出限界以下にすることはできなかったが、SPF動物用飼料の目安とされている大腸菌数0、細菌数 $10^4$ 個/g<sup>11)</sup>を判断基準とすると、澱粉廃液回収物、血液廃液回収物ともに0.5 Mradの照射で十分目的を達することが可能であった。

なお、Boughらはすでにキトサンを用いて各種廃水から回収したタンパク質<sup>124~126)</sup>の動物に対する飼育効果を検討しており、回収物中のキトサン濃度が5%以下では飼育効果に何ら悪影響はないと報告している。<sup>120)</sup>

### 9.3.2 廃液中のタンパク質凝集に対する照射とキトサン添加の効果

照射した血液廃液でキトサンによる凝集効果が増大することが認められた(Fig. 9.4)。そこで、澱粉廃液を用いて、照射による凝集促進効果をさらに詳しく検討した。澱粉廃液を5 Mradまで照射すると、Fig. 9.6に示したように濁度が著しく減少し、高線量照射廃液ではキトサンを添加しなくても容易に沈降するようになった。またFig. 9.7に示したように、1.0 Mradの照射処理あるいはキトサン処理単独の場合に比べ、照射とキトサン処理を組み合わせると凝集効果がさらに促進された。廃水の放射線処理を行うと凝集効果が増大することはいくつかの廃水で知られており、<sup>127, 128)</sup>澱粉廃液の場合にも照射による凝集促進効果が認められた。その上、照射廃液をキトサン処理すると凝集効果がさらに促進され、廃液中の有機物を効果的に回収することが可能であった。

馬鈴薯汁液中には種々の可溶性のタンパク質やペプチドが含まれており、<sup>129)</sup>これらはそのまま澱粉廃液中に移行しているものと考えられる。しかしキトサンは懸濁物質の凝集には有効であるが溶解している物質の凝集には効果がなく、<sup>119)</sup>澱粉廃液中のタンパク質を凝集できなかった。そこで、照射した廃液中のタンパク質の凝集について検討した。澱粉廃液中の懸濁物質を12,000rpm、30分間の遠心分離により除いた廃液上澄液を照射すると、Fig. 9.8に示したように濁度が増加した。この白濁物質は $5 \times 10^{-3}$ %のキトサン添加で容易に凝集、沈降させることができ、上澄液中のタンパク質含量は減少した。この結果は、澱粉廃液中の可溶性タンパク質が照射により不溶化し、キトサン処理により凝集、沈降し易くなったことを示している。

以上のように、照射により廃液中のタンパク質の凝集を促進することが可能であり、飼料用



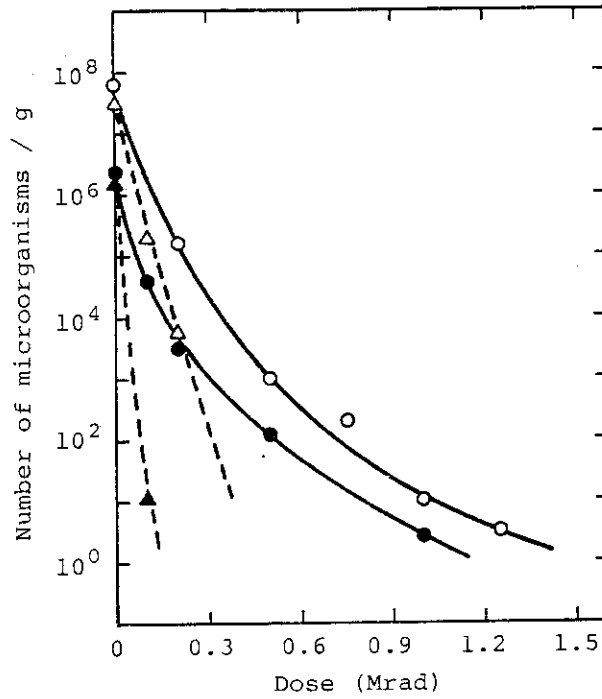


Fig.9.5 Decrease in Number of Microorganisms in Blood Wastewater Coagulum and Blood Powder by Irradiation.  
 Symbols: ○, total aerobic bacteria in blood powder;  
 ●, total aerobic bacteria in coagulum with chitosan from blood wastewater;  
 △, coliforms in blood powder;  
 ▲, coliforms in coagulum with chitosan from blood wastewater.

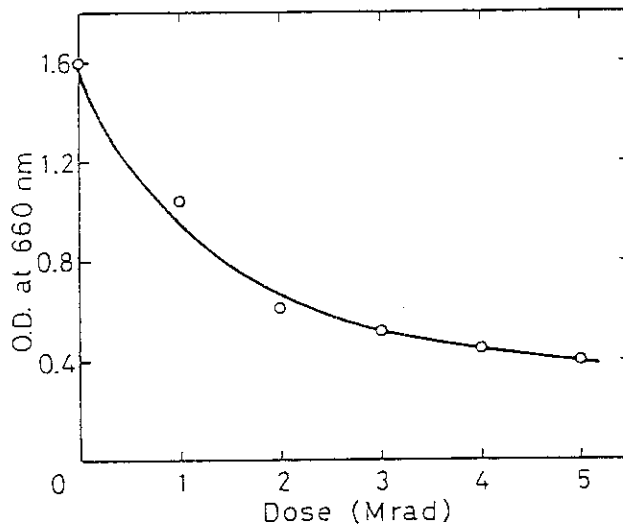


Fig.9.6 Effect of Irradiation on Turbidity of Potato Starch Wastewater.  
 O.D. at 660 nm of the supernatant was measured after standing for 2.5 hr at room temperature.

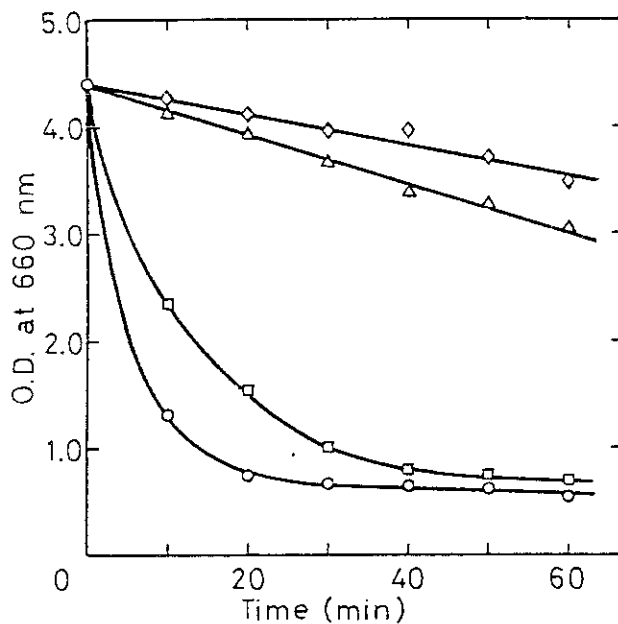


Fig.9.7 Decrease in Turbidity of Potato Starch Wastewater by Irradiation and Chitosan Treatment.  
 Symbols: ◇, control; △, irradiated with 1.0 Mrad;  
 □, 10<sup>-2</sup>% chitosan in unirradiated sample;  
 ○, 10<sup>-2</sup>% chitosan in 1.0 Mrad irradiated sample.

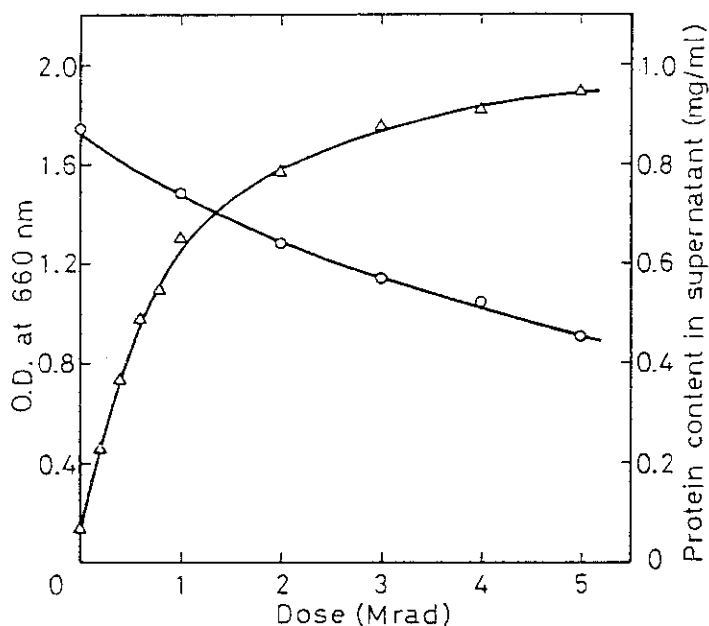


Fig.9.8 Change in Turbidity and Protein Content in Supernatant of Potato Starch Wastewater by Irradiation.  
 The supernatant was obtained by centrifugation at 12,000 rpm for 30 min. The protein content was measured after coagulation of turbid materials with 5 x 10<sup>-3</sup>% chitosan.  
 Symbols: △, O.D. at 660 nm; ○, protein content.

タンパク質回収への放射線処理の有効性が明らかとなった。また馬鈴薯澱粉廃液の場合 2～3 Mrad の照射で褐変防止効果も認められ、これら廃水への放射線処理の応用は資源の有効利用のみならず、環境汚染の防止にも寄与できるものと考えられる。

### 9.3.3 照射によるモデルタンパク質の凝集

放射線処理によるタンパク質の回収、飼料化を効果的に行うためには、照射によるタンパク質の変化を明らかにしておくことが必要である。タンパク質に対する照射効果に関する数多くの報告があるが、タンパク質を凝集させるといった観点から行われた研究は少ない。そこでタンパク質のモデル溶液として、ウシ血清アルブミンおよびオボアルブミンを用い、照射による凝集性の変化について検討した。Fig. 9.9 にウシ血清アルブミン溶液 (0.2% 濃度, 0.01 M リン酸緩衝液, pH 6.0) を  $N_2$  中,  $0^\circ C$  で照射したときの凝集性の変化を示した。540 nm における濁度は、0.2 Mrad 以下の線量ではわずかに増加するだけであったが、0.3 Mrad 以上では急激に増加した。 $O_2$  中で照射した場合には、濁度の上昇は認められなかった。これら照射試料液に  $5 \times 10^{-4}$  % のキトサンを添加したところ、0.3 Mrad 以上で著しい凝集、沈降効果が認められた。しかし非照射、0.1, 0.2 Mrad では濁度が増加しただけで、凝集、沈降効果はほとんど認められなかった。またキトサンによる凝集効果と平行して、上澄液中のタンパク質含量は減少し、0.4 Mrad 以上の照射により完全に凝集、沈降させることが可能であった。一方、オボアルブミン溶液を同じ条件下で 1.0 Mrad まで照射しても、 $N_2$  中、 $O_2$  中ともに濁度の上昇はほとんど認められず、またキトサンを添加しても凝集、沈降させることはできなかった。このようにウシ血清アルブミンはオボアルブミンよりはるかに凝集しやすいことが認められた。またこれら照射試料の GPC 分析の結果を Fig. 9.10 に示した。 $O_2$  中の照射では両者ともに分子量がわずかではあるが減少傾向を示したのに対し、 $N_2$  中では分子量が増大した。これらの結果は  $O_2$  が照射によるタンパク質の架橋を阻害していることを示しており、タンパク質を凝集させるためには  $O_2$  を除いた状態で照射することが必要である。しかし一般の空気平衡下での照射では、溶液中の  $O_2$  は低線量の照射で消費されてしまうため実用上は問題とならない。一方、 $N_2$  中での照射による分子量の増大は、オボアルブミンに比べてウシ血清アルブミンの方が著しく、タンパク質の種類により、凝集性が異なるという結果が得られた。

タンパク質の照射による凝集には、S-S 結合などの共有結合によるものと疎水結合や静電的な結合などの非共有結合によるものがある。<sup>130,131)</sup> S-S 結合による架橋はリゾチームの場合 10～20%、<sup>132)</sup> リボヌクレアーゼの場合 10～60%<sup>69)</sup> と報告されており、照射による新たな S-S 結合の形成はタンパク質の凝集に重要な役割を果しているが、S-S 結合以外の要因の寄与も大きいものと考えられる。ウシ血清アルブミンは 17 個の S-S 結合と 1 個の SH 基を有する<sup>133)</sup> のに対し、オボアルブミンは 1 個の S-S 結合と 4 個の SH 基を有する。<sup>134)</sup> これらシステイン、システイン残基をはじめとするアミノ酸組成や構造の違いにより、照射による凝集性に相違が生じたものと考えられる。照射によるタンパク質の凝集には、タンパク質の種類、濃度、pH、温度、酸素の有無、共存物質など種々の要因が関与すると考えられ、実際にタンパク質を効率良く回収するためには、最適の照射条件を選ぶことが必要である。

なお、照射により凝集、回収したタンパク質を飼料原料として用いる場合にはその消化性が

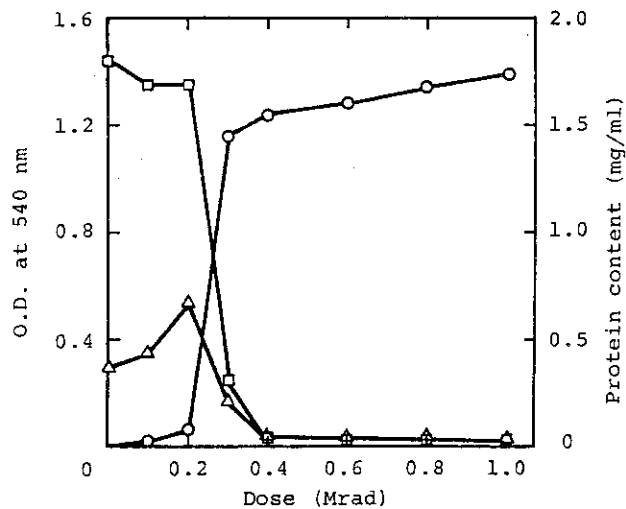


Fig.9.9 Aggregation of Bovine Serum Albumin in 0.2% Solution (pH 6.0) Irradiated in  $N_2$ .  
 Symbols: ○, O.D. at 540 nm; △, O.D. at 540 nm after chitosan treatment; □, protein content in the supernatant after chitosan treatment.

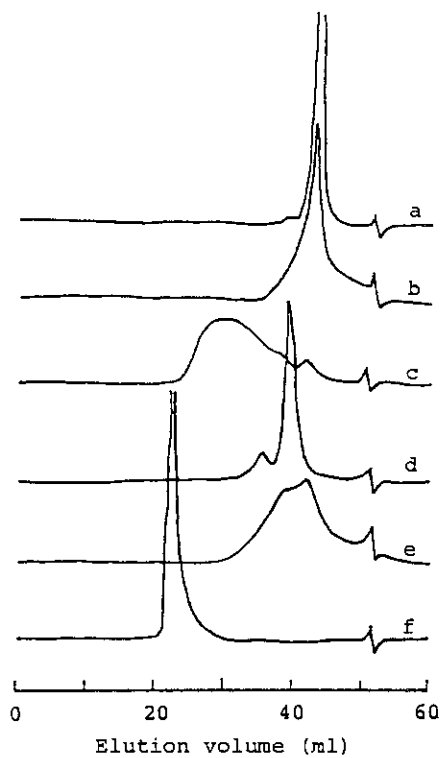


Fig.9.10 Change in GPC Elution Curves of Ovalbumin (OVA) and Bovine Serum albumin(BSA) by Irradiation.  
 a) OVA, unirradiated; b) OVA, 0.5 Mrad in  $O_2$ ;  
 c) OVA, 0.5 Mrad in  $N_2$ ; d) BSA, unirradiated;  
 e) BSA, 0.5 Mrad in  $O_2$ ; f) BSA, 0.1 Mrad in  $N_2$ .

問題となるが、オボアルブミン、<sup>135</sup>ウシ血清アルブミン<sup>136</sup>ともに照射により消化性は向上すると報告されており、消化性が悪くなることはないと考えられる。

### 9.3.4 照射によるキトサンの物理化学的諸性質の変化

キトサンを用いて廃液から回収した飼料用タンパク質を放射線殺菌する場合、凝集剤であるキトサンも同時に照射されることから、キトサンの照射による変化を明らかにしておくことが必要である。そこで、キトサンの照射による変化について検討した。Table 9.1 にキトサン粉末（水分含量 14.1%）を照射したときの物理化学的諸性質の変化を示した。0.005%酢酸に対するキトサンの溶解度およびグルコサミンの遊離量は照射線量が高くなるとともに増大したが、10 Mrad でもわずかな上昇であった。コロイド滴定によって求めた相対的表面電荷は照射に対して非常に安定で、100 Mrad という大過剰の線量を照射してもわずか13%減少しただけであった。タンパク質懸濁液に対する凝集能は線量の増大とともに減少したが、100 Mrad 照射しても60%の凝集能が残っていた。一方、水溶液中（濃度 0.1%, pH 6.0）では1.0 Mrad 以下の照射で表面電荷、粘度とも著しく減少し、凝集能も著しく低下する。これらの結果は、固体状態のキトサンは溶液状態に比べて極めて安定であることを示している。キトサンの金属イオンに対する吸着能は50 Mrad まで照射しても変化しないという同様の結果が Muzzarelli ら<sup>137</sup>によって報告されている。一方、キトサンの粘度はFig. 9.11に示したように著しく低下した。したがって、キトサンの粘度は他の諸性質と異なり固体状態の照射でも容易に低下することが明らかとなった。

多糖類の放射線照射による変化に関しては、これまでに数多くの研究が行われている。<sup>54,138-140</sup>とくに澱粉の変化については詳細に調べられており、本実験結果で得られたキトサンの場合と同様著しい粘度の低下がおこり、<sup>138,141</sup>酵素による消化率<sup>142</sup>やラットに対する飼料効率<sup>143</sup>が向上すると報告されている。このように照射による多糖類の分解は飼料効率の改善に役立つものと考えられる。一方、海藻類から得られるアルギン酸ソーダやカラギーナンに高線量の照射を行うと、タンパク質に対する凝集効果が増大するという結果も得られている。<sup>144</sup> これら多糖類の照射による変化は類似しており、分解性の向上や凝集剤としての改質などを利用した未利用資源飼料化への放射線処理の応用が期待できるものと考えられる。

## 9.4 要約

血液廃液および馬鈴薯澱粉廃液を用いて、飼料用タンパク質回収に対する照射とキトサン添加の効果を検討するとともに、凝集剤として用いたキトサンの照射による変化について検討し、以下の結果を得た。

- (1) 澱粉廃液および血液廃液中の懸濁物質はキトサンを添加することにより効果的に凝集でき、最適キトサン濃度はそれぞれ  $8 \sim 10 \times 10^{-3}\%$ 、 $6 \sim 8 \times 10^{-3}\%$  であった。
- (2) 澱粉廃液および血液廃液からのキトサン凝集物、澱粉廃液、血粉のいずれの場合にも、0.5 Mrad の照射で総細菌数  $10^4$  個/g 以下、大腸菌群を検出限界以下に殺菌することが可能であった。またキトサンの存在が殺菌効果に影響を及ぼすことはなかった。

Table 9.1 Change in Some Physicochemical Properties of Chitosan Irradiated in Dry State.

Dose (Mrad)	Solubility (%)	Relative charge (%)	Coagulation property (%)	Released glucosamine (mg/g chitosan)
Unirradiated	2.3	100	100	0
0.1	2.3	100	97	0
1.0	2.4	101	97	0
5.0	3.7	99	-	-
10.0	4.0	97	87	2.0
50.0	16.5	92	78	11.7
100.0	27.6	87	60	13.3

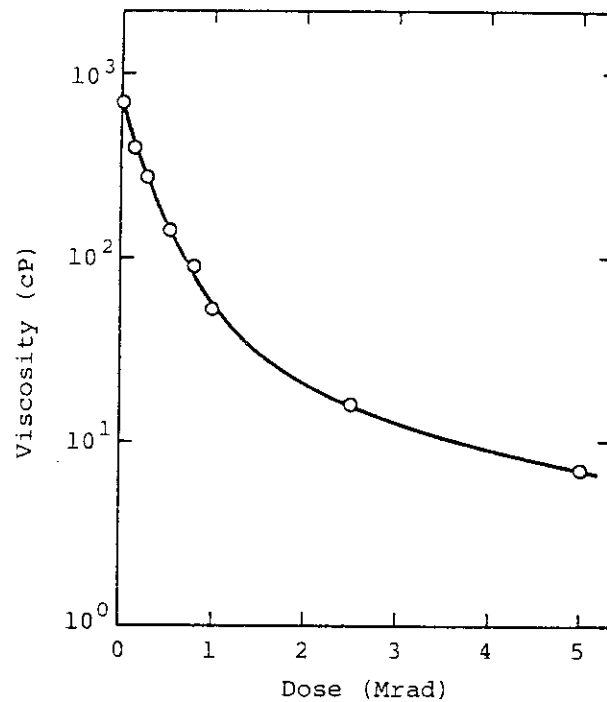


Fig.9.11 Change in Viscosity of Chitosan Irradiated in Dry State.

Viscosity of 1% solution in 2% acetic acid was measured at 35°C.

- (3) 照射した澱粉廃液、血液廃液はいずれもキトサンによる凝集効果が増大した。とくに澱粉廃液中の可溶性タンパク質はキトサンを添加しても凝集しないが、照射すると容易に凝集、沈降するようになった。また照射とキトサン添加の併用により、凝集効果をさらに促進することが可能であった。
- (4) 0.2% ウシ血清アルブミン溶液を $N_2$  中、 $0^\circ C$ で照射すると、0.3 Mrad 以上で著しい凝集効果が認められた。しかし $O_2$  中では1 Mrad 照射しても凝集効果は認められず、またオボアルブミンの場合は $N_2$ 、 $O_2$  中ともに凝集効果は認められなかった。
- (5) GPC 分析の結果、オボアルブミン、ウシ血清アルブミンはともに $N_2$  中での照射で早く溶出する成分が増大し、とくにウシ血清アルブミンの変化が著しかった。一方、 $O_2$  中での照射ではこれらの変化は小さく、タンパク質の凝集が阻害されていた。
- (6) キトサンを乾燥状態で照射した場合には、溶解度、表面電荷、グルコサミンの遊離、タンパク質に対する凝集能にはわずかな変化しか認められないが、粘度は著しく低下した。

## 10. 総 括

一般動物用飼料の安全性の確保ならびに貯蔵性の向上に放射線処理法を応用するための基礎として、飼料や飼料原料の汚染微生物に対する放射線殺菌効果と貯蔵中の菌数変化、照射にともなう各種主要成分や栄養価の変化、実用規模での照射処理技術、ならびに未利用資源の飼料化への応用について検討し、以下の結果を得た。

### 10.1 飼料および飼料原料の微生物分布と放射線殺菌効果

飼料および飼料原料の放射線処理を行う上で必要な殺菌線量を確立するために、まず飼料原料および飼料の微生物汚染の状況と放射線照射の殺菌効果について検討した。各種動物性飼料原料のうちとくに近海産の魚粉や調整魚粉の微生物汚染が著しく、総細菌数は1g 当り  $2.4 \times 10^4 \sim 8.0 \times 10^6$  個、大腸菌群は  $8 \sim 1.0 \times 10^5$  個、好浸透圧性糸状菌は  $7.5 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^5$  個、一般糸状菌は  $8.8 \times 10^1 \sim 7.0 \times 10^5$  個検出された。近海産魚粉や調整魚粉の大腸菌群は糞便由来の大腸菌の占める割合が高く、またサルモネラ菌などの病原性細菌により汚染されているものも認められた(第2章)。

市販の各種粉末配合飼料1g 当りの汚染微生物数は、総細菌数  $5.3 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^6$  個、大腸菌群  $5.1 \times 10^3 \sim 6.8 \times 10^5$  個、好浸透圧性糸状菌  $9.6 \times 10^2 \sim 3.5 \times 10^5$  個、一般糸状菌  $2.1 \times 10^3 \sim 4.5 \times 10^5$  個であり、汚染の実態を明らかにした。総細菌数は1.0 Mrad 照射しても検出限界以下にできなかったが、大腸菌群、一般糸状菌および好浸透圧性糸状菌は比較的放射線抵抗性が弱く、各々0.5~0.8, 0.7 および0.2 Mrad で検出限界以下にまで殺菌できた。高湿度条件下で貯蔵した配合飼料では、総細菌数、大腸菌群、一般糸状菌は減少傾向を示すのに対し、好浸透圧性糸状菌数は著しく増大した。0.2 Mrad 照射飼料中の好浸透圧性糸状菌は、照射直後では検出限界以下になっているにもかかわらず、貯蔵中に著しく増殖した。0.5 Mrad 照射飼料では、好浸透圧性糸状菌は長期間発生を抑制され、0.75 Mrad ではほぼ完全に殺菌されていることが明らかとなった。このように大腸菌などの細菌類は飼料の貯蔵中に増殖することはないので検出限界以下にまで殺菌しておけば十分であるが、好浸透圧性糸状菌は高湿度下の貯蔵で著しく増殖するので完全殺菌しておくことが必要と考えられた(第3章)。

これら飼料から分離された代表的な好浸透圧性糸状菌について、Aspergillus versicolor を中心にマイコトキシン産生能ならびに放射線感受性について検討した。分離された A. versicolor 3株のうち2株がステリグマトシスチン産生能を有していた。この発がん性を有するステリグマトシスチンは乾燥状態では放射線に対して安定であり、分解のためには52 Mrad の高線量が必要であった。一方、A. versicolor の分生子の  $D_{10}$  値は緩衝液中で32~37 krad、乾燥状態で50~54 krad であり、他の代表的な汚染糸状菌である A. gracilis や A. candidus とほぼ同様の値が得られた。これら分離糸状菌の  $D_{10}$  値から殺菌線量を求めた結果、0.7 Mrad 以下の線量で完全殺菌できることが明らかとなった(第4章)。



以上の結果を総合して、飼料の安全性を確保し貯蔵性を向上させる上で問題となる病原性細菌および好浸透圧性糸状菌は通常 0.7 Mrad 以下の線量で殺菌できるが、飼料によっては大腸菌群を検出限界以下にするのに 0.8 Mrad 必要なものもあり、安全性を見込んで必要線量は 0.8 Mrad と結論した。この線量は現在実用化されている実験動物用飼料の完全殺菌線量 2.5 Mrad の 1/3 以下であり、大巾な照射コストの低減ならびに照射にともなう成分変化の抑制に役立つものと考えられる。

## 10.2 放射線照射による飼料の主要成分ならびに栄養価の変化

照射した飼料の健全性確認の基礎として、照射にともなう成分の変化や毒性物質の生成の有無についての放射線化学的研究と、育雛試験による照射飼料の栄養価の変化について検討した。

主要な動物性飼料原料である魚粉に 5 Mrad までの大線量を照射しても、脂肪のわずかな酸化を除いて主成分にはほとんど変化は生じないことが明らかとなった。魚粉を高水分下 (15.5%) で貯蔵すると、配合飼料の場合と同様好浸透圧性糸状菌が著しく増殖し、過酸化物質の増大や粗脂肪含量の急激な減少などの成分変化が生じたが、貯蔵前に殺菌線量の照射を行うことによりこれら糸状菌の増殖を抑え、貯蔵中の成分変化や養分損失を抑制できることを明らかにした (第 5 章)。

また飼料中の有効性リジンの損失を招き、毒性も示す可能性のあるリジノアラニンおよび飼料による中毒の原因物質の一つとして考えられているヒスタミンについて照射による変化を検討した。リジノアラニンおよびヒスタミンは魚粉などの動物性飼料原料から検出されたが、これら飼料原料を 5 Mrad まで照射しても含量はほとんど変化しなかった。一方、アミノ酸のモデル水溶液系では照射によりリジノアラニンやヒスタミンが生成する可能性が認められたが、タンパク質溶液や複合系である飼料原料中では蓄積しないことを明らかにした (第 6 章)。

次に、照射した飼料の栄養価を総合的に評価するために、雛の飼育試験を行った。各種配合飼料に 1 Mrad 照射しても、雛の成長および飼料効率にほとんど変化は認められなかった。また貯蔵中に好浸透圧性糸状菌が増殖した飼料では雛に対する栄養価が低下したが、貯蔵前に照射しておくことによりこの栄養価の低下は防止できることが明らかとなった (第 7 章)。

以上のように、飼料および飼料原料の成分の化学分析および雛の飼育試験の結果、殺菌線量の照射を行っても飼料の健全性上何ら問題となる点は見出されず、また貯蔵中の品質劣化、養分損失を効果的に防止できることを明らかにした。1980 年に出された「1.0 Mrad 以下の照射では毒性試験を行う必要はない」との FAO/IAEA/WHO 合同専門家委員会の勧告がわが国でも受け入れられるならば、本研究で求められた必要線量 0.8 Mrad という結論は動物試験に必要な莫大な労力と費用を省くことを可能にし、飼料の放射線処理実用化の上で重要な意味をもつことになると考えられる。

## 10.3 飼料の実用規模における照射処理技術の検討

パッケージを用いた飼料の連続大量処理技術について検討した。まず飼料を詰めたパッケー

ジ内の吸収線量および空間線量分布をFricke 線量計を用いて実測し、飼料による吸収線量減衰率曲線を求めた。次に、この線量減衰率曲線をもとにコンベヤ装置を用いた処理条件を決定し、パッケージに詰めた飼料の連続照射を行った。この結果、 $^{60}\text{Co}$  線源 25,000Ci、必要最低線量 0.8 Mrad として、ペレット状飼料では線量均一度 2.23 で 27.7kg/hr の処理が可能であり、粉末飼料では線量均一度 2.42 で 31.1kg/hr の処理が可能であった。本実験結果に基づき 100 万Ci の  $^{60}\text{Co}$  線源を用いた実用規模における処理量および処理コストを試算したところ、ペレット状飼料では 8880t/年、20 円/kg、粉末飼料では 9960 t/年、18 円/kg と求められた。以上のように飼料 1 kg 当たり 18~20 円で、実用規模での放射線殺菌処理を行うことが可能であることが明らかとなった(第 8 章)。

#### 10.4 未利用資源飼料化への放射線処理の応用

飼料用新資源の開発に放射線処理を応用することを目的として、廃液からの飼料用タンパク質回収に対する照射とキトサン添加の併用効果について検討した。天然高分子凝集剤であるキトサンを、馬鈴薯澱粉工場廃液やと殺場で得られる血液廃液に添加すると、廃液中の懸濁物質を効果的に凝集できた。得られた凝集物中の汚染微生物は、0.5 Mrad の照射で SPF 動物用飼料の目安とされている。大腸菌群 0、総細菌数  $10^4$  個/g 以下に殺菌することが可能であった。照射した澱粉廃液および血液廃液はいずれもキトサンの添加による凝集効果が増大し、殺菌と同時にタンパク質の凝集が促進されることを明らかにした。また、凝集剤用多糖類であるキトサンを粉末状態で照射すると表面電荷はほとんど変化しないが粘度は著しく低下するという結果が得られ、照射による分解性の向上や凝集剤としての改質が可能であると考えられた。この多糖類凝集剤は化学凝集剤とは異なり天然物であるので、凝集回収物の飼料化に適していると考えられる。以上のように廃液の放射線処理は、殺菌効果と同時におこるタンパク質や多糖類の変化を利用して、未利用資源の飼料化に有効に応用できることを明らかにした(第 9 章)。

以上の研究成果により、飼料および飼料原料の安全性、貯蔵性の上から問題となる汚染病原性細菌や好浸透圧性糸状菌などは 0.8 Mrad の照射で有効に殺菌できること、この照射にともなう飼料の主要成分や栄養価などの劣化はほとんどなく、また貯蔵前に殺菌線量の照射を行うことにより貯蔵中の成分劣化や養分損失を抑制できることが明らかとなった。またコンベヤを用いた照射装置でパッケージに詰めた飼料の照射を行い、線量均一度、処理コストなど実用規模での照射技術に関する資料を得ることができた。さらに、照射による廃液中のタンパク質の凝集や、凝集剤用多糖類の分解などを利用した未利用資源飼料化への応用の可能性が明らかとなった。これらの結果から、放射線処理法は、飼料の安全性の確保ならびに長期の貯蔵を行う上で有効な手段であることを明らかにした。本研究成果が飼料および飼料原料の有効利用、ひいては食糧問題解決に寄与し得ることを期待するものである。

## 謝 辞

本報告は高崎研究所食品照射開発試験室において実施された研究をまとめたものである。本研究を遂行するに当たり、御指導、御鞭撻をいただいた武久正昭研究部長兼食品照射開発試験室長（現研究部長）、客員研究員飯塚 廣東京理科大学教授（現研究嘱託）ならびに食品照射開発試験室の伊藤 均副主任研究員（現照射利用開発室）に深甚なる謝意を表します。また種々の御助言、御協力をいただいた農林水産省畜産試験場の亀岡暄一場長、土黒定信飼料加工研究室長、武政正明氏ならびに食品照射開発試験室の渡辺 宏副主任研究員（現照射利用開発室）、橋 宏行氏（現照射施設課）に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) 岡 充：衛生化学，17，47(1971)。
- 2) 佐藤健二：医療器具の放射線殺菌法の実際，放射線照射振興協会，p. 7(1981)。
- 3) 松原尚生：放射線と産業，2，4(1976)。
- 4) 小林昌敏編：放射線利用に関する最新研究資料，第2巻，フジ・インターナショナル，p. 223(1974)。
- 5) 伊藤嘉昭，岩橋 統，垣花廣幸，杉本 渥：科学，46，348(1976)。
- 6) T. Teruya and H. Zukeyama, Appl. Ent. Zool., 14，241(1979)。
- 7) 伊藤 均，武久正昭：ファインケミカル，11(9)，18(1982)。
- 8) 佐藤友太郎，田村直幸，青木章平，二階堂昭二，橘 宏行，久米民和，田中隆一，田島 訓，菊地孝行，河合視己人，景山英一：JAERI-M 6000(1975)。
- 9) 梅田圭司：化学と生物，12，532(1974)。
- 10) 農林省畜産局流通飼料課法制技術研究会編：飼料安全法の解説，大成出版社，1977。
- 11) 梅田圭司：原子力工業，23(5)，17(1977)。
- 12) 川嶋浩二，佐藤友太郎：食品工誌，18，441(1971)。
- 13) 伊藤 均：食品照射，13，47(1978)。
- 14) 梅田圭司：食品照射，15，38(1980)。
- 15) M. Lapidot, "Decontamination of Animal Feeds by Irradiation", IAEA, Vienna, p.43(1979)。
- 16) E. Sickel, "Decontamination of Animal Feeds by Irradiation", IAEA, Vienna, p.133(1979)。
- 17) 戸部満寿夫，小林和雄：原子力工業，23(5)，13(1977)。
- 18) 科学技術庁編：わが国における食品照射の現状と問題点，p. 34(1966)。
- 19) 川嶋浩二，林 徹，河端俊治(訳)：食品照射，16，92(1981)。
- 20) 養田泰治：化学と生物，19，530(1981)。
- 21) 後藤昭二：食品工業，23(9)，57(1980)。
- 22) 佐藤静夫：畜産の研究，33，303，408(1979)。
- 23) 渡辺 宏，伊藤 均，柴部禎己，飯塚 廣：農化，45，55，500(1971)。
- 24) 三井英三，宮川規矩子，川嶋浩二，梅田圭司，佐藤友太郎：食品工誌，17，379(1970)。
- 25) 高野博幸，梅田圭司：食品工誌，21，267(1974)。
- 26) 梅田圭司，高野博幸，佐藤友太郎，戸塚耕二，高橋芳雄，麻生和衛：日畜会報，42，617(1971)。
- 27) 武久正昭，伊藤 均：原子力工業，25(4)，74(1979)。
- 28) 伊藤 均：化学工業，32，473(1981)。
- 29) 藤田 雅，橋本和典，須田光雄，海老洋一：家衛試報，No 75，9(1977)。
- 30) D. A. A. Mossel, "Decontamination of Animal Feeds by Irradiation",

- IAEA, Vienna, p. 3 (1979).
- 31) 田辺 俊, 小島満子: *Minophagen Medical Review*, 15, 241 (1970).
  - 32) H. Ito and H. Iizuka, "Decontamination of Animal Feeds by Irradiation", IAEA, Vienna, p. 15 (1979).
  - 33) 飼料品質改善中部協議会編: 実用飼料検査法, p. 44 (1978).
  - 34) 朝井勇宣, 飯塚 廣: 「飼料の微生物学的障害およびその鑑定方法に関する研究」, 農林省農林漁業試験研究報告書, 昭和34~36年度 (1959~1961).
  - 35) 朝井勇宣, 飯塚 廣: 「薬剤等による濃厚飼料の品質保全に関する研究」, 農林省農林漁業試験研究報告書, 昭和29~33年度 (1954~1958).
  - 36) 赤池洋二, 中島隆夫, 中山 昇, 長田 久, 柏崎 守: *SPF<sub>SWINE</sub>*, *SPF 豚協会編*, 1, 21 (1970).
  - 37) 柏崎 守, 波岡茂郎, 渡辺英之: *SPF<sub>SWINE</sub>*, *SPF 豚協会編*, 1, 31 (1970).
  - 38) 高鳥浩介, 近藤末男: *日畜会報*, 49, 578 (1978).
  - 39) 伊藤 均, 柴部禎己, 飯塚 廣: *農化*, 43, 773 (1969).
  - 40) H. Ito, H. Iizuka and T. Sato, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 789 (1973).
  - 41) 滝川明宏: *畜産の研究*, 34, 400, 525 (1980).
  - 42) 佐々木酉二, 佐々木 博: *日畜会報*, 42, 87 (1971).
  - 43) 佐々木酉二, 佐々木 博: *日畜会報*, 42, 210 (1971).
  - 44) 角田 広, 岸 菊子, 上野芳夫, 大久保 薫, 齊藤 守: *マイコトキシン*, 1, 16 (1975).
  - 45) 角田 広, 伊藤澄磨: *食研報告*, 19, 15 (1965).
  - 46) 岩田和夫: *細菌毒素研究*, 別冊蛋白質核酸酵素, 加藤 巖編, 共立出版, p. 297 (1976).
  - 47) 宇田川俊一, 鶴田 理: *かびと食物*, 医歯薬出版, p. 174, p. 263 (1975).
  - 48) 真鍋 勝, 南沢正敏, 松浦慎治: *農化*, 47, 209 (1973).
  - 49) 武田由比子, 五十畑悦子, 天野立爾, 田辺弘也, 倉田 浩: *食衛誌*, 15, 363 (1974).
  - 50) P. B. Mislivec, C. T. Dieter and V. R. Bruce, *Appl. Microbiol.*, 29, 522 (1975).
  - 51) 五十畑悦子, 武田由比子, 内山 充: *食衛誌*, 17, 392 (1976).
  - 52) K. Aibara and K. Miyaki, IAEA-PL-334/7, p. 41 (1970).
  - 53) H. K. Frank and Th. Grunewald, *Food Irradiation*, 11, 15 (1971).
  - 54) 林 力丸, 齊藤和実訳: *食品照射の化学*, P. S. Elias, A. J. Cohen 編著, 学会出版センター (1981).
  - 55) 川岸舜朗, 並木満夫: *食品成分の相互作用*, 並木満夫, 松下雪郎編, 講談社, p. 16 (1980).
  - 56) A. Takigawa, H. Danbara and Y. Ohyama, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 48, 27 (1977).

- 57) 滝川明宏, 檀原 宏, 大山嘉信: 畜試研報, 30, 15(1976).
- 58) B. O. Eggum, "Decontamination of Animal Feeds by Irradiation", IAEA, Vienna, p. 55(1979).
- 59) D. A. A. Mossel and A. P. de Groot, "Radiation Preservation of Foods", Publ. 1273, Nat. Acad. Sci., NRC, Washington, D. C., p. 233(1965).
- 60) Association of Official Agricultural Chemists, "Official Methods of Analysis", 13th Ed., AOAC, Washington, D.C., p. 125, p. 285, p. 437(1980).
- 61) A. Takigawa, H. Danbara and Y. Ohyama, Jpn., J. Zootech. Sci., 47, 292(1976).
- 62) "Decontamination of Animal Feeds by Irradiation", IAEA, Vienna, p. 145(1976).
- 63) E. D. Wills, Int. J. Radiat. Biol., 37, 403(1980).
- 64) 山本 修: 化学と生物, 15, 159(1977).
- 65) 荒井綜一, 藤巻正男, 加藤博通: 食品成分の相互作用, 並木満夫, 松下雪郎編, 講談社, p. 150(1980).
- 66) A. P. de Groot and P. Slump, J. Nutr., 98, 45(1969).
- 67) J. C. Woodard and D. D. Short, J. Nutr., 103, 569(1973).
- 68) O. Yamamoto, "Protein Crosslinking", A, ed. by M. Friedman, Plenum Press, New York, p. 509(1977).
- 69) ディルティンガー, ユンク(代谷, 天笠 共訳): 放射線生物学, 東京大学出版会, p. 120(1974).
- 70) W. M. Garrison, LBL-8928(1981).
- 71) E. G. Harry, J. F. Tucker and A. P. Laursen-Jones, Br. Poult. Sci., 16, 69(1975).
- 72) E. G. Harry and J. F. Tucker, Vet. Rec., 99, 206(1976).
- 73) J. Liebster and J. Kopoldova, "Advances in Radiation Biology", Vol. 1, ed. by L. G. Augenstein, R. Mason and H. Quasther, Academic Press, New York, p. 215(1964).
- 74) 長沢佳熊, 中山豪一, 福田秀男: 衛生試験所報告, 第78号, 71(1960).
- 75) H. C. Sturde and H. J. Heitmann, Nucl. Sci. Abst., 22, 1318(1969).
- 76) I. G. Draganić and Z. D. Draganić, "The Radiation Chemistry of Water", Academic Press, New York, p. 123(1971).
- 77) 厚生省環境衛生局監修: 食品衛生検査指針, II, 日本食品衛生協会, p. 211(1978).
- 78) 荒井綜一: 化学と生物, 14, 583(1976).
- 79) M. Sternberg and C. Y. Kim, Science, 190, 992(1975).
- 80) Z. Bohak, J. Biol. Chem., 239, 2878(1964).
- 81) R. Hayashi and I. Kameda, Agric. Biol. Chem., 44, 891(1980).

- 82) R. Hayashi and I. Kameda, *J. Food Sci.*, 45, 1430(1980).
- 83) J. W. Finley and G. O. Kohler, *Cereal Chem.*, 56, 130(1980).
- 84) 齊尾恭子, 村瀬 誠:食品工誌, 22, 30(1975).
- 85) K. Hasegawa and N. Okamoto, *Agric. Biol. Chem.*, 44, 649(1980).
- 86) M. Friedman, J. C. Zahnley and P. M. Masters, *J. Food Sci.*, 46, 127(1981).
- 87) M. Fujimaki, T. Haraguchi, K. Abe, S. Homma and S. Arai, *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1911(1980).
- 88) T. Haraguchi, K. Abe, S. Arai, S. Homma and M. Fujimaki, *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1951(1980).
- 89) 村瀬 誠, 後藤富士雄:食品工誌, 24, 547(1977).
- 90) 村瀬 誠:農化, 54, 13(1980).
- 91) J. K. Shetty and J. E. Kinsella, *J. Agric. Food Chem.*, 28, 798(1980).
- 92) R. Hayashi and I. Kameda, *Agric. Biol. Chem.*, 44, 175(1980).
- 93) 勝田啓子, 早川 功, 野村男次:農化, 56, 435(1982).
- 94) K. Hasegawa, S. Kitajima and Y. Takado, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2133(1981).
- 95) J. F. Diehl and H. Scherz, *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 26, 499(1975).
- 96) N. I. Karayiannis, J. T. MacGregor and L. F. Bieldanes, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 17, 585(1979).
- 97) 阿部啓子, 五十畑富士子, 本間清一, 荒井綜一, 藤卷正男:農化56年度大会講演要旨集, p. 96(1981).
- 98) 宮木高明, 林 誠:食品衛生学, 豊川行平編, 朝倉書店, p. 182(1963).
- 99) 高木光造, 飯田 優, 村山花子, 相馬すが:北大水産彙報, 20, 227(1969).
- 100) S. H. Arnold and W. D. Brown, *Adv. Food Res.*, 24, 113(1978).
- 101) C. Ienistea, "The Microbiological Safety of Food", ed. by B. C. Hobbs and J. H. B. Christian, Academic Press, New York, p. 327(1972).
- 102) E. S. Dainton and D. B. Peterson, *Proc. Soc. London, Ser. A*, 267, 443(1962).
- 103) E. J. Hart and M. Anber, "The Hydrated Electron", John Wiley & Sons Inc., New York, p. 153, p. 161(1970).
- 104) S. Rustgi, A. Joshi and P. Riesz, *Int. J. Radiat. Biol.*, 32, 533(1977).
- 105) M. Farraggi and Y. Tal, *Radiat. Res.*, 62, 347(1975).
- 106) D. J. Ford, "Decontamination of Animal Feeds by Irradiation", IAEA, Vienna, p. 69, p. 77(1979).
- 107) J. G. Van Kooij, "Decontamination of Animal Feeds by Irradiation", IAEA, p. 89(1979).

- 108) 吉田 勉：畜産の研究, 29, 441(1975).
- 109) F. W. Hill and D. L. Anderson, *J. Nutr.*, 64, 587(1958).
- 110) 岩藤誠吾, 鈴木善雄, 飯塚 廣, 柴部禎己, 仲川憲一：実験動物, 19, 77(1970),  
21, 189(1972).
- 111) 村田行夫, 勝俣是五郎, 多田 檀, 鈴木祥太, 油井 享：武田研究所報, 31,  
42(1972).
- 112) 久米民和, 橋 宏行, 青木章平, 佐藤友太郎：食品工誌, 20, 492(1973).
- 113) "Manual of Food Irradiation Dosimetry", IAEA, Vienna, (1977).
- 114) J. W. T. Spinks and R. J. Woods, "An Introduction to Radiation  
Chemistry", John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 91 (1976).
- 115) H. Fricke and E. J. Hart, "Radiation Dosimetry", Vol. II, ed. by  
F. H. Attix and W. C. Roesch, Academic Press, New York,  
p. 186(1966).
- 116) ICRU Report 14, "Radiation Dosimetry: X Rays and Gamma Rays  
with Maximum Photon Energies between 0.6 and 50 MeV", ICRU,  
Washington, D.C. (1969).
- 117) 日本放射性同位元素協会編：新版アイソトープ便覧, 丸善, 538 (1970)
- 118) G. G. Birch, K. J. Parker and J. T. Worgan (辻 薦, 上原陵一監訳)：農産廢  
棄物よりの飼料と食糧, 建帛社, 1978.
- 119) R. A. A. Muzzarelli, "Chitin", Pergamon Press, New York, p. 247(1977).
- 120) W. A. Bough, Proc. 1st Int. Conf. Chitin/Chitosan, MIT, USA,  
p. 218(1978).
- 121) M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 72, 248(1976).
- 122) 千手諒一：コロイド滴定法, 南江堂(1969).
- 123) G. Bix, *Acta Chem. Scand.*, 2, 467(1948).
- 124) W. A. Bough, *J. Food Sci.*, 40, 297(1975).
- 125) A. C. M. Wu, W. A. Bough, M. R. Holmes and B. E. Perkins,  
*Biotech. Bioeng.*, 20, 1957(1978).
- 126) W. A. Bough, *Poultry Sci.*, 54, 1904(1975).
- 127) A. F. Groneman, Proceedings of an International Workshop of ESNA  
Working-group on Waste Irradiation, Hanover, F.R. of Germany,  
IAEA-mf-6408, p. 46(1979).
- 128) 松田龍夫：放射線化学, 8, 20(1973).
- 129) 仲曾根克己, 林 力丸, 秦 忠夫：農化, 46, 45(1972).
- 130) 本城市次郎, 崔 英哲：基礎放射線生物学, 南江堂, p. 73(1966).
- 131) 斉藤真弘：放射線障害の機構, 山本 修編著, 学会出版センター, p. 167(1982).
- 132) C. O. Stevens, H. E. Sauberich and G. R. Bergstrom,  
*J. Biol. Chem.*, 242, 1821(1967).



- 133) 日本生化学会編：生化学データブック〔I〕，東京化学同人，p. 303(1979)。
- 134) 渡辺乾二：New Food Industry, 24(1), 85(1982)。
- 135) F. J. McArdle and N. W. Desrosier, Food Technol., 9, 527(1955)。
- 136) Y. Hattori and A. Matsuyama, Agric. Biol. Chem., 44, 679(1980)。
- 137) R. A. A. Muzzarelli and O. J. Tubertini, J. Radioanal. Chem.,  
12, 431(1972)。
- 138) "Improvement of Food Quality by Irradiation", IAEA, Vienna(1974)。
- 139) A. Charlesby, J. Polymer Sci., 15, 263(1955)。
- 140) N. D. Kunz, J. L. Gainer and J. L. Kelley, Nucl. Technol.,  
16, 556(1972)。
- 141) T. Kume, N. Kobayashi, A. Okuaki and S. Aoki, Agric. Biol. Chem.,  
43, 1625(1979)。
- 142) 三品岡良, 二国二郎：農化, 33, 931(1959)。
- 143) 梅田圭司, 早川清一, 早川 昭, 豊島英親, 宮崎基嘉：食研報告, 25, 11(1970)。
- 144) T. Kume and M. Takehisa, Agric. Biol. Chem., 47, 899(1983)。