[報文]

生薬中の微生物分布と放射線殺菌効果

伊藤 均, 鎌倉浩之*, 関田節子*

日本原子力研究所高崎研究所
(〒370-1292 群馬県高崎市綿貫町1233)

*国立医薬品食品衛生研究所
(〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

Distribution of Microorganisms in Herb Medicines and Their Decontamination by Gamma-irradiation

Hitoshi Ito, Hiroyuki Kamakura* and Setuko Sekita*

Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, Japan Atomic Energy Research Institute,
Takasaki, Gunma 370-1292, Japan

* National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Herb medicines are traditional medicine in Japan and have been used for medical treatment. These herb medicines are contaminating frequently by microorganisms which has possibility to cause opportunistic diseases. Recently, hygienic standard of herb medicines become more strict than before, and it needs to decontaminate microorganisms by some treatments. However, chemical treatments such as by ethylene oxide fumigation leave toxic residues in the herbs while steam sterilization decrease medicinal components. From study on the distribution of microorganisms in 31 samples of selected herb medicines, colony forming units of total aerobic bacteria were determined to be 1.9×10^2 to 1.4×10^6 per gram in 30 samples. Coliforms were also determined to be 6.9×10^2 to 4.3×10^6 per gram in 16 samples. The main aerobic bacteria were identified as *Bacillus pumilus*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *Erwinia*, *Enterobacter* and *Acinetobacter*, whereas consisted mainly of *Enterobacter* in coliform counts. Molds were determined to be 6.3×10^1 to 1.9×10^5 per gram which consisted mainly *Aspergillus glaucus* group, *A. restrictus* group, *A. flavus* group, *A. ostianus*, *A. phoenicis*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* and *Alternaria* in 25 samples. A study on the inactivation of microorganisms at sample No. S18 showed that a gamma-irradiation dose of 20 kGy was required to reduce the total aerobic bacteria and the coliforms below a detectable level, while radiation-resistant bacteria were survived at high doses more than 10 kGy consisted with *Acinetobacter* and *Enterobacter*. Molds were inactivated below 8 kGy except *Alternaria*. However, a dose of 10 kGy should be effective for the sample No. S18 to reduce the spore-forming bacteria, the fecal coliforms and the molds below a detectable level per gram. On the study of inactivation of microorganisms in many samples except the No. 18, all kinds of microorganism were inactivated below a detectable level at 10 kGy irradiation.

緒 言

植物等から得られる生薬には微生物汚染の著しいものが多く、日和見感染の原因になることも考えら

れる。また、生薬によっては収穫後の貯蔵・流通中に糸状菌が増殖してマイコトキシン産生による汚染の可能性もある。生薬は自然界からの産物のため、収穫前から様々な微生物が共生または付着してお

り、たとえ、良好な衛生条件下で収穫・貯蔵しても微生物の汚染は防止できない。近年、生薬等の衛生基準がきびしくなっており、なんらかの殺菌処理が必要になってきている。しかし、生薬を酸化エチレン等の薬剤で処理すれば毒性物質の残留が問題になるし、蒸気殺菌の場合には薬効成分の低減が問題になる。香辛料の場合には汚染微生物は7~10kGyで殺菌され糸状菌の増殖も防止でき、精油成分や抗菌性、抗酸化性もほとんど変化しない¹⁻⁵⁾。植物由来の生薬も香辛料と成分的に類似しているため、照射による成分変化は少ないと思われるが、放射線殺菌効果についてはほとんど検討されていない。

本研究では植物由来の生薬について微生物汚染の実態と放射線殺菌効果について検討した。

実験方法

植物由来の生薬 31 試料 (Table 1, 2): ケイヒ (試料 No. ; S1), マオウ (S5), シャクヤク (S6, S13), ウイキョウ (S7) カゴソウ (S8), ダイオウ (S9, S11, S12), シュクシャ (S15), カンゾウ (S13, S16, K1, K2, K3, K4), ショウマ (S18, S28), シャゼンソウ (S19), インチコウ (S21), ソヨウ (S22), ケイガイ (S23), センナ (Se1, Se2, Se3, Se4, Se5, Se6, Se7, Se8) を生薬会社より入手し、一般好気性細菌、大腸菌群、一般糸状菌、好浸透圧性糸状菌の汚染菌数を香辛料と同じ方法¹⁾で調べた。一般細菌と大腸菌群の代表的分離株の同定は Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. I, II (1987) に従って行い⁶⁾、糸状菌類については The genus *Aspergillus*⁷⁾ 及び Illustrated genera of Imperfect Fungi⁸⁾ を参考にした。放射線殺菌効果¹⁾は当研究所の約 10 万キュリーのコバルト-60 ガンマ線源を用い、吸収線量は Fricke 線量計により測定した。

実験結果

1. 生薬中の微生物分布

生薬中の好気性細菌数は Table 1 及び Table 2 に示すように 1 試料を除いて、1g 中 $1.9 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^6$ 個検出された。大腸菌群は 16 試料より 1g 当たり $6.9 \times 10^2 \sim 4.3 \times 10^6$ 個検出された。試料 S11 のダイオウについては菌が全く検出されず、すでになんらかの殺菌処理が行われているものと思われる。生薬中の好気性細菌の約 50% は *Bacillus* 属で構成されており、

B. pumilus, *B. circulans*, *B. megaterium* 等が多く検出された。また、*Erwinia* や *Enterobacter*, *Acinetobacter* も多く検出された。一方、大腸菌群の多くは土壌由来と思われる *Enterobacter* であり、*E. agglomerans* や *E. cloacae*, *E. intermedium* が検出され、腸内由来と思われる *Citrobacter* も若干検出された。

一般糸状菌は 25 試料より 1g 当たり $6.3 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^5$ 個検出され、主な糸状菌は *Aspergillus flavus*, *A. flavus* var. *columnaris*, *A. ostianus*, *A. phoenicis* であり、*Penicillium* や *Trichoderma*, *Alternaria* も検出された。好浸透圧性糸状菌は 1g 当たり $6.3 \times 10^1 \sim 1.9 \times 10^5$ 個検出され、*Aspergillus glaucus* 群と *A. restrictus* 群で構成されていた。好浸透圧性糸状菌は低水分活性下でも増殖可能であり、試料 S15 のシュクシャや S22 のソヨウ、Se5 のセンナは糸状菌の増殖が起きていると思われる。また、一般糸状菌数が多い S8 のカゴソウや S15 のシュクシャでは *A. flavus* 群の増殖初期の状態を示していると思われる。

2. 生薬の放射線殺菌効果

生薬 30 試料中、微生物汚染が最も著しい S18 のショウマについて殺菌効果を調べたところ、Fig. 1 に示すように好気性細菌及び大腸菌群は 15kGy でも多くの生残菌が認められた。この場合、10kGy 以上の高線量で生残している菌は *Acinetobacter* と *Enterobacter* であった。一方、糸状菌類は全て 8kGy 以下で殺菌された。S17 のカンゾウや K3 のカンゾウの場合には、Fig. 2 及び Fig. 3 に示すように 10kGy でほぼ殺菌された。しかし、各試料とも大腸菌群は糸状菌に比べ放射線耐性を示していた。なお、生薬中の *Bacillus* 属も 10kGy 以下で検出できなくなった。

そこで、生薬からの *Enterobacter* 分離株である *E. agglomerans* K3-1 と *E. cloacae* K3-2 について 0.067M 磷酸緩衝液中での放射線感受性を比較したところ、 D_{10} 値は K3-1 株で 0.25kGy、K3-2 株で 0.35kGy となり、*Citrobacter* 分離株の D_{10} 値 0.07kGy または比較に用いた *Escherichia coli* S2 株の D_{10} 値 0.12kGy の 2~5 倍あった。さらに、*E. agglomerans* K3-1 株の定常期細胞をカンゾウ、ショウマ、センナ粉末中で凍結乾燥して殺菌効果を調べたところ、Fig. 4 に示すようにカンゾウ、ショウマ中ではセンナに比べ放射線に耐性であった。従って、生薬によっては高線量でも大腸菌群が生残する原因は大腸菌群が *Enterobacter* で主に構成されており *Escherichia coli* 等の糞便系大腸菌

群に比べ放射線に著しく耐性であること及び乾燥生葉中の放射線保護物質の存在によって説明可能である。

考 察

生葉の放射線殺菌で特に問題になる汚染微生物はマイコトキシン産生の可能性がある糸状菌類と衛生上問題になる大腸菌群であろう⁹⁾。*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属の糸状菌はポリエチレン密封下の生葉でも増殖可能であり¹¹⁾, 5kGy 以下の線量で増殖を防止できると思われる。本研究で分離された *A. flavus* や *A. flavus* var. *columnaris*, *A. ostianus* はマイコトキシン産生の可能性があり, 放射線殺菌によりこれらの菌の増殖抑制が可能である。なお, 生葉中には *A. niger* 群に属する *A. phoenicis* と類似したコロニーを形成する *Altenaria* 等の不完全菌が検出されることがあるが, 本菌は放射線に耐性であり 10kGy 以上でも生残する可能性がある¹⁰⁾。しかし, 不完全菌の多くは収穫前からの汚染菌であり, 乾燥下での増殖は考えられない。

生葉の一般細菌及び大腸菌群の殺菌線量は香辛料¹¹⁾ に比べ大きい傾向が認められ, 以前の予備的検討でも必要殺菌線量が 15kGy 以上を越えることがあった。香辛料の場合には構成菌が主に *Bacillus* 属で占められており, 10kGy 以下の線量で衛生規準まで殺菌することが可能であった。一方, 生葉の場合には *Acinetobacter* や大腸菌群が 15kGy でも生残していることがある。しかし, 高線量で生残している大腸菌群は *Enterobacter* であり, *E. coli* や *Salmonella* が高線量で生残する可能性は考えられない。事実, 伊藤等が報告したように乾燥魚粉中で *Salmonella* や *E. coli* は 5kGy でほぼ殺菌される¹⁰⁾。また, ブドウ球菌や緑膿菌等の多くの非芽胞形成細菌の放射線感受性も *Salmonella* と同じであり低線量で殺菌可能である¹²⁾。*Enterobacter* は放射線に耐性であるが, 衛生上は特に問題のない菌であり, 高線量で生残しても問題にならないであろう。また, *Acinetobacter* も衛生上の問題がない菌である。従って, 生葉の殺菌線量を 10kGy としても衛生的に問題がないと思われるが, 簡易的な微生物検査で高線量照射後に大腸菌群が生残していることは問題であろう。Fig. 1 のような場合には必要殺菌線量は 20kGy になると思われるが, 糞便系大腸菌群検査により大腸菌群が 1g 当た

り 0 個以下, 好気性細菌数が 10^3 個以下とする場合には必要殺菌線量は 15kGy となるであろう。また, *Bacillus* 属等の有芽胞細菌と糸状菌, 糞便系大腸菌群を衛生的な検査対象にすれば殺菌線量は 10kGy で十分と思われる。

生葉の放射線殺菌を実用化する場合には薬効成分の変化についても検討しておく必要がある。しかし, 香辛料のように生葉と成分組成が類似している食品類では精油等の成分変化はほとんど低下せず²⁻⁵⁾, 生葉での研究例でも薬効成分の低減は無視することができると思われる¹³⁾。

文 献

- 1) Muhamed L. J., H. Ito, H. Watanabe and T. Tamura : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 347 (1986).
- 2) 渡辺 宏, S. Bagaiwati, 田村直幸 : 食品照射, **20**, 27(1985).
- 3) 金子信忠, 伊藤 均, 石垣 功 : 日食工誌, **38**, 1025 (1991).
- 4) H. Ito and M. S. Islam : *Radiat. Biol. Chem.*, **43**(6), 595 (1994).
- 5) 伊藤 均, Gao Meixu : 食品照射, **29**, 1(1994).
- 6) J. G. Holt, et al (Ed.) : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I and II, Baltimore, Williams and Wilkins, 1986.
- 7) K. B. Raper and D. I. Fennell : *The genus Aspergillus*, Baltimore, Williams and Wilkins, 1965.
- 8) H. L. Barnett : *Illustrated genera of Imperfect Fungi*, Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1965.
- 9) 倉田 浩, 石関忠一, 宇田川俊一 : 衛生試験所報告, **96**, 1(1978).
- 10) 伊藤 均, 大木由美, 石垣 功 : 防菌防黴, **19**, 577(1991).
- 11) 伊藤 均, A. Begum, 久米民和, 武久正昭 : 農化, **57**, 9(1983).
- 12) 伊藤 均 : 食品照射, **33**, 51(1998).
- 13) 木村提二郎, 佐々木将博, 近藤裕一, 城 尚信, 神岡俊隆, 小出祐章 : *RADIOISOTOPES*, **30**, 669(1981).

(1999 年 5 月 30 日受理)

Table 1. Distribution of microorganisms in different samples of herb medicine (colony forming units per gram).

Sample No.	Total aerobic bacteria	Coliforms	Fungi	Osmophilic molds
S1 <i>Cinnamomum cassia</i>	$.25 \times 10^3$	—	—	1.25×10^2
S5 <i>Ephedra sinica</i>	5.19×10^3	—	2.50×10^2	6.25×10^1
S6 <i>Paeonia lactiflora</i>	1.88×10^2	—	—	1.25×10^2
S7 <i>Foeniculum vulgare</i>	7.13×10^5	6.63×10^5	6.88×10^2	4.38×10^2
S8 <i>Prunella vulgaris</i> var. <i>hilucina</i>	2.79×10^6	7.08×10^4	2.16×10^4	7.08×10^4
S9 <i>Rheum palmatum</i>	1.34×10^4	—	4.17×10^4	1.03×10^4
S10 <i>Foeniculum vulgare</i>	1.94×10^4	1.38×10^4	6.50×10^3	4.04×10^3
S11 <i>Rheum palmatum</i>	—	—	—	—
S12 <i>Rheum palmatum</i>	1.31×10^3	—	7.50×10^2	1.01×10^4
S13 <i>Paeonia lactiflora</i>	9.38×10^2	—	6.25×10^1	—
S15 <i>Amomum xanthioides</i>	8.75×10^6	—	9.58×10^4	1.85×10^5
S16 <i>Glycyrrhiza uralensis</i>	1.64×10^4	1.50×10^3	1.25×10^2	—
S17 <i>Glycyrrhiza uralensis</i>	2.13×10^5	1.64×10^4	3.13×10^2	3.13×10^3
S18 <i>Cimicifuga simplex</i>	1.38×10^8	4.25×10^6	2.08×10^4	1.06×10^4
S19 <i>Plantago asiatica</i>	6.25×10^4	—	—	2.20×10^4
S20 <i>Cimicifuga simplex</i>	2.59×10^6	6.88×10^2	6.30×10^1	—
S21 <i>Artemisia capillaris</i>	2.53×10^6	3.79×10^5	3.75×10^2	8.75×10^2
S22 <i>Perilla frutescens</i>	1.79×10^6	3.38×10^3	1.44×10^3	1.25×10^5
S23 <i>Schizonepeta tenuifolia</i>	2.99×10^4	—	6.30×10^1	1.13×10^3

* — : below detection level

Table 2. Distribution of microorganisms in Senna (Se) and Licorice (K).
(colony forming units per gram)

Sample No.	Total aerobic bacteria	Coliforms	Fungi	Osmophilic molds
Se 1	8.50×10^3	—	1.25×10^2	—
Se 2	2.93×10^4	—	2.50×10^2	—
Se 3	3.36×10^4	9.88×10^3	4.00×10^3	4.88×10^3
Se 4	1.85×10^4	6.25×10^2	3.75×10^2	1.38×10^3
Se 5	7.50×10^4	4.63×10^3	1.54×10^5	1.17×10^5
Se 6	2.71×10^4	1.50×10^3	7.50×10^2	1.25×10^2
Se 7	2.38×10^4	2.38×10^3	3.75×10^2	1.25×10^2
Se 8	1.15×10^4	—	2.50×10^2	1.25×10^2
K 1	3.03×10^4	—	—	—
K 2	8.63×10^5	5.78×10^4	4.88×10^3	4.30×10^4
K 3	7.50×10^5	3.50×10^3	1.25×10^2	5.00×10^3
K 4	2.80×10^4	—	—	5.00×10^2

Senna : *Cassia sennae*, Licorice : *Glycyrrhiza uralensis*

Fig. 1 Inactivation curves for microorganisms in sample No. S18 after gamma-irradiation.
Symbols : ● , total serobic bacteria ; ○ , coliform bacteria ; ■ , fungi ; △ , osmophilic molds

Fig. 2 Inactivation curves for microorganisms in sample No. S17 after gamma-irradiation.
Symbols : ● , total serobic bacteria ; ○ , coliform bacteria ; △ , osmophilic molds

Fig. 3 Inactivation curves for microorganisms in sample No. K3 after gamma-irradiation.
Symbols : ● , total serobic bacteria ; ○ , coliform bacteria ; △ , osmophilic molds

Fig. 4 Survival curves of *Enterobacter agglomerans* K3-1 under dried condition in herb medicines after gamma-irradiation.
Symbols : ● : Sample No. K3, ○ : Sample No. S18, △ : Sample No. Se1