

資料

ヒスタミン産生菌を接種した養殖マサバのバイオジェニックアミン蓄積に及ぼす保存温度と期間の影響

二村和視*・大島伊織*・山崎資之*・小泉鏡子*

Effects of storage temperature and duration on biogenic amine accumulation in cultivated chub mackerel *Scomber japonicus* inoculated with histamine-producing bacteria

Kazumi NIMURA, Iori OHSHIMA, Motoyuki YAMAZAKI and Kyoko KOIZUMI

We investigated the accumulation of biogenic amine (BA) in tissues of cultivated chub mackerel (*Scomber japonicus*) inoculated histamine-producing bacteria after 48h of storage of 5,10,15 and 20 °C. After storage at 5 °C, histamine (Hm) was not detected. After storage at 10 °C, histamine (Hm) was not detected, but was detected at concentrations of 22-46mg/kg in the gills and visceral organs. Putrescine (Put) and Cadaverine (Cad) were not detected after storage at 5 °C and 10 °C. However, high Hm concentrations (over 1,000mg/kg) were detected at 15 °C and 20 °C, in addition to Put (44mg/kg) and Cad (249mg/kg). These results suggest that it may be possible to suppress BA products such as Hm, Put and Cad via storage at temperatures of 10 °C and lower, even if tissues of chub mackerel is contaminated with histamine-producing bacteria.

キーワード：養殖, マサバ, ヒスタミン, バイオジェニックアミン
2022年10月4日受付 2023年7月19日受理

養殖マサバ *Scomber japonicus* は脂の乗りや肉質が安定すること、鮮度が高く、アニサキス感染のリスクが少ないため生食が可能なことから、近年では中部以西の各地で養殖されており、年間生産量は約100万尾を超えている(長野2019)。さば類を含む赤身魚はヒスチジン含有量が高く、温度管理が適切ではない場合、ヒスタミンが蓄積する可能性があり、ヒスタミン食中毒の原因となる(藤井2006)。ヒスタミンは、ヒスチジン脱炭酸酵素を持つヒスタミン産生菌がヒスチジンに作用することで蓄積される。このヒスタミン産生菌は海水中やさば類の体表に付着していることが報告されており(与口ら1990a, b)、また日本国内で1998年～2008年までにヒスタミン食中毒のうち13%がさば類由来との報告がある(登田ら2009)。このため、養殖マサバにおいても、ヒスタミンに対する注意は必要であると考えられるが、保存温度や保存期間の異なるヒスタミン蓄積についての知見はない。また、ヒスタミン以外のバイオジェニック

アミンについては、食品が腐敗した際にヒスタミンと同時に産生されるチラミン、プトレシン、スペルミジン、スペルミン、カダベリン等がヒスタミンを分解する酵素を阻害するため、ヒスタミンの毒性がより強まるとされており、バイオジェニックアミン同士の相乗・相加作用も懸念される(井部2014)。このためヒスタミン以外のバイオジェニックアミンの挙動を把握する必要がある。

そこで本研究では、広く流通している養殖マサバについて、人為的にヒスタミン産生菌に汚染させた状態で、保存温度や保存期間の異なるヒスタミン及びその他のバイオジェニックアミンの蓄積状況を調査した。

材料と方法

試験は2021年11月8日に実施した。静岡県沼津市の養殖業者が約4カ月間飼育したマサバを生きた状態で氷入り海水中に入れることで活締めし、4°C以下に冷やし

* 静岡県水産・海洋技術研究所
〒425-0032 静岡県焼津市鯛ヶ島136-24
Shizuoka Prefectural Research Institute of Fishery and Ocean, Yaizu, Shizuoka 425-0032, Japan
E-mail: kazumi1_nimura@pref.shizuoka.lg.jp

て4時間以内に研究所に持ち帰った。マサバは尾叉長及び重量を測定後、試験に供した。試験に用いたヒスタミン産生菌には当研究所でカツオ内臓から分離・同定した *Klebsiella aerogenes* を用いた。この菌株のヒスタミン産生能は、HB培地に10⁶cfu/mLで添加し、15°C及び30°Cで24時間培養した場合においてそれぞれ125mg/kg、410mg/kgであった。また、これらの増殖特性は15°C及び30°Cで24時間培養した場合、培養開始時の10⁵cfu/mLからそれぞれ10⁷cfu/mL及び2×10⁹cfu/mLとなり、15°Cに比べて30°Cで高い増殖特性を示した。保存試験として、チャック付きビニール袋にラウンド状態のマサバと、ヒスタミン産生菌数を10⁵cfu/mLに調整した生理食塩水1L（以下、保存液とする）を入れ、5°C、10°C、15°C及び20°Cに設定した恒温器（MIR-154-PJ、PHC株式会社）で各4尾を24時間及び48時間保存した。試験に用いた *K. aerogenes* は好塩性であり、菌の増殖や保存のため生理食塩水を用いた。また、接種濃度の設定については、中温好塩性のヒスタミン産生菌はマサバ鮮魚の体表から多い時には10³~10⁴/cm²レベルで検出されることがあり（与口ら1990b）、本研究では接触させる保存液のヒスタミン産生菌濃度を10⁵cfu/mLと高濃度にしてマサバの表面に接触させた。また、試験開始時の状態を把握するため、研究所に持ち帰った直後のマサバ4尾のヒスタミン含有量を測定した。ヒスタミン含有量の測定用サンプルは、鰓、内臓（胃内容物含む）、スキンレスフィレに切り分け、各部位をアルコールで殺菌した包丁でミンチ状にし、チャック付きビニール袋に封入して-40°Cで保存した。

ヒスタミンの抽出は、各部位1gもしくは保存液1mLをプラスチックチューブに取り、1M EDTAを24mL加えて攪拌し、沸騰水中で20分間抽出後、ろ紙（No.5A、アドバンテック東洋株式会社）にてろ過した。ヒスタミンの測定は、チェックカラーヒスタミン（キッコーマンバイオケミファ株式会社）を用いて、付属の説明書に従って発色させ、デジタルパックテスト（DPM2-ABS、株式会社共立理化学研究所）を用いて測定波長470nmでの吸光度を測定した。なお、ヒスタミン量が高濃度の場合は、イオン交換水でろ液を適宜希釈してから発色させた。48時間保存後の魚肉については、ヒスタミン以外のバイオジェニックアミン含有量測定のため、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によりチラミン、プトレシン、スベルミジン、カダベリン含有量を分離・定量した（Saito *et al.* 1992）。なお、高速液体クロマトグラフィーを用いることでヒスタミンも測定できるが、本研究では抽出及び発色等の操作が簡便でかつ測定精度が保証されているチェックカラーヒスタミン（国際認証機関AOAC-RIのPTM認証取得）を採用した。サンプルの前処理はプラスチック遠沈管にミンチ状の魚肉1gと5%（w/v）トリクロロ酢酸水溶液4mLを入れ、ホモジナイザー（ヒスコトロンNS-50及びジェネレーターシャフトNS-10、株

式会社マイクロテック・ニチオン）を用いてホモジナイズした後、イオン交換水で10mLに定容した。その後、ホモジネートを5°C、1,800×gで5分間遠心分離した。上清を分離し、ろ紙（No.5B、アドバンテック東洋株式会社）にてろ過し、ろ液に内部標準として20µg/mLジエチレントリアミンを0.5mL加えた後、1M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH6~7に調整し、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.6）で5mLに定容した。この抽出液を固相抽出カラム（InertSep mini MC-1、ジーエルサイエンス社）に通すことで一旦アミン類を吸着させ、カラムを0.1M酢酸緩衝液（pH5.6）10mLと5mLの水で洗浄し、0.1M塩酸5mLでアミン類を溶出させた。この溶出液を真空状態で蒸発乾固させた後、5mLの0.05M塩酸に再溶解し、10µLをHPLC（Hitachi Chromaster system、株式会社日立ハイテク）を用いて分析に供した。カラムはAsahipak ODP-50-4D（150×4.6mm：昭和電工株式会社）、を用い、カラムオープンは40°Cに設定した。移動相には0.5mM *o*-フタルアルデヒド及び0.5mM N-アセチル-L-システインを含む50mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH9.9）-アセトニトリル（77:23,v/v）を用い、流速0.5mL/min、励起波長330nm、蛍光波長430nmでアミン類を検出した。

結果及び考察

試験に用いたマサバの尾叉長と魚体重は30.7 ± 0.9cm（平均±標準偏差；以下同様）、321 ± 25gであり、保存

表1. 養殖マサバ保存後の各部位及び保存液のヒスタミン含有量

保存温度	含有量 (各部位：mg / kg) (保存液：mg / L)	経過時間 (h)	
		24	48
		(平均±標準偏差)	
5°C	魚肉	ND	ND
	鰓	ND	ND
	内臓	ND	ND
	保存液	-	ND
10°C	魚肉	ND	ND
	鰓	ND	22 ± 8
	内臓	ND	46 ± 13
	保存液	-	ND
15°C	魚肉	ND	1,001 ± 896
	鰓	17 ± 8	181 ± 32
	内臓	65 ± 13	781 ± 222
	保存液	-	164
20°C	魚肉	39 ± 26	4,125 ± 716
	鰓	77 ± 21	686 ± 105
	内臓	670 ± 135	1,718 ± 413
	保存液	-	470

ND:検出されず、検出限界:各部位<10mg/kg、保存液<10mg/L。保存液の“-”は測定なし。

表 2. 保存試験終了時の養殖マサバ魚肉のチラミン, プトレシン, スペルミジン, カダベリン含有量

保存温度	バイオジェニックアミン	含有量 (mg/kg)
		平均±標準偏差
5℃	チラミン	ND
	プトレシン	ND
	スペルミジン	7.8 ± 2.1
	カダベリン	ND
10℃	チラミン	ND
	プトレシン	ND
	スペルミジン	7.3 ± 2.6
	カダベリン	ND
15℃	チラミン	0.8 ± 1.5
	プトレシン	ND
	スペルミジン	5.0 ± 3.4
	カダベリン	24.0 ± 8.3
20℃	チラミン	7.8 ± 5.6
	プトレシン	43.8 ± 13.1
	スペルミジン	ND
	カダベリン	248.5 ± 63.0

ND: 検出されず. 検出限界: チラミン <2mg/kg; プトレシン, スペルミジン, カダベリン <4mg/kg.

前の4尾からヒスタミンは検出されなかった。保存試験の結果を表1に示す。5℃で保存した場合は、24時間、48時間保存後の各部位及び保存液でヒスタミンは検出されなかった。10℃では24時間後の各部位及び48時間後の魚肉と保存液ではヒスタミンは検出されなかったが、48時間保存した鰓及び内臓のヒスタミン含有量は、それぞれ $22 \pm 8\text{mg/kg}$, $46 \pm 13\text{mg/kg}$ であった。15℃で保存した場合は、24時間後の鰓及び内臓でヒスタミンの蓄積が始まり、48時間後の魚肉、鰓、内臓及び保存液ではそれぞれ $1,001 \pm 896\text{mg/kg}$, $181 \pm 32\text{mg/kg}$, $781 \pm 222\text{mg/kg}$, 164mg/kg であり、いずれも非常に高濃度のヒスタミンの蓄積がみられた。なお15℃、48時間保存後の魚肉については、官能的に若干の軟化及びにおいが確認された。20℃では、48時間後の魚肉、鰓、内臓及び保存液においてそれぞれ $4,125 \pm 716\text{mg/kg}$, $686 \pm 105\text{mg/kg}$, $1,718 \pm 413\text{mg/kg}$, 470mg/kg と高濃度のヒスタミンの蓄積がみられ、また魚肉は強い悪臭及び軟化が認められ、官能的にも食用に適さない状態であった。

天然海域でのヒスタミン産生菌濃度は年間で最も高い時期でも 10cfu/mL と報告されており(与口ら 1990a)、本試験開始時の *K. aerogenes* の菌数は 10^5cfu/mL であり、天然海域に比べて著しく高い濃度設定であった。また、試験終了時の保存液に *K. aerogenes* が存在することを確認しているため、体表はヒスタミン産生菌に汚染されていると考えられた。また、市販のマサバでは体表と腸管内容物にヒスタミン産生菌が存在する(与口ら 1990b)ことを考慮すると、試験開始時の体表、鰓、内臓はヒスタミン産生菌に汚染されていたと推測された。このよう

な汚染された状態においても、5℃及び10℃の48時間後までは魚肉でのヒスタミンの蓄積は認められず、ヒスタミン蓄積の観点からは食用には問題がないと考えられた。しかし、15℃以上の保存ではヒスタミンが早期に蓄積することが明らかになった。

部位毎のヒスタミン蓄積状況は24時間後の保存では、内臓、鰓の順にヒスタミン含有量が高かった(表1)。これは保存中、ヒスタミン産生菌に汚染されている内臓や鰓においてヒスタミンが蓄積しやすいことが理由であると考えられた。内臓の有無とヒスタミン蓄積の関係については、サンマ丸干しでの4日間の乾燥試験において、内臓を除去した場合はヒスタミンの蓄積が見られないのに対し、内臓を除去せずに、20℃で保存した場合はヒスタミンが $10 \sim 40\text{mg}/100\text{g}$ 蓄積したことが報告されている(大槻 2006)。このため、鰓や内臓を除去するドレス、セミドレス等の一次処理を行うことでヒスタミンの発生を遅延もしくは抑制できると推察される。また、5℃及び10℃で保存した場合の魚肉(スキンレスフィレ)のヒスタミン含有量は検出限界以下(10mg/kg 未満)であり、ヒスタミンが検出された10℃保存の鰓及び内臓では 50mg/kg 以下であった(表1)。1回の食事で健康被害を起こさないと考えられる食品中のヒスタミン濃度は 200mg/kg とされており(FAO/WHO2012)、10℃以下で保存した各部位は健康被害を引き起こす可能性は極めて低いと考えられた。

ヒスタミン以外のバイオジェニック含有量を表2に示す。48時間保存した魚肉中のチラミン、プトレシン、スペルミジン、カダベリン含有量は、5℃及び10℃ではいずれも 10mg/kg 以下であった。15℃ではカダベリン含有量が $24.0 \pm 8.3\text{mg/kg}$ であり、それ以外のバイオジェニックアミンは 10mg/kg 以下であった。20℃ではチラミン、スペルミジンは 10mg/kg 以下であったが、プトレシン及びカダベリンは高い含有量を示した。ヒスタミン以外のバイオジェニックアミンは、ヒスタミンが蓄積しなかった5℃及び10℃では蓄積せず、ヒスタミンが高濃度で蓄積した15℃及び20℃ではプトレシン及びカダベリンが蓄積した。プトレシン及びカダベリンは水産物に含まれるオルニチン及びリジンの脱炭酸反応によりそれぞれ生成する(井部 2014)。また、プトレシン及びカダベリンは魚種不明であるが干物から検出事例があり(観ら 2005)、また魚醤油、味噌、醤油、納豆、酒類の発酵食品から検出されている(井部ら 1995, 井部ら 1996, 中里ら 2002)。これらのバイオジェニックアミンにはヒスタミンの毒性を強める可能性や、バイオジェニックアミン同士の相乗・相加作用も懸念されるため(井部 2014)、バイオジェニックアミンの生成抑制も食品衛生上重要である。

以上から、ヒスタミン産生菌に汚染されていても5℃及び10℃の低温で保存することにより48時間後まで魚肉中のヒスタミンの蓄積が抑えられるが、15℃におい

ては24時間後に鰹、内臓でヒスタミンが蓄積し始め、48時間後の魚肉において非常に高い含有量でヒスタミンが蓄積することが明らかになった。また、ヒスタミンが高濃度に蓄積した魚肉ではプトレシン及びカダベリンが蓄積していた。ヒスタミン食中毒の予防のため、漁獲時に水温もしくは気温が28.3°C以下の温度で漁獲された魚は9時間以内に4.4°C以下に冷やす必要があるとされており(FAO/WHO2012)、バイオジェニックアミン産生抑制の観点からは保存温度を速やかに5°C以下にし、ヒスタミンが蓄積しやすい鰹及び内臓を早期に除去するなど、ヒスタミン、チラミン、カダベリンのようなバイオジェニックアミン産生を抑制することでより安全な養殖さばの流通が可能になると考えられた。

文 献

- FAO, WHO (2012) Joint FAO/WHO expert meeting on the public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products. ed by FAO, WHO, 126p.
- 藤井建夫 (2006) アレルギー様食中毒. 日食微誌, **23**, 61-71.
- 井部明広・上村 尚・田端節子・早野公美・田村行弘 (1995) 発酵食品中の不揮発性アミン類の含有量調査 (第1報). 東京衛研年報, **46**, 102-107.
- 井部明広・上村 尚・田端節子・早野公美・木村祐起子・松友俊夫 (1996) 発酵食品中の不揮発性アミン類の含有量調査 (第2報). 食衛誌, **47**, 90-94.
- 井部明広 (2014) 食品に含まれるアミン類. 日本調理科学会誌, **47**, 341-347.
- 観 公子・牛山博文・新藤哲也・斉藤和夫 (2005) 市販魚介類およびその加工品中のヒスタミン含有量調査. 食衛誌, **46**, 127-132.
- 長野直樹 (2019) マサバ養殖の急増から見る市場規模拡大と生産・流通の特徴. 養殖ビジネス, **9**, 4-7.
- 中里光男・小林千種・山嶋裕季子・立石恭也・川合由華・安田和男 (2002) 魚醤油中の揮発性塩基窒素及び不揮発性アミン類の分析. 東京衛研年報, **53**, 95-100.
- 大槻直也 (2006) 赤身魚塩干品のヒスタミン生成について (2). 千葉水産研報, **1**, 91-94.
- Saito K, Horie M, Nose N, Nakagomi K, Nakazawa H (1992) Determination of polyamines in foods by liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. *Anal. Sci.*, **8**, 675-680.
- 登田美桜・山本 都・畝山智香子・森山 馨 (2009) 国内外におけるヒスタミン食中毒. 国立衛研報, **127**, 31-38.
- 与口りお・奥積昌世・藤井建夫 (1990a) 東京湾および相模湾沿岸海水における中温好塩性ヒスタミン生成菌の季節的消長. 日水誌, **56**, 1467-1472.
- 与口りお・奥積昌世・藤井建夫 (1990b) 市販鮮魚における好塩性ヒスタミン生成菌の季節的消長. 日水誌, **56**, 1473-1479.