

資料

LC/MS/MSによる不揮発性アミン類の迅速一斉分析法の検討と 鮮魚中のヒスタミン産生菌の分離について

Examination of Rapid Simultaneous Method of Nonvolatile Amines by LC/MS/MS and Isolation of Histamine Producing Bacteria in Raw Fish

茶屋真弓 穂積和佳¹ 岩元由佳²
原田卓也 吉田純一

1 はじめに

ヒスタミンは、赤身魚等に多く含まれるヒスチジンが微生物の働きにより脱炭酸されることで生成される。ヒスタミンを多く蓄積した食品を喫食すると、アレルギー様の症状を呈する食中毒を引き起こす。一度蓄積したヒスタミンは、加熱をしても分解されないことから、ヒスタミンによる食中毒を予防するためには、食材の温度管理を適切に行い、ヒスタミン産生菌の増殖を抑えることが重要となる。また、他のアミン類の共存は、ヒスタミン作用を増強する可能性が示唆されるという報告¹⁾もあり、他のアミン類の挙動の把握も重要であるとされている²⁾。

ヒスタミン等不揮発性アミン類の一斉分析法については、ダンシルクロライドを用いて誘導体化し、蛍光HPLCにより測定する方法³⁾が、食品衛生検査指針に示されており、当センターでも現在、これに基づき検査を実施している。しかし、操作が煩雑で長時間を要するため、健康危害発生時に求められる迅速さに欠けている。そこで、近年、不揮発性アミン類一斉分析法(LC/MS/MS)の報告^{4)~6)}が多くあることから、当センターでも、精製操作を行わず希釈のみを前処理操作とする、迅速性に優れた分析法について検討した。さらに、市場に流通している魚介類加工品やヒスタミンやその他アミン類を含有するとされる発酵食品について、当該分析法により、食品中含有量を調査した。

また、ヒスタミン食中毒の発生には微生物の働きが重要であるが、ヒスタミン産生を低減化するための試みと

して、今後、食品由来の成分若しくは食品添加物を用いてその阻害効果を検証していく。今回は、低温でも増殖し、ヒスタミンを産生するとされるヒスタミン産生菌の分離を実施したので、その結果も併せて報告する。

2 理化学検査

2.1 方法

2.1.1 試料

魚介類加工品22種、醤油7種、及び漬物6種を用いた(全て県内で製造された市場流通品)。

2.1.2 対象項目及び標準品

- ①ヒスタミン(HIS)：ヒスタミン二塩酸塩
(和光純薬工業，特級)
- ②カダベリン(CAD)：カダベリン二塩酸塩標準品
(和光純薬工業，食品分析用)
- ③スペルミジン(SPD)：スペルミジン
(和光純薬工業製，生化学用)
- ④チラミン(TYM)：チラミン塩酸塩
(関東化学，特級)
- ⑤プトレシン(PUT)：プトレシン二塩酸塩標準品
(和光純薬工業，食品分析用)
- ⑥ヒスチジン(HID)：L-ヒスチジン
(和光純薬工業，食品分析用)
- ⑦フェネチルアミン(PHA)：フェネチルアミン
(関東化学，特級)

1 県立大島病院

〒894-0015 奄美市名瀬真名津町18-1

2 熊毛支庁屋久島事務所

〒891-4311 熊毛郡屋久島町安房650

- ⑧トリプタミン(TYP)：トリプタミン塩酸塩
(Sigma-aldrich, 99%)
- ⑨アグマチン(AGM)：硫酸アグマチン
(Combi-Blocks)

2. 1. 3 標準原液及び標準液の調製

各標準品を0.1N塩酸に溶解し、1000µg/mLの標準原液とし、これを精製水で100µg/mLに希釈したものを混合標準液とした。検量線用混合標準液は、0.1%ギ酸アセトニトリルが4%となるように精製水で調製した。

2. 1. 4 試薬

塩酸（有害金属測定用）は関東化学製、ギ酸（HPLC用）、1mol/Lギ酸アンモニウム（HPLC用）、アセトニトリル（LC/MS用）は和光純薬工業製または関東化学製を用いた。

2. 1. 5 装置

高速液体クロマトグラフはProminenceシリーズ（島津製作所社製）を使用し、送液ポンプはLC-20AD、オートサンプラーはSIL-20ACHT、カラムオーブンはCTO-20ACを用いた。

質量分析装置は4000QTRAP（ABSciex社製）を使用し、イオンソースはTurb Ion Sprayを用いた。

2. 1. 6 LC/MS/MS測定条件

測定条件は、表1のとおり。また、化合物ごとのプリカーサーイオン（Q1）、プロダクトイオン（Q3）、MRMにおけるDP（Declustering Potential）、CE（Collision Energy）及び保持時間（RT：Retention Time）は表2に示す。

2. 1. 7 試験溶液の調製

瀧澤らの報告⁹⁾を参考に図1に示す方法で実施した。均一に細切した試料1.0g（醤油の場合1mL）に25mLの精製水を加え、ホモジナイズ（9000rpm, 1分間）し、シャフトを15mLの精製水で洗浄した後、精製水で50mLに定容した。その後、遠心分離（3000rpm, 5分間）し、上清1mLを分取し0.1%ギ酸アセトニトリル4mLを加え、ボルテックスで攪拌した。その後、さらに遠心分離（3000rpm, 5分間）し、上清0.5mL（漬物では2mL）を分取し精製水で10mLに定容し、0.45µmのメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

2. 1. 8 マトリックス効果の検証

2.1.1の試料から選択した14種（魚介類加工品10種、

醤油2種及び漬物2種）について、図1に示す方法で調製した試料溶液で混合標準液を20µg/mLとなるよう調製したマトリックス標準液について、添加濃度と定量値の比を算出し、検証した。なお、HIDはHIS生成の前駆物質であり、HIS食中毒の原因物質ではないことから、評価対象からは外した。

2. 1. 9 添加回収試験

2.1.8と同じ試料14種に混合標準液を100µg/gとなるよう添加し、30分放置した後に抽出操作を行い、2.1.8と同様に検証した。なお、前項同様HIDは評価対象から外した。

表1 LC/MS/MSの測定条件

LC条件 (株)島津製作所製Prominenceシリーズ	
分析カラム	: ZIC ^R -pHILIC(2.1mm×100mm, 粒径 5µm)
流速	: 0.2mL/min
注入量	: 5µL
カラム温度	: 40℃
移動相	: A : 0.45%ギ酸60mMギ酸アンモニウム水溶液 : B : アセトニトリル
グラジエント条件	: 70% (0min)→70% (1min)→40% (4min) (B%) →40% (6min)→1% (7min)→1% (13min) →70% (13.1min)→70% (20min)
MS/MS条件 AB sciex社製4000QTRAP	
イオン化法	: エレクトロスプレーイオン化 (ESI・ポジティブ)
イオンスプレー電圧	: 4.5 kV
イオンソース温度	: 600 °C
測定モード	: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

表2 化合物ごとのMS/MSパラメータ、保持時間及び定量下限

化合物名	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	RT (min)	定量下限 (µg/g)
① HIS	112.1	95.0	41	21	5.8	10
② CAD	103.2	86.0	36	15	6.1	10
③ SPD	146.3	72.1	36	21	10.2	250
④ TYM	138.2	121.0	41	15	2.7	10
⑤ PUT	89.2	72.1	61	15	6.6	25
⑥ HID	156.1	110.1	46	21	5.1	10
⑦ PHA	122.2	105.0	31	17	2.6	10
⑧ TYP	161.1	144.0	41	15	2.7	10
⑨ AGM	131.2	72.0	56	21	6.3	10

試料 1.0g
 | 精製水 25mL
 ホモジナイズ (9000rpm, 1min)
 | 精製水 15mLでシャフト洗浄
 精製水で50mLに定容
 |
 遠心分離 (3000rpm, 5min)
 |
 上清1 mL分取
 | 0.1%ギ酸アセトニトリル4mL
 遠心分離 (3000rpm, 5min)
 |
 上清0.5mL分取 (漬物では2mL)
 |
 精製水で10mLに定容
 | 0.45 μ mメンブランフィルターろ過
 試料溶液 (5000倍 (漬物は1250倍) 希釈溶液)
 |
 LC/MS/MS分析

図1 試験フロー

2. 2 結果及び考察

2. 2. 1 測定条件の検討

9種のアミン類を一斉に検出するため、HILICカラム及び移動相について検討した。

(1) HILICカラム

TSK-Amide80 (東ソー) とZIC^R-pHILIC (Merck) で比較した。TSK-Amide80では、ピーク形状がブロードになるもの (SPD) やキャリーオーバーするもの (PUT, AGM) があった。ZIC^R-pHILICでは、ピーク割れやキャリーオーバーは問題なく、SPDのピークは他アミン類と比較するとブロードであったが、分離は可能であった。また、PUTについては、ベースラインが高かったが、ピークの分離は可能であった。以上より、分析にはZIC^R-pHILICを使用した。

(2) 移動相

移動相は、A液にギ酸アンモニウム水溶液、B液にアセトニトリルを用いて検討した。ギ酸アンモニウムの濃度と水溶液のギ酸濃度 (pH調整) を複数検討し、A液: 0.45%ギ酸60mMギ酸アンモニウム水溶液の条件で、良好なピーク形状となった。さらに、グラジエント条件を検討し、確立した条件を表1に示した。この条件により、9種のアミン類の良好なピークが得られた (図2)。

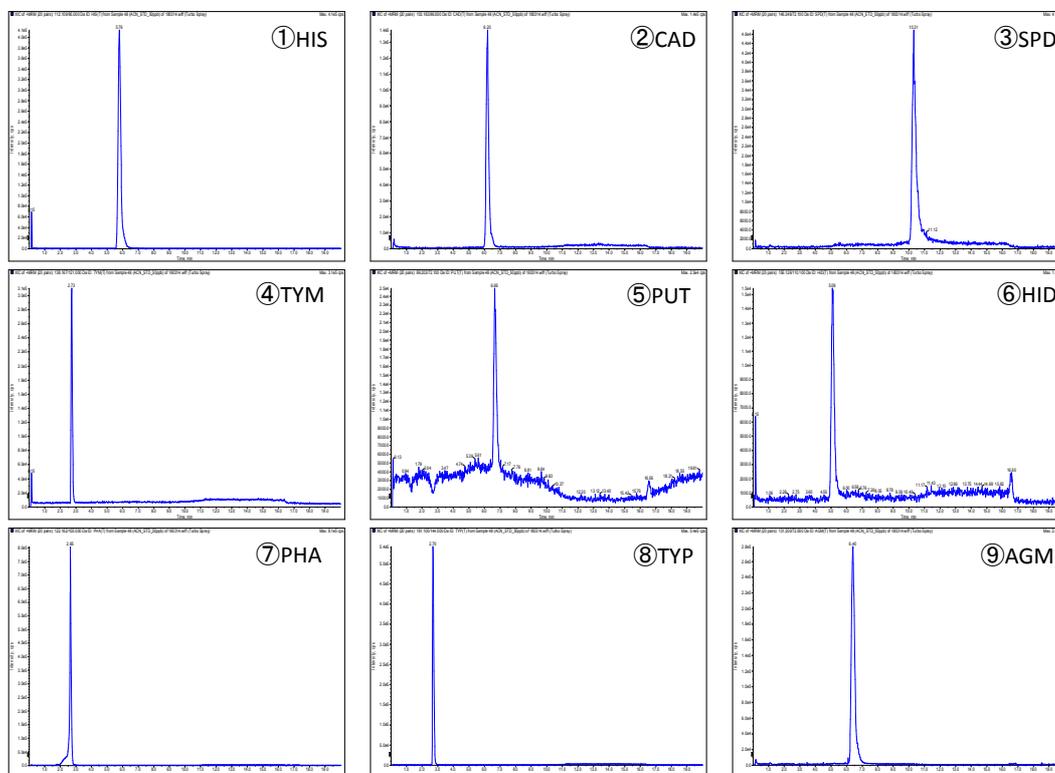


図2 各不揮発性アミン類のLC/MS/MS クロマトグラム (50ng/mLの標準液)

2. 2. 2 検量線の直線性

SPDは50～500ng/mL, PUTは5～100ng/mLその他は2～100ng/mLの範囲(2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500)で相関係数0.995以上の良好な直線性が得られた。SPDについては、ベースラインからの分離が明確に確認できた50ng/mLを検量線最低濃度とした。PUTについては、2ng/mLでは明瞭に分離したピークが認められなかった。

SPDについては、さらに低濃度でピークが分離可能な条件を検討する必要がある。

2. 2. 3 定量限界

各アミン類の検量線の最低濃度において、S/N比を求めたところ、全てS/N \geq 10を満たしており、2.2.2で作成した検量線の範囲で定量が可能であることが確認できた。

2. 2. 4 食品中の不揮発性アミン含有量

2.1.1の県内で製造された加工食品を調査した結果を

表3に示す。魚介類加工品のうち、ウルメ丸干しからHISが73.5 μ g/g, CADが199.5 μ g/g検出され、ふりかけからTYPが高濃度で検出された。その他は、高濃度で検出されたものはなかった。

醤油については、濃口醤油ではTYP以外が検出され、淡口醤油では、HIS及びTYMが定量下限値以上で検出された。濃口醤油の方がアミン類の含有が高い傾向であった。漬物については、醤油漬けから複数のアミン類が定量下限値以上で検出され、酢漬けでは検出されなかった。漬物の種類でアミン類の検出に差が出たこと及び検出されたアミン類は濃口醤油からも同様に高濃度で検出されたことの2点から、醤油漬け中のアミン類の含有については、発酵、熟成段階での生成によるものではなく、原材料の醤油由来であることが推測される。

なお、HIDはHIS生成の前駆物質であり、HIS食中毒の原因物質ではないことから、定量は行っていない。

表3 市販の加工食品中の不揮発性アミン類含有量

No.	検体名	検体数	① HIS	② CAD	③ SPD	④ TYM	⑤ PUT	⑦ PHA	⑧ TYP	⑨ AGM
魚介類加工品	1 ウルメ丸干し	1	73.5	199.5	—	10.9	40.2	—	—	58.5
	2 サバ節	1	41.6	—	—	—	26.0	—	—	—
	3 塩辛(カツオ)	1	17.7	—	—	—	—	—	—	—
	4 ふりかけ(カツオ)	1	—	—	—	—	—	—	209.4	34.7
	5 その他	18	—	—	—	—	—	—	—	10～13.6
醤油	6 濃口醤油	5	<10～187.8	<10～11.7	<250～445.0	26.2～982.3	<25～67.4	<10～28.7	—	10～10.8
	7 淡口醤油	2	16.9, 18.2	—	—	10.9, 19.9	—	—	—	—
漬物	8 漬物(醤油漬け)	4	<2.5～3.1	—	—	<2.5～46.3	—	<2.5～5.0	—	—
	9 漬物(酢漬け)	2	—	—	—	—	—	—	—	—

※単位：No. 1～5, 8, 9： μ g/g

No. 6, 7： μ g/mL

※—：定量下限値未満

※定量下限値(μ g/g, μ g/mL)：漬物以外：③SPD \rightarrow 250, ⑤PUT \rightarrow 25, ③⑤以外 \rightarrow 10

漬物：③SPD \rightarrow 62.5, ⑤PUT \rightarrow 6.25, ③⑤以外 \rightarrow 2.5

【参考】HISの食品中安全域濃度(推定)：50 μ g/g以下²⁾

HIS中毒量(HIS総摂取量)：22～370mg⁷⁾

2. 2. 5 マトリックス効果の検証

2.2.4で含有量を求めた試料のうち、主にHISを検出しなかった食品及び代表的な食品を用いて、試験数n=1でマトリックス効果を検証した。分析対象アミン類を含有していた食品については、定量値から含有量を差し引いた値と添加濃度との比を算出することで、マトリックス効果とした。

図3に示すとおり、ほとんどの加工食品における分析対象アミン類でほぼ100%であったが、一部食品を除いてどの食品もマトリックス効果が同程度に影響しているように思われ、食品の加工、調味の違いよりも、アミンの種類に由来するものであることが推測された。

そこで、図3に示したマトリックス効果を箱ヒゲ図で

表し、アミン類間での分布を比較した(図4)。ふりかけについては、原材料が複数使用されており、他の魚介類加工品とマトリックス効果の挙動が異なったため、図4の比較からは除外した。その結果、魚介類加工品において、SPD, TYM, TYP以外は、マトリックス効果は、食品種によるばらつきは少なく、アミンの種類による違いが大きいことが分かった。醤油、漬物においては、アミンの種類による違いは明確ではなかったが、一定の傾向は見られた。SPD, TYM, TYPについては、魚介類加工品と醤油・漬物を比較するとマトリックス効果に正負の違いが見られたことから、食品由来の夾雑物質の違いがその要因となっていることが推測される。

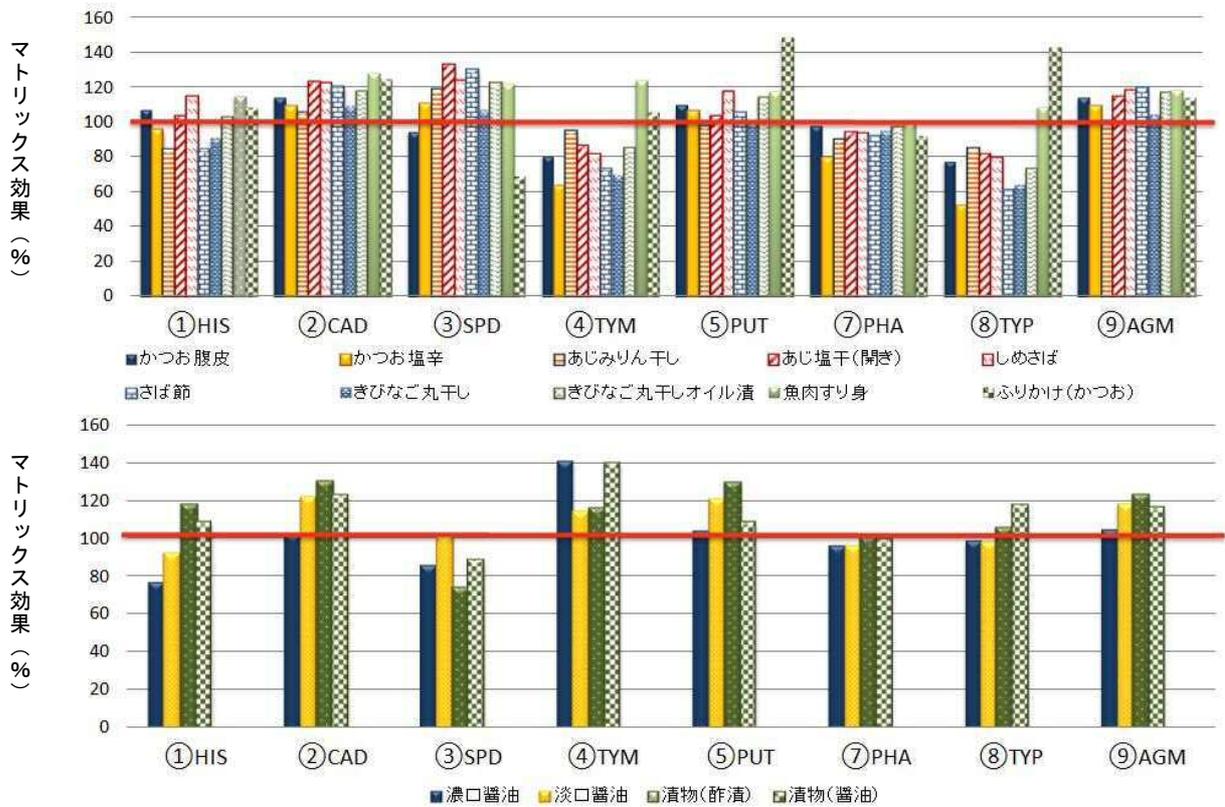


図3 マトリックス効果結果

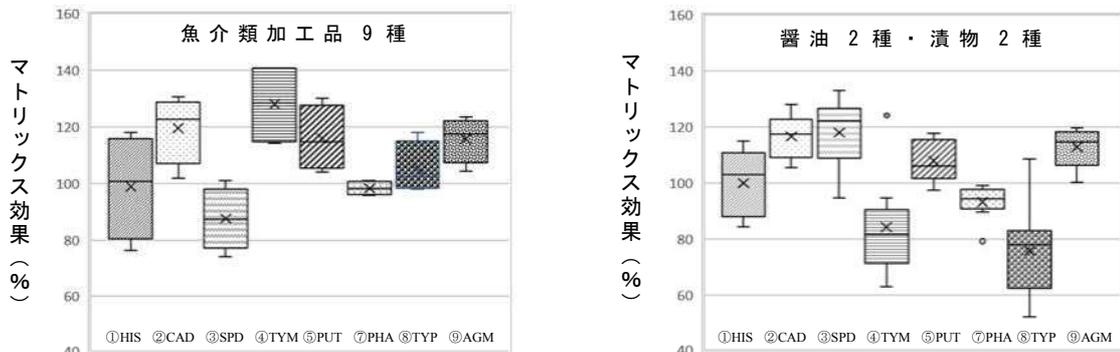


図4 マトリックス効果のアミン類間の比較

2. 2. 6 添加回収試験結果

2.2.5で用いた食品について、試験数n=1で添加回収試験を実施した結果を図5に示す。分析対象アミン類を含有していた食品については、定量値から含有量を差し引いた値と添加濃度との比より回収率を算出した。

魚介類加工品については、概ね回収率70~120%となったが、複数の食品で回収率の極端に高いもの、低いものが見受けられる結果となった。醤油、漬物については、SPDの回収率が低い結果となったが、他のアミン類では概ね回収率70~120%となった。

以上より、今回の抽出法及び分析条件は、全ての食品に対するアミン類の正確な定量法として十分ではなく、精製法や希釈倍率またはマトリックス標準及び内部標準の使用について更なる検討が必要であることが示唆された。しかしながら、一部項目を除き、国の示す健康危害発生時の迅速検出法における回収率の目標値⁹⁾である50~200%は満たしており、マトリックス効果や試験結果の取り扱いについて留意した上で、健康危害発生時には使用可能な分析条件と考える。

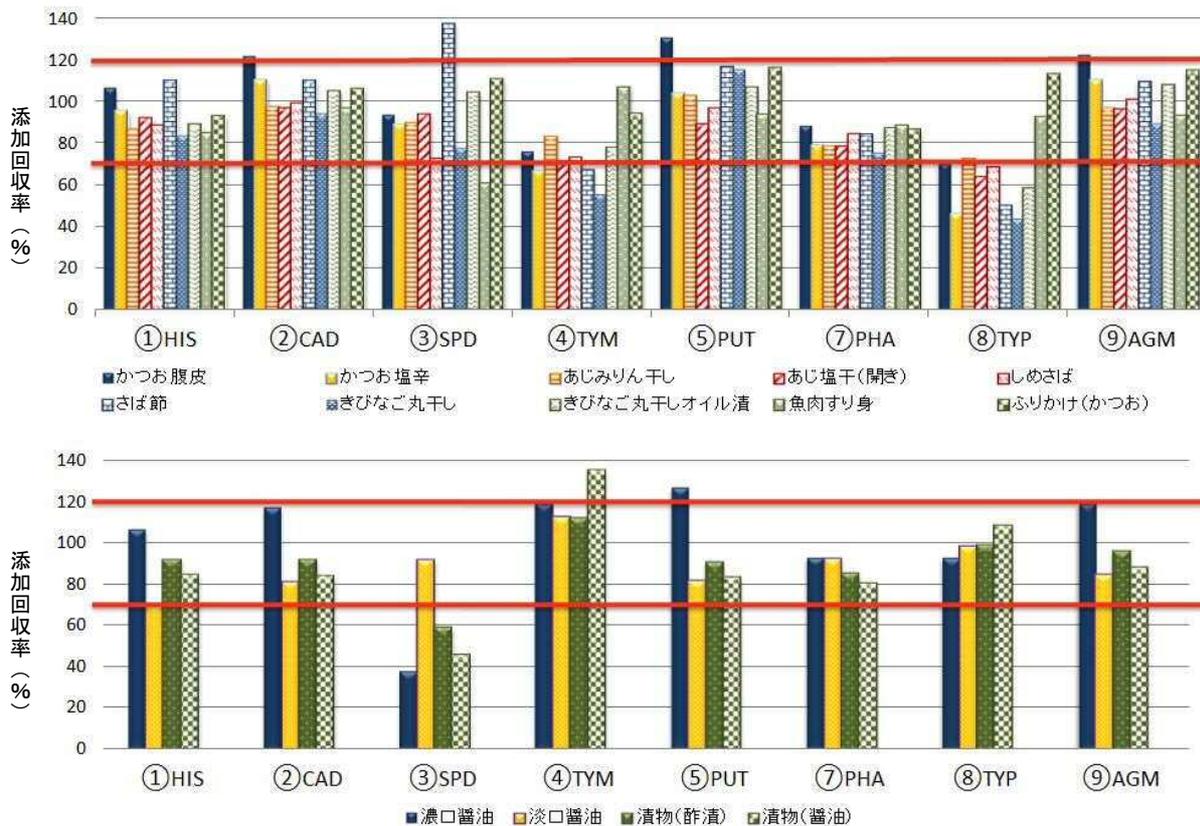


図5 添加回収試験結果

3 微生物検査

3. 1 方法

3. 1. 1 試料

2016, 2017年度に行政依頼検査で搬入された鮮魚（鹿児島湾で漁獲したもの5種（ブリ、ハマチ、ネイゴ、サヨリ、オオモンハタ））。

3. 1. 2 試薬

- ①BHI寒天, BHIブイヨン培地, 標準寒天培地, ドルセット卵培地：日水製薬工業製
- ②ふきふきチェック II, TCBS寒天培地, DHL寒天培地：栄研化学製

③Niven培地, HIDプロス

：C. F. NIVEN⁹⁾, 伊達ら¹⁰⁾の方法により調製

④API 20E：シスメックス・バイオメリュー製

⑤Ex Taq, Bacterial 16S rDNA PCR kit：タカラバイオ製

⑥シーケンス解析に用いた試薬

：アプライドバイオシステム製

⑦ヒスタミンチェッカー：キッコーマン製

3. 1. 3 装置

サーマルサイクラーは、Veriti 96well（アプライドバイオシステム製）、DNAシーケンサーは、3500Genetic Analyzer（アプライドバイオシステム製）を使用した。

3. 1. 4 試料からの検体採取

試料表面, えら内部をふきふきチェックⅡで拭き取り, リン酸緩衝液で希釈したものを魚体拭き取り検体とした。

3. 1. 5 HIS産生菌の増菌・分離

リン酸緩衝液で希釈した検体を, BHIブイオン培地で37°C, 24時間培養したものを標準寒天培地, DHL, TCBSに塗抹, 5°C及び37°Cで24時間培養した。その後, 定型的なコロニーを釣菌し, API 20Eで簡易同定を行った。

また, リン酸緩衝液で希釈した検体を, 2.5% NaClを添加したBHIブイオンで25°C, 24時間培養したものをHIDプロスに接種し, 25°C及び15°Cで24時間培養し, 増殖を認めたものについてさらにNiven培地に塗抹し, 25°C及び15°Cで24時間培養して, コロニーの周辺が紫色に呈色したものをHIS産生能有りとした。

3. 1. 6 HID脱炭酸酵素 (HDC) 遺伝子の確認

3.1.5でHIS産生能有りと判定した菌株について, HDC遺伝子の有無をPCRにより確認した。DNA鋳型の調製にはTakara Ex Taqを用い, プライマーとPCR反応条件は, Takahashiら¹¹⁾の報告を参照し, PCR産物の電気泳動結果から特異的バンドの有無を確認した。HDC遺伝子を持つとして多数の報告がある*Morganella morganii* を陽性対象(PC)とした。

3. 1. 7 HIS産生能確認

3.1.6でPCと同様のバンドが確認された菌種について, ヒスタミンチェッカーを用いてHIS産生能を調査した。キットの操作法を一部変更し, HIDプロスで15°C, 72時間培養した培養液を0.2µmメンブランフィルターでろ過し, 0.5mLを検液とした。その後の反応等は付属の手順書どおり行った。PCには同様に, *M. morganii* を用いた。

3. 1. 8 HIS産生菌の遺伝子同定

3.1.7でHIS産生能が認められた菌種について, Bacterial 16S rDNA Kitを用いて遺伝子同定を行った。熱抽出したDNAを鋳型とし, 付属の16S rDNAプライマーを用い, 16S rDNAをPCRで増幅させ, 増幅産物を確認後, 得られた増幅産物はシーケンス反応で塩基配列を決定し, DNAデータベース(DDBJ)のBLASTにより塩基配列との相同性の検索を行い, 菌種を決定した。

3. 2 結果及び考察

3. 2. 1 魚体拭き取り検体からの菌分離

魚体拭き取り検体を培養して得られた分離株をAPI 20Eで簡易同定したところ, 複数の菌種が同定できた。その中で, 一般的にHIS産生菌といわれる菌種は, *M. morganii*, *Photobacterium damsela*, *Enterobacter* sp. であった。

3. 2. 2 HID脱炭酸酵素 (HDC) 遺伝子の確認結果

Niven培地で紫色に呈色したコロニーについてHDC遺伝子を確認したところ, *P. damsela*, *Enterobacter* sp. からPCと同じ709 bp付近の特異的バンドを検出した。

3. 2. 3 HIS産生能調査結果

Niven培地で紫色に呈色したコロニーのうち, 複数の菌種について15°C培養でのHIS産生能を調査した。PCと比較し同等にHISを産生したのはオオモンハタから分離された*P. damsela*のみであった。

3. 2. 4 HIS産生菌の遺伝子同定

3.2.3でHISを産生した*P. damsela* について遺伝子同定を行ったところ, データベースに登録された*P. damsela* と100%の相同性が得られたため, *P. damsela* と同定した。

4 まとめ

- 1) 今回検討した9種の不揮発性アミン類迅速一斉分析法は, SPDの低濃度における定量及び食品の種類により定量の正確さに課題はあるものの, 健康危害発生時に迅速に原因物質を特定する必要がある場合においては, 十分使用可能である。ただし, SPDについては, さらに低濃度においてピークが分離可能となる条件を検討する。
- 2) 当該分析法を用いて県内で製造する魚介類加工品, 発酵食品を分析したところ, 高濃度HISを含有した食品はなかった。今後は, 対象とする食品の範囲を広げて含有量調査を実施していく。
- 3) 鮮魚から分離した細菌のうち, 15°Cの培養条件でHISを多量に産生する菌種は*M. morganii* 及び*P. damsela*のみであった。
- 4) 今回の調査では, 10°C以下の低温でも増殖し, HIS産生能を持つ*P. phosphoreum* を検出できなかったため, 今後は, *P. phosphoreum* の標準菌株を入手し, 低温下でのHIS産生とその抑制についての検討も行う。

参考文献

- 1) 井部明弘；発酵食品に含まれるアミン類，東京都健康安全研究センター研究年報，**55**，13～22 (2004)
- 2) 登田美桜，山本都，他；国内外におけるヒスタミン食中毒，国立医薬品食品衛生研究所報告，**127**，31～38(2009)
- 3) (公社)日本食品衛生協会；食品衛生検査指針理化学編2015，785～794
- 4) 瀧澤裕，千葉美子，高橋美保；LC/MS/MSを用いた不揮発性アミン類分析法の妥当性評価，宮城県保健環境センター年報，**33**，81～82 (2015)
- 5) 西名武士，飛野敏明，他；LC/MS/MSを用いた食品中不揮発性アミン類の迅速一斉分析法の検討，熊本県保健環境科学研究所報，**44**，38～47 (2014)
- 6) 佐藤陽子，太田康介，笠原義正；LC-MS/MSを用いた不揮発性アミン類の一斉分析法の検討，山形県衛生研究所報，**48**，13～16 (2015)
- 7) 井部明弘；アレルギー様食中毒，食中毒（食品安全セミナー1），中央法規出版，215～227 (2001)
- 8) 厚生労働省医薬食品局安全部基準審査課事務連絡；加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出方について，平成25年3月26日
- 9) Niven, C. F. , Jeffrey, M. B. , Corlett, D. A. ; Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Appl Environ. Microbiol.* , **41**, 321～322 (1981)
- 10) 伊達佳美，古川一郎，他；神奈川県衛生研究所研究報告，**38**，19～22 (2008)
- 11) Takahashi H. , Sato M. , Kimura B. , et al. , ; Evaluation of PCR－single-strand conformational polymorphism analysis for identification of gram-negative histamine-producing bacteria isolated from fish. *J. Food Prot.* , **70**, 1200～1205 (2007)