

## 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  
低温好塩性ヒスタミン産生菌の挙動についてExamination of Rapid Simultaneous Method of Nonvolatile Amines  
by LC-MS/MS and Behavior of Psychrophilic and Halophilic  
Histamine Producing Bacteria

茶屋真弓<sup>1</sup> 原田卓也 山下清佳  
前原香純 二石大介<sup>2</sup> 下島浩幸

## 1 はじめに

ヒスタミンを原因物質とする食中毒は、赤身魚に多く含まれるヒスチジンが微生物の働きによりヒスタミンに分解され、これを多く蓄積した食品を喫食した場合に顔面紅潮やじんましんなどのアレルギー様症状を呈するものである。ヒスタミンと他のアミン類との共存によりヒスタミン作用の増強が示唆されるという報告<sup>1)</sup>があり、他のアミン類の挙動の把握も重要であるとされている<sup>2)</sup>ことから、既報<sup>3)</sup>ではLC-MS/MSを用いた不揮発性アミン類一斉分析法について検討し報告を行った。

今回、抽出方法や測定条件について、再検討を行うとともに、改良した分析法を用いて魚介類加工品中の不揮発性アミン類の含有量調査を実施したので報告する。

また、一度食品に蓄積したヒスタミンは、加熱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、一般的に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されている。しかしながら、適切な温度管理がされていたにもかかわらずヒスタミンが生成した事例も報告されているため、低温性のヒスタミン産生菌*Photobacterium phosphoreum*を用いて菌の増殖やヒスタミン産生に関与する要因、さらには食品素材等を用いたヒスタミン産生の阻害効果を検証したので併せて報告する。

## 2 方法

## 2. 1 理化学検査法

## 2. 1. 1 試料

魚介類加工品33検体（市場流通品）

内訳：塩干物（22）、かつお生節（3）、にぼし（1）、味付け鮮魚（1）、そうざい（5）、サバ煮汁濃縮物（1）

## 2. 1. 2 対象項目及び標準品

既報で報告したヒスチジンを除く8種（①ヒスタミン（HIS）、②カダベリン（CAD）、③スペルミジン（SPD）、④チラミン（TYM）、⑤プトレシン（PUT）、⑥フェネチルアミン（PHA）、⑦トリプタミン（TYP）、⑧アグマチン（AGM））のアミン類標準品を用いた。

## 2. 1. 3 標準原液及び標準液の調製

標準品をそれぞれ秤量後、0.1mol/L塩酸に溶解し5000µg/mLの標準原液とし、これを0.1mol/L塩酸で500µg/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、移動相溶媒（A:B=60:40）で調製した。

## 2. 1. 4 試薬等

1mol/Lギ酸アンモニウム（HPLC用）、ギ酸（HPLC用）、塩酸（有害金属試験用）、トリクロロ酢酸（特級）（以下「TCA」とする。）は和光純薬工業(株)製、アセトニトリル（LC/MS用）は和光純薬工業(株)製または関東化学(株)製を用いた。LC/MS/MS測定用バイアルはPP製を用いた。

1 大隅地域振興局保健福祉環境部

2 退職（2020年3月）

## 2. 1. 5 装置

既報のとおり。

## 2. 1. 6 LC/MS/MS測定条件

既報の測定条件のうちグラジエント条件，流速及び注入量については，表1のとおり変更した。

表1 LC/MS/MSの測定条件 (LC部)

旧条件	
流速	: 0.2mL/min : 5 $\mu$ L
移動相	: A) 0.45%ギ酸60mmol/L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 (B%)	: 70% (0min) →70% (1min) →40% (4min) →40% (6min) →1% (7min) →1% (13min) →70% (13.1min) →70% (20min)
新条件	
流速	: 0.4mL/min : 10 $\mu$ L
移動相	: A) 0.2%ギ酸60mmol/L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 (B%)	: 40% (0min) →40% (0.5min) →5% (5min) →5% (9min) →40% (9.1min) →40% (15min)

## 2. 1. 7 試験溶液の調製

SPD以外のアミン類はpH6程度で良好な回収率を示すが，pH6程度ではSPDの回収率が不十分であることから，既報では精製水により抽出していた調製法（以下「旧法」という。）を，抽出液をpH1～2に調整する図1の方法（以下「改良法」という。）に変更した。

## 2. 1. 8 マトリックス効果の検証

事前に各アミン類が検出しないことを確認したサバの水煮缶詰，サバのみそ煮缶詰及びイワシ丸干しを用い，図1のフローに従い抽出し，3段階に希釈した試験溶液（1000，5000，10000倍希釈）を用いて各アミン類の標準溶液を100ng/mLとなるように調製したマトリックス混合標準液と，溶媒混合標準液の100ng/mLとのピーク面積の比を算出し，マトリックス効果を検証した。

## 2. 1. 9 妥当性評価のための実験計画

2.1.8と同じ試料に対し，各アミン類を試料中濃度100 $\mu$ g/gとなるように混合標準液を添加し，30分以上経過した後抽出操作を行った。分析者3名が1日2併行2日間操作を行い，真度，併行精度，室内精度及び選択性を評価した。

試料 1.0g

—20%TCA 2.5mL  
—精製水 25mL

ホモジナイズ 9000rpm, 1min

—精製水 10mLでシャフト洗浄  
遠心分離 (4℃, 3000rpm, 10min)

上清ろ過

精製水で50mLに定容

—適宜希釈 (移動相溶媒 (A:B=60:40))  
0.45 $\mu$ mメンブランフィルターろ過

試験溶液

LC/MS/MS分析

図1 試験フロー

## 2. 2 微生物学的検査法

## 2. 2. 1 試料

## (1) 魚肉

市販のサバ（マサバ又はゴマサバ）を3枚おろしにし，無菌的に10g又は50gに柵切りしたもの。

## (2) 菌株

独立行政法人製品評価技術基盤機構より分譲された *Photobacterium phosphoreum* (NBRC 104104)（以下「*P.phos*」という。）を使用した。

## (3) 阻害剤

## 1) 種類

- a 市販のチューブ入り調味料（ワサビ，ショウガ），市販の粉状調味スパイス（シナモン，クローブ，一味）及び市販の乾燥唐辛子（唐辛子）
- b ボンタン精油：県内の食品製造業者より提供されたもの。
- c 米酢：市販品
- d 過酢酸（パーサンMP2-J・食品添加物）：関東化学(株)製
- e 亜塩素酸水（ケア・フォー・食品添加物）：本部三慶(株)
- f 次亜塩素酸ナトリウム（食品添加物）：和光純薬工業(株)製

## 2) 阻害剤液の調製

各食材に(3)1)aが10%となるようにエタノール及び精製水をそれぞれ加え，30分間超音波抽出後に遠心分離（3000rpm，10分間）し，上清を使用した。

2. 2. 2 試薬及び装置

- ・エタノール (99.9%) : 和光純薬工業(株)製, 残留農薬試験用
- ・TSB (トリプトソイブイオン) 培地 : 栄研化学(株)製
- ・L-ヒスチジン : 和光純薬工業(株)製, 特級
- ・塩化ナトリウム : 和光純薬工業(株)製, 特級
- ・寒天 : 和光純薬工業(株)製, 特級
- ・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)製
- ・簡易濁度計 : 高電工業(株) MM-1000
- ・分光光度計 : 日本分光(株) V-560

2. 2. 3 検査方法

微生物学的検査におけるHIS量の測定は、チェックカラーヒスタミンにより行った。定量下限は、チェックカラーヒスタミンの説明書に定める10μg/g (培地中のHIS量の測定は10μg/mL) とした。

(1) *P.phos*によるHIS産生の挙動

TSBブイオン培地に塩化ナトリウムが3%、L-ヒスチジンが1%となるように添加した培地 (以下「TSB・HID培地」という) を用いて以下の試験を実施した。添加時の菌数は、簡易濁度計で0.5~0.7に調整し、同時にTSB・HID培地に寒天が1.5%となるように添加し、25°Cで24時間培養後、菌数測定を行い確認した。

1) 菌の増殖とHIS産生に対する温度の影響

TSB・HID培地に*P.phos*を接種し、4, 10, 25, 30, 37°Cで24時間培養した後、分光光度計 (ABS660nm) で菌量の測定を実施した。菌量は $9.8 \times 10^4$ cfu/mLであった。併せて培養後の培地中のHIS量も測定した。

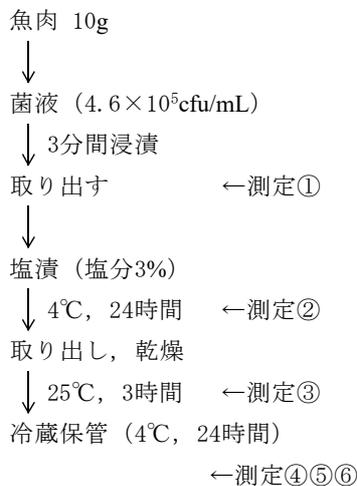


図2 塩干物製造工程モデル I

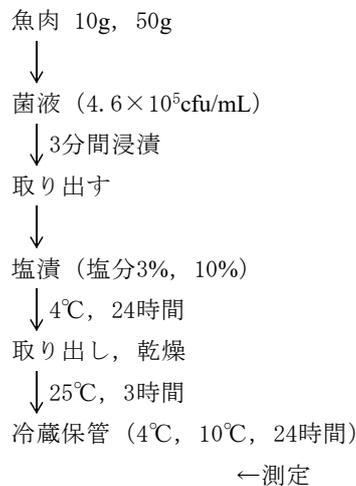


図3 塩干物製造工程モデル II

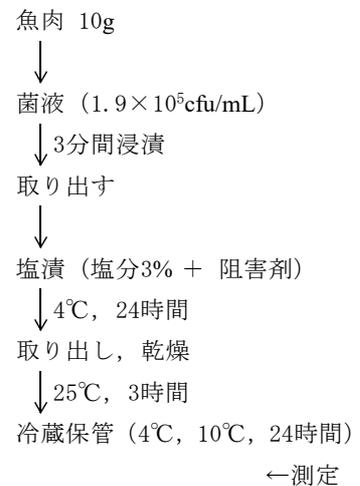


図4 塩干物製造工程モデル III

2) HIS産生に対する塩分濃度の影響

TSB・HID培地の塩分濃度を0.5, 2, 3, 10%とし*P.phos*を接種し、25°Cで24時間培養し、培地中のHIS量を測定した。菌量は $1.2 \times 10^6$ cfu/mLとした。

3) HIS産生に対する塩分濃度、温度及び時間の影響

塩分濃度を3%又は10%としたTSB・HID培地に $7.4 \times 10^5$ cfu/mLとなるように*P.phos*を接種し、4°Cまたは10°Cで2, 6, 15, 24, 48時間培養し、培地中のHIS量を測定した。

4) 魚肉中HIS産生の温度別、経時的変化の検証

魚肉10gに菌液を $9.8 \times 10^6$ cfu/gとなるように接種し、4°Cまたは10°Cで15, 24, 48, 72, 120時間培養し、魚肉中に産生されたHIS濃度を測定した。

(2) 塩干物製造工程における*P.phos*によるHIS産生の挙動の検証

塩干物製造工程を想定し、各製造段階におけるHIS産生の挙動を検証した。図2に示す製造工程をモデルとし、①菌液 (菌量： $4.6 \times 10^5$ cfu/mL) 浸漬後、②塩漬後、③乾燥後、冷蔵保管中 (④6時間、⑤12時間、⑥24時間) のHIS産生量を測定した。

(3) 塩干物製造工程におけるHIS産生への温度及び塩分濃度の影響

塩干物製造工程を想定し、図3に示す製造工程をモデルとし、魚肉 (10g, 50g) を $4.6 \times 10^5$ cfu/mLの菌液に浸漬後、製造工程におけるHIS産生の挙動を検証した。

(4) 各種食品等によるHIS産生阻害効果の検証

1) 試験管内での阻害効果

TSB・HID培地に2.2.1(3)1)の阻害剤を表2のとおり添加した。接種菌量は $5.4 \times 10^4 \sim 9.2 \times 10^5$ cfu/mLであった。

2) 魚肉中での阻害効果

塩干物製造工程を想定し、魚肉10gを $1.9 \times 10^5$ cfu/mLの菌液に浸漬後、塩漬工程で阻害剤を添加しHIS産生への影響を検証した。各工程を図4に示すとおり設定し、(4)1)で阻害効果が高かった阻害剤を表3のとおり用いた。濃度は、食品添加物の使用基準等を参考に設定した。

(5) 凍結によるHIS含有量の変動確認

(3)でHISを産生させた魚肉を-30℃で9週間保管し、凍結後と、凍結前のHIS量と比較した。

表2 阻害剤の種類と試験管中濃度

阻害剤種類	試験管中濃度 (%)
a 各種 水抽出	0.1
各種 エタノール抽出	0.1
b ボンタン精油	1, 0.5
c 米酢	0.1
d 過酢酸 20倍希釈液	0.2, 0.02
e 亜塩素酸水	0.2, 0.02
f 次亜塩素酸ナトリウム 24倍希釈液	2, 0.4, 0.2

表3 阻害剤の種類と塩漬溶液中濃度

阻害剤種類	塩漬溶液中濃度 (%)
a ワサビ 水抽出	1
b ボンタン精油	1
d 過酢酸	0.05
e 亜塩素酸水	0.2
f 次亜塩素酸ナトリウム 6倍希釈液	0.5

3 結果及び考察

3.1 理化学検査法の検討結果

3.1.1 測定条件の変更

既報のグラジエント条件では、ブランクを分析した際にSPDのQ1/Q3 (146.3>72.1)においてSPD検出時間のベースラインが上昇し、低濃度においてピークの分離ができなかった。そこで、西名ら<sup>4)</sup>の分析条件を参考に表1の新条件で分析したところ、図5のとおりベースラインが平坦になり、低濃度でのピーク分離が可能であった。

分析カラムは既報と同じZIC<sup>R</sup>-pHILIC (Merck社製)を用いた。HILICカラムは、ODSで保持できない極性分子の分離に適しており、有機溶媒濃度が高い初期条件で保持した極性分子を、水の比率を上げることで溶出させることができる。今回、70%アセトニトリルで平衡化した場合、目的の保持時間付近に分子の溶出が見られたベー

スラインが、40%アセトニトリルとすることにより改善した。高濃度の有機溶媒によるグラジエントでは、SPDの検出時間に何らかの分子が溶出していたと推察された。このことから、HILICカラムを用いたSPDの分析は、平衡化時の移動相中の水の比率が重要であることが分かった。

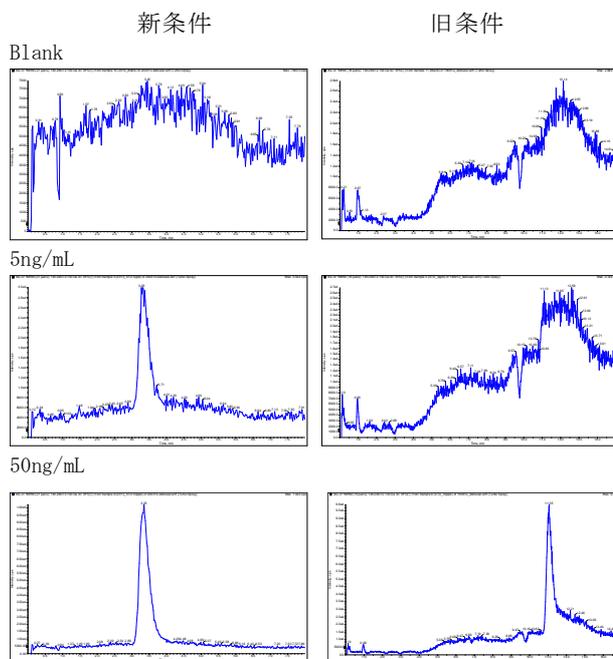


図5 SPDのクロマトグラム

3.1.2 試験溶液調製法の変更

旧法の試験溶液と20%TCAを添加した改良法の試験溶液のpHを測定したところ、それぞれpH5.90とpH1.38であり、改良法はpH1~2を満たしていた。

HISまたはCADが検出された検体を用いて旧法と改良法の検出値を比較したところ、いずれの検体でもHIS及びCADの定量値に大きな変化はなかった。SPDは定量値が増加し(表4)、定量可能となった。

表4 SPD検出値の比較 (単位: µg/g)

	旧法		改良法	
	HIS	SPD	HIS	SPD
Sample 1	35.3	ND	39.7	44.0
Sample 2	275.5	28.0	279.8	86.4
Sample 3	105.5	32.2	87.1	82.0
	CAD		SPD	
Sample 4	40.0	35.7	39.5	83.1
Sample 5	38.1	36.8	38.0	87.7

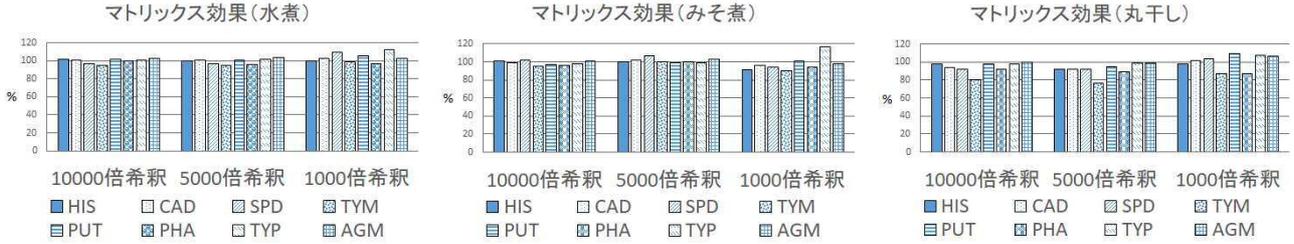


図6 マトリックス効果結果

3. 1. 3 検量線の直線性, 定量限界

検量線については、1~100ng/mLの範囲(1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200)で相関係数0.99以上の良好な直線性が得られた。各アミン類のS/N比を求めたところ、SPDでは2ng/mL、その他のアミン類は1ng/mLでS/N比 $\geq 10$ を満たしており、SPDでは2~100ng/mL、その他アミン類は1~100ng/mLで定量可能であることが確認できた。

3. 1. 4 マトリックス効果の検証

図6に示すとおり、1000倍希釈では全ての検体において面積比が100%を外れるアミン類が複数あり、これらはマトリックスの影響を受けていた。サバ水煮缶詰及びみそ煮缶詰については、5000倍希釈、10000倍希釈で面積比がほぼ100%となり、5000倍以上の希釈でマトリックスの影響を受けないことが考えられた。イワシ丸干しについては、5000倍希釈、10000倍希釈でTYMが面積比80%程度と負のマトリックス効果を受けていたが、その他のアミン類については面積比89~100%であり、TYM以外は5000倍以上の希釈で、マトリックスの影響は受けないと考えられた。従ってイワシ丸干しのTYMについては、5000倍希釈及び10000倍希釈の検出時には負のマトリックス効果を受けていることに注意する必要がある。

3. 1. 5 妥当性評価

3.1.4の結果から、抽出液を10000倍希釈した試料溶液について、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン<sup>5)</sup>」に従い実施した結果を表5に示す。目標値は真度を70~120%、併行精度及び室内精度を15%未満とした。

全ての項目について、ガイドラインの目標値を満たしており、選択性についても各アミン類のピーク検出付近に測定を妨害するピークはなかった。

なお、抽出液を5000倍希釈した試料溶液の妥当性評価を実施した結果、ガイドラインの目標値は満たしたものの10000倍希釈と比べて真度が100%を超過する傾向があった。

3. 2 市販加工食品中の不揮発性アミン類含有量調査結果

2.1.1の県内産魚介類加工品の調査結果について、HIS食中毒を生じる可能性があると考えられる50 $\mu\text{g/g}$ <sup>2)</sup>以上を含有していた加工品及び高濃度のHISを含有することが報告<sup>6)</sup>されているイワシ丸干しは検体ごとの定量値を、その他加工品の定量値は一括して表6に示す。

表5 妥当性評価結果 (10000倍希釈)

	水煮			みそ煮			丸干し		
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
①HIS	99.5	2.7	4.8	101.7	2.9	5.1	99.8	2.4	5.8
②CAD	99.8	2.8	2.8	101.1	2.1	2.5	98.6	1.9	4.4
③SPD	104.3	8.0	10.7	104.5	6.8	11.0	119.7	7.2	10.1
④TYM	93.6	5.8	6.1	96.1	4.9	7.7	92.4	9.6	10.3
⑤PUT	110.9	6.9	7.6	106.4	4.3	5.2	105.3	3.1	5.4
⑥PHA	90.1	3.7	3.7	91.8	2.7	3.4	87.8	3.0	3.3
⑦TYP	96.5	2.5	3.8	99.2	0.9	2.7	89.8	2.9	4.9
⑧AGM	99.3	2.4	2.7	100.3	1.3	1.6	95.8	2.4	2.6

表6 含有量調査

(単位:  $\mu\text{g/g}$ )

	①HIS	②CAD	③SPD	④TYM	⑤PUT	⑥PHA	⑦TYP	⑧AGM
(丸干し)								
ウルメイワシ 1	ND	ND	32.8	ND	ND	ND	ND	ND
ウルメイワシ 2	279.8	383.2	86.4	51.6	ND	11.5	ND	73.9
ウルメイワシ 3	129.3	200.9	27.7	87.8	ND	ND	ND	89.9
ウルメイワシ 4	ND	ND	44.0	ND	ND	ND	ND	ND
カタクチイワシ 1	ND	28.7	83.1	ND	ND	ND	ND	13.0
カタクチイワシ 2	ND	27.9	87.7	ND	ND	ND	ND	ND
カタクチイワシ 3	87.1	1044.5	82.0	167.0	ND	16.1	ND	460.6
カタクチイワシ 4	ND	26.7	72.3	ND	ND	ND	ND	24.2
カタクチイワシ 5	ND	ND	66.3	ND	ND	ND	ND	17.8
マイワシ 1	ND	ND	30.1	ND	ND	ND	ND	ND
マイワシ 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
サバ煮汁濃縮	52.9	28.7	52.7	ND	ND	ND	ND	47.5
その他魚介類加工品(21)	ND~10.7	ND~23.5	ND~34.7	ND~25.9	ND	ND	ND	ND~17.8

※ND: 定量下限値 (SPD:20 $\mu\text{g/g}$ , その他アミン類:10 $\mu\text{g/g}$ ) 未満

ウルメイワシ4検体中2検体, カタクチイワシ5検体中1検体から50 $\mu\text{g/g}$ 以上のHISが検出された。ウルメイワシ2は乾燥度が高いため, 検体内のHISが濃縮され, 他よりも高値を示したと推測された。これは体長11cm程度で12匹入り約45gのものであった。この検体を約80g喫食すると, HISの中毒量(大人1人当たり22~320mg)といわれる<sup>7)</sup>22mgに達するが, 中毒量に達する量を一度に喫食する可能性は低いと考えられる。しかし, 軽度の症状は発症する可能性があり, 注意が必要である。

丸干しは加熱工程がなく, 生魚を塩漬後乾燥して塩干物とするため, 原料魚中にHIS産生菌が残存することがある。また最近では, 健康志向の高まりから塩分濃度の低い食品が好まれる傾向にあり, 製造工程中の塩析時の塩分濃度が低い場合, 乾燥工程における管理方法次第でHISが蓄積することが十分にあり得る。今回の調査では, 丸干しの魚種別のHIS含有量についても比較したが, 同じ魚種でも差があることから, 魚種とHIS産生量との関連性はないと考えられた。しかし, 魚種の違いによるHIS含有量を把握するには今回の検体数では不十分であるため, 同じ製造業者の異なる魚種の丸干しについて, 製造工程の違いも含めた比較を行うなど, さらに調査が必要である。

### 3. 3 微生物学的検査法の検討結果

#### 3. 3. 1 *P.phos*によるHIS産生の挙動

##### (1) 菌数測定のための吸光度測定範囲の検討

菌数測定には濁度OD660nm等が用いられるが, 今回は, 現在保有する分光光度計により菌数測定を試み,

ABS660nmで濃度依存的に直線性が保てる, 散乱の影響を受けない範囲を検討した。

TSB・HID培地に*P.phos*を $9.5 \times 10^5 \text{cfu/mL}$ 接種し, 25 $^{\circ}\text{C}$ で24時間培養した菌液を適宜希釈して吸光度を測定した。図7に示すとおり吸光度測定値1.0以下で $R=0.999$ の良好な関係が得られ, 吸光度により菌数測定を実施することが可能であった。測定値が1.0を超過する場合は, 適宜菌液を精製水で希釈して測定した。  
(2) 増殖に対する温度の影響(菌増殖及びHIS産生量(n=1))

図8に示すとおり, *P.phos*は25 $^{\circ}\text{C}$ で最も増殖し, HIS産生量も一番多かった。菌の増殖が37 $^{\circ}\text{C}$ 以外で確認され, 4 $^{\circ}\text{C}$ でもわずかに増殖した。また, 30 $^{\circ}\text{C}$ より10 $^{\circ}\text{C}$ が菌は増殖したが, 30 $^{\circ}\text{C}$ の方がHIS産生量が多かった。さらに, 37 $^{\circ}\text{C}$ では菌の増殖はなかったものの, HISは13.3 $\mu\text{g/mL}$ 産生した。これは, 菌の増殖至適温度とHISを産生するHID脱炭酸酵素の至適温度には, ずれがあることが報告<sup>8)</sup>されており, 接種した菌のHID脱炭酸酵素により至適温度下でHISが産生したためと推測される。

##### (3) HIS産生に対する塩分濃度の影響(n=1)

図9に示すとおり, 塩分濃度10%でHISの産生は定量下限値未満であった。塩分濃度2%及び3%では同等のHIS産生量であり, 0.5%でもHISを産生した。

##### (4) HIS産生に対する塩分濃度, 温度及び時間の影響(n=1)

図10に示すとおり, (3)の結果と同様, 塩分濃度10%ではHISは定量下限値未満であった。一方, 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存

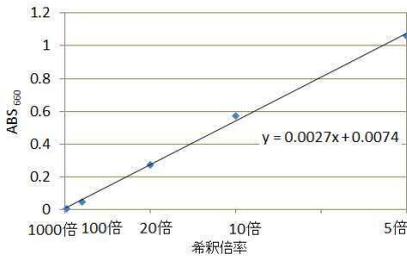


図7 菌濃度と吸光度の関係

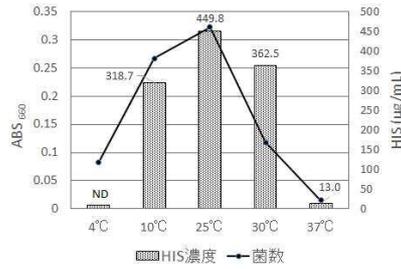


図8 菌数増殖及びHIS産生

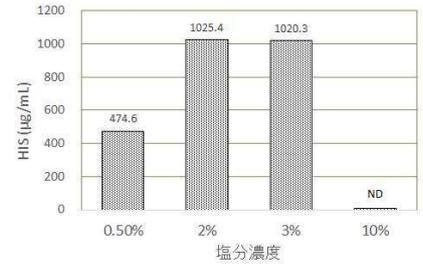


図9 HIS産生に対する塩分濃度の影響

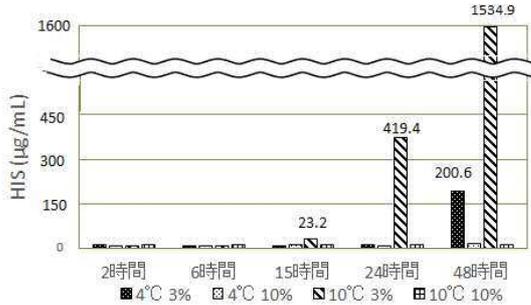


図10 HIS産生における温度及び塩分濃度の影響（経時的変化）

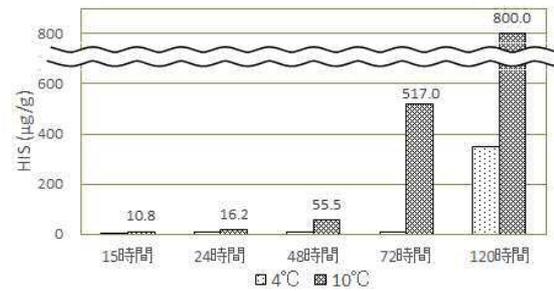


図11 魚肉中でのHIS産生の温度の影響（経時的変化）

下の塩分濃度3%では15時間でHISが産生され、24時間及び48時間では急激にHISが増産された。4°C保存下でも48時間後でHISが産生され、低温HIS産生菌で汚染されていた場合、リスクが高いことが分かった。

(5) 魚肉中HIS産生の温度別、経時的変化の検証 (n=1)

魚肉中でのHIS産生量の温度別経時的変化を図11に示す。時間の経過と共にHISが産生され、4°Cでも120時間の保管で顕著にHISが産生された。また、*P. phos*を接種しない陰性対照の魚肉は、HISが定量下限値未満であることを確認した。なお、以後の魚肉を用いた試験も同様に陰性対照はHISが定量下限値未満であることを確認した。

3. 3. 2 塩干物製造工程における *P. phos*によるHIS産生の挙動の検証 (n=1)

図2の塩干物製造工程モデルIの各工程における、HIS量を測定した結果、乾燥後の冷蔵保管段階でHIS産生が増加していた(図12)。3.3.1(5)の結果同様、低温HIS産生菌で汚染されている場合、低温で保管しても時間経過と共にHISが産生され、食中毒を引き起こす濃度まで蓄積する可能性があることが推測された。

3. 3. 3 塩干物製造工程におけるHIS産生への温度と塩分濃度の影響 (n=1)

魚肉10gまたは50gを用いて、図3の塩干物製造工程モ

デルIIに従い検証した結果、保管温度10°Cで塩分濃度3%の場合はHISが多量に産生され、塩分濃度10%の場合は保管温度に関係なくHIS産生を抑制していたものの完全には抑制することができなかった(図13)。また、4°Cにおいても塩分濃度10%の場合はHIS産生を一定程度抑制していた。

魚肉の大きさによる違いは、魚肉10gの方がHIS量が2倍程度であった。魚肉1g当たりのHIS量を測定しているため、HIS産生菌の魚肉との接触面積がHIS産生量に影響していることが示唆された。

3. 3. 4 各種食品等によるHIS産生阻害効果の検証

(1) 試験管内での阻害効果

*P. phos*を接種した陽性対照(PC)のHIS産生量を100%の産生率とし、各阻害剤存在下でのHIS産生率を図14に示す。顕著に阻害効果を示したのは、水、エタノール抽出共にワサビ、シナモン及びクローブであった。また、各種殺菌剤及び食品も濃度によってはHIS産生を阻害した。エタノールも、阻害効果を示したことから、エタノール抽出においては、エタノールによる阻害効果も加味されていることが示唆された。

(2) 魚肉中での阻害効果

試験管内培地中の試験において阻害効果があった阻害剤を、図4の塩干物製造工程モデルIIIの塩漬時に添加し、冷蔵保管後のHIS量を測定した(図15)。

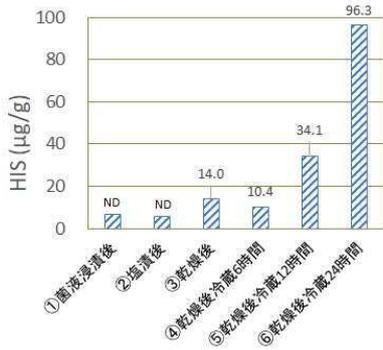


図12 塩干物製造工程段階の HIS 産生量

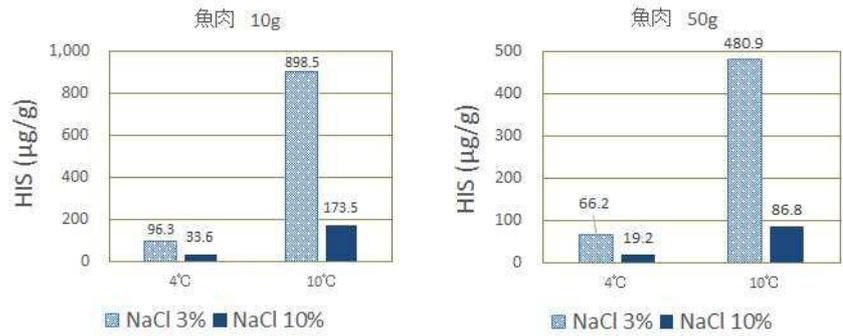


図13 塩干物製造工程における塩分濃度の影響 (魚肉10g, 50g)

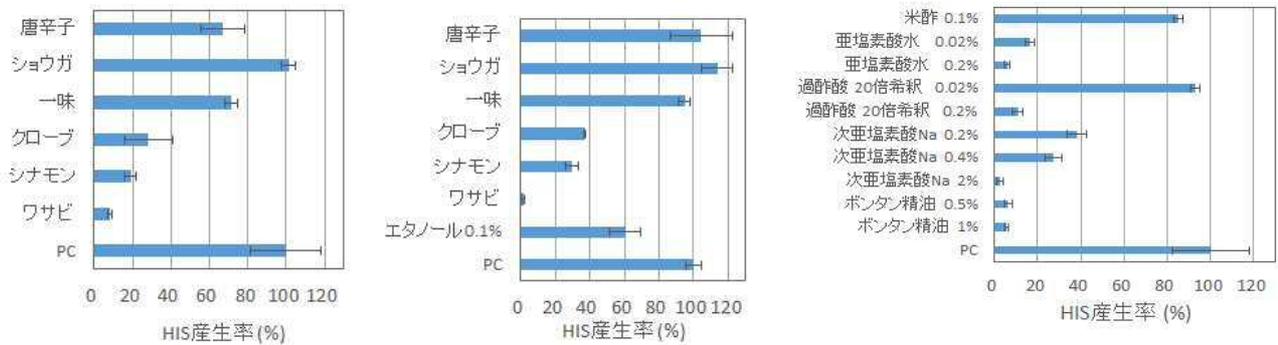


図14 各種阻害剤のHIS産生阻害効果 (試験管内 左: 水抽出, 中央: エタノール抽出, 右: 各種殺菌剤及び食品)

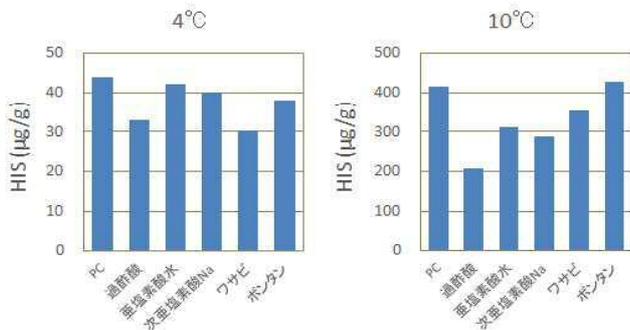


図15 各種阻害剤のHIS産生阻害効果 (魚肉中)

表7 凍結によるHIS含有量の変動 (単位: μg/g)

	凍結前	凍結後
Sample 1	96.3	84.1
Sample 2	898.5	887.0

いずれの阻害剤も、試験管では90%程度の阻害効果が見られたが、魚肉中において、4°Cでは陽性対照(PC)と同程度HISを産生し、10°Cでは200μg/g以上HISが産生され、抑制効果は確認できなかった。

### 3. 3. 5 凍結によるHIS含有量の変動

表7に示すとおり、HIS産生菌で汚染された魚肉でも9週間の凍結の間にHIS含有量が増加することはなかった。

## 4 まとめ

- 1) 不揮発性アミン類一斉分析の測定条件及び抽出条件の再検討を行い、サバの水煮缶詰、サバの味噌煮缶詰及びイワシ丸干しについて妥当性評価を行った結果、SPDは20μg/g、その他アミン類は10μg/gから定量可能であった。
- 2) 県内産魚介類加工品中のHIS濃度調査の結果、イワシ丸干し製品にHIS含有量の高い製品が複数存在した。
- 3) *P.phos*は4°Cという低温下でも塩分濃度3%の条件下で多量にHISを産生した。阻害剤としてワサビ等を添

加することで、試験管ではHIS産生を阻害できたが、塩干物製造工程におけるサバ魚肉ではいずれの阻害剤も効果がなかった。一方、塩分濃度10%にすることで一定の阻害効果がみられた。

- 4) 健康志向の高まりから干物製造工程における塩分濃度を3%程度にする傾向があるが、仮に*P.phos*に汚染されていた場合、この濃度では菌の増殖を抑制することはできないことが分かった。そのためHIS産出を抑制するには原料の魚を十分に洗浄すること、塩干物製造工程において製造後速やかに凍結することにより、*P.phos*を含むHIS産生菌の増殖及びHIS産生リスクを軽減できることが分かった。

### 参考文献

- 1) 井部明広；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) 茶屋真弓，穂積和佳，他；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，本誌，**19**，56～63（2018）
- 4) 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）
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知；食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（食安発1224第1号），平成22年12月24日
- 6) 農林水産省；有害化学物質含有実態調査結果データ集（平成23～24年度）
- 7) 藤井建夫；微生物性食中毒としてのアレルギー様食中毒，食品衛生学雑誌，**47**，J343～J348（2006）
- 8) 森井秀昭，和泉好彦，他；低温性発光細菌 *Photobacterium phosphoreum* のヒスタミン生成に及ぼす因子の影響，日本水産学会誌，**60**（6），773～777（1994）