

生食用鮮魚介類等におけるヒスタミン産生菌に関する調査

Study of histamine producing bacteria in fresh seafoods to eat raw

宮崎 麻由 平本 都香 山口 友美
有田 富和 加藤 浩之 那須 務
渡邊 節 沖村 容子 御代田 恭子

Mayu MIYAZAKI, Kunika HIRAMOTO, Yumi YAMAGUCHI
Tomikazu ARITA, Hiroyuki KATO, Tsutomu NASU
Setsu WATANABE, Yoko OKIMURA, Yasuko MIYOTA

宮城県内に流通する生食用鮮魚介類及びゆでだこ 78 検体について 25℃・48 時間培養の虐待試験を実施し、遺伝子検査によるヒスタミン産生菌の有無を調査したところ、22 検体が陽性となった。この陽性検体からは、*Morganella morganii* 他 12 菌種が分離同定された。また、MPN 法を用いてヒスタミン産生菌を定量的に測定したところ、<3.0～15/ml であった。さらに、PCR 陽性であった虐待試験検体からは高濃度のヒスタミンが検出され、ヒスタミン産生菌によるヒスタミンの産生が確認された。これらのことから、生食用鮮魚介類等であっても取扱状況によりヒスタミン産生の可能性があることが示唆された。

キーワード：ヒスタミン；ヒスタミン産生菌；鮮魚介類

Key words : Histamine ; Histamine producing bacteria ; Fresh seafoods

1 はじめに

ヒスタミンは、赤身魚に多く含まれるヒスチジンがヒスタミン産生菌のもつヒスタミン脱炭酸酵素によって生成され、しばしばアレルギー性食中毒の原因として問題となる。現在我が国において、食品中のヒスタミン量には規制はないが、ヒスタミン食中毒発症濃度はおよそ 100mg/100g 以上と言われている¹⁾²⁾。ヒスタミンによる食中毒は、全国で年間十数件程度発生しており³⁾、宮城県では平成 21 年に 2 件の発生があった⁴⁾。平成 17 年から 5 年間の全国と宮城県のヒスタミン食中毒発生件数を図 1 に示した。今回、県内に流通する生食用鮮魚介類及び生食用魚介類加工品についてヒスタミン産生菌の検出及びヒスタミン産生量の測定を実施し、若干の知見を得たので報告する。

2 対象及び検査方法

2.1 対象

平成 21 年 6 月から 9 月までに搬入された収去検査用検体で、赤身魚 42 件、白身魚 10 件、その他（ほたて・ほや・甘えび等）9 件及びゆでだこ 17 件の計 78 検体を調査対象とした。

2.1.1 試料液の調整

試料液 A: 検体 10g に PBS90ml を加えてストマッキングしたもの

試料液 B: 検体 10g を 25℃で 24 時間培養後、Histidine Broth90ml を加えてストマッキングし、さらに、25℃で 24 時間培養したもの（検体の虐待試験）

2.2 方法

2.2.1 一般細菌数測定

試料液 A を用いて、 10^2 から 10^4 まで 10 倍段階希釈した希釈液各 1ml を 1%食塩加標準寒天培地で混釈し、25℃で 48 時間培養して一般細菌数を求めた。

2.2.2 ヒスタミン産生菌 MPN

試料 A を用いて、 10^1 から 10^4 までの 10 倍段階希釈液 1 ml を Histidine Broth10ml 各 3 本にそれぞれ接種し、25℃で 24 時間培養した。発育を示したものについて PCR によりヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子の有無を確認しヒスタミン産生菌 MPN 値を求めた（ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子 PCR MPN）。

2.2.3 PCR によるヒスチジン脱炭酸酵素の検出

試料液 B を用いてヒスチジン脱炭酸酵素を標的遺伝子として、試料中のヒスタミン産生菌の有無を検査した。

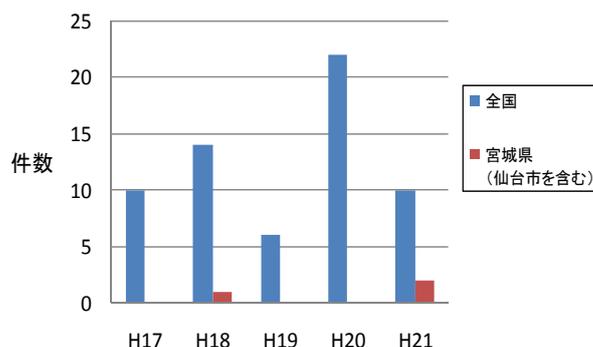


図 1 ヒスタミン食中毒事件

表1 一般細菌数

種類	検体数	細菌数(cfu/ml)				
		$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^6$
赤身魚	11	1	3	5	2	
白身魚	5		1	1	2	1
ゆでだこ	3				3	
ほたて・ほや ・甘えび	各1	1	1	1		
計	22	2	5	7	7	1

表2 ヒスタミン産生菌 MPN 値 (PCR)

種類	検体数	ヒスタミン産生菌MPN(/ml)				
		<3.0	3.6	6.2	7.4	15.0
赤身魚	11	7	2	1	1	
白身魚	5	2	1	1		1
ゆでだこ	3		3			
ほたて・ほや ・甘えび	各1	2	1			
計	22	11	7	2	1	1

2.2.4 ヒスタミン産生菌の分離及び同定

PCR 陽性であった検体について BTB 培地に塗抹し、25℃で 48 時間培養した。乳糖分解菌、非分解菌をそれぞれ 30 菌株ずつ釣菌し、分離菌株について再度 PCR によりヒスタミン脱炭酸酵素遺伝子を有する菌株を特定した。陽性菌株について、それぞれ 1%の食塩を加えた TSI 寒天、LIM 培地、SIM 培地、VP 半流動培地、尿素培地、シモンズのクエン酸塩培地に接種し、25℃で 48 時間培養して生化学性状を検査した。併せて、簡易同定キット (BBL クリスタル: 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いて菌種の同定を行った。

2.2.5 ヒスタミン量の測定

試料液 B について、ヒスタミン簡易測定キットであるチェックカラーHistamine (キッコーマン) を用いて、ヒスタミン産生量を測定した。

3 結果及び考察

3.1 一般細菌数測定及びヒスタミン産生菌 MPN

魚種別の PCR によるヒスタミン脱炭酸酵素遺伝子の検出状況を図 2 に示した。PCR 陽性となった検体 22 件の一般細菌数は、 $5.0 \times 10^2 \sim 3.9 \times 10^6$ cfu/ml の間で推移して、 10^2 オーダーが 2 件、 10^3 オーダーが 5 件、 10^4 オーダーが 7 件、 10^5 オーダーが 7 件、 10^6 オーダーが 1 件であった (表 1)。また、ヒスタミン産生菌 MPN は、<3.0/ml が 11 件 (50.0%)、3.6/ml が 7 件 (31.9%)、6.2/ml が 2 件 (9.1%)、7.4/ml が 1 件 (4.5%)、15/ml が 1 件 (4.5%) であった (表 2)。

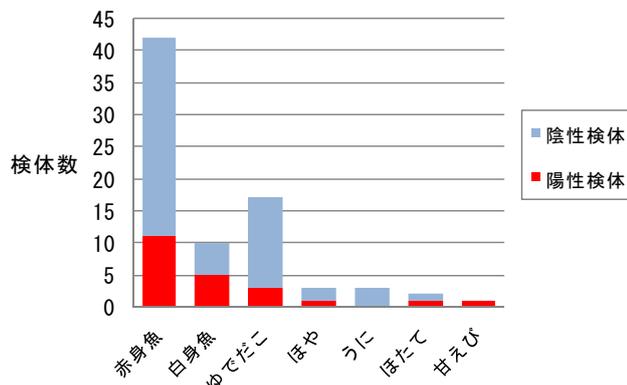


図2 魚種別ヒスタミン脱炭酸酵素遺伝子検出状況

3.2 PCRによるヒスタミン脱炭酸酵素の検出及びヒスタミン産生菌の分離・同定

虐待試験検体のうち、22 件が PCR 陽性となった。さらに、これら 22 件から 106 株のヒスタミン脱炭酸酵素陽性菌株を分離した (表 3)。陽性検体のうちわけは、赤身魚が 11 検体 (50.0%) 白身魚が 5 検体 (22.7%) その他の魚介類が 6 検体 (27.3%) であった。同定したヒスタミン産生菌は *Morganella morganii* 72 株、*Klebsiella oxytoca* 14 株、*Pantoea agglomerans* 5 株、*Providencia rettgeri* 4 株、*Proteus vulgaris* 2 株、*Enterobacter gergoviae* 2 株、*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia plymuthica*, *Ewingella americana*, *Flaviamonas oryzihabitans*, *Enterobacter cloacae*, *Kluyvera ascorbata*, *Bergeyella zoohelcum* 各 1 株ずつであった。

3.3 ヒスタミン産生量

虐待試験検体のうち、PCR 陽性であった 22 件のヒスタミン量は、194~5,003mg/L であった。また、そのほとんどが 3,000mg/L 前後であり、ヒスタミン含有量が多いとされている赤身魚に限らず白身魚、その他の魚介類からも高濃度に検出された (表 4)。

4 まとめ

今回、虐待試験を実施した 78 検体のうち、22 件 (28%) からヒスタミン脱炭酸酵素遺伝子が検出された。ヒスタミン含有量の多い赤身魚の他、白身魚、ゆでだこ、ほたて、ほや、甘えびからも検出され、魚種に関わらずヒスタミン産生菌の存在が確認された。また、これらから分離された 106 菌株のうち 72 株 (68.0%) はヒスタミン産生菌として最も代表的な *Morganella morganii* であった。分離菌はこの他、*Klebsiella*, *Providencia* や *Serratia* 等の腸内細菌科であった。多くが環境常在菌であることから、取扱いまたは流通過程で二次汚染があったことが考えられた。一般細菌数は $10^2 \sim 10^6$ cfu/ml と多かったのに対し、ヒスタミン産生菌量はヒスタミン脱炭酸酵素遺伝子 PCR の MPN 値で <3.0~15/ml と低く、全体に占めるヒスタミン産生菌の割合は非常に少なかった。しかし、PCR によりヒスタミン脱炭酸酵素陽性となった虐待試験検体からは、高濃度のヒスタミンが検出され

表 3 魚種によるヒスタミン産生菌分離状況

種類	ヒスチジン 脱炭酸酵素 陽性コロ ニ一数	<i>Morganella morganii</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Ewingella americana</i>	<i>Flavimonas oryzae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Bergeyella zoohelcum</i>
赤身魚	68	55	4	2		2	1	1			1	1		1
白身魚	23	12	1	3	4			1		1			1	
ゆでだこ	5	3	2											
ほたて・ほや 甘えび	10	2	7				1							
計	106	72	14	5	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1
割合(%)		68.0	13.3	4.8	3.8	1.9	1.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9

た。このことは、生食用魚介類に付着していたヒスタミン産生菌のヒスタミン産生能を裏付ける結果であると考えられる。鮮魚中のヒスタミン産生菌及びヒスタミン量は加工品に比べて少ないことが報告されているが⁵⁾⁶⁾、本調査でヒスタミン産生菌が被検体の28%から検出され、そのすべてからヒスタミンが検出されたことから、生食用鮮魚介類であっても水揚げから流通までの間にヒスタミン産生菌による汚染があれば、取り扱いの不備や作業温度、取り扱い時間などによって菌が増殖して、ヒスタミンが産生されることが示唆された。また、ヒスタミン産生菌量が少量であっても、菌の増殖に伴いヒスタミンが産生されることが推察された。

表 4 虐待試験検体のヒスタミン産生量
(チェックカラーHistamine法)

検体	魚種	ヒスタミン量(mg/L)
赤身魚	赤身魚 1	4,551
	赤身魚 2	3,960
	赤身魚 3	2,185
	赤身魚 4	3,900
	赤身魚 5	4,030
	赤身魚 6	4,581
	赤身魚 7	3,820
	赤身魚 8	2,887
	赤身魚 9	4,792
	赤身魚 10	3,409
	赤身魚 11	3,880
白身魚	白身魚 1	2,456
	白身魚 2	5,003
	白身魚 3	2,316
	白身魚 4	2,797
	白身魚 5	3,429
ゆでだこ	ゆでだこ 1	2,707
	ゆでだこ 2	2,657
	ゆでだこ 3	194
その他	ほや	852
	甘えび	2,857
	ほたて	3,639

ヒスタミンの制御は衛生的取扱いと温度管理が重要であり、一度産生されたヒスタミンは加熱によっても減少しないことから、一般消費者を含めた鮮魚介類の取扱いについての周知徹底が必要であると思われる。過去5年間において、全国的にも白身魚による食中毒事例はみられない。しかし、今回の調査で白身魚やその他の魚介類からもヒスタミン産生菌が検出されており、主としてヒスタミンによる食中毒の原因となる赤身魚だけではなく、白身魚やその他の魚介類においてもヒスタミン産生菌による汚染が認められたことから、その取扱いによっては二次汚染源となる可能性も考えられた。魚介類やその加工品の製造が盛んな宮城県においては、より厳重な衛生管理によるヒスタミンの制御が求められる。

今後さらなる調査を加え、ヒスタミンによる食中毒防止の一助としていきたい。

5 参考文献

- 1) 観公子, 牛山博文, 新藤哲也, 斉藤和夫: 東京衛研年報, **52**, 163-166 (2001)
- 2) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 2005, 180-181 (2005)
- 3) 平成 21 年食中毒発生状況: 厚生労働省食中毒統計
- 4) 宮城県環境生活部食と暮らしの安全推進課: 平成 21 年宮城県食中毒事件録, 20-21 (2010)
- 5) 観公子, 牛山博文, 新藤哲也, 斉藤和夫: 食衛誌, **46**, 127-132 (2005)
- 6) 新井輝義, 池内容子, 岸本泰子, 石崎直人, 柴田幹良, 観公子, 下井俊子, 牛山博文, 立田真弓, 白石典太, 甲斐明美, 矢野一好: 東京都健康安全研究センター研究年報, **58**, 別冊 (2007)