

氏 名(国籍)	Tao 陶	Zhi 志	hua 華
学 位 の 種 類	博 士 ( 農 学 )		
学 位 記 番 号	農 博 第 8 4 3 号		
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	農学研究科資源生物科学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	魚類におけるヒスタミンの生成・拡散機構の解明と HACCP 衛生管理への応用		
論文審査委員	(主 査)	教 授	佐 藤 實
	(副 査)	教 授	南 卓 志
		教 授	齋 藤 忠 夫

# 論文内容要旨

## 序論

魚肉にはさまざまな栄養成分や健康機能性成分が多く含まれるが、鮮度低下や腐敗が早い欠点もある。また、魚肉およびその加工品を摂取した後、アレルギー様の食中毒にかかることがよく知られている。その原因は、赤身魚に大量に含まれる遊離アミノ酸の一種であるヒスチジンが *Morganella morganii* や *Photobacterium phosphoreum* などの微生物の持つヒスチジンデカルボキシラーゼ(HDC)により脱炭酸され、ヒスタミンが生成されるためと考えられている(図1)。サバ科魚肉のヒスタミン食中毒は、米国、ヨーロッパ(EU)、日本および他の国において、水産食品と関連する一般的な食中毒であり、最も注意を要する化学的有害因子と考えられている。近年でみると2002年から2004年までの3年間に、日本全国で水産食品のヒスタミン中毒が24例発生し、患者数も535人に達するなど、化学物質に由来する食中毒においてヒスタミン食中毒は圧倒的に多くなっている。特に、日本では水産食品も多く、摂取する機会も多いため、ヒスタミン中毒に対する関心が高い。

米国FDAの報告によると、8,000人規模の魚のヒスタミン食中毒が引き起こされた場合、その治療に要するコストは2,708,755ドルに達すると予想し、その防止のためHACCP(危害分析重要管理)衛生管理システムの導入を指導している。FDAは、健康を及ぼすヒスタミン量を500ppmをとし、魚およびその加工品に含まれるヒスタミン量について50ppmの規制値を設けている。また、EUではサンプルのヒスタミン含有量の平均値は100ppmを超えないことを義務づけている。魚肉によるヒスタミンの食中毒を防ぐために、原料の漁獲後の取り扱い、水産食品の加工過程、輸出入を含む流通過程において、FDAやEUのガイドラインに基づく、ヒスタミン含有量の規制が厳しく実行される必要がある。

以上の事実により、水産食品加工現場でHACCP衛生管理システムに基づく、サンプリング方法ならびにヒスタミンをモニターする方法の確立が強く望まれるが、それには、魚肉におけるヒスタミンの生成、拡散のメカニズムを解明することが不可欠である。しかし、この点に関しては未だ不明な点が多い。

このような背景から本研究では、サバ科魚肉におけるヒスタミン生成、拡散機構およびその消長を明らかにすると共に、実用的な予防的安全管理方法を考案することによりHACCP衛生管理への応用を目的とした。

## 第1章 世界各国の魚介類およびその加工品のヒスタミン含有量の調査

日本を含む9ヶ国から魚介類およびその加工品を入手し、ヒスタミン含有量の調査を行った。日本、中国およびノルウェーの検体からはヒスタミンは検出されなかった。タイの11検体中4検体で56~1,964ppmの範囲で、また、フィリピンの13検体のうち8検体で19~1,530ppmの範囲でヒスタミンが検出された。カンボジアの淡水魚の干物3検体で25~148ppmの範囲でヒスタミンが検出された。南太平洋のフィジーの30検体中15検体で12~31ppm、ヨーロッパのドイツの12検体中2検体で68~184ppm、オランダの9検体中2検体で39~1,439ppmの範囲でヒスタミンが検出された(表1)。

以上の結果、ヒスタミン食中毒が起これと考えられる濃度1,000ppm以上が検出された検体はオランダの新鮮マグロ(1,439ppm)、タイの塩蔵品(1,964ppm)、フィリピンの鰹節(1,530ppm)であった。それらの魚およびその加工品100gを摂取した場合、ヒスタミ

ン食中毒を発症するリスクが非常に高いと考えられた。ドイツ 1 検体、オランダ 1 検体、タイ 3 検体、カンボジア 1 検体、フィリピン 5 検体から 100~1,000 ppm の範囲でヒスタミンを検出した。それらの魚肉およびその加工品を大量に摂取した場合、ヒスタミン食中毒を発症する可能性が高いと考えられた。

今回の調査では、一見して、新鮮なマグロ筋肉中にヒスタミンが大量に検出されたばかりでなく、塩蔵品や調味用の鰹節などの加工品からもヒスタミンが大量に検出された。また、海産魚のみならず、淡水魚の干物からもヒスタミンが検出された。これらのことは、ヒスタミンによる食中毒が世界的に多発する危険性を孕んでいることを示している。

## 第 2 章 魚肉におけるヒスタミン生成・拡散のメカニズム

ヒスタミンの生成、拡散のメカニズムを明らかにするため、*M. morganii* NBRC 3168 および *P. phosphoreum* NBRC 13896 を無菌状態のメバチ筋肉に感染させ、20℃および 25℃に保存しながら、経時的にサンプリング(図 2)を行い、ヒスタミンの消長を観察した。定量は、ろ紙電気泳動法により行った。*M. morganii* NBRC 3168 を接種したメバチ筋肉を 25℃で培養した時のヒスタミン生成・拡散を図 3 に示した。感染させた A1 の部分はヒスタミンが著しく生成され、48 時間でヒスタミン生成量が最も多くなり、4,000 ppm を超えた。内部の A2、A3 および遠隔地の B 点ではヒスタミンの生成速度は感染点 A1 と比較し緩やかに増加した。*P. phosphoreum* NBRC 13896 の場合は、感染させた A1 の部分では 48 時間でヒスタミンの生成量が最も多く、1,500 ppm を超えたが、A2 および A3 も A1 と同じ変化パターンを示した(図 4)。一方、B 点では A 点と比べて、ヒスタミンの生成速度が 36 時間以降緩慢に増えた。

*M. morganii* NBRC 3168 の場合は感染点周辺でのヒスタミンの生成が著しいのに対し、*P. phosphoreum* NBRC 13896 の場合はヒスタミンの蓄積が感染点周辺のみならず、広範囲にわたって認められた(図 5)。

## 第 3 章 魚種によるヒスタミン生成の差異

マサバとサンマ筋肉ではヒスタミンを生成する前駆物質としてのヒスチジン含有量はほぼ同程度であるが、生成されたヒスタミン量は大きく異なり、マサバで多かった(図 6)。また、4 種類のマグロ(メバチ、キハダ、ビンナガ、クロマグロ)筋肉に、*M. morganii* NBRC 3168 および *P. phosphoreum* NBRC 13896 を感染させ、25℃で 72 時間培養した。メバチ筋肉は他のマグロ筋肉よりヒスタミンの生成量が多く、クロマグロ筋肉では最も少なかった(図 7)。これらは、ヒスタミン生成量はヒスチジン含有量と必ずしも比例しないことを示している。メバチおよびクロマグロ筋肉を比較したところ、メバチ筋肉は pH 7 程度を呈すること、結合組織も緩いため、菌が侵入、増殖しやすいと考えられる一方、クロマグロは結合組織が緻密であるうえ、エキス中に HDC 活性阻害因子の存在が示唆された(図 8~図 10)。以上のように、魚種によりヒスタミン生成に対する感受性が異なることが明らかになった。

## 第 4 章 魚肉におけるヒスタミン生成に対する魚皮、塩分濃度の影響

無菌状態で培養したマサバ筋肉では微生物の増加およびヒスタミンの生成が認められなかった。一方、皮付きマサバ筋肉は微生物が著しく増殖し、ヒスチジンの減少に伴いヒスタミンが大量に生成された（図 11、図 12）。無菌状態のメバチ筋肉に海水を塗布するとヒスタミンが著しく蓄積され、海水中にヒスタミン生成菌の存在が示唆された（図 13）。また、ヒスタミン生成菌 *P. phosphoreum* NBRC 13896 を感染させたメバチ筋肉におけるヒスタミン生成に対する塩分濃度の影響を検討したところ、5% 塩水濃度でヒスタミン生成が強く促進されたが、10% 以上の塩水濃度は逆にヒスタミン生成を抑制した（図 14）。

## 第 5 章 海水から単離したヒスタミン生成菌の分析

前章で海水中にヒスタミン生成菌の存在が示唆されたため、本章では宮城県塩釜湾の海水中に含まれる細菌の周年変化を調べた（図 15）。水温の高い 9 月（25℃）に  $5 \times 10^4$  cfu/ml の一般生菌数が検出された。生菌数は、水温の低下とともに減少し、1 月には殆ど検出されなかった。一般生菌数は海水温度にほぼ比例して変動していることが示された。一方、ヒスタミン生成菌は海水温度に関係なく、水温が低い 2~4 月でも検出された。ヒスタミン生成菌は年間を通じて、魚肉を汚染する可能性があることを示唆している。海水から単離したヒスタミン生成菌のヒスタミン生成におよぼす温度の影響を調べた（図 16）。高温（25℃、30℃）でヒスタミンを活発に生成する菌が多い一方、5℃、15℃という低温でヒスタミンを生成する菌が海水中に存在した。このことは、低温保存下でヒスタミンの生成・拡散が生じる可能性を示しており、菌の汚染を防ぐことが重要であると考えられた。

海水からヒスタミン生成菌 10A-1 を単離し、ヒスタミン生成に及ぼす pH および塩分濃度の影響を分析した（表 2）。10A-1 菌は幅広い温度、pH 範囲で成長可能なうえ、海水に近い塩濃度（2~4%）でヒスタミン生成が著しかった。16S rDNA の分析より、10A-1 は *Klebsiella* 属に属し、既知のヒスタミン生成菌 *K. planticola* と同定された（図 17）。

## 第 6 章 ヒスタミン生成菌の簡易・迅速検出方法の開発

魚肉でのヒスタミン生成にヒスタミン生成菌が密接に関わることが確認されたことより、水産食品の予防的安全管理の上で、ヒスタミン生成菌の簡易・迅速検出法の開発が望まれる。そこで、海水の場合は直接、魚肉の場合は無菌生理食塩水でホモジナイズした上澄み液を 2 枚組のメンブレンフィルター（上に 10 μm、下に 0.2 μm のフィルターを重ねる）でろ過し、菌をトラップした 0.2 μm メンブレンフィルターを B.T.B 含有ヒスチジン寒天培地上で 35℃、5 時間培養する方法を開発した。ヒスチジンプイオン培地を用いた確認実験より、ヒスタミン生成菌は周囲が青色を呈するコロニーとして光学顕微鏡で検出することができた（図 18）。菌の存在および菌の発育は電子顕微鏡で確認した。本法は、2 層メンブレンフィルターろ過、選択培地培養、光学顕微鏡観察により、ヒスタミン生成菌を簡易にかつ迅速に測定できる。本法は、水産食品加工現場で予防的な HACCP 衛生管理に広く応用できると考えられた。

## 総合考察

本研究では世界 9 か国の魚類およびその加工品のヒスタミン含有量を調査した。一般市

民が購入する商品を市場より 160 検体入手し、その中で 3 か国 3 検体が 1,000 ppm を越え、5 か国 11 検体が 100 ppm を越えるなどヒスタミン食中毒を発症する恐れのある商品が容易に入手できる状況が認められた。また、100 ppm 以下の検体を含めると合計で 34 検体より検出しており、検出された 6 か国の検体の実に 40%以上からヒスタミンを検出していることになる。このことはヒスタミン食中毒が世界中に多発する危険性をもっていることを窺わせる。

また、ヒスタミン食中毒に関連する二種類のヒスタミン生成菌 *M. morganii* NBRC 3168 および *P. phosphoreum* NBRC 13896 を用い、魚肉におけるヒスタミン感染モデル試験を行った。ヒスタミン生成、拡散のメカニズムは種により異なることが示された。*M. morganii* NBRC 3168 の場合、感染点周辺でヒスタミンの生成が著しく、*P. phosphoreum* NBRC 13896 の場合、ヒスタミンの蓄積が感染点周辺のみならず、広範囲にわたって認められた。

さらに、ヒスタミンの生成速度は感染した魚種により異なり、その理由として魚肉の pH、筋肉組織の構造、筋肉エキス中の酵素影響因子などの内在要因が明らかになった。また、魚肉の保存温度、塩分濃度などの外部因子にもヒスタミン生成量は影響された。海水に近い塩濃度（2%～5%）ではヒスタミン生成は強く促進された。一般生菌数は海水温度にほぼ比例して変動していたが、ヒスタミン生成菌は 2～4 月の低海水温期にも確認されるなど、通年海水中に存在した。海水はヒスタミン生成を助長する因子と考えられ、低温 5℃でヒスタミンを生成する菌が海水中に存在したため、これら汚染菌が魚肉に付着しないよう注意が必要であり、洗浄用海水は滅菌する必要があると考えられた。この低温（5℃）でヒスタミンを活発に生成する菌を単離し、16S rDNA 解析から既知のヒスタミン生成菌 *Klebsiella planticola* と同定した。

ヒスタミン食中毒を防ぐには菌の感染を防ぐことが重要であるが、菌の感染を判断する実用的な方法がないため、新たにヒスタミン生成菌の簡易・迅速検出法を開発した。本法は 2 層メンブレンフィルターろ過、選択培地培養、光学顕微鏡観察により、約 5 時間で感染の有無を判断することが可能であり、食品衛生管理上、食中毒を予防する上で実用的で有効な方法と考えられた。本法は水産食品の加工現場で原材料からの HACCP の衛生管理のモニタリング方法として応用できると考えられる。また、本法はヒスタミン生成菌の簡易・迅速検出法としてだけでなく、培地を変えて、他の細菌（例えば、大腸菌など）を簡易・迅速に検出する方法として発展可能のものである。



図1. ヒスタミン生成反応

表1. 世界各国の魚介類およびその加工品のヒスタミン含有量の調査

国名	検体数	ヒスタミン 検出検体数	ヒスタミンの濃度範囲 (ppm)
日本	56	0	0
中国	21	0	0
ノルウェー	5	0	0
タイ	11	4	56～1964
カンボジア	3	3	25～148
フィリピン	13	8	19～1530
フィジー	30	15	12～31
ドイツ	12	2	68～184
オランダ	9	2	39～1439

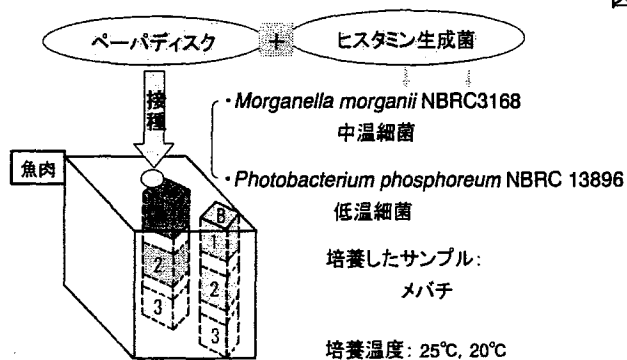


図2. メバチ筋肉におけるヒスタミン生成・  
拡散メカニズムのモデル実験

(ペーパーディスク (6mm 直径) にヒスタミン  
生成菌をしみ込ませ、魚肉上 A に置く)

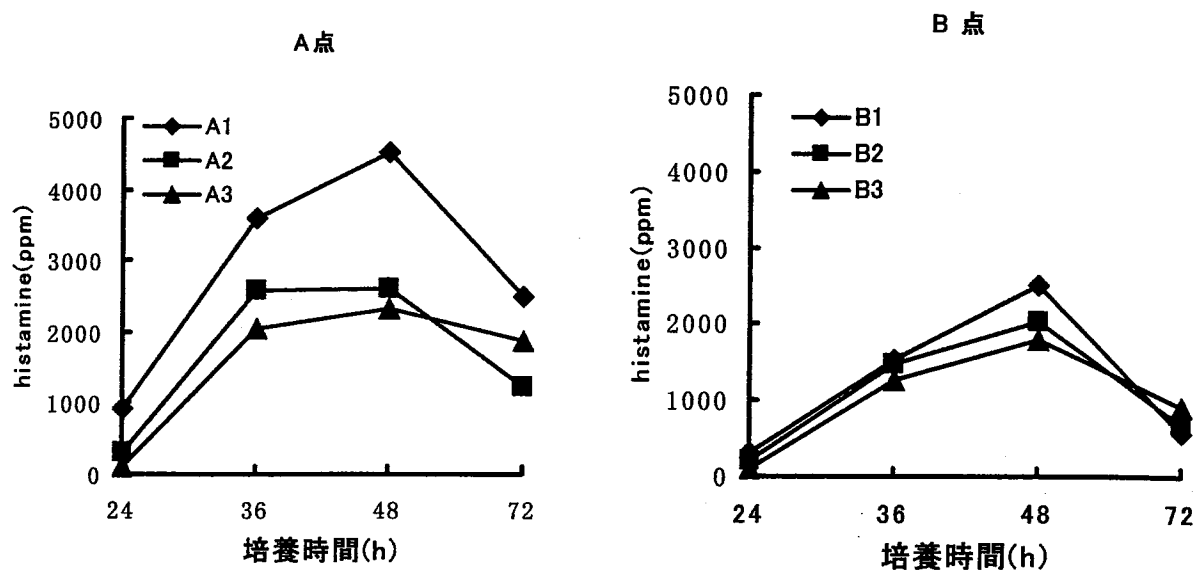


図 3. *M. morganii* NBRC 3168 を接種したメバチ筋肉におけるヒスタミンの生成 (25℃)  
(A1、A2、A3、B1、B2、B3 は図 2 を参照)

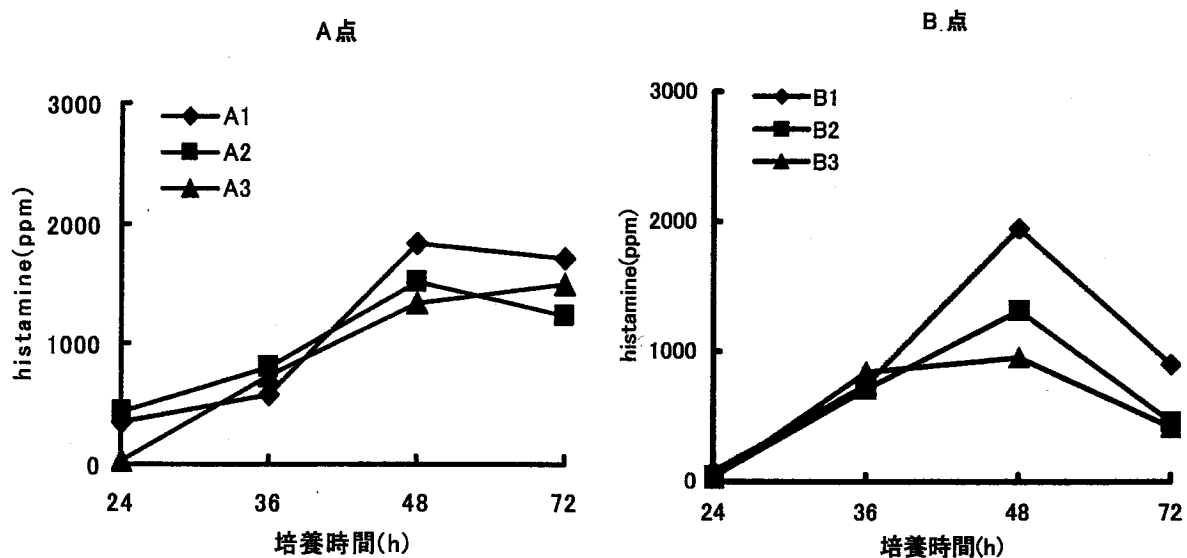


図 4. *P. phosphoreum* NBRC 13896 を接種したメバチ筋肉におけるヒスタミンの生成 (25℃)

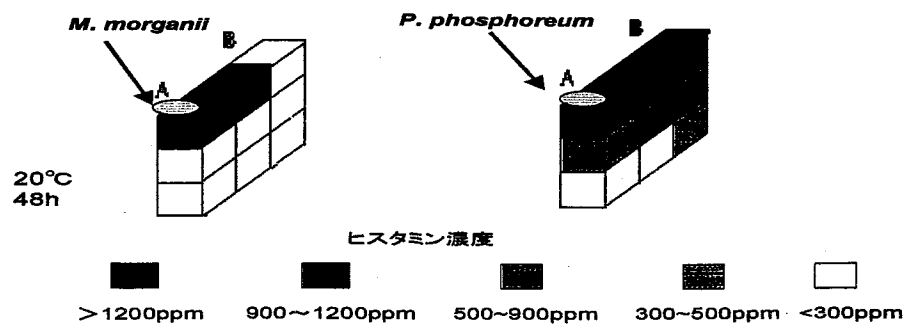


図 5. ヒスタミン蓄積・拡散の濃度図

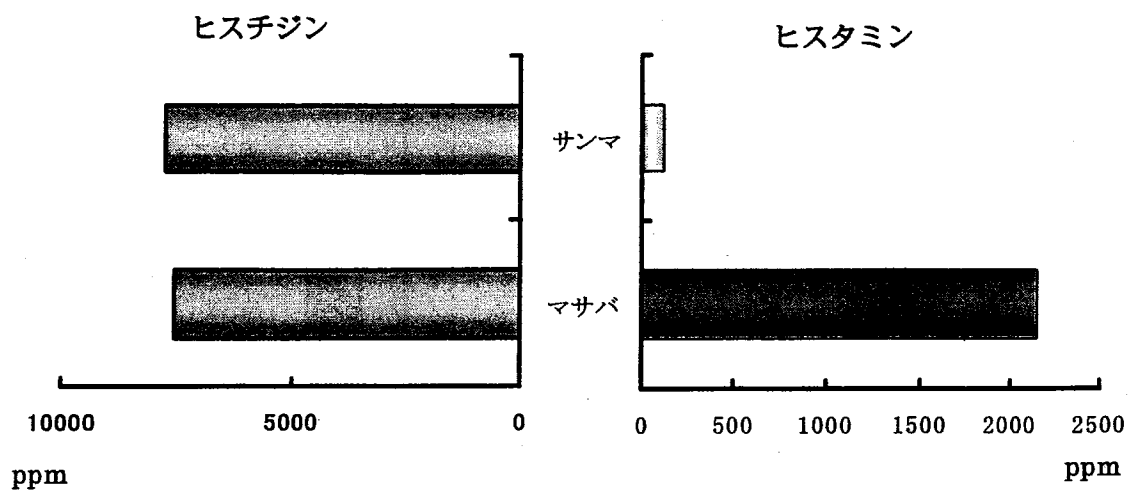


図 6. 皮付きマサバおよびサンマ筋肉におけるヒスチジン含有量およびヒスタミンの生成量(25℃、24h)

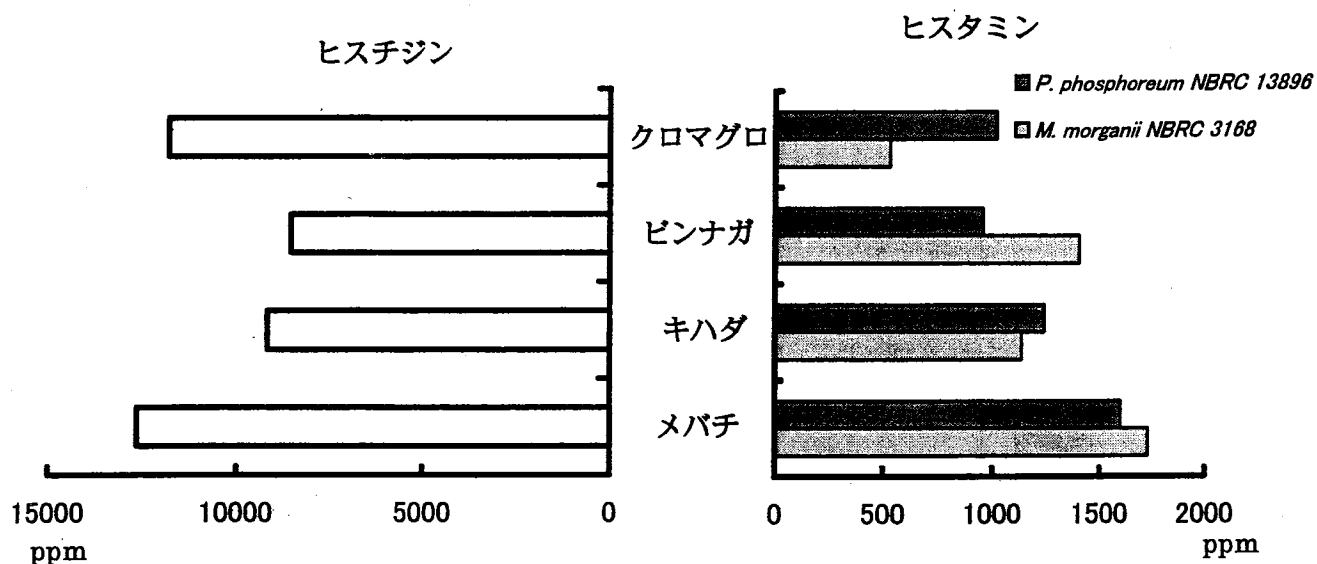


図 7. 4種マグロ類筋肉におけるヒスチジン含有量およびヒスタミンの生成(25℃、72h)

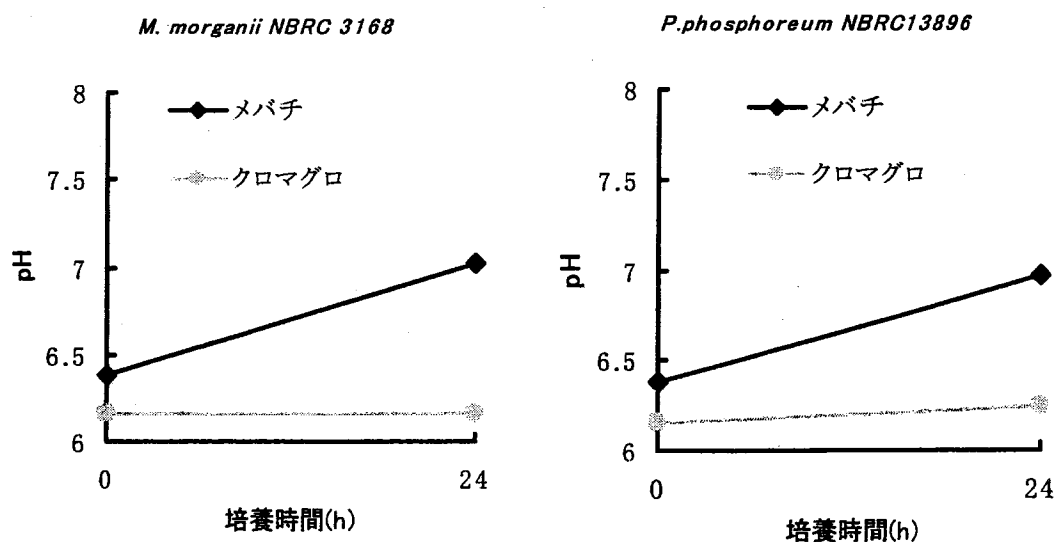


図 8. メバチおよびクロマグロ筋肉における pH の変化(25℃、24h)



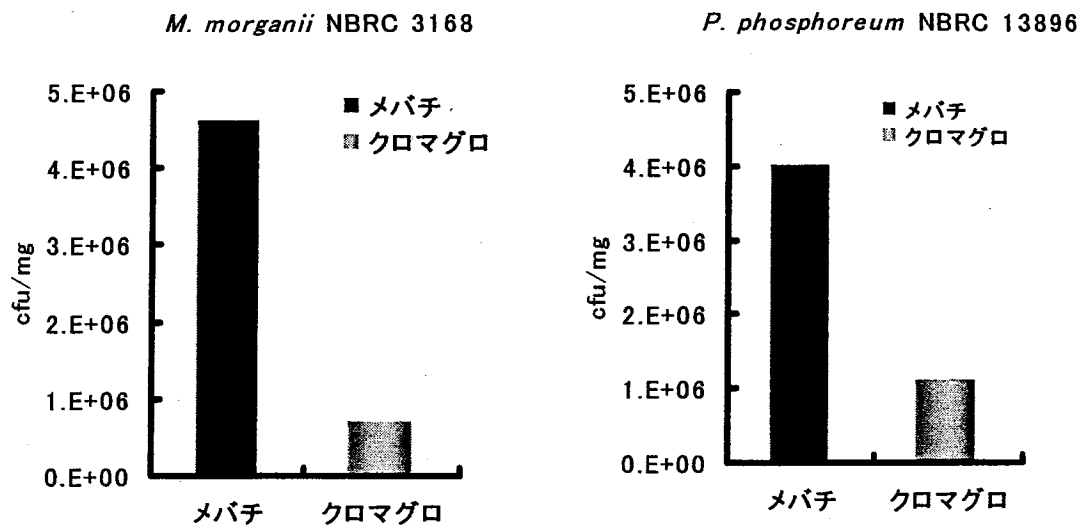


図9. メバチ及びクロマグロ筋肉における生菌数の変化(25℃、24h)

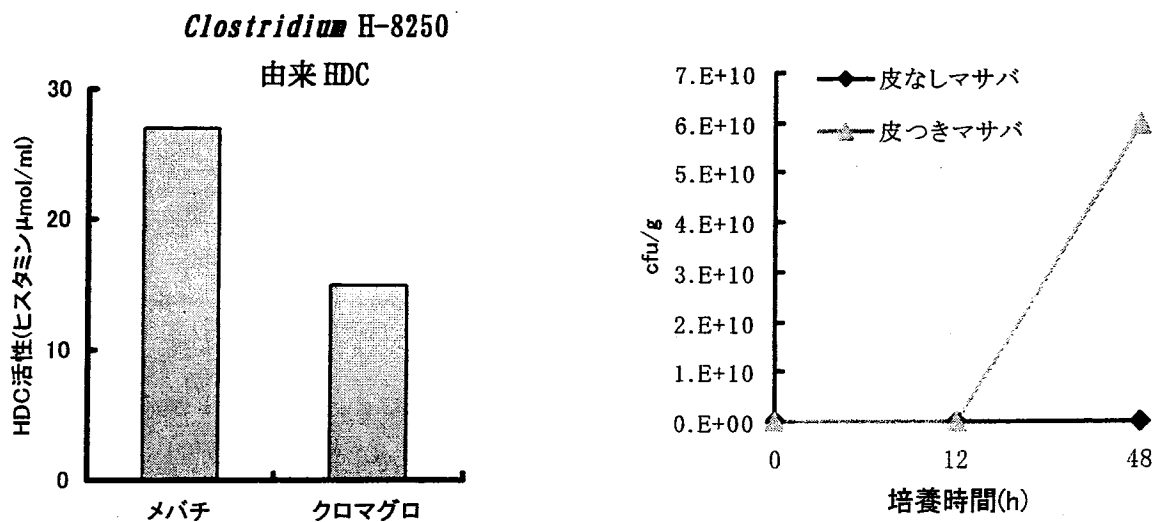


図10. HDC (Histidine decarboxylase) 活性へのメバチ及びクロマグロ筋肉エキスの影響

図11. 25℃で培養したマサバの微生物の変化

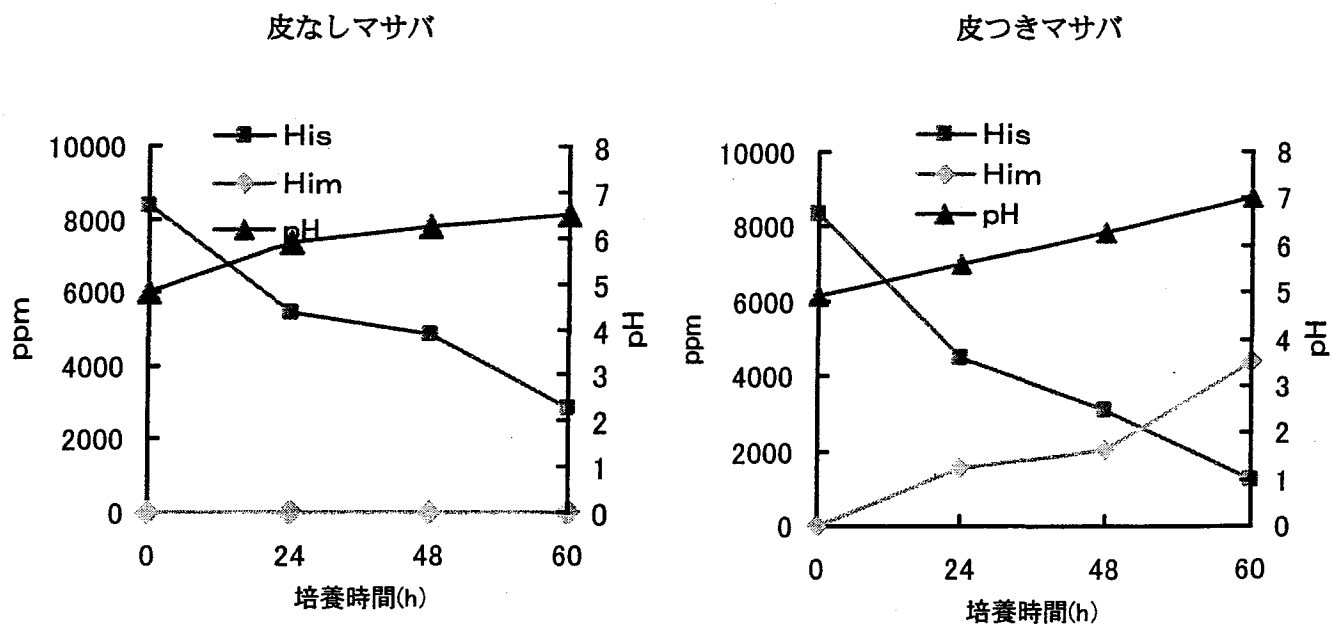


図 12. 25℃でマサバ筋肉のヒスチジン、ヒスタミン及び pH の変化

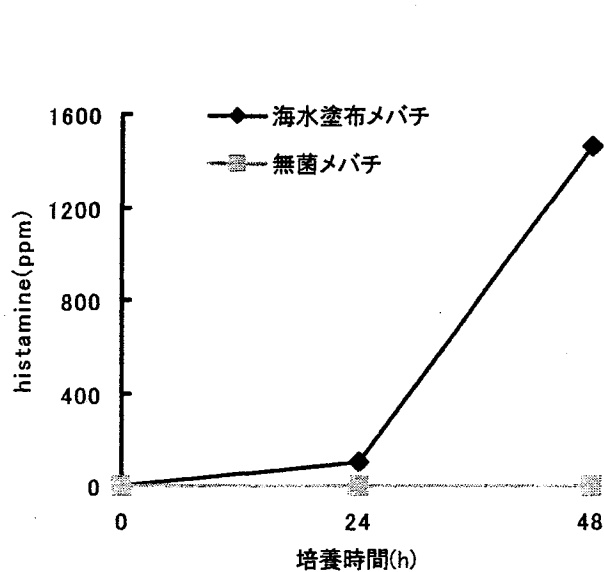


図 13. 海水塗布メバチ筋肉でのヒスタミン生成

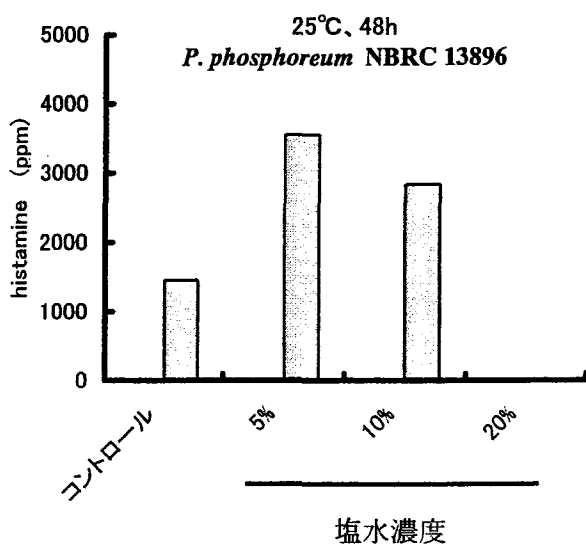
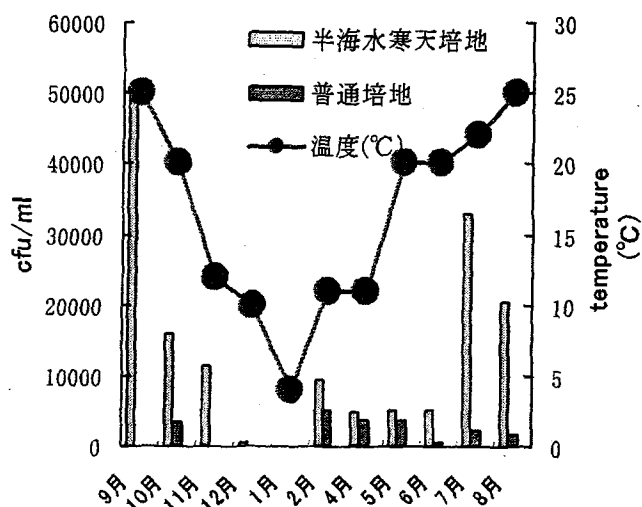


図 14. ヒスタミン生成に及ぼす塩水濃度の影響

# 一般生菌



# ヒスタミン生成菌

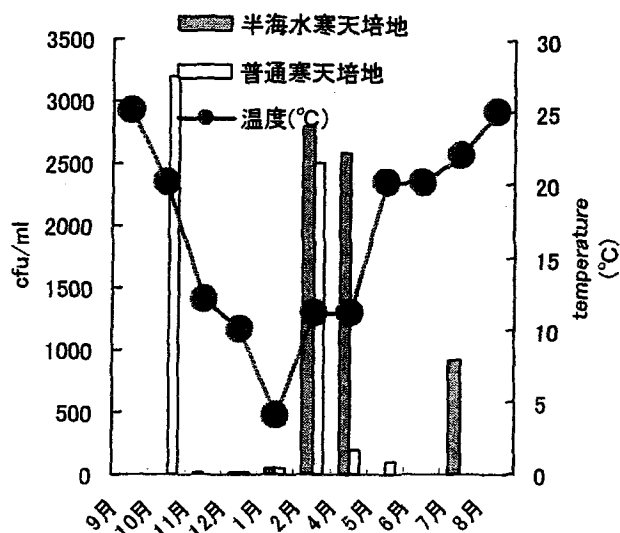


図 15. 塩釜湾海水微生物の周年変化 (2002.9~2003.8)

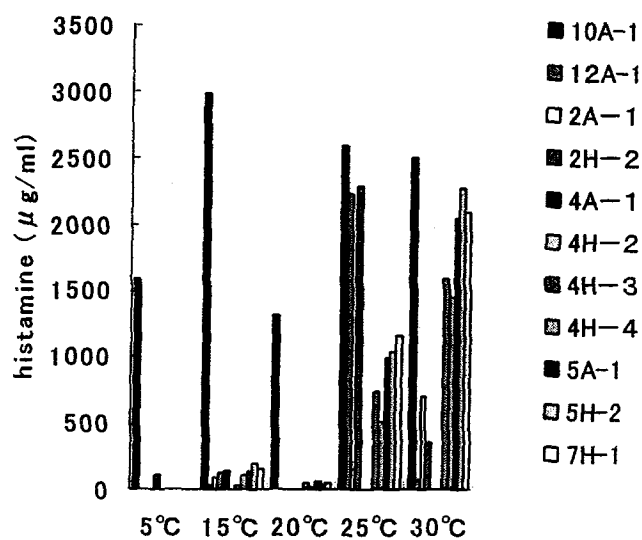


図 16. 塩釜湾海水から単離したヒスタミン生成菌の各温度帯でのヒスタミン生成量

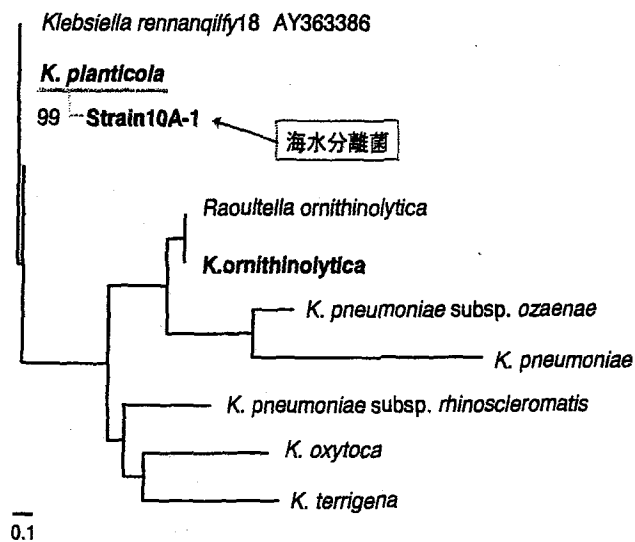


図 17. 16 S rDNA 分析によるヒスタミン生成菌の同定

表 2. 海水から単離したヒスタミン生成菌 10A-1 のヒスタミン生成に対する pH および塩分濃度の影響

10A-1

	Time (day)	Initial condition	NaCl concentration(%)		
			0	2	4
pH	1	5.6	6.1	6.5	6.1
		6.5	6.4	6.4	6.7
		7.6	6.6	6.7	6.5
		8.5	6.8	6.8	6.7
	3	5.6	6.5	6.6	6.6
		6.5	6.4	6.4	6.6
		7.6	6.8	6.6	6.6
		8.5	7	6.7	6.8
Histamine ( $\mu\text{g/ml}$ )	1	0	397	3964	497
		0	2130	6846	6104
		0	2857	2280	5788
		0	2928	1998	2884
	3	0	2026	2670	5343
		0	2174	2702	5371
		0	2162	2891	3392
		0	2114	4023	3265
Growth OD660	1	0	0.352	1.131	0.537
		0	0.987	1.253	0.983
		0	1.178	1.358	1.032
		0	1.652	1.029	0.924
	3	0	0.982	1.631	1.237
		0	1.563	1.553	1.252
		0	1.736	1.494	1.482
		0	1.727	1.094	1.524

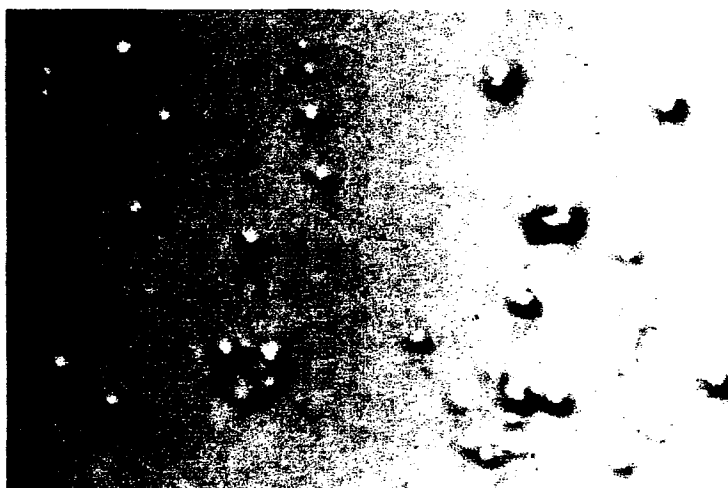


図 18. 35°C、5h 培養後光学顕微鏡によるヒスタミン生成菌の観察 (×100 )

## 論文審査結果要旨

魚肉は様々な栄養性および健康機能性成分を含んでいるが、畜肉に比べ鮮度低下が早い欠点がある。魚類、特にサバ科魚類において最も注意を要する化学的な食中毒危険因子はヒスタミンである。サバ、マグロなどの赤身魚にはヒスタミンの前駆物質であるヒスチジンが多く含まれており、これがヒスタミン生成菌が有するヒスチジンデカルボキシラーゼ (HDC) により脱炭酸されヒスタミンが生成する。ヒスタミンによる食中毒は、水産食品を摂食する機会の多い日本でも毎年発生しており非常に関心が高い。この食中毒防止のために、水産加工現場における HACCP 衛生管理システムに基づくサンプリング法ならびにヒスタミンモニター法の確立が望まれる。その確立には魚肉におけるヒスタミンの生成および拡散の機構に関する知見が必要とされるが、不明な点が多かった。

本研究はサバ科魚肉におけるヒスタミンの生成および拡散の機構とその消長を明らかにし、さらに実用的なヒスタミンに対する予防的安全管理方法を考案することで HACCP 衛生管理への応用について論じた。

第一章では、日本を含む世界 9 カ国から魚介類およびその加工品を入手し、ヒスタミンの含有量を調べた。その結果、日本、中国およびノルウェーの検体からヒスタミンは検出されなかったが、タイ、フィリピンおよびオランダなどの検体にはそれを高濃度含むものが存在することを明らかにした。特に、一見して新鮮なマグロ筋肉中や塩蔵品や淡水魚などにも高濃度のヒスタミンを検出したことで、本食中毒が世界的に多発する危険性のある事を示した。

第二章では、ヒスタミン食中毒に関与する二種のヒスタミン生成菌 *Morganella morganii* と *Photobacterium phosphoreum* を用い、感染筋肉におけるヒスタミンの生成および拡散のメカニズムが種により異なること、すなわち *M. morganii* では感染点付近でヒスタミンが蓄積し、一方 *P. phosphoreum* では感染点のみならず広範囲にそれが蓄積することを認めた。

第三章では、ヒスタミン生成菌によるヒスタミン生成の速度が感染する魚種によって異なることを明らかにし、その理由として魚肉の pH、筋肉組織の構造および筋肉エキスの HDC 影響因子の存在などを考えた。

第四章では、天然海水中にヒスタミン生成菌が存在することを示し、さらにヒスタミン生成菌によるヒスタミンの蓄積には、魚肉の保存温度や塩分濃度が影響することを明らかにした。

第五章では、塩釜湾海水中の一般生菌数が海水温度にほぼ比例し変動するのに比べ、ヒスタミン生成菌は 2～4 月の低海水温期にも検出され通年存在することを示した。そして海水はヒスタミン生成を助長する因子であることを認め、魚体洗浄用の海水は滅菌する必要があると推察した。さらに低温下で活発にヒスタミンを生成する菌を単離し、16S rRNA 解析により *Klebsiella planticola* と同定した。

第六章では、2 層メンブレン、選択培地および光学顕微鏡などを組み合わせ、ヒスタミン生成菌の簡易・迅速検出法を開発した。この方法により約 5 時間でヒスタミン生成菌感染の有無が判定できたことで、本法が食中毒を予防する上で実用的かつ有効な方法であると考えた。

以上のように本研究は、魚肉におけるヒスタミンの生成、拡散の機構および消長について新規知見を数多く含み、さらにヒスタミン生成菌の簡易・迅速検出法を開発し HACCP 衛生管理に応用する道を開いたことは、学術的および産業的な貢献度が大きく、審査員一同は本研究者に博士（農学）の学位を授与するに値するものと認定した。