報 文

精油成分、食品添加物、過酢酸および界面活性剤が
ヒスチジン脱炭酸酵素活性の阻害に及ぼす影響

(平成 23 年 3 月 31 日受理)

上井恵理 寺田 岳 秋山純基 一色賢司*

Inhibitory Effect of Essential Oils, Food Additives, Peracetic Acid
and Detergents on Bacterial of Histidine Decarboxylase

Eri KAMII, Gaku TERADA, Jyunki AKIYAMA and Kenji ISSHIKI*

Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University:
3-1-1 Minatocho, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan;

* Corresponding author

The aim of this study is to examine whether various essential oils, food additives, peracetic acid and detergents inhibit bacterial histidine decarboxylase. Crude extract of *Morganella morganii* NBRC3848 was prepared and incubated with various agents. Histidine decarboxylase activity was significantly inhibited ($p < 0.05$) by 26 of 45 compounds tested. Among the 26 agents, sodium hypochlorite completely decomposed both histidine and histamine, while peracetic acid caused slight decomposition. Histidine and histamine were stable in the presence of the other 24 agents. These results indicated that 25 of the agents examined were inhibitors of histidine decarboxylase.

(Received March 31, 2011)

Key words: ヒスタミン脱炭酸酵素 histamine decarboxylase; ヒスタミン histamine; 生体アミン biogenic amine; 精油成分 essential oil; 食品添加物 food additive; 界面活性剤 detergent

緒 言

ヒスタミンを多量に蓄積した食品を摂食するとアレルギー様食中毒が引き起こされる。日本国内でも、毎年 10 件近くの事例が報告されており、ヒスタミン食中毒は近年でも問題となっている食中毒の 1 つである¹⁾。ヒスタミンは、ヒスタミン産生菌が産生するヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の働きにより食品中のヒスチジンが脱炭酸し、食品に蓄積する。そのため HDC 活性を阻害する物質の添加が効果的なヒスタミン食中毒の予防方法の 1 つと考えられる。

ヒスタミン産生菌の HDC 活性の阻害物質を探索する試みは過去にも検討されており、香辛料であるクローブ、ナツメグ、シナモン、オールスパイス、セージのエタノール抽出液により HDC 活性が阻害され、これらの香辛料抽出物に含まれている成分のうち、シンナムアルデヒドが酵素活性を高く阻害していることが報告されている²⁾。また、クローブやシナモンが *Morganella morganii* の HDC 活性を強く阻害し、実際に 30℃ で 24 時間保存後のサバに蓄

積するヒスタミン量をコントロールの 10~20% の割合までに抑制している³⁾。さらに、ヒスタミン産生菌の産生する HDC ではなく、ヒト由来 HDC の活性を阻害する物質の探索も行われている。ヒト由来 HDC に対しては、ナツメグ、シナモン、オールスパイス、山椒およびクローブが活性を完全に阻害し⁴⁾、緑茶由来のエピカテキンガラートやポリフェノールも酵素活性を阻害すること⁵⁾、バラ科の植物抽出液も活性を阻害すること⁶⁾が報告されている。

これらの事実から、本研究では、抗菌力を有する物質や日持ち向上の目的で食品への添加例が報じられている物質が酵素活性阻害能を有しているかどうかを調査することは、食中毒を防ぐための重要なデータベースになると考えられる。そこで、本研究では、精油成分、食品添加物、過酢酸および界面活性剤を含む 45 種類の物質がヒスタミン産生菌である *M. morganii* NBRC3848 の HDC 活性に及ぼす影響を検討した。

試料と方法

1. 粗酵素抽出液の調製

M. morganii NBRC3848 を 1% histidine (和光純薬工業) 添加 Tryptic Soy Broth (BD, pH 6.8) 上で、30℃ で

* 連絡先

北海道大学大学院水産科学研究院: 〒041-8611 北海道函館市港町 3-1-1

18時間培養した。遠心分離 ($8,000 \times g$, 4°C , 15 分間) 後, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で洗浄を2回行い, 同緩衝液で全量を 7 mL に定溶した。細胞を氷冷しながら, 超音波破碎 (Sonicater, No. 5202, 大岳製作所) を行った。菌体破碎液を遠心分離 ($17,000 \times g$, 4°C , 30 分間) 後, 上清を孔径 $0.45 \mu\text{m}$ の PVDF メンブランフィルター (Millipore) を用いてろ過し, ろ液を粗酵素液とした。粗酵素液のタンパク質濃度は, Bradford 法を用いて測定した。なお, 粗酵素液のタンパク質濃度は下記の実験のため 10 mg/mL となるように 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で調整した。

2. 精油成分, 食品添加物および界面活性剤

精油成分としては, 1,8-シネオール, α -ピネン, p -シメン, アネトール, アリルイソチオシアネート, オイゲノール, カルバクロール, サリチルアルデヒド, シトラール, シンナムアルデヒド, ペリラルデヒド, ベンジルイソチオシアネート, リナロール, リモネン (以上, 和光純薬工業) の計 14 種類を用いた。

食品添加物として, 酢酸, クエン酸, ギ酸, 酒石酸, 乳酸, シュウ酸, プロピオン酸, 次亜塩素酸ナトリウム, 過酸化水素水, 安息香酸ナトリウム, グリシン (以上, 和光純薬工業), EDTA・2Na (同仁化学), リンゴ酸, ソルビン酸カリウム (以上, 関東化学), 亜硫酸ナトリウム (ナカライテスク), リゾチーム (エーザイ), ペクチン分解物 (ノイペクチン, アサマ化成), ϵ -ポリリシン (チッソ), ショ糖モノラウリン酸エステル (C_{12} 98%, モノエステル 75%), ショ糖モノミリスチン酸エステル (C_{14} 95%, モノエステル 95%), ショ糖モノパルミチン酸エステル (C_{16} 98%, モノエステル 93%) (以上, 三菱化学フーズ) の計 21 種類を用いた。

界面活性剤として, 塩化ベンザルコニウム, 塩化ベンゼトニウム, 1-デカンスルホン酸ナトリウム, ドデシル硫酸ナトリウム (和光純薬工業), オレイン酸カリウム, 塩化テトラメチルアンモニウム, 塩化 1- n -ヘキサデシルピリジニウム, 塩化 n -ヘキサデシルトリメチルアンモニウム, ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (関東化学) の計 9 種類を用いた。

3. 各種薬剤の調製

ヒスチジンは 5 mg/mL となるように 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解した。45 種類の供試試料のうち, 精油成分 14 種類は, 20% エタノール (和光純薬工業)-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) に, 他の 31 種類の物質は, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) に 3 mg/mL となるように溶解して調製した。なお, pH の調整は, 必要に応じて 1N 塩酸あるいは 1N 水酸化ナトリウムを用いて行った。

4. 酵素活性の測定

粗酵素液 (タンパク質濃度 10 mg/mL) の 10 倍希釈液 $300 \mu\text{L}$, 3 mg/mL の供試試料溶液 $100 \mu\text{L}$ および 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) $500 \mu\text{L}$ を混合し, 30°C で 5 分間ブレインキュベーションを行った。ブレインキュベーション

後, 5 mg/mL のヒスチジン溶液 $100 \mu\text{L}$ を添加することにより反応を開始した。 30°C で 20 分間反応後, 沸騰水中に 5 分間浸漬することにより反応を停止した。その後, 反応中に生成されたヒスタミン量はチェックカラーヒスタミン (キッコーマン) を用いて定量した。対照として, 精油成分では, 供試試料溶液の代わりに 20% エタノール-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を添加したもの, 他の供試試料は, 供試試料溶液の代わりに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を添加したものをを用いた。反応中に生成されたヒスタミン量を対照と比較した相対値を, 残存活性として表した。

5. 各種薬剤のヒスチジンおよびヒスタミンに及ぼす影響

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) $800 \mu\text{L}$ に 3 mg/mL の各種供試試料溶液 $100 \mu\text{L}$ および 5 mg/mL のヒスチジン溶液もしくは 3 mg/mL のヒスタミン溶液 $100 \mu\text{L}$ を加え, 30°C で 20 分間放置した後, ヒスチジンはニンヒドリン法で発色後, 全自動アミノ酸分析機 (JLC-500/V, 日本電子) を用いて測定した。ヒスタミンはチェックカラーヒスタミンを用いて定量した。対照は, 前項 4 と同様に調製したものをを用いた。

6. 統計解析

各試験は, 同様の試験を 3 回行った平均値をとった。有意差検定は, 酵素活性に及ぼす各種薬剤の影響では, 30°C 20 分間の酵素反応後に生成されるヒスタミン量を, 薬剤添加区と対照区との間でスチューデントの t -検定 ($p < 0.05$) を行うことにより評価した。ヒスチジンおよびヒスタミンに及ぼす影響においても, 30°C 20 分間後に残存する両物質の量を薬剤添加区と対照区との間でスチューデントの t -検定 ($p < 0.05$) を行うことにより評価した。

結果と考察

HDC 粗酵素液を調製し, 各種供試試料溶液と反応させた場合に生成されるヒスタミン量を対照と比較し, 残存活性により各種供試試料の酵素活性阻害能を評価した。その結果, 精油成分では, 実験に供した 14 種類すべてが HDC 活性を有意に ($p < 0.05$) 阻害した (Table 1)。HDC 活性阻害能は, 1,8-シネオール, リナロールおよびリモネンを作用させたときの残存活性は約 90% であったが, ベンジルイソチオシアネート, アリルイソチオシアネートを作用させたときの残存活性はそれぞれ, 5.1%, 12.5% となり HDC 活性が強く阻害されたが, 精油成分の種類により酵素活性阻害能に差が見られた。これまでにシンナムアルデヒドやオイゲノールは, HDC の活性を強く阻害することが報告されていたが^{2), 4)}, 本実験でも両者により酵素活性は強く阻害され, シンナムアルデヒドでは残存活性が 16.0%, オイゲノールでは 54.5% となった。

食品添加物においては, 次亜塩素酸ナトリウム, 亜硫酸ナトリウム, ショ糖ミリスチン酸エステルおよびショ糖ラウリン酸エステルを作用させた場合の残存活性はそれぞ

Table 1. Remaining activity of crude histidine decarboxylase (HDC) extract of *M. morganii* NBRC3848 in the presence of various compounds

Compound	Remaining activity (%)	Compound	Remaining activity (%)
Essential oils		Food additives	
1,8-Cineole	92.3*	Acetic acid	104
α -Pinene	84.4*	Citric acid	100
<i>p</i> -Cymene	85.7*	Formic acid	105
Allyl isothiocyanate	12.5*	Lactic acid	103
Anethole	33.8*	Malic acid	100
Benzyl isothiocyanate	5.1*	Oxalic acid	98.3
Carvacrol	53.3*	Propionic acid	100
Cinnamaldehyde	16.0*	Tartaric acid	102
Citral	59.7*	EDTA·2Na	104
Eugenol	54.5*	Hydrogen peroxide	101
Linalool	91.8*	Potassium sorbate	96.8
Limonene	92.0*	Sodium benzoate	106
Perillaldehyde	49.7*	Sodium hypochlorite	0*
Salicylaldehyde	73.3	Sodium sulfite	89.4*
		Sucrose monolaurate	71.1*
Detergents		Sucrose monomyristate	84.7*
Benzethonium chloride	0*	Sucrose monopalmitate	98.2
Benzalkonium chloride	0*	Glycine	102
Tetramethylammonium chloride	102	Lysozyme	98.3
1-Decanesulfonic acid sodium salt	88.4*	Pectin hydrolysates	100
1- <i>n</i> -Hexadecylpyridinium chloride	0*	ϵ -Polylysine	102
Potassium oleate	100		
Sodium dodecylbenzenesulfonate	0*	Other	
Sodium dodecyl sulfate	0*	Peracetic acid	0*
<i>n</i> -Hexadecyltrimethylammonium chloride	0*		

Values are the mean of three different experiments.

The statistical significance of differences was determined by Student's *t*-test.

* Statistically significant difference, $p < 0.05$.

れ、0%, 89.4%, 71.1%, 84.7% であり、これらの物質は HDC 活性を有意に ($p < 0.05$) 阻害した。

過酢酸を作用させた場合の残存活性は 0% となり、HDC 活性を有意に ($p < 0.05$) 阻害した。

界面活性剤においては、塩化ベンゼトニウム、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、塩化 *n*-ヘキサデシルトリメチルアンモニウムおよび塩化ベンザルコニウムおよび塩化 1-*n*-ヘキサデシルピリジニウムを作用させた場合の残存活性は 0%, 1-デカンスルホン酸ナトリウムでは 88.4% となり、界面活性剤のうち 7 種類が HDC 活性を有意に ($p < 0.05$) 阻害した。

しかし、HDC の活性を有意に ($p < 0.05$) 阻害したと考えられる物質は、酵素ばかりではなく、基質としてのヒスチジンや生成物のヒスタミンと反応し、それが見かけ上、活性阻害として現れている可能性がある。そこで、HDC 活性に影響を及ぼしたと考えられる 26 種類の物質を反応させた後にヒスチジンおよびヒスタミンの回収率を測定した。

Table 2 に示すようヒスチジンの回収率は、精油成分 14 種類、亜硫酸ナトリウム、ショ糖ミリスチン酸エステル、ショ糖ラウリン酸エステルおよび界面活性剤 7 種類をヒスチジンと反応させた場合に、ほぼ 100% (96.3~103%) であり有意差は見られなかった ($p > 0.05$)。次亜塩

素酸ナトリウムおよび過酢酸を作用させた場合には回収率は有意に ($p < 0.05$) 低下し、回収率はそれぞれ 0%, 80.1% となった。

Table 3 に示すようにヒスタミンの回収率も、精油成分 14 種類、亜硫酸ナトリウム、ショ糖ミリスチン酸エステル、ショ糖ラウリン酸エステルおよび界面活性剤 7 種類をヒスチジンと反応させた場合に、ほぼ 100% (96.3~103%) であり有意差は見られなかった ($p > 0.05$)。次亜塩素酸ナトリウムおよび過酢酸を作用させた場合には回収率は有意に ($p < 0.05$) 低下し、回収率はそれぞれ 0%, 72.8% となった。

以上のことから、精油成分 14 種類、亜硫酸ナトリウム、ショ糖ミリスチン酸エステル、ショ糖ラウリン酸エステルおよび界面活性剤 7 種類の共存下で観察された HDC-ヒスチジン系のヒスタミン産生の抑制は、本実験の条件では、これらの物質がヒスチジンおよびヒスタミンに著しく影響しないことが確認されたため、HDC の活性を阻害した可能性が高いと考えられる。

精油成分の酵素活性を抑制する機構は明らかとなっていないが、精油成分のなかには、微生物の酸化還元酵素の活性を阻害して抗菌力を示すものや、タンパク質のイオン結合や疎水結合に反応する成分もあると言われている⁷⁾。界面活性剤は一般的に酵素活性を阻害することが知られてお

Table 2. Recovery of histidine after incubation with various compounds in 0.1 M PBS (pH 6.5)

Compound	Recovery (%)
1,8-Cineole	103
α -Pinene	101
<i>p</i> -Cymene	100
Allyl isothiocyanate	101
Anethole	100
Benzyl isothiocyanate	99.5
Carvacrol	100
Cinnamaldehyde	100
Citral	101
Eugenol	103
Linalool	98.9
Limonene	98.3
Perillaldehyde	99.5
Slicylaldehyde	100
Peracetic acid	80.1*
Sucrose monolaurate	97.5
Sucrose monomyristate	103
Sodium hypochlorite	0*
Sodium sulfite	100
Benzalkonium chloride	102
Benzethonium chloride	103
Sodium dodecyl sulfate	96.3
Sodium dodecylbenzenesulfonate	96.3
<i>n</i> -Hexadecyltrimethylammonium chloride	103
1-Decanesulfonic acid sodium salt	103
1- <i>n</i> -Hexadecylpyridinium chloride	96.8

Values are the mean of three different experiment.

The statistical significance of differences was determined by Student's *t*-test.

*Statistically significant difference, $p < 0.05$.

り⁸⁾、酵素の立体構造は内部に疎水域、表面に親水域が配置されていることから、界面活性剤は内部の疎水域に相互作用し、立体構造を破壊すると考えられている⁹⁾。食品添加物に含めたが、ショ糖ミリスチン酸エステルやショ糖ラウリン酸エステルは非イオン性界面活性剤であるため、他の界面活性剤と同様に酵素活性の阻害効果を示すと考えられる。

次亜塩素酸ナトリウムを HDC-ヒスチジン系に作用させたときにヒスタミンは全く生成されなかった。しかし、本研究の条件では、ヒスチジンとヒスタミンの両方が次亜塩素酸ナトリウムにより、大きく構造変化することが示唆された。

過酢酸を、HDC-ヒスチジン系に作用させたときにヒスタミンは全く生成されなかった。本研究の条件では、基質として 0.5 mg/mL のヒスチジンを加えると、粗酵素液により最終的に 0.25~0.3 mg/mL のヒスタミンが生成された。過酢酸をヒスチジンおよびヒスタミンに反応させ回収率を測定したところ、今回の条件では、ヒスチジンとヒスタミン共に一部にのみ構造変化を引き起こすと考えられた。そのため、本実験の反応条件で仮に過酢酸が酵素活性に影響を及ぼさなかったとすると、HDC-ヒスチジン系においてヒスタミンは検出されると考えられる。ゆえに、過酢酸は HDC 活性の阻害能を有している可能性が高いと推

Table 3. Recovery of histamine after incubation with various compounds in 0.1 M PBS (pH 6.5)

Compound	Recovery (%)
1,8-Cineole	102
α -Pinene	102
<i>p</i> -Cymene	98.7
Allyl isothiocyanate	101
Anethole	101
Benzyl isothiocyanate	97.5
Carvacrol	97.5
Cinnamaldehyde	101
Citral	102
Eugenol	96.2
Linalool	104
Limonene	102
Perillaldehyde	101
Salicylaldehyde	102
Peracetic acid	72.8*
Sucrose monolaurate	97.5
Sucrose monomyristate	103
Sodium hypochlorite	0*
Sodium sulfite	100
Benzalkonium chloride	102
Benzethonium chloride	103
Sodium dodecyl sulfate	96.3
Sodium dodecylbenzenesulfonate	96.3
<i>n</i> -Hexadecyltrimethylammonium chloride	103
1-Decanesulfonic acid sodium salt	103
1- <i>n</i> -Hexadecylpyridinium chloride	100

Values are the mean of three different experiments.

The statistical significance of differences was determined by Student's *t*-test.

* Statistically significant difference, $p < 0.05$.

測される。以上のことより、今回の実験に供した 45 種類の物質のうち、25 種類が HDC 活性阻害能を有していることが明らかとなった。

ま と め

ヒスタミン産生菌である *M. morganii* NBRC3848 の HDC 活性に精油成分、食品添加物、過酢酸および界面活性剤を含む 45 種類の物質が及ぼす影響を検討した。*M. morganii* NBRC3848 から得られた粗酵素液の残存活性を測定したところ、26 種類の物質で活性が有意に ($p < 0.05$) 抑制されていると考えられた。酵素活性を抑制した物質とヒスチジンおよびヒスタミンを反応させ、両者の回収率を測定したところ、次亜塩素酸ナトリウムおよび過酢酸以外の 24 種類の物質で、回収率がほぼ 100% ($p > 0.05$) となり、これらの物質は HDC 活性を阻害していると考えられた。次亜塩素酸ナトリウムでは両者の回収率が 0% となり、今回の条件では HDC 活性に及ぼす影響を評価できなかった。過酢酸では回収率が 2~3 割低下したが、酵素活性を抑制したと考えられた。そのため、本研究では、試験に供した 45 種類の物質のうち 25 種類の物質に HDC 活性阻害能があることが明らかとなった。

謝 辞

本研究は、平成 22 年度新たな農林水産政策を推進する
実用技術開発事業，課題番号 22036 により実施した。

文 献

- 1) Toda, M., Yamamoto, M., Uneyama, C., Morikawa, K. Histamine food poisonings in Japan and other countries. Bulletin of National Institute of Health Sciences, **127**, 31-38 (2009).
- 2) Wendakoon, C. N., Sakaguchi, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. Journal of Food Protection, **58**, 280-283 (1995).
- 3) Shakila, R. J., Vasundhara, T. S., Rao, V. D. Inhibitory effect of spices on *in vitro* histamine production and histidine decarboxylase activity of *Morganella morganii* and on the biogenic amine formation in mackerel stored at 30°C. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, **203**, 71-76 (1996).
- 4) Ohshita, J., Okigami, H., Nitta, Y., Ueno, H. Evaluation of inhibitory effects of spice-derived natural extracts on histidine decarboxylase. Journal of Home Economics of Japan, **58**, 17-22 (2007).
- 5) Nitta, Y., Kanai, T., Ueda, H. Food components inhibiting recombinant human histidine decarboxylase activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **55**, 299-304 (2007).
- 6) Nitta, Y., Ito, K., Ueno, H. Inhibitory activity of medicinal plants toward human histidine decarboxylase. Journal of Home Economics of Japan, **59**, 1011-1016 (2008).
- 7) 藤上朝生. 各種抗菌剤と非熱処理の併用. フレッシュ食品の高品質殺菌技術. 五十部誠一郎, 藤川 浩, 宮本敬久 編. 東京, サイエンスフォーラム, 2008, pp. 275-288. (ISBN978-4-916164-93-3)
- 8) Helenius, A., Sioms, K. Solubilization of membranes by detergents. Biochimica et Biophysica Acta, **415**, 29-79 (1975).
- 9) 松村吉信, 土戸哲明. 界面活性剤の殺菌メカニズム. 洗浄殺菌の科学と技術. 高野光男, 横山理雄, 西野 甫 編. 東京, サイエンスフォーラム, 2000, pp. 61-73. (ISBN4-916164-40-7)