当面獲得する際の基本的理論に基づくものと考えられるが、一応限界希釈法によって純化させることができた。そして純化させた耐性菌においては、抗生物質を含んだ培地および含まない培地に10代継代培養しても、その耐性は安定していた。

次に耐性菌を用いて行う T. T. C. test に際して、発色時間の遅延および発色状態の減退に対する検討の結果は、耐性菌を純化後、抗生物質を含まない脱脂乳培地に10代継代したものにおいて、発色時間ならびに発色状態ともに非耐性菌の場合と略同様の状態に復元した。このような結果は純化の場合と同様に、一般に細菌の抗生物質に対する基礎理論によるものか、あるいは試験菌として使用する菌の量の問題か興味ある問題であると考え、今後検討を行って見るつもりである。

なお、抗生物質の 85°, 5分間に対する熱抵抗性の実験結果は、そのような加熱による影響は全くないか、あっても極く僅かなものであり、すでに先人⁵⁾の行った成績と同様であった。したがって T. T. C. test における熱操作の影響は、全く無視してよいと考える。

さらにこれらの実験と平行的に指示薬、T. T. C. の代りに、レザズリンを用いる方法⁶⁾⁷⁾⁸⁾を検討して見た。その結果は判定時間の短縮、色調変化の明確さ、価格が低廉であるなどの点で、有利であると考えられる結果が得られているが、このことに関しては、別の機会に報告するつもりである。

総括

T. T. C. test の応用によって、牛乳中に含まれる抗生物質を鑑別する方法について、基礎的な実験を実施したところ、次に述べるような結果が得られた。

(1) 脱脂乳培地中に抗生物質を順次増量しながら、これに *S. th.* を馴化継代することによって、ペニシリン、テラマイシン、アクロマイシン、ストレプトマイシンおよびクロロマイセチンのそれぞれに耐性を持った *S. th.* 耐性菌を得ることができた。これらの各耐性菌の T. T. C. test における発色限界は、ペニシリンでは24

U/ml 以上、テラマイシンでは 16 μ g/ml, アクロマイシンでは 2.4 μ g/ml 以上、ストレプトマイシンでは 128 μ g/ml 以上、クロロマイセチンでは 32 μ g/ml である。

(2) *S. th.* の各抗生物質耐性菌の耐性は、それぞれの抗生物質に対して特異性がある。しかしテラマイシンおよびアクロマイシン耐性菌は相互に交叉した耐性を持っている。

(3) 各抗生物質に対する耐性は、限界希釈法による純化によって安定させることができた。しかしそれらの菌が T. T. C. test において示す発色時間の遅延、発色状態の減少など非耐性菌の示す結果と幾分異なる点については、基礎的に検討する余地がある。

(4) T. T. C. test に際して 85°で5分間加熱することは、試験の結果には何ら影響を与えない。

以上の基礎的な実験に基づき、これを実際に応用するならば、牛乳中に含まれる抗生物質の鑑別は可能であると考えられる。

この研究の一部は、文部省科学試験研究費の補助によるものであり、その関係者のご好意に対し感意を表する。

文献

- 1) C. E. Neal, H. E. Calbert: J. Dairy Sci. **38**, 629 (1955).
- 2) 阿部, 外: 日本公衆衛生雑誌 **4**, 418 (1957).
- 3) 北原, 外: 日本獣医師会雑誌 **11**, 109 (1958).
- 4) 北原, 外: 日本公衆衛生雑誌 **4**, 11 増刊号 151 (1957).
- 5) K. M. Shahani: J. Dairy Sci. **41**, 382 (1958).
- 6) R. Tridmann, C. Epstein: Gen. Microbiology, **5**, 830 (1951).
- 7) I. A. Schipper, W. E. Petersen: Vet. Med. **46**, 222 (1951).
- 8) C. C. Prouty: J. Milk and Food Tech. **23**, 224 (1960).

獣肉中のヒスタミン定量による鮮度判定について

津郷友吉*, 斎藤芳枝**

On the Inspection of Freshness of Meat by Determination of Histamine

Tomokichi TSUGO, Yoshie SAITO

(from the Faculty of Agriculture, University of Tokyo and Tokyo University of Home Economics)

The contents of histamine in beef, pork and chicken were determined during spoilage and investigated whether they could be applied to the inspection of the freshness of meat or not. Determinations of histamine were carried out by means of an improved McIntire's method modified by Kawabata using ion exchange resin which was applied to estimate histamine content in fish. Some chemical tests for inspecting freshness of meat were performed at the same time.

The results showed no clear relation between histamine contents and the values of the other chemical tests. Although organoleptic test and the other chemical tests on the meat showed obviously spoilage, only a little histamine was detected as compared with that of fish.

Therefore it is considered to be difficult to judge freshness of meat by the determination of histamine in it. It is assumed that this is due to the difference of the constituents between fish and meat and to the existence or absence of bacteria producing histamine.

(Received December 19, 1960)

緒 論

現在食餌性アレルギー中毒が、しばしば見られるようである。アレルギー様中毒の原因は、主としてヒスタミンやヒスタミン様物質の存在やヒスタミンの作用を増強する因子などによることが多いといわれている。

したがって食品中のヒスタミンの存否、あるいは含量が問題となり、食品中のヒスタミンを簡単に定量する方法が検討された。門田、林は水産食品の腐敗過程において、生成するヒスタミンの簡易定量法の一つとして paper chromatography¹⁾ による方法を発表し、また門田、井上らは、McIntire²⁾ の血液プラズマ中に存在するヒスタミンの定量法に改良を加えて簡易迅速法として、溶剤抽出および陽イオン交換性物質の cotton acid succinate による方法³⁾ を発表した。

また最近河端は、イオン交換樹脂を用いる改良法⁴⁾ を発表している。著者らは河端のイオン交換樹脂による方法が魚肉に適用されたものであるので獣肉類に適用でき、したがって獣肉類の鮮度判定にも使用されるか否かを知るため、他の鮮度判定の化学的試験とともに実験を行ない、その関係を調べたので結果を報告する。

なお最近ヒスタミンの定量法が缶詰食品の化学的検査法として、食品衛生検査指針に取り入れられた⁵⁾。

実験の部

1. 試料 市販の牛、豚および鶏肉の脂肪の少ない部分を用いた。これと比較するために、市販の冷凍のサバの切身と水中に保存したアジを試料とした。

2. 試料の調製 食品衛生検査指針⁵⁾ の方法によって次のように行なった。牛、豚および鶏肉は腱を除き、サバ、アジは内臓、皮および骨を除き、各々十分に混和し

その 10 g を 100 ml のビーカーに秤取する。これに蒸留水 50 ml を加えてよくかきまぜ 30 分間浸出する。次に 20% トリクロル酢酸溶液 10 ml を加えてよくかきまぜた後 10 分間放置し、なるべく肉片がろ紙上に移らないように注意してろ過する。次に 2% トリクロル酢酸溶液 10 ml を加え、全肉片をろ紙に移し、ビーカー内に残留物のある場合、少量の 2% トリクロル酢酸溶液と蒸留水を用いて洗い、この全液を漏斗上に移し、充分にろ別し、全ろ液を 100 ml のメスフラスコに移し、蒸留水を加えて 100 ml とする。この液 10 ml を 1.5 N 炭酸ナトリウム溶液で中和し、0.4 N 酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.6) 10 ml を加え、次のカラムろ過液とする。

3. ヒスタミンの定量法 河端の方法に準じて、次のように行なった。Amberlite C G-50 type 1 (100~200 メッシュ) の樹脂を 2 N 塩酸および水で処理洗浄したのち、1 N 酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.6) で処理し、pH 4.6 の 0.2 N 酢酸ナトリウム溶液に保存する。カラムは内径 8 mm のガラス管を用い、高さ 55 mm とする。このカラムに試料溶液 (量はヒスタミンの含量によって調節する) をろ過させ、さらに 0.2 N 酢酸ナトリウム溶液 80 ml (pH 4.6) を通過させ、ヒスタミンの溶離は 0.2 N 塩酸 8 ml で行ない、溶離液を 1.5 N 炭酸ナトリウム溶液で中和したのち水で 10 ml とする。

次に 1.1 N 炭酸ナトリウム溶液 5 ml に、ジアゾ試薬 (スルファニル酸 2 ml を、10% 塩酸に飽和するまで溶かし (濃度約 0.9%), これに使用直前 5% 亜硝酸ナトリウム溶液等容量を水浴中で混和する) を加え、1 分後上記のカラム溶離中和液 2 ml を加えて発色させる。比色は 5 分後波長 510 mμ で Coleman 分光光度計を用いて測定する。

4. 揮発性塩基窒素, pH 試験およびタンパク沈殿反応 揮発性塩基窒素, pH 試験およびタンパク沈殿反応

* 東京大学農学部

** 東京家政大学

Table 1. Histamine Contents and the Values of the Other Chemical Tests Obtained for Beef, Pork and Mackerel after 24 and 48 Hours at 30°

	Beginning of experiment					After 24 hours at 30°					After 48 hours at 30°				
	volatile basic nitrogen (mg %)	pH	precipitation reaction of protein		histamine (mg %)	volatile basic nitrogen (mg %)	pH	precipitation reaction of protein		histamine (mg %)	volatile basic nitrogen (mg %)	pH	precipitation reaction of protein		histamine (mg %)
Beef	6	5.6	—	—	0	21	5.1	—	—	6.5	77	7.1	+	+	5.8
Pork	17	5.9	—	—	0	28	6.8	—	+	3.0	160	7.5	+	+	16.0
Mackerel	14	6.2	±	—	0	68	6.8	+	+	250.0	180	8.0	+	+	255.0

Table 2. Histamine Contents and the Values of the Other Chemical Tests Obtained for Chicken, Roast Ham and Horse-Mackerel after 24 and 48 Hours at 30°

	Beginning of experiment					After 24 hours at 30°					After 48 hours at 30°				
	volatile basic nitrogen (mg %)	pH	precipitation reaction of protein		histamine (mg %)	volatile basic nitrogen (mg %)	pH	precipitation reaction of protein		histamine (mg %)	volatile basic nitrogen (mg %)	pH	precipitation reaction of protein		histamine (mg %)
Chicken	9	5.8	—	—	5.3	58	7.1	+	+	15.0	188	8.0	+	+	15.0
Roast Ham	9	6.1	+	—	0.6	11	6.2	+	+	0.6	11	6.1	+	+	0.6
Horse-Mackerel	10	6.2	+	±	0	43	6.8	+	+	11.0	156	7.6	+	+	35.0

Table 3. Histamine Contents and the Values of the Other Chemical Tests Obtained for Beef, Pork and Chicken after 24 and 48 Hours at 18°

	Beginning of experiment					After 24 hours at 30°					After 48 hours at 30°				
	volatile basic nitrogen (mg %)	pH	precipitation reaction of protein		histamine (mg %)	volatile basic nitrogen (mg %)	pH	precipitation reaction of protein		histamine (mg %)	volatile basic nitrogen (mg %)	pH	precipitation reaction of protein		histamine (mg %)
Beef	11	5.6	—	—	2.3	12	5.6	—	—	3.8	20	5.1	+	+	4.8
Pork	5	5.8	—	—	0.3	16	5.9	±	—	3.1	33	6.9	+	+	3.0
Chicken	11	6.2	±	±	0	13	6.5	±	—	1.9	62	7.7	+	+	2.7

の実験方法は、すべて食品衛生検査指針の方法³⁾により行った。

5. 牛、豚肉およびサバについての実験結果 3種の試料について、入手直後と30°で24時間放置後と、さらに30°で24時間放置後の各々について前述の方法で調製し、ヒスタミン、揮発性塩基窒素、pH試験およびタンパク沈殿反応の実験を行い、Table 1に示すような結果を得た。

Table 1によれば、入手直後においては、ヒスタミン含量は3種とも0であった。その他の三つの化学的試験においては、サバがpH試験とタンパク沈殿反応で、初期腐敗の直前とみられ、牛肉および豚肉は魚の鮮度判定基準によって、普通新鮮な価を示している。30°で24時間放置後においては、3種ともに悪臭を認め、腐敗の状態であったが、実験の結果によれば、サバは四つの試験ともに、明らかに腐敗を表す価であり、ヒスタミンは250 mg%である。牛肉は揮発性塩基窒素が前回より増加しているが、普通鮮度の価であり、pHは変りがないが、タンパク沈殿反応は初期腐敗直前の価であり、ヒスタミンはわずかに6.5 mg%であった。豚肉はヒスタミンを除いた三つの試験では、初期腐敗または腐敗期を示している。しかしヒスタミンはわずかに3 mg%である。30°で48時間放置後、3種ともにヒスタミンを除いては腐敗を示す価であるが、ヒスタミン含量はサバでは255 mg%である。獣肉はこれに比べると、牛肉は前回とやや同じであるが、豚肉が少し増加して16 mg%であって魚肉に比べてはるかに少ない。

6. 鶏肉、ロースハムおよびアジについての実験結果

鶏肉とロースハムについて、前と同様に実験した。アジを比較のために同時に用いた。なお入手直後鶏およびロースハムは普通の鮮度であり、アジは鮮度低下の状態であった。放置実験に用いたアジは、内臓を除き洗ってから試験に供した。実験の結果はTable 2に示した。

Table 2によれば、入手直後においては、鶏肉はヒスタミンの試験を除いた他の三つの試験成績では、普通の新鮮の価であり、ヒスタミンは5.3 mg%である。ロースハムはpH試験とタンパク沈殿反応がわずかに鮮度低下の価を示したが、ヒスタミンは0.6 mg%である。アジはpH試験および沈殿反応では初期腐敗直前の価である。ヒスタミンは0である。30°で24時間後、鶏肉、アジは悪臭があり、ロースハムは光沢や弾力性がなく、鮮度低下の状態であったが、粘性が現われず悪臭も認められなかった。実験の結果では鶏は明らかに腐敗の価を示しているが、ヒスタミンは前回より少し増加して15 mg%であった。ロースハムは入手直後に比べてヒスタミ

ンは同じであったが、タンパク沈殿反応は腐敗を示し他の二つはわずかに増加した。アジは三つの化学的試験では腐敗の価を示し、ヒスタミンは11 mg%であった。30°で48時間放置後、鶏肉は24時間放置後よりさらに腐敗が進んだが、ヒスタミンは15 mg%で同量である。ロースハムは24時間放置後とほとんど同じであった。アジは腐敗の価であるが、ヒスタミンが割合に少なく35 mg%を示した。

7. 放置温度18°における牛、豚および鶏肉の実験結果 これまでの実験は、入手直後と30°に24時間、48時間放置したものについて実験を行なったものであり、これらの条件では、第2回目の試験ですでに腐敗の時期に入ってしまうので、腐敗直前頃の状態を知るため18°に放置して前と同じ実験を行なった。結果をTable 3に示した。18°で24時間放置後、牛肉は色が変わったが、肉の状態は入手当時と同様であった。しかし3種ともいくらか悪臭が感じられた。48時間後は全体に鮮度低下の状態であった。24時間放置後の肉は、悪臭がわずかで、これを除けばまだ食用に用いられる状態と思われた。

Table 3によれば、18°で24時間放置の牛肉は、入手直後に比べてヒスタミンが極くわずかに増加したが、他は差異がほとんどなかった。48時間放置では、全体に低下してヒスタミンもわずかに増加した。しかし揮発性塩基窒素、pH試験の示す価では、普通新鮮の状態である。この状態でヒスタミンは4.8 mg%である。18°で24時間放置後の豚肉は、入手直後に比べてわずかに鮮度は低下したが、普通新鮮の状態と考えられ、ヒスタミンは3.1 mg%である。48時間後では、腐敗初期に進んだがヒスタミンは増加していない。18°で24時間放置後の鶏肉（入手直後から鮮度低下していた）では、わずかに鮮度が低下しているが、ヒスタミンは1.9 mg%である。48時間放置後では腐敗期に入ったが、ヒスタミンは2.7 mg%であった。

以上の実験を総括すると、18°で24時間放置しても腐敗までに進まず、ヒスタミンは3 mg前後である。48時間放置すると、腐敗初期に入るがヒスタミンは2.7~4.8 mg%の間にある。

8. 試料の各種処理による結果の差 これまでの実験によると、獣肉類は魚肉に比べてヒスタミンの増加する量ははるかに少ない。これは試料の処理に原因があるとも考えられるので、次の実験を行なった。すなわち乳ばちで試料を混砕し水で浸出する方法と試料を海砂とともに、乳ばちで混砕し水で浸出する方法、またワーリング・ブレンダーによって混砕した試料を水で浸出する方法の三種について、同試料を用い、前述同様にして実験

Table 4. Histamine Contents and the Values of the Other Chemical Tests Due to the Difference of Preparation of Sample

	pH	precipitation reaction of protein		Volatile basic nitrogen			Histamine		
		A	B	glass- mortar (mg %)	Seasand +glass- mortar (mg %)	blender (mg %)	glass- mortar (mg %)	seasand +glass- mortar (mg %)	blender (mg %)
Beef	5.8	—	—	16	16	15	3.8	2.0	1.4
Pork	6.5	+	+	21	10	10	0.1	0.1	0.5
Horse- mackerel	6.4	+	+	8	9	10	0.3	0.1	0

した結果を Table 4 に示した。

Table 4 によれば、乳ばちで混砕した方法が浸出量の多いことがわかった。前述の実験はこの方法で行なったので、混和操作による影響はないとみてよい。

考 察

魚肉中のヒスタミン定量法で、獣肉中のヒスタミンを定量し、かつその量により、鮮度判定ができればよいと考えられたので、魚肉のヒスタミン定量法と同じ方法を用いて、獣肉について行ってみた。

実験の結果によれば、魚肉におけるヒスタミンの量は、腐敗期に入って、サバ 250 mg%, アジ 35 mg% であり大分差があった。これは魚の種類による差、または試料調製の際、アジは内臓を除き洗浄して試験に供したので、それらの差により生じたものと考えられる。

獣肉においては、腐敗期における牛肉で 5.7 mg%, 豚肉で 3.0~16.0 mg%, 鶏肉で 2.7 mg% である。

著しい悪臭があり、腐敗したもので揮発性塩基窒素、pH 試験、タンパク沈殿反応において、著しい腐敗の価を示したものであっても、ヒスタミンは割合に少なく 5.0~16.0 mg% で、魚肉の腐敗初期で 100 mg% といわれているのに比べて少ない。

また揮発性塩基窒素、pH 試験およびタンパク沈殿反応の価が、比較的低いときでヒスタミンは 3.0 mg% 位である。すなわち獣肉類のヒスタミンは、ヒスタミン以外の化学的試験と同じ関係にあるとはいえない。また魚肉と比べて、ヒスタジンの含量に大差がないにもかかわらず、試験の結果に差異の現われるのは、魚肉と獣肉の他の成分の差によるものか、またはヒスタミン生成細菌の有無によるものか、あるいは浸出液のカラム吸着を妨害する物質によるものか、以上のいずれかの影響によるものと考えられる。これらの点については、今後実験検討を行って明らかにする必要がある。

以上の結果から、魚肉に適用されるこのヒスタミン定量に基づく鮮度判定法は獣肉においては、そのまま適

用するには、不適當で今後の検討を要するものと思われる。

要 約

食品中特に獣肉(牛、豚および鶏肉)中のヒスタミン定量実験を行った。すなわち河端法による魚肉中のヒスタミン定量法を用い、獣肉の腐敗過程においてヒスタミンの定量を他の化学的試験(揮発性塩基窒素、pH 試験、タンパク沈殿反応)とともにを行い、それらの関係を調べそのヒスタミンの定量が、肉の鮮度判定に使用できるか否かについて検討した。その結果によれば、魚肉におけるように明らかな関係は現われなかった。すなわち獣肉中のヒスタミンは他の三つの化学的試験および官能検査により、明らかに腐敗の状態にあっても、ヒスタミンはきわめて少量現われるに過ぎない。

従ってヒスタミンを定量することにより、獣肉の鮮度判定を魚肉と肉と同様に行なうことは困難と思われる。これは魚獣肉の成分の違いか、または魚肉と獣肉中のヒスタミンを生成する細菌の有無によるものと考えられ、今後の実験検討をまちたい。

終りに臨み本研究を行なうに当り、ヒスタミンの定量について種々助言を頂いた、国立予防衛生研究所の食品衛生部河端俊治博士に厚く謝意を表する。

文 献

- 1) 門田元, 林孝市郎: 京都大学食糧科学研究所報告 6, 30 (1951).
- 2) F.C. McIntire et al.: J. Biol. Chem. 170, 537 (1947).
- 3) 門田元, 井上淳太郎: 日水産. 19, 8 (1953).
- 4) 河端俊治: 日水産, 投稿中.
- 5) 厚生省編纂: 衛生検査指針 III, 食品衛生検査指針 I, 各論 II, p. 28; 総論 VI, p. 8; 各論 I, p. 33 (1960).
- 6) 神立誠: “食品化学” p. 7 (1959).