平成 18 年度水産学技術賞

水産物中のヒスタミン簡易測定法の開発

佐藤 常雄

キッコーマン株式会社商品開発本部

Development of simple and rapid determination of histamine in seafood

TSUNEO SATO

Product Development Division, Kikkoman Corporation, Noda, Chiba 278-0037, Japan

ヒスタミンは、アレルギー反応、胃酸分泌、血圧など人体において様々な生理作用に関与する化学物質である。ヒスタミンを高濃度（一般的には 100 mg/100 g = 1000 ppm 以上）含む食品を摂取した場合、顔面の紅潮、頭痛、じんま疹、発熱などの症状を呈することがある。この中毒は、食品などのアレルゲンによるアレルギー反応にその症状が似ていることからアレルギー様食中毒と呼ばれている。食品に含まれるヒスタミンは、主に細菌由来のヒスチジン脱炭酸酵素がヒスチジンに作用して生成する。^{1,2)} 赤身魚（マグロ、サンマ、カツオ、アジ、サバなど）によるアレルギー様食中毒が多いのは、ヒスタミン生成の基質である遊離ヒスチジンの含量が多いためである。赤身魚のほか、発酵中のタンパク質分解によりヒスチジンが生成しやすいワインやチーズなどの食品でも、多量のヒスタミンが検出されることがある。³⁾

日本では 1950 年代に生鮮魚類のほか、サバ、イワシなどの干物、フライなどによるアレルギー様食中毒が多発したが、1970 年以降では冷温貯蔵が普及し、衛生管理も向上したため減少傾向にあった。それでもなお、現在でも毎年集団による本食中毒事故が発生している。⁴⁾ また、海外では近年の魚食志向を反映して増加傾向にあり、米国でのアレルギー様食中毒の報告件数は年間約 800 件、推定発生件数は 8000 件で、この数字からも本食中毒は食品衛生学上軽視できないことが窺える。¹⁾

ヒスタミンの規制については、日本では定められていないが、米国、EU およびコーデックス（FAO/WHO 合同食品規格計画）では規制値が設定されている。¹⁾ 日本から欧米に輸出する場合はこの基準を守らなければならないため、国内においてもヒスタミン測定の必要性が非常に高い。

代表的なヒスタミン測定法^{2,5)}としては、蛍光光度法（AOAC 法）⁶⁾と HPLC 法^{7,8)}などが知られている。しかしながら、これらの測定法には、①サンプルの前処理や測定操作が煩雑で測定に時間と熟練を要する、②機器が高価である、などの問題点があった。また、近年、ヒスタミンの簡易測定として酵素免疫測定法（EIA 法）を用いた市販キットが販売されているが、分析コストが高い。

そこで、水産食品加工の現場から流通まで、幅広く利用できるような、簡便・迅速でかつ安価なヒスタミン測定法を 2 種類開発し、その実用化を行った。本稿では、新規ヒスタミンデヒドロゲナーゼを用いた比色法によるヒスタミン測定法の開発について紹介する。

1. 新規ヒスタミンデヒドロゲナーゼ生成菌の探索⁹⁾

ヒスタミンに特異的に作用する酵素を土壌細菌より探索した結果、食品中に含まれる他のアミン類には全く作用せず、ヒスタミンに特異的に作用する酵素として、*Rhizobium* sp. 4-9 株が生産する新規ヒスタミンデヒドロゲナーゼ（EC 1.4.99）を見出した。また本酵素は、反応性、耐熱性に優れており、ヒスタミン測定に用いる酵素としては最適であった。本酵素をヒスタミン測定に用いるために、構造遺伝子のクローニングと大腸菌による発現を行い、大量生産を可能とした。¹⁰⁾

2. 測定系の構築⁹⁾

本測定法は、酵素を用いた比色法を測定原理（図 1）として構築した。つまり、ヒスタミンに電子受容体である 1-Methoxy PMS の存在下、ヒスタミンデヒドロゲナーゼを作用させ、この時に生じる電子の授受によってテトラゾリウム塩（WST-8）からホルマゼン色素が生

成される。このホルマザン色素の吸光度 (460~470 nm) を測定することによって、ヒスタミン濃度を算出した。

ヒスタミン標準液 0~4.0 ppm (サンプル換算 0~100 ppm) を測定した結果、ヒスタミン濃度と吸光度の間に良好な直線関係が認められた (図 2)。

本キットの検量線は直線性、精度に優れており、実サンプルのヒスタミン定量には、標準ヒスタミン 1 点における吸光度より精度良く算出できた。これに対し EIA 法における検量線は非直線であるため、サンプル

図 1 本測定法の原理

図 2 本測定法のヒスタミン検量線

のヒスタミンを測定する場合、標準ヒスタミンを 5 点前後同時に分析しなくてはならない。これは、非直線性の検量線の作成といった煩雑操作が必要となるだけではなく、コストの面にも大きく影響してしまう。しかしながら、本キットはコスト面、検量線の作成などの問題がなく操作が簡便で、市販キットとして好適な測定法だと考えられた。

3. 測定手順

抽出ならびに測定操作については、簡便な方法を考案した。試料 1 g を秤量し、これに蒸留水あるいは抽出用溶液 (0.1 M EDTA ナトリウム水溶液 pH 8.0) 24 mL を加え加熱抽出した。放冷後、濾紙 (通常: No. 2, 濁りの多いもの: No. 5) で濾過し、これを測定用試料とした。測定用試料あるいはヒスタミン標準液、発色試薬液、酵素液を試験管に入れ、37°C、15 分間加温し反応させた。反応後、反応終了液の吸光度 (460~470 nm) を比色計や分光光度計にて測定し、試料中のヒスタミン濃度を算出した (図 3)。本測定法では、試料調製から測定までの所要時間は 1 時間ほどで、短時間での分析が可能であった。

4. キットの仕様

試薬の安定化を図るために、ヒスタミンデヒドロゲナーゼや発色試薬は粉末化し、軽量化した。測定に必要とする器具類については、極力減らし、試薬と比色計以外には 1 mL オートピペット、濾紙、漏斗、試験管のみで測定できるようにキットの設計を行なった (図 3, 4)。

図 3 本測定法の操作手順

図4 本測定法のキット化（試薬と専用比色計）

表1 ツナ缶詰および生マグロでのヒスタミン添加回収試験（n=3）

ヒスタミン 添加量 (ppm)	オイル漬け ツナ缶	スープ漬け ツナ缶	生マグロ
5	5.0	5.0	5.3
10	11.3	10.8	10.6
20	21.6	21.2	20.0
50	51.0	49.5	50.9
75	72.0	73.5	77.6
回収率	96~113%	98~108%	100~106%

5. 分析データ

添加回収実験 ツナ缶（オイル漬けおよびスープ漬け）および生マグロにヒスタミンをそれぞれ 5, 10, 20, 50, 75 ppm になるよう添加し、これら試料中のヒスタミン量を本測定法で定量した。その結果、良好な回収率が得られた（表1）。

従来法との比較 鮮度低下したマグロ（生および缶詰）ならびに魚粉について、試料中のヒスタミン量を本測定法と従来法で測定した。その結果、本測定法は他法と同等の分析結果が得られることが判明した（表2, 3）。

6. 本測定法の特長

本測定法と従来法の概要を比較して表4に示した。

本測定法は、①操作方法ならびに抽出操作が簡単、②AOAC法およびHPLC法などのように測定妨害物質を除くための複雑な前処理操作や酸・メタノールなどの危険な試薬が不要、③測定時間が短い、など従来法と比べ優れた特徴があり、かつ従来法と同等の結果を得ることができる簡易測定法であった。また本キットおよび専用比色計は低価格であり、検量線の作成も1点の測定で済むなどコストパフォーマンスにも優れていた。以上のことから、本測定法はヒスタミン中毒が懸念される食品の衛生管理に有効な簡易検査法であると考えられた。

水産物中のヒスタミン測定は、本測定法の実用化によ

表2 従来法との比較分析（n=3）マグロ（生および缶詰）

測定法	生マグロ（ppm） 20℃, 2日貯蔵	ツナ缶詰 (ppm)
本測定法	2,710	537
HPLC法	2,550	566
AOAC法	2,650	530
EIA法1※	2,760	463
EIA法2※	2,730	574

※市販キット

表3 従来法との比較分析（n=3）魚粉

測定法	魚粉A	魚粉B	魚粉C	魚粉D	魚粉E
本測定法	1,100	219	630	193	118
HPLC法	1,260	194	611	224	146
EIA法1※	1,430	248	508	190	124

※市販キット

表4 本測定法と従来法の比較

	本測定法	AOAC法	HPLC法
測定時間	1時間	>6時間	>6時間
サンプル抽出	熱抽出（缶詰、魚粉は水抽出）	メタノール抽出	酸抽出
調製	ろ紙ろ過	ろ紙ろ過	フィルターろ過
前処理	なし	イオン交換樹脂処理	イオン交換樹脂処理
検量線	1点	3点以上	1点 (同時測定不可)
測定操作	簡便	煩雑（操作、試薬の調製）	煩雑 (HPLCの操作)

って、今まで必要性を感じながら機会が得られなかった水産メーカーや研究機関にも普及し、水産分野の食品衛生向上に大きく貢献できたと考えている。

謝 辞

なお、本研究開発にあたり、ご尽力ならびにご高配頂いた東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科前教授の藤井建夫博士、食品生産科学科教授の木村凡博士に衷心より感謝申し上げます。また、本測定法の実用化にあたり、多大なご協力ならびにご支援頂いた独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所の里見正隆博士、酪農学園大学食品科学科准教授の船津保浩博士、社団法人大日本水産会の高鳥直樹氏に厚く感謝の意を申し上げます。

文 献

- 1) 藤井建夫. ヒスタミン生成菌. 「HACCPと水産食品」水産学シリーズ125. (藤井建夫, 山中英明編) 恒星社厚生閣, 東京. 2000; 59-74.

- 2) Lehan L, Olley J. Histamine fish poisoning revisited, *Int. J. Food Microbiol.* 2000; **58**: 1-37.
- 3) 莊村多加志. 第7章有害アミン24 ヒスタミン. 「食品衛生化学物質データブック」.(細貝祐太郎, 中澤裕之, 西島基弘編) 中央法規出版, 東京. 1998; 777-782.
- 4) 山中英明. 赤身の魚とアレルギー様食中毒. 家政誌 2000; **50**: 293-297.
- 5) 齊藤貢一, 望月恵美子. 食品中のアミン類の分析. 月刊フードケミカル 1994; **7**: 115-122.
- 6) Association of Official Analytical Chemists. Histamine in seafood: fluorometric method. Method 35.1.32 method 977.13, in: Official methods of analysis, 17th ed., AOAC International, Gaithersburg, Md. 2003; 17-19.
- 7) 2.1.2.3 特殊窒素化合物 不揮発性腐敗アミン (2) 高速液体クロマトグラフィーによる定量. 「衛生試験法・注解 2000」(日本薬学会編) 金原出版, 東京. 2000; 172-175.
- 8) 第4章 食品中の汚染物質および変質物 C 天然汚染物質 ⑤ 不揮発性腐敗アミン. 「食品衛生検査指針 理化学編」 日本食品衛生協会, 東京. 1991; 276-279.
- 9) Sato T, Horiuchi T, Nishimura I. Simple and rapid determination of histamine dehydrogenase from *Rhizobium* sp.. *Anal. Biochem.* 2005; **346**: 320-326.
- 10) Bakke M, Sato T, Ichikawa K, Nishimura I. Histamine dehydrogenase from *Rhizobium* sp.: gene cloning, expression in *Escherichia coli*, characterization and application to histamine determination. *J. Biotechnol.* 2005; **119**: 260-271.