うるめいわし丸干における柑橘精油添加による ヒスタミン蓄積抑制効果について

保 聖子,^{1,3a*} 里見正隆,² 舊谷亜由美,²
仁部玄通,¹ 稲盛重弘,¹ 木村郁夫³

(2017 年 2 月 1 日受付, 2017 年 5 月 1 日受理, 2017 年 8 月 25 日 J-STAGE 早期公開)

¹鹿児島県水産技術開発センター, ²(国研)水産研究・教育機構中央水産研究所,

³鹿児島大学大学院連合農学研究科

Effect of essential oil from pomelo *Citrus grandis* on suppression of histamine accumulation
in dried whole red-eye round herring *Etrumeus teres*

SEIKO TAMOTSU,^{1,3a*} MASATAKA SATOMI,² AYUMI FURUTANI,²
HARUNAO NIBE,¹ SHIGEHIRO INAMORI¹ AND IKUO KIMURA³

¹Kagoshima Prefecture Fisheries Technology and Development Center, Ibusuki, Kagoshima 891-0315, ²National Research Institute of Fisheries Science, Japan Fisheries Research and Education Agency, Yokohama, Kanagawa 236-8648, ³The United Graduate School of Agricultural Sciences Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan.

A histamine-producing bacterium was isolated from dried whole red-eye round herring *Etrumeus teres* in which histamine accumulation had been observed. The closest phylogenetic neighbor of this bacterial strain was *Photobacterium angustum*, which shares a 99.15% similarity based on 16S rRNA gene sequencing. An essential oil prepared from pomelo *Citrus grandis* rind showed strong inhibition of growth of *P. angustum* isolated from dried whole red-eye round herring. Histamine accumulation was also strongly depressed in dried whole red-eye round herring by the addition of the essential oil to the brine used in the salting process. Application of this citrus essential oil therefore effectively suppresses histamine formation in whole dried red-eye round herring.

キーワード：ウルメイワシ, 柑橘精油, ヒスタミン, ヒスタミン生成菌, 丸干

我が国における 2015 年度に発生した食中毒のうち、ヒスタミン（以下 Hm という）が原因とされるものは、13 件で患者数は 405 名となっており、2011 年から 2015 年の 5 年間の平均患者数は、195 名である。¹⁾ しながら Hm 中毒は、その症状が比較的軽いこと等から食中毒としての届け出がない場合もあり、実態は統計上の数値よりも多いと推定されている。²⁾ Hm の蓄積は、Hm 生成菌の産生するヒスチジン脱炭酸酵素により遊離アミノ酸のヒスチジンが脱炭酸されヒスタミンを生成するためであり、²⁾ Hm 食中毒の原因食材のほとんどは、遊離アミノ酸のヒスチジンを多く含む赤身魚やその加工

品であるとされている。¹⁾ また、2011 年から 2012 年に農林水産省が実施した調査において、発酵食品やイワシ等を原料とした塩干品で Hm 濃度の高い製品が流通している実態が明らかにされた。³⁾ このうちイワシの塩干品は丸干のことを示し、その製法は、原料魚のイワシをそのままの形状で食塩水に一定時間浸漬した後水洗し、目や鰓を串に刺した後さらに軽く水洗し、上乾製品で 3 日間程度乾燥を行う。⁴⁾ 塩漬けの効果は、塩味を付ける以外にも魚から水分の一部を除去し、乾燥を早める効果があるが、近年では消費者の低塩分嗜好により、10% 程度の食塩水に 3 時間程度浸漬し、乾燥時間を 24 時間

程度と短くした製品も多く製造されている。原料魚には、マイワシ *Sardinops melanostictus*, ウルメイワシ *Etrumeus teres*, カタクチイワシ *Engraulis japonicus* が使用されるが、中でも脂質含量が低いウルメイワシの丸干は、高級品とされている。鹿児島県の北西部に位置する地域では、古くから地元で漁獲されるウルメイワシやカタクチイワシを原料とした丸干の製造が盛んであるが、食の安全を求める食品流通業界から、納品時に製品の Hm 濃度測定結果を求められるなど、製造業者はその対応に苦慮している。このような状況において、消費が低迷する国内から海外に新たな販路を求めようとする加工業者も出てきている。現在、我が国においては衛生・取扱基準に Hm の規制値は設けられていないが、Hm の規制値を設けている国もあり輸出のための水産物 HACCP 工場認可取得には、Hm のリスク管理が重要な項目となっており、丸干の海外展開への大きな障壁となっている。このような社会的背景から、いわし丸干製造における Hm 蓄積抑制技術の確立は急務となっている。これまで生鮮魚流通や発酵食品製造における好塩性 Hm 生成菌や Hm 生成菌の増殖特性に関しては多くの研究が報告されていて^{5,6-9)} 水産発酵食品では発酵スターターを利用した Hm 蓄積抑制技術の開発が進んでいる。⁹⁾ 一方、いわし丸干に関しては、Hm 食中毒事例の検証で、海洋細菌である *Photobacterium phosphoreum* が原因菌と推定された報告はあるものの、¹⁰⁾ 丸干の Hm 蓄積抑制に関しては原料の鮮度管理や製品の低温流通¹¹⁾ 以外の具体的な抑制技術は確立されていないのが実情である。本研究ではいわし丸干の中でも取扱量も多いウルメイワシを対象として、いわし丸干製造時における Hm 蓄積リスクの高い加工工程と生成原因や条件を明らかにし、Hm 蓄積を軽減するための実用的な技術を開発することを目的とした。近年、植物由来の精油には大腸菌やブドウ球菌などに対する殺菌効果や、¹²⁻¹⁴⁾ Hm 生成菌のヒスチジン脱炭酸酵素（以下 *hdc* という）活性阻害に関する報告¹⁵⁾ があることから、本研究では植物由来の精油の応用試験を行った。精油は鹿児島県の丸干製造が盛んな地区の柑橘郷土銘菓「文旦漬」の製造時に派生する文旦 *Citrus grandis* 果皮から製造されているものを用い、うるめいわし丸干から分離した Hm 生成菌に柑橘精油を添加し、増殖抑制効果と *hdc* 活性阻害作用の検証を行った。また、うるめいわし丸干製造工場で精油添加効果について実証試験を行ったので報告する。

材料と方法

丸干製造工場でのサンプリング 鹿児島県内のうるめいわし丸干製造工場において、原料魚及び塩水浸漬、水洗による塩抜きならびに乾燥の各工程終了時にウルメイワシを 5 尾ずつ採取した。サンプルはポリエチレン製

の保存袋に入れ氷蔵で鹿児島県水産技術開発センターに持ち帰り試験に供した。なお、サンプルは分析に供するまで -40°C で冷凍保存した。

Hm 蓄積量の測定 半解凍状態で 1 尾ずつミンチにし、ミンチ肉 2 g に 8 倍量のイオン交換水を加え、ポリトロンホモジナイザー（KINEMATICA 製 PT2500E）でホモジネートし、遠心分離（ 4°C , 10,000 rpm, 5 分間）により上清を得た。得られた上清を Histamarine kit（Beckman Coulter）を用いた ELISA 法により反応させマイクロプレートリーダー（東ソー MPR-A4i）にて 400 nm における吸光度を測定し、Hm 標準液の濃度と吸光度から作成した検量線により Hm 濃度を求めた。

水分量と塩分濃度の測定 使用したミンチ肉の水分は常圧加熱乾燥法（ 105°C ）で測定した。塩分濃度はミンチ肉を 8 倍量のイオン交換水でホモジネートし塩分計（アタゴ製 PAL-ES1）で測定した。

丸干製造モデル試験 乾燥工程における好塩性細菌数、Hm 生成菌数、Hm 蓄積量、塩分濃度及び水分活性の変化を把握するために製造モデル試験を実施した。

供試魚 鹿児島県西方海域で漁獲され鹿児島県水産技術開発センターに氷蔵で搬送したウルメイワシ（被鱗長 16.6 ± 1.1 cm, 体重 63.5 ± 12.7 g）46 尾を使用した。なお、26 尾は製造モデル試験に、残りの 20 尾は Hm 生成菌の接種試験に用いた。

丸干の試作 冷水で原料ウルメイワシを洗浄した後、冷 10% 食塩水に 5 時間浸漬した。その後、冷水で洗浄し水切りを行い、冷風乾燥機（ユニマック製 SD-50）を使用して 20°C で 24 時間及び 72 時間乾燥して丸干を試作し分析に供した。

好塩性細菌数、Hm 生成菌数及び Hm 蓄積量の測定 細菌数の測定は、サンプルの頭と尾鰭を外し、各 5 尾を個別に分析した。ミンチ肉 4 g を Satomi *et al.*¹⁶⁾ および木村⁹⁾ の方法に準じ、0.5% L-ヒスチジン塩酸塩及び 1.5% 食塩を添加したトリプチケースソイブロス（以下 TSB という）36 mL を添加し、 30°C で 48 時間培養後の濁度から最確数（MPN）法¹⁷⁾ により好塩性細菌数を求めた。また、Hm 生成菌数については、好塩性細菌数の測定に用いた培地の中からチェックカラーヒスタミン（キッコーマン製）により黄色く呈色したものを Hm の生成が確認できたものとして、^{9,16)} 最確数（MPN）法¹⁷⁾ を用いて求めた。また Hm 蓄積量はサンプルの頭と尾鰭を外し、各工程で 5 尾ずつミンチにし、前述の Histamarine kit（Beckman Coulter）を用いた ELISA 法により 1 個体ごとに測定し、5 尾の平均値を表記した。

塩分濃度と水分活性の測定 サンプルは胸鰭までの頭部と腹鰭から以降の尾鰭を切り外した胴体部分の脊椎骨より腹肉側をミンチにした。塩分濃度は、ミンチに 8 倍量のイオン交換水を加えホモジネートし塩分計で測定

した。また、水分活性は簡易コンウェイ・ユニット法¹⁸⁾により測定した。

試作丸干からの Hm 生成菌の分離 Hm 生成菌数測定に用いた MPN 試験液のうち Hm の生成が認められた培地を選抜し、限界希釈法¹⁶⁾により Hm 生成菌を分離し、簡易同定用のサンプルとした。また、分離した菌は Satomi *et al.*¹⁶⁾ の手法に準じ、0.5% L-ヒスチジン塩酸塩及び 1.5% 食塩を添加した TSB 培地で 30℃ にて 22 時間培養し、分離菌の Hm 生成量を測定した。

Hm 生成菌の簡易同定 Hm 生成菌株の簡易同定は 16S rRNA 遺伝子塩基配列による分子解析により行った。0.5% L-ヒスチジン塩酸塩及び 1.5% 食塩を添加したトリプチケースソイアガー (TSA) 平板培地上で発育させた Hm 生成菌の 1 コロニーを 1 白金耳かきとり、1% TritonX-100 を加えた TE 緩衝液 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) に懸濁し、100℃ で 5 分間加熱した。加熱後直ちに氷冷し、クロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) を等量加え混合し、遠心分離にて上清を回収し、PCR の鋳型 DNA とした。細菌 DNA の 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅は、真正細菌ユニバーサルプライマーである 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1492R (5'-TTACCTGTTACGACTT-3') を用いて行った。¹⁹⁾ 得られた増幅産物の確認は 1.5% アガロースゲル電気泳動後、ゲルを臭化エチジウムにて染色して行った。PCR により増幅された 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の配列を DNA シーケンサー (Applied Biosystems, Foster City, CA) により決定し、Genbank, EMBL および DDBJ のデータベースの BLAST アルゴリズム²⁰⁾により既知の配列との相同性を検索し、近縁種を推定した。

Hm 生成菌の増殖温度依存性 0.5% L-ヒスチジン塩酸塩及び 1.5% 食塩を添加した TSB 培地 25 mL に試作丸干から分離した Hm 生成菌液 0.075 mL (10^7 cfu/mL) を添加し、15, 20, 25, 30℃ で培養し、経時的に培地の濁度 (O.D. 600 nm) をマイクロプレートリーダー (東ソー 製 MPR-A4i) にて測定した。

丸干から分離した Hm 生成菌のウルメイワシ肉への接種試験 ウルメイワシの背肉を滅菌リン酸緩衝液で洗浄し、3% 食塩水に 1 時間浸漬後 -35℃ で冷凍保管した。2 日後に半解凍状態でフードプロセッサー (Panasonic MK-K60P) を用いてミンチ肉を調製した。ミンチ肉 30 g を 2 等分し、一方は試作丸干から分離し予め 10^7 cfu/mL に調整した Hm 生成菌を 2 mL 接種し 20℃ で 24 時間保存し Hm 濃度を測定した。残りのミンチ肉は対照試験に供した。

柑橘精油 鹿児島県内で菓子製造時に派生する文旦果皮を圧搾、遠心分離して製造される文旦精油を購入し使用した。

Hm 生成菌に対する柑橘精油の増殖抑制試験 0.5% L-ヒスチジン塩酸塩及び 1.5% 食塩を添加した TSB 培地 5 mL に試作丸干から分離した Hm 生成菌液 0.015 mL (10^7 cfu/mL) を接種した。接種後の培地を十分に攪拌し、直ちに柑橘精油を培地に対して 0.5, 1.0, 2.0, 4.0% 量添加し攪拌した。それぞれ 30℃ に温度設定した光学検出器付き小型振盪培養器 (ADVANTEC 製 TN-1506) を用いて培養を開始し、経時的に培地の濁度を (O.D. 660 nm) 計測した。

Hm 生成菌の hdc に対する柑橘精油の阻害作用測定

1. hdc 粗酵素液の調製 0.5% L-ヒスチジン塩酸塩及び 1.5% 食塩を添加した TSB 培地 5 L に丸干から分離した Hm 生成菌液 6.5 mL (10^7 cfu/mL) を加え、30℃ で 8 時間培養した。この培地を遠心分離 (8,000 rpm, 10 分, 4℃) して菌体を得た。得られた菌体は滅菌リン酸緩衝液で 2 回洗浄した。その後 200 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.3) を加え水中で超音波ホモジナイザー (トミー精工製 UD-21P) を用いて粉碎した後、遠心分離 (8,000 rpm, 10 分, 4℃) により得られた上清をタンパク質濃度が 1.5 mg/mL になるように調整し粗酵素液とした。

2. 酵素反応 25 mM L-ヒスチジン塩酸塩と 200 mM 酢酸アンモニウム混合液 (pH 5.0) を酵素基質とした。基質 0.8 mL に粗酵素液 0.2 mL と柑橘精油 0.2 mL を加え、35℃ で反応を開始し、15 分後に 16% (w/w) トリクロロ酢酸を加え反応を停止させた。その後生成した Hm を Histamarine kit (Beckman Coulter) による ELISA 法で測定した。柑橘精油を加えずに同様の酵素反応を行ったものを対照として上井ら¹⁵⁾の方法に準じて残存活性として表した。

柑橘精油による実証化試験 うるめいわし丸干製造工場において、通常の丸干製造とともに柑橘精油を添加した丸干を製造した。すなわち、塩水浸漬工程において漬け込み塩水の 0.5% 量の柑橘精油を添加し適時攪拌を行いながら 3 時間浸漬をした。その後 20℃ で 20 時間の乾燥を行った。製造後直ちに凍結処理を行い分析に供するまで -25℃ で冷凍保管した。

統計処理 得られたデータは、エクセル統計 2010 ソフト (社会情報サービス製) を用い等分散であることを確認したうえで一元配置分散分析による多重比較検定 (Bonferroni's) または *t* 検定を行い評価した。

結 果

加工工程ごとの Hm 蓄積実態調査 丸干製造工場でサンプリングした原料魚及び各工程終了後のサンプルの水分量 (%) 及び塩分濃度 (%) を Table 1 に Hm 蓄積量を Fig. 1 にそれぞれ示す。水分量 (%) は原料魚から塩抜き工程までは $70.5 \pm 1.0\%$ から $74.5 \pm 4.0\%$ の

Table 1 Moisture and salinity of fish in process of producing dried whole red-eye round herring

	Raw fish	Salted fish	Desalinated fish	Dried whole fish
Moisture (%)	72.7 ± 2.0	70.5 ± 1.0	74.5 ± 4.1	59.6 ± 2.2
Salinity (%)	0.88	2.9 ± 0.2	1.7 ± 0.3	4.0 ± 0.6

Values are mean ± standard deviation ($n=5$).

Fig. 1 Histamine content in fish for each process of producing dried whole red-eye round herring. Values are mean ± standard deviation ($n=5$). Different letters (a, b) indicate significant differences ($p<0.01$).

範囲内であり, 乾燥工程を経て $59.6 \pm 2.2\%$ に減少した。塩分濃度 (%) は塩水浸漬後で $2.9 \pm 0.2\%$ となった。塩抜き後に $1.7 \pm 0.3\%$ と低くなり, 乾燥工程後は水分量の低下に伴い $4.0 \pm 0.6\%$ まで高くなった。Hm 蓄積量は原料魚, 塩水浸漬後, 塩抜き後でそれぞれ 0.77 ± 0.11 ppm (乾物換算 2.85 ± 0.54 ppm), 0.85 ± 0.13 ppm (乾物換算 2.87 ± 0.34 ppm), 0.71 ± 0.05 ppm (乾物換算 2.82 ± 0.34 ppm) と低かったが, 乾燥工程を経ると 83.86 ± 75.24 ppm (乾物換算 206.04 ± 185.86 ppm) と有意に高くなった ($p<0.01$)。

乾燥工程による好塩性細菌数, Hm 生成菌数, Hm 蓄積量, 塩分濃度及び水分活性の変化 丸干モデル試験の各工程における好塩性細菌数及び Hm 生成菌数の結果を Figs. 2, 3 に Hm 蓄積量を Fig. 4 に示す。原料魚の好塩性細菌数は 3.60 ± 0.44 log MPN/g であったが, 24 時間及び 72 時間乾燥後にはそれぞれ 7.96 ± 0.41 log MPN/g, 8.61 ± 0.50 log MPN/g と有意に増加した ($p<0.01$)。なお, 24 時間乾燥と 72 時間乾燥について比較したが乾燥時間が増えても菌数に有意な変化は認められなかった。一方, Hm 生成菌数については原料魚で 2.14 ± 1.09 log MPN/g であったが, 24 時間及び 72 時間の乾燥工程後の Hm 生成菌数はそれぞれ 7.76 ± 0.54 log MPN/g, 8.13 ± 0.72 log MPN/g と有意に増加した ($p<0.01$)。なお, 原料魚の Hm 蓄積量は 0.36 ± 0.13 ppm (乾物換算 1.43 ± 0.46 ppm) で低い値を示した。一方 24 時間乾燥後には 290.27 ± 153.47 ppm (乾物換算

Fig. 2 Effect of drying process time on the growth of halophilic bacteria. The viable cell count of halophilic bacteria in raw fish of red-eye round herring, and dried whole red-eye round herring dried for 24 h and 72 h at 20°C was measured. Values are mean ± standard deviation ($n=5$). Different letters (a, b) indicate significant differences ($p<0.01$). **Fig. 3** Effect of drying process time on the growth of histamine-producing bacteria. The viable cell count of histamine-producing bacteria in the same materials used in Fig. 2 was measured. Values are mean ± standard deviation ($n=5$). Different letters (a, b, c) indicate significant differences ($p<0.01$).

907.66 ± 497.85 ppm) となり 72 時間乾燥後では 3934.03 ± 645.50 ppm (乾物換算 10306.17 ± 2034.35 ppm) と乾燥時間が長くなるにつれ有意に増加した ($p<0.01$)。また, 試作丸干の原料魚, 24 時間乾燥後及び 72 時間乾燥後の塩分濃度と水分活性を Table 2 に示す。塩分濃度は, 原料魚で $0.4 \pm 0.1\%$, 24 時間乾燥後で $3.3 \pm 0.2\%$, 72 時間乾燥後で $4.2 \pm 1.2\%$ であった。水分活性は原料魚で 0.96 ± 0.01 であり 24 時間乾燥後で

Fig. 4 Effect of drying process time on histamine accumulation in dried whole red-eye round herring. The histamine content in the same materials used in Fig. 2 was measured.

Table 2 Salinity and water activity of fish in process of producing dried whole red-eye round herring

	Raw fish	Dried whole fish	
		24 h	72 h
Salinity (%)	0.4±0.1	3.3±0.2	4.2±1.2
Water activity	0.96±0.01	0.95±0.00	0.93±0.01

Values are mean±standard deviation ($n=3$).

0.95±0.00, 72 時間乾燥後で 0.93±0.01 となった。乾燥工程を経て塩分濃度が高くなり水分活性は低くなったが、24 時間乾燥では微生物の増殖が可能な値であった。

試作丸干の Hm 生成菌の簡易同定 試作丸干から検出された Hm 生成菌は 30℃ 7 時間の培養条件で 62.8 ppm の Hm 生成を示し、分離株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列は *Photobacterium angustum* (以下 *P. angustum* という) のものと最も近く 99.15% の相同性を示し、本菌種であると推定された。

丸干から分離した Hm 生成菌の増殖温度依存性 培養温度と *P. angustum* の増殖の関係を Fig. 5 に示す。15℃ から 30℃ の培養では温度が高いほど増殖速度が速かった。一方で、15℃ でも速度は遅いものの増殖することが確認された。

試作丸干から分離した Hm 生成菌のウルメイワシ肉への接種試験 Hm 生成菌を接種したミンチ肉 (肉玉) を 20℃ で 24 時間保持した際の Hm 濃度は 105.01 ppm であり、Hm 生成菌を接種しなかった場合の Hm 濃度は検出限界以下であった (図示しない)。このことから、試作丸干から分離された Hm 生成菌 (*P. angustum*) はウルメイワシの肉中で Hm を生成することが確認された。

丸干から分離した Hm 生成菌に対する柑橘精油の増

Fig. 5 Effect of temperature on the growth of histamine-producing bacteria. Bacteria growth in TSB broth added with 0.5% L-histidine hydrochloride and 1.5% sodium chloride was measured by optical density at 600 nm during cultivation at 15 (open circles), 20 (filled circles), 25 (filled triangles) and 30°C (open triangles).

Fig. 6 Effect of citrus essential oil on the growth of histamine-producing bacteria. Bacteria growth in TSB broth added with 0.5% L-histidine hydrochloride and 1.5% sodium chloride was measured by optical density at 660 nm during cultivation at 30°C. Open circles, without treatment with essential oil from pomelo; closed circles, with treatment with 0.5% essential oil from pomelo.

増殖抑制効果検証 *P. angustum* の増殖に対する柑橘精油添加の効果を Fig. 6 に示す。*P. angustum* を接種した柑橘精油無添加の培地では培養時間の経過とともに吸光度が上昇し増殖が確認された。一方、柑橘精油を 0.5, 1.0, 2.0, 4.0% 添加したものは添加量に関わらず全ての培地で培養時間が経過しても吸光度は上昇せず *P. angustum* の増殖は抑制された (図には 0.5% の添加結果を示す)。また、30℃ で 23 時間培養した時の培地の Hm 蓄積量は柑橘精油無添加で 197.91 ppm, 0.5% 添加で 0.79 ppm となり、柑橘精油添加により Hm 生成が抑制された。

丸干から分離した Hm 生成菌の hdc に対する柑橘精油の活性阻害 前述のとおり柑橘精油添加により *P. an-*

Fig. 7 Effect of treatment with essential oil from pomelo on histamine accumulation in dried whole red-eye round herring products. The dried whole products of red-eye round herring were produced in a fishery factory. The treatment with essential oil from pomelo was done in the salting process with 0.5% essential oil for 3 h. Then, the fish was dried for 20 h at 20°C. Open circles, without treatment with essential oil from pomelo, closed circles, with treatment with essential oil from pomelo.

gustum の増殖と Hm 生成の抑制効果が認められた。次に *P. angustum* の *hdc* を柑橘精油が阻害するかについて *P. angustum* の *hdc* 粗酵素液を使って測定を行った。その結果, *hdc* 粗酵素反応系に柑橘精油を添加しても Hm の生成はわずかしかな抑制されず, *hdc* の残存活性は 89% であった (図示しない)。

実証化試験 丸干工場で行った実証化試験で得られた丸干の Hm 蓄積量の分析結果を Fig. 7 に示す。通常製品では最大で Hm 濃度 27.59 ppm で平均 17.0 ± 8.44 ppm であったのに対し柑橘精油を添加したものは, 最大で 2.93 ppm, 平均で 1.57 ± 0.40 ppm と Hm 蓄積量は有意に低かった ($p < 0.01$)。

考 察

うるめいわし丸干製造の加工工程での Hm 蓄積の実態調査により, 乾燥工程を経ると Hm 濃度が急激に上昇することが確認された。また, 丸干製造モデル試験の結果では, 原料魚に存在する好塩性細菌のうち約 10% が Hm 生成菌であった。原料魚の Hm 生成菌数は $2.14 \pm 1.09 \log \text{MPN/g}$ であったが, 乾燥工程を経ると Hm 生成菌の比率は高まった。Hm 生成菌数は 24 時間乾燥で $7.76 \pm 0.54 \log \text{MPN/g}$, 72 時間乾燥で $8.13 \pm 0.72 \log \text{MPN/g}$ と有意に増加し, これに対応するように Hm 蓄積量も原料魚では 1 ppm 未満であったが, 24 時間乾燥後で約 290 ppm, 72 時間乾燥後には約 3900 ppm と有意に高くなった (Figs. 2-4)。これらのことから, 20°C における乾燥工程が Hm 生成菌の増殖ならびに Hm の蓄積に影響を与えることが明らかとなった。Hm 生成には Hm 生成菌の関与が知られているが,²¹⁾ 本

研究におけるうるめいわし丸干からは海洋性細菌の一種でグラム陰性菌の *P. angustum* が検出された。一般に細菌の生育には最低限必要な水分活性が存在する。²²⁾ 浜谷ら²³⁾ はシメサバを用いた Hm 生成菌に対する水分活性の影響を調べた結果, 水分活性が 0.95 では増殖し, 0.93 以下で増殖が抑制されたことを報告している。本研究で使用した丸干の腹側における水分活性は 24 時間乾燥後で 0.95 ± 0.00 と高く, 72 時間乾燥でも 0.93 ± 0.01 とサンプルによっては, 0.94 以上となるサンプルも確認された。本研究で水分活性が高かった理由は, 近年の消費者嗜好に伴う魚肉加工品の低塩分化による脱水効果の低下と内臓を含んだまま製造されるため腹部の水分が蒸発しにくいことが影響していると考えられる。モデル試験の結果から乾燥後のウルメイワシには, 好塩性細菌及び Hm 生成菌が 7-8 log MPN/g 程度存在し, さらに乾燥後の塩分濃度が 3.3% から 4.2% であったことから乾燥中の魚体内は海洋性細菌や Hm 生成菌が増殖し易い環境になっていることが示された。これらのことから, 20°C 乾燥中でもウルメイワシ魚体中は, Hm 生成菌にとって高い水分活性と適度な塩分濃度および温度の環境にあり, *P. angustum* が増殖し, Hm が蓄積するのに十分な条件が揃っていることが推察される。本研究において Hm が蓄積したうるめいわし丸干から検出された Hm 生成菌は, 簡易同定の結果 *P. angustum* と推定され, 分離菌のウルメイワシ肉への接種試験の結果も接種後 Hm の蓄積が認められたことから, 本研究においてうるめいわし丸干で蓄積した Hm の原因は *P. angustum* である可能性が極めて高いことが示唆された。また, 本研究で丸干から分離された *P. angustum* の Hm 生成量は培地中で 197.91 ppm とやや高い値を示した。流通している丸干では 420-4500 ppm のように高濃度の Hm の蓄積が確認されることがあり,^{10,24)} Hm を蓄積したうるめいわし丸干から *P. phosphoreum* 及び *P. damsela* が検出されたとの報告がある。^{10,24)} Hm 生成菌として本研究で確認された *P. angustum* および, すでに報告されている *P. phosphoreum*, *P. damsela* とともに海洋性細菌であることから餌の捕食時にウルメイワシ体内に取り込まれる可能性があり, また丸干製造における魚肉の塩分濃度や乾燥温度条件は, いずれの細菌も丸干製造中に増殖可能な条件である。したがってうるめいわし丸干における Hm 蓄積の原因菌はこれら *Photobacterium* 属の海洋細菌の関与が大きいと推察される。うるめいわし丸干製造中においては, 魚体内に Hm 生成菌が存在し増殖環境が整えば Hm が高濃度に蓄積するリスクが高いことが本研究で明らかにされたことから, 乾燥工程における Hm 生成菌の増殖を阻止するか, もしくは, Hm 生成菌の *hdc* 酵素活性を阻害することにより Hm の蓄積を抑制する必要がある。植物精油には, 植物自体を微生物が

ら守るための抗菌作用を持つことが知られている。²⁵⁾ 本研究では植物精油のうち、鹿児島県で生産されている柑橘精油について検討した。丸干から分離した *P. angustum* の培養試験において、柑橘精油は強い増殖抑制作用を示した。本研究で使用した柑橘精油は柑橘の一種である文旦果皮から抽出されたもので、成分組成はリモネン (70%), γ -テルピネン (14%), α -ピネン (3%) である。²⁶⁾ リモネンは、単環系モノテルペンの一つであり、植物病原糸状菌に対して抗菌作用があることが報告されている。²⁷⁾ 一方、上井ら²⁸⁾は精油に含まれる各成分について Hm 生成菌に対する抗菌力を最小発育阻止量から調べ、グラム陰性菌である *Morganella morganii* NBRC3848 及び *Raultella planticola* NBRC3317 に対して抗菌力が低いことを報告している。一方、本研究では、文旦由来の柑橘精油はグラム陰性菌である *P. angustum* の増殖を強く抑制する結果が得られた。丸田ら¹⁴⁾は、テルピネンを主成分とするティートリー (tea-tree) 精油がグラム陰性菌であるネズミチフス菌に対して強い抗菌作用を有し、精油の主成分だけでなく複数の成分の相互作用を受けている可能性を報告し、また岡村ら¹²⁾は間伐材精油を用いた試験でグラム陽性菌及びグラム陰性菌の両方に抗菌力を示し、その主要な成分はモノテルペン炭化水素であることを報告している。これらのことから、本研究でグラム陰性菌の *P. angustum* に対して強い増殖抑制作用を示したことは精油中の単一成分での試験ではなく各成分を含んだ柑橘精油を用いたためと推察している。すなわち、柑橘精油にはリモネン、 γ -テルピネン、 α -ピネンといったモノテルペン炭化水素が約 90% 含まれており、これらの相互作用により強い増殖抑制作用を示したものと推察している。一方、*P. angustum* の *hdc* 酵素に対する柑橘精油の阻害作用については、残存活性が 89% であり、わずかな阻害であった。この結果は、上井らのリモネン、1,8-シネオール、リナロールを用いた研究報告¹⁵⁾と一致した。精油成分は、細胞膜の脂質 2 重層構造に入り込みやすく、モノテルペン炭化水素の分子量が小さいために皮膚への浸透性に優れているとされている。²⁹⁾ 本研究で行った製造現場での実証試験において、塩水浸漬工程で食塩水に柑橘精油を添加し魚体に柑橘精油を接触させた。その結果、柑橘精油を添加したものは、柑橘精油を添加しないものに比べて有意に Hm の蓄積が少なく、1 ppm 程度であった。このことは、約 3 時間の塩水浸漬時間で柑橘精油が魚体中に浸透し、乾燥工程での Hm 生成菌の増殖が抑制されたために Hm がほとんど蓄積しなかったものと推察している。文旦精油による Hm 生成菌の増殖抑制メカニズムについては更に検討を行う予定である。本研究からうるめいわし丸干の Hm 蓄積抑制にとって柑橘精油の応用は有効な手段と成り得ることが明

らかとなった。今後は *P. angustum* 以外の *Photobacterium* 属の海洋細菌に対しても同様の試験を行い、柑橘精油によるうるめいわし丸干の Hm 蓄積抑制効果を確認する予定である。

謝 辞

本研究の一部は、「平成 23 年度有害化学物質リスク管理基礎調査事業」により行われた。本研究の遂行にあたり、貴重なご助言、ご指導を賜った鹿児島大学大学院連合農学研究科安部淳一教授、上西由翁教授、前田広人教授、塩崎一弘准教授に厚く御礼申し上げる。また、柑橘精油の実用試験にご協力賜った株式会社下園薩男商店様、供試魚の入手等ご尽力頂いた鹿児島県水産技術開発センター野元聡氏、小路口拓輝氏、天野裕平氏、福元亨介氏にこの場を借りて、心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) 厚生統計要覧. 厚生労働省, 東京. 2015.
- 2) 藤井建夫. アレルギー様食中毒の現状と対策. 「月刊フードケミカル」株式会社食品化学新聞社, 東京. 2009; 71-78.
- 3) 有害化学物質含有実態調査結果データ集, 農林水産省, 東京. 2011-2012.
- 4) 網仲 仁. いわし丸干し. 「全国水産加工品総覧」(福田裕, 山澤正勝, 岡崎恵美子監修)光琳, 東京. 2005; 32-34.
- 5) Okuzumi M, Awano M, Ohki Y. Effects of temperature, pH value and NaCl concentration on histamine formation of N-group bacteria (psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria). *Nippon Suisan Gakkaishi* 1984; doi:10.2331/suisan.50.1757 (in Japanese with English abstract).
- 6) Kurihara K, Wagatsuma Y, Fujii T, Okuzumi M. Effect of culture conditions on L-histidine decarboxylation activity of halophilic histamine-forming bacteria. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; doi:10.2331/suisan.59.1401 (in Japanese with English abstract).
- 7) Morii H, Cann D, Taylor L. Histamine formation by luminous bacteria in mackerel stored at low temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; doi:10.2331/suisan.54.299.
- 8) Yoguchi R, Okuzumi M, Fujii T. Seasonal variation in number of halophilic histamine-forming bacteria on marine fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; doi:10.2331/suisan.56.1473 (in Japanese with English abstract).
- 9) Kimura M, Furutani A, Fukui Y, Shibata Y, Nei D, Yano Y, Satomi M. Isolation and identification of the causative bacterium of histamine accumulation during fish sauce fermentation and the suppression effect of inoculation with starter culture of lactic acid bacterium on the histamine accumulation in fish sauce processing. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2015; doi:10.2331/suisan.81.97 (in Japanese with English abstract).
- 10) 神吉政史. ヒスタミン食中毒原因菌の特定および赤身魚でのヒスチジン脱炭酸酵素の役割. 博士論文, 大阪府立大学, 大阪. 2007.
- 11) ヒスタミン食中毒防止マニュアル. 社団法人日本水産会, 東京. 2009.
- 12) 岡村健司, 村上結城, 岡田芳治, 野村正人. 間伐材精油

- の化学成分とその生理活性について. 近畿大学工学部研究報告 2014; **48**: 1-11.
- 13) 芋川 浩, 今浪愛里. 精油 (ティートリーとラベンダー) の抗菌効果の検討 その 1. 福岡県立大学看護学研究紀要 2014; **11**: 63-70.
- 14) 丸田直子, 里村洋明, 前田詠里子, 西田雅博, 世良暢之. 精油の腸管系病原性微生物に対する抗菌活性について. 福岡県保健環境研究所年報第 43 号 2016; 70-75.
- 15) 上井恵理, 寺田 岳, 秋山純基, 一色賢司. 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. 食品衛生学会誌 2011; **52**: 271-275.
- 16) Satomi M, Furushita M, Oikawa H, Yoshikawa-Takahashi M, Yano Y. Analysis of a 30 kbp plasmid encoding histidine carboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce. *Int. J. Food Microbiol.* 2008; **126**: 202-209.
- 17) 日本薬学会編. 衛生試験法・注解. 金原出版株式会社, 東京. 2000; 53-56.
- 18) 日本薬学会編. 衛生試験法・注解. 金原出版株式会社, 東京. 2000; 159.
- 19) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol* 1991; **173**: 697-703.
- 20) Altschul SA, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; **215**: 403-410.
- 21) 山中英明, 藤井建夫, 塩見一雄. 化学性食中毒. 「食品衛生学」恒星社厚生閣, 東京. 2012; 99-128.
- 22) 横関源延. 微生物の発育と水分活性. 「食品の水」恒星社厚生閣, 東京. 1973; 138-147.
- 23) Hamatani Y, Furutani A, Fukui Y, Takewa T, Satomi M. Growth characteristics of histamine-producing lactic acid bacteria isolated from marinade broth in shimesaba production. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2014; doi:10.2331/suisan.80.956 (in Japanese with English abstract).
- 24) 新井輝義, 池内容子, 岸本泰子, 石崎直人, 柴田幹良, 舘 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. 卸売市場で流通する鮮魚, 魚介類加工品及び漬け水のヒスタミン生成菌汚染状況. 東京都健康安全研究センター研究年報 2007; 58.
- 25) 中坪文明. 「木の顔」(日本木材学会抽出成分と木材利用研究会編)海青社, 滋賀. 2002; 3-4.
- 26) 近森麻矢, 村井正徳, 浜田和秀, 山中恭二, 山中義也. マイクロ波加熱蒸留により抽出した高知県産柑橘精油の評価. 高知県工業技術センター研究報告 2011; **42**: 29-32.
- 27) 藤岡佳代子. リモネンによる病原性糸状菌の病原性制御と宿主植物における誘導抵抗性に関する研究. 博士論文, 岡山大, 岡山. 2016.
- 28) 上井恵理, 寺田 岳, 横山純基, 一色賢司. 柑橘成分蒸気を用いたヒスタミン産生菌の制御. 食品衛生学会誌 2011; **52**: 276-280.
- 29) 丸山奈保, 安部 茂. 植物精油の抗真菌・抗炎症効果—真菌感染症への可能性—. *J. Japan Association on Odor Environment* 2012; **43**: 199-210.