しめさば調味液から分離された乳酸菌のヒスタミン生成特性について

浜谷 祐司,¹ 本田 (舊谷) 亜由美,² 福井 洋平,²
矢野 豊,³ 武輪 俊彦,¹ 里見 正隆^{4*}

(2019 年 10 月 29 日受付, 2020 年 1 月 14 日受理, 2020 年 3 月 31 日 J-STAGE 早期公開)

¹武輪水産株式会社, ²(国研)水産研究・教育機構 中央水産研究所, ³同 北海道区水産研究所, ⁴同 増養殖研究所

Characteristics of histamine production on lactic acid bacteria isolated
from marinade broth in *shimesaba* production

YUJI HAMAYA,¹ AYUMI HONDA-FURUTANI,² YOUHEI FUKUI,² YUTAKA YANO,³
TOSHIHIKO TAKEWA¹ AND MASATAKA SATOMI^{4*}

¹Takewa Suisan Co., Ltd., Hachinohe, Aomori 031-0841, ²National Research Institute of Fisheries Science, Japan Fisheries Research and Education Agency, Yokohama, Kanagawa 236-8648, ³Hokkaido National Fisheries Research Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, Sapporo, Hokkaido 062-0922, ⁴National Research Institute of Aquaculture, Japan Fisheries Research and Education Agency, Minami-izu, Shizuoka 415-0156, Japan

To investigate the conditions for histamine production on lactic acid bacteria isolated from a marinade broth accumulating histamine in *shimesaba* production, the characteristics of growth and histamine production in the isolates were studied. Nineteen strains capable of producing histamine were isolated from a marinade broth by using the aerobic plate count with anaerobic culture method and the members of lactobacilli were identified based on the phenotypic characteristics. The closest phylogenetic neighbor of the strains was *Lactobacillus otakiensis* sharing 100% similarity based on 16S rRNA gene sequence. The strains harbored a pyruvoyl dependent histidine decarboxylase gene. Growth of the strains was inhibited by low pH (below 3.6), low water activity (below 0.939), high salt concentration (above 10%), and supplementation of 2% acetic acid (final concentration). However, all of the strains were able to grow in MRS broth of pH 5.7 at below 8°C and produce histamine within 4 weeks of cultivation. To prevent histamine accumulation in *shimesaba* production, it is necessary to apply a combination of bacteriostatic conditions, low pH (around 4.0), low temperature (below 8°C), and an appropriate concentration of vinegar, to preserve marinade broth based on the hurdle technology theory.

キーワード : *Lactobacillus*, しめさば, 調味液, 乳酸菌, ヒスタミン生成菌, ヒスチジン脱炭酸酵素

しめさばは日本の伝統的な水産加工食品の一つで、サバフィレを塩漬けたのち、食酢を主成分とする調味液に浸漬して製造される。¹⁾ 日本では、青森県八戸市近辺がしめさばの一大産地であり、年間生産量は 5,000–6,000 t にもおよぶ。²⁾ 伝統的なしめさば製造では、原料魚としてマサバを使用し、3 枚におろしてフィレを作製した後、魚肉重量と同量の 10% 食塩水に 24 時間浸漬し塩漬処理を行う。塩漬後、水切りした魚肉重量と同量の調味液（醸造酢、水、白砂糖など）に 24 時間浸漬

し、水切り後魚肉の皮を除去し、真空包装して完成品となる。調味料由来の酸味（酢酸の終濃度は約 2%）とサバの濃厚な呈味性が特徴である。食酢の添加は呈味性の付与のほかに、酢酸による pH 低下（約 4.0）および酢酸自身の抗菌性により保存期間の延長に寄与している。³⁾ 近年では、HACCP の導入、輸出品としての衛生管理の徹底などにより、全ての製造工程は低温室で行われ、製造物も冷蔵・冷凍で流通されることが多くなった。しかしながら、しめさば製造においては、遊離のア

ミノ酸としてヒスチジンを多く含み、鮮度低下が速いサバ属魚類を原料とする製品が多いため、ヒスタミン食中毒への対策が重要である。¹⁾ また、伝統的な製法では調味液を数か月から半年程度、食酢などの原材料を補充しながら繰り返し使い続けることもあり、調味液の保存性について科学的に検討する必要がある。

ヒスタミンは分子式 $C_5H_9N_3$ 、分子量 111.14 のバイオジェニックアミンの一種で、ヒスチジンの脱炭酸反応で誘導される。無色、無臭で一般的な加熱調理では分解しない。⁴⁾ ヒスタミンはアレルギー様食中毒の原因物質で、人間が大量に摂取すると発疹、顔面紅潮、血圧低下を引き起こす。水産物、特に鮮度の落ちた赤身魚などで蓄積されやすい。^{4,5)} 食品中のヒスタミンはヒスチジン脱炭酸酵素 (EC.4.1.1.22) を持つ微生物により変換されて生成するものであり、鮮魚や加工度の低い水産物では、腸内細菌科細菌や海洋性の *Photobacterium* 属が、発酵食品では、乳酸菌や *Staphylococcus* 属が原因細菌として報告されている。^{4,6-20)} 日本では食品中のヒスタミン量についての基準値は設定されていないが、FDA, CODEX など海外の国や機関では基準値が設定されている。⁴⁾ そのため、本物質の制御は水産加工分野において重要である。特に、サバを原料とするしめさば製造においてヒスタミンは重要な危害因子として認識され、ヒスタミン生成菌の動態把握、ヒスタミン蓄積抑制手法の開発が望まれている。¹⁾

鮮魚貯蔵中のヒスタミン生成菌の動態およびヒスタミンの蓄積に関する研究^{13,21-24)} は豊富にあるが、しめさば製造時のヒスタミン生成原因菌についての報告は少ない。Furutani *et al.*²⁵⁾ は代表的なグラム陰性ヒスタミン生成菌をサバフィレーに接種し、しめさば製造中でのこれらの菌群の挙動を追跡したが、塩蔵および調味液浸漬工程で細菌の増殖は見られず、製品の貯蔵試験においてもヒスタミンの著しい蓄積は認められなかったとしている。つまり、しめさば製造時に低温を維持し、適正濃度の食酢を添加する事で一般的なヒスタミン生成菌の増殖は抑制されていることを示している。しかしながら、実際の生産現場で使用されたしめさば調味液を長期間保存した際のヒスタミン量の変遷についての知見はない。

本研究では、しめさば製造工場において使用された調味液の保存試験を行い、このような低い pH 環境で酢酸を含有している条件で生存するヒスタミン生成微生物を分離し、さらには原因微生物のヒスタミン生成特性を調べることを目的とした。

材料と方法

しめさば調味液 しめさば製造工場で使われた調味液 (砂糖 20%, 食酢 17%, 食塩 3%, 調味料 3%, pH 4.1) を使用後 6 か月間 10°C にて貯蔵し、ヒスタミンの

蓄積、一般生菌数、嫌気性細菌数を測定した。ヒスタミンの蓄積が観察された調味液検体をヒスタミン生成菌分離のための試料とした。なお、使用した食酢の酢酸濃度は約 10% で、調味液の酢酸濃度は約 2% であった。実験は 4 ロットで行い、そのうちの 1 ロットについて経時的に各種生菌数およびヒスタミン量について測定した。

ヒスタミン量の測定 しめさば調味液中のヒスタミン量は ELISA 法によるヒスタミン測定キット (Beckman Coulter) で測定した。また、ヒスタミン生成菌の培養液中のヒスタミン量は ELISA 法によるヒスタミン測定キットおよびチェックカラーヒスタミン (キッコーマン) で測定した。

ヒスタミン生成菌の分離 調味液 1.0 mL を採取し、9.0 mL のリン酸緩衝液 (0.625 mM, pH 7.2) にて段階希釈し、各希釈段から 1.0 mL をペトリフィルム AC 培地 (生菌数測定用培地: 住友スリーエム) に接種した。35°C にて 48 時間、好気および嫌気 (アネロパック嫌気, 三菱ガス化学) 条件下で培養し、形成したコロニーを釣菌し、純粋分離した。得られた分離株を 0.1% ヒスチジンを添加した普通ブイヨン (栄研) に接種し、35°C, 48 時間培養後、培地中でのヒスタミン生成の有無を調べた。ヒスタミン生成が認められた菌株をヒスタミン生成菌として保存した。長期間保存するため、培養菌体を 20% グリセリン添加 MRS (メルク) に分散させ、-80°C にて保管した。

ヒスタミン生成菌の性状 表現形質を調べるため、乳酸菌実験マニュアル²⁶⁾ に準じて、グラム染色、形態および運動性の観察、カタラーゼおよびオキシダーゼ産生試験、グルコースの発酵性とガス産生試験、生成乳酸の異性体の有無、酸素要求性試験を行った。ヒスタミン生成菌の増殖可能食塩濃度を調べるため、食塩を終濃度が 0.5, 3, 4, 5, 6, 10 および 15% になるように加えた MRS 液体培地 (既成品のまま, pH 5.7) を調製して試験菌を接種し、30°C で 1 週間培養した後、濁度の増加 (目視) により増殖の有無を判定した。なお、*Lactobacillus otakiensis* JCM15040^T を比較対照菌株として使用した。

16S rRNA 遺伝子による簡易同定 ヒスタミン生成菌 19 株をヒスチジンブロスで培養し、菌体を回収した後、Wizard Genomic DNA Purification Kit (プロメガ社) を用いて PCR の鋳型となる DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子の増幅は PCR 法により、常法²⁸⁾ に従った。16S rRNA 遺伝子の増幅プライマーは真正細菌ユニバーサルプライマーである 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') と 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')²⁹⁾ を使用した。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 で得られた 16S rRNA 遺伝子の DNA 断片の配列を

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³⁰⁾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。

ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子 (*hdc*) の検出 分離株が既知のヒスタミン生成酵素遺伝子を持つか調べるため, *hdc* 検出プライマーを用いた PCR を行った。検出プライマーはビルボイル型 *hdc* 検出プライマーセット¹⁵⁾を用い, PCR の反応条件はアニーリング温度を 65°C に変更した以外は既法¹⁵⁾に従った。鋳型となる DNA は 16S rRNA 遺伝子の増幅に用いたものと同じものを使用した。なお, *Tetragenococcus halophilus* I 株¹⁸⁾を *hdc* 陽性対照菌株として使用した。また, ヒスタミン生成に関連する遺伝子群 (*hdc* 遺伝子群) の構造を解析するため, 本研究で分離したヒスタミン生成菌 Hm 2 株について, 本遺伝子群を増幅するプライマーセット (Hm0F: 5'-GCATCAGCGCTCCCGGCATC-3', Hm0R: 5'-GGTT-CGAATCCCGCATATCG-3') を用いてヒスタミン生成遺伝子群を増幅し, プライマーウォーキング法で塩基配列を決定し, Genetyx コンピュータープログラム (ゼネディックス) にて構造を解析した。PCR で得られた DNA 断片の配列は 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³⁰⁾により既知の配列と相同性を比較した。なお, *hdc* 遺伝子群の配列決定に用いた Hm 2 株の DNA は 1% labiase (コスモバイオ) -TE 溶液で細胞壁を溶解したのち, Johnson (1981) の方法²⁷⁾にて抽出した。

ヒスタミン生成菌の増殖特性 試験菌の増殖特性を調べるため, 各種条件 (温度, pH, 食塩濃度, 水分活性, 酢酸添加) に設定した MRS 液体培地 5 mL に前培養液 50 μ L を接種し, 細菌接種後の培養液の濁度 (O.D. 660 nm) を簡易濁度計 (Mini Photo 518R, TAITEC) にて測定し, 増殖の有無を判定した。O.D. が 0.1 以上増加した場合を増殖可能とし, O.D. が 1.0 以上で濁度の上昇が平衡に達した場合を定常状態とし, 培養を中止した。特に記載が無い場合, 各実験は 2 回繰り返した。

1. 増殖におよぼす pH の影響 オートクレーブ滅菌後の MRS 液体培地の pH を塩酸にて 3.4, 3.6, 3.8, 4.0, 4.2 および 4.4 に調製し, 0.2 μ m の滅菌フィルター (DISMIC-25AS, ADVANTEC) で濾過滅菌した後, 試験菌を接種し, 30°C で 1 週間培養した後の増殖とヒスタミン生成量を調べた。

2. 増殖におよぼす温度の影響 MRS 液体培地 (既成品のまま, pH 5.7) に試験菌を接種し, 各温度 (4, 5, 8, 10, 30 および 37°C) で培養した。培養は 4 週間行った。

3. 増殖におよぼす酢酸の影響 MRS 液体培地に終濃度 2% の酢酸を添加したものと無添加のものを調製

し, それぞれの培地の pH を塩酸と水酸化ナトリウムで 3.8, 4.0, 4.2 および 4.4 に調製したものを 3 組用意した。これらの培地に試験菌 (Hm 2 および Hm 6 株) を接種し, 各 pH に調製した培地を 1 組 (pH 3.8, 4.0, 4.2 および 4.4) とし, それらを各温度 (5, 8, 10°C) にて 24 週間経時的に濁度を測定しながら培養した。各試験は 3 試験管を用いて行い ($n=3$), 3 つの試験管のうち, 1 つでも濁度の上昇が観察されれば増殖可能と判定した。また, 定常期への到達日は 3 試験管のうち最も速く増殖した試験管のデータを記載した。ヒスタミン生成量は培養終了時 (168 日後) のみ測定した。なお, 本実験に限り耐酸性が優れていた Hm 2 株と特筆すべき特徴のない Hm 6 株の 2 菌株のみを試験菌として用いた。上記 2 菌株は本研究で分離したものである。

ヒスタミン生成菌の増殖におよぼす水分活性の影響 ヒスタミン生成菌を含んでいるしめさば製造工場が使われた調味液に乳酸ナトリウムを添加して水分活性値を各段階 (0.950, 0.939, 0.912 および 0.880) に調製して 25°C にて貯蔵し, ヒスタミン生成菌数とヒスタミン量の経時変化を追跡した。ヒスタミン生成菌数はペトリフィルム (AC プレート, 35°C・48 時間・嫌気条件下で培養) により測定した。

統計処理 得られた値は統計解析 Statcel Ver. 3 (オーエムエス出版, 埼玉) を用いて, 一元配置の分散分析に引き続き, Tukey-Kramer の多重比較検定を行い, 危険率 5% における有意差を判定した。

結 果

ヒスタミン生成菌の分離 調味液貯蔵中のヒスタミン蓄積, 一般生菌数, 嫌気性細菌数の挙動を Fig. 1 に示した。しめさば製造に使用した後, 6 か月間 10°C で貯蔵した 4 ロットの調味液の pH は 4.1-4.2 で, ヒスタミン量は 24.5-73.2 mg/100 mL であった。また, ペトリフィルム AC 培地を嫌気条件下で培養したものから, 19 株のヒスタミン生成菌を分離し, 菌株番号 Hm 1-Hm 19 とした。これらの菌株は 0.1% ヒスチジン添加普通ブイヨンおよび 1% ヒスチジン添加 MRS プロス中でヒスタミンを生成した。なお, 調味液中の一般生菌数は 10^2 cfu/mL 前後で推移し, コロニーを形成したものを純粋分離し, ヒスタミン生成能を評価したが, ヒスタミン生成能を持つ菌株を分離する事は出来なかった。

ヒスタミン生成菌の性状 分離されたヒスタミン生成菌の性状を Table 1 に示した。全ての菌株はグラム陽性, 通性嫌気性の桿菌で, 非運動性, カタラーゼおよびオキシダーゼ陰性であった。また, グルコースからガスと乳酸を生成し, 生成した乳酸の光学異性体を測定したところ, D 型または D 型 + L 型であった。D 型 + L 型の菌株における D 型と L 型乳酸の生成割合は 3:2 で

Fig. 1 Changes in histamine contents (mg/100 mL), mesophilic bacterial counts (cfu/mL), and anaerobic bacterial counts (cfu/mL) during preservation test of marinade broth in *shimesaba* production. The marinade broth tested was preserved at 10°C for six months. Open circles (○), aerobic plate counts (cfu/mL); closed circles (●), anaerobic plate counts (cfu/mL); closed triangles (▲), histamine contents (mg/100 mL).

Table 1 Characteristics of histamine-producing bacteria isolated from marinade broth in *shimesaba* production and *Lactobacillus otakiensis* JCM15040^T

Characteristic	<i>Lactobacillus otakiensis</i> JCM15040 ^T	Isolates (<i>n</i> = 19)	
Gram stain	+	+	100*
Cell shape	Rod	Rod	100
Motility	—	—	100
Oxygen requirement	—	—	100
Oxidase	—	—	100
Catalase	—	—	100
O/F test	F	F	100
Gas production from glucose	+	d	53
Type of lactate	D + L	D + L or D	58
Growth at 4°C within 4 weeks	+	+	100
at 45°C	—	—	100
Growth at pH 3.6	—	—	100
at pH 3.8	—	— (d)	63
at pH 4.0	+	+	100
Growth in 10% NaCl	—	— (d)	74
in 15% NaCl			100

Numbers refer to percentages of strains that are positive for the particular characteristic.

あった。好気条件においてMRS平板培地上でのコロニー形成は阻害されたが、MRS平板培地上に菌液を塗抹し、空气中に24時間曝露しても死滅することはなかった。

Table 2 Identification of the histamine-producing bacteria based on 16S rRNA gene sequence similarity

Closest bacterial species	Similarity percent	Accession number
<i>Lactobacillus otakiensis</i> YIT 11163 ^T (= JCM15040 ^T)	100	AB366386
<i>Lactobacillus sunkii</i> YIT 11161 ^T	99.5	AB366385
<i>Lactobacillus kefir</i> YIT 0222 ^T	98.5	AB429371
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> YIT 0272 ^T	98.5	AB429372
<i>Lactobacillus buchneri</i> YIT 0077 ^T	98.1	AB429368
<i>Lactobacillus parakefir</i> YIT 10382 ^T	97.7	AB429373
<i>Lactobacillus rapi</i> YIT 11204 ^T	97.1	AB366389
<i>Lactobacillus diolivorans</i> YIT 10368 ^T	96.5	AB429369
<i>Lactobacillus kisonensis</i> YIT 11168 ^T	96.1	AB366388
<i>Lactobacillus hilgardii</i> YIT 0269 ^T	94.9	AB429370

Fig. 2 Electrophoresis of *hdc* gene amplified from the putative histamine-producing isolates using the PCR method with a primer set HmF/HmR. Lane M, 100 bp ladder; lanes 1 to 19 correspond to strains Hm 1 to 19, respectively; lane P, positive control. *Tetragenococcus halophilus* strain I; lane N, distilled water as negative control.

16S rRNA 遺伝子による簡易同定 ヒスタミン生成菌 19 株の 16S rRNA 遺伝子を増幅し、配列を決定した。試験菌 19 株の遺伝子配列は全て同じであった。データベースに登録されている既知の細菌の塩基配列と比較したところ、*Lactobacillus otakiensis* と 100% の相同性を示した。その他、95% 以上の相同性が見られた近縁種は全て *Lactobacillus* 属の種であった (Table 2)。

ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子 (*hdc*) の検出 全ての分離株においてピルボイル型 *hdc* 検出 PCR でバンドが観察された (Fig. 2)。また、増幅された DNA 断片の大きさは陽性対照のものと同じ約 540 bp で、分離株由来の PCR 産物はピルボイル型 *hdc* から増幅されたものと判断された。¹⁵⁾ また、Hm 2 株のヒスタミン生成遺伝子群を PCR 法にて増幅させたところ、使用したプライマーセットから約 5,700 bp の増幅産物が得られた。それをシーケンスし、解析した結果、得られた 5,676 bp

の配列は *L. hilgardii* の遺伝子配列³¹⁾と 99.95% 同様に、シーケンスした配列の中には 4 つの ORF が含まれており、それぞれの ORF をアミノ酸に変換し、*L. hilgardii* のものと比較すると、それぞれ *hdcP* (相同性 98.6%), *hdcA* (相同性 100%), *hdcB* (相同性 100%), *hdcRS* (相同性 99.8%) に相当すると判断された。従って、Hm 2 株のヒスタミン生成遺伝子群は *L. hilgardii* に代表される多くのヒスタミン生成乳酸菌が持つ遺伝子の構造と同一であることが強く示唆された (Fig. 3)。

ヒスタミン生成菌の増殖におよぼす pH の影響 種々の pH に調整した MRS 液体培地中での試験菌株の増殖

Fig. 3 Genetic organizations of histidine decarboxylase related genes in strain Hm 2. The sequenced data of *hdc* related genes from strain Hm 2 was significantly close to that of the *Lactobacillus hilgardii* IOEB 0006 with 99.95% similarity. Legend: aa, amino acid residues; *hdcP*, histidine/histamine antiporter; *hdcA*, pyruvoyl dependent histidine decarboxylase; *hdcB*, catalyzing maturation of pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase and *hdcRS*, histidyl-RNA synthetase.

とヒスタミン生成量を調べた (Table 3)。その結果、pH 4.0 以上では全ての菌株が増殖し、300 mg/100 mL 以上のヒスタミンを生成した。pH 3.8 では 12 株が増殖が認められ、そのうち 4 株 (Hm 2, 10, 13 および 17 株) は特に旺盛に増殖していた (O.D. 1.0 以上)。ヒスタミンの生成は増殖をしていない株を含み、全ての株で認められた。pH 3.6 では明確に増殖をしたものはなかったが、Hm 2, 9 および 14 株の 3 菌株でそれぞれ 390, 12.2 および 12.9 mg/100 mL のヒスタミンの生成が認められた。Hm 2 株の場合、培地中のヒスタミン濃度が 390 mg/100 mL と高く、増殖が認められなくてもヒスタミンが生成される可能性が示唆された。pH 3.4 で増殖またはヒスタミンを生成した株はなかった。なお、増殖が認められた培養条件 (pH 3.8 以上) において、培養後の培地の pH は酢酸緩衝液を添加しない場合、3.6 から 3.9 であった。

ヒスタミン生成菌の増殖におよぼす温度の影響 結果は図示しないが、試験菌 (Hm 1-Hm 19 株) は、培地の pH 5.7 において試験した全ての温度帯で 4 週間以内での増殖が認められた (O.D. 1.0 以上)。8 および 10°C では培養後 1 週間以内に定常期に達し、4 および 5°C でも 4 週間以内に定常期に達した。30 および 37°C では

Table 3 Growth characteristics and histamine production (mg/100 mL) of histamine producing bacteria isolated from *shimesaba* marinade broth under various pH conditions

Strain	Growth* at					
	pH 3.8		pH 3.6		pH 3.4	
	Histamine	Growth*	Histamine	Growth*	Histamine	Growth*
Hm 1	301.6	+	—**	—	—	—
Hm 2	333.0	++	390.0	—	—	—
Hm 3	13.3	+	—	—	—	—
Hm 4	305.0	—	—	—	—	—
Hm 5	280.0	—	—	—	—	—
Hm 6	305.0	+	—	—	—	—
Hm 7	325.0	—	—	—	—	—
Hm 8	33.3	+	—	—	—	—
Hm 9	300.0	—	12.2	—	—	—
Hm 10	341.6	++	—	—	—	—
Hm 11	282.2	+	—	—	—	—
Hm 12	318.3	—	—	—	—	—
Hm 13	65.0	++	—	—	—	—
Hm 14	320.0	—	12.9	—	—	—
Hm 15	293.3	—	—	—	—	—
Hm 16	326.6	+	—	—	—	—
Hm 17	300.0	++	—	—	—	—
Hm 18	313.3	+	—	—	—	—
Hm 19	311.6	+	—	—	—	—

Strains were cultured at 30°C in MRS broth.

* Growth was evaluated by monitoring OD 660 nm: ++, >1.0 OD; +, >0.1 OD; —, <0.1 OD.

** —, under detection limit (<10.0 mg/100 mL)

Fig. 4 Effects of temperature, pH, and acetic acid on the growth of histamine-producing bacteria, strain Hm 2. The bacterial growth under each condition was compared by monitoring optical density (660 nm) during cultivation. Left panel (a–d), no acetic acid added to MRS broth; right panel (e–h), 2% acetic acid added to MRS broth. The top two graphs (a, e) indicate the growth of the test strain in MRS broth at pH 4.4 at various temperatures. The pair of graphs second from the top (b, f) indicates the growth of the test strain in MRS broth at pH 4.2 at various temperatures. The pair of graphs third from the top (c, g) indicates the growth of the test strain in MRS broth at pH 4.0 at various temperatures. The graphs at the bottom (d, h) indicate the growth of the test strain in MRS broth at pH 3.8 at various temperatures. *Triangles* (Δ), growth at 10°C; *squares* ($\square$), growth at 8°C; *diamonds* ($\diamond$), growth at 5°C.

48時間以内に定常期に達した。

ヒスタミン生成菌の増殖におよぼす酢酸の影響 Hm 2株を2%酢酸添加MRS液体培地および酢酸無添加MRS液体培地に接種し、それらを種々の温度およびpH条件下で培養し、増殖を比較した (Fig. 4a–h)。その結果、酢酸無添加培地では、pH 4.4, 4.2 および 4.0 において10°C培養では培養10日目で、8°Cでは13から14日目に定常期に達したのに対し、5°Cでは168日後でも定常期に達することはなかった。しかし、目視で確認できる程度に濁度は上昇し、緩慢ではあるが増殖をしていることが認められた (Fig. 4a, b, c)。pH 3.8 において、Hm 2株は10°C培養で17日目、8°C培養で24日目に定常期に達したが、5°Cでは明確な増殖が認めら

れなかった (Fig. 4d)。一方、酢酸を添加した培地では、Hm 2株において pH 4.4 および 4.2 の10°C培養で培養63から73日にかけて定常期に達したが (Fig. 4e, f), 残りの培養条件では、明確な増殖は認められなかった。また、結果は図示しないが、Hm 6株についても同様の実験を行った結果、Hm 6株を酢酸無添加培地にて10°Cで培養すると41日目に、8°C培養で73日目に定常期に達したが、5°Cでは明確な増殖が認められなかった。一方、酢酸添加培地にて10°Cで培養すると、pH 4.4で73日目に、pH 4.2で133日目に、pH 4.0では147日目に定常期に達した。pH 3.8の10°C培養、pH 4.4, 4.2, 4.0の8°C培養で僅かに増殖している (O.D. が0.2程度) ことが認められたが、その他の条件では、濁

度による判定では増殖が認められなかった。上述した増殖試験のうち酢酸無添加培地における Hm 2 株および Hm 6 株のヒスタミン生成量は全ての培養条件で 100 mg/100 mL 以上のヒスタミンを生成した (結果は図示しない)。それに対し, 酢酸添加培地における Hm 2 株および Hm 6 株のヒスタミン生成量は培養条件で大きく変動したため, ヒスタミン生成量と増殖の有無についての結果を Table 4 にまとめた。Hm 2 株のヒスタミン生成は, 酢酸添加培地では, 培養温度 10°C, pH 4.4 および 4.2 の試験区でのみ 100 mg/100 mL 以上の蓄積が観察され, 培養温度 8°C および 5°C では全ての pH 試験区で少量のヒスタミン蓄積 (8.9–33.3 mg/100 mL) が観察された (Table 4 上段)。同様に Hm 6 株のヒスタミン生成は, 酢酸添加培地では, 培養温度 10°C の全ての試験区で 100 mg/100 mL 以上の蓄積が観察されたが, 培養温度 8°C では, pH 4.4 でのみヒスタミンの大量蓄積が観察され, 培養温度 8°C においては pH 4.2 以下で 40.4–51.4 mg/100 g のヒスタミン蓄積が観察され, 5°C の全ての pH 試験区では少量のヒスタミン蓄積 (13.3–15.6 mg/100 mL) が観察された (Table 4 下段)。なお, 結果は図示しないが酢酸濃度 0.5% 添加では両菌株において抑制効果が認められなかった。

ヒスタミン生成菌の増殖におよぼす水分活性の影響
ヒスタミン生成菌を含むしめさば調味液に乳酸ナトリウムを添加して水分活性値を各段階 (0.950, 0.939, 0.912 および 0.880) に調製して 25°C にて貯蔵し, ヒスタミン生成菌数とヒスタミン量の経時変化を追跡した結果 (結果は図示しない), 水分活性値を調整していない調味液 (0.95) では, 日数経過とともにヒスタミン生成菌が増殖し, 実験開始 30 日後に 10⁸ cfu/mL に達した。ま

た, ヒスタミン量も 120 mg/100 mL にまで増加した。それに対し, 水分活性を 0.939 以下に調整した調味液ではヒスタミン生成菌の増殖およびヒスタミン生成が抑制され, 菌数の増加およびヒスタミンの生成は観察されなかった。

考 察

しめさば調味液中でヒスタミンを生成する細菌を分離し, それらは乳酸菌 *Lactobacillus otakiensis* またはその近縁種であった。*L. otakiensis* がしめさば製造工程におけるヒスタミン蓄積の原因であることを明らかにしたのは本報が初めてであり, また, 本菌がヒスタミンを生成するという事実もこれまで報告されていなかった知見である。そのため, 本報では, 加工場で設定可能な環境条件における分離株の増殖特性を調べ, しめさば製造で本菌の増殖を抑制できる環境条件について考察した。

使用済みしめさば調味液を 10°C で 6 か月間保存した試験では 25 mg/100 mL 程度のヒスタミンの蓄積が認められ (Fig. 1), 調味液中にヒスタミン生成菌が存在することが示唆された。一般に加工度の低い水産物では, 腸内細菌科細菌がヒスタミン生成菌として分離されるため,¹³⁾ 本研究では当初, これらの細菌群の分離を試みた。しかし, 調味液中には大腸菌群は存在せず, 好気条件ではヒスタミン生成菌を分離できなかった。そこで, 調味液中でのヒスタミン蓄積はワインやチーズなどの発酵食品でヒスタミン生成菌として問題となる乳酸菌^{4,7–20)}によるものと仮定し, 嫌気培養で増殖できる細菌からヒスタミン生成菌の分離を試みた。その結果, 19 株のヒスタミン生成菌株を得ることが出来た。分離株は全てグラム陽性の桿菌で, グルコースから乳酸を生

Table 4 Growth characteristics and histamine production (mg/100 mL) of the two representative histamine-producing strains, Hm 2 and Hm 6, isolated from *shimesaba* marinade broth under various pH and temperature conditions in MRS broth containing 2% acetic acid

Strain	pH	Growth at *1 (°C)					
		5		8		10	
		Histamine*2	Growth*1	Histamine	Growth	Histamine	Growth
Hm 2	4.4	8.5 ± 0.79 ^{aA*3}	—	18.0 ± 1.07 ^{aA}	+	293.0 ± 3.48 ^{aB}	++
	4.2	13.3 ± 0.00 ^{bA}	—	17.9 ± 0.51 ^{aA}	+	262.2 ± 16.9 ^{aB}	++
	4.0	15.0 ± 1.23 ^{bA}	—	25.5 ± 0.75 ^{bB}	—	31.8 ± 0.89 ^{bC}	—
	3.8	25.2 ± 1.21 ^{cA}	—	32.1 ± 1.03 ^{cB}	—	37.0 ± 3.58 ^{bB}	—
Hm 6	4.4	13.3 ± 3.00 ^A	—	277.1 ± 3.31 ^{aB}	+	283.0 ± 12.2 ^{aB}	++
	4.2	14.5 ± 0.00 ^A	—	51.0 ± 2.38 ^{bB}	+	279.9 ± 19.3 ^{aC}	++
	4.0	14.4 ± 1.16 ^A	—	40.4 ± 1.47 ^{cB}	+	292.8 ± 8.30 ^{aC}	++
	3.8	15.6 ± 1.19 ^A	—	51.4 ± 3.26 ^{bB}	—	102.2 ± 3.37 ^{bC}	+

*1 Growth was evaluated by monitoring OD 660 nm: ++, >1.0 OD; +, >0.1 OD; —, <0.1 OD.

*2 Mean ± SD (n = 3)

*3 Vertical (a, b, and c) values in each block having different superscript letters are significantly different (*p* < 0.05). Horizontal (A, B, and C) values in each line having different superscript letters are significantly different (*p* < 0.05).

成し、カタラーゼ陰性であったため、乳酸桿菌である可能性が強く示唆された (Table 1)。^{32,33)} 実際、16S rRNA 遺伝子塩基配列の解析の結果、*L. otakiensis* またはその近縁種と同定され (Table 2)、表現形質による結果と矛盾しなかった。³⁴⁾ *L. otakiensis* は木曽地方で生産される“すんき”というカブナの漬けものから分離され、低温かつ低 pH の環境に適応していると考えられている。³⁴⁾ そのため、本菌群はしめさば調味液のような環境でも生存できると考えられた。*Lactobacillus* 属の細菌がヒスタミンを生成することはこれまでにもいくつか報告され、ヒスタミン生成に関与する遺伝子群、発現機構などについて明らかにされている。^{31,35-39)} 本実験で用いた *L. otakiensis* JCM15040^T はヒスチジンを加えた培地でヒスタミンを生成せず、また、データベース中の本菌株の全ゲノムデータ (NZ_BASH01000001 および NZ_AZED01000000) においても *hdc* に該当する遺伝子は検出されなかった。一方、分離株をヒスチジン添加した培地 (普通ブイヨン, MRS プロス) に接種し、ヒスタミンの生成を確認したところ、全ての株で、ヒスタミン生成が認められ、*hdc* 検出 PCR でも *hdc* の保有が確認された。また、代表株として選んだ Hm 2 株のヒスタミン生成関連遺伝子を解析したところ、ヒスタミンを生成するヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子 (*hdcA*) の周辺にヒスタミン生成に関与する遺伝子群 (*hdcP*, *hdcB*, および *hdcRS*) がコードされていることが明らかとなり、本菌は多くのヒスタミン生成乳酸菌が持つヒスタミン生成遺伝子群 (ピルボイル型 *hdc*) と同じものを保有していると考えられた (Fig. 3)。

Lactobacillus 属細菌のような乳酸菌は一般に低 pH 環境で旺盛に増殖することが知られているが、⁴⁰⁾ 分離株がしめさば調味液のような低 pH かつ低温環境で生存し、ヒスタミンを生成できるのかは明らかでないため、培地の pH を 4.0 前後に、温度をしめさば製造調味液と同等に調整し、分離株の生存およびヒスタミン生成を評価した。その結果、分離株 (Hm 6) は培養温度 10℃において pH 4.0 以上で旺盛な増殖を示し、ヒスタミンを生成した (Table 4)。したがって、分離株はしめさば調味液のような環境でも生存できることが明らかとなった。さらに、しめさば調味液の保存試験において嫌気性菌数の増加とヒスタミンの蓄積量は相関し、嫌気性細菌数のほぼ大半を *L. otakiensis* と同定される菌群が占めていることから、本菌群がヒスタミンの蓄積に関与していることが示唆された。これらの結果より、分離された *L. otakiensis* と推定される菌株はヒスタミン生成菌であると判断された。

分離菌株の増殖を抑制するようなしめさば調味液の物理化学特性を検討するため、培地の pH を 4.4, 4.2, 4.0 および 3.8 に調整し、菌株を接種したそれぞれの培地を

5, 8, 10℃で培養した。その結果、酢酸無添加培地においては、pH が低下するにつれ、増殖速度は遅くなった (Fig. 4a-d)。培養温度 8℃と 10℃では、若干の増殖速度の相違は認められたものの、実験した pH 条件では旺盛な増殖を示した。しかし、5℃で 168 日間の培養では、pH 4.0 および 3.8 での増殖は認められなかった (Fig. 4c, d)。さらに、培地にしめさば製造で使用する調味液と同程度の酢酸 (終濃度 2%) を添加して各種 pH および温度で分離株を培養したところ、全ての培養条件で増殖が著しく阻害され、10℃, pH 4.4 において定常期に達するまでに 73 日間、pH 4.0 では 147 日間を必要とした (Fig. 4e-h)。これは、しめさば製造時に工場内を 5-8℃に保ち、調味液への食酢の添加量を制御して pH を約 4.0 に維持することの重要性を示している。食塩添加、水分活性の低下は分離株の増殖を抑制したが、効果が見られた条件 (食塩濃度 10% 以上、水分活性 0.939 以下) は一般的に *Lactobacillus* 属の増殖を抑制する条件ではあるが、⁴¹⁾ 調味液の食塩含量を増やすことはしめさばの製造上困難であり、現実的ではない。これらの事象から、温度制御、pH 制御、酢酸添加といった各条件単独でしめさば調味液のヒスタミン生成菌の増殖を抑制することは困難であるが、ハードルテクノロジー理論⁴¹⁾に基づき、温度、pH および酢酸濃度の各条件を組み合わせることでヒスタミン生成菌の増殖を抑制することは十分可能であると判断された。

一方、注目すべき点としてヒスタミン生成菌の増殖が抑制されたにも関わらず、ヒスタミン生成が観察される環境条件が見出されたことが挙げられる。Table 3 で示したように分離菌の培地の pH を 3.6 まで下げると増殖は抑制できたがヒスタミンを生成した株が 3 株存在した。特に Hm 2 株は 390 mg/100 mL ものヒスタミンを生成し、食中毒を引き起こすレベルのヒスタミンを蓄積した。このような現象は Table 4 で示す温度、pH、酢酸添加実験でも認められた。これらのヒスタミン生成菌の増殖が見られないにも関わらず、ヒスタミンが生成される原因として以下のような理由が考えられた。1) 接種された菌が増殖をすることなしに一定期間生存し、ヒスタミンを生成した。2) 培地に接種した菌からヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) が漏出し、ヒスタミンを生成した。Furutani *et al.*⁴²⁾ は *Staphylococcus epidermidis* から精製した HDC は pH 4.0 でも活性を示すことを報告しているため、培地中に漏出した HDC がヒスタミンを生成している可能性は否定できない。Kanki *et al.*⁴³⁾ も解凍された魚介類におけるヒスタミン蓄積は冷凍物に付着していた細菌由来の HDC によるものであると指摘している。このため、増殖が観察されないにも関わらず、ヒスタミンが生成される機構についてはさらなる研究が必要である。

これまでしめさば製造におけるヒスタミン生成の原因菌はグラム陰性ヒスタミン生成菌であると考えられてきたが, これらの菌群は pH 5.0 以下では生育できず,³⁾ しめさば調味液中での生残は不可能であることから,²⁵⁾ しめさば製造においては原料由来と考えられるグラム陰性ヒスタミン生成菌よりも耐酸性を有し, 低温でも増殖可能である *Lactobacillus* 属などの乳酸菌の方がヒスタミン蓄積の危害要因として重要であると考えられた。

以上の結果から, しめさばを製造する際には調味液の温度 (5–8℃) と酢酸濃度 (終濃度 2%) を制御し, pH を 4.0 以下に保持することで, 製品の風味を損なうことなく製造現場でのヒスタミン生成菌の増殖抑制の可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 16S rRNA 遺伝子および *hdc* 解析 PCR を実施し, ご助言をいただいた国立研究開発法人水産研究・教育機構の釜石隆博士に深謝いたします。実験の補助をして頂いた国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所の端野なおみ氏に感謝します。本研究は, 独立行政法人科学技術振興機構 復興促進プログラム (マッチング促進) の一環として実施しました。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) 松原 久. しめさば. 「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; 396–398.
- 2) 八戸市農林水産部水産事務所. はちのへの水産. 統計資料編 (平成 25 年).
- 3) 清水 潮. 第 3 章環境と微生物. 「食品微生物の科学」幸書房, 東京. 2001; 84–96.
- 4) FAO, WHO. Hazard identification. In: FAO, WHO (eds) *Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products*. 2012.
- 5) Hungerford JM. Scombroid poisoning: A review. *Toxicon* 2010; **56**: 231–243.
- 6) 八並一寿・越後多嘉志. 市販いわし糠漬けからの耐塩性ヒスタミン生成菌の分離. 日本水産学会誌 1991; **57**: 1523–1528.
- 7) Halász A, Baráth Á, Simon-Sarkadi L, Holzapfel W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Tech.* 1994; **5**: 42–49.
- 8) Lonvaud-Funel A, Joyeux A. Histamine production by wine lactic acid bacteria. Isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Microbiol.* 1994; **77**: 401–407.
- 9) Satomi M, Kimura B, Mizoi M, Sato T, Fujii T. *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid sauce. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; **47**: 832–836.
- 10) Hernandez-Herrero MM, Roig-Sages AX, Rodriguez-Jerez JJ, Mora-Ventura MT. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J. Food Prot.* 1999; **62**: 509–514.
- 11) Lonvaud-Funel A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001; **199**: 9–13.
- 12) Landete JM, Ferrer S, Pardo I. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *J. Appl. Microbiol.* 2005; **99**: 580–586.
- 13) 藤井建夫. アレルギー様食中毒. 日本食品微生物学会雑誌 2006; **23**: 61–71.
- 14) de las Rivas B, Rodríguez H, Carrascosa AV, Muñoz R. Molecular cloning and functional characterization of a histidine decarboxylase from *Staphylococcus capitis*. *J. Appl. Microbiol.* 2008; **104**: 194–203.
- 15) 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.
- 16) Ladero V, Calles-Enriquez M, Fernández M, Alvarez MA. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr. Nutr. Food Sci.* 2010; **6**: 145–156.
- 17) Spano G, Russo P, Lonvaud-Funel A, Lucas P, Alexandre H, Grandvalet C, Coton E, Coton M, Barnavon L, Bach B, Rattray F, Bunte A, Magni C, Ladero V, Alvarez M, Fernandez M, Lopez P, de Palencia PF, Corbi A, Trip H, Lolkema JS. Biogenic amines in fermented foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2010; **64**: S95–S100.
- 18) Satomi M, Furushita M, Oikawa H, Yano Y. Diversity of plasmid encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus* spp. isolated from Japanese fish sauce. *Int. J. Food Microbiol.* 2011; **148**: 60–65.
- 19) Yokoi K, Harada Y, Shozen K, Satomi M, Taketo A, Kodaira K. Characterization of the histidine decarboxylase gene of *Staphylococcus epidermidis* TYH1 coded on the staphylococcal cassette chromosome. *Gene* 2011; **477**: 32–41.
- 20) Satomi M, Mori-Koyanagi M, Shozen K, Furushita M, Oikawa H, Yano Y. Analysis of plasmids encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus muriaticus* isolated from Japanese fermented seafoods. *Fish. Sci.* 2012; **78**: 935–945.
- 21) Okuzumi M, Okuda S, Awano M. Isolation of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria from *Scomber japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1981; **47**: 1591–1598.
- 22) 山中英明, 松本美鈴. 高速液体クロマトグラフィーによる赤身魚中のポリアミン類の同時定量および鮮度の判定. 食品衛生学雑誌 1989; **30**: 396–405.
- 23) Sato T, Fujii T, Masuda M, Okuzumi M. Changes in numbers of histamine-metabolic bacteria and histamine content during storage of common mackerel. *Fish. Sci.* 1994; **60**: 299–302.
- 24) Takahashi H, Kimura B, Yoshikawa M, Fujii T. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; **69**: 2568–2579.
- 25) Furutani A, Matsubara H, Ishikawa T, Satomi M. Behavior of histamine-producing bacteria in *shimesaba*, raw mackerel salted and marinated in vinegar during processing and storage at various temperatures. *Fish. Sci.* 2013; **79**: 725–733.
- 26) 小崎道雄, 内村 泰, 岡田早苗. 乳酸菌実験マニュアル. 朝倉書店. 東京. 1992.

- 27) Johnson, JL. Genetic characterization. In Gerhardt P, Murray RGE, Costilaw RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB (eds). *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington DC. 1981; 450–472.
- 28) Suzuki T, Yamasato K. Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994; **115**: 13–18.
- 29) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 1991; **173**: 697–703.
- 30) Altschul SA, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; **215**: 403–410.
- 31) Lucas PM, Wolken WA, Claisse O, Lolkema JS, Lonvaud-Funel A. Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; **71**: 1417–1424.
- 32) Kandler O, WeissbN. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}. In: Sneath PHA *et al.* (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The William and Wilkins Co., Baltimore. 1986; 1209–1234.
- 33) Hammes WP, Weiss N, Holzapfel W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows A *et al.* (eds). *The Prokaryotes*, 2nd ed., Vol. 2. Springer Verlag, New York NY. 1992; 1535–1594.
- 34) Watanabe K, Fujimoto J, Tomii Y, Sasamoto M, Makino H, Kudo Y, Okada S. *Lactobacillus kisonensis* sp. nov., *Lactobacillus otakiensis* sp. nov., *Lactobacillus rapi* sp. nov. and *Lactobacillus sunkii* sp. nov., heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009; **59**: 754–760.
- 35) Vanderslice P, Copeland WC, Robertus JD. Cloning and nucleotide sequence of wild type and a mutant histidine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 15186–15191.
- 36) Joosten HMLJ, Northolt MD. Detection, growth, and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989; **55**: 2356–2359.
- 37) Martín MC, Fernández M, Linares DM, Alvarez MA, Sequencing, characterization and transcriptional analysis of the histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology* 2005; **151**: 1219–1228.
- 38) Lucas PM, Claisse O, Lonvaud-Funel A. High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; **74**: 811–817.
- 39) Trip H, Mulder NL, Rattray FP, Lolkema JS. HdcB, a novel enzyme catalysing maturation of pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase. *Mol. Microbiol.* 2011; **79**: 861–871.
- 40) 藤井建夫. 第9章 食品の微生物制御. 「食品衛生学」(山中英明, 藤井建夫, 塩見一雄共著)恒星社厚生閣, 東京. 2012; 202–203.
- 41) 藤井建夫. 第1章 食品と微生物. 「食品の保全と微生物」(藤井建夫編)幸書房, 東京. 2001; 1–13.
- 42) Furutani A, Harada Y, Shozen K, Yokoi K, Saitou M, Satomi M. Purification and properties of a histidine decarboxylase from *Staphylococcus epidermidis* TYH1 isolated from Japanese fish-miso. *Fish. Sci.* 2014; **80**: 93–101.
- 43) Kanki M, Yoda T, Tsukamoto T, Baba E. Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; **73**: 1467–1473.