N 菌群細菌 (低温好塩性ヒスタミン生成菌) のヒスタミン生成に 及ぼす温度, pH および NaCl 濃度の影響

奥 積 昌 世・栗 野 正 石・大 木 由 美

(1984 年 3 月 6 日受理)

Effects of Temperature, pH Value and NaCl Concentration on Histamine Formation of N-group Bacteria (Psychrophilic and Halophilic Histamine-Forming Bacteria)

Masayo OKUZUMI,* Masaishi AWANO,* and Yumi OHKI*

Many studies have been made on histidine decarboxylase by the mesophiles such as *P. morganii*, *E. coli* and *C. perfringens*, however the decarboxylation mechanism of the psychrophilic and halophilic histamine former such as the N-group bacteria has not yet been studied.

The present paper deals with the effects of temperature, pH value and NaCl concentration on the histidine decarboxylation by the N-group bacteria.

Results obtained are summarized as follows:

(1) The optimum temperature for the growth of the N-group bacteria was around 20°C, while that for the histamine formation was about 25°C, the highest temperature for supporting their growth. The histidine decarboxylase activity of the washed cell suspension tested was highest at a temperature between 35° to 40°C.

(2) The optimum pH value for the growth of the N-group bacteria was between 6 to 8, while that for the histamine formation was between 5 to 6. The activity of histidine decarboxylase of the washed cell suspension was highest at pH 5.4.

(3) The optimum concentration of NaCl for the histamine formation by the N-group bacteria was 1 to 3%, corresponding to the optimum concentration for their growth. On the other hand, there was no correlation observed between the histidine decarboxylase activity of the washed cell suspension and the NaCl concentration.

特定の細菌がヒスチジン (Hd) を脱炭酸してヒスタミン (Hm) を生成するということは古くから知られており、現在までに研究された細菌には *Escherichia*,^{1,2)} *Clostridium*,²⁾ *Achromobacter*,^{3,4)} *Vibrio*,⁵⁾ *Proteus*,⁶⁻¹⁴⁾ *Aeromonas*,¹⁵⁾ *Lactobacillus*,^{16,17)} *Klebsiella*,¹⁸⁾ *Hafnia*¹⁹⁾ などがある。これらの中で、とくに *Proteus morganii* は 1950 年代にわが国で多発したアレルギー様食中毒の原因菌として有名である。当時、細菌のアミノ酸脱炭酸酵素について広範な研究を行った GALE^{2,20)} は、*Proteus* 菌群の Hd 脱炭酸能を否定していたのであるが、相磯ら,^{9,10,21)} 木俣ら,⁶⁻⁸⁾ 河端ら¹¹⁻¹³⁾ の詳細な研究によって *P. morganii* や *P. vulgaris* などの脱炭酸能の存在は確定的となったのである。

P. morganii の発育温度域は 10°~43°C で²²⁾、その至適は 30°~35°C にあるが⁴⁾ Hm 生成の至適温度は 30°C 付近にあるといわれている。²³⁾ また、これに関連して、

河端ら¹³⁾ は、*P. morganii* の細菌懸濁液による Hd 脱炭酸作用は、25°C 培養で得た菌体の活性が最も強かったと述べている。*P. morganii* の発育至適 pH は 7.0 付近にあるが、Hm 生成のそれは、木俣ら^{8,23)} および河端ら^{12,13)} によると、6 前後にあるといわれている。一方、*E. coli*^{8,20)} および *C. perfringens*²⁰⁾ の Hd 脱炭酸酵素の至適 pH はそれぞれ 5 および 4.5 付近にあり、菌種によって差異のあることがわかる。

奥積ら²⁴⁻²⁶⁾ は、N 菌群細菌 (低温好塩性 Hm 生成菌) が周年、海水および海産魚から検出されること、また、20°C 以下に貯蔵した魚では、しばしば *P. morganii* より優占することなどを報告した。さて、N 菌群細菌^{27,28)} の発育に対する至適温度は 20°C 前後、至適 pH は 6~8 の間にあるが、このような低温細菌の Hd 脱炭酸作用を調べることは、細菌学的見地はもとより、公衆衛生の立場からも重要であると考えられる。

* 東京水産大学食品生産化学科 (Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, Konan-4, Minato, Tokyo 108, Japan).

今回は、Hd 脱炭酸作用に及ぼす温度、pH および食塩濃度の影響について検討したので、その結果を報告する。

実験材料および方法

供試菌株 海産魚から分離した N 菌群細菌 4 株、LAFA (I 型菌, 発光性 +, チトクロームオキシダーゼ +), FAOB (I 型菌), KGFC (II 型菌, +, -), HCOD (III 型菌, -, +) を実験に供した。

生菌数測定用培地 前報²⁸⁾の 50% 海水寒天平板培地を用いた。

人工海水 前報²⁸⁾の LYMAN and FREMING の人工海水を改変したものを使用した。

2% NaCl サバ肉抽出液 マサバの背肉 (表皮および皮下脂肪をできるだけ除去したもの) 500 g を乳鉢でよく磨砕し、それに蒸留水 1,000 ml を加え、90~100°C で 80 分間煮熟した。その煮熟液を東洋濾紙 No. 2 で濾過し、濾液に NaCl を 2% 濃度になるように添加し、pH を 6.0 に修正してから、121°C で 15 分間滅菌した。

洗滌菌体懸濁液 供試菌として LAFA 株を用いた。本菌を 2% NaCl グルコースブイヨン (ポリペプトン 10 g, 酵母エキス 3 g, グルコース 5 g, NaCl 20 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.2) の 4 l で、20°C, 20 時間培養し、遠心分離で集菌し、菌体を 2% NaCl 水で 5 回洗浄後、同 NaCl 水で菌液を約 20 ml とした。菌液の乾燥菌体量は 20~25 mg/ml とした。

濁度の測定 日立製作所製光電比色計 EPOB 型を用い、610 nm で培養液の濁度を測定した。

生菌数の測定 生菌数測定用培地を用い、塗抹法により、20°C 培養で測定した。なお供試菌培養液の 10 倍段階希釈は 50% 海水を希釈液として用いた。

Hm の定量試験 河端ら²⁹⁾の方法で行った。また、円

形クロマトグラフィーを用いる宮木-ルッター法³⁰⁾は、本来は定性試験であるが、今回は、発色の強さにより Hm 生成量の程度を示した。

Hd からの生成 CO₂ 量の測定 ワールブルグ検圧計を用いて CO₂ 量を測定した。

実験結果

実験 I ヒスタミン生成に及ぼす温度の影響 前報²⁷⁾で述べたごとく、N 菌群細菌の発育の上限温度は 25~30°C、至適温度は 20°C 前後にある。本実験では、15~25°C における Hm 生成を比較検討し、さらに洗滌菌体懸濁液を用いて 15~45°C における Hd 脱炭酸の活性を調べることにした。

発育菌による Hm 生成 供試菌 1 株につき、2% NaCl サバ肉抽出液 10 ml を 6 本準備し、それぞれに供試菌の 20 時間培養を 1 白金耳接種し、15.0°, 17.5°, 18.5°, 20.0°, 22.5°, 及び 25.0°C で培養し、15 時間後に濁度を測定し、同時に各培養について生成 Hm 量を円形クロマトグラムの発色度で比較観察した。その結果が Table 1 である。

各供試菌の発育至適温度は 20°C 前後にあったが、Hm 生成のそれはいずれも発育の至適より高いところにあった。

そこでさらに、詳細な差異を調べるために、供試菌 LAFA 株を用いて次の実験を行った。すなわち、2% NaCl サバ肉抽出液 100 ml を 4 本用意し、それぞれに供試菌の 20 時間培養を 10⁴/ml になるように接種し、15.0°, 17.5°, 20.0° 22.5° および 25.0°C で培養し、22 および 39 時間後に生菌数と Hm 生成量を測定した。その結果が Fig. 1 である。

22 時間後の発育では 22°C 付近に至適がみられたが、一方 Hm 生成では 25°C 以上にみられ、発育の至適より高い温度域にあることがわかった。

Table 1. Effect of temperature on the growth and the histamine formation

Strains tested		Temperature (°C)					
		15.0	17.5	18.5	20.0	22.5	25.0
HCOD	Growth*1	30	52	104	124	126	144
	Hm*2	—	±	+	+	++	++
KGFC	Growth	16	60	75	68	68	56
	Hm	—	—	±	+	+	+
LAFA	Growth	20	58	101	112	105	77
	Hm	—	±	±	+	++	++
FAOB	Growth	32	57	82	80	88	67
	Hm	—	±	±	+	++	++

Incubation period was 15 h.

*1 Growth: $-\log T \times 10^5$

*2 Hm: histamine formed

Fig. 1. Effect of temperature on the growth and the histamine formation of the N-group bacteria, LAFA.

The viable count (●) and the histamine content (○) were determined after 22 and 39 h.

洗滌菌体による Hm 生成 ワールブルグ検圧計を用い、15.0°, 20.0°, 25.0°, 30.0°, 35.0° 40.0° および 45.0°C について、LAFA 株の洗滌菌体による Hd の脱炭酸を測定した。すなわち、容器の主室には、洗滌菌体懸濁液 1 ml と 2% NaCl 加 McILVAINE 緩衝液 (pH 5.5) 1 ml を入れ、側室には 2% NaCl 加 Hd 溶液 (100 μM/ml, pH 5.5) を 0.2 ml 入れて実験を行った。その結果が Fig. 2 である。Hd 脱炭酸の至適温度は、時間によって少しずつずれているが、35°~40°C にあることがわかった。

実験 II ヒスタミン生成に及ぼす pH の影響 前報²⁷⁾で述べたごとく、N菌群細菌の発育の限界 pH は、酸性側で 4.5 付近、アルカリ側で 9.0 以上、また至適 pH は 6~8 の間にある。本実験では、pH 4.7~7.0 における発育と Hm 生成を比較検討し、さらに洗滌菌体懸濁

Fig. 2. Effect of temperature on the formation of histamine by the washed cell suspension of the N-group bacteria, LAFA.

Reaction was carried out with a Warburg manometer.

液を用いて pH 4.0~8.0 における Hd 脱炭酸の活性を調べることにした。

発育菌による Hm 生成 pH 4.68, 4.95, 5.35, 5.92, 6.59, 6.59, 7.00 の各種 2% NaCl サバ肉抽出液 10 ml に各供試菌の 20 時間培養を接種し、20°C で培養し、20 時間後に濁度と生成 Hm を観察した。その結果が Table 2 である。

なお、各種 pH の 2% NaCl サバ肉抽出液の調製は、上記の方法で述べたごとく、マサバの背肉 500 g に蒸留水 500 ml を加え、煮熟し、濾過し、その濾液 3 容に対して蒸留水 1 容、各種 pH の McILVAINE 緩衝液 (M/5 Na₂HPO₄ と M/10 クエン酸) 2 容を加え、さらに NaCl を添加し、滅菌して調製した。

Table 2 に示したごとく、発育の至適 pH は、各供試菌とも 6.5~7 付近にあり、一方 Hm 生成の方は 5.3~

Table 2. Effect of pH value on the growth and the histamine formation

Strains tested		pH					
		4.68	4.95	5.35	5.92	6.59	7.00
HCOD	Growth* ¹	2	30	85	125	180	150
	Hm* ²	—	±	+	++	+	+
KGFC	Growth	2	45	80	102	120	100
	Hm	—	±	+	±	±	±
LAFA	Growth	8	60	105	117	150	150
	Hm	—	±	+	+	±	±
FAOB	Growth	10	57	90	98	131	150
	Hm	—	±	+	+	±	±

Incubation period was 20 h.

*¹ Growth: $-\log T \times 10^3$

*² Hm: histamine formed

Fig. 3. Effect of pH value on the growth and the histamine formation of the N-group bacteria, LAFA.

The viable count (●) and the histamine content (○) were determined after 7, 15 and 24 h.

Fig. 4. Effect of pH value on the formation of histamine by the washed cell suspension of the N-group bacteria, LAFA.

Reaction was carried out at 35°C for 120 min with Warburg manometer.

6 付近にあって、発育の至適 pH より低かった。そこでさらに、詳細な差異を調べるために供試菌 LAFA 株を用いて次の実験を行った。すなわち、pH 4.87, 5.31, 5.87, 6.51, 6.85 の各種 2% NaCl サバ肉抽出液 100 ml に供試菌の 20 時間培養を接種し、20°C で培養し、生菌数および Hm を測定した。その結果が Fig. 3 である。

発育では pH 5.8 から 6.8 までほとんど差はなかったが、Hm 生成の方は、15 時間後では 5.8, 24 時間後では 5.3 付近に至適がみられた。以上の結果から、発育の

至適 pH は微酸性から中性付近に、Hm 生成の方は 5~6 の間にあることがわかった。

洗滌菌体による Hm 生成 ワールブルグ検圧計を用い、pH 4.00, 4.79, 5.38, 6.00, 7.20, 8.00 における LAFA 株の洗滌菌体による Hd 脱炭酸を 35°C で測定した。その結果が Fig. 4 である。

CO₂ 発生は、pH 4.0 や 8.0 でもみられたが、最高値を示したのは pH 5.4 であった。したがって N 菌群細菌の Hd 脱炭酸酵素の至適 pH はこの付近にあることがわかった。

実験 III ヒスタミン生成に及ぼす NaCl 濃度の影響

前報²⁷⁾で述べたごとく、N 菌群細菌の発育の NaCl 濃度限界は、下限が 0.5% 付近、上限が 5% 付近にあり、また至適は 1~3% の間にある。本実験では、0.5~5% における発育と Hm 生成について比較検討し、さらに洗滌菌体懸濁液を用いて Hd 脱炭酸の活性を調べることとした。

発育菌による Hm 生成 NaCl 濃度が 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, および 3.0% の各サバ肉抽出液 10 ml に供試菌 1 白金耳を接種し、20°C で培養し、20 時間後に濁度および Hm を観察した。その結果が Table 3 である。

発育の至適濃度は、LAFA が 1.0~2.0%, FAOB および KGFC が 2.0~3.0%, HCOD が 1.0% にみられた。また Hm 生成の至適濃度もほぼそれに一致するようであった。そこでその点を詳細に調べるために、供試 LAFA 株を用いて次の実験を行った。すなわち、上記各種サバ肉抽出液に供試菌の 20 時間培養を接種し、20°C で培養し、生菌数および Hm 量を測定した。その結果を Fig. 5 に示した。

Fig. 5. Effect of NaCl concentration on the growth and the histamine formation of the N-group bacteria, LAFA.

The viable count (●) and the histamine content (○) were determined after 7, 15 and 24 h.

Table 3. Effect of NaCl concentration on the growth and the histamine formation

Strains tested		NaCl concentration (%)					
		0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
HCOD	Growth* ¹	100	192	114	120	48	10
	Hm* ²	—	+	+	+	±	—
KGFC	Growth	95	94	110	114	48	9
	Hm	—	—	±	±	—	—
LAFA	Growth	100	155	146	122	8	5
	Hm	—	±	±	±	—	—
FAOB	Growth	90	94	110	112	38	8
	Hm	—	±	±	±	—	—

Incubation period was 20 h.

*¹ Growth: $-\log T \times 10^3$ *² Hm: histamine formed

Fig. 6. Effect of NaCl concentration on the formation of histamine by the washed cell suspension of the N-group bacteria, LAFA.

Reaction was carried out at 35°C with a Warburg manometer.

発育に対する NaCl の至適濃度は 1.5% 前後にあり、一方、Hm 生成に対しては 1.5~2.0% の間にあって、発育の至適とはほぼ一致した。

洗滌菌体による Hm 生成 ワールブルグ検圧計を用い、0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 および 5.0% の各食塩濃度における LAFA 株の洗滌菌体による Hd 脱炭酸の活性を測定した。その結果が Fig. 6 である。

洗滌菌体による Hm 生成では濃度間に顕著な差はみられなかった。したがって、N 菌群細菌の Hd 脱炭酸酵素は NaCl 濃度に強い関係はないようであった。

考 察

Epps³¹⁾ によると、*C. perfringens* の Hd 脱炭酸酵素は 37°C に至適温度があるという。他方、EGGERTH¹⁾ によると、数種の細菌では、37°C より低温の方に至適が存

在するといわれ、また河端ら¹³⁾も、30°C 以上で培養した *P.morganii* の酵素活性は低下すると述べている。しかるに、N 菌群細菌の場合は、発育が低温性であるにもかかわらず、該酵素の至適温度は 35°~40°C にあり、全く発育可能な温度範囲からはずれていることがわかる。したがって、本菌群では、発育の上限温度において酵素活性は最高であると考えられ、事実、発育菌による Hm 生成の実験では、最高値は発育の上限温度に近い 25°C で得られている。すなわち、Hm 生成の至適温度は酵素活性のそれより低いところにあるが、しかし至適温度における発育はかなり旺盛なので、たとえ酵素活性が低下するにしても、Hm の多量生成は可能であると考えられる。GALE²⁰⁾ によると、*E. coli* や *C. perfringens* の Hd 脱炭酸酵素は、pH 5 付近において最も強い活性が得られると述べている。また、木俣ら⁹⁾ および河端ら¹²⁾ によると、*P. morganii* の該酵素の至適 pH は 6 前後乃至 5 付近に認められると報告している。一方、N 菌群細菌では、洗滌菌体の実験によると、該酵素の至適 pH は 5.4 付近にあり、上記中温菌のそれとはほぼ同じであることがわかる。しかし、それは発育の至適 pH (6.5~7 付近) より若干酸性側にずれているが、pH 5.4 における発育は比較的旺盛であるので、Hm の多量生成は可能であると考えられる。

木俣ら²³⁾ によれば、*A. histaminum* I および II (その後 *P. morganii* に変更) における Hm 生成の至適食塩濃度はそれぞれ 2~3% および 1% であるという。一方、N 菌群細菌の該酵素活性は、洗滌菌体の実験によると、NaCl 濃度に関係であるらしい。したがって、Hm の生成は発育の至適濃度において最高値が得られるはずであり、事実、発育良好な 1~3% の濃度範囲において Hm 生成も高い数値を示している。

Hm はアレルギー様食中毒原因物質のひとつであると考えられているが、その生成菌としての N 菌群細菌の意

義について考察すると、Hd 含量の多い赤身魚肉の pH は 5.5~6.0 にあるので、中温性 Hm 生成菌と同様に N 菌群細菌にとっても赤身魚は Hm 生成の好適の培地であるといえる。しかも本菌は海産魚に周年存在し、かつ低温で増殖し、Hm を生成、蓄積するので、鮮魚の低温流通においても食品衛生上注意すべき細菌ではないかと考えられる。

要 約

N 菌群細菌の Hm 生成に及ぼす温度、pH および NaCl 濃度の影響を調べた。

1) 培養における Hm 生成の至適温度は発育のそれより若干高いところにあった。また、洗滌菌体による Hd 脱炭酸の至適温度は 35°~40°C にあった。

2) 培養における Hm 生成の至適 pH は発育のそれより若干酸性側にずれており、pH 5~6 付近にあった。洗滌菌体による Hd 脱炭酸の至適 pH は 5.4 であった。

3) 培養における Hm 生成の至適 NaCl 濃度は発育のそれとほぼ同じで、1~3% であった。しかし、洗滌菌体による Hd 脱炭酸は NaCl 濃度にほとんど無関係であった。

本研究の遂行にさいして、御助言を賜った東京水産大学食品生産化学科、堀江 進教授に厚く御礼を申し上げます。また、本研究の一部は、文部省科学研究費補助金によったことを記し、謝意を表します。

文 献

- 1) A. H. EGGERTH: *J. Bacteriol.*, **37**, 205-222 (1939).
- 2) E. E. GALE: *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, **6**, 1-32 (1946).
- 3) M. KIMATA and A. KAWAI: *Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ.*, **6**, 1-2 (1953).
- 4) M. KIMATA and M. AKAMATSU: *Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ.*, **8**, 1-3 (1955).
- 5) O. EHRLMANN and E. WERLE: *Biochem. Z.*, **318**, 560-578 (1948).
- 6) M. KIMATA, A. KAWAI, and M. AKAMATSU: *Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ.*, **14**, 33-41 (1958).
- 7) M. KIMATA and A. KAWAI: *Mem. Cell. Agric., Kyoto Univ., Fish. Ser. Spec.*, 92-99 (1958).
- 8) M. KIMATA and A. KAWAI: *Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ.*, **18**, 1-7 (1959).
- 9) 相磯和嘉・豊浦秀世・藤田久稔: 日本細菌学雑誌, **10**, 1015-1019 (1955).
- 10) K. AISO, H. TOYOURA, and H. IIDA: *Japan. J. Microbiol.*, **2**, 143-147 (1958).
- 11) 河端俊治・石坂公成・三浦利之・佐々木忠尚: 日水誌, **22**, 41-47 (1956).
- 12) 河端俊治・鈴木 茂: 日水誌, **25**, 473-480 (1959).
- 13) 河端俊治・鈴木 茂: 日水誌, **25**, 481-487 (1959).
- 14) S. H. ARNOLD, R. J. PRICE, and W. D. BROWN: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **46**, 991-995 (1980).
- 15) 海瀬好和: 千葉医学会誌, **36**, 149-156 (1960).
- 16) J. ROSENTHALER, B. M. GUIRARD, G. W. CHANG, and E. E. SNELL: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **54**, 152 (1965).
- 17) G. W. CHANG and E. E. SNELL: *Biochemistry*, **7**, 2005 (1968).
- 18) S. L. TAYLOR, L. S. GUTHERTZ, M. LEATHERWOOD, and E. R. LIEBER: *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 274-278 (1979).
- 19) M. FERNICK: *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, **14**, 52-60 (1970).
- 20) E. F. GALE: *Advances in Enzyme.*, VI, Interscience Pub. Inc., New York, 1946, p. 1.
- 21) 相磯和嘉・豊浦秀世・中野啓吾: 日本細菌学雑誌, **11**, 517-520 (1956).
- 22) R. E. BUCHANAN, N. E. GIBBONS ed.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1974, p. 327.
- 23) M. KIMATA and M. AKAMATSU: *Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ.*, **8**, 4-18 (1955).
- 24) M. OKUZUMI and M. AWANO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 1285-1291 (1983).
- 25) M. OKUZUMI, H. YAMANAKA, and T. KUBOZUKA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 161-167 (1984).
- 26) M. OKUZUMI, H. YAMANAKA, T. KUBOZUKA, H. OZAKI, and K. MATSUBARA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 653-657 (1984).
- 27) M. OKUZUMI, S. OKUDA, and M. AWANO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 799-804 (1982).
- 28) M. OKUZUMI, S. OKUDA, and M. AWANO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 1591-1598 (1981).
- 29) 河端俊治・内田 大・赤野多恵子: 日水誌, **26**, 1183-1191 (1960).
- 30) 宮本高明: 食品衛生研究, **12**, 7-14 (1954).
- 31) H. M. R. EPPS: *Biochem. J.*, **39**, 42 (1945).