氷蔵および氷冷下のサバにおけるヒスタミン生成と細菌フローラについて

石本 亮, 笠間憲太郎, 森井秀昭

(1994年5月12日受付)

Histamine Formation and Bacterial Flora in Mackerel Stored in Ice and at the Temperature of Ice

Ryo Ishimoto,*¹ Kentaro Kasama,*² and Hideaki Morii*^{1, 2}

In order to determine the mechanism of histamine (Hm) formation in scombroid fish stored at low temperature, total viable and luminous bacterial counts (TVC and LBC), bacterial flora, Hm contents in several parts of mackerel stored in ice and at the temperature of ice, and Hm formation by the isolates were studied.

In the first experiment (Exp. I), Hm was formed in the muscles during storage at the temperature of ice but not in ice. Hm content was far higher in the ventral muscles than in the dorsal muscles. *P. phosphoreum* grew in the abdominal walls in both storages (ca. 81% in LBC/TVC), and in the muscles during storage at the temperature of ice (ca. 2.5% in LBC/TVC). *P. phosphoreum* isolated formed a high level of Hm. In the second experiment (Exp. II), a small amount of Hm was formed in the muscles, especially the ventral muscles, and *P. phosphoreum* was not found in fish before and after storage. These results indicate that *P. phosphoreum* plays an exclusive role in histamine formation in mackerel stored at the temperature of ice.

Both whole and halophilic bacterial floras were dominated by *Vibrio* in all the parts (skin, muscle, abdominal walls) of fish in Exp. I and by *Pseudomonas* or *Moraxella* in Exp. II. *Photobacterium leiognathi* was found in all the parts of fish before storage in Exp. I but not in Exp. II, and *P. phosphoreum* also grew only in fish after storage in Exp. I as above. *Pseudomonas* or *Moraxella* dominated also in Exp. I after growth of *P. phosphoreum*. These results suggest that *Photobacterium* grows in the flora dominated by *Vibrio*, especially halophilic floras, and hardly grows in the flora dominated by *Pseudomonas* or *Moraxella*.

キーワード: 氷蔵, 氷冷, サバ, ヒスタミン, 細菌フローラ, 発光細菌, *Photobacterium phosphoreum*

低温好塩性ヒスタミン (Hm) 生成菌については, 1981年に Okuzumi ら¹⁾により 5 および 20°C に貯蔵したサバ肉のホモジネート試料から分離され, N 菌群細菌として報告された。この報告では, N 菌群細菌は四つの菌型 (I ~IV 型) に分けられ, このうち II 型は発光細菌の *Photobacterium phosphoreum* であろうとし, また他の発光細菌 (I 型) と非発光細菌 (III および IV 型) の分類学的位置は不明であるとしている。次に, Okuzumi ら²⁾は 2.5°C に貯蔵したサバ, イワシ, サンマの魚体にも新鮮時に $1 \sim 10^2$ /g, 腐敗時には $10^6 \sim 10^8$ /g の N 菌群細菌が存在するとし, 食品衛生上の重要性を指摘した。また, Okuzumi and Awano³⁾は海産魚の皮膚では同菌は大半が 10^2 /cm² 以下であったが, 腸管からは内容物 1 g 当たり

$10^3 \sim 10^8$ が検出され, Hm 生成菌の割合が腸管で高いことを報告した。

一方, 著者らは通常鮮魚の流通で用いられている氷蔵を中心に, 低温貯蔵した赤身魚における Hm 生成に関し, 研究を進めてきた。これまでの報告で, サバ^{4, 5)}またはニシン⁶⁾を 10°C 貯蔵と氷蔵した場合, それらの内臓ではいずれの貯蔵下でも, また表皮では 10°C 貯蔵下で発光細菌が高い割合で見いだされたが, 背部内層筋肉や氷蔵下の表皮では検出されず, またこれら発光細菌の大半が *P. phosphoreum* で, 同菌は多量の Hm を生成した。また, サバ⁵⁾を同温度に貯蔵した場合, 特に 10°C 貯蔵では背部外層筋肉と内臓での Hm 量が極めて多かったが, 背部内層筋肉では少なかった。以上のことから, Hm の

*¹ 長崎大学大学院海洋生産科学研究科 (Graduate School of Marine Science and Engineering, Nagasaki University, Bunkyo, Nagasaki 852, Japan).

*² 長崎大学水産部 (Faculty of Fisheries, Nagasaki University, Bunkyo, Nagasaki 852, Japan).

生成には *P. phosphoreum* が主な役割りを演じること, また背部内層筋肉や氷蔵魚の表皮で発光細菌が検出されなかったことについては発光細菌が海洋細菌であることに起因すること, またこれまでの観察で発光は通常腐敗臭がないときに確認され, 腐敗臭の増加に伴いそれは減衰し (これらのことについては羽根田⁶⁾ によっても観察されている), すなわち発光細菌の消長 (Hm の消長) は細菌フローラの構成と密接な関連があることが考えられた。

そこで今回は, 上述の考えや結果を確認するため, 氷蔵 (魚体を氷と直接接触させて水中に貯蔵) および氷冷 (魚体を氷と直接接触させずに水中に貯蔵) したサバについて表皮, 筋肉, および腹壁の生菌数, 発光細菌数および細菌フローラ (属段階まで, 特に発光細菌については種段階までの分類), および背部外層筋肉, 背部内層筋肉, および腹部筋肉における Hm 量の経時変化, さらに分離菌の Hm 生成能を調べた。

実験方法

氷蔵および氷冷下のサバにおける Hm 生成に関する実験 氷蔵および氷冷したサバ *Scomber japonicus* について Hm 量, 生菌数, および発光細菌数を経時的に調べた。サバは鮮魚店から購入した。氷蔵は魚体と氷が直接接するように魚体を水中に埋めず, 氷冷は魚体と氷が直接接しないように, ビニール袋に魚体を入れ, それを水中に埋めずめた。実験は 4 日間隔で 24 日間行い, 供試魚は 1 回の分析に 3 尾を用いた。なお, 一連のこの貯蔵実験は 11 月と 12 月に, 計 2 回行った。

生菌数および発光細菌数の測定と菌株の分離 供試魚の表皮 (背部), 筋肉 (表皮より約 5 mm 以深の層), および腹壁について生菌数と発光細菌数の測定および菌株の分離を行った。表皮および腹壁については, 滅菌したコルクボーラー (直径 2.5 cm) をそれらの表面に密着させ, その部分を 10 ml の 0.1% ペプトン-リン酸緩衝液 (pH 7.0) で十分に洗浄して集菌し, 菌数測定用試料とした。筋肉については, その約 1 g に 9 ml の同緩衝液を加えポリトロン (Kinematica GmbH, Steinhofhald 20, 6005 Luzern CH) を用いてけん濁液とした。次に, これらの試料を同緩衝液を用いて 10 倍段階希釈液とし, PYBG 寒天平板培地 (ポリペプトン 0.5%, 肉エキス 0.25%, 酵母エキス 0.25%, グルコース 0.1%, 寒天 1.5%, 50% 海水, pH 7.0) に 0.2 ml ずつ接種し, 20°C で培養した。発光細菌数の測定は 10 倍段階希釈液接種平板のすべてについて 12~48 時間培養後に計数し, 総生菌数は 5 日間培養後に計数した。菌株の分離は総生菌数測定用の平板から外観の異なる集落を, 特に発光細菌に関しては総生菌数測定用平板以外の平板からも集落を釣菌し, 同平板培地

を用いて純粋分離した。

分離菌の同定 分離菌は Bergey's Manual^{7, 8)} を参考とし清水⁹⁾ の同定方式に従い属段階まで, 特に発光細菌については前報^{4, 5)} と同様にして種段階までの同定を行った。

Hm 量の測定 氷蔵および氷冷したサバの背部外層筋肉 (表皮から 1~2 mm), 背部内層筋肉 (約 5 mm 以深), および腹部筋肉 (腹壁から 1~2 mm) 中の Hm 量および分離菌培養液中の Hm 量を前報^{4, 5)} 同様に測定した。なお, 分離菌培養液中の Hm 量については, 発光細菌のすべて (*Photobacterium leiognathi* については総生菌数測定用平板より分離した 6 株とその他の平板より分離した 2 株の計 8 株, *P. phosphoreum* については総生菌数測定用平板より分離した 16 株とその他の平板より分離した 12 株の計 28 株) と, 氷蔵および氷冷下で Hm の生成が認められた貯蔵 12 日目以降の供試魚の各部位から分離した発光細菌以外のすべての菌株 (153 株) と貯蔵 8 日目に分離した各属の菌株の半数 (計 30 株) について調べた (総計は発光細菌 36 株とその他 183 株)。

結果

氷蔵および氷冷下のサバの各部位における総生菌数および発光細菌数の経時変化 氷蔵および氷冷したサバの表皮, 筋肉 (内層), および腹壁における総生菌数および発光細菌数の経時変化を Table 1 に示す。

実験 I (1 回目の貯蔵実験) においては, 貯蔵前の供試魚では表皮, 筋肉, および腹壁のいずれでも発光細菌が認められた。氷蔵および氷冷後では, 表皮についてはいずれの供試魚とも発光細菌は認められなかった。筋肉については氷蔵魚では発光細菌は確認できなかったが氷冷魚では貯蔵 16 日目と 20 日目にそれぞれ 8.0×10^6 /g および 1.7×10^7 /g の発光細菌が認められ, これらが総生菌数に占める割合はそれぞれ 2.1 および 2.8% であった。なお, 発光細菌は 16 および 20 日目とも供試魚 3 尾のうちの 1 尾だけで認められた。腹壁ではいずれの貯蔵魚でも 12 日目以降に発光細菌が認められ, 20 日目で最大となり, その数は氷蔵下では 9.7×10^7 /cm², 氷冷下では 4.9×10^7 /cm² で, これらが総生菌数に占める割合はそれぞれ 80.8 および 81.7% であった。また, 供試魚によってフローラのすべてが発光細菌で占められていた。実験 II (2 回目の貯蔵実験) では貯蔵前, 氷蔵および氷冷後の供試魚のいずれでも発光細菌は認められなかった。

なお, 総生菌数は実験 I および II とも, 表皮および筋肉では氷蔵魚は氷冷魚に比べその値は低く, 腹壁では逆に高かった。総生菌数の経時変化は各部位で異なった傾向を示し, 特に筋肉と腹壁では貯蔵 4 日目に生菌数は一時的に減少した。同じ部位を実験 I と II および氷蔵魚と

Table 1. Total viable count (TVC) and luminous bacterial count (LBC) in the skin, the inner layer of muscle, and the abdominal walls of mackerel during storage in ice and at the temperature of ice

Storage time (days)	Bacterial counts	Number of bacterial counts					
		In ice			At the temperature of ice		
		Skin (cfu/cm ²)	Muscle (cfu/g)	Abdominal walls (cfu/cm ²)	Skin (cfu/cm ²)	Muscle (cfu/g)	Abdominal walls (cfu/cm ²)
Experiment I							
0	TVC	4.3×10 ⁵	7.2×10 ⁵	4.2×10 ⁵	4.3×10 ⁵	7.2×10 ⁵	4.2×10 ⁵
	(LBC)	(1.6×10 ⁴)	(1.1×10 ⁴)	(1.1×10 ²)	(1.6×10 ⁴)	(1.1×10 ⁴)	(1.1×10 ²)
4	TVC	3.7×10 ⁵	3.2×10 ⁴	1.1×10 ⁴	3.5×10 ⁵	8.2×10 ⁴	2.5×10 ³
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)
8	TVC	2.7×10 ⁷	5.2×10 ⁶	1.8×10 ⁶	4.8×10 ⁸	4.0×10 ⁷	6.6×10 ⁴
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)
12	TVC	5.7×10 ⁸	2.4×10 ⁷	7.1×10 ⁶	8.5×10 ⁸	1.5×10 ⁸	1.5×10 ⁵
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	(1.7×10 ⁶)	($<10^2$)	($<10^2$)	(4.0×10 ⁴)
16	TVC	1.8×10 ⁹	4.0×10 ⁷	1.4×10 ⁷	2.1×10 ⁹	3.8×10 ⁸	2.1×10 ⁶
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	(6.7×10 ⁶)	($<10^2$)	(8.0×10 ⁶)	(8.5×10 ⁵)
20	TVC	3.7×10 ⁹	3.6×10 ⁸	1.2×10 ⁸	6.7×10 ⁹	6.1×10 ⁸	6.0×10 ⁷
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	(9.7×10 ⁷)	($<10^2$)	(1.7×10 ⁷)	(4.9×10 ⁷)
24	TVC	3.8×10 ⁹	8.5×10 ⁷	5.0×10 ⁷	1.4×10 ¹⁰	5.2×10 ⁸	9.2×10 ⁵
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	(5.6×10 ⁵)	($<10^2$)	($<10^2$)	(4.6×10 ⁵)
Experiment II							
0	TVC	4.3×10 ⁵	2.3×10 ³	1.6×10 ²	4.3×10 ⁵	2.3×10 ³	1.6×10 ²
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)
4	TVC	1.6×10 ⁵	1.5×10 ²	$<10^2$	6.7×10 ⁵	1.6×10 ³	$<10^2$
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)
8	TVC	1.2×10 ⁷	1.8×10 ⁴	2.4×10 ³	1.4×10 ⁸	3.8×10 ⁵	1.5×10 ²
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)
12	TVC	4.5×10 ⁸	1.4×10 ⁵	2.6×10 ³	3.9×10 ⁹	1.3×10 ⁶	1.3×10 ³
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)
16	TVC	1.3×10 ⁸	2.4×10 ⁵	2.5×10 ⁴	8.5×10 ⁹	1.6×10 ⁶	7.7×10 ³
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)
20	TVC	1.4×10 ⁸	1.4×10 ⁵	4.4×10 ⁶	1.0×10 ¹⁰	1.7×10 ⁶	4.9×10 ⁵
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)
24	TVC	2.8×10 ⁸	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.5×10 ¹⁰	1.9×10 ⁶	2.4×10 ⁵
	(LBC)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)	($<10^2$)

Mackerel was stored as touched directly (in ice) and indirectly with ice (at the temperature of ice). The inner layer of muscle is deeper 5 mm from the skin. The counts of bacteria were carried out using PYBG medium [polypeptone, 0.5%; beef extract, 0.25%; yeast extract, 0.25%; glucose, 0.1%; and agar, 1.5% in 50% sea water (pH 7.0)] at 20°C.

氷冷魚の間で比べてみると、いずれの部位の場合ともその両者では似た傾向を示した。なお、総生菌数は貯蔵前後の供試魚とも表皮では実験 I と II で有意な差は見られなかったが、筋肉と腹壁では実験 I は II に比べてその値が極めて高かった。

氷蔵および氷冷下のサバの各部位における全細菌フローラと好塩性細菌フローラの変動 氷蔵および氷冷したサバの表皮、筋肉、および腹壁における全細菌フローラと好塩性細菌フローラの経時変化を Fig. 1~4 に示す。

貯蔵前（貯蔵 0 日目）の供試魚においては、実験 I では表皮、筋肉、および腹壁いずれの部位でも中温性発光細菌の *P. leiognathi* が認められたが、全細菌フローラに関してはこれらのいずれの部位でも *Vibrio* が最も高い

割合を占め、その他 *Pseudomonas*, *Photobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus* が主要細菌として認められた。好塩性細菌フローラに関してはいずれの部位でも *Vibrio* や *Photobacterium* が優占し、*Pseudomonas* や *Moraxella* も主要細菌として認められた。また、全細菌フローラに占める好塩性細菌フローラの割合はいずれの部位でも 40~50% であった。これに対し、発光細菌を認めなかった実験 II では、全細菌フローラに関していずれの部位でも *Pseudomonas* および *Moraxella* がその大部分を占め、その他 *Vibrio*, *Bacillus*, *Micrococcus* などが認められた。好塩性細菌フローラもいずれの部位でも *Pseudomonas* および *Moraxella* がその大半を占めた。また、全細菌フローラに占める好塩性細菌フローラの割合は 30~60%

Fig. 1. The floras of the whole (A) and halophilic (B) bacterial strains isolated from the skin, the inner layer of muscle, and the abdominal walls of mackerel stored in ice in Experiment I.

Numerals show the number of bacterial strains used in the test. The strains were identified at a specific level for luminous bacteria in the same way as in previous papers^{4,5)} and at a generic level for the other bacteria according to the scheme of Shimizu⁹⁾ and Bergey's Manual.^{7,8)}

であった。

貯蔵魚の腹壁においては、実験Ⅰの水蔵および氷冷魚では低温性発光細菌の *P. phosphoreum* が12日目以降に認められたが、全細菌フローラに関してはいずれの貯蔵魚とも12または16日目までは *Vibrio* の割合が極めて高く、*Pseudomonas* が通常これにいつだが、12日目から発光細菌数の増加とともに *Pseudomonas* の割合が増加し、発光細菌数が最大値を示した20日目以降では *Pseudomonas* が最も高い割合を占めた。好塩性細菌フローラに関しては、いずれの貯蔵魚でも12日目までは *Vibrio* が大半を占めたがそれ以降では *Vibrio* の割合が減少し *Photobacterium* の割合が増加した。全細菌フローラに占める好塩性細菌フローラの割合はいずれの貯蔵魚でも12日目で約50%を占めたが、それ以降では漸減した。これに対し、実験Ⅱの水蔵および氷冷魚の腹壁では全貯蔵期間を通して発光細菌は認められなかったが、全細菌フローラに関しては全貯蔵期間を通して *Pseudomonas* や *Moraxella* が優勢し、特に貯蔵12日目以降では

この両者あるいは *Pseudomonas* によりその大半が占められた。また、全細菌フローラに占める好塩性細菌フローラの割合は貯蔵期間の増加に伴い漸減し、氷蔵では8日目、氷冷では12日目以降ではその割合は0%から数%に過ぎなかった。

貯蔵魚の筋肉においては、実験Ⅰの氷冷魚では *P. phosphoreum* が16日と20日目に認められたが、16日目までは *Vibrio* の割合が最も高く、*Pseudomonas* がこれにいつだが、20日目以降では *Vibrio* の割合は急減し、*Pseudomonas* がその大半を占めた。また *Moraxella*, *Bacillus*, *Micrococcus*, コリネ型細菌が認められた。好塩性細菌フローラに関しては16日目までは *Vibrio* が最も多かった。また、全細菌フローラに占める好塩性細菌フローラの割合は表皮や腹腔内面に比べ低く、またその変動が大きく、0%から35%の範囲で変動した。また、実験Ⅰの水蔵魚では氷冷魚に比べフローラの変動が大きく、また16日目以前でも *Vibrio* の割合が必ずしも最大値を示さないなどの違いは見られたが、概略的には氷冷魚につい

Fig. 2. The floras of the whole (A) and halophilic (B) bacterial strains isolated from the skin, the inner layer of muscle, and the abdominal walls from mackerel stored at the temperature of ice in Experiment I. Numerals show the number of bacterial strains used in the test.

て述べたこととほぼ同様な結果を示した。これに対して、発光細菌が検出されなかった実験 II の氷蔵魚と氷冷魚の筋肉では、全細菌フローラに関しては貯蔵全期間を通して *Pseudomonas* が最も高い割合を占め、特に 16 日目以降ではほぼ大半が *Pseudomonas* で占められた。その他 *Vibrio*, *Moraxella*, *Bacillus*, *Micrococcus* などが認められた。また、全細菌フローラに占める好塩性細菌フローラの割合は貯蔵に伴い急減し、特に氷冷魚では 12 日目以降では 0% で、また氷蔵魚でも 0% から数 % であった。

なお、貯蔵魚の表皮においては、前報³⁾での 10°C (空冷) 下では *P. phosphoreum* が確認されたが、氷蔵下では確認できなかったことから、本実験の氷冷魚と氷蔵魚の表皮でも細菌フローラに違いが見られることが期待されたが、実験 I および II ともこの両者でのフローラの構成およびその経時変化にはほとんど違いが見られず、全細菌フローラ、好塩性細菌フローラ、および全細菌フローラに対する好塩性細菌フローラの割合およびこれらの経時変化は、実験 I および II の場合とも筋肉および腹壁の結果とほぼ類似していた。

氷蔵および氷冷下のサバ筋肉における Hm 量の経時変化 氷蔵および氷冷したサバの背部外層筋肉、背部内層筋肉および、腹部筋肉における Hm 量の経時変化を Table 2 に示す。

実験 I においては、氷蔵魚では背部外層筋肉、背部内層筋肉、および腹部筋肉のいずれも 24 日間の貯蔵で Hm 量はほとんど増加しなかった。一方、氷冷魚ではいずれの筋肉でも 12 日目を境として Hm 量は増加し、特に腹部筋肉では 20 日目以降に急増した。しかし、最大含量を示した腹部筋肉の 24 日目でも 12 mg/100 g で、ヒスタミン中毒の目安とされる 100 mg/100 g¹⁸⁾ には達しなかった。

実験 II においては、腹部筋肉では氷蔵および氷冷魚とも増加傾向を示したが、実験 I の氷冷魚の同部位と比べるとその値は極めて低かった。

なお、実験 I および II の場合とも貯蔵前の供試魚では背部内層筋肉、腹部筋肉、および背部外層筋肉の順に Hm 量は減少し、特に背部外層筋肉ではその値は著しく低かった。

分離菌の Hm 生成能 分離菌の Hm 生成能を Table 3

Fig. 3. The floras of the whole (A) and halophilic (B) bacterial strains isolated from the skin, the inner layer of muscle, and the abdominal walls from mackerel stored in ice in Experiment II.

Numerals show the number of bacterial strains used in the test.

に示す。発光細菌のうち低温性の *P. phosphoreum* は 20℃ で 24 時間の培養液 100 ml 中に 11~75 mg の Hm を生成したが、中温性の *P. leiognathi* および発光細菌以外の菌株は Hm を生成しないか、生成したとしてもその量は 0.3 mg/100 ml 以下であった。

考 察

1 回目の貯蔵実験で、氷冷魚の筋肉では貯蔵 12 日目を境とし Hm が生成されたが、氷蔵魚では生成されなかった。一方、*P. phosphoreum* が 12 日目を境として腹壁で優占的に増殖し、特に氷冷魚では筋肉（内層）でも同菌を確認したが、氷蔵魚の筋肉では確認できなかった。また、2 回目の貯蔵実験では氷蔵および氷冷魚とも腹部筋肉で Hm が生成されたがその値は低く、また *P. phosphoreum* は確認できなかった。ところで、Hm の生成を認めた供試魚から分離した菌株のうち、*P. phosphoreum* だけが大量の Hm を生成し、発光細菌 *P. leiognathi* を含む他の菌株は Hm を生成しないか、生成してもその量は少なかった。以上のことから、実験 I の氷冷下のサバで多量に認めた Hm についてはその大半が *P. phosphoreum* に起因したと言える。また、実験 II の、特に腹部筋肉で少量な

がら認めた Hm については *P. phosphoreum* 以外の細菌により生成され、生菌数の増加に伴いその量も増加したと考えられる。

ところで、Okuzumi らは赤身魚における発光性・非発光性の低温好塩性 Hm 生成菌の存在を報告している。^{1,2,11,12)} ところが今回、分離菌の中には Hm を多量に生成する非発光細菌は確認できなかった。これについては、Okuzumi and Awano³⁾ が開発した Hm 生成菌分離用培地を用いなかったことが原因とも考えられる。しかし、このような分離用培地を用いないために同菌の分離される頻度が低くなる³⁾ ことがあっても、全く分離されないとは考えられない。事実 Okuzumi ら^{1,2)} によってもこのような分離用培地を用いなくても多数の非発光性の Hm 生成菌を分離している Okuzumi らが分離し供試した Hm 生成菌 32 株のうちの 20 株が非発光性であった。²⁾ また、この非発光性細菌は奥積¹³⁾ によると *P. phosphoreum* の発光性を失った変異種であろうとしている。そうだとすると、同非発光細菌が同発光細菌同様に優占増殖していたならば、同発光細菌だけが分離され、同非発光細菌が分離されないということはさらに考えにくい。すなわち、今回の実験に関しては、*P. phosphoreum*

Fig. 4. The floras of the whole (A) and halophilic (B) bacterial strains isolated from the skin, the inner layer of muscle, and the abdominal walls from mackerel stored at the temperature of ice in Experiment II. Numerals show the number of bacterial strains used in the test.

Table 2. Histamine development in each layer of the muscles of mackerel stored in ice and at the temperature of ice

Storage time (days)	Histamine formed ($\mu\text{g/g}$)					
	In ice			At the temperature of ice		
	Outer muscle	Inner muscle	Ventral muscle	Outer muscle	Inner muscle	Ventral muscle
Experiment I						
0	5.9	18.4	16.2	5.9	18.4	16.2
4	6.0	15.0	16.3	6.9	15.4	16.4
8	8.1	13.8	17.3	8.4	16.1	19.0
12	7.1	11.9	17.6	15.1	18.2	20.6
16	6.8	11.9	15.8	19.7	21.6	21.0
20	6.5	11.1	16.3	25.7	26.2	43.6
24	8.0	13.4	16.0	39.3	31.1	124.1
Experiment II						
0	6.7	18.0	16.2	6.7	18.0	16.2
4	6.5	16.5	15.8	7.8	17.2	15.7
8	6.2	14.1	14.8	8.8	15.2	15.5
12	5.2	13.3	15.3	8.8	15.2	15.5
16	5.7	13.5	18.6	8.2	15.2	17.1
20	5.8	15.2	21.0	10.6	17.3	21.9
24	8.3	19.0	28.6	12.9	19.2	24.1

The outer and inner muscles are layer from 1–2 mm and deeper 5 mm from the skin respectively, and the dorsal muscle is layer from 1–2 mm from the abdominal walls. Histamine was determined using the method of Taylor *et al.*¹⁴⁾

Table 3. Histamine formation by bacterial strains isolated

Bacterial strain	Number of strain	Histamine (mg/100 ml)
Luminous bacteria		
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	28	11.3–75.8
<i>Photobacterium leiognathi</i>	8	0.0–0.2
Other bacteria	183	0.0–0.3

P. leiognathi was isolated from mackerel before storage, and *P. phosphoreum* and other bacteria were isolated from mackerel which formed histamine in significant amount during storage at the temperature of ice.

The other bacteria were *Pseudomonas* (78 strains), *Vibrio* (73), *Moraxella* (13), *Bacillus* (11), *Micrococcus* (4), *Coryneform* (3), *Acinetobacter* (1).

Histamine formation was tested with Moeller's decarboxylase basal medium containing 1% histidine at 20°C for 24 h.

を認めなかった供試魚では Hm の値が低かったことを考え合わせると、優占的な増殖をし、Hm を多量に生成する非発光細菌は存在しなかったと考えるのが妥当であろう。なお、奥積¹³⁾は Hm 生成菌である N 菌群細菌の中にはヒスチジン脱炭酸作用が不活性のものもあるとし、したがって今回の供試魚でもこのような N 菌群細菌が生育していた可能性は否定できない。しかし、今回分離した非発光細菌 1969 菌株の中には *P. phosphoreum* の性状と一致したものは認められなかった。

なお、著者らがこれまでに分離し 20°C 下で継代培養している *P. phosphoreum* 199 菌株の約半数が発光能を失っている。ところで、奥積らの発光性を失なった *P. phosphoreum* であろうとする非発光性の Hm 生成菌のほぼすべて (18 菌株/19 菌株) はオキシダーゼ陽性²⁾であるが、著者らが分離した *P. phosphoreum* のすべてが同陰性 (標準菌株 ATCC11040 も陰性) であり、奥積らの言う非発光性の N 菌群細菌は *P. phosphoreum* の発光能だけを消失したものとは異なるようである。

また、前回^{4,5)}確認した表皮での *P. phosphoreum* の増殖は今回は確認できず、また今回は腹壁での同菌の増殖に続き筋肉での増殖を認め、したがって本筋肉の同菌は腹腔内細菌に由来したと言える。したがって腹部筋肉は背部内層筋肉に比べ Hm 量も高かったと考えられる。この考えについては内臓を除去したサバはそうでないサバに比べ筋肉の Hm 量が低かった事実⁹⁾からも支持され、また与口ら¹²⁾も同様の考えを示している。

ところで、発光細菌は海洋細菌であり、塩分がないと生育できない。前報⁹⁾で述べたように、氷蔵下のサバの表皮では *P. phosphoreum* が増殖しなかったが 10°C 貯蔵下 (空冷下) では増殖し、したがって今回の氷冷蔵の表皮でも同菌の増殖が考えられた。しかし、今回は 2 回の

実験の場合とも、表皮での増殖はなく、また表皮における細菌フローラの構成と好塩性細菌フローラの割合およびそれらの経時変化も氷蔵魚と氷冷蔵魚の間に有意な違いが見られなかった。したがって、氷蔵魚の表皮で *P. phosphoreum* が増殖しなかった理由については塩分要求性に加え、それ以外の理由も考慮しなければならない。

また、前報⁹⁾では *P. phosphoreum* は筋肉では増殖しなかったことを報告したが、今回は筋肉でも増殖し、同菌は筋肉内でも条件が整えば旺盛な生育をすることが明らかとなった。しかし、筋肉での同菌の増殖の機会が著しく低く、腹壁では供試魚 24 尾で同菌の増殖が見られたが筋肉では 2 尾で増殖したに過ぎなかった。これについては、筋肉の好塩性細菌フローラの割合が腹壁に比べて低いことから考えると、塩分濃度がその一因と推察される。特に今回、同菌の筋肉での増殖は氷冷蔵魚では見られたが氷蔵魚では見られなかった。この違いについても塩分濃度が関与するかどうかはなお明らかではないが、同菌が増殖していた供試魚は 2 尾だけである。また、細菌フローラの構成や好塩性細菌の割合およびそれらの経時変化も両貯蔵魚間で類似していた。したがって、両貯蔵魚で見られた違いが貯蔵方法の違いに基づくとは考えにくい。しかし、総生菌数については氷蔵魚と氷冷蔵魚で明らかな違いが見られ、したがって筋肉での同菌の増殖は鮮度低下に伴う組織の変化とそれに伴う物理的、化学的、および生物的要因も複雑に絡みっていると推察される。

今回、実験 I の供試魚では *P. leiognathi* と *P. phosphoreum* を認めたが実験 II では認めず、また実験 I の供試魚では *Vibrio* が、実験 II では *Pseudomonas* または *Moraxella* が最も高い割合で存在した。また、*P. phosphoreum* の増殖を認めた腹壁と筋肉では、*P. phosphoreum* の増殖に伴い *Vibrio* の割合が減少し、*Pseudomonas* の割合が増加した。すなわち、*Photobacterium* は *Vibrio* 特に好塩性 *Vibrio* が優占する環境下で増殖し、*Pseudomonas* や *Moraxella* が優占する環境下では増殖は抑制されると考えられる。ところで、鮮魚の腐敗細菌としては *Pseudomonas* が最も重要と言われる。したがって今回の両実験間の細菌フローラの違いも腐敗と関連すると考えられたが、*Pseudomonas* の割合が高い実験 II の供試魚のほうが鮮度が良かった。

これまでの研究で、腹壁または内臓^{4,5)}では *P. phosphoreum* が優占増殖した。したがってこれら同菌は筋肉内に漸次侵入し、多量のヒスタミンを生成すると考えられた。ところが、腹壁や内臓で同菌が優占増殖していたにも拘わらず筋肉での増殖は認められないか、認められるとしてもその頻度は低かった。また、今回氷蔵魚の腹壁では同菌が優占増殖していたにも拘わらずいずれの筋

肉部位でも Hm は生成されなかった。他方, Hm が生成され, その含量が最も多かった氷冷魚の貯蔵 24 日目(腐敗が進行し, 食用とはならない)の腹部筋肉でも 12.4 mg/100 g, また前報³⁾の 10°C 貯蔵の場合でもいずれの筋肉部位でも中毒を起こす量には至らなかった。特に, この 10°C 貯蔵の場合には内臓のほか表皮でも *P. phosphoreum* が優占増殖していた。以上の結果を踏まえると, 通常食用としている鮮魚では *P. phosphoreum* による中毒は一般的には起こり得ないと考えられる。

文 献

- 1) M. Okuzumi, S. Okuda, and M. Awano: Isolation of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria from *Scomber japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 1591-1598 (1981).
- 2) M. Okuzumi, S. Okuda, and M. Awano: Occurrence of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria (N-group bacteria) on/in redmeat fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 799-804 (1982).
- 3) M. Okuzumi and M. Awano: Seasonal variations in numbers of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria (N-group bacteria) in seawater and on marine fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 1285-1291 (1983).
- 4) H. Morii, D. C. Cann, and L. Y. Taylor: Formation of histamine by luminous bacteria isolated from scombroid fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 2135-2141 (1986).
- 5) H. Morii, D. C. Cann, and L. Y. Taylor: Histamine formation by luminous bacteria in mackerel stored at low temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 299-305 (1988).
- 6) 羽根田弥太: 発光生物, 恒星社厚生閣, 東京, 1985, pp. 8-17.
- 7) N. R. Krieg and J. G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore/London, 1984.
- 8) P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore-London-Los Angeles-Sydney, 1986.
- 9) 清水 潮: 海洋細菌—従属栄養細菌, 「海洋生物資源の探索と利用」(内藤 敦編), シーエムシー, 東京, 1986, pp. 69-82.
- 10) 清水 恒, 日引重幸: 水産物の腐敗に関する研究—XXIII. ヒスタミンの中毒限界濃度について. 日水誌, **21**, 365-367 (1955).
- 11) M. Okuzumi, H. Yamanaka, and T. Kubozuka: Occurrence of various histamine-forming bacteria on/in fresh fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 161-167 (1984).
- 12) 与口りお, 奥積昌世, 藤井建夫: 市販鮮魚における好塩性ヒスタミン生成菌の季節的消長. 日水誌, **56**, 1473-1479 (1990).
- 13) 奥積昌世: 冷蔵魚とヒスタミン生成菌. 化学と生物, **31**, 149-151 (1993).
- 14) S. L. Taylor, E. R. Lieber, and M. Leatherwood: A simplified method for histamine analysis of foods. *J. Food Sci.*, **43**, 247-250 (1978).