

宮崎県流通の水産食品におけるヒスタミン産生菌汚染状況調査及び柑橘精油（へべす及び日向夏）によるヒスタミン食中毒予防効果の検討

恒益知宏¹⁾ 高山清子 福留智子²⁾ 引地恵一²⁾
成田翼²⁾ 黒木麻衣³⁾ 野中勇志

Survey of Histamine-producing Bacteria Contamination in Seafood Products Distributed in Miyazaki Prefecture and Examination of The Preventive Effect of Citrus Essential oils (‘Hebesu’ and ‘Hyuganatsu’) on Histamine Food Poisoning

Tsunemasu Tomohiro, Takayama Kiyoko, Fukudome Tomoko, Hikichi Keiichi,
Narita Tsubasa, Kurogi Mai, Nonaka Yuji

要旨

本県では2017年から2019年にかけてシイラを原材料としたヒスタミン食中毒が連続して発生した。ヒスタミン食中毒の発生を未然に防ぐためには、本県に流通する水産食品のヒスタミン産生菌汚染状況を明らかにすることが重要であり、また、その汚染状況に応じた対策が必要と考えられた。そこで本調査では柑橘精油の抗菌活性に着目し、本県特有の柑橘類であるへべす及び日向夏の精油がヒスタミン食中毒予防効果を有するか検討した。ヒスタミン産生菌汚染状況調査においてシイラ20尾を調べたところ、18尾から*Photobacterium damsela*、2尾から*Enterobacter aerogenes*が検出された。*P. damsela*に対し、へべす精油及び日向夏精油をそれぞれ用いたところ、どちらの精油においても濃度依存性のヒスタミン産生菌増殖抑制効果及びヒスタミン蓄積抑制効果が得られた。本調査により、本県特有の柑橘類であるへべす及び日向夏の精油が*P. damsela*を原因とするヒスタミン食中毒の予防に有用である可能性が示された。

キーワード：ヒスタミン食中毒，ヒスタミン産生菌，食中毒予防，柑橘精油，へべす，日向夏

はじめに

ヒスタミン（以下「Hm」という。）食中毒は、Hmを高濃度に蓄積した食品を摂取することによりアレルギー様症状を呈する食中毒である¹⁾。本県においては、2017年から3年連続で発生しており、原因魚種は3年連続でシイラ、原因菌種は、2017年が*Raoultella planticola*、2018年及び2019年が*Photobacterium damsela*であった²⁾。Hm食中毒は全国的に発生し、Hm産生菌の特性などが広く研究されている³⁾ものの、本県に流通する水産食品のHm産生菌汚染状況等のHm食中毒リスクを調査した事例は少ない⁴⁾。そのため、本県におけるHm食中毒リスクの特徴を明らかにし、さらにHm食中毒予防に資する方法を検討することが

本県の食品衛生上重要と考えられる。

Hm食中毒予防のために温度管理は重要である²⁾が、温度管理以外の方法についても検討されている。山木らの報告⁵⁾では、電解水やpHコントロールなどが紹介されており、そのほかでは新田らがコロナ放電⁶⁾、保らが柑橘精油（文旦）⁷⁾によるHm産生菌の制御を報告している。

農林水産業の盛んな本県においては柑橘類の生産量が多く、その果実は生食だけでなく飲料等のさまざまな加工品の原材料にも使われているものの、果皮等加工残渣の有効活用が課題となっている。高橋らは、柑橘類の加工残渣の有効活用の一例として柑橘精油に着目し、その抽出方法について検討している⁸⁾。一方、本県にはへべすや日向夏など特有の柑橘類があるものの、それらの精油が

文旦精油⁷⁾と同様にHm産生菌の制御に使用できるかなどの特性は未だ明らかにされていない。

以上の背景から、本県におけるHm食中毒リスク調査として、本県流通の水産食品におけるHm産生菌汚染状況を調査し、さらに本県特有の柑橘類であるへべす及び日向夏の精油がHm食中毒の予防に資するかを検討したので報告する。

対象

1 水産食品における Hm 産生菌汚染状況調査

1) 鮮魚

県内漁港で 2023 年 10 月に水揚げされたシイラ 20 尾を水産業者から購入し、内臓を検体とした。

2) 水産加工品

缶詰、冷凍食品等 24 品目を 2022 年 3 月に県内の小売店から購入し検体とした。

2 柑橘精油による Hm 食中毒予防効果の検討

1) Hm 産生菌

本調査において分離された株である *P. damsela* mi01-01 を用いた。

2) 柑橘精油

県内で菓子製造時等に派生するへべす及び日向夏の果皮を原材料に、 50 ± 5 °Cの減圧水蒸気蒸留法により製造された精油を 2024 年 4 月に購入し使用した（合同会社 LC）。

方法

1 水産食品における Hm 産生菌汚染状況調査

1) 水産食品からの Hm 産生菌分離

通堂⁹⁾及び神吉ら¹⁰⁾の方法を参照し、一部改変して行った。すなわち、検体をホモジナイズした後に 5 g を量り取り、Histidine Broth（ハイポリペプトン（富士フィルム和光純薬株）10 g, Bacto Yeast Extract（Gibco）3 g, D(+)-グルコース（富士フィルム和光純薬株）5 g 及び L-ヒスチジン塩酸塩一水和物（富士フィルム和光純薬株）5.47 g を 50%人工海水（New Ocean, 株）ジャパンバイオケミカル）1L に溶解後 pH 5 に調整）45 mL を加え、ストマッカーで懸濁した。懸濁後、各懸濁液を 30°C 24 時間で増菌培養した。増菌培養後の各懸濁液を 30°C 24 時間で 0.1%グルコース添加

Niven's agar¹¹⁾で画線培養した。

なお、*Morganella morganii* NBRC3848 の菌液を Histidine Broth に添加したものを陽性対照として、Histidine Broth のみを陰性対照として増菌培養の操作からそれぞれ実施し、その後得られた液を 30°C 24 時間で 0.1%グルコース添加 Niven's agar で画線培養した。

2) DNA 抽出

アルカリ熱抽出法により行った。すなわち、0.1%グルコース添加 Niven's agar 上で周囲が紫変したコロニーをそれぞれ 1 白金耳かきとり、PBS 50 μ L に懸濁した。懸濁液 5 μ L を 25 mM NaOH（ナカライテスク株）50 μ L に添加し、100 °C で 10 分間加熱し、冷却後に 80 mM Tris-HCL（株ニッポンジーン）50 μ L を添加し中和した。その後、4 °C、10,800 rpm で 10 分間遠心し、その上清を DNA 抽出液とした。

3) PCR による HDC 遺伝子検出

Takahashi らの方法¹²⁾を参照し、一部改変して行った。PCR 試薬に TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version（タカラバイオ株）を用い、PCR 反応液組成はマニュアルに従った。ヒスチジン脱炭酸酵素（Histidine decarboxylase, HDC）遺伝子のプライマーセットである *hdc-f*（TCH ATY ARY AAC TGY GGT GAC TGG RG）及び *hdc-r*（CCC ACA KCA TBA RWG GDG TRT GRC C）を DNA 抽出液を添加した PCR 反応液に添加し、サーマルサイクラー（Veriti, Applied Biosystems）を用いて HDC 遺伝子の増幅反応を行った。DNA 抽出操作の確認として、16S rRNA のプライマーセットである 10F（GTT TGA TCC TGG CTC A）及び 800R（TAC CAG GGT ATC TAA TCC）を用いて 16S rRNA の増幅反応を併行して行った。HDC 遺伝子の PCR 反応は、94°C 5 分、40 cycle（94°C 30 秒-58°C 30 分-72°C 1 分）及び 72 °C 4 分とした。16S rRNA の PCR 反応は、94°C 5 分、40 cycle（94°C 30 秒-55°C 30 分-72°C 1 分）及び 72 °C 4 分とした。

PCR 産物は、画線培養で得られたコロニー数が少ない場合はアガロースゲル電気泳動、多い場合はマイクロチップ電気泳動でそれぞれ確認した。アガロースゲル電気泳動では、エチジウムブロマイド（富士フィルム和光純薬株）を 0.5 μ g/mL の濃度になるように添加した 2%アガロースゲル

(Prime Gel Agarose PCR - Sieve, タカラバイオ(株) 及び 1×TAE (富士フイルム和光純薬(株)) で、100V, 40 分間泳動した PCR 産物を紫外線照射により確認した。マイクロチップ電気泳動では、マイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA MCE-202, (株)島津製作所) のマニュアルに従って操作し、PCR 産物を確認した。色素は GelStar® (ロンザ(株)) を用いた。

4) 16S rRNA 解析による菌種推定

第十八改正日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」¹³⁾を参照し、一部改変して行った。16S rRNA の PCR 反応は方法 1-3) により行った。得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) によりサイクルシーケンスを行った。得られた産物を BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) により精製し、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。得られた塩基配列を MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) により処理し、National Center for Biotechnology Information の Nucleotide BLAST により菌種推定を行った。

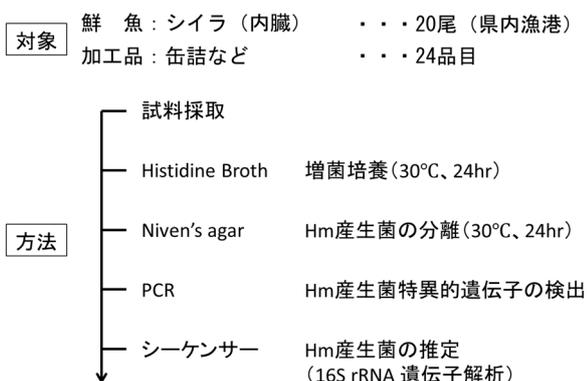


図 1 Hm 産生菌汚染状況調査の概要

2 柑橘精油による Hm 食中毒予防効果の検討

1) 精油成分の分析

高橋らの方法⁸⁾を参照し、一部改変して行った。すなわち、へべす精油及び日向夏精油 10 µL をアセトン (富士フイルム和光純薬(株)) で 1000 倍にそれぞれ希釈し、表 1 に示す条件により GC-MS

(AgilentGCMSD 7890AGC/5975C, Agilent) で分析した。得られたデータを NIST Mass Spectral Library (NIST 08) のデータベースと照合し成分同定を行った。

表 1 GC-MS 分析条件

装置	AgilentGCMSD 7890AGC/5975C
カラム	HP-5MS, Φ 0.25 mm×30 m, 膜厚 0.25 µm
昇温条件	70°C (5 min) -2°C/min - 230°C (5 min)
注入口温度	230°C
キャリアーガス	ヘリウム
注入方法	スプリットレス
注入量	1 µL

2) Hm 産生菌増殖抑制効果の検討

保らの方法⁷⁾を参照し、一部改変して行った。すなわち、0.5%L-ヒスチジン塩酸塩 (関東化学(株)) 及び 1.5%食塩 (関東化学(株)) を添加したトリプトソーヤブイヨン (日水製薬(株)) 5 mL に鮮魚のシイラから分離した *P. damsela* mi01-01 の菌液 10 µL (10⁸ cfu/mL) を接種した。接種後の培地を十分に攪拌し、直ちにへべす精油及び日向夏精油の 0.5, 1.0, 2.0, 4.0%量をそれぞれ培地に添加し攪拌した。以上の培地が入った試験管を振とう機にセットし、30°Cに設定した恒温槽に入れ、23 時間振とう培養した。振とう培養後、紫外可視近赤外分光光度計 (V-760, 日本分光(株)) を用いて培地の濁度 (O.D. 660 nm) を計測した。

3) Hm 蓄積抑制効果の検討

上原らの方法²⁾を参照し、一部改変して行った。すなわち、方法 2-2) で得られた菌液を 75°C¹⁴⁾ で 10 分間加熱し、4500 rpm で 5 分間遠心して得られた上清 100 µL を 10%トリクロロ酢酸溶液 900 µL と混和し、蒸留水で 10 mL に定容した後、50% アセトニトリル溶液でさらに 100 倍希釈し、0.2 µm フィルターろ過で得られた液を LC-MS/MS (Prominence, (株)島津製作所。API 3200QTRAP, AB SCIEX) で分析した。LC-MS/MS の分析条件は上原らの方法²⁾に従った。

4) 統計処理

方法 2-2) 及び 3) は 5 併行で実施し、平均値 ± 標準偏差で結果を示した。統計検定は、Tukey 検定を用い、有意水準を 1%とした。

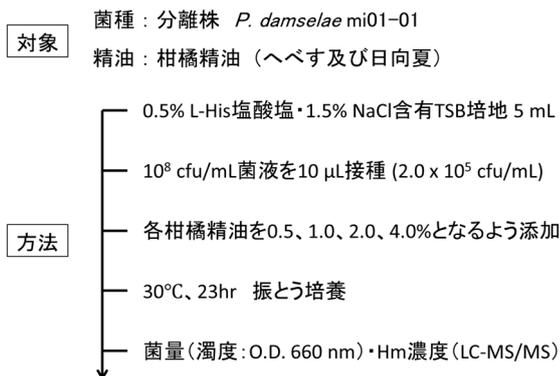


図2 Hm 食中毒予防効果検討の概要

結果

1 水産食品における Hm 産生菌汚染状況

Hm 産生菌は、鮮魚 18 検体から *P. damsela*, 2 検体から *Enterobacter aerogenes* が分離された。水産加工品ではサバを原材料とする干物 1 検体から *R. planticola* が分離され、これを除く 23 検体から Hm 産生菌は分離されなかった (表 2)。

表 2 水産食品における Hm 産生菌汚染状況

鮮魚	検体数	菌種(検出数)
シイラ(内臓)	20	<i>Photobacterium damsela</i> (18) <i>Enterobacter aerogenes</i> (2)
水産加工品	検体数	菌種(検出数)
缶詰	11	検出しない
冷凍食品	8	検出しない
干物(サバ)	2	<i>Raoultella planticola</i> (1)
干物(アジ)	2	検出しない
だし(煮干)	1	検出しない

2 柑橘精油による Hm 食中毒予防効果

1) 精油成分

得られた成分組成を表 3 に示す。へべす精油及び日向夏精油において、含有率の最も高い成分が Limonene, 次に高い成分が γ -Terpinene であった。一方、全ての成分がそれぞれの柑橘精油に共通して存在しているわけではなく、含有率も全ての成分で不一致であった。

2) へべす精油の Hm 食中毒予防効果

濃度依存性の Hm 産生菌増殖抑制効果及び Hm 蓄積抑制効果が観察された (図 3)。

3) 日向夏精油の Hm 食中毒予防効果

濃度依存性の Hm 産生菌増殖抑制効果及び Hm 蓄積抑制効果が観察された (図 4)。

4) へべす精油と日向夏精油の比較

へべす精油と日向夏精油の Hm 産生菌増殖抑制効果の比較を図 5 に、Hm 蓄積抑制効果の比較を図 6 に示す。比較するそれぞれの効果 (%) は、次式により算出した数値を用いた。

$$\text{効果(\%)} = \frac{\text{無添加群} - \text{柑橘精油添加群}}{\text{無添加群}} \times 100$$

表 3 柑橘精油成分組成

成分名	へべす		成分名	日向夏	
	へべす	日向夏		へべす	日向夏
Sabinen	0.08	0.09	γ -Terpinene	7.48	5.69
α -Pinene	1.42	1.05	α -Terpinolene	0.33	0.25
β -Phellandrene	0.15	-	Linalool	0.18	1.59
β -Pinene	0.65	0.67	α -Terpineol	-	0.18
β -Myrcene	1.68	1.48	Decanal	0.34	-
α -Phellandrene	1.38	-	β -Elemene	0.86	-
3-Carene	-	0.47	cis- β -Farnesene	2.64	0.36
Limonene	79.26	85.34	α -Selinene	0.28	-
D-sylvestrene	2.24	2.83	α -Farnesene	1.03	-
		合計(%)		100	100

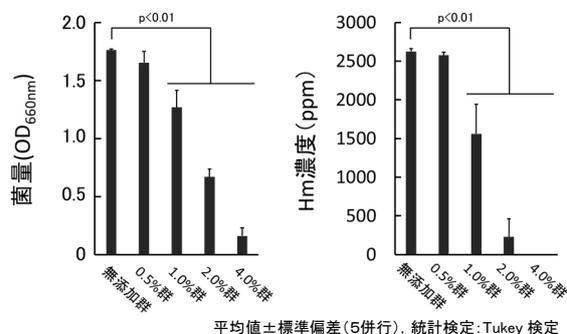


図 3 へべす精油の Hm 食中毒予防効果

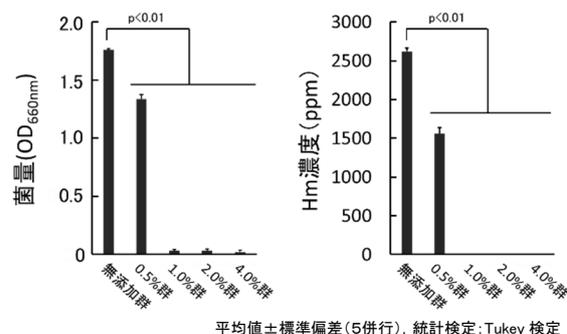


図 4 日向夏精油の Hm 食中毒予防効果

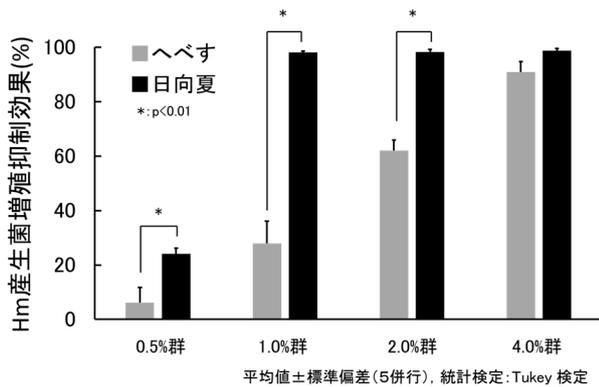


図5 Hm産生菌増殖抑制効果の比較

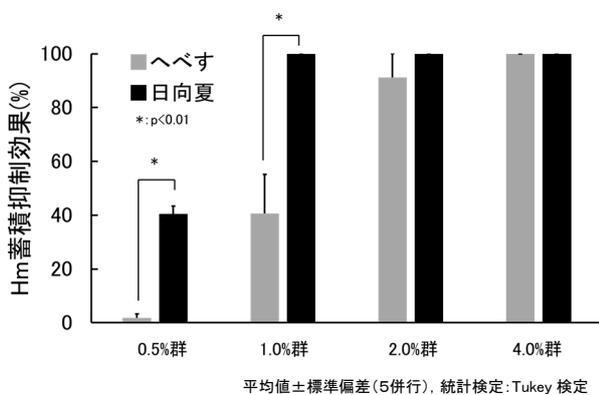


図6 Hm蓄積抑制効果の比較

考察

1 水産食品におけるHm産生菌汚染状況

本調査において、シイラ20尾のうち18尾から *P. damsela* が検出された。 *P. damsela* は、2018年及び2019年の本県におけるHm食中毒の原因菌であった。このことから、シイラを原因魚種とするHm食中毒の予防策として、 *P. damsela* を制御することが重要と考えられた。

2 柑橘精油によるHm食中毒予防効果

本調査では、本県特有の柑橘類であるへべす及び日向夏の精油がHm産生菌である *P. damsela* の増殖及びHmの蓄積を濃度依存性に抑制することが示され、保ら⁷⁾の報告を支持する結果となった。Limoneneなどの柑橘精油成分単独ではHm産生菌に対して高い抗菌活性を示さない^{15,16)}ものの、精油成分を組み合わせることにより抗菌活性が向上することを示唆している報告¹⁷⁾があり、

本調査では保ら⁷⁾と同様に精油成分の相互作用によりHm産生菌に対して抗菌活性が示されたと考えられた。

本調査で購入し使用した柑橘精油の場合、日向夏精油がへべす精油と比べヒスタミン食中毒予防効果が高いという結果となった。一方、抽出条件により柑橘精油の成分組成が変化するという報告⁸⁾があることから、それぞれの柑橘精油についてHm産生菌に対する抗菌活性を最大化する抽出条件の検討が必要と考えられる。また、本調査では柑橘精油の抽出条件だけでなく、検討したHm産生菌及び精油の種類が限定的であることから、Hm食中毒リスクの低減化に向け今後幅広い種類での検討が重要と考えられる。さらに実用化を目指し、食品加工への応用を検討することで本県におけるHm食中毒リスク低減化のみならず、本県の食品産業振興に貢献できると考えられる。

まとめ

本調査により、本県におけるHm食中毒リスクの一つとして *P. damsela* による水産食品の汚染が考えられた。さらに、本県特有の柑橘類であるへべす及び日向夏の精油が *P. damsela* によるHm食中毒を予防できる可能性が示された。今後は、柑橘精油の抽出条件の検討、Hm産生菌及び精油の種類の組合せの調査、食品加工への応用等を検討し、本県におけるHm食中毒リスクの低減化や食品産業の振興に貢献する。

文献

- 1) 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(2) : 61-71.
- 2) 上原直美, 保田和里, 前田智子 他. 鮮魚中のヒスタミン産生菌に与える温度管理の影響について. 宮崎県衛生環境研究所年報 2019 ; 31 : 69-71.
- 3) 都丸亜希子, 登田美桜, 工藤由起子. 日本のヒスタミン食中毒事例における魚種およびヒスタミン生成菌に関する文献情報解析. 食品衛生学雑誌 2022 ; 63(3) : 109-116.

- 4) 山本雄三, 中原藤正, 橋口玲子 他. 市販鮮魚, 魚肉加工食品における *Morganella morgamii* の分布ならびに本菌によるヒスタミン産生におよぼす温度と食塩濃度の影響. 食品と微生物 1991 ; 7 (3) : 159-165.
- 5) 山木将悟, 山崎浩司. 水産物におけるヒスタミン食中毒とヒスタミン生成菌. 日本食品微生物学会雑誌 2019 ; 36(2) : 75-83.
- 6) 新田陽子, 熊谷孝. ヒスタミン産生菌が誘発する食中毒の予防を目的としたコロナ放電の効果について. 日本食品微生物学会雑誌 2020 ; 37(2) : 75-80.
- 7) 保聖子, 里見正隆, 舊谷亜由美 他. 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. 日本水産学会誌 2017 ; 83(5) : 769-776.
- 8) 高橋克嘉, 永山志穂, 山田和史. 抽出温度によるへべス精油組成の変化. 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告 2016 ; 61 : 57-60.
- 9) 通堂裕子. 低温ならびに中温性ヒスタミン生成菌の挙動と迅速同定法に関する研究. 博士論文, 東京海洋大学, 東京. 2013.
- 10) 神吉政史, 吉田綾子, 塚本定三 他. 赤身魚およびその加工品からのヒスタミン生成菌の検出. 日本食品微生物学会雑誌 2000 ; 17(3) : 195-199.
- 11) Niven, C. F. Jr., Jeffrey, M. B., Corlett, D. A. Jr. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 1981; 41: 321-322.
- 12) Takahashi H, Kimura B, Yoshikawa M, et al. 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. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 2003; 69: 2568-2579.
- 13) 厚生労働省. 遺伝子解析による微生物の迅速同定法. 第十八改正日本薬局方 2021 ; 2600-2601.
- 14) 厚生労働省. 大量調理施設衛生管理マニュアル (平成 29 年 6 月 16 日) . <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000168026.pdf> (2025 年 2 月 19 日)
- 15) 上井恵理, 寺田岳, 秋山純基 他. 精油成分蒸気を用いたヒスタミン産生菌の制御. 食品衛生学雑誌 2011 ; 52(5) : 276-280.
- 16) 上井恵理, 寺田岳, 秋山純基 他. 好塩性ヒスタミン産生菌の天然由来抗菌物質等を用いた制御. 食品衛生学雑誌 2011 ; 52 (6) : 315-320.
- 17) 上村繁樹, 山口菜摘, 大久保努 他. 香りの抗菌活性の評価方法の改変と香り分子の組合せによる抗菌活性の向上. におい・かおり環境学会誌 2013 ; 44(6) : 397-404.