

令和4年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「小規模事業者におけるHACCPの検証に資する研究」

分担研究報告書

水産加工品中のヒスタミン合成細菌の挙動及び制御方法の検討

研究分担者 五十君 静信（東京農業大学）

研究協力者 大槻 駿介、榎木 真吾（東京農業大学）

高澤 秀行、矢野 俊博、多賀 夏代、高澤 慎太郎
(株式会社高澤品質管理研究所)

戸田 政一（学校法人東京農業大学食品安全研究センター）

研究要旨

全国水産加工業協同組合連合会発行の「HACCPの考え方を取り入れた衛生管理の手引書」（小規模な水産加工業者向け）における危害要因物質であるヒスタミンについてはその制御法に関する科学的知見が求められた。ヒスタミンは、ヒスチジンを含む赤身魚などにおいて、ヒスタミン合成菌 (*Morganella morganii*) などが増殖した場合に合成され、アレルギー様食中毒の原因となる。ヒスタミンは、食品の加熱調理後も活性が保たれるため、水産加工の段階で合成に係わる細菌の制御が求められる。

サバにおける当該菌の菌数の消長及びヒスタミン産生の相関性について検討した。これまでの研究により「ヒスタミン合成菌 (*Morganella morganii*) の保存温度と時間における菌数動態とヒスタミン産生の相関性」、及び「25°C保存におけるアジ・塩サバ干物の菌数の消長及びヒスタミン産生の相関性」を報告した。令和3年度は、培地および食材としてサバを対象とし、これまでの実験結果の再現性の検証、リスク管理方法の提案を行った。

市販されている一部の醤油中にはヒスタミンが検出されており、醤油等においてもHACCPにおいてヒスタミンの制御の必要性が求められている。そのため、これまで醤油業界ではヒスタミンに関する検討が行われ、その低減化に取り組んでいる。我々のこれまでの検証事業においても醤油由来乳酸菌 (*Tetragenococcus halophilus*) 培養液中にアレルギーを発症させる量のヒスタミンが確認された。

令和3年度の市販魚類発酵食品の汚染実態調査により、市販され流通している塩濃度の比較的高い魚加工品（醤油加工品、照り焼き、西京・味噌漬・糠漬け）等を購入し、それらの食品中のヒスタミン汚染の実態と分離される細菌に関する調査を実施した。結果として103検体の中で糠加工品9検体中5検体（55%）が、魚醤の安全性の指標である200ppmを超えるヒスタミンを検出した。糠加工品は他の加工品に比べてヒスタミン量は高値であった。本結果を踏まえ、本年度は糠加工品でヒスタミン量が高値を示す原因として特に高い値が検出された「へしこ」について、詳しい調査を行った。

A. 研究目的

全国水産加工業協同組合連合会発行の「HACCPの考え方を取り入れた衛生管理の手

引書」（小規模な水産加工業者向け）に記載されている危害要因物質であるヒスタミンに関する実験として、これまで研究班では最も代表

的なヒスタミン合成菌 (*Morganiella morganii* : 以後 *M. morganii*) の保存温度と時間における増殖菌数とヒスタミン産生の相関性に関する実験結果についてその再現性を確認し、その制御方法の提案と対処方法に関する考察と科学的根拠を提供した。また、令和3年度の市販流通の魚加工品（醤油加工品、照り焼き、西京・味噌漬・糠漬け）等のヒスタミンの汚染実態調査により、このような食品にヒスタミン汚染の可能性が示唆された。市販魚加工品 103 検体のヒスタミンレベルは一般的にそれほど高くはなかったものの、特に「魚のぬか漬け」は 9 検体中 5 検体 (55%) がコーデックスの魚醤の安全性の指標である 200ppm を超える値で、糠加工品は他の加工品に比べてヒスタミン量は高値を示した。本年度は糠加工品の「へしこ」について、ヒスタミン汚染の実態と分離される細菌に関する調査を実施し、ヒスタミンのリスクマネージメントに有用と思われる検討を行った。

B. 研究方法

① 市販の魚のぬか漬けのヒスタミン汚染調査

市販の魚のぬか漬けにおけるヒスタミン汚染の実態調査を行った。産地や製造元の異なる市販の魚のぬか漬け、サバ、サンマなど 12 検体を購入した。身（魚体）とぬかそれぞれについてヒスタミン濃度を測定した

一般生菌数の測定は、標準寒天培地（日水製薬）を用いて、通知法に従い実施した。耐塩性菌の菌数測定は、MRS 培地（関東化学）を用いて行った。ヒスタミンの定量は、前処理として検体前処理用抽出液 [0.1M EDTA・2Na(pH8.0)] を用い、チェックカラーヒスタミン（富士フィルム株式会社）を用いた。汚染実態調査は、それぞれ、魚体とぬかに分け、滅菌生理食塩水に入れ懸濁し 10% 乳剤を作製後、一般生菌数及び耐塩性菌細菌数を各検体 2 平板にて混釀平板培養法により測定した。

② ぬか漬けから分離した細菌叢からの菌の分離同定

高濃度のヒスタミンが検出されたぬか漬けと、比較のためにヒスタミンが低濃度であった

ぬか漬けそれぞれから、菌株の分離を試み、分離菌株について生化学的性状と遺伝子情報などから菌種の同定を行った。

③ 自作ぬか漬けにおけるヒスタミン産生性の検討（実験 I）

自作ぬか漬けにおけるヒスタミン濃度・pH・水分活性の測定では生のサバの切り身に等量の塩を加え、1 週間常温で漬け込んだ後、市販のぬか床に常温で漬け込み、ヒスタミン濃度と水分活性、pH を測定した。20 週目までの測定を行った。

魚肉（サバ）における培養温度に伴うヒスタミン生成量と菌数の測定

魚肉特にヒスチジンを多く含み扱いやすい真サバを使用した。一検体につき *M. morganii* $10^2 \sim 10^3$ cfu/g になるように接種した。ネガティブコントロールとして未接種のサバを同時に培養した。5、10°C では 1、3、5、10 日間。酵素活性が高い 25°C では 14、24、72 時間培養し経時的にヒスタミン生成量及び菌数を 3 連で測定した。

M. morganii 未接種の魚肉（サバ）におけるヒスタミン生成菌の分離・同定

M. morganii 未接種のサバにおいてもヒスタミンの産生を確認したため、サバから分離した菌株を Tryptic Soy Broth に接種し、分離・菌種同定を行った。

シメ鰯を想定し酢酸及び食塩を添加したサバのヒスタミン生成量・菌数の計測

（実験 4）①酢酸、②食塩、③酢酸・食塩、の 3 群にて実験を行った。なお、酢酸と食塩はそれぞれ酢酸（株式会社 Mizkan）、食塩（伯方塩業株式会社）を使用した。家庭用のレシピを参考に添加量はサバ 100g につき酢酸 100g、食塩は 30g とし、それぞれに一時間漬け込んだ。その後、水で洗い流し水分をふき取り検体とした。一検体につき *M. morganii* NBRC3848 を $10^2 \sim 10^3$ cfu/g になるように接種した。温度管理については未処理のサバでヒスタミン生成が確認された 10°C と 25°C に限定して行った。10°C では 1、3、5、10 日間。酵素活性が高い 25°C では 14、24、72 時間培養し経時的にヒスタミン生成

量及び菌数を3連で測定した。

④自作ぬか漬けにおけるヒスタミン產生性の検討（実験Ⅱ）

検体A：「滅菌した魚」を通常の方法でへしこ糠漬けする。⇒ 検体Aがヒスチジン添加濃度に比例して「陽性」になればへしこ糠由来ヒスタミン產生菌からのヒスタミンが考えられる。検体B；「検体A」のリファレンス（コントロール）として通常の方法で生魚をへしこ糠漬けする。⇒ 検体Bはヒスチジン添加濃度に比例して「陽性」なると思われる。

結果の評価：

- ① 検体A「+」 検体B「+」 ⇒
へしこ用糠由来が考えられる。
- ② 検体A「+」 検体B「-」 ⇒
へしこ用糠由来が考えられる
(*ヒスチジン添加濃度が低い可能性あり)
- ③ 検体A「-」 検体B「+」 ⇒
へしこ糠用由来なし
- ④ 検体A「-」 検体B「-」 ⇒
へしこ糠用由来なし
(*ヒスチジン添加濃度が低い可能性あり)

1) 材料

(1) 検体：

市販魚（令和3年検証でヒスタミンが高値に出た魚：さば）

へしこ用糠： 糠は同一の糠を使用する。
糠は室温（25°C）保存とする。

(2) 培地・試薬

一般菌数測定培地 ······ 標準寒天培地（日水製薬）

耐塩性菌菌数測定培地 ······ MRS 培地（関東化学）10%NaCl 加で使用

L-ヒスチジン塩酸塩-1水和物 ··· 関東化学

(3) ヒスタミン定量試薬

①前処理：検体前処理用抽出液 [0.1M EDTA · 2 Na (pH8.0)]

②測定：チェックカラーヒスタミン（富士フ

イルム株式会社）

へしこ糠の調製

サバ	塩漬けしたサバを1~4cm3に裁断したもの	250g
へしこ用糠		250 g
塩漬け水		250 mL

実験（図5）

サバの塩漬け

サバ 5 Kg (水分は60%とした)

水 10L

食塩 1.69Kg

最終食塩濃度が13%になるように、10Lの水に食塩1.69Kgを溶解し、そこにサバ（フィレ）を漬け込み25°Cで10日間放置した。なお、サバが完全に浸漬できるように、カバーと錘を使用した。

・検体前処理（殺菌処理検体・未殺菌検体の調製）

検体A（殺菌処理）：塩漬けしたサバ（2.5Kg）および塩漬け水（3L）を別々にビーカーまたは三角フラスコに入れ、殺菌処理（121°C、15分）した。

これを、①に従って混合し、密封容器に入れ、所定期間（25°C）放置した。

検体B（未殺菌）：塩漬けしたサバおよび塩漬け水を使用し、①に従って混合し、密封容器に入れ、所定期間（25°C）放置した。

・ヒスチジン含有糠の調製

検体A：へしこ用糠に殺菌した塩漬け水を加えて糠ベースとする。

なお、塩漬け水はヒスチジン濃度が各々n=3で、0g/100g、1g/100g、2g/100gの割合になるようにヒスチジンを添加*）した。

検体B：へしこ用糠に未殺菌の塩漬け水を加えて糠ベースとする。

なお、塩漬け水はヒスチジン濃度が各々n=3で、0g/100g、1g/100g、2g/100gの割合になるようにヒスチジンを添加*）した

*）ヒスチジン添加量は（図6）を参考とした。

検体の漬け込み

検体 A: 本糠に殺菌後のサバを漬け込み、室温（25°C）で 0 日、3 日、6 日、10 日、90 日放置を検体として各々のヒスタミン量*・一般生菌数・耐熱性乳酸菌・pH・Aw を測定する。

検体 B: 本糠に未殺菌のサバを漬け込み、室温（25°C）で 0 日、3 日、6 日、10 日、90 日放置を検体として各々のヒスタミン量*・一般生菌数・耐熱性乳酸菌・pH・Aw を測定する。

*）ヒスタミン定量方法（図 7）

C. 研究結果

① 市販の魚のぬか漬けのヒスタミン汚染調査

市販の魚のぬか漬けにおけるヒスタミン汚染の実態調査は、表 1 に示した市販の 12 検体を購入し、魚体とぬかそれぞれについて、ヒスタミン量を定量した。

魚体とぬかにおけるヒスタミン濃度の測定結果を図 1 に示す。

② ぬか漬けから分離した細菌叢からの菌の分離同定

また、主にぬかから菌の分離を行い、単独菌株とし、主な菌株について、培養液中のヒスタミン合成量を図 2 に示す。菌株の同定及びヒスタミン生成能の評価では高濃度にヒスタミンが検出されたぬか漬けと比較のために低濃度であったサバのぬか漬けから 17 菌株を分離した。その結果全ての菌からヒスタミンが検出された。測定を行った株についての同定結果を表 2 に示した。

③ 自作ぬか漬けにおけるヒスタミン產生性の検討（実験 I）

自作ぬか漬けにおけるヒスタミン濃度・pH・水分活性の測定では生のサバの切り身に等量の塩を加え、1 週間常温で漬け込んだ後、市販のぬか床に常温で漬け込み、ヒスタミン濃度と水分活性、pH を測定した。20 週目まで、定期的にヒスタミン量を測定した結果を図 3 に示した。ヒスタミン濃度は、測定期間中を通じ大きな変化は観察されず、魚体では最高値で 20 週

目に 10.09 µg/g となり codex 基準を超えることはなかった。また、測定時の pH と水分活性の推移を図 4 に示した。こちらについても大きな値の変化は認められなかった。

④ 自作ぬか漬けにおけるヒスタミン產生性の検討（実験 II）

一般生菌数の変動（図 8）

検体 A と B の初発菌数は検体 A では 4 乘個/g、検体 B では 7 乘個/g であり、その差は糠由来（検体 A）と糠とサバ由来（検体 B）の差であることが示唆された。

以後、室温放置（25°C）で 10 日目には検体 A では 7 乘～8 乘個/g、検体 B では 8 乘個/g となりその差は殆ど無くなかった。

また、ヒスチジン添加濃度による増殖変動は確認されなかった。

耐塩性乳酸菌の変動（図 9）

検体 A と B の初発菌数は検体 A では 1 乘個/g、検体 B では 6 乘個/g であり、糠の耐塩性乳酸菌量は少量であることが確認された。

しかしながら以後、室温放置（25°C）で 10 日目には検体 A、検体 B 共に 7 乘～8 乘個/g となりその差は殆ど無くなかった。

また、一般生菌数と同様にヒスチジン添加濃度による増殖変動は確認されなかった。

ヒスタミン產生量変動（図 10）

検体 A、検体 B 共に 0 日目のヒスタミン濃度は 7 ppm 以下であり、ヒスチジン添加濃度による差も認められなかった。

以後、室温放置（25°C）で 3 日、6 日、10 日目までヒスタミン產生量の増加は認められず、一般生菌数、耐塩性乳酸菌増殖との相関は見られなかった。

又、ヒスチジン添加濃度による差も認められなかった。

pH の変動（図 11）

検体 A、検体 B 共に初発 pH は 6.2 前後であった。

検体 A はその後の室温放置で 10 日目に 6.04 前

後となったが大きなpH変動はみられなかった。検体Bでは3日目、6日目、10日目と経時的にpHは低下し10日目にはpHは5.1前後となり、初発pHとの差はpH1以上の差が確認された。

Awの変化(図12)

検体A、検体B共に0日～10日まで0.93前後であった。

D. 考察

①市販の魚のぬか漬けのヒスタミン汚染調査

福井県、石川県、北海道などで、魚のぬか漬けは市販されており、12検体を購入し魚体、ぬかのヒスタミン濃度を検討した。魚種はイワシ3検体、サバ6検体、サンマ1検体、ニシン2検体であった。同一品については、魚体とぬかはヒスタミン濃度はほぼ同じであり、モニタリングはどちらで行っても構わないと思われた。

製品によりヒスタミン濃度は異なり、7検体はヒスタミン濃度が400 $\mu\text{g/g}$ を超えており、このような製品は何らかの対策が求められると思われる。4検体は、ほとんど検出されず、1検体は200 $\mu\text{g/g}$ と中間の値であった。

半数以上がコーデックスの魚醤の基準値を超えており、ヒスタミン量を制御する。何らかの対応が必要と思われ、さらなる制御法に関する検討を行う必要がある。

②ぬか漬けから分離した細菌叢からの菌の分離同定

ぬか漬けから分離された菌株の培地中でのヒスタミン産生能には、菌株間で明らかな差が認められた。特にヒスタミン産生能力が高い菌は、*Tetragenococcus halophilus*であり、当該菌の制御は重要と思われる。他の分離菌株も弱いながらもヒスタミン合成能が認められていることから、このような細菌の内どの菌が定着しているかにより、へしこのヒスタミン量の高低が決まってくる可能性が考えられる。

③自作ぬか漬けにおけるヒスタミン産生性の検討(実験I)

自作のぬか漬けにおける20週間の観察では、

高濃度のヒスタミン産生は確認できなかった。実際の製品の生産は、温度の高い時期に行われており、発酵期間も長期にわたることから、実験的にヒスタミン産生を観察するにはかなりの条件検討が必要と思われる。

④自作ぬか漬けにおけるヒスタミン産生性の検討(実験II)

糠由来のヒスタミンの存在を確認する目的として、検体A：滅菌魚の糠漬け、検体B：リファレンスとして未滅菌魚の糠漬けを作製し検討した。一般生菌数・耐塩性乳酸菌・ヒスタミン定量の経時的な変動を確認した。

又、ヒスタミン産生を促進させる目的で両検体にヒスチジン0g/100g、1g/100g、2g/100gを添加し、その濃度勾配によるヒスタミン産生量の差についても試みた。

結果として両検体では一般生菌・耐塩性乳酸菌については初発菌数に差はあるものの室温放置で経時的に増殖し、10日目では8乗前後のピークに達していたが、ヒスタミン産生については比例的な増加は見られず、全ての検体で7ppm以下の濃度であった。

また、ヒスタミン産生促進の目的でヒスチジン添加を試みたが有意の差は認められなかつた。本実験結果の原因として以下のことが推察された。

a)我々が経験した令和3年度市版魚加工品のヒスタミン汚染調査報告で103検体中ヒスタミン100ppmを超えた検体は5検体(5%)と確立が低いこと又、ヒスタミン産生と耐塩性乳酸菌数との相関性が認められなかつたことから今回用いたサバ検体及び糠検体にヒスタミン産生菌は存在していないことが考えられ、スペイク実験をしないと検証は難しいと考えられる。

b)今般の添加回収率が59.4%であったことから検体に何らかの測定に影響を与える干渉物質存在し、正確な測定が出来なかつた可能性が考えられた。

c)一般的に*Morganella morganii*はかなりな頻度でサバに生息しているが今回の実験では塩濃度13%と高濃度の糠に漬けたので存在し

ていてもヒスタミンの產生を与えることはなかったと考える。

今回の自作ぬか漬けによる実験結果では目的である市販糠中の Codex 鮮度低下指標 (100ppm) 以上のヒスタミンの存在を確認することは出来なかった。サバ殺菌・未殺菌共に 0 日のヒスタミンが若干なりとも高値に示されていることから、低いレベルの *Morganella morganii* の影響の可能性が示唆された。

糠床で塩漬け (13%) にしているので活性自体の影響はないと思われた。以上の内容を考慮し、次回検討は未殺菌の方は増菌培地を使って *Morganella morganii* の存在の可否の評価が必要と考える。

また、糠床に存在している乳酸菌は活性を持っているとは限らないので糠床にあらかじめ分離したヒスタミン合成型の乳酸菌をスパイクした実験も行う必要性があると考える。

E. 結論

市販の魚のぬか漬けからは高い濃度のヒスタミンが確認されており、何らかの対策が必要

と思われる。今回の自作ぬか漬けによる実験結果では目的である市販糠中の Codex 鮮度低下指標 (100ppm) 以上のヒスタミンの存在を確認することは出来なかった。今後さらなる条件検討を行い、魚のぬか漬けにおいてなぜヒスタミンが高濃度になってしまうかの検討を行うことにより、その制御法が提案できる可能性があると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

表1. 市販の魚のぬか漬けにおけるヒスタミン汚染の実態調査の検体リスト

検体	商品名	製造元	魚種	販売方法
A	いわしのへしこ	■■■	イワシ	冷蔵
B	いわし糠漬	■■■	イワシ	冷蔵
C	いわし糀漬	■■■	イワシ	冷蔵
D	さばのへしこ半身	■■■	サバ	冷蔵
E	さばのへしこ	■■■	サバ	冷蔵
F	さばのへしこ	■■■	サバ	冷蔵
G	さば糠	■■■	サバ	冷蔵
H	さばの糠漬けの粕漬	■■■	サバ	冷蔵
I	さばのへしこ	■■■	サバ	冷蔵
J	糠さんま	■■■	サンマ	冷凍
K	甘塩ヌカにしん	■■■	ニシン	冷凍
L	にしん糠漬	■■■	ニシン	冷蔵

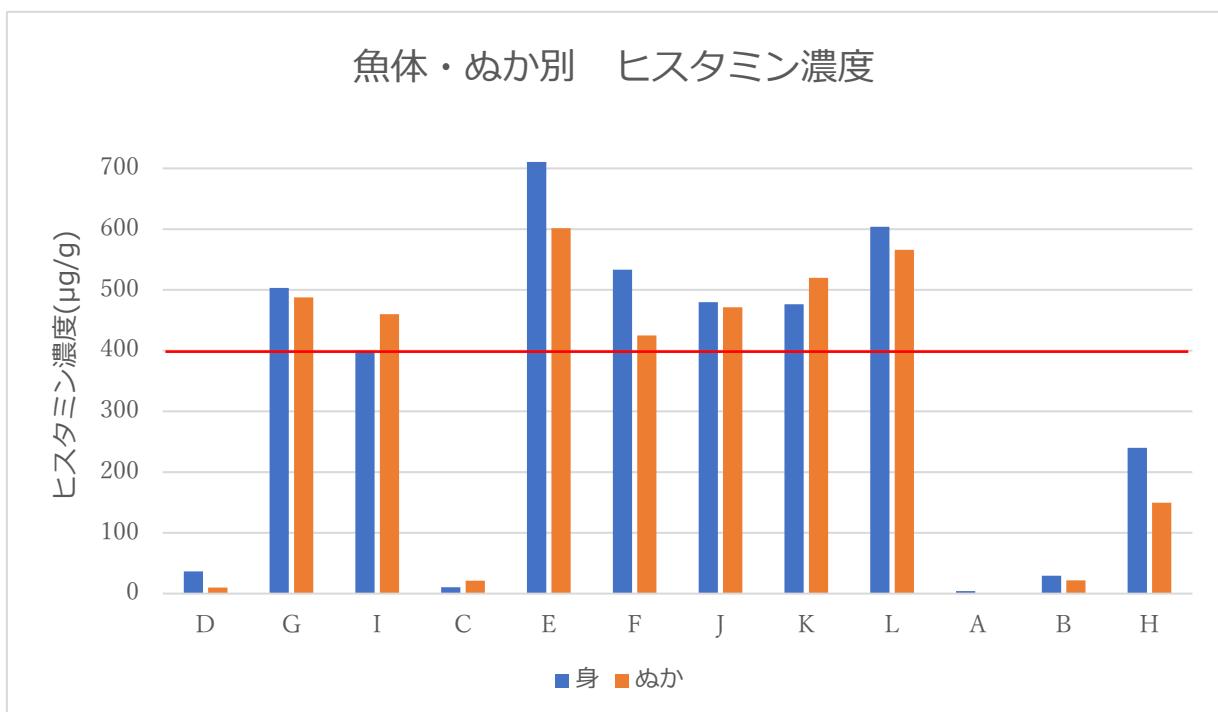


図1. 市販の魚のぬか漬けにおける魚体・ぬかのヒスタミン濃度測定結果

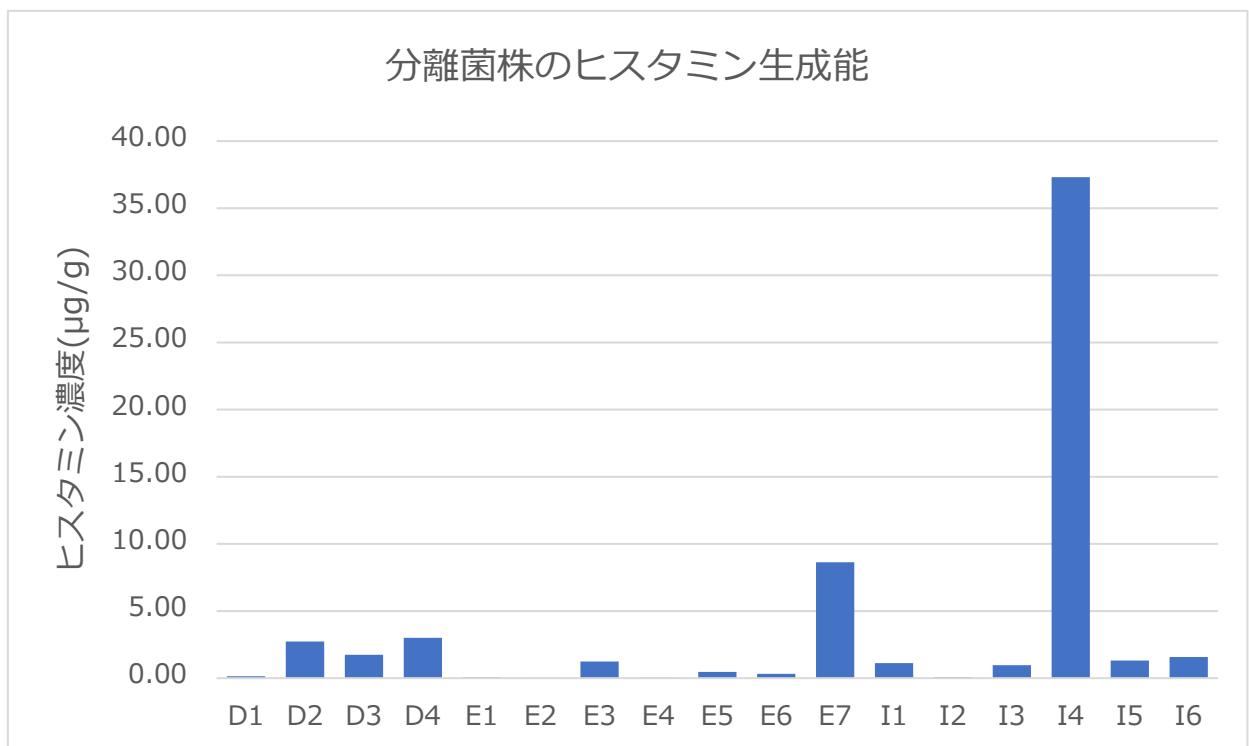


図2. ぬか中から分離した主な菌株のヒスタミン測定結果

表2. 主な分離菌株の同定結果

No.	菌名
D1	<i>Bacillus tequilensis</i>
D2	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>
D3	<i>Bacillus toyonensis</i>
D4	<i>Paenibacillus cucumis</i>
E1	<i>Bacillus velezensis</i>
I3	<i>Halomonas andesensis</i>
I4	<i>Tetragenococcus halophilus</i>
I5	<i>Bacillus dafuensis</i>

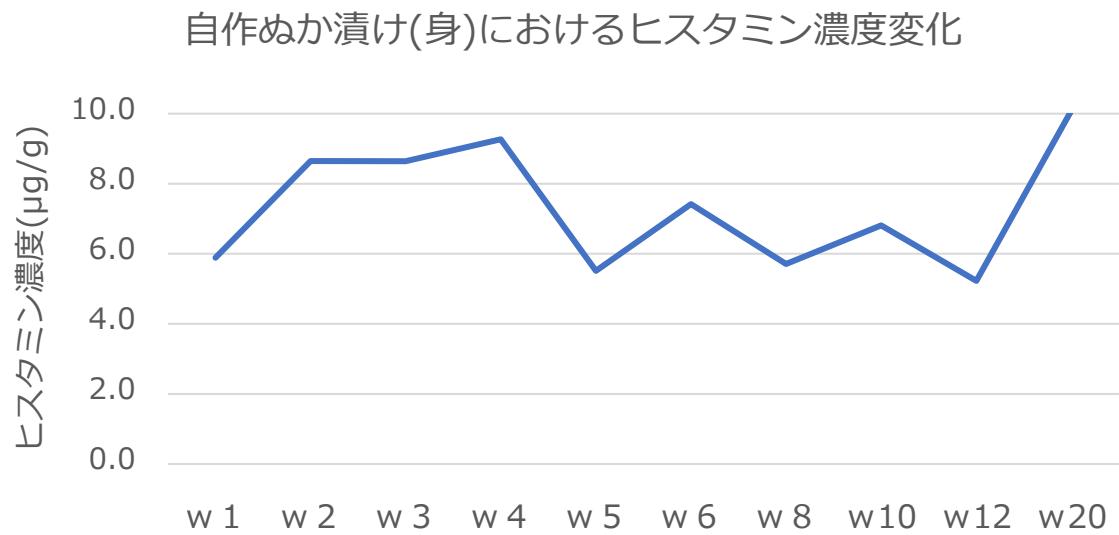


図3. 自作ぬか漬けにおけるヒスタミン濃度変化

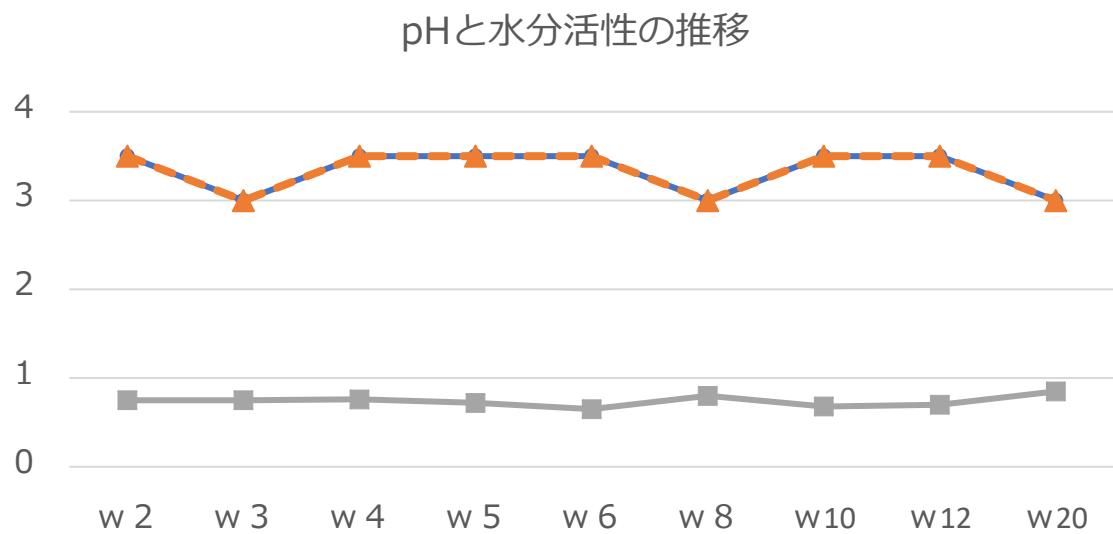


図4. 自作ぬか漬けにおける pH と水分活性の推移

1) 検体前処理

(検体A)

食塩 + 鯖切り身 : 耐熱性ビニール袋い入れ9個の市販漬物容器に漬ける
↓
25°C 7~10日放置
↓
耐熱性ビニール袋を取り出しオートクレーブ
↓
つけ汁とサバを使用する

(検体B)

食塩 + 鯖切り身 : 耐熱性ビニール袋い入れ9個の市販漬物容器に漬ける
↓
25°C 7~10日放置
↓
つけ汁とサバを使用する

2) ヒスチジン含有糠調製

(検体A)

へしこ糠ベース
↓
検体A つけ汁 適量
↓
ヒスチジン溶液
(0g/100g 1g/100g 2g/100g)

へしこ糠	1Kg
水	0.6~1L
塩	130g
昆布	5cm四方を3枚程度
赤トウガラ	2本

(検体B)

へしこ糠ベース
↓
検体Bつけ汁 適量
↓
ヒスチジン溶液
(0g/100g 1g/100g 2g/100g)

3) 検体漬け込み

(検体A)

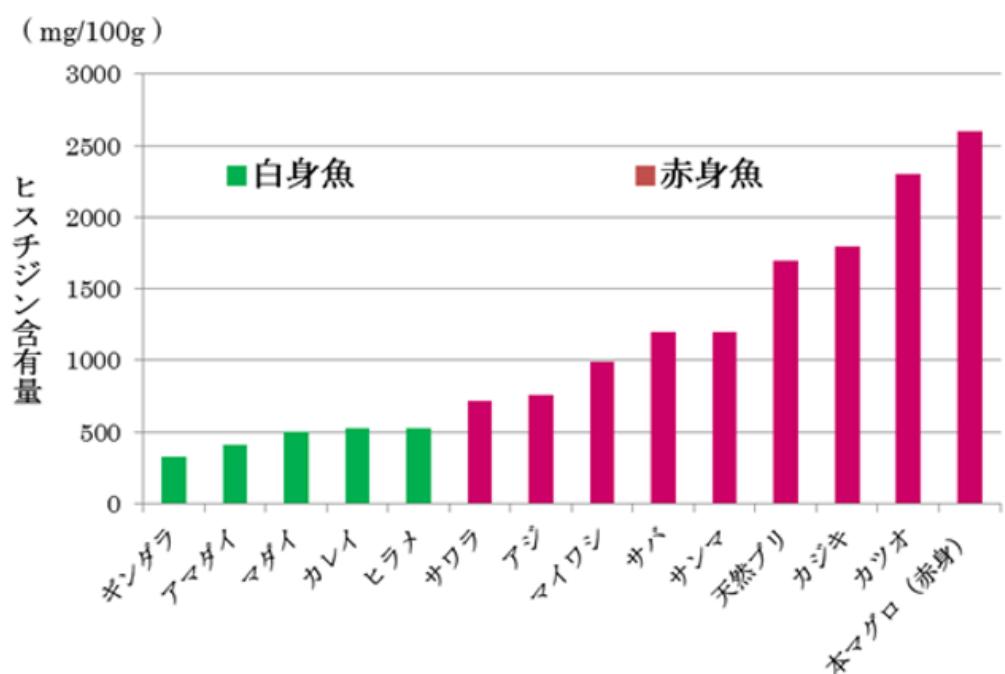
塩漬け処理後のサバを各濃度のヒスチジン含有へしこ糠に漬ける
↓
25°Cで保存
↓
0日・3日・5日・10日・3ヶ月後を検体として
ヒスタミン量・一般生菌数・耐塩性乳酸菌・pH・Awを測定する

(検体B)

塩漬け処理後のサバを各濃度のヒスチジン含有へしこ糠に漬ける
↓
25°Cで保存
↓
0日・3日・5日・10日・3ヶ月後を検体として
ヒスタミン量・一般生菌数・耐塩性乳酸菌・pH・Awを測定する

図5. ヒスチジン添加によるヒスタミン产生実験概要

ヒスチジン濃度参考資料



(出典：東京都福祉保健局「食品衛生の窓」)

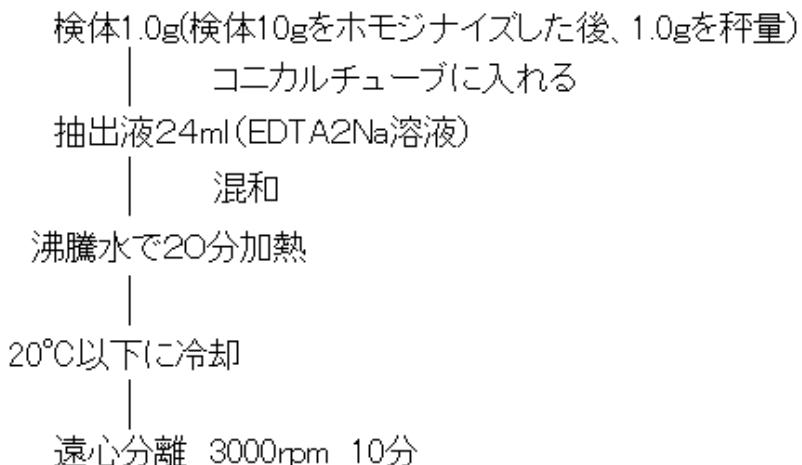
図6. 魚種別ヒスチジン含有量

ヒスタミンの定量

試薬の調製

発色液 : 1バイアル/11ml蒸留水
酵素液 : 1バイアル/6ml 緩衝液

検体前処理



測定: 470nmの吸光度で各々検体ブランクをとて測定する

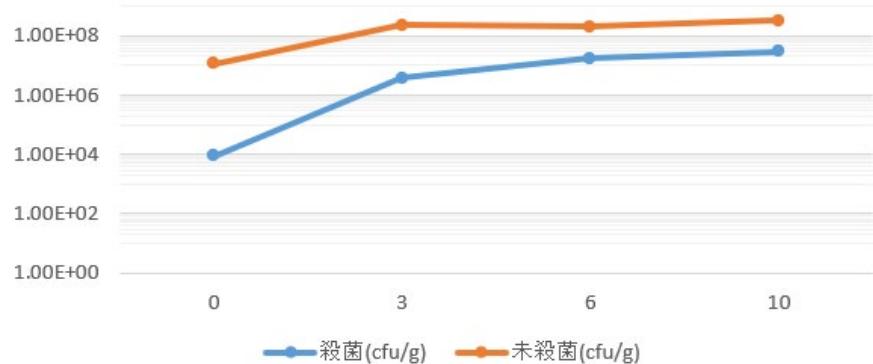
	検体値	検体BLK	標準液	試薬BLK
検体(ml)	0.5	0.5		
STD(ml)			0.5	
DW(ml)				0.5
発色液(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5
酵素液(ml)	0.5		0.5	
緩衝液(ml)		0.5		0.5
	Es	Eb	Estd	Ec

検体中ヒスタミン量

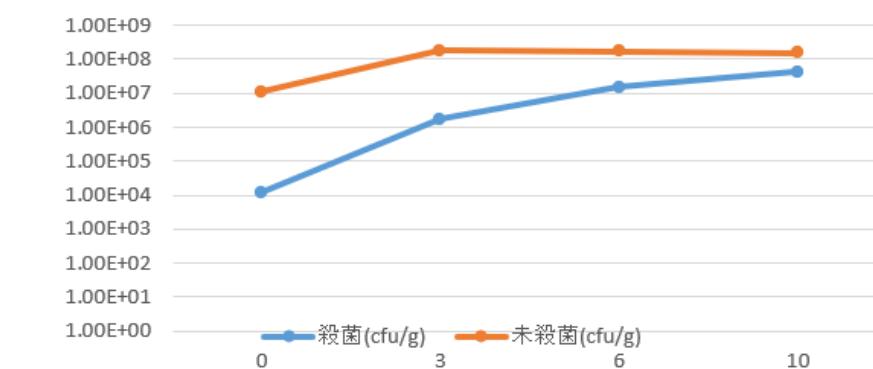
$$(Es-Eb) \div (Estd-Ec) \times 4 \times 25$$

図7. ヒスタミンの定量法の概要

一般生菌数 ヒスチジン0g/100g



一般生菌数 ヒスチジン1g/100g



一般生菌ヒスチジン2g/100g

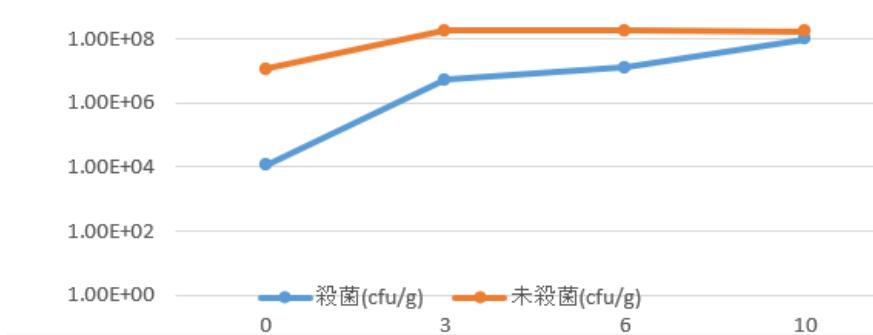


図 8. 一般生菌数の変動

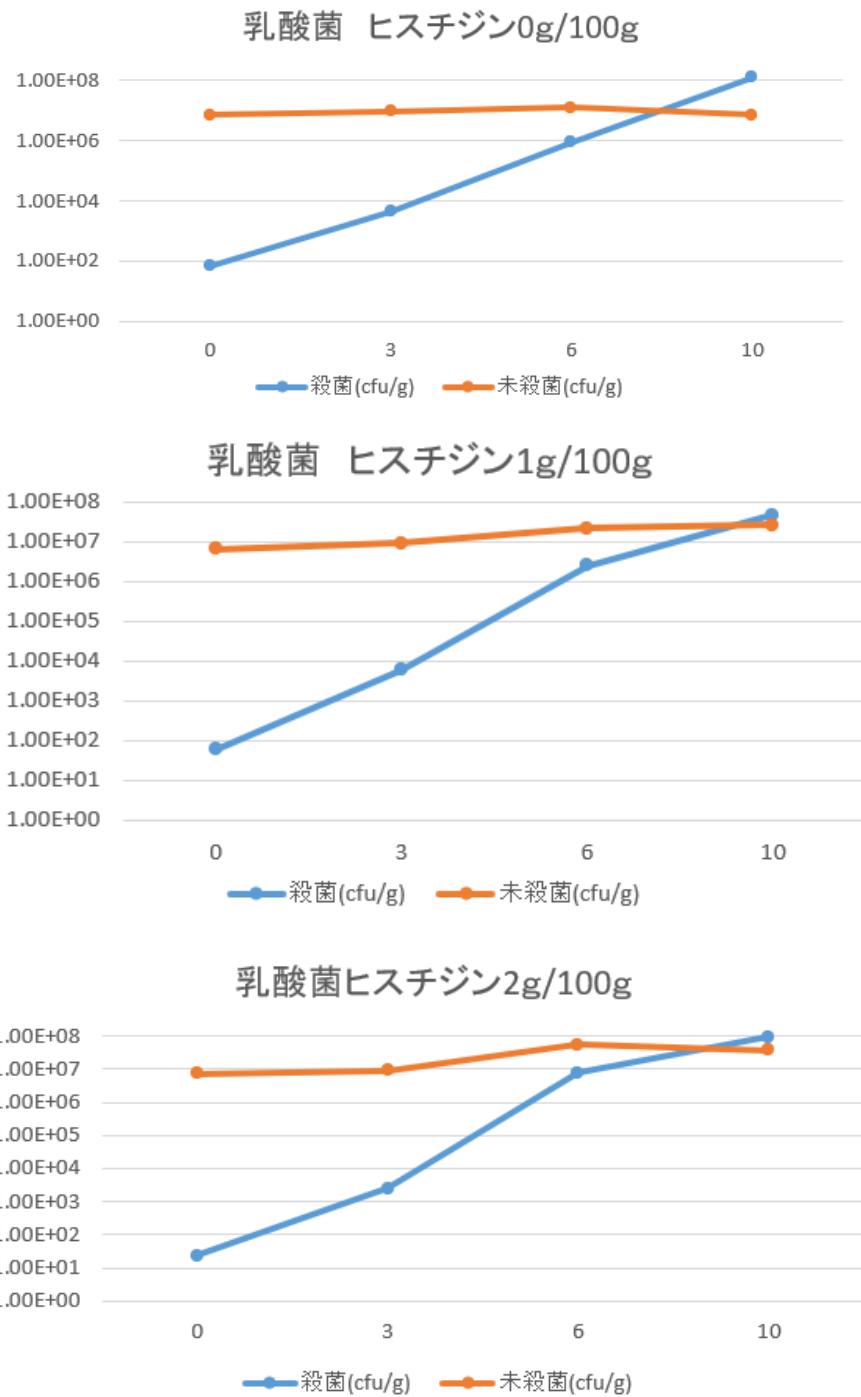
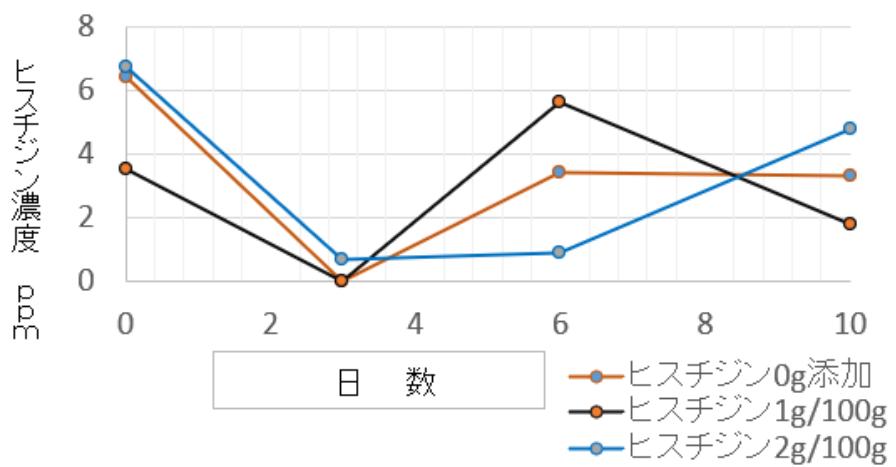


図 9. 耐塩性乳酸菌の変動

さば殺菌処理後のヒスタミン濃度



さば未殺菌のヒスタミン濃度

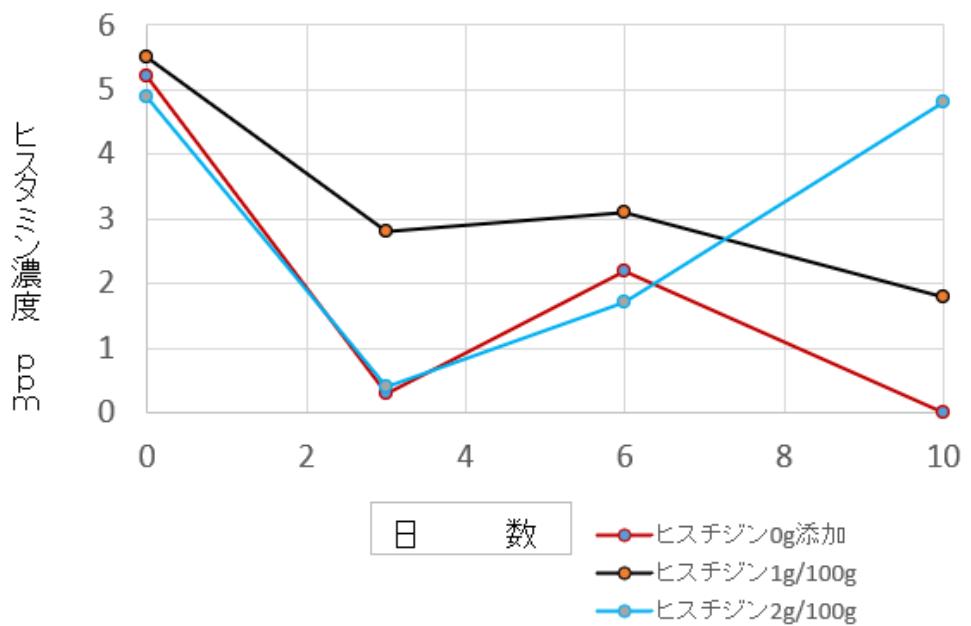


図10. ヒスタミン産生量変動

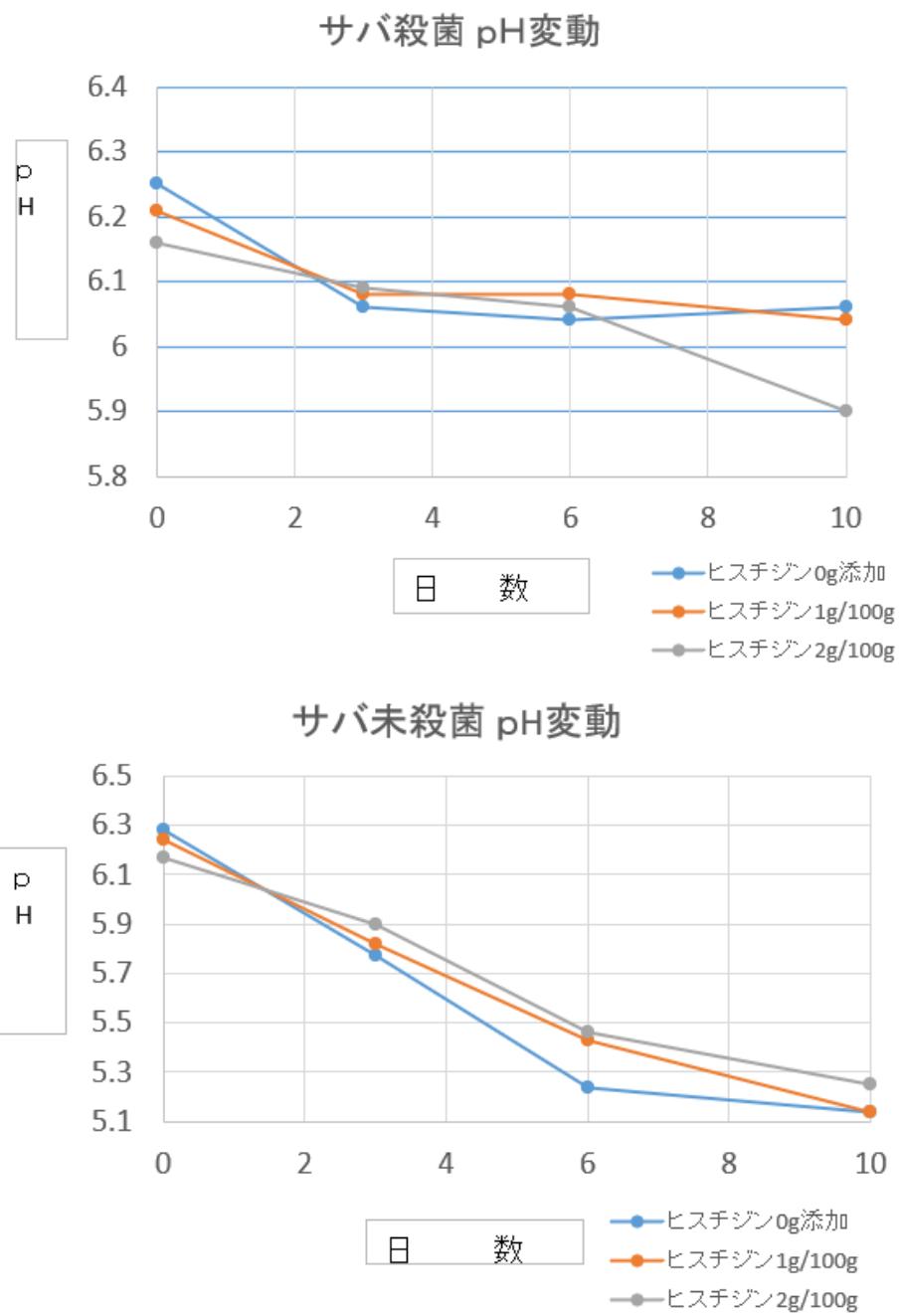
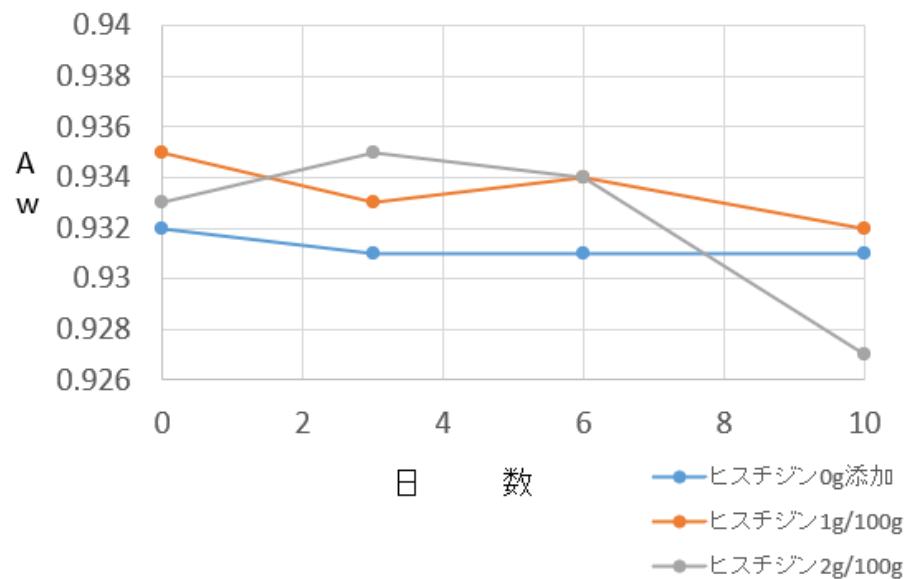


図 1 1. pH の変動

サバ殺菌 Aw変化



サバ未殺菌 Aw変化

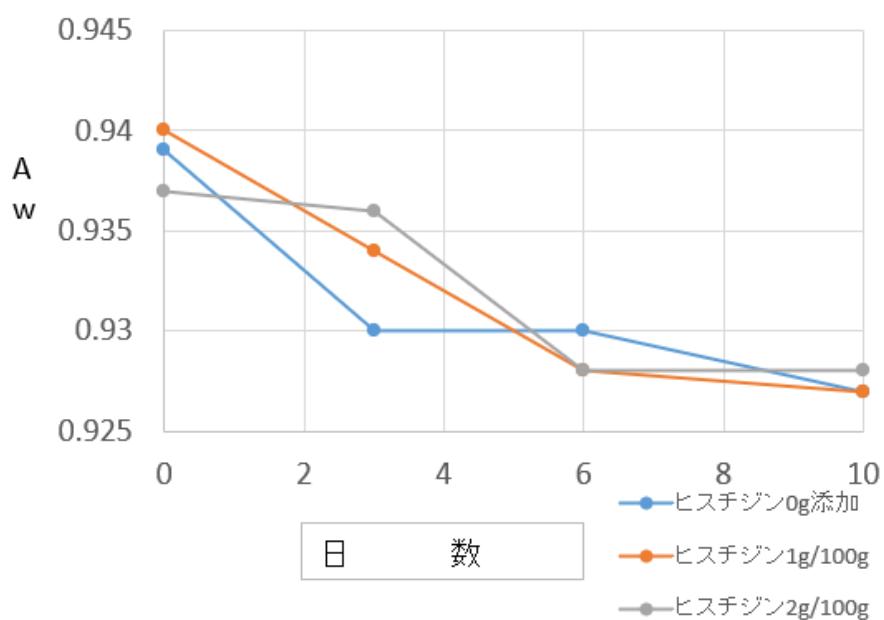


図12. Awの変化