

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：36101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K00837

研究課題名（和文）亜塩素酸水を用いたヒスタミン食中毒予防法の確立

研究課題名（英文）Prevention of histamine food poisoning using chlorous acid water

研究代表者

岡崎 貴世（Okazaki, Kiyo）

四国大学・生活科学部・教授

研究者番号：10227738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で鮮魚や加工品から分離したすべてのヒスタミン生成菌は、5℃で1-2日のうちに増殖することが確認された。分離菌の*Klebsiella oxytoca*は35℃で7,600ppmを超えるヒスタミンを生成し、ヒスタミン生成菌で知られる*Morganella*菌に匹敵する量だった。分離菌は、2.5ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液または0.67-1.2ppm亜塩素酸水の処理で死滅した。ヒスタミン生成菌を接種した赤身魚を塩素系消毒剤で浸漬処理(10分間×3回)した結果、菌数を対数値で1.89以上減少させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒスタミン食中毒の予防には魚の低温管理が最も効果的な方法であるが、本研究で分離されたすべてのヒスタミン生成菌は低温で増殖可能であり、また高濃度のヒスタミンを生成する菌が含まれるなど身近な魚類にヒスタミン生成菌が存在し、食中毒対策の必要性が明らかになった。ヒスタミン生成菌は低濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液および亜塩素酸水によって殺菌作用を受けた。また菌接種モデル赤身魚を用いて消毒剤の効果を検証し、ヒスタミン食中毒予防のための基礎的データを収集することができた。

研究成果の概要（英文）：All histamine-producing bacteria isolated from fresh fish and processed products in this study were found to grow at 5℃ in 1 or 2 days. One of the isolates, *Klebsiella oxytoca* produced over 7,600 ppm histamine at 35℃. The amount was comparable to that produced by *Morganella* known as histamine-producing bacteria. The isolates were sterilized by 2.5 ppm sodium hypochlorite or 0.67-1.2 ppm chlorous acid water. It was found that the bacterial count of the test fish inoculated with isolated bacteria was significantly reduced by the treatments (10 minutes × 3 times) with two chlorine disinfectants.

研究分野：食品衛生学

キーワード：ヒスタミン 食中毒予防 増殖阻害 塩素系消毒剤

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー様食中毒であるヒスタミン食中毒は、腸管出血性大腸菌やノロウイルスなどの微生物による食中毒に比べると発生件数や患者数は少ないが、毎年数件から十数件程度発生している。保育園や学校で提供された給食により、平成25年9月には東京都の事例(原因食品：イワシのつみれ汁)で患者数109人、平成27年6月には徳島県の事例(同：アジフライ)で227人の患者が出る大規模食中毒が発生するなど、ヒスタミン食中毒対策の必要性が増している。

食中毒の原因となるヒスタミンは、赤身魚に多く含まれるアミノ酸(ヒスチジン)を細菌が分解することで生じる。そのためヒスタミン食中毒は赤身魚でのみ発生する。流通や加工段階で、いったん魚肉中にヒスタミンが生成・蓄積されると加熱処理では分解することができないため、食中毒の予防には低温管理が最も効果的な手段である。しかし現在の食産業は生鮮食品や加工食品が大量流通しており、低温管理を徹底することは簡単なことではない。さらにヒスタミン生成菌の中には低温増殖性の菌も存在する。そのためヒスタミン食中毒の予防には、さらに積極的な対策をとる必要があると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、食品添加物である「亜塩素酸水」の殺菌作用に注目し、ヒスタミン生成菌の制御に利用することを目的とする。亜塩素酸水は平成25年に殺菌料として指定された新規食品添加物である。食環境でよく使用されている次亜塩素酸ナトリウム(Na)と同類の塩素系殺菌剤であるが、亜塩素酸水は次亜塩素酸Na溶液と比較して殺菌力は劣るが有機物存在下でも殺菌力を維持する特徴を持っている。そのため亜塩素酸水は栄養成分が常に存在する調理・加工の現場において非常に有効な殺菌剤と考えられる。さらに、亜塩素酸水を使用できる食品に鮮魚介類(鯨肉を含む)が含まれており、浸漬または噴霧による使用(最大濃度0.40g/kg)ができる。

本研究では、鮮魚および加工品の細菌汚染状況を調査し、その中からヒスタミン生成菌(中温細菌と低温細菌)の検出頻度の調査を行う。さらにヒスタミン生成菌を分離・同定し、分離菌のヒスタミン生成能や増殖特性を明らかにし、塩素系消毒剤に対する感受性を測定することでヒスタミン食中毒予防のための微生物学的基礎データを収集する。

## 3. 研究の方法

### (1) 鮮魚および加工品の細菌汚染状況とヒスタミン生成菌の分離・同定

徳島県内を流通する鮮魚および加工品24検体を試料とし、中温細菌(一般生菌)、低温細菌および大腸菌・大腸菌群の測定を行った。細菌検査で得られたコロニーから無作為に5~10個を釣菌し、改良Niven寒天培地(0.5%トリプトン、0.5%酵母エキス、1.8%L-ヒスチジン、0.5%塩化ナトリウム、0.1%炭酸カルシウム、0.05%グルコース、0.006%プロモクレゾールパープル、3%寒天、pH5.3)を用いて分離を行った。改良Niven寒天平板上に形成されたコロニーの色が紫色で、また培地が黄緑色から紫色に変化したものをヒスタミン生成菌(Hm+)分離菌とした。Hm+分離菌の同定にはアピ・マニュアルキット(シスメックス・バイオメリュー株式会社)を用いた。

### (2) Hm(+)分離菌の特性

#### ① 供試菌および増殖特性の測定

Hm(+)分離菌およびヒスタミン生成標準株である *Morganella morganii* subsp. *morganii* NBRC 3848 (Mor (STD)) と *Raoultella planticola* NBRC 3317 (Rau (STD)) を用いた。供試菌を改良Niven寒天平板に塗抹し、5~25℃における生育状況とヒスタミン生成の確認を行った。また0~15% NaCl 添加 TSB 培地 (BD 社) と pH4~9 に調整した TSB 培地を用いて菌の増殖状態を観察した。

#### ② ヒスタミン生成量の測定

供試菌のコロニーを滅菌水に懸濁して OD<sub>660</sub>=0.001 (約 1.0×10<sup>5</sup>CFU/mL) に調整した。各菌懸濁液 0.25mL を 1% ヒスチジン添加 TSB 培地 25mL に接種し、所定の温度で培養した。一定時間後サンプリングを行い、チェックカラーヒスタミン(キッコーマンバイオケミファ株式会社)を用いて定量を行った。

### (3) Hm(+)分離菌の各種抗菌物質に対する感受性の測定

#### ① 食品保存料と日持ち向上剤

食品保存料のソルビン酸カリウム(K)と安息香酸ナトリウム(Na)、日持ち向上剤の酢酸、乳酸およびクエン酸を用いて、増殖阻害作用を測定した。保存料は TSB 培地で所定の濃度に希釈し pH5 に調整した。酢酸、乳酸、クエン酸も同様に TSB 培地で所定の濃度に希釈した。各保存料または日持ち向上剤添加 TSB 培地 2mL に菌懸濁液(OD<sub>660</sub>=0.001) 0.1mL を接種し、35℃で24時間培

養し、菌の増殖が認められない最小の濃度を最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) とした。

## ② 塩素系消毒剤

次亜塩素酸 Na 溶液 (ピューラックス、株式会社オーヤラックス) と亜塩素酸水 (ケアフォー No. 15、本部三慶株式会社) を用いた。各消毒剤を 100ppm 溶液 (pH5) に調整し、滅菌水 (pH5) で段階的に希釈を行った。試験管に各濃度の希釈液 5mL を入れ、菌懸濁液 0.1mL を接種し、30 秒間よく混和後、処理液 0.1mL を消毒剤を含まない TSB 培地 2mL に滴加し、35°C で 24 時間培養した。培養後、TSB 培地の濁りの有無を判定し、増殖が認められない最小の消毒剤の濃度を最小殺菌濃度 (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) とした。

### (4) 菌汚染モデル赤身魚を用いた塩素系消毒剤の殺菌作用の測定

赤身魚 (アジ、約 40g/匹) を水道水で洗浄し、水分を除き、菌懸濁液 ( $OD_{660}=0.1$ ) を魚の表面に魚 10g あたり 0.1mL を塗抹して菌汚染モデル赤身魚を調整した。次亜塩素酸 Na 溶液と亜塩素酸水の希釈液 (pH5) は、魚 10g あたり 50mL の量とし、比較として滅菌水 (pH5) を用いた。菌汚染モデル赤身魚を消毒液または滅菌水中に浸漬し、5°C、10°C または 15°C で一定時間処理した後、浸漬液から魚を取り出し、余分な水分をのぞいた後、浸漬液と同じ液量の滅菌水 (pH 調整なし) で洗浄を行った。処理後の魚の細菌検査は標準寒天培地を用いて実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 鮮魚および加工品の細菌汚染状況と Hm(+) 菌の分離・同定

多くの試料から中温細菌と低温細菌が検出された。鮮魚は一尾で販売されているものより切り身の方が細菌の汚染度が高い傾向にあり、無加熱摂取冷凍食品である 6 試料から食品の不衛生な取扱いを示す指標である大腸菌群が検出され、さらに 4 試料から大腸菌 (糞便汚染の指標) が検出され、衛生上の問題が懸念された。

細菌検査の中温細菌の培養シャーレから 132 株、低温細菌の培養シャーレからは 102 株の汚染菌を分離し、その中から、中温増殖性の Hm(+) 菌 9 株、低温増殖性の Hm(+) 菌 3 株を分離した。Hm(+) 菌の検出率は約 5% で、先行研究に比較すると低く、この理由として本研究で検査した試料の多くがスーパーマーケットでの購入であり、魚介類せり売業者、仲買業者、魚介類販売業者、製造加工業者魚によって魚の洗浄が行われ、魚表面に付着していた菌が洗い流された結果、検出率が低くなったと推測された。

Hm(+) 分離菌 12 株のうち、*Pseudomonas fluorescens*、*Ps. putida*、*Klebsiella oxytoca*、*Pantoea* sp.、*Serratia* sp. の 5 種類が同定された。いずれも魚に存在する可能性のある菌であり、食品の腐敗に関与する菌、ブドウ糖非発酵菌の日和見感染起因菌などが含まれ、ヒスタミン食中毒の原因菌であるだけでなく、感染症に関与する菌が含まれていたことから、魚や加工品の衛生対策の重要性が改めて確認された。

### (2) Hm(+) 分離菌の特性

すべての Hm(+) 分離菌は、5°C においても 1~2 日間で増殖することが確認された。ヒスタミン生成に関しては、分離菌により差が見られ、5°C では 1 週間以上の時間を要する菌がいたが、15°C では 1 株を除く分離菌が 1 日の培養でヒスタミンを生成した。このためヒスタミン食中毒を予防するには、徹底した低温管理が求められることがわかった。また Hm(+) 分離菌の *K. oxytoca* は 5°C、2 日間でヒスタミンを生成し、35°C 培養においてはヒスタミン生成量が 7,600ppm を超え、標準株の Mor (STD) と Rau (STD) に匹敵する生成量であることがわかった。さらに 5.5% NaCl 存在下、pH5~9 の広い pH 範囲で増殖することが確認され、制御の困難さを示した。

### (3) Hm(+) 分離菌の各種抗菌物質に対する感受性

#### ① 食品保存料と日持ち向上剤

ソルビン酸 K と安息香酸 Na の Hm(+) 分離菌に対する MIC 値は 500ppm だった。一般に安息香酸とソルビン酸は酸性保存料と呼ばれ、その増殖阻害作用は pH の影響を受け、酸性で高い効果を示す。そのため南蛮漬けなど pH が低い料理で増殖阻害効果が見込めると考えられたが、pH が低い料理や魚単品では効果を期待することはできないと考えられた。日持ち向上剤は、Hm(+) 分離菌に対してほとんど効果が認められなかった (MIC 値: 5,000~15,000ppm)。しかし 5% NaCl と併用することで、*K. oxytoca* に対する酢酸の MIC 値は 1,000ppm に減少した。また、クエン酸も 5% NaCl との併用ですべての供試菌に対する MIC 値が低下したことから、日持ち向上剤は NaCl との併用効果が期待できると考えられた。

#### ② 塩素系消毒剤の殺菌効果

Hm(+) 分離菌に対する消毒剤の MBC 値は、次亜塩素酸 Na 溶液で 2.5ppm、亜塩素酸水で 0.67~1.2ppm の範囲となり、2 種類の塩素系消毒剤とも低濃度、短時間 (30 秒間) で高い殺菌作用を示

すことがわかった。しかし塩素系消毒剤は有機物の影響を強く受け、殺菌効果が低下することが知られている。MBC の測定では 有機物(培地成分)が存在しない試験溶液で行われたため非常に高い効果を得ることができたが、実際に魚介類へ応用する場合は、消毒剤の濃度や処理時間を検討する必要があると考えられた。

#### (4) 菌汚染モデル赤身魚に対する塩素系消毒剤の殺菌効果

予備試験として菌接種モデル赤身魚を 15℃の次亜塩素酸 Na 溶液または亜塩素酸水に 30 分間浸漬した時の殺菌効果を検討した。しかし高濃度(200ppm)で処理した場合でもモデル赤身魚の菌数を 1 桁おとす程度の効果しか得られなかった。また 24 時間の浸漬を行った場合は、魚肉に消毒剤におよぼす付着やタンパク質の変性が認められ、食材に使用するには不適切な方法と考えられた。そこで両消毒剤(200ppm)へ 10 分間、複数回(1~3 回)浸漬する方法を検討した。消毒剤に 1 回浸漬した場合、対数減少値(滅菌水(pH5)浸漬処理のモデル赤身魚から得られた菌数の対数值との差)は次亜塩素酸 Na 溶液で 0.14、亜塩素酸水で 0.54 となり、亜塩素酸水の方が高い効果は得られたものの、30 分間浸漬した予備試験の結果よりも殺菌効果は低下した。しかし浸漬回数を増やすことでモデル赤身魚から検出される菌数は減少し、3 回浸漬後の検出菌数は測定下限値を下回り、対数減少値は両消毒剤で 1.89 を超え、高い殺菌効果を示すことがわかった。この菌数減少は消毒液を含まない滅菌水(pH5)浸漬処理においても認められたことから、消毒剤の殺菌効果に加え浸漬を繰り返すことにより菌が物理的に洗い流されたことも要因と考えられた。

今後、塩素系消毒剤をより効果的に使用するため、浸漬液量や浸漬回数、消毒液に浸漬する魚の前処理等の検討を続けていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>岡崎貴世、鈴木恵理                 |
| 2. 発表標題<br>赤身魚から分離したヒスタミン生成菌の制御方法の検討 |
| 3. 学会等名<br>日本防菌防黴学会第46回年次大会          |
| 4. 発表年<br>2019年                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>岡崎貴世、鈴木恵理、鉄岡佳奈               |
| 2. 発表標題<br>赤身魚を汚染するヒスタミン生成菌の分離とヒスタミン生成能 |
| 3. 学会等名<br>日本家政学会第71回大会                 |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鈴木恵理、七條月、岡崎貴世                |
| 2. 発表標題<br>赤身魚を汚染するヒスタミン生成菌の分布およびその増殖特性 |
| 3. 学会等名<br>第64回日本栄養改善学会学術総会             |
| 4. 発表年<br>2017年                         |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|