

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K02094

研究課題名（和文）アレルギー様食中毒の予防を目的とした非加熱調理の最適化の検討

研究課題名（英文）Optimization of food preparation for prevention of allergy-like food poisoning.

研究代表者

新田 陽子（Nitta, Yoko）

お茶の水女子大学・基幹研究院・准教授

研究者番号：70403318

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：毎年発生しているヒスタミン食中毒は、ヒスタミンの多量摂取が原因となっており、その食中毒を予防するために、すでに蓄積した食品中のヒスタミンを無毒な形に変換して除去できるか検討した。植物由来のジアミンオキシダーゼを利用し、植物のペーストまたは植物から抽出した酵素を食品に塗布する処理の効果を調べた。その結果、豆苗由来の粗酵素液を約200ppmのヒスタミンを含有するサバ筋肉の試料に添加し25℃で24時間反応させたところ、80%以上のヒスタミン減少が観察された。豆苗粗酵素液を使用することで食中毒が防止できる濃度までヒスタミンを減少できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毎年発生しているヒスタミン食中毒は、ヒスタミンの多量摂取が原因となっており、ヒスタミンは無色、無臭であり無味とされていることから、事前に汚染を把握することが困難である。さらに通常の調理における加熱温度では安定であることから、加熱による除去も困難である。本研究では豆苗の酵素を使用することで、すでに食品中に蓄積したヒスタミンを除去できるかどうかを検討した。豆苗の粗酵素液を使用することで食中毒予防に有効なレベルまでヒスタミンを減少させられることが確認できた。

研究成果の概要（英文）：Histamine food poisoning, which occurs annually and is caused by the ingestion of large amounts of histamine. We examined the possibility of removing histamine in foods that had already accumulated by converting it to a non-toxic form in order to prevent such food poisoning. Using plant-derived diamine oxidase, we investigated the effects of a treatment in which plant pastes or enzymes extracted from the plants were applied to foods. As a result, when a crude enzyme solution derived from bean seedlings was added to a sample of mackerel muscle containing approximately 200 ppm histamine and allowed to react for 24 hours at 25 °C, a histamine reduction of more than 80% was observed. The results suggest that the use of bean seedling crude enzyme solution may be able to reduce histamine to a concentration that can prevent food poisoning.

研究分野：調理科学

キーワード：ヒスタミン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー様食中毒は、食品に蓄積した多量のヒスタミンを摂取することに起因する。ヒスタミンは生理活性アミンの一つで、アレルギー反応の介在物質として働く他、様々な生理作用に関与する。ヒスタミンは生体内で作られ、摂取されたヒスタミンは分解され代謝される。そのため、食品からのヒスタミン摂取は必要ないが、ヒスタミン産生菌により食品中に産生されたヒスタミンを摂取することがある。食品に蓄積した多量のヒスタミンを摂取すると顔面紅潮などのアレルギー様の症状を呈することがあり、そのためアレルギー様食中毒と呼ばれている。日本では調理後の赤身魚による食中毒が多い。

厚生労働省食中毒統計資料には毎年アレルギー様食中毒が報告されており、予防対策が求められている。症状が30分程度でおさまることなどから、報告されていないものの、ヒスタミン汚染された食品を摂取している場合も多いと思われる。ヒスタミンは通常の加熱では分解されないため、加熱による対策ができない。また、無色・無臭、一般に無味とされており、ヒスタミン汚染を食する前に気づくことは困難である。日本にはヒスタミンに対する規制はなく、食中毒予防として、低温での保管を徹底してヒスタミン産生菌が増殖しないようにして、ヒスタミンを増やさないことが提唱されている。しかし、衛生管理を徹底したとしても低温で増殖するヒスタミン産生菌が存在し、低温でヒスタミンが蓄積する報告があることから(加藤莉子他, *日食微誌*, 2017、藤井建夫, *日食微誌*, 2006、Auerswald et al., *Food Chem.*, 2006)、その他の対策も必要であると考えられる。しかし、学術論文は現在のところ食中毒に至った食品中のヒスタミン量を報告する内容が国内外問わずほとんどで、新しい対策に言及した学術論文は研究代表者のもの以外は見つけられていない。研究代表者は、ヒスタミンが酵素により生成することに着目し、酵素活性阻害成分を利用することによる食中毒対策を発表した(Nitta et al., *J. Food Prot.* 2016)。また別のアレルギー様食中毒対策としてコロナ放電の利用を考え、その効果についても検証した(新田陽子他, *日食微誌*, 2020)。

ヒスタミンは生体内では、ジアミンオキシダーゼなどの酵素によってアルデヒドを経てイミダゾール酢酸となり、食中毒の原因物質ではなくなることが知られている。植物では、豆類にジアミンオキシダーゼが多く含まれることが知られており、酵素の抽出法についても報告例がいくつかある(Neree et al., *J. Agric Food Chem.*, 2018, Jumarie et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2017)。アレルギー様食中毒の新たな対策として、植物由来ジアミンオキシダーゼを作用させて、すでに蓄積した食品中のヒスタミンを無毒な形に分解し除去する対策ができれば、ヒスタミンによる食中毒を減らすことができるのではないかと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒスタミンに植物由来ジアミンオキシダーゼを作用させて、食品中のヒスタミンを無害な物質に変換する際の最適条件を探索することとした。植物由来ジアミンオキシダーゼを作用させる方法には、精製した酵素を利用または、植物ペーストそのものを利用することとした。食品に植物由来ペーストを塗り込む下処理は、食品を軟らかくすることや、風味付けの目的などがあるが、新たな目的として、ヒスタミンによる食中毒の予防へつなげられるかを調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

対象とする食材は、過去に食中毒事例の多い赤身魚とした。過去の研究により、サバの切り身

を室温放置すると、2 日後に食中毒レベルのヒスタミンが高い頻度で蓄積することを確認済みである (Nitta et al., *J. Food Prot.* 2016)。調理法は、2019 年度報告事例の 8 件中 6 件が焼き物であることから、焼きの調理に対応する下処理法を考えることとした。例年保育所での事例が多く見られ、2019 年度も 8 件中 3 件が保育所給食で発生している。これは、大人よりも幼児の方が少量のヒスタミンに反応し、中毒症状が現れることが考えられる。ヒスタミンの中毒量は 1 食あたり 22 ~ 370mg と報告されているが (井部明広、食中毒、中央法規出版 2001)、幼児の場合には 22mg またはそれ以下にヒスタミンを減らす必要があると考えられる。一方ヒスタミンの汚染レベルとされる濃度は 50ppm であり、50ppm 前後にまでヒスタミン量が減少させられる条件を探索することとした。

下処理に用いる植物は、ジアミンオキシダーゼ活性が高いことが報告されている豆類の発芽部分とし、古くから酵素が精製されているエンドウ豆を選定した (Hirasawa E. *Plant Physiol.*, 1988, 鈴木米三, 化学と生物, 1977)。エンドウ豆の苗は、豆苗として市販されており、利用しやすいことから選定した。豆と根の部分を切り落とした豆苗を 1cm 程度の長さに包丁で切り、50 mM リン酸 Na Buf. (pH 7.0, 200 mM NaCl を含む) と 1 : 1 (w/w) で混合した。この混合物を、ミキサー (WARING 社製、7011HS) の低速モードで 10 sec × 7 回ホモジナイズしたものを豆苗ペーストとして得た。また、豆苗ペーストを 16,100 g × 10 min, 4 で遠心分離して得た上清を豆苗抽出液として得た。

豆苗抽出液に硫酸アンモニウムを 40% 飽和まで加え、30 分攪拌した後 10,100 g × 10 min, 4 で遠心分離し、上清のみをピーカーへ戻した。続いて 60% 飽和になるまで硫酸アンモニウムを加え、同様に攪拌、遠心分離した後の沈殿を得た。得た沈殿は計 3 mL の 20 mM リン酸 Na Buf. (pH 7.4) で溶解し、Econo-Pac® 10DG Columns (RESOUCCE Q 使用時)、もしくは Hitrap Desalting (Cytiva 社製、DEAE 使用時) で同様の緩衝液を用いて脱塩し粗酵素液を得た。

粗酵素液は ÄKTA™prime plus (Cytiva 社製) を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムは RESOURCE Q 1 ml (Cytiva 社製) を用いた。溶離液は 20 mM リン酸 Na Buf. (pH 7.4) を用い、NaCl 濃度を 0~500 mM までグラジエントをかけ、ÄKTA™prime plus のシステムを用いてイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。

イオン交換カラムクロマトグラフィーで得た酵素液において、活性が高いと判断された画分 (Fr.4~12) を Amicon ultra フィルターで液量を約 1/4.8 に濃縮し、ゲル濾過クロマトグラフィーで更に精製した。カラムは HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (Cytiva 社製)、溶離液には 50 mM リン酸 Na Buf. (pH 7.4) を用いた。波長 280 nm の吸光度をモニターし、タンパク質が溶出開始してから 5 mL ずつ分取した。

サバの筋肉を高濃度ヒスタミン溶液に浸漬して作成した約 200 ppm のヒスタミンを含む試料に、粗酵素液を添加して反応後の試料中ヒスタミン量を HPLC にて定量した。温度、時間、試料 pH 等の反応条件を変化させ、食中毒が防止できる濃度までヒスタミン濃度を下げる際の反応条件や、酵素反応の最適条件を検討した。

#### 4. 研究成果

生のサバ筋肉 1 g に豆苗ペースト、豆苗抽出液を作用させヒスタミンを測定した。豆苗ペーストを作用させたものについて、コントロールと比べてヒスタミン量が減少せず、DAO の効果が不十分であると判断した。この結果より豆苗抽出液からの DAO の精製が必要であると考えられた。

豆苗抽出液の硫酸分画を 30% 飽和から 10% 区切りの画分に分け、それぞれ 1111.5 ppm ヒス

タミン溶液と1 : 1 (v/v)で反応させた際、50 %、60 %の画分は、他の画分に比べて吸光度減少量が多く、すなわちヒスタミンが減少したことが明らかになった。そのため、40 %飽和までの沈殿画分は取り除き、更に60 %飽和までの沈殿画分を取集することで、より活性の高い粗酵素液を得られると考えられた。

粗抽出液・抽出液・粗酵素液・DEAEによるイオン交換クロマトグラフィー・ゲル濾過クロマトグラフィーでの各タンパク質溶液について、総タンパク質量、比活性、精製度、収率を表1に示した。今回のゲル濾過クロマトグラフィーは、イオン交換クロマトグラフィー後1週間冷蔵保存(4℃)した試料を用いており、冷蔵保存中に活性が低下していることを考慮し保存後の活性も「DEAE1週間冷蔵後」として表1に示している。

精製段階が進むにつれて、総タンパク質量は624.1 mgから6.7 mgまで減少し、比活性は4.5 nmol/mg/hから193.3 nmol/mg/hまで増加した。前述の通り1週間の冷蔵保存によるタンパク質の凝集や変性の影響で、イオン交換クロマトグラフィー後の試料の比活性は277.1 nmol/mg/hの半分以下の125.9 nmol/mg/hになった。そのためゲル濾過クロマトグラフィー後の比活性は、冷蔵保存前の試料を用いていれば193.3よりも高い値を示していたと考えられる。

精製度は1倍から43.1倍まで増加し、収率は100%から43.5%まで減少した。ゲル濾過クロマトグラフィー後の精製度・収率についても、比活性と同様にイオン交換クロマトグラフィー後の冷蔵保存の影響から、本来ならば精製度は43.1倍、収率は43.5%よりも高い値であったと考えられる。ゲル濾過クロマトグラフィーに用いた試料の活性が約1/2になっていたことを考慮すると、ゲル濾過クロマトグラフィー後の試料の活性は2倍の386.6以上であった可能性が考えられ、そのように仮定すると、ゲル濾過クロマトグラフィー後の精製度は86.2倍、収率は87.0%となるはずであり、その場合イオン交換クロマトグラフィーよりも精製ができたといえる。

また収率について抽出液の時点で100%を超え、548.5%まで増加していた。これは、本研究の抽出液の比活性は粗抽出液の5.8倍であるが、本研究の粗抽出液の比活性が非常に低い値であったことが要因となり、収率が100%を超えたと考えられる。

ゲル濾過クロマトグラフィーにより、精製度は粗抽出液の43.1倍となり、ゲル濾過クロマトグラフィー前の試料が冷蔵保存によって活性が低下していることを考えると、冷蔵保存前にゲル濾過クロマトグラフィーを行うことでDAOをより精製できる可能性が示唆された。

しかし、ゲル濾過クロマトグラフィー後のタンパク質溶液をサバ筋肉に適用する際、本研究の精製手順のままではタンパク質濃度が非常に低く、実用的ではない可能性が懸念点として挙げられる。今後食品に対して使用するには、一度そのままの濃度で検討した上で、濃縮や凍結乾燥といった処理が必要であると考えられる。

上記の通り、精製後の酵素液は少量であったため、十分量用意できた粗酵素液を実際の食品に適用した。約200ppmのヒスタミンを含有するサバ筋肉の試料に添加し25℃で24時間反応させたところ、平均81.7%のヒスタミン減少が確認された(図1)。このことから粗酵素液中のDAOにより、食中毒が防止できる濃度まで食品中のヒスタミンを減少できる可能性が示唆された。十分量の安定な酵素液を得るために精製を硫酸分画までに留めたが、より効率的にヒスタミン量を減らすためには酵素液のさらなる精製が必要であると考えられた。

表 1 各タンパク質溶液の総タンパク質量、比活性、精製度、収率

	Total protein (mg)	Specific activity (nmol/protein mg/ 1h at 25 )	Purification	Yield of enzyme activity (%)
粗抽出液	663.9	4.5	1.0	100.0
抽出液	629.7	25.9	5.8	548.5
粗酵素液	79.8	48.0	10.7	128.7
DEAE	16.7	271.1	60.4	151.7
DEAE 1週間冷蔵後	16.7	125.9	28.1	70.4
ゲル濾過クロマト グラフィー	6.7	193.3	43.1	43.5

※Purification=対象試料のSpecific activity / 粗抽出液のSpecific activity

Yield of enzyme activity

= (対象試料のTotal protein \* Specific activity) / (粗抽出液のTotal protein \* Specific activity) \* 100  
として算出した。

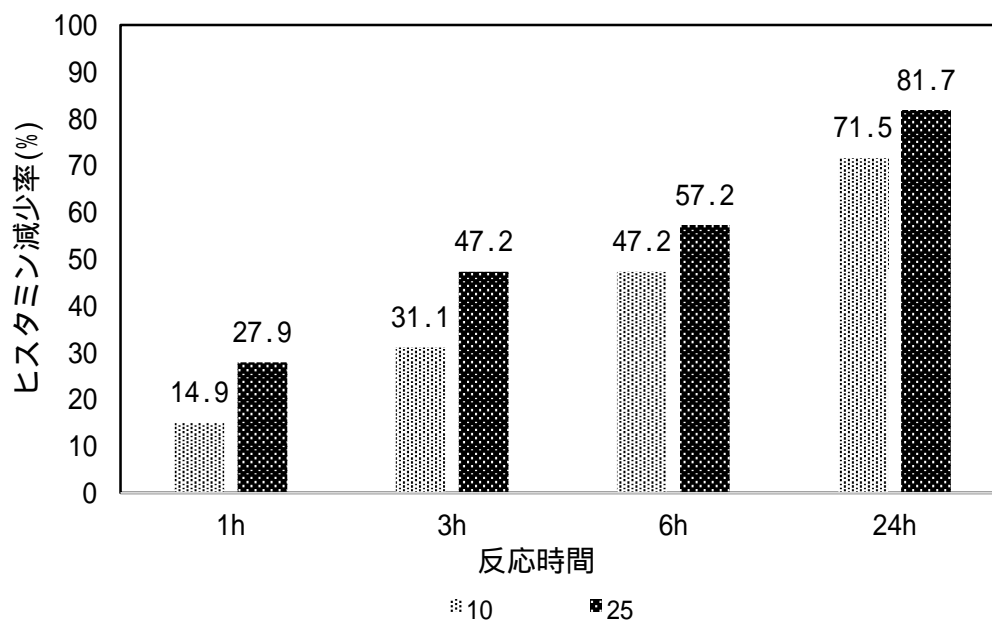


図 1 反応時間とヒスタミン減少

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本紗奈衣, 新田陽子
2. 発表標題 豆苗由来酵素によるヒスタミンの酸化反応における生成物について
3. 学会等名 日本生物高分子学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河内公花, 山本紗奈衣, 新田陽子
2. 発表標題 豆苗ジアミンオキシダーゼによる食品中のヒスタミン量の減少について
3. 学会等名 日本ビタミン学会第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本紗奈衣, 新田陽子
2. 発表標題 植物由来ジアミンオキシダーゼを利用したアレルギー様食中毒対策について
3. 学会等名 日本生物高分子学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 葛西円, 菊崎泰枝, 新田陽子
2. 発表標題 エラジタンニン, ガロタンニンによる食品中ヒスタミン蓄積抑制機構の解明
3. 学会等名 日本生物高分子学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------