静岡水技研研報(56)：1-5，2024
Bull. Shizuoka Pref. Res. Inst. Fish. Oc. (56)：1-5，2024

煮熟カツオのヒスタミン蓄積条件

二村和視[*1]・市川　稜[*2]・山﨑資之[*1]・山内　悟[*3]・小泉鏡子[*1]

煮熟カツオを様々な条件下で最大30時間まで保存し，ヒスタミン含有量の経時変化を調べた。その結果，5℃，35℃の恒温機内で保存及び加工場で保存したいずれの試験区においても30時間まではヒスタミンが検出されなかった。一方，実験モデルとして魚肉にヒスタミン産生菌が多く存在する内臓及び鰓のホモジネートを塗布することで汚染させ35℃で保存した煮熟カツオでは，保存後6時間まではヒスタミンが検出されなかったが，保存後18時間のヒスタミン含有量は307±57ppmであり，その後ヒスタミン含有量は時間と共に増加し，保存後30時間では1,825±480ppmの非常に高い値を示した。これらのことから，煮熟カツオは加工場や35℃の高温で保存しても衛生的な環境ではヒスタミンは産生されないが，ヒスタミン産生菌により汚染された場合はヒスタミンが高濃度に蓄積する可能性が示唆された。

キーワード：鰹節，カツオ，煮熟，ヒスタミン，ヒスタミン産生菌

鰹節は日本古来の伝統的な食品である[1)]。2013年に「和食」がユネスコ無形文化遺産に登録されたことで，味の基礎を成す鰹節にも注目が集まっている。一方，厚生労働省は食品衛生法を改正し，HACCP（Hazard Analysis and Critical Control Point）に沿った衛生管理を制度化した。これにより2020年6月から全食品加工業者に対して一般衛生管理に加え，HACCPに基づく衛生管理もしくはHACCPの考え方を取り入れた衛生管理を実施することを義務付けている。また，本制度の実施に当たって小規模な節類製造事業者向けの手引書*が公開されている。手引書では「ヒスタミン産生の抑制」を危害要因と特定し，原料魚処理作業開始から煮熟までの作業時間について管理基準を設けることを推奨している。

ヒスタミンは腸内細菌や海洋性細菌の中のヒスタミン産生菌が持つヒスタミン脱炭酸酵素により，赤身魚に多く含まれるヒスチジンから生成され，魚肉中に蓄積される[2)]。魚肉に蓄積したヒスタミンをヒトが摂取することでアレルギー様症状を引き起こすことがある[3)]。これまでに赤身魚[4)]，水産加工品や調理済水産食品[5,6)]におけるヒスタミンの蓄積・含有量に関する研究は豊富になされているが，水産加工品製造工程中のヒスタミン蓄積リスクに関する報告は少ない[7)]。鰹節は，原料を解凍した後に生切りし，煮熟工程，複数回の焙乾工程を経て製造される[8)]。煮熟したカツオ*Katsuwonus pelamis*を一定時間工場内で保存してから焙乾した場合には，ヒスタミン蓄積のリスクが高まると考えられるが，煮熟カツオを保存した際のヒスタミン含有量の変化についての知見はない。

そこで本研究では，煮熟カツオを加工場における通常の保管条件のほか，低温及び高温条件で一定時間保存し，ヒスタミンの蓄積状況を調べた。また，加工場内での交差汚染によるヒスタミン蓄積のリスクを明らかにするため，実験モデルとしてヒスタミン産生菌で汚染させ，高温を維持した試験区を設定し，ヒスタミン蓄積状況を調べると共に，煮熟カツオからヒスタミン産生菌の分離及び菌種の同定を試みた。

材料及び方法

材料には，焼津市内の加工場で生産した煮熟カツオを用いた。原料カツオの大きさは銘柄1.8kg下で，当

2023年1月23日受理
静岡県水産・海洋技術研究所(本所)業績第1181号
[*1] 静岡県水産・海洋技術研究所開発加工科
[*2] 静岡県水産・海洋技術研究所開発加工科，現静岡県経済産業部水産資源課
[*3] 静岡県水産・海洋技術研究所開発加工科，現静岡県水産・海洋技術研究所資源海洋科
* https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000746832.pdf

該加工場での通常の生産工程に従い生切り及び煮熟し，煮熟後に左右に分割し，1試験区あたり無作為に選んだ2枚の片身を保存試験に供した。加工場で保存した区（以下，加工場区）は，煮熟カツオを煮熟カゴに載せ，当該加工場で通常一時保存しているものと同条件で保存した。また，加工場区以外の試験区に供する煮熟カツオは，煮熟直後に煮熟カゴに載せたまま，清潔なビニールシートに包み汚染を最小限にした状態で，10分以内に静岡県水産・海洋技術研究所まで持ち帰り，保存試験に供した。保存試験は5℃（以下，低温区），35℃（以下，高温区）に設定した恒温器を用いて行った。実験モデルには，加工残渣であり，かつヒスタミン産生菌が付着している内臓，及び産生菌が存在する海水[2]に接する鰓を用いた。等量の内臓と鰓をホモジナイザー（ヒスコトロンNS-50およびジェネレーターシャフトNS-20，株式会社マイクロテック・ニチオン）で細断しながら，蒸留水で10倍希釈したものを煮熟カツオの表面に塗布し，35℃で保存したものを高温汚染区とした。保存中の煮熟カツオの中心温度及び加工場での保存場所の気温については，記録式温度計（TR-52，株式会社ティアンドディ）及び付属のセンサーを用いて測定した。

ヒスタミン測定用のサンプルは，煮熟直後のカツオを0時間とし，各試験区とも保存後6，18，24，30時間に片身2枚を雄節（背中側）及び雌節（腹側）に割り，雄節2本，雌節2本の計4本をサンプリングした。サンプルは包丁でミンチ状にし，分析まで-40℃で保存した。

ヒスタミンの測定は，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，添付の説明書に従って抽出及び比色定量分析を行い，魚肉重量に対するヒスタミンの比率（ppm）として表記した。また，保存試験でヒスタミンの蓄積が確認された高温汚染区の雄節・雌節の各1本については，Saito *et al*[9]に従い，高速液体クロマトグラフィーを用いてヒスタミン及び他のアミン類を分析した。

ヒスタミン産生菌による汚染状況を調べるため，加工場区から研究所まで持ち帰った直後の煮熟カツオ，及びヒスタミンが蓄積した高温汚染区の検体からヒスタミン産生菌を分離した。包丁でミンチ状にした試料1gを15mL遠沈管に入れ，塩分3%に調整したヒスチジンブロス[10]9mLと混合し，35℃で24時間培養した。目視により菌の増殖が確認されたものについては，Niven寒天培地[11]に塗布し，35℃で24時間から48時間培養した。培養後，周辺が紫色に変色したコロニーを釣菌し，2mLマイクロチューブに入れたTSB培地750 mLに塗布した。35℃で24時間培養後，40%グリセリン750mLと混合し，-80℃で凍結保存した。

以下の分析は，株式会社テクノスルガ・ラボ（静岡市）に委託した。分離した菌をSCD寒天（Becton Dickinson），30℃，24～48時間好気培養し，これらからDNAをアクロモペプチダーゼ（富士フィルム和光純薬株式会社）を用いて抽出し，抽出したDNAを鋳型として16S rDNAの一部領域をPCRにより増幅した。プライマーは，9F，536R，1406R，1510Rを用いた[12]。サイクルシークエンスにはBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems，USA），シークエンスにはABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer System（Applied Biosystems），相同性検索にはENKI v3.2（TechnoSuruga Laboratory，Japan）データベース，DB-BA15.0（TechnoSuruga Laboratory），国際塩基配列データベース（DDBJ/ENA(EMBL)/GenBank）をそれぞれ用いた。

結　果

保存試験中の加工場の気温及び煮熟カツオの中心温度を図1に示した。中心温度はいずれの試験区も煮熟後に急激に降下し，低温区及び高温区では恒温器の設定温度に近い値となった。一方，加工場では気温が平均27.8℃（最高32.6℃，最低24.2℃）であったのに対して，煮熟カツオの中心温度は平均24.3℃（最高28.6℃，最低22.0℃）であり，煮熟カツオの中心温度は気温よりも低かった。

表1に各条件で保存した煮熟カツオのヒスタミン含有量の変化を示した。低温区，高温区及び加工場区では，30時間保存してもヒスタミンは検出されなかったが，高温汚染区では保存後18時間からヒスタミンの蓄積が見られ，保存後30時間では1,825±480ppmと非常に高い含有量を示した（表1）。また，高速液体クロマトグラフィーでの分析結果でも2,268±402ppmと比色定量法と同程度のヒスタミンの蓄積が確認されたほか，ヒスタミン以外にもチラミン（44±33ppm），プトレシン（92±81ppm），カダベリン（200±56ppm）が検出された。

ヒスタミン産生菌については，加工場から持ち帰った直後の煮熟カツオから*Morganella morganii*，*Klebsiella aerogenes*が，高温汚染区のサンプルからは前述の*M. morganii*，*K. aerogenes*に加えて，*Citrobacter freundii*が分離された。

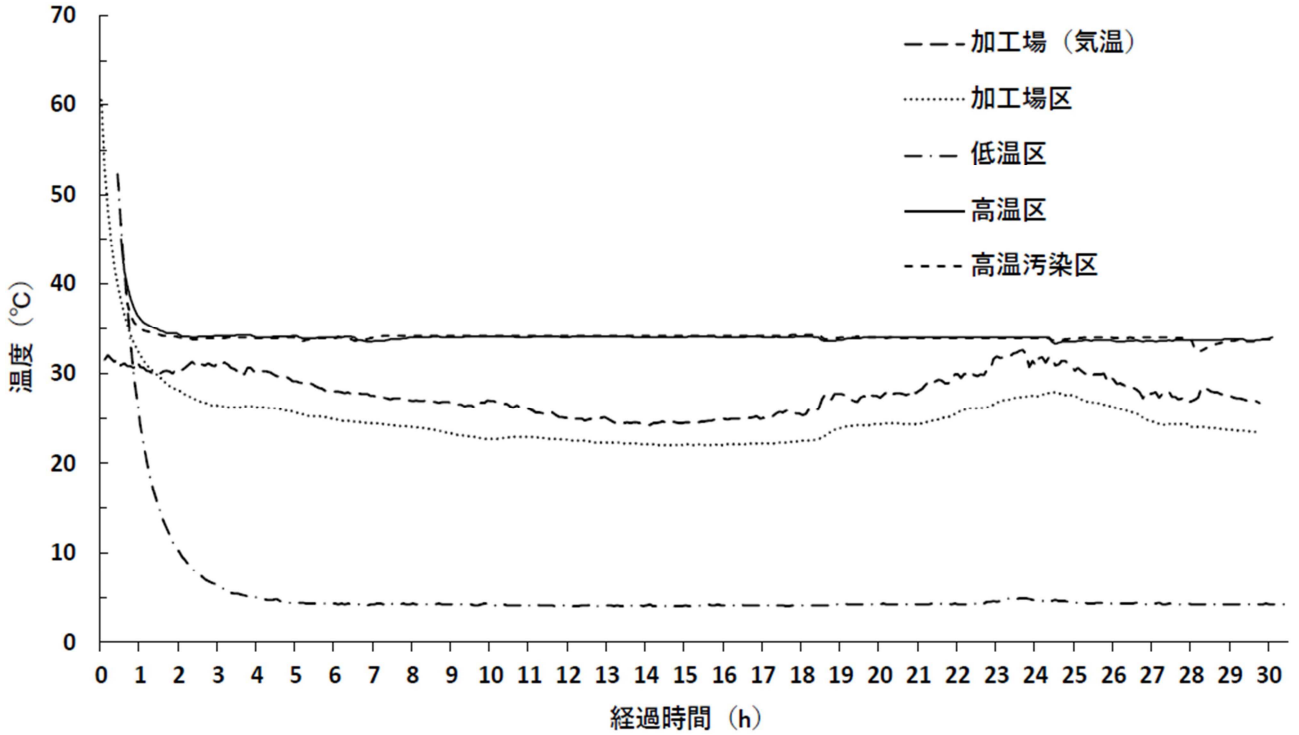

図１　各試験条件での加工場の気温及び各試験条件での煮熟カツオの中心温度の変化

表１　各試験条件で保存した煮熟カツオのヒスタミン含有量（ppm）

経過時間	0h	6h	18h	24h	30h
加工場区	ND※	ND	ND	ND	ND
低温区		ND	ND	ND	ND
高温区		ND	ND	ND	ND
高温汚染区		ND	307 ± 57	783 ± 72	1,825 ± 480

※検出限界（10ppm）未満

考　察

加工場では気温が平均 27.8℃であったのに対して，煮熟カツオの中心温度は平均 24.3℃であり，煮熟カツオの中心温度は気温よりも低かった（図 1）。これは煮熟カツオから水分が蒸発し，気化熱により温度が低下したためと考えられた。

高温汚染区では保存後 18 時間からヒスタミン含有量が 307±57ppm と非常に高濃度であった（表 1）。この濃度は，アメリカ食品医薬品局が注意喚起レベルとする 50ppm[13] を大きく超える結果となり，ヒスタミン産生菌に汚染された状態かつ高温で保存することは，ヒスタミンを蓄積しやすいことから注意が必要である。また，高温汚染区の保存後 30 時間後には，チラミン，プトレシン，カダベリンのヒスタミン以外のアミン類が検出された。これらのアミン類は，ヒスタミンを解毒する酵素を阻害し，腸管からのヒスタミン吸収を増加させるため，毒性を高める可能性が指摘されている[14]。そのため，これらのアミン類の蓄積状況にも注意が必要である。

加工場区，低温区及び高温区では，温度条件に関わらず，ヒスタミンは検出されなかった。しかし，海洋及び魚類の体表や腸管には，約 30℃で増殖する中温性や約 15℃で増殖する低温性のヒスタミン産生菌である，腸内細菌科の *M. morganii*，海洋性細菌の *Photobacterium damselae*，*P. phosphoreum* などが多数存在していると

されている[2)]。本研究においては保存試験直前の煮熟カツオから *M. morganii*, *K. aerogenes* が，高温汚染区のサンプルから *M. morganii*, *K. aerogenes*, *C. freundii* が分離され，これらはヒスタミン産生能を有することが報告されている[2)]。これらから，煮熟カツオを焙乾前に保存する場合は，汚染源となる内臓などの残滓や原料カツオなどとの徹底した隔離などの汚染対策を行う必要がある。また，本研究では35℃の高温で保存しても衛生的な環境ではヒスタミンは検出されなかった（表1)。しかし，ヒスタミン産生菌の汚染状況によってはヒスタミンが発生する可能性もあるため，煮熟後は速やかに焙乾を行うか，製造の都合で保存する場合はなるべく低温で保存し，ヒスタミン蓄積のリスクを低減させることが重要であると考えられた。

文　献

1) 和田　俊(1999)：かつお節-その伝統からEPA・DHAまで-，幸書房，東京，2～23.

2) 藤井建夫(2006)：アレルギー様食中毒．日本食品微生物学会雑誌,**23**(2)，61～71.

3) 宮木高明(1954)：アレルギー様食中毒．食品衛生研究，**4**(12)，7～14.

4) 山中英明・塩見一雄・菊池武昭・奥積昌世(1984)：赤身魚類の貯蔵中におけるヒスタミンの消長．日本水産学会誌，**50**，695～701.

5) 栗津 薫・野村千枝・山口瑞香・尾花裕孝(2011)：タンデム固相抽出を用いた魚肉中ヒスタミン分析法の検討．食品衛生学雑誌，**52**，199～204.

6) 菊池博之・堤　智昭・松田りえ子(2012)：フルオレスカミン誘導体化HPLC法による魚および水産加工品中のヒスタミン分析の性能評価．食品衛生学雑誌，**53**，121～127.

7) 保　聖子・里見正隆・舊谷亜由美・仁部玄通・稲森重弘・木村郁夫(2017)：うるめいわし丸干における柑橘製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，**83**，769～776.

8) 新谷寛治(2005)：かつお節．全国水産加工品総覧（福田　裕・山澤正勝・岡﨑恵美子)，光琳，東京，486～488.

9) K. Saito, M. Horie, N. Nose, K. Nakagomi and H.Nakazawa(1992)：Determination of polyamines in foods by liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. *Anal. Sci.*, **8**，675～680.

10) H. Takahashi, M. Sato, B. Kimura, T. Ishikawa and T. Fujii(2007)：Evaluation of PCR single strand conformational polymorphism analysis for identification of gram-negative histamine-producing bacteria isolated from fish. *J. Food Prot.*, **70**，1200～1205.

11) C. F. Niven, Jr. , M. B. Jeffrey and D. A. Corlett, Jr. (1981)：Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**(1)，321～322.

12) 中川恭好・川崎浩子(2001)：遺伝子解析法 16S rDNA遺伝子の塩基配列決定法．放線菌の分類と同定(日本放線菌学会編)，日本学会事務センター，東京，88～117.

13) U.S.Food and Drug Administration (2020)：Scombrotoxin (Histamine) formation in “Fish and fishery products hazards and controls guidance(4th edition)”, U.S. FDA, Maryland, 113～152.

14) 井部明広(2004)：発酵食品に含まれるアミン類.東京都健康安全研究センター年報，**55**，13～22.

Histamine accumulation in boiled loins of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*

Kazumi Nimura, Ryo Ichikawa, Motoyuki Yamazaki,

Satoru Yamauchi and Kyoko Koizumi

Abstract This study investigated histamine accumulation in boiled loins of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* that underwent intermediate processing in a katsuobushi factory. The boiled loins were incubated under different experimental conditions and their histamine content was determined. Histamine was not detected in boiled loins maintained at 5 or 35℃ in an incubator, or in those stored at the katsuobushi factory for up to 30 h. However, histamine accumulation was observed in loins that were incubated at 35℃ with a paste of the gills and internal organs of skipjack tuna within 18-30 h. These results indicate that histamine can potentially accumulate in boiled loins in unsanitary environments.

Key words: Boiled loin, Skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, Histamine, Histamine-producing bacteria