

簡易型ヒスタミン測定キットを利用した鰹節のヒスタミン測定方法の検討

大島伊織^{*1}・山崎資之^{*1}・二村和視^{*1}

鰹節を対象として簡易型ヒスタミン測定キット(ヒスタミンチェックスワブ)での前処理及び測定方法を検討した。その結果、前処理工程の抽出液に4%酢酸水溶液を使用すること、反応時間を30分間とすることの2点を定法から変更することで、問題点として指摘されていた誤発色を抑制し、鰹節のヒスタミン簡易検査が可能となった。

キーワード：ヒスタミン，簡易型ヒスタミン測定キット，鰹節，酢酸，誤発色抑制

鰹節は日本古来の伝統的な食品¹⁾であり、日本料理のだし素材として古くから親しまれている²⁾。一方で、鰹節は原料の保管及び加工工程中に適切な鮮度管理がなされない場合、食中毒の原因物質であるヒスタミン(以下、Hmとする)の蓄積リスクがある³⁾。

Hmは摂取することでアレルギー様症状を引き起こす化学物質⁴⁾であり、2018年の食品衛生法改正により2021年6月1日に完全施行されたHACCP(Hazard Analysis and Critical Control Point)に沿った衛生管理において、危害要因⁵⁾となっている。このため、加工現場において原料や製造工程中にHm量の測定、管理が推奨されている。

Hmの測定方法はHPLC法⁶⁾や比色定量法⁷⁾が一般的である。しかしながら、HPLC法は専用かつ高価な分析機器及び高度な分析技術を要する。また、比色定量法はHPLC法と比較して測定の簡便性は大きく向上したが、専用の測定機器及び抽出作業、検量線の作成等の作業を必要とすることから、加工現場での迅速な測定は困難であった。

一方で、測定時間が5分間と短い簡易型Hm測定キット(ヒスタミンチェックスワブ^{*3)}が2019年に開発された。本キットは、試薬の発色状況を付属のカラーチャートと比較することで視覚的にHm量を把握できることから、測定機器を使用せず迅速にHm検査を簡便に行うことが可能である。このため、水産加工現場への導入が期待されているが、本キットは焙乾後の鰹節を測定する際に誤発色することがありHm量を正確に測定することが出来ない場合がある。

本キットの原理は、酵素反応によるHm分解時の電子伝達を利用してテトラゾリウム塩を発色させている^{*4)}。このため、酸化あるいは還元基質の存在下においては発色が妨害または増強される可能性が指摘されている⁷⁾。特に、テトラゾリウム塩を利用した比色分析法では、検体中にテトラゾリウム塩を還元する物質が含まれる場合、偽陽性を示すことが報告されている⁸⁾。本キットの誤発色については、キ

2024年7月1日受理

静岡県水産・海洋技術研究所開発加工科業績第1188号

^{*1} 静岡県水産・海洋技術研究所開発加工科

^{*2} <https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000746832.pdf>

^{*3} <https://biochemifa.kikkoman.co.jp/products/detail/?id=13232>

^{*4} <https://biochemifa.kikkoman.co.jp/download/?id=12504>

ッコーマンバイオケミファから酸化剤として4%酢酸水溶液水溶液を用いることで誤発色を抑制できる可能性が報告されている(未発表)。

そこで本研究では、鰹節加工現場への本キットの導入を目的として、焙乾後の鰹節測定時に発生する誤発色を抑制する測定方法及びHm 定量性を検討したので報告する。

材料及び方法

材料には、Hm 含有量が既知の鰹節粉を使用した。この鰹節粉をHm 濃度0ppmの鰹節粉と混合し、Hm 含有量が0～1,000ppmとなるように濃度を調製した。抽出液は酸化剤として4%酢酸水溶液、比較として蒸留水を使用した。本キットで測定するための前処理として、調整した鰹節粉1gに対し、抽出液を4mL添加して混合後、沸騰水中で5分間加熱抽出を行い、その後常温に冷却することで検液を作製した。なお、作製した検液中のHm量は、あらかじめヒスタミンチェックカラー(キッコーマンバイオケミファ株式会社)で測定を行い、その測定値を定量値とした。

抽出液による誤発色抑制効果について、測定にはテトラゾリウム塩及び電子受容体のみが含まれており、酵素反応を介さないテトラゾリウム塩の発色を検出する誤発色確認用キット^{*5}にて行った。蒸留水と4%酢酸水溶液で抽出した検液を用いて発色の程度を比較し、誤発色の抑制効果を確認した。また、反応時間による影響がないことを確認するため、5～40分間静置し、発色の変化を記録した。

ヒスタミンチェックスワブの定量性の評価については、抽出液に4%酢酸水溶液を用いた場合、手順書記載の測定時間である5分間では同一の検液において発色の程度にばらつきが確認されたことから、本キットを用いて反応時間が5～40分となるように測定を行い、発色の変化について記録した。その後、各反応時間の測定値を定量値と比較して、本キットによるHm量の定量性を評価した。

結果及び考察

抽出液による誤発色の抑制効果について表1に示した。抽出液として蒸留水を用いて抽出を行った検液は5分後には発色がみられたが、4%酢酸水溶液を用いた検液は発色せず、40分後も発色はみられなかった。本手法は、検体中の還元物質に対して酸化剤を用いて誤発色を抑制する手法である。鰹節は焙乾工程において木材の薫煙により抗酸化性を示すフェノール類が付着することが報告されている⁹⁾。このため、酸化剤として4%酢酸水溶液を用いることで焙乾時に付着した還元物質の影響を低減したと考えられる。

表1 抽出液による誤発色の抑制効果

試験区	誤発色の有無				
	5分	10分	20分	30分	40分
蒸留水 (B1)	+	+	+	+	+
4%酢酸 (B2)	—	—	—	—	—

＋：誤発色有り

—：誤発色無し

*5 https://biochemifa.kikkoman.co.jp/files/product/kit/hcs_cyu.pdf

また、本キットの定量性の評価結果を表2に示した。Hm含有量が60ppm以上の検体では、手順書に記載されている5分間の反応時間では、定量値より低い値を示し、Hm量を過小評価していた。反応時間が30分間の場合は、すべての定量値と一致する測定値が得られた。しかし、40分以上反応させた場合は、Hm含有量が40ppmの検体において定量値より高い値を示し、Hm量の過大評価が確認された。

表2 鰹節におけるヒスタミン濃度別のヒスタミンチェックスワブ測定値

試験区	Hm含有量 (ppm)	ヒスタミンチェックスワブ測定値 (ppm)				
		5分	10分	20分	30分	40分
①	0.0	0	0	0	0	0
②	20.6	20	20	20	20	20
③	41.6	40	40	40	40	60
④	63.4	20	20	60	60	60
⑤	84.3	40	60	80	80	80
⑥	109.2	40	60	80	80	80
⑦	528.9	20	40	80	80	80
⑧	1033.9	20	20	60	80	80

4%酢酸水溶液を使用したことにより反応が遅延した原因は不明であるが、本キットは検体中に酸化あるいは還元基質が存在すると発色が妨害または増強される可能性が指摘されており⁷⁾、また本キットで使用されている酵素はpH7.0~11.5で安定した酵素活性を示し、pH7.0以下では酵素活性が低下すると報告されている⁹⁾。4%酢酸水溶液を用いた検液はpH4.0付近であったことから、検液のpH低下により酵素活性が低下した可能性がある。

しかしながら、反応時間を5分間から30分間に延長することで定量性は改善された。このため、鰹節では抽出液に4%酢酸水溶液を使用し、反応時間を30分間とすることにより本キットでのHm簡易検査は可能であると考えられた。

本研究による測定手法は反応時間に30分を要するが、従来のHPLC法や、同じ比色定量法であるチェックカラーヒスタミンでは前処理から測定に至るまで1時間以上を要する。また、定量性については他の測定手法と比較して精度は劣るものの、コスト及び測定操作の簡便性において優位性がある。このため、本キットを活用することで加工現場でのヒスタミン測定が容易となる、あるいは本キットを従来のHPLC法などによる検査前の一次スクリーニングとして活用することで検査コストの削減が可能となる。

このように本キットを利用した鰹節加工の現場で効率的かつ経済的な検査体制を構築していくことは、鰹節のHmの蓄積リスクを減らす一助になると考えられた。

謝 辞

本研究に御助言をいただいたキッコーマンバイオケミファ株式会社下地氏をはじめとした関係社員の方々に厚く御礼申し上げる。

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) 河野一世(2008): かつお節とかつお節だしに関する調理科学的・食文化的考察. 日本調理科学会誌, **41**(1), 2~10.
- 3) 二村和視・山崎資之・山内悟・市川稜・小泉鏡子(2021): 本県水産業におけるヒスタミン管理手法の開発と HACCP 制度化に向けた展開. 令和 2 年度静岡県水産・海洋技術研究所事業報告, 5~7.
- 4) 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.
- 5) 厚生労働省監修(1991): 食品衛生検査指針(理化学編). 日本食品衛生協会, 東京, 276~279.
- 6) Sato T., Horiuchi T., Nishimura I. (2005): Simple and rapid determination of histamine in food using a new histamine dehydrogenase from *Rhizobium sp.* *Anal. Biochem.*, **346**, 320~326.
- 7) 本間茂(2016): ヒスタミン分析の課題と酵素法による簡易迅速分析の実際, 月刊フードケミカル, **377**, 86~90.
- 8) Chamchoy, K., D. Pakotiprapha, P. Pumirat, U. Leartsakulpanich, U. Boonyuen. (2019): Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochem.*, **20**, 4.
- 9) 鈴木敏博・本杉正義(1996): かつお節香気成分ならびに付着フェノール類による抗酸化力の焙乾工程中的変化. 日本水産学会誌, **43**(1), 29~35.
- 10) 佐藤常雄・今井泰彦・堀内達雄・鈴木勝(2001): ヒスタミンデヒドロゲナーゼ及びその製造法, 特開 2001-157579 号.

Examination of the method for measuring histamine in Katsuobushi using a simplified histamine assay kit

Iori Oshima, Motoyuki Yamazaki and Kazumi Nimura

Abstract When histamine in Katsuobushi was measured using a simplified histamine assay kit (Histamine check swab), there was a problem with false positives. In this study, we examined pretreatment and measurement methods to eliminate false positives. As a result, the problem was solved by using 4% acetic acid solution as the extractant in the pretreatment process and by setting the reaction time to 30 minutes, which enabled histamine measurement in Katsuobushi.

Keyword: Histamine, Histamine assay kit, Katsuobushi, Acetic acid, Elimination of false positives