

資料

メカジキの刺身によるヒスタミン食中毒事例について

Cases of Histamine Food Poisoning by Sashimi of Swordfish

山下 清 佳	下 島 浩 幸 ¹	中 野 拓 宜 ²
西 村 修 一 ³	岩 屋 あまね ⁴	榎 元 清 美 ²
揚 松 龍 治 ¹	下堂 正 弘	

1 はじめに

ヒスタミン食中毒は、赤身魚に多く含まれるヒスチジンが微生物の働きによりヒスタミンとして生成され、これが蓄積された食品を喫食した場合に顔面紅潮やじんましんなどのアレルギー様症状を呈するものである。

ヒスタミン検査には、ダンシルクロライドを用いて誘導体化し、蛍光検出器付HPLC（以下「HPLC (FL)」という。）により測定する方法が食品衛生検査指針¹⁾に示されており、公定法として実施されている。この他に迅速に検査できるLC-MS/MSを使用した不揮発性アミン類一斉分析法²⁾やヒスタミン測定キット³⁾であるチェックカラーヒスタミン（以下「簡易キット」という。）による検査がある。

2020年8月にヒスタミン食中毒が発生した際、上述した3検査方法を実施したところ、ヒスタミン検出量の差に若干の知見が得られたので報告する。さらに今回はヒスタミン産生菌の同定を試みたので併せて報告する。

2 経緯

2. 1 食中毒事例の概要

2020年8月31日8時40分頃、当県川薩保健所管内の飲食店Aの営業者から、「8月30日昼に配達した弁当を食べた1グループ10名中4名が、喫食後直ちに舌のピリピリ感及びアレルギー様の症状を呈した。」との電話連絡が同保健所にあった。

患者は全員、メカジキ（通称：カジキマグロ）の刺身を食べた直後に異常を訴えていること、患者宅に保管さ

れていたメカジキの刺身及び飲食店Aにおいて保管されていたメカジキの刺身残品から、一般的に食中毒を引き起こすとされている濃度である100mg/100g（1000ppm）⁴⁾の4～8倍程度のヒスタミンが、同保健所の実施した簡易キットによる検査で検出されたこと、患者の症状及び潜伏期間がヒスタミンによるものと考えられること、以上のことから、同保健所はメカジキの刺身を原因食品としたヒスタミン食中毒と断定した。

2. 2 食中毒事例への対応

今回の食中毒事例は、症状等の疫学的調査より、当初からヒスタミンによる食中毒が強く疑われた。この時、同保健所では簡易キット（キッコーマンバイオケミファ（株）製）を保有しており、当センターに検体を搬入して検査するよりも短時間でヒスタミンの検出が可能との判断から、同保健所で検査を実施し、その結果を基に、食中毒調査から指導等まで実施した。

当センターは、後日、確認のため搬入された検体を用いて確認試験とヒスタミン産生菌の同定を実施した。

3 方法

3. 1 試料及び標準品

保健所はメカジキの刺身及び柵a～eの検体を検査し、当センターは搬入されたメカジキの刺身a～dの検体と添加回収試験用として、市販のビンナガ（通称：ビンチョウマグロ）の刺身を試料として検査した。

メカジキの検体の詳細については、以下のとおり。

1 退職（2021年3月）

2 北薩地域振興局保健福祉環境部

3 鹿児島地域振興局保健福祉環境部

4 くらし保健福祉部生活衛生課

〒895-0041 鹿児島県薩摩川内市隈之城町228-1

〒899-2501 鹿児島県日置市伊集院町下谷口1960-1

〒890-8577 鹿児島県鹿児島市鴨池新町10-1

- a 弁当の刺身残品① (患者宅冷蔵保管)
 - b 弁当の刺身残品② (患者宅冷蔵保管)
 - c 食べ残しの刺身 (患者宅冷蔵保管)
 - d 同一ロットの刺身 (飲食店冷蔵保管)
 - e 同一ロットの柵 (飲食店冷凍保管)
- ヒスタミン標準品は、和光純薬工業(株)製のヒスタミン二塩酸塩を用いた。希釈には、富士フィルム和光純薬(株)製の塩酸(有害金属試験用)を用いた。

3. 2 ヒスタミン検査法

3. 2. 1 簡易キットによる検査

(1) 試薬

ヒスタミン測定キットは、キッコーマンバイオケミファ(株)製のチェックカラーヒスタミンを用いた。

(2) 装置

分光光度計は日本分光(株)製V-560を用いた。

(3) 検査方法

チェックカラーヒスタミンの説明書のとおり行った。

なお、この簡易キットの測定原理は、ヒスタミンにヒスタミンデヒドロゲナーゼを反応させることで青色に発色し、その吸光度を測定することにより、ヒスタミンを定量する。

チェックカラーヒスタミンの定量下限値は、説明書に記載されている10 μ g/g (10ppm)である。

試料調製に要する時間は10分程度、検査結果が判明するのは約1時間後である。

3. 2. 2 HPLC (FL) による方法

(1) 試薬

トリクロロ酢酸(特級)(以下「TCA」という。)、アセトニトリル(HPLC用)、オクタスルホン酸ナトリウム(特級)、L-プロリン(特級)、トルエン5000(残留農薬・PCB用)は富士フィルム和光純薬(株)製を、炭酸ナトリウム(特級)及びメタノール(HPLC用)は関東化学(株)製を、10%ダンシルクロライド・アセトン溶液は、東京化成工業(株)製を用いた。

固相抽出カラムはウォーターズ社製Sep-Pac^R Vac C18 (1g, 6cc)を用いた。

内部標準液は、和光純薬工業(株)製の1,6-ジアミノヘキサン二塩酸塩を用いた。

(2) 装置

高速液体クロマトグラフは、(株)島津製作所製Nexera UHPLCを使用した。

(3) 測定条件

表1に示すとおりとした。

(4) 検量線の作成

標準品を0.1mol/L塩酸で希釈し、10~200 μ g/mLの検量線用標準溶液を調製した。定量下限値は40 μ g/g (40ppm)である。

(5) 試験溶液の調製

図1のとおり調製した。

試料調製に要する時間は10時間以上、検査結果が判明するのは、翌日である。

表1 HPLC (FL) の測定条件

分析カラム	関東化学(株)製 Mightysil RP-18 GP (内径4.6mm, 長さ250mm, 粒径5 μ m)
流速	1.0mL/min
注入量	10 μ L
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
移動相	精製水 : アセトニトリル (35 : 65)
検出器	蛍光検出器
励起波長	325nm
蛍光波長	525nm

試料 : 10g

- (添加回収試験は標準溶液添加)
- 20%TCA 10mL
- 水 100mL
- ホモジナイズ 6000rpm, 10min, 4 $^{\circ}$ C
- 水で200mLに定容

ろ過

ろ液

ろ液を5mL分取 (検体は0.25mL分取 : 20倍希釈)

- 0.1mol/Lオクタスルホン酸ナトリウム 5mL

精製カラム (Sep-Pac Vac C18 (1g, 6cc))

- 水 20mLで洗浄
- メタノール : 水 (6 : 4) 10mLで溶出

減圧濃縮 (1mL以下)

- ※検量線用標準溶液1mLも以下の操作を実施
- 内部標準液 0.5mL
- 炭酸ナトリウム 0.2g
- 2% ダンシルクロライド溶液 2mL
(誘導体化試薬)

遮光して、45 $^{\circ}$ C, 2hr放置

- 10% プロリン溶液 0.5mL

振とうして、10min静置

- トルエン 5mL

激しく振とう 1min

トルエン層 5mL分取

減圧濃縮乾固

- アセトニトリル 1mL

試験溶液

HPLC (FL)

図1 試験フロー (HPLC (FL) による方法)

3. 2. 3 LC-MS/MSによる迅速一斉分析法

(1) 試薬

1mol/Lギ酸アンモニウム (HPLC用), ギ酸 (LC用), TCA (特級), アセトニトリル (LC/MS用) は富士フイルム和光純薬(株)を用いた。

(2) 装置

高速液体クロマトグラフは, (株)島津製作所製 Prominence LCシリーズを, 質量分析装置は, AB Sciex 社製4000QTRAPを使用した。

(3) 測定条件

表2に示すとおりとした。

(4) 検量線の作成

標準品を0.1mol/L塩酸で希釈し, 2~100ng/mLの検量線用標準溶液を調製した。定量下限値は10 μ g/g (10ppm) である。

(5) 試験溶液の調製

図2の方法で調製した。

試料調製に要する時間は1時間程度, 検査結果が判明するのは, 当日夕方~翌日である。

表2 LC/MS/MSの測定条件

LC条件 (株)島津製作所製Prominenceシリーズ	
分析カラム	ZIC ^R -pHILIC(2.1mm×100mm, 粒径5 μ m)
流速	0.4mL/min
注入量	10 μ L
カラム温度	40°C
移動相	A: 0.2%ギ酸60mmol/Lギ酸アンモニウム水溶液 B: アセトニトリル
グラジェント条件	40% (0min) →40% (0.5min) →5% (5min) (B%) →5% (9min) →40% (9.1min) →40% (15min)
MS/MS条件 AB sciex社製4000QTRAP	
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化 (ESI・ポジティブ)
イオンスプレー電圧	4.5 kV
イオンソース温度	600 °C
測定モード	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
測定イオン	156.1 > 110.1

試料: 1g

- (添加回収試験は標準溶液添加)
- 20%TCA 2.5mL
- 水 20mL
- ホモジナイズ 9000rpm, 5min, 4°C
- 遠心分離 3000rpm, 10min, 4°C

ろ過

水で50mLに定容

適宜希釈 (移動相溶媒 (A:B=60:40))

- 0.45 μ mメンブランフィルターろ過

試験溶液

LC/MS/MS

図2 試験フロー (LC-MS/MSによる方法)

3. 3 食中毒事例におけるヒスタミン産出菌の同定

3. 3. 1 試薬

Niven培地は, NIVENら⁶⁾の方法により調製した。HIDブrossは, 伊達ら⁶⁾の方法により調製した。API 20Eは, シスメックス・ビオメリユー製を用いた。Ex Taq, Bacterial 16S rDNA PCR kitは, タカラバイオ製を用いた。シーケンス解析に用いた試薬は, アプライドバイオシステム製を使用した。

3. 3. 2 装置

サーマルサイクラーは, アプライドバイオシステム製 Veriti 96well, DNAシーケンサーは, アプライドバイオシステム製3500Genetic Analyzerを使用した。

3. 3. 3 ヒスタミン産生菌の増菌・分離及び簡易同定

ヒスタミン産生菌の増菌・分離の方法については, 今回, ヒスタミンを生成していることがわかっている検体からの増菌・分離のため, 茶屋ら⁷⁾の報告を参考に次の方法で行った。

検体5gを45mLのHIDブrossでストマッカー処理したもの1mL及び0.1mLを, それぞれ9mL及び9.9mLのHIDブrossに接種し, 30°Cで24時間及び15°Cで24~48時間培養して増菌させた。これらをNiven培地に一白金耳塗抹し, 30°C及び15°Cで24時間培養して, コロニーの周辺が紫色に呈色したものをヒスタミン生成能有りとした。その後, 定型的なコロニーを釣菌し, API 20Eで簡易同定を行った。

3. 3. 4 ヒスタミン産生菌の遺伝子同定

3.3.3でAPI 20Eを用いて簡易同定した結果, ヒスタミン産生菌として知られている菌について, Bacterial 16S rDNA Kitを用いて遺伝子同定を行った。熱抽出したDNAを鋳型とし, 付属の16S rDNAプライマー0を用い, 16S rDNAをPCRで増幅させ, 増幅産物を確認後, 得られた増幅産物はシーケンス反応で塩基配列を決定し, DNAデータバンク (DDBJ) のBLASTにより塩基配列との相同性の検索を行い, 菌種を決定した。

4 結果及び考察

4. 1 ヒスタミン検査

3.2.1, 3.2.2, 3.2.3のヒスタミンの定量結果は, 表3のとおりであった。

簡易キットとLC-MS/MSによる方法では, ほぼ同様の定量結果が得られた。しかしながら, HPLC (FL) によ

る検査方法の結果は、他の2つの方法の結果より高い値を示した。

この原因として2つ考えられる。

1つは、HPLC (FL) による方法では、食品由来の夾雑物がヒスタミンの誘導体化効率に影響を与えることはよく知られている。今回、定量結果が高い値を示した原因も、夾雑物が誘導体化効率を高めたことが一因であると推察された。

もう1つの原因は、この方法では内部標準液を添加しているため、測定値が検量線の最大値 (200ppm) を超える場合は、図1の操作により、精製・誘導体化する前に希釈を実施しなければならない。この精製・誘導体化の操作が煩雑なため、希釈した分、定量結果の収差が大きくなったと考えられる。なお、添加回収試験 (n=2)

を実施したところ、検量線の相関係数は0.993で、回収率は平均115%であった。

LC-MS/MSによる方法でも希釈を実施しているが、図2のとおり試験溶液を作成する際に希釈しているため、定量結果に大きな影響は与えていない。なお、添加回収試験 (n=10) を実施したところ、検量線の相関係数は0.999で、回収率は平均95%であった。

なお、簡易キットの検査結果から、飲食店で冷凍保管されていたメカジキの柵からヒスタミンが検出されなかったこと、解凍・調理されたメカジキの刺身からのみ約4000~8000ppmのヒスタミンが検出されたこと、以上から保健所は解凍から盛付・保管までの工程においてヒスタミンが高濃度に生成された可能性が高いと推察した。

表3 ヒスタミン検査結果

検体の種類 (メカジキ)	ヒスタミン濃度 (µg/g (ppm))		
	簡易キット*	HPLC (FL)	LC-MS/MS
a 弁当の刺身残品① (患者宅冷蔵保管)	4444	5637	4907
b 弁当の刺身残品② (患者宅冷蔵保管)	8025	12613	8132
c 食べ残しの刺身 (患者宅冷蔵保管)	7901	15658	7277
d 同一ロットの刺身 (飲食店冷蔵保管)	6948	10013	6885
e 同一ロットの柵 (飲食店冷凍保管)	定量下限値以下	-	-

* 保健所で検査を実施

4. 2 食中毒事例におけるヒスタミン産生菌の同定

4. 2. 1 検体からの菌の増菌・分離及び簡易同定

検体を接種後、30°Cで24時間増菌培養したHIDブrossをNiven培地に塗抹した結果、コロニーの周辺が紫色に呈色した菌株を数多く確認した。しかしながら、同様にHIDブrossで15°C、24時間及び48時間増菌培養後、Niven培地に塗抹したものは、周辺が紫色に呈色したコロニーは確認できなかった。以上の結果から、今回のヒスタミン産生菌はヒスタミン産生低温細菌ではないことがわかった。

次に、検体を増菌・培養して得られた分離株、20株をAPI 20Eで簡易同定したところ、全て*Enterobacter cloacae*等*Enterobacter sp.*と同定された。

4. 2. 2 ヒスタミン産生菌の遺伝子同定

4.2.1の簡易同定結果、ヒスタミン産生菌である*Enterobacter sp.*について遺伝子同定を行ったところ、データベースに登録された*Enterobacter sp.*と99~100%の相同性が得られ、そのうちのひとつは、*Enterobacter cloacae*と100%の相同性が得られたため、*Enterobacter*

*cloacae*と同定した。

*Enterobacter cloacae*は、ヒスタミンを生成する菌として知られている中温性腸内細菌科菌群であり、そのヒスタミン生成能は、一般的なヒスタミン産生菌である*Morganella morganii*に比べると低いとされている。しかしながら、神吉ら⁸⁾は、*Enterobacter cloacae*をより食品成分に近いtuna fish infusion broth等を使用して35°Cで24時間培養した結果、2670~9500ppmのヒスタミンを生成したと報告しており、これは今回の食中毒事例の検査結果と同程度の生成濃度であった。

5 まとめ

1) HPLC (FL) による方法 (公定法) では、誘導体化による影響と、希釈による影響及び操作が煩雑であることから、今回は他の検査方法よりも定量結果が大きくなった。このことは、公定法では定量結果の収差が大きくなる傾向を示唆するものであった。なお、定量下限値も他の検査方法に比べて高く、測定にも時間を要する。

2) ヒスタミン食中毒は、一般的にはヒスタミンが

100mg/100g以上の食品で発症するとされているが、実際には摂取量が問題であり、食中毒事例から発症者のヒスタミン摂取量を計算した例では大人一人当たり22～370mgと報告されている⁴⁾。そのため、食中毒調査においては、正確にヒスタミン濃度を測定する重要性はそれほど高くない。今回の食中毒事例では、当センターに検体を持ち込む前に、保健所で簡易キットによる検査を実施した結果、一般的に食中毒を引き起こすとされている濃度をはるかに上回るヒスタミンが確認された。当県において、従来、保健所は当センターの検査結果通知によりヒスタミンを食中毒の病因物質と断定していたため、食中毒調査からその後の指導等までに数日を要していた。しかし、今回の事例で保健所はこの簡易キットの結果を基に、食中毒調査からその後の指導等まで迅速に実施することができた。

これらのことから、ヒスタミンを病因物質とする食中毒発生時には、保健所で迅速にでき、高額な機器も不要な簡易キットによる検査が有効であると考えられた。

3) 今回の食中毒事例のヒスタミン産生菌は*Enterobacter cloacae*であった。

参考文献

- 1) (公社)日本食品衛生協会；食品衛生検査指針 理生物編2015, 785～791
- 2) 茶屋真弓, 原田卓也, 他；LC/MS/MSによる不揮発性アミン類の迅速一斉分析法の検討と低温好塩性ヒスタミン産生菌の挙動について, 本誌, 21, 69～77 (2020)
- 3) キッコーマンバイオケミファ株式会社；チェックカラーヒスタミン
<https://biochemifa.kikkoman.co.jp/products/detail/?id=11160>
(2021/07/30アクセス)
- 4) ヒスタミン, 食中毒予防必携 第3版, 日本食品衛生協会, 417～421 (2013)
- 5) Niven, C. F., Jeffrey, M. B., Corlett, D. A.
；Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. Appl Environ. Microbiol., 41, 321～322 (1981)
- 6) 伊達佳美, 古川一郎, 他；切り身魚からのヒスタミン生成菌の検出, 神奈川県衛生研究所研究報告, 38, 19～22 (2008)
- 7) 茶屋真弓, 穂積和佳, 他；LC/MS/MSによる不揮発性アミン類の迅速一斉分析法の検討と鮮魚中のヒスタミン産生菌の分離について, 本誌, 19, 56～63 (2018)
- 8) 神吉政史, 吉田綾子, 他；赤身魚およびその加工品からのヒスタミン生成菌の検出, 日本食品微生物学会雑誌, 17, 195～199 (2000)