

卸売市場で流通する鮮魚，魚介類加工品及び浸け水のヒスタミン生成菌汚染状況

新井輝義，池内容子，岸本泰子，石崎直人，柴田幹良，観 公子，下井俊子，
牛山博文，立田真弓，白石典太，甲斐明美，矢野一好

Contamination of Histamine-forming Bacteria in Raw Fish, Processed-Fish and Ice Water for Fish Storage on Market

Teruyoshi ARAI, Youko IKEUCHI, Yasuko KISHIMOTO, Naoto ISHIZAKI,
Mikiyoshi SHIBATA, Kimiko KANN, Toshiko SHIMOI, Hirohumi USHIYAMA,
Mayumi TACHIDA, Norita SHIRAISHI, Akemi KAI and Kazuyoshi YANO

卸売市場で流通する鮮魚、魚介類加工品及び浸け水のヒスタミン生成菌汚染状況

新井輝義*, 池内容子*, 岸本泰子*, 石崎直人*, 柴田幹良*, 観 公子*², 下井俊子*²,
牛山博文*³, 立田真弓*⁴, 白石典太*⁵, 甲斐明美*, 矢野一好*⁶

Contamination of Histamine-forming Bacteria in Raw Fish, Processed-Fish and Ice Water for Fish Storage on Market

Teruyoshi ARAI*, Youko IKEUCHI*, Yasuko KISHIMOTO*, Naoto ISHIZAKI*,
Mikiyoshi SHIBATA*, Kimiko KANN*², Toshiko SHIMOI*², Hirohumi USHIYAMA*³,
Mayumi TACHIDA*⁴, Norita SHIRAISHI*⁵, Akemi KAI* and Kazuyoshi YANO*⁶

Keywords : ヒスタミン histamine, ヒスタミン生成菌 histamine-forming bacteria, 鮮魚 raw fish, 魚介類加工品 processed fish, 浸け水 ice water, 汚染 contamination,

緒 言

ヒスタミン食中毒は、魚肉に付着したヒスタミン生成菌が増殖する際に産生するヒスチジン脱炭酸酵素の働きにより、魚肉中の遊離ヒスチジンから生成されたヒスタミンを摂取することによって発症するアレルギー性の食中毒である。

都内で発生したヒスタミンによる食中毒は、平成 12 年から 17 年までの 6 年間に 11 件あり、患者数は 276 人であった。ヒスタミン食中毒は、発生件数はそれ程多くはないが、1 事件あたりの患者数が他の食中毒に比較して多いのが特徴である。原因食品は、メカジキ、マグロ、サバ、イワシ、イナダなどの赤身魚の照焼、竜田揚げ、干物焼きなどであった。これら食中毒事件の多くは、調理施設での食材の温度管理の不備に起因するが、加工工場で切り身や開き等に加工する際の温度管理の不備によると推定される事例も認められた¹⁾。

これまでに、ヒスタミン生成菌による海水および海産魚汚染、あるいはヒスタミン生成菌の菌種や発育性状等に関する報告はあるが²⁻⁵⁾、市場に流通する魚介類の本菌による汚染実態はほとんど明らかにされていない。そこで、流通過程に注目し、卸売市場で流通する鮮魚（漁獲後凍結保存されたもの）、魚介類加工品及び浸け水（非凍結鮮魚を保冷するために殺菌海水などを使用する）を対象にヒスタミン含有量、ならびにヒスタミン生成菌による汚染状況を調査したので報告する。

調査方法

1. 調査対象

平成 17 年 6 月から平成 18 年 11 月までの期間に、都内の水産物卸売市場に流通していた鮮魚 54 検体、魚介類加工品 78 検体及び鮮魚浸け水 30 検体を供試した。

2. ヒスタミンの測定

ヒスタミンは、衛生試験法注解⁶⁾に準じて、薄層クロマトグラフィーにより定性的に確認し、さらに高速液体クロマトグラフィーで定量した。

3. 水分活性の測定

食品の水分活性は、水分活性測定装置 AW-2 型 Hygrooskop DT (Rotronic 社製) で測定した。

4. 細菌検査

1) 試料液の調製 鮮魚及び魚介類加工品は 25 g を秤量し、225 mL の食塩加リン酸緩衝ペプトン液（以下、希釈液と略）を加えストマッカーにて乳剤とし、試料原液とした。また、浸け水はそのままを試料原液とした。

2) 細菌数 試料原液及びその 10 倍段階希釈液を作成し、各 1 mL を標準寒天培地で混釈し、35℃で 2 日間培養して細菌数を求めた。

3) 低温細菌数 試料原液及びその 10 倍段階希釈液の各 1 mL を標準寒天培地で混釈し、10℃で 7 日間培養して低温細菌数を求めた。

4) 大腸菌群数 試料原液及びその 10 倍段階希釈液の各 1 mL をデソキシコーレート寒天培地（日水製薬）で混釈

* 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

*2 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科

*3 東京都健康安全研究センター多摩支所食品衛生研究科

*4 東京都福祉保健局健康安全室食品監視課

*5 東京都健康安全研究センター多摩支所広域監視課

*6 東京都健康安全研究センター微生物部

し、35℃で20時間培養して大腸菌群数を求めた。

5) ヒスタミン生成菌数 試料原液及びその10倍段階希釈液の各1 mLを2%食塩加0.05%グルコース加ヒスチジン寒天培地(0.05%Glu-His培地)⁷⁾にて混釈後、重層し、25℃で2日間培養して、定型的集落数を算定した。更に定型的集落について、後述のヒスタミン生成菌の確認及び同定法に従ってヒスタミン生成能を確認し、ヒスタミン生成菌数を求めた。

6) 増菌培養によるヒスタミン生成菌の分離 鮮魚及び魚介類加工品の25 gに、2%食塩加0.5%Glucose broth (pH4.7)⁸⁾225 mLを加えてストマッカーにて乳剤とし、25℃で48時間培養した。浸け水は、その2 mLに同培地100 mLを加えて同様に培養した。増菌後の培養液及びその10倍段階希釈液の各1 mLを2%食塩加0.05%Glu-His培地にて混釈し、重層し、25℃で2日間培養した。形成された定型的集落を同培地にて単離し、ヒスタミン生成能の確認及び菌種同定に供した。

7) ヒスタミン生成菌の確認及び同定法 分離菌株を2%食塩加0.15%Glucose-histidine modified broth⁷⁾に接種し、25℃で20時間培養後、その10 µLを薄層クロマトグラフィーで展開して、ヒスタミン生成を確認した。また、分離菌を普通寒天斜面、TSI寒天、LIM培地、シモンズのクエン酸塩培地、クリステンゼンの尿素培地、VP半流動培地及び2%食塩を加えたこれらの培地に接種し、35℃で20時間～3日間培養して、各性状を調べ菌種を同定した。また、普通寒天斜面培養菌をチトクロームオキシダーゼ試験に供した。一部の分離株の同定には、同定キットAPI 20E(バイオメリュウ)を使用した。

結果及び考察

1. 食品におけるヒスタミン汚染状況

食品から直接ヒスタミンが検出された検体は、塩干物であるイワシ丸干し4検体及び調味生魚に分類されるサバ味噌漬1検体であった(表1)。検出ヒスタミン量は、34～450 mg/100 gであったが、イワシ丸干し③から検出された450 mg/100 gはヒスタミン食中毒の原因食品となり得る濃度であった。ヒスタミンが検出されたイワシ丸干し4検体中3検体(イワシの丸干し①、②、③)の水分活性は0.77以下で、これらからヒスタミン生成菌は検出されなかった。残り1検体(イワシの丸干し④)の水分活性は0.97で、ヒスタミン生成菌である*Photobacterium damsela*が 9.9×10^3 /g検出された。サバ味噌漬の水分活性は0.97で比較的高い値であったが、ヒスタミン生成菌は検出されなかった。

2. 細菌数、低温細菌数及び大腸菌群数

鮮魚54検体、魚介類加工品78検体及び浸け水30検体の細菌数、低温細菌数及び大腸菌群数を図1、図2、及び図3に示した。

表1. ヒスタミンを検出した検体の概要

検体名	ヒスタミン mg/100 g	水分 活性	細菌数 /g	ヒスタミン生成菌
イワシ丸干し①	42	0.73	1.5×10^7	—
イワシ丸干し②	77	0.66	1.7×10^3	—
イワシ丸干し③	450	0.77	1.3×10^8	—
イワシ丸干し④	34	0.97	4.2×10^3	+*
サバ味噌漬	70	0.97	1.8×10^7	—

* 9.9×10^3 /g

鮮魚の細菌数は $10^0 \sim 10^6$ /gの範囲に分布していた。なかでも、 10^5 /g以上の汚染がみられた検体はメカジキ、シイラ、ブリ等の大型魚であった。低温細菌数も大型魚で同様の傾向が認められた。細菌数が 10^4 /gを超える20検体の内、その約1/3から大腸菌群が 10^2 /g検出されたが、それらは大型の魚種であった。一方、細菌数が比較的小さい 10^4 /g以下の検体は、メカジキ等の大型魚もあるが、主にイワシ、サバ、サンマ等の小型魚であり、大腸菌群の汚染も僅少であった。この細菌汚染度の違いは、水揚げ後凍結するまで、および流通過程における取り扱い方法を含めた保管方法に由来するものと推察された。

魚介類加工品では、細菌数は $10^1 \sim 10^8$ /gと広範囲に分布していた。低温細菌数もほぼ同数またはそれ以下のものが多かった。また、約40%の検体では大腸菌群による汚染がみられ、そのうち約20検体の大腸菌群数は $10^2 \sim 10^4$ /gであり、鮮魚と比較して汚染の程度が高かった。その原因は、加工時にヒトの手や製造環境からの細菌汚染を受ける機会が多いこととその間の低温保持の難しさによるものと推察された。

浸け水では、細菌数と低温細菌数は一部を除いて、ともに $10^3 \sim 10^5$ /mLの範囲に分布していた。大腸菌群数も約半数の検体が $10^1 \sim 10^2$ /gであった。

3. ヒスタミン生成菌による汚染状況

1) ヒスタミン生成菌による汚染頻度及び菌量 ヒスタミン生成菌検出状況を、鮮魚、魚介類加工品の食品群および浸け水に分類して表2に示した。鮮魚のヒスタミン生成菌汚染頻度は、54検体中12検体(22.2%)と低く、汚染菌量は10未満～ 10^2 /gであった。魚介類加工品のうち調味生魚では15検体中4検体(26.7%)が陽性で、汚染菌量は、10未満～ 10^3 /gであった。塩干物は48検体中18検体(37.5%)が陽性で、そのうちの7検体は $10^2 \sim 10^4$ /gであり、他の検体群に比べて汚染菌量の多い物が認められた。味噌干しは8検体中7検体(87.5%)と汚染率が高く、汚染菌量は10未満～ 10^3 /gと検体間での差が大きかった。

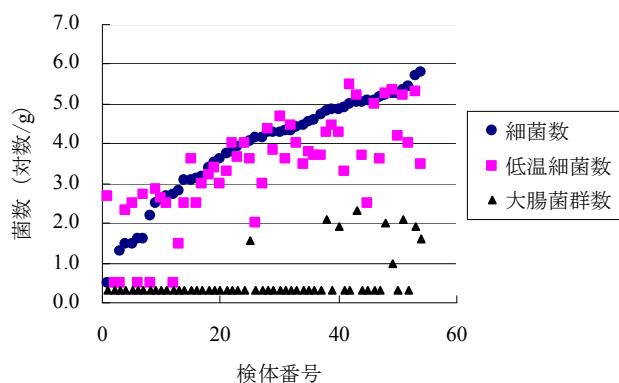


図1. 鮮魚の細菌数、低温細菌数
及び大腸菌群数

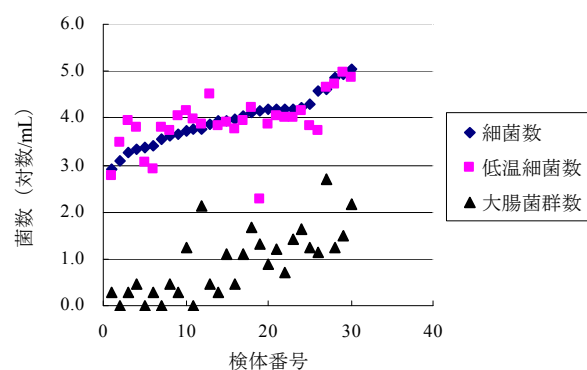


図3. 浸け水の細菌数、低温細菌数
および大腸菌群数

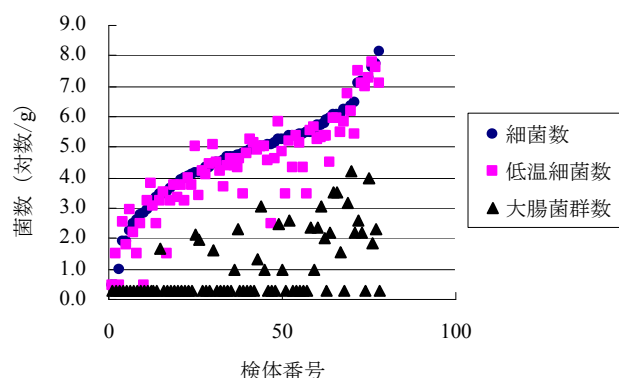


図2. 魚介類加工品の細菌数、低温細菌数
及び大腸菌群数

ネギトロは4検体中3検体(75.0%)が陽性、魚肉すり身は2検体とも陽性で、いずれも汚染頻度は高かったが、汚染菌量は $10^1 \sim 10^2$ /gと少なかった。このように各食品群のうち、調味生魚、塩干物、味醂干しは検体によって汚染菌量に大きな差が見られたが、これは製造過程や保

存過程での温度管理の良否を反映しているものと推察された。すなわち、鮮魚に比べ魚介類加工品は加工過程で人手や時間を費やし、施設環境との接触も多く、これらが汚染率と汚染菌数を高める要因となっているものと推察される。

また、浸け水では、30検体中29検体(96.7%)からヒスタミン生成菌が検出され、汚染菌数は10未満 $\sim 10^3$ /gと検体間での差が大きかった。この差は、浸漬する魚体あるいは保管容器の汚染程度の違いを反映したものと推定された。

2) 分離されたヒスタミン生成菌の種類 食品群毎に分離されたヒスタミン生成菌種を表3に示した。鮮魚では、アジ、メカジキ、ブリ及びシイラから *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella morganii* が分離され、メカジキからは更に海水由来の *Photobacterium damsela* が分離された。ヒスタミン生成菌による汚染がみられなかったイワシ、サバ、サンマ等は魚体が小さく、容易に取り扱

表2. 鮮魚、魚介類加工品及び浸け水からのヒスタミン生成菌検出状況

食品群	供試 検体数	ヒスタミン 生成菌 検出検体数 (%)	汚染菌量 (1 g 当り)					
			<10	10	10^2	10^3	10^4	10^5
鮮 魚	54	12 (22.2)	5	5	2	0	0	0
魚 介 類 加 工 品	調味生魚	15	4 (26.7)	1	1	1	0	0
	塩干物	48	18 (37.5)	6	5	5	0	2
	味醂干し	8	7 (87.5)	1	3	2	1	0
	ネギトロ	4	3 (75.0)	0	2	1	0	0
	魚肉すり身	2	2 (100)	0	2	0	0	0
	なまり節	1	0 (0.0)	0	0	0	0	0
浸け水	30	29 (96.7)	11	13	3	2	0	0

表3. 鮮魚，魚介加工品及び浸け水から分離されたヒスタミン生成菌

食品群	魚 種	検出菌種									
		検体数	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Serratia</i> sp.	<i>Morganella morganii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Providencia</i> sp.	<i>Escherichia</i> sp.	<i>Photobacterium damsela</i> 好塩菌の一種
鮮魚*	イワシ	1									
	サバ	17									
	アジ	3				1					
	サンマ	2									
	サゴシ	3									
	サワラ	4									
	青ヒラス	1									
	メカジキ	16	4	1		3					3
	ブリ	3	1								
	シイラ	4	2			2					
調味生魚	イワシ	2	1	1		1					
	サバ	2									
	サンマ	4				1					1
	メカジキ	4	2								
	ブリ	1									
塩干物	イワシ	18			1						1
	サバ	9	5			1					
	アジ	12	4	1	1	3					
	サンマ	9	4	1		3	1	1			
味醂干し	サバ	4	3	1		1					
	アジ	2	2	1							
	サンマ	2	2			1					
その他	マグロのネギトロ	4	1			3					
	イワシの魚肉すり身	2	2	1		1					
	カツオのなまり節	1									
浸け水	イワシ	3		1		1					3
	サバ	6	4		1	2				1	3
	アジ	9	4	2	1	4					9
	サンマ	9	6	1		2			1		2
	ハマチ	1									1
	カレイ	1									1
	ヒラメ	1									1

* 冷凍および解凍した生魚

いできるため施設環境からの汚染を受けにくいのに対して、メカジキは4菌種による汚染がみられ、細菌数や大腸菌群数の汚染程度が高かったことを考慮すると、多くの場合取り扱いの際に加工施設環境からの汚染を受けやすいのではないかと推察された。

調味生魚ではサバとブリからはヒスタミン生成菌は検出されなかったが、イワシから *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella morganii* が、メカジキから *Klebsiella* spp. サンマからは *Morganella morganii* および *P. damsela* が検出された。

塩干物や味噌干しでは、アジ、サンマおよびサバから *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. および *M. morganii* が、アジからは更に *Serratia* sp. が、サンマの塩干物からは更に *Citrobacter freundii* および *Proteus mirabilis* が検出された。また、イワシ塩干物からは、*Serratia* sp., *P. damsela* および好塩菌の一種が検出された。これらの加工品は加工度が高く、汚染の機会が多いことから2~5種類と多種のヒスタミン生成菌に汚染されたことが推察された。

マグロのネギトロやイワシの魚肉すり身も汚染の機会が多いと考えられる。

浸け水の中では、イワシ、サバ、アジ及びサンマの浸け水で、*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* sp., *M. morganii* 及び *P. damsela* のいずれかまたは複数の菌種が検出された。その他 *Escherichia* sp. がサバから、*Providencia* sp. がサンマから検出された。一方、ハマチ、カレイ及びヒラメの浸け水では、それぞれ1検体であるが、海水由来の *P. damsela* のみが検出された。

なお、奥積⁵⁾や藤井³⁾は海産魚における低温性ヒスタミン生成菌として *Photobacterium phosphoreum* を紹介しているが、今回の調査では、当該菌は検出されなかった。その原因として、本菌は混雑培養に耐えられない程熱に弱いこと、及び増菌培養と分離培養温度を本菌の発育適温よりも高い25℃で行ったことが考えられた。

4. 保存温度とヒスタミン生成菌のヒスタミン生成能

直接法あるいは増菌法により分離したヒスタミン生成菌200株について、各菌株を2%食塩加0.05%Glu-His培地に接種し、5℃で14日間、10℃で6日間及び25℃で1日間保存培養し、各温度での菌の増殖とヒスタミン生成能を調べた(表4)。

5℃、14日間の保存培養でヒスタミンを生成した株は200株中30株で、*K. oxytoca* 18株(45%)、*K. pneumoniae* 1株(25%)、*K. rhinoscleromatis* 2株(67%)、*Klebsiella* spp. 7株(54%)、*Serratia* sp. 1株(33%)であった。

10℃、6日の保存培養では、200株中105株(53%)でヒスタミンの生成が確認された。菌種別では *K. oxytoca*

40株(100%)、*K. pneumoniae* 4株(100%)、*K. rhinoscleromatis* 3株(100%)、*Klebsiella* spp. 13株(100%)、*M. morganii* 16株(48%)、*Serratia* sp. 1株(33%)、*P. damsela* 23株(29%)等であった。

表4. ヒスタミン生成菌の5℃、10℃及び25℃でのヒスタミン生成能

菌種	供試株数	ヒスタミン生成菌株数		
		5℃, 14日間	10℃, 6日間	25℃, 1日間
<i>Citrobacter</i> sp.	2	0	0	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	40	18	40	37
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	1	4	4
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	3	2	3	2
<i>Klebsiella</i> spp.	13	7	13	11
<i>Morganella morganii</i>	33	0	16	16
<i>Enterobacter</i> spp.	11	0	1	11
<i>Serratia</i> sp.	3	1	1	3
<i>Proteus mirabilis</i>	2	0	0	1
<i>Providencia</i> sp.	1	0	1	1
<i>Photobacterium damsela</i>	78	0	23	75
同定不能株	10	1	3	9
合計	200	30	105	172

25℃、1日保存培養では、すべての株は増殖し、200株中172株(86%)にヒスタミン生成が確認された。菌種別にみると、*Citrobacter* sp., *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis* 及び *Klebsiella* spp. は、その大多数の株で、また、*M. morganii* は半数の株でヒスタミン生成が認められた。*P. damsela* の陽性率は、25℃では96%であり、10℃での29%よりも大幅に増加した。

ヒスタミン生成菌200株の各温度での増殖とヒスタミン生成能の検討結果から、その約90%が25℃、1日間の保存で速やかに増殖しヒスタミンを生成することが確認された。本調査で34mg/100gのヒスタミン汚染があったイワシ丸干しからヒスタミン生成菌として *P. damsela* が 9.9×10^3 /g 検出されている。この検体を例にすると、本製品を流通する場合、安定した5℃以下の低温保存が確保された場合にはヒスタミン生成菌である *P. damsela* の増殖は抑制されて、ヒスタミンの増加は無く、ヒスタミン食中毒の原因食品になる可能性は低いが、25℃で保管された場合にはそのリスクは上昇するものと推測された。

まとめ

水産物卸売市場に流通する鮮魚54検体、魚介類加工品78検体及び浸け水30検体を対象にヒスタミン、細菌数、低温細菌数、大腸菌群数及びヒスタミン生成菌汚染を調査し、以下の結果を得た。

- 1) ヒスタミンは、イワシ丸干し 4 検体とサバ味噌漬 1 検体から検出され、最も多く検出されたイワシ丸干しでは 450 mg/100 g 検出され、食中毒の原因となりうる量であった。他の食品では数 10 mg/100 g であった。また、これらのイワシ丸干しの内の 1 検体からヒスタミン生成菌である *Photobacterium damsela* が 9.9×10^3 /g 検出された。
- 2) 細菌数、低温細菌数、大腸菌群数を調べた結果、魚介類加工品は、鮮魚に比べ、全般的に菌数が高いことが明らかとなった。
- 3) ヒスタミン生成菌による汚染頻度は、鮮魚 22.2%、調味生魚 26.7%、塩干物 37.5%、味噌干し 87.5%、ネギトロ 75.0%、魚肉すり身 100% であった。
- 4) ヒスタミン生成菌として、*Klebsiella* spp., *Morganella morganii*, *Enterobacter* spp., *Photobacterium damsela*, *Serratia* sp. 等 が分離された。
- 5) 分離した 200 株のヒスタミン生成能を調べた結果、5℃、14 日間の保存培養では 30 株 (15 %)、10℃、6 日間の保存培養では 105 株 (53%)、25℃、1 日間保存培養では、172 株 (86%) がヒスタミンを生成した。

文 献

- 1) 東京都福祉保健局健康安全室：東京都の食中毒概要，平成 12 年～平成 17 年，各年。
- 2) Lehane, L. and Olley, J.: *Int. J. Food Microbiol.*, **58**, 1-37, 2000.
- 3) 藤井建夫：日食微誌，**23**，61-71，2006.
- 4) 与口りお，奥積昌世，藤井建夫：日本水産学会誌，**56**，1473-1479，1990.
- 5) 奥積昌世：日本食品低温保蔵学会誌，**19**，30-40，1993.
- 6) 日本薬学会編，衛生試験法注解 2000，172-175，2000，金原出版，東京。
- 7) 柴田幹良，新井輝義，池内容子，他：食品衛生学会第 85 回学術講演会講演要旨集，2003.
- 8) Niven, F.JR., Jeffery, M.B. and Corlett, A.JR.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 321-322, 1981.
- 9) 神吉政史，石橋正憲，依田知子，他：日食微誌，**21**，216-220，2004.