

緑茶抽出物を利用した水産食品におけるヒスタミンの蓄積抑制

北海道大学 大学院水産科学研究院 水産食品科学分野 食品衛生学研究室
准教授 山崎浩司(代表), 助教 山木将悟

1. 背景と目的

水産食品に起因する食中毒のひとつにアレルギー様症状を示すヒスタミン(Hm)食中毒がある。Hm食中毒は、魚介類に付着したグラム陰性桿菌 *Morganella morganii* (モルガン菌)などが産生するヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)の作用によって遊離ヒスチジンが Hm に変換され、魚肉に蓄積するために発症する。凍結処理によって細菌の発育は阻止できるが、HDC は Hm 産生菌の菌体内に存在するため、食品の凍結・解凍などの物理的ストレスによって細胞が壊れると細胞内から漏出し、それが原因となって食品に Hm が蓄積してしまう可能性がある。そこで、本研究では抗菌活性のある茶抽出物に含まれる成分(ポリフェノール類)によって HDC 活性を阻害し、水産食品におけるヒスタミン蓄積を抑制する方法を検討した。

2. 試料および方法

2.1. 供試菌株

Photobacterium damselae JCM 8969, *P. kishitanii* LB-38, *P. phosphoreum* NBRC 13896, *Proteus mirabilis* ATCC 33583, *P. vulgaris* ATCC 33420, *Providencia rustigianii* JCM 3953, *P. rettgeri* ATCC 9250, *Morganella morganii* NBRC 3168, *M. morganii* ATCC 25829, *M. morganii* subsp. *sibonii* JCM 16939, *M. psychrotolerans* JCM 16473^T, *Raoultella planticola* NBRC 3317, *Hafnia alvei* JCM 1666, および *Klebsiella aerogenes* ATCC 10006 を 1.5 %NaCl 含有 histidine broth で 25°C または 30°C で 18 時間培養し、以降の実験に供した。

2.2. 供試菌株に対する緑茶カテキン(エピガロカテキンガレート, EGCg)の最小発育阻止濃度測定

96 穴マイクロプレートにフェノールレッドを添加した改変 TSB (pH 7.2) を分注し、EGCg を所定の濃度となるように添加後、新鮮培養供試菌を 10^6 CFU/ml となるように接種した。25°C または 30°C で 48 時間培養後、目視により最小発育阻止濃度 (MIC) を決定した。

2.3. Hm 産生菌の細胞に及ぼす凍結・解凍処理の影響

P. damselae JCM8968 培養菌を改変 PBS (2%NaCl) に 10^8 CFU/mL となるよう懸濁した。これを -48°C で 2 日間凍結後、27°C の水浴で 3 分間解凍した。この菌懸濁液の 660nm における吸光値と遠心分離 (10,000xg, 2min) して得た上清の 280nm および 260nm における吸光値を測定した。

2.4. 凍結融解処理による Hm 産生菌細胞からの HDC 漏洩の測定

K. aerogenes ATCC10006 培養菌を PBS に 10^8 CFU/mL となるよう懸濁した。これを -48°C で 2 日間凍結後、27°C の水浴で 3 分間解凍し、菌懸濁液を濾過滅菌 (孔径 0.45 μ m, PVDF ; Millipore) して無細胞上清 (CFS) を得た。この CFS を同量の 2%ヒスチジン含有 PBS 溶液と混合し、37°C で 2 時間保持後、生成した Hm 量をヒスタミン測定用キット (チェックカラーヒスタミン) で測定した。なお、対照には凍結前の菌懸濁液から同様の処理によって得た CFS を使用した。

2.5. マグロ刺身における *K. aerogenes* による Hm 蓄積に及ぼす EGCg 処理の影響

凍結マグロ肉を4℃で一夜解凍後、5gずつにスライスし、 10^7 CFU/mlに調整した *K. aerogenes* の菌懸濁液に10分間浸漬して菌を付着させた。これを-48℃で24時間凍結後、凍結した試料を8mg/mlのEGCg溶液に10分間浸漬し、-48℃で24時間再凍結した。解凍後、各試料を4℃または20℃で24時間保存し、生菌数とHm量を測定した。なお、対照はEGCg溶液の代わりに滅菌蒸留水を使用した。

3. 結果および考察

3.1. 各 Hm 産生菌株に対する EGCg の最小発育阻止濃度 (MIC)

供試菌15株のグラム陰性菌に対するEGCgの抗菌効果を検討したが、6菌株(*P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morgani* 2菌株, *R. planticola*, *K. aerogenes*)に対しては本実験で評価した2mg/ml EGCgでの抗菌性は認められなかった。一方、海洋細菌の *Photobacterium* 属3菌株に対するEGCgのMICは0.25mg/mlであった。その他の菌株に対するMICは0.5-2.0mg/mlであった。以上の結果から、EGCgの単独処理によるHm産生性グラム陰性菌の増殖抑制は難しいと考えられた。

3.2. Hm 産生菌の細胞膜に及ぼす凍結・解凍処理の影響

*P. damsela*細胞を凍結・解凍した時、細胞懸濁液の濁度は凍結前よりも0.45低下した。凍結・解凍後のCFSの260_{nm}と280_{nm}における吸光値は、凍結前よりも大幅に増加した。したがって、Hm産生性グラム陰性菌は、凍結・解凍処理によって一部の細胞が壊れ、細胞内容物の漏洩が起こることが明らかになった。すなわち、細胞内に存在するHDCも凍結・解凍処理によって細胞外へ漏洩していると推察された。

3.3. 凍結融解後の無細胞上清によるヒスタミン生成試験

凍結・解凍処理した *K. aerogenes* 細胞懸濁液から調製したCFSを添加したヒスチジン溶液においてHm蓄積(498ppm)が認められた。したがって、Hm産生菌が多量に付着した水産物を凍結・解凍した場合、凍結・解凍による物理的ストレスによって細菌細胞が崩壊し、細胞外へ漏出したHDCによってHmが生成する可能性が示唆された。

3.4. マグロ肉における *K. aerogenes* による Hm 蓄積に及ぼす EGCg 処理の影響

4℃保存の場合、対照区とEGCg処理区における24時間後の生菌数に差は認められなかったが、Hm量は対照区(12.5ppm)よりもEGCg処理区(9ppm)で僅かに少なかった。20℃保存の場合、24時間後の生菌数は対照区とEGCg処理区ではともに増加したが、両者に差は認められなかった。一方、Hm量は対照区で1,114ppmまで増加していたが、EGCg処理区でのHm量は約1/2(574ppm)に抑制されていた。したがって、凍結マグロ肉をEGCg処理すると保存中における生菌数の増加を抑制できなくても、EGCgがHm生成に関わるHDCに作用し、蓄積するHmを有意に減少させられる可能性が示唆された。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益社団法人南北海道振興財団に御礼申し上げます。また、本研究に使用したEGCgをご提供いただきました太陽化学(株)に御礼申し上げます。