

称号及び氏名	博士(獣医学) 神吉 政史
学位授与の日付	平成 19 年 9 月 2 0 日
論 文 名	「ヒスタミン食中毒原因菌の特定および赤身魚でのヒスチジン脱炭酸酵素の役割」
論文審査委員	主査 馬場 栄一郎 副査 小崎 俊司 副査 山崎 伸二

## 論文要旨

はじめに

ヒスタミン食中毒はヒスタミンの蓄積した赤身魚を喫食して引き起こされる化学性食中毒であり、喫食後 30 分ほどで顔面紅潮や発疹などのアレルギー様症状を呈する。原因食となるのは筋肉中に遊離ヒスチジンを多く含有するマグロやシイラ、イワシなどの魚であり、ヒスチジン脱炭酸酵素を有する細菌(ヒスタミン生成菌)により魚肉中の遊離ヒスチジンがヒスタミンに変換されて食中毒が引き起こされる。ヒスタミン食中毒は化学性食中毒に分類されているために原因菌に対する関心が低く、現在までにヒスタミン食中毒事例において実際に原因菌として分離・特定されたのは *Morganella morganii*、*Klebsiella pneumoniae* および *Hafnia alvei* のみであった。これらは腸内細菌科細菌であり、腸内細菌科ヒスタミン生成菌はヒスタミン生成能が高く、赤身魚から頻繁に分離されることから主要な食中毒原因菌とされてきた。しかしながら、最近では海洋性細菌で低温菌でもある *Photobacterium phosphoreum* もヒスタミン生成菌として注目されている。

わが国における腸内細菌科ヒスタミン生成菌についての報告は、ほとんどが *M. morganii* についてのものであり、海外で報告されたような赤身魚における腸内細菌科ヒスタミン生成菌分布についての調査報告はわが国ではほとんどない。本研究では市販されている生鮮赤身魚およびその加工品における腸内細菌科ヒスタミン生成菌の分布調査を実施した。さらに、2002 年 3 月に発生したイワシ丸干しによるヒスタミン食中毒事例では、原因食であるイワシ丸干しから *P. phosphoreum* を分離したので、そのヒスタミン生成能を分析し、*P. phosphoreum* が食中毒原因菌であるかを検討した。ヒスタミン生成能の高い海洋性細菌である *P. phosphoreum* および *Photobacterium damsela* について、市販の赤身魚における分布も調査した。さらに、ヒスタミン生成菌の菌体破壊により流出したヒスチジン脱炭酸酵素が魚肉中でヒスタミンを生成するという仮説について本酵素の組換え体を作成して検証した。各種ヒスタミン生成菌およびその酵素のヒスタミン生成能を研究し、生鮮赤身魚およびその加工品でのヒスタミン食中毒の発生機序について検討した。

## 第1章:腸内細菌科ヒスタミン生成菌の赤身魚における汚染状況およびその性状

ヒスタミン食中毒の主要な原因菌は腸内細菌科ヒスタミン生成菌であると考えられ、多くの腸内細菌科ヒスタミン生成菌が報告されている。そこで、市販赤身魚を調査したところ、生鮮魚 22 検体中 15 検体および加工品 14 検体中 6 検体から腸内細菌科ヒスタミン生成菌を分離した。ヒスタミン生成菌の検出率は加工品よりも生鮮魚の方が高かったが、汚染菌数は生鮮魚で最高  $2.0 \times 10^2$  CFU/gであったのに対して、加工品では生節3検体が  $10^4$  CFU/g以上であった。低温流通されている生鮮魚では、中温菌である腸内細菌科細菌の増殖は難しいが、加工品では製造過程や保存期間において室温におかれることが多く、魚肉中の菌数の増加に伴いヒスタミンが生成される可能性があることが示唆された。

赤身魚から分離されたヒスタミン生成菌を市販同定キットによって同定した結果、*Klebsiella oxytoca* および *M. morganii* が最も多く存在し、食中毒原因菌とされる *K. pneumoniae* も分離された。これらは代表的なヒスタミン生成菌として報告されているが、簡易キットによって *K. oxytoca* および *K. pneumoniae* と同定されたヒスタミン生成菌 22 株は、4°C および 42°C での発育試験と炭素源利用テストによる鑑別の結果、すべて *Raoultella planticola* と判明した。鑑別試験で *K. oxytoca* および *K. pneumoniae* と同定された糞便由来 67 株と、*K. oxytoca* および *K. pneumoniae* の分与菌株ならびに標準菌株 12 株はヒスタミン生成能を有していなかった。また、*Raoultella ornithinolytica* が赤身魚からヒスタミン生成菌として分離されたが、本菌はこれまでヒスタミン生成菌としての報告はない。*Raoultella* 属は 2001 年に *Klebsiella* 属から派生したものであり、当初は *Klebsiella* 属に属しており、当時 *Klebsiella* 属であったヒスタミン生成能を有するものは、現在は *Raoultella* 属に分類されていることが分かった。

## 第2章:*Photobacterium phosphoreum* による食中毒事例および赤身魚における海洋性ヒスタミン生成菌の汚染状況

海洋性細菌である *Photobacterium phosphoreum* および *Photobacterium damsela* も赤身魚から分離される代表的なヒスタミン生成菌として報告されている。2002 年 3 月に大阪府下で発生したヒスタミン食中毒事例における原因食であるイワシ丸干しから *P. phosphoreum* を分離し、その菌数は  $10^4$  CFU/gであった。しかしながら、このイワシ丸干しは 10 日間冷凍されており、*P. phosphoreum* は冷凍に弱いので、ヒスタミン生成時には菌数はさらに多かったと推測された。分離された *P. phosphoreum* は 12°C 以下では *M. morganii* よりも高いヒスタミン生成能を示し、滅菌およびホモジネートしたイワシに  $10^6$  CFU/g の菌量で添加した場合、20°C で 12 時間後に中毒量とされる 500 mg/kg のヒスタミンが生成された。以上のことから、この食中毒事例の原因菌を *P. phosphoreum* と結論づけた。

市販の赤身魚における海洋性ヒスタミン生成菌の分布を調査した結果、生鮮マグロ 10 検体中 6 検体から *P. phosphoreum* を検出した。マグロ以外の生鮮魚 10 検体については *P. damsela* がシイラ 1 検体から分離された。わが国におけるヒスタミン食中毒の原因食で最も多いのはマグロであるが、生鮮魚の場合は低温流通が徹底されている。低温菌である *P. phosphoreum* がマグロから高率に分離されたことから、*P. phosphoreum* が生鮮魚の主要な食中毒原因菌である可能性が示唆された。加工品については *P. phosphoreum* が 4 検体から、*P. damsela* が 1 検体から分離された。海洋性細菌が分離された加工品には、イワシ干物 2 検体およびすり身 1 検体が含まれていた。前述の食中毒事例もイワシ丸干しが原因食であったが、イワシの干物は通常内臓を除去しないため、海洋性細菌に汚染されているイワシ腸管内では加工後も菌はそのまま生存していると推測された。以

上のことから生鮮魚およびイワシ加工品では海洋性ヒスタミン生成菌が主要な食中毒原因菌であり、イワシを含めた加工品では腸内細菌科ヒスタミン生成菌が主要な原因菌であると推察した。

### 第3章: マグロおよびサンマ干物でのヒスタミン蓄積に関するヒスチジン脱炭酸酵素の役割

マグロなどの赤身魚やその製品は冷凍される機会が多いが、ヒスタミン生成菌、特に *Photobacterium phosphoreum* は冷凍による傷害でその菌数を減少させたり、解凍後にヒスタミン生成能を低下させたりする。しかしながら、冷凍品でもヒスタミン食中毒は発生するので、冷凍前に増殖していたヒスタミン生成菌が冷凍により菌体破壊を起こして、ヒスチジン脱炭酸酵素が魚肉中に漏出し、酵素単独でヒスタミンを生成するという説が考えられている。そこで、*P. phosphoreum*、*Photobacterium damsela*e、*Raoultella planticola*、*Morganella morganii* ヒスチジン脱炭酸酵素の組換え体を作成し、それぞれの活性や安定性を検証した。菌種間の本酵素のアミノ酸配列には 76% から 84% の相同性があったが、各組換え体の比活性にほとんど差はなく、136  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  から 147  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  であった。*P. phosphoreum* の組換え酵素は最も不安定であり、マグロおよびサンマ干物に添加した場合には、20°C のマグロ以外では活性の大幅な低下が見られた。*R. planticola* は加工品に多く存在するが、その組換え酵素の活性は加工品においては著しく減少した。*P. damsela*e の組換え酵素の最適 pH は 6.0 であり、pH 5.5 でも活性は 75% 保持されていた。赤身魚の筋肉は pH 5.5 から 6.5 であり、*P. damsela*e の組換え酵素の耐酸性が食品中で最も安定であった一因であると考えられた。また、*P. damsela*e の酵素は耐塩性も有し、5% 食塩下では *P. phosphoreum* の酵素活性は 27% まで低下するのに対して、*P. damsela*e の酵素は 89% の活性が保持されていた。本酵素のこれらの安定性により食品中では他菌種の酵素より活性が高く、30°C のマグロに 0.5  $\mu\text{g}/\text{g}$  の酵素を添加した場合は 2 時間で 649  $\text{mg}/\text{kg}$  のヒスタミンが生成された。また、サンマ干物に添加して -20°C で保存したところ、12 週間後でも約半分の活性が保持されていた。以上の結果、*P. damsela*e のヒスチジン脱炭酸酵素は単独でヒスタミン食中毒を引き起こす可能性があると考えられた。

### まとめ

ヒスタミン食中毒の発生機序において以下の結論を得た。

1. これまで *Klebsiella pneumoniae* および *K. oxytoca* とされてきたヒスタミン生成菌は、現在の分類では *Raoultella planticola* であることが判った。中温菌である腸内細菌科ヒスタミン生成菌の菌数は加工品で  $10^4$  CFU/g を超えるものがあり、加工品においては腸内細菌科ヒスタミン生成菌が主要な食中毒原因菌であることが示唆された。
2. イワシ丸干しを原因食とするヒスタミン食中毒事例から *Photobacterium phosphoreum* を分離した。この細菌は 12°C で *Morganella morganii* より高いヒスタミン生成能を示し、その他のヒスタミン生成菌が分離されなかったことから、*P. phosphoreum* が食中毒原因菌であったと結論づけた。*P. phosphoreum* は生鮮マグロから高率に分離され、また本菌は低温で高いヒスタミン生成能を発揮することから、生鮮魚では主要な食中毒原因菌であることが示唆された。
3. *Photobacterium damsela*e の組換えヒスチジン脱炭酸酵素が赤身魚中で最も安定性を示すと同時に高いヒスタミン生成能を示した。*P. damsela*e は食中毒原因菌としての報告はないが、*P. damsela*e の酵素は酵素単独でヒスタミン食中毒を引き起こす可能性があると考えられた。

## 審査結果の要旨

ヒスタミン食中毒はヒスタミンの蓄積した赤身魚を喫食してアレルギー様症状を呈する化学性食中毒である。ヒスチジン脱炭酸酵素を有するヒスタミン生成菌により魚肉中の遊離ヒスチジンがヒスタミンに変換されて引き起こされる。これまでヒスタミン食中毒事例の原因菌として分離・特定されたのは *Morganella morganii*、*Klebsiella pneumoniae* および *Hafnia alvei* のみであった。また、わが国における腸内細菌科ヒスタミン生成菌分布調査報告はほとんどない。しかし、最近では原因菌として海洋性細菌で低温菌でもある *Photobacterium phosphoreum* の可能性も考えられている。

そこで申請者は、腸内細菌科ヒスタミン生成菌とそれ以外の原因によるヒスタミン中毒の可能性を検討するために研究をおこなった。以下はそれらの成績の概要である。

第1章では、腸内細菌科ヒスタミン生成菌の赤身魚における汚染状況およびその性状を調べた。市販赤身魚を調査し、生鮮魚22検体中15検体および加工品14検体中6検体から腸内細菌科ヒスタミン生成菌を分離した。ヒスタミン生成菌の検出率は加工品よりも生鮮魚の方が高かったが、汚染菌数は生鮮魚より加工品の方が高かった。赤身魚から分離されたヒスタミン生成菌は、簡易キットによって *Klebsiella oxytoca* および *M. morganii* と同定された菌種が最も多く、*K. pneumoniae* がこれに次いだ。しかし *K. oxytoca* および *K. pneumoniae* と同定された22株は、その後の検査結果から、すべて *Raoultella planticola* と判明した。これまで本菌のヒスタミン生成菌としての報告は極めて少なく、この結果はヒスタミン生成菌に関するこれまでの知見を修正する必要があることを示唆した。

第2章では、*P. phosphoreum* による食中毒事例および赤身魚における海洋性ヒスタミン生成菌の汚染状況を調べた。海洋性細菌である *P. phosphoreum* および *P. damsela* は赤身魚から分離されるヒスタミン生成菌として報告されている。大阪府下で発生したヒスタミン食中毒事例の原因食であるイワシ丸干しから *P. phosphoreum* を分離した。イワシ丸干しを使って再現試験を行ない、本食中毒事例の原因菌は *P. phosphoreum* であると結論づけた。また、市販の赤身魚における海洋性ヒスタミン生成菌の分布を調査した結果、*P. phosphoreum* が生鮮魚の主要な原因菌である可能性が示唆された。

第3章では、マグロおよびサンマ干物におけるヒスタミン蓄積に関するヒスチジン脱炭酸酵素の役割を検討した。すでに増殖していたヒスタミン生成菌が冷凍により破壊され、ヒスチジン脱炭酸酵素が魚肉中に漏出して、酵素単独でヒスタミンを生成するという仮説が考えられる。そこで、*P. phosphoreum*、*P. damsela*、*R. planticola*、*M. morganii* ヒスチジン脱炭酸酵素の組換え体を作成したところ、本酵素のアミノ酸配列には菌種間で76%から84%の相同性があったが、各組換え体の活性にほとんど差がなかった。*P. damsela* の酵素活性は、赤身魚の筋肉内あるいは、5%食塩下でも保持されており、他菌種の酵素より高い安定性を保持していた。以上の結果から、*P. damsela* のヒスチジン脱炭酸酵素は単独でヒスタミン食中毒を引き起こす可能性があるかと推測された。

本研究は、これまで不明な点が多かったヒスタミン食中毒について、多くの新たな知見を明らかにし、その成果はとくに魚肉食品の安全性を確保するために重要な情報を提供した。さらに、食中毒事例における検査手法や今後の研究課題に対して獣医公衆衛生学および食品衛生学領域に大きく貢献するものと評価できる。したがって、本論文の審査と学力確認の結果をあわせて博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。