
東京都微生物検査情報

MONTHLY MICROBIOLOGICAL TESTS REPORT, TOKYO

第43巻 第5号
2022年5月号
月 報

 東京都健康安全研究センター

<https://idsc.tmiph.metro.tokyo.lg.jp/>

ISSN 1883-2636

ヒスタミン産生菌の迅速検査法

1. はじめに

ヒスタミンによるアレルギー様食中毒は、東京都では過去10年間で年平均2.2事例、患者数平均30名、日本全国では年平均10事例、患者数平均200名程度の事例が発生している^{1,2)}。特に、保育園や学校、社員食堂などの給食施設の食事を原因として大規模に発生する事例が知られており、そのため1事例当たりの患者数が多いことが特徴である。

ヒスタミン食中毒は、ヒスタミンが大量に蓄積した魚介類やその加工品の喫食により、喫食後1時間程度で、じんましん、顔面紅潮、悪心、頭痛などのアレルギー様の症状を呈する。

ヒスタミンは、ヒスタミン産生菌が赤身魚の筋肉中に多く含有されているヒスチジンをヒスチジン脱炭酸酵素により変換することにより生じる。つまりヒスタミン食中毒は化学物質を原因とする化学性食中毒でありながら、その生成に細菌が関与しており、細菌性食中毒様の側面も持ち合わせている。

ヒスタミン産生菌はヒスチジンをヒスタミンに変換する細菌群の総称であり、主に鮮魚では腸内細菌及び海洋細菌が、塩蔵・発酵食品や低pH食品では乳酸菌が知られている。しかし、多種多様な細菌が含まれていることから、菌種同定と同時にヒスタミン生成能を迅速に検査することは困難であるため、ヒスタミン食中毒発生時に原因菌の特定が行われることは稀である。

現在のところ、日本ではヒスタミンの規制値は定められていないが、アメリカ食品医薬品局(FDA)ではヒスタミン食中毒を引き起こしうる魚中のヒスタミン濃度を500ppmから200ppmへの引き下げを提案しており、ヒスタミン食中毒に関連する消費者保護を強化する方向にある³⁾。

2. ヒスタミン産生菌の検査法

ヒスタミン産生菌は菌種や菌株によりヒスタミン生成能が異なるため、菌種同定と同時にヒスタミン生成能を調べる必要がある。

1)菌種同定方法

生化学的手法を利用した市販の菌種同定キット以外に、16SリボソームDNAの塩基配列解析法やマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)による方法などがある。市販の菌種同定キットは手軽に利用できる反面、対象とする菌種に限られる。塩基配列解析はより多くの菌種がカバーできるが、手技が複雑であり、日数を要する。MALDI-TOF MSは装置が高額であるために初期投資が必要であるが、ランニングコストは低く、簡易な前処理で迅速な同定が可能である。

2)ヒスタミン生成能試験

Niven培地などヒスチジンを基質に含有する培地で細菌を培養し、生成したヒスタミンをpH指示薬で検出する方法、ELISA法やテトラゾリウム塩の還元によるホルマジン色素の発色によりヒスタミンを吸光度で検出する市販のキットなどが販売されている。これらの方法では比較的容易にヒスタミン生成の有無を調べることができる。その他、ヒスチジンデカルボキシラーゼ遺伝子*hdc*をPCRで増幅して検出する方法もある。一般的には、ヒスタミンの定量は食品衛生検査指針や衛生試験法・注解に記載されている標準法である高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で行われるが、薄層クロマトグラフィー(TLC)や液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)などによりヒスタミンを検出する手法もある。

しかし、いずれの方法も菌種とヒスタミン生成能を同時に検査することは出来ず、精度が上がるほど複雑な前処理を要し、測定までに時間を要するという問題点がある。

3. 質量分析計を用いたヒスタミン産生菌の同定

MALDI-TOF MSを用いた微生物同定は、微生物特有のリボソームタンパク質を主成分とした分子のマススペクトルパターンを既知の標準株ライブラリーと照合し、菌種を同定する手法である。この原理を利用してヒスタミンのプロト

ン付加イオン[M+H]⁺を検出して標準物質と比較することにより、ヒスタミンについても直接検出することが可能である。この手法ではヒスタミン産生菌の菌種同定とヒスタミンの検出を一度に行うことが可能であり、さらに濃縮工程を加えることで、ヒスタミン食中毒発生時の原因食品からのヒスタミン検出も可能である。

1) 前処理方法

菌種同定：ヒスチジン寒天培地、Niven 培地など基質にヒスチジンを含有する培地でヒスタミン産生菌を培養する。培養温度及び時間は各菌株の生育に最も適した条件で行う。爪楊枝でコロニーをターゲットプレートに薄く均一になるように塗布して乾燥させ、マトリックス試薬を添加して乾燥させる。

菌株のヒスタミン：上記の菌株を培養した培地を直径 6mm にくり抜き、アセトニトリル 500 μ L 及び少量の塩化ナトリウムを加えて 3 分間ボルテックスで抽出する。1 分間静置した後、上清 1 μ L とマトリックス試薬 1 μ L を混合してターゲットプレートに塗布し、乾燥させる。また、標準物質としてアセトニトリルで希釈したヒスタミン標準液 1 μ L とマトリックス試薬 1 μ L を混合してターゲットプレートに塗布し、乾燥させる。

食品のヒスタミン：食品 10g に 20%トリクロロ酢酸溶液 10mL を加えて混合し、蒸留水を加えて 10 倍希釈する。バイアル瓶に試験溶液 500 μ L、少量の塩化ナトリウム及びアセトニトリル 500 μ L を加えて 3 分間ボルテックスで抽出する。1 分間静置後、上清 50 μ L をタンパク質抽出キットで精製し、抽出物 1 μ L とマトリックス試薬 1 μ L を混合してターゲットプレートに塗布し、乾燥させる。

2) 分析方法

菌株は 2,000–20,000Da の範囲で分析し、得られたマススペクトルを菌種同定ソフトウェアで解析し菌種を同定する。菌株及び食品のヒスタミンは 100 Da–700 Da の範囲で分析し、手動で 1 サンプルにつき 10 個の異なるスポットから 400 ピークを積算する。得られたマススペクトルは解析ソフトウェアを用いて、ヒスタミンプロトン付加イオン [M+H]⁺は 112 \pm 0.5 m/z 、ヒスタミンナトリウム付加イオン[M+Na]⁺は 134 \pm 0.5 m/z に、S/N 比が 10 以上となるピー

クが含まれた場合にヒスタミン陽性と判定する。検出下限は菌株のヒスタミンで 200ppm 程度である。菌株からのヒスタミン検出事例を図 1 に示す。

4. まとめ

ヒスタミン産生菌を同定する方法は様々な手法があるが、MALDI-TOF MSを用いることにより、短時間で簡易に菌種同定とヒスタミン生成能を同時に調べることが可能であり、ヒスタミン産生菌のスクリーニングに有用である。

本手法では、ヒスタミンを直接検出するために、その前駆体となるヒスチジンを含む培地で培養する点が重要である。本分析方法は定性分析のみで、HPLC等に比べて感度がかなり低いという短所もある。しかし、ヒスタミン食中毒の原因食品からも、ヒスタミンを検出できた事例もあり、検査への適用は可能であると考えられる(図2)。一般的にヒスタミン食中毒を発症するヒスタミン摂取量は22~370mg⁴⁾とされていることから、抽出効率をあげる検査法の改良を行うことにより、さらに低濃度のヒスタミンを検出することが期待できる。

<引用文献>

- 1) 東京都福祉保健局：食品衛生の窓
https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/tyuudoku/r4_sokuhou.html
- 2) 厚生労働省：ヒスタミンによる食中毒について
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000130677.html>
- 3) FDA: CPG Sec 540.525 DRAFT: Scombrotoxin (Histamine)-forming Fish and Fishery Products – Decomposition and Histamine (CPG 7108.24)
<https://www.fda.gov/media/155085/download>
- 4) 中央法規出版：食中毒（食品安全性セミナー1）215-227, 2001.
(2022年5月31日現在)

(食品微生物研究科 上原 さとみ)

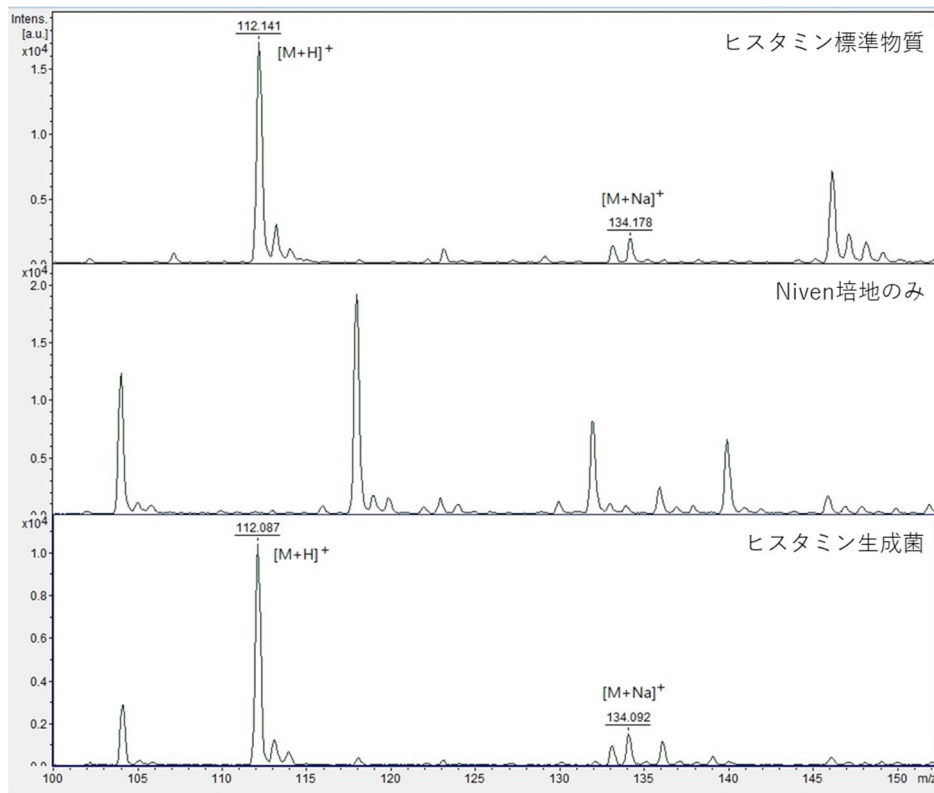


図 1. MALDI-TOF MS による菌株及び Niven 培地のマススペクトル

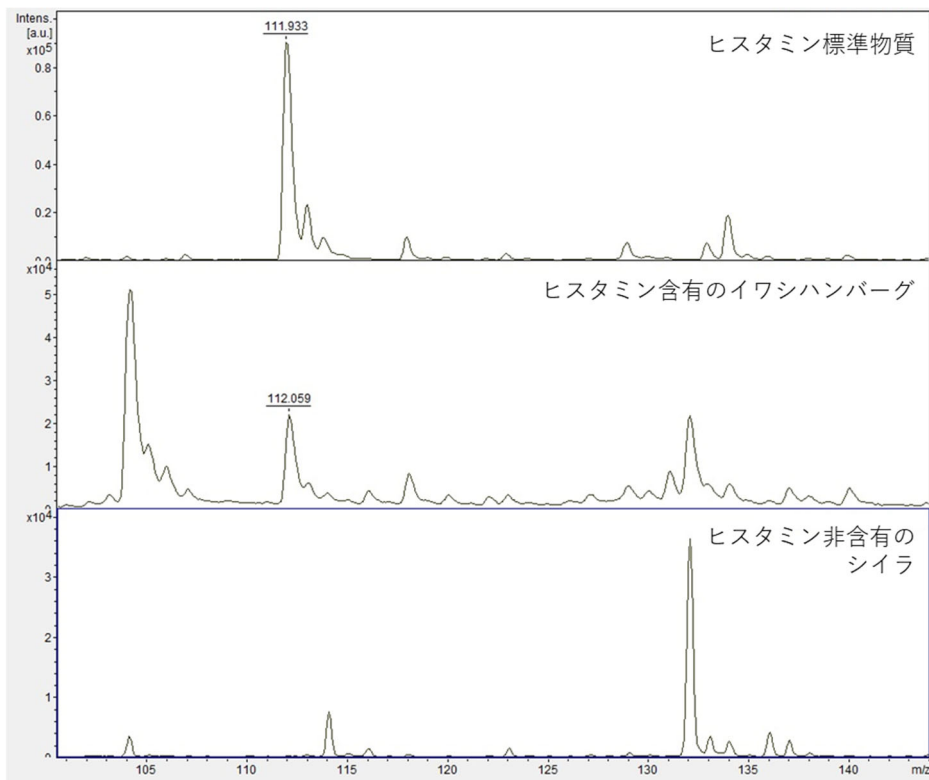


図 2. MALDI-TOF MS による食品中ヒスタミンのマススペクトル

表1 病原体搬入・検出状況(4種等)*

2022年5月分

機関名		コレラ菌	赤痢菌	チフス菌	パラチフス A菌	腸管出血性 大腸菌	結核菌
区	千代田区					4	
	中央区						
	港区					4	
	新宿区						
	文京区						
	台東区						2
	墨田区					1	
	江東区					1	
	品川区					2	
	目黒区					2	
	大田区						1
	世田谷区						1
	渋谷区					1	
	中野区						
	杉並区					4	
	豊島区						
	北区					2	
	荒川区						
	板橋区					1	2
	練馬区					2	
足立区							
葛飾区						2	
江戸川区							
市	町田市						
	八王子市					2	
小 計						26	8
都	西多摩						
	多摩立川					3	
	南多摩					2	
	多摩府中					2	
	多摩小平					1	
	島しょ						
小 計						8	
合 計						34	8
健康安全研究センター 検出分						5	

*2016年4月より、各保健所から搬入された検体を集計することとした。

表2 検体搬入状況(全数把握対象疾患-五類)*

2022年5月分

	検体数	2022年累計
侵襲性インフルエンザ菌感染症(菌)		4
侵襲性髄膜炎菌感染症(菌)		
侵襲性肺炎球菌感染症(菌)	10	32
カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症(菌)	8	23
播種性クリプトコックス症(菌)		6
合計	18	65

※2016年4月(第37巻・第4号)から追加

表3 病原微生物検出状況(食中毒関連)

2022年5月分

	菌種名	検体数	2022年累計
細菌	大腸菌		
	毒素原性		
	組織侵入性		
	病原血清型		
	腸管出血性	1	1
	その他・不明	5	34
	サルモネラ		
	O4		1
	O7	2	2
	O8		
	O9		
	その他		
	不明		
	腸炎ビブリオ		
	カンピロバクター	12	43
	黄色ブドウ球菌	1	3
	F型ウエルシュ菌		3
ボツリヌス菌		1	
F型ボツリヌス毒素産生 クロストリジウム・バラティイ			
セレウス菌			
ウイルス	ノロウイルス(G I)		9
	ノロウイルス(G II)	2	114
	ノロウイルス(G I,G II)		2
	ロタウイルス		
	サポウイルス		23
寄生虫	アニサキス	4	24
	クドア		
合計		27	260

表4 HIV 検査数及び陽性数

2022年5月分

	男性		女性		性別不明		合計	
	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数
東京都新宿東口検査・相談室※	629	2	176	0	0	0	805	2
保健所等	88	2	35	0	0	0	123	2
合計	717	4	211	0	0	0	928	4
2022年累計	3,480	35	1,055	0	2	0	4,537	35

※2021年3月より名称変更

表5 性感染症検査数及び陽性数

2022年5月分

	梅毒検査		クラミジア遺伝子検査		淋菌遺伝子検査	
	検査数	陽性	検査数	陽性	検査数	陽性
東京都新宿東口検査・相談室※	819	103	0	0	0	0
保健所等	122	6	117	10	66	1
合計	941	109	117	10	66	1
2022年累計	4,507	519	379	24	221	1

※2021年3月より名称変更

定点把握疾患別病原体分離状況（ウイルス）

過去3ヶ月間にセンターに搬入された定点把握疾患検体から、ウイルスは分離されませんでした。

◆東京都微生物検査情報◆

2022年6月30日

編集・発行

東京都健康安全研究センター

東京都感染症情報センター

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-24-1

TEL:03-3363-3213

FAX:03-5332-7365

S0000786@section.metro.tokyo.jp

<https://idsc.tmiph.metro.tokyo.lg.jp/>

(2022年1月12日よりURLを変更しました)