

食品中の不揮発性アミン類等の保存条件による消長

大谷友香 伊藤志穂 宇川夕子 望月美菜子 井上智 四宮博人

Fate of non-volatile amines in foods depending on storage conditions

Yuka OTANI, Shion ITO, Sekiko UKAWA, Minako MOCHIZUKI,
Satoshi INOUE, Hiroto SHINOMIYA

Histamine is a non-volatile amine produced by bacteria from histidine in food when the food is stored in an inappropriate temperature environment, and ingesting large amounts causes allergic food poisoning. Its action is enhanced by the coexistence of other amines such as tyramine.

To prevent health damage caused by amines such as histamine food poisoning, it is necessary to clarify under which conditions amines increase, and the storage conditions (storage period, temperature, Etc.) was investigated.

As a result, it was revealed that many amines increase with time. In particular, histamine exceeded levels that caused severe food poisoning when stored at room temperature for 24 hours. Furthermore, amines increased when stored for a long time even at low temperatures.

Therefore, it was found that temperature control is an important factor in food preservation.

Keywords : Histamine , non-volatile amines , storage test

はじめに

ヒスタミンは、食品を不適切な温度環境下で保存した場合に、食品中のヒスチジンから細菌により生成される不揮発性アミン(以下、「アミン類」という。)であり、多量に摂取すると、発疹、頭痛、嘔吐、顔面紅潮等のアレルギー様症状を呈する。ヒスタミン食中毒は、学校給食等における大規模事例が多数報告されており、食の安全・安心において大きな問題となっている。

また、ヒスタミンの作用はチラミン等の他のアミン類の共存やモノアミンオキシダーゼ阻害薬(MAOI)により増強される^{1) 2)}とも言われている。

日本においては食品中のアミン類の基準値等は定められていないが、欧州では魚の腐敗の指標として、ヒスタミン、カダベリン、プトレシン、チラミンの4種の不揮発性アミンの合計である Biogenic Amine Index(BAI)を用いることも提案されている³⁾。

ヒスタミン食中毒をはじめとしたアミン類による健康被害防止を図るためには、アミン類がどのような条件で増加するかを明らかにすることが重要であるため、8種のアミン類及びオルニチンについて、当所で開発した一斉分析法⁴⁾を用いて、食品中のアミン類の保存条件(保存期間、温度等)による消長を調査したので報告する。

材料と方法

1 分析対象化合物

今回、不揮発性アミンとしてアグマチン(Agm)、カダベリン(Cad)、ヒスタミン(Him)、フェネチルアミン(Phm)、プトレシン(Put)、スベルミジン(Spd)、トリプタミン(Tpm)、チラミン(Tym)の8項目、及び前駆体アミノ酸としてオルニチン(Om)の合計9物質を分析対象とした。(図1)

2 試薬・器具

標準品として、硫酸アグマチン(研究用)はTOCRIS製、カダベリン二塩酸塩(食品分析用)、ヒスタミン二塩酸塩(食品分析用)、2-フェネチルアミン(特級)、プトレシン二

塩酸塩(食品分析用), スペルミジン(生化学用), チラミン塩酸塩(食品分析用)及びD,L-オルニチン塩酸塩(特級)は和光純薬工業製, トリプタミン(analytical standard)はSigma-aldrich製を用いた.

その他0.1mol/L塩酸(容量分析用), トリクロロ酢酸, ギ酸, ギ酸アンモニウム(以上, 特級), アセトニトリル, メタノール(以上, 残留農薬・PCB試験用)は和光純薬工業製を用いた.

標準原液は, アミン類及びオルニチン標準品を0.1 mol/L塩酸で溶解し, 500 µg/mLに調製した. 各標準原液を適宜分取混合し, 移動相溶媒で希釈したものを混合標準溶液とした.

精製水は超純水製造装置arium 611UV(ザルトリウス・メカトロニクスジャパン)により精製したものを使用した.

ろ過にはADVANTEC No.5A, PTFE製0.2µmシリンジレスフィルターMini-UniPrep(GCヘルスケア)を用いた.

3 装置

LC-MS/MSは, ACQUITY UPLC H-CLASS(LC)及びXevo TQD(MS/MS)(Waters)を用いた. フードプロセッサはMK-K48P(Panasonic), ホモジナイザーはULTRA-DISPERSER(ヤマト科学), 遠心分離機はKUBOTA5200(久保田商事), 水浴はBK-300(ヤマト科学), 乾燥機はDF-41(ヤマト科学), 冷蔵庫はMPR-312D(SANYO)を用いた.

4 測定条件

既報⁴⁾と同様に, 測定にはLC/MS/MSを用いた. 測定条件を表1に示す.

5 試料

県内の販売店で購入したアジ(長崎県産), サバ(青森県産), サワラ(愛媛県産)及びブリ(ワカナ)(愛媛県産)の可食部をそれぞれフードプロセッサで細切均一化し, 試料として用いた.

また, 調味試料として, アジの切身を酒, みりん, 醤油各15 mLと砂糖4.5 gを混合した調味液に漬けたもの及び, サバ切身に20 gの塩をまぶした後に酢150 mLに30分漬けて酢締めにしたものをそれぞれフードプロセッサで細切均一化し, それぞれアジ調味試料(照焼), サバ調味試料(酢締め)とした.

6 方法

試料をジッパー付きアルミ袋に入れ, 4 (冷蔵庫), 25 (水浴), または 35 (乾燥器)でそれぞれ保存し, 0時間, 6時間, 24時間, 48時間経過後に図2に従って試料溶液を調製し, アミン類を測定した. また, 4 においては, 7日, 14日経過後にも測定を行った.

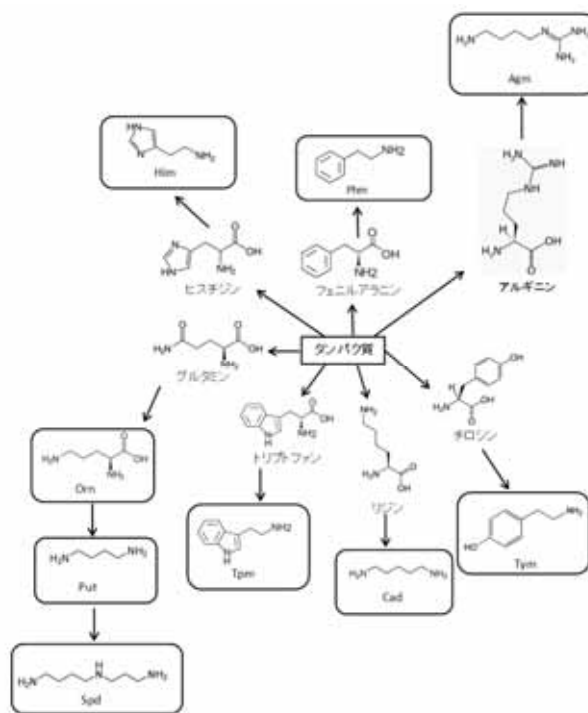


図1 分析対象としたアミン類等

表1 測定条件

カラム	UPLC ACQUITY BEH HILIC (2.1×100mm, 1.7µm Waters製)		
カラム温度	40		
移動相	500mMギ酸アンモニウム (pH4.0) : アセトニトリル : メタノール : 水 10 : 60 : 20 : 10 (アイソクラディック)		
流速	0.2mL/min		
注入量	2µL		
イオン化モード	ESI(+)		
イオン源温度	120		
デソルベーション温度	350		
デソルベーションガス流量	1000L/hr (N ₂)		
コーンガス流量	50L/hr (N ₂)		
測定モード	MRM		
測定イオン (m/z)	Agm: 131.13 > 71.83 Him: 112.09 > 94.88 Put: 89.11 > 71.83 Tpm: 161.11 > 143.99 Orn: 133.10 > 69.81	Cad: 103.12 > 85.88 Phm: 122.10 > 104.90 Spd: 146.17 > 71.83 Tym: 138.09 > 120.94	

- 試料 2.0 g
 - + 20 %トリクロロ酢酸 2 mL
 - + 水 20 mL
- ホモジナイズ
 - + 水 10 mL
- 30分静置
- 遠心分離 3,000 rpm 10分
- ろ過(No.5Aろ紙)
- 水で50 mLに定容
- 移動相で適宜希釈
- 試料溶液(LC/MS/MS)

図2 試料溶液調製手順

なお、試験は全て3併行で実施した。

結果及び考察

1 保存期間とアミン類の消長

食品中のアミン類が時間の経過とともにどのように変動するか確認するため、細切した試料を25℃で48時間保存し、アミン類の経時変化を調査した。図3に25℃におけるアミン類9物質について含有量の経時変化を示す。

試料を6時間保存した場合、変化はみられなかったが、その後時間の経過とともに有意に変化した。多くのアミン類は増加傾向を示したが、Agm、Spd、Tpmにおいてはほとんど変化がみられなかった。48時間以内の増加量は、Himがいずれの魚種においても最大であり、1000～7000 µg/gまで増加し、24時間後には、重篤な食中毒を引き起こすとされている1000 µg/gを超過していた。

また、アミン類の変化量は魚種により異なり、多くのアミン類においてサバの変化量が最大であり、Ornについてはサバのみが増加傾向を示した。

これらのことから、今回調査したアミン類は全般的に6時間から24時間の間に急激に増加する傾向があり、特にHimの増加量が最も多いことから、アミン類による食中毒においてHimの寄与が最も大きいことが示唆された。

また、魚種により増加するアミン類の構成が異なっていた。

2 保存温度とアミン類の消長

アミン類の経時的な変動に対する保存温度の影響を明らかにするため、25℃に加えて、4℃及び35℃における48時間までの保存試験を行った。各温度条件におけるアミン類の経時変化を図4に示す。

4℃では、全ての魚種においてSpd、Ornを除くアミン類の増加は確認できなかった。

また、35℃ではアジ、サバ、ブリの全てのアミン類について、25℃と同様に6時間までは変化が見られず、その後変化していた。一方、サワラでは25℃よりもアミン類の増加が遅く、48時間後に確認できたが、その増加量は25℃の10分の1以下であった。

Himにおいては全ての魚種で25℃での増加量の方が大きく、Putでは35℃での増加量が大きかった。

一般に酵素活性は35℃付近で最大となるため、いずれのアミン類も25℃よりも35℃において増減が最大となると考えていたが、実際は魚種やアミンにより差がみられた。これは魚種により付着している細菌が異なり、それぞれの細菌の発育至適温度や酵素の種類により差が生じたものと考えられる²⁾。

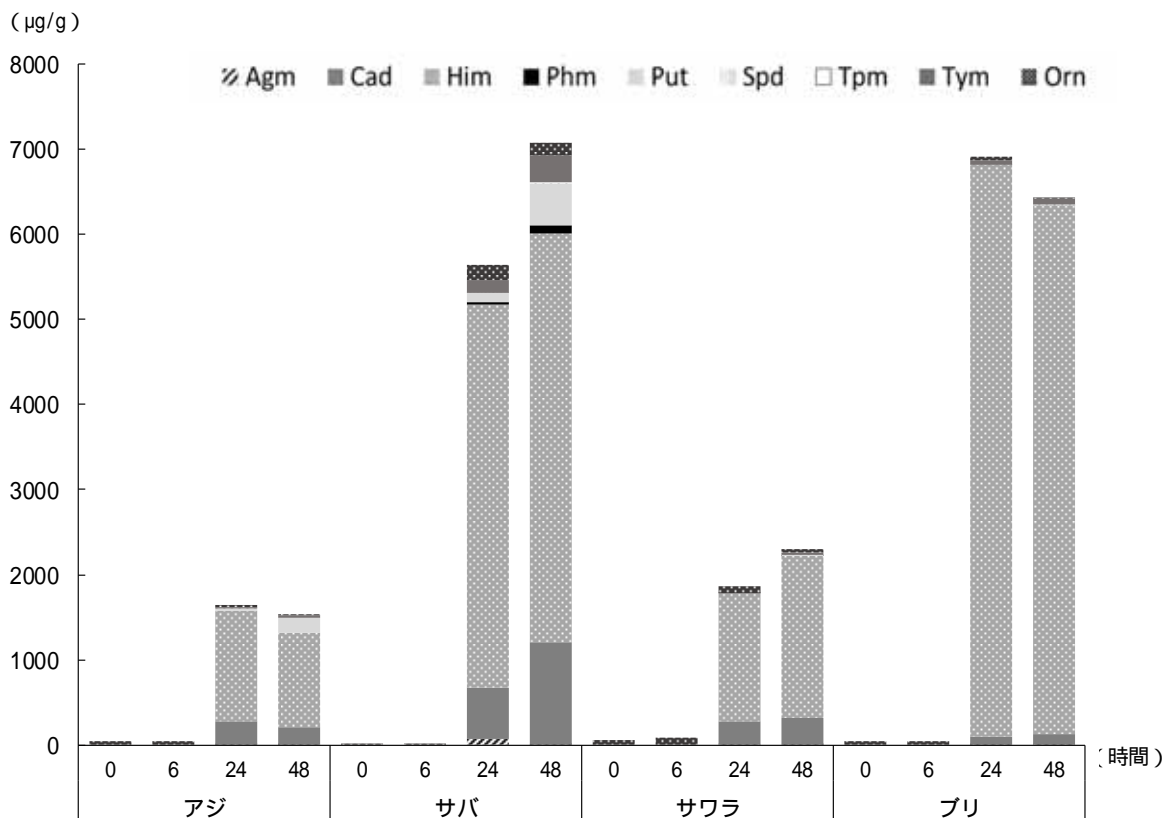


図3 アミン類の経時変化 (25℃)

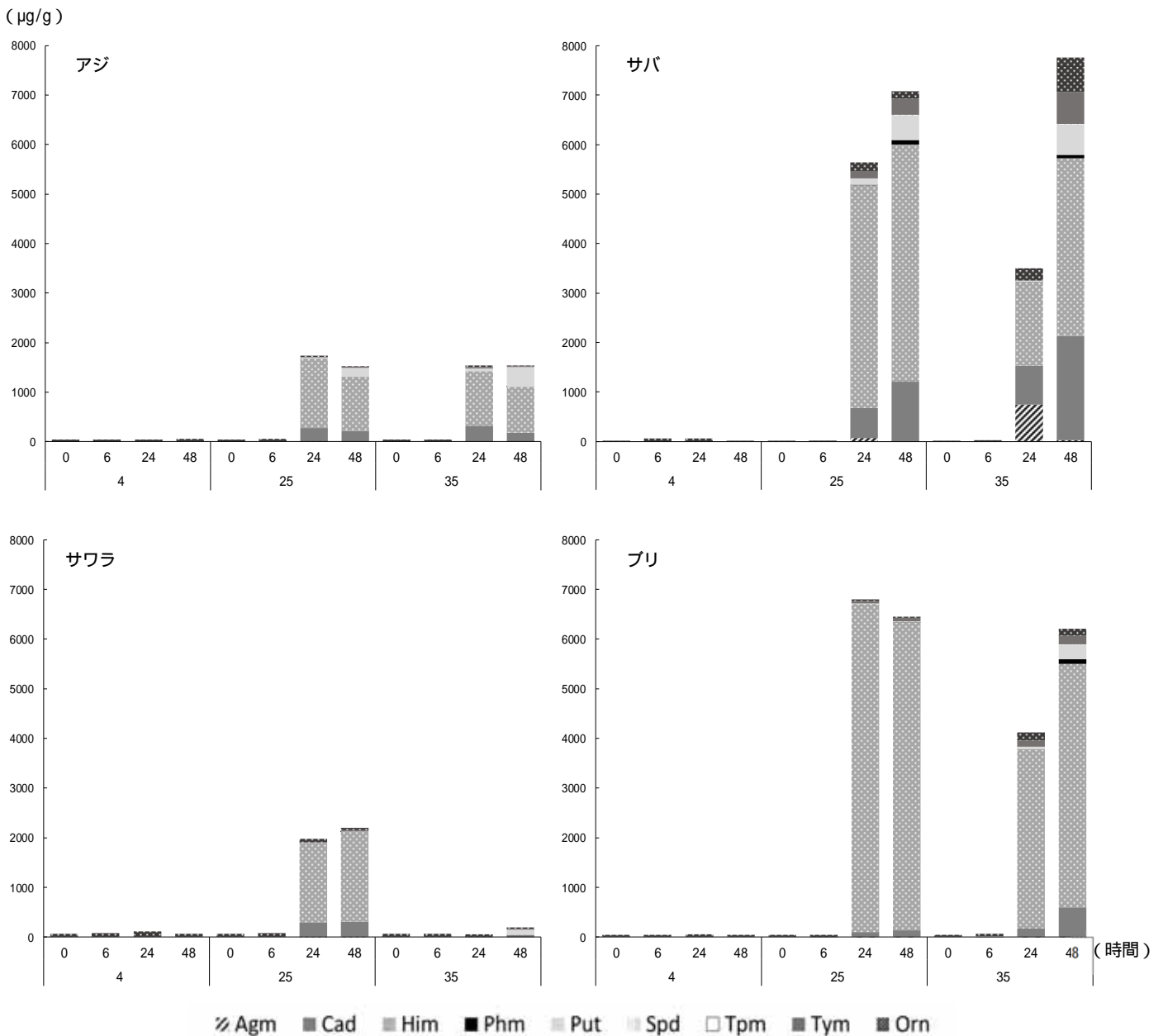


図4 各温度条件におけるアミン類の経時変化

3 低温長期保存でのアミン類の消長

前述2の試験において、4°Cでは48時間以内にアミン類の有意な変化は見られなかったが、長距離輸送等を想定し、冷蔵条件で長期保存した場合にアミン類の含有量がどのように変動するか調査した。表2に4°Cで14日間保存した場合のアミン類の含有量及びBAIを、図5に4°Cで14日間保存後の各試料のアミン類含有量を示す。

Spd, Ornを除くアミン類は魚種に関わらず2日(48時間)までは大きな変化はないが、それ以降には増加する傾向がみられた。25°Cと比較して、増加は全体的に抑制されており、特にHimは全ての魚種で25°C・48時間保存の0.6%以下と強い抑制傾向がみられた。しかし、サバ

におけるAgm, サワラ及びブリにおけるPut, サバ及びサワラにおけるSpdにおいては増加が促進されていた。

長期保存後の各試料を腐敗指標としてBAIを用いて評価すると、7日後のサバは159 µg/gとなり、初期の腐敗を示す50 µg/gを超過し、腐敗していた。また、14日後には全ての試料においてBAIは50 µg/g以上を示し、4°Cにおいても7日を超える長期間の保存では腐敗することが示された。

このことから、冷蔵条件ではアミン類の生成は抑制されるが、輸送など長期間冷蔵条件で保存する場合においては注意が必要であることがわかった。

表2 4 -で 14 日間保存した場合の各アミン類含有量

保存期間 (日)	含有量(μg/g)										BAI (Cad+Him+Put+Tym)
	Agm	Cad	Him	Phm	Put	Spd	Tpm	Tym	Orn		
アジ	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.7	N.D.	N.D.	43	0
	1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.6	N.D.	N.D.	39	0
	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.2	N.D.	N.D.	55	0
	7	2.9	5.0	N.D.	N.D.	12	2.4	N.D.	N.D.	28	17
	14	N.D.	190	6.5	N.D.	65	1.5	N.D.	3.7	2.5	266
サバ	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.7	N.D.	N.D.	4.3	0
	1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.8	N.D.	N.D.	54	0
	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.3	N.D.	N.D.	5.8	0
	7	67	130	N.D.	2.0	N.D.	5.9	N.D.	29	14	159
	14	160	220	3.8	20	N.D.	5.6	N.D.	140	42	364
サワラ	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.2	N.D.	N.D.	59	0
	1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.9	N.D.	N.D.	110	0
	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.5	N.D.	N.D.	60	0
	7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	26	6.4	N.D.	N.D.	28	26
	14	N.D.	16	2.7	N.D.	96	5.0	N.D.	3.9	8.7	119
ブリ	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.7	N.D.	N.D.	33	0
	1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.6	N.D.	N.D.	44	0
	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.4	N.D.	N.D.	32	0
	7	N.D.	4.9	1.3	N.D.	29	7.6	N.D.	4.7	2.4	40
	14	N.D.	26	28	N.D.	89	1.7	N.D.	33	2.2	176

N.D. : 定量下限値未満

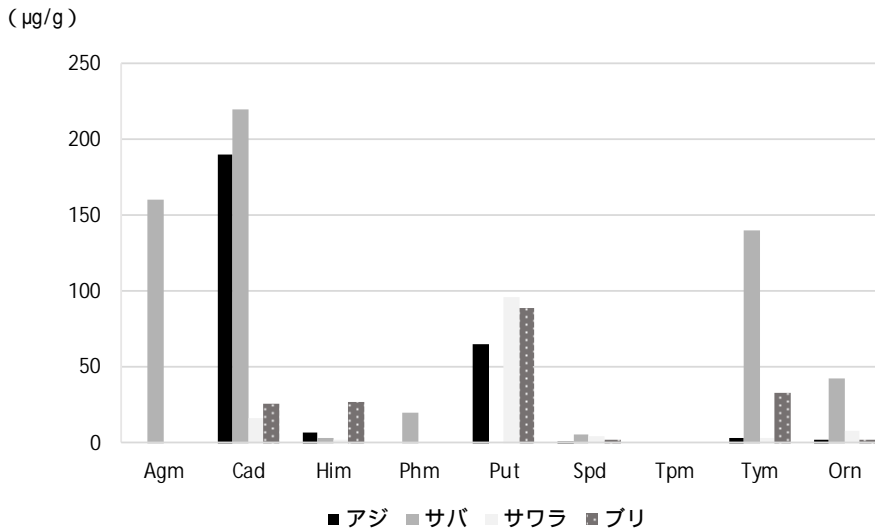


図5 4 保存 14 日後のアミン類含有量

4 調味試料におけるアミン類の消長

実際の食中毒では鮮魚よりも、調味したものが原因食品となることが多いため、4 及び 25 における調味によるアミン類の消長への影響を調査した。

表3 にアジ、サバの無調味試料及び調味試料を 25 及び 4 で 48 時間保存した場合におけるアミン類の含有量を示す。

アジ調味試料(照焼)を 25 で 48 時間保存すると、無調味の場合と比較して、Him 及び Put は増加が抑制され、Tpm を除く他のアミン類においては増加が促進されていた。Tpm については増加が確認できなかった。また、4 においては Agm 及び Put の産生が無調味試料と比較して促進されていた。調味液のアルコール、塩分、糖分

等が細菌や酵素に影響したものと考えられる。

一方、サバにおいては、無調味試料では 25・48 時間保存すると、全てのアミン類が検出され、Him が 4800 μg/g 検出されたが、サバ調味試料(酢締め)においては、いずれの温度条件でも Spd, Orn 以外は定量下限値未満となり、25 においては全てのアミン類の産生が有意に抑制されていた。

この結果は、酢絞めの調味料による影響に加えて、調理工程による影響が大きいと考えられる。酢締めは塩で脱水し、水洗いしたのちに酢漬けにする。この一連の工程により、アミン産生能をもつ細菌が試料表面から除去されたため、アミンの産生がみられなかったと考えられる。

表3 調味試料における48時間保存後のアミン類含有量

単位:($\mu\text{g/g}$)

	アジ				サバ			
	4°C		25°C		4°C		25°C	
	無調味	調味(照焼)	無調味	調味(照焼)	無調味	調味(酢締め)	無調味	調味(酢締め)
Agm	N.D.	2.0	2.0	240	N.D.	N.D.	4.0	N.D.
Cad	N.D.	N.D.	220	430	N.D.	N.D.	1200	N.D.
Him	N.D.	N.D.	1100	330	N.D.	N.D.	4800	N.D.
Phm	N.D.	N.D.	N.D.	2.0	N.D.	N.D.	93	N.D.
Put	N.D.	2.1	170	7.7	N.D.	N.D.	500	N.D.
Spd	3.2	3.0	N.D.	2.6	5.3	4.2	5.0	4.0
Tpm	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.7	N.D.
Tym	N.D.	N.D.	24	88	N.D.	N.D.	320	N.D.
Orn	55	67	3.5	87	5.8	9.9	150	16

まとめ

今回、食品中のアミン類の保存条件による消長について調査した。

アミン類はいずれの温度条件においても経時的な変化がみられた。4 では概ね増加が抑制されていたが、25 及び 35 においては全ての魚種において24時間までに Him が重篤な食中毒を引き起こす濃度である 1000 $\mu\text{g/g}$ を超過するなど、低温での温度管理が重要であることが改めて示された。

一方、4 においても7日後には BAI が腐敗に相当する 50 $\mu\text{g/g}$ 以上となるものもあった。本報には記載しないが、冷凍保存(-30)した試料では28日までアミン類の増加がみられないことを確認しており、長期間の保存や輸送が必要な場合には、冷蔵よりも冷凍することが望ましいという結果が得られた。

調味試料については、調味料や調理加工法による影響が大きく、また、アミン類によっても無調味の場合と比較して増減の傾向が異なっていた。いずれにしても、アミン類は経時的に増加するため、アミン類による食中毒を防止するためには適切な温度管理が必要である。

また、各試料のアミノ酸組成⁵⁾に大きな差がないにも関わらず、アミン類の増加量には試料により差があった。このため、食品中のアミン類の増加には、前駆体となるアミ

ノ酸の組成よりも食品に付着している細菌やその酵素による寄与が大きいと考えられる。

以上のことから、アミン類による食中毒防止のためには、アミン類の増加を防ぐ措置として、食品の保存温度管理が重要であり、併せて保存期間に留意すべきことが改めて確認できた。これをもとに、食品製造業者、消費者等に注意喚起することで、食の安全・安心に資することとした。

なお、本研究は愛媛県立衛生環境研究所特別研究調査事業により行われたものである。

参考文献

- 1) 登田美桜ほか: 国立医薬品食品衛生研究所報告 127, 31-38(2009)
- 2) EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): EFSA Journal , 9(10), 2393(2011)
- 3) Ljerka Prester: Food Additives and Contaminants , 28(11), 1547-1560(2011)
- 4) 宇川夕子ら: 愛媛県立衛生環境研究所年報 第20号 (2017), 6-9
- 5) 文部科学省: 日本食品標準成分表 2015年版(七訂) アミノ酸成分表編