

=原 著=

低温性ヒスタミン生成菌 *Morganella psychrotolerans* の 水産食品における分布とヒスタミン生成能

加藤 莉子^{*1}・王 迪^{*1}・山木 将悟^{*2}・川合 祐史^{*2}・山崎 浩司^{*2,†}

(^{*1}北海道大学大学院水産科学院, ^{*2}北海道大学大学院水産科学研究院)

(受付: 平成29年3月10日)

(受理: 平成29年4月28日)

Distribution on Fishery Products and Histamine Producing Ability of *Morganella psychrotolerans*, a Psychrotrophic Histamine-Producing Bacterium

Riko KATO, Di WANG, Shogo YAMAKI, Yuji KAWAI and Koji YAMAZAKI[†]

(Hokkaido University, 3-1-1 Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611; [†]Corresponding author)

Morganella psychrotolerans is a novel psychrotrophic histamine producing bacterium and seems to cause histamine fish poisoning (scombroid poisoning). However, there is little information about the occurrence and histamine producing ability of this bacterium for food contamination. To elucidate the contamination status of *M. psychrotolerans*, we used an MPN-PCR method that can determine bacterial number more sensitive than a traditional plating method. Many kinds of fish samples purchased in Hokkaido and water samples collected in Hakodate area were used in this study. Eighty-five MPN-PCR positive samples were found in total 192 samples (44.3%) and thirty-seven strains of *M. psychrotolerans* were isolated from the positive samples. It suggests *M. psychrotolerans* is widely distributed in retail seafood product in Japan. Then the amounts of histamine produced by *M. psychrotolerans* isolates were investigated. All isolates produced more than 4,000 mg/L (4,000 ppm) of histamine after 48 h incubation at 25°C. Next, the growth and histamine production of *M. psychrotolerans* (JCM 16473^T, strain Mps. 3 from a horse mackerel sample) and *Photobacterium phosphoreum* NBRC 103031^T was compared in the liquid media containing 0.1 or 2.0% NaCl at 4°C. At 0.1% NaCl, histamine concentration produced by *M. psychrotolerans* was higher than that by *P. phosphoreum*. It indicates *M. psychrotolerans* will also become one of the important bacteria associated with histamine-poisoning at refrigeration temperature on seafood, as well as *P. phosphoreum*.

Key words: *Morganella psychrotolerans*, histamine producing bacteria, histamine fish poisoning, MPN-PCR, *Photobacterium phosphoreum*

緒 言

ヒスタミン食中毒は、ヒスタミンが蓄積した食品の喫食により発生し、嘔吐、下痢、蕁麻疹などのアレルギー様症状を呈することからアレルギー様食中毒とも呼ばれる⁹⁾。ヒスタミンは、細菌の生成するヒスチジン脱炭酸酵素によって魚肉中の遊離ヒスチジンが脱炭酸され生成、蓄積する。日本においては、ヒスタミン食中毒は細菌性食中毒ではなく化学性食中毒に分類され、2015年

に日本で発生した化学性食中毒事例14件中13件がヒスタミンによるものであり、患者数は405人であった(厚生労働省 ヒスタミン食中毒について <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000130677.html>)。ヒスチジン脱炭酸酵素は凍結に安定¹²⁾であり、また食品中で生産されたヒスタミンは、加熱や凍結などの加工処理を行ってもほぼ分解することがないため、生鮮魚介類だけではなく、加工処理済みの水産食品を原因とした食中毒事例が後を絶たない。

ヒスタミン食中毒を引き起こす微生物はヒスタミン生成菌と呼ばれ、代表的なものに *Morganella morganii*,

[†]連絡先

☎041-8611 北海道函館市港町3-1-1

Photobacterium damsela, *P. phosphoreum*^{3, 11, 17} が挙げられる。一方、2006年に、Emborgらによって新種の *Morganella* 属細菌として *M. psychrotolerans* が登録された⁴⁾。本菌の特筆すべき性質は、4℃以下の低温でも増殖し、多量のヒスタミンを生成する^{4~6)} ことである。*M. psychrotolerans* によるヒスタミン食中毒の事例はいまだ報告されていないが、*M. psychrotolerans* の一般性状が *M. morganii* と極めて類似しているため、過去に *M. morganii* によるヒスタミン食中毒とされた事例のいくつかが *M. psychrotolerans* によるものであった可能性が推察される。また、*M. psychrotolerans* の分布に関する知見は乏しく、本菌を主対象としたリスク調査はこれまで行われていない。Toridoらが行ったヒスタミン生成菌の分布調査では、赤身魚を主体とした鮮魚143検体中の1検体（イワシ）で *M. psychrotolerans* が検出された¹⁸⁾。しかし、Toridoらはヒスタミン生成菌の検出および分離に使用した培地に海洋細菌である *Photobacterium* 属の細菌も効率良く検出するために50%人工海水を含む非選択培地を採用している。この場合、*Morganella* 属の細菌よりも *Photobacterium* 属の細菌などの海洋細菌が優先して発育すると考えられ、平板培地から分離できず見逃している可能性が推察される。そのため、ヒスタミン食中毒のリスクのある *M. psychrotolerans* の分布調査には、培養条件で *Morganella* 属の細菌をある程度選択できる条件で行わないと見逃してしまうと考えた。そこで本研究では、*M. psychrotolerans* の検出法として、

Morganella 属の細菌に適した培地を採用して最確数(MPN)法とPCR法を組み合わせたMPN-PCR法での分布調査を行った。また、分離した *M. psychrotolerans* のヒスタミン生成能を他のヒスタミン生成菌と比較し、低塩分条件における本菌の食中毒発生リスクの有無を検討したので、ここに報告する。

材料および方法

1. 供試検体および検体原液の調製

函館市、札幌市とその近隣都市（北斗市、江別市）で購入した食品185検体、道南地域で採取した河川水7検体、海水2検体の計194検体を供試した(Table 1)。供試検体を無菌的に10 gまたは10 ml量り取り、リン酸緩衝液(pH 7.2) 90 mlを加えストマッカーで混合したものを検体原液とした。

2. *M. psychrotolerans* のMPN-PCRによる検出と定量

検体中の *M. psychrotolerans* 検出および定量は、3管法のMPN法とPCR法を組み合わせたMPN-PCR法で行った。培地には、*Morganella* 属細菌の発育に適した組成である *Morganella* enrichment (MoE) medium（トリプトン(BD, New Jersey, USA) 10 g/L, 酵母エキス(BD) 5 g/L, リン酸二水素カリウム7 g/L, リン酸水素二カリウム7 g/L, L-ヒスチジン塩酸塩一水和物10 g/L, コリスチン硫酸塩32 mg/L; pH 6.5)¹⁶⁾ にプロモクレゾールパープルを0.003%となるように加えpHを調整し

Table 1. The number of MPN-PCR positive samples in different kinds of food or natural water (%)

Food or other sample	Tested sample number	MPN of <i>M. psychrotolerans</i> (N; MPN/100 g of sample)					Total positive sample number	
		ND	10 ¹ < N ≤ 10 ²	10 ² < N ≤ 10 ³	10 ³ < N ≤ 10 ⁴	10 ⁴ < N		
Lean fish	Horse mackerel	14	6 (42.9)	3 (21.4)	2 (14.3)	2 (14.3)	1 (7.1)	8 (57.1)
	Sardine	14	11 (78.6)	3 (21.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (21.4)
	Amberjack	13	7 (53.8)	3 (23.1)	3 (23.1)	0 (0)	0 (0)	6 (46.2)
	Mackerel	11	9 (81.8)	1 (9.1)	1 (9.1)	0 (0)	0 (0)	2 (22.2)
	Tuna	9	7 (77.8)	2 (22.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.2)
	Herring	4	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Saury	3	2 (66.7)	1 (33.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33.3)
	Other	3	2 (66.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33.3)	1 (33.3)
	Processed food	27	19 (70.4)	5 (18.5)	2 (7.4)	0 (0)	1 (3.7)	8 (29.6)
Lean fish total	98	67 (68.4)	18 (18.4)	8 (8.2)	2 (2.0)	3 (3.1)	31 (31.6)	
White fish	Flounder	21	8 (38.1)	9 (42.9)	3 (14.3)	1 (4.8)	0 (0)	13 (61.9)
	Rockfish	5	3 (60)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	2 (40.0)
	Codfish	4	2 (50)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (50.0)
	Other	22	7 (31.8)	7 (31.8)	5 (22.7)	1 (4.6)	2 (9.1)	15 (68.2)
	Processed food	4	1 (25)	1 (25)	1 (25)	0 (0)	1 (25)	3 (75.0)
White fish total	56	21 (37.5)	20 (35.7)	9 (16.1)	2 (3.6)	4 (7.1)	35 (62.5)	
Other seafood	Squid・Octopus	14	5 (35.7)	2 (14.3)	3 (21.4)	2 (14.3)	0 (0)	7 (50.0)
	Shell	7	4 (57.1)	1 (14.3)	1 (14.3)	1 (14.3)	0 (0)	3 (42.9)
	Prawn	8	6 (75)	0 (0)	2 (25)	0 (0)	0 (0)	2 (25.0)
Other seafood total	29	17 (58.6)	3 (10.3)	6 (20.7)	3 (10.3)	0 (0)	12 (41.4)	
River water	7	0 (0)	3 (42.9)	2 (28.6)	1 (14.3)	1 (14.3)	7 (100.0)	
Sea water	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Total	192	107 (55.7)	44 (22.9)	25 (13.0)	8 (4.2)	8 (4.2)	85 (44.3)	

ND: No detection.

たもの(改変MoE medium, pH 5.1)を使用した。検体原液10, 1, 0.1 mlを改変MoE medium10 ml(試料10 ml)を添加する場合には, 2倍濃度の改変MoE培地10 ml)に接種し, 12°Cで7日間培養した。pHの上昇により変色が見られた管より培養液1 mlを採取し, 集菌洗浄(10,000×g, 2分間)後, 菌体に400 µlのTritonX-100を加えて99°C, 10分間加熱して, 菌体からDNAを抽出し, これをTemplate DNAとして用いた。*M. psychrotolerans*の検出にはVI型分泌機構をコードするVasD遺伝子に特異的なプライマー対のVasD-F4(5'-AAA TCG CCA TCA CAC TCC TTG-3')およびVasD-R4(5'-TTC AAA ACG GGA GTC CTC ACT G-3')¹⁶⁾を用い, PCR反応液はEmerald Amp[®] Max PCR Master mix (TaKaRa, 滋賀) 12.5 µl, 5 pmol/µl VasD-F4 1 µl, 5 pmol/µl VasD-R4 1 µl, Template DNA 2 µl, 滅菌蒸留水8.5 µlを混合し調製した。PCR反応は95°C, 4分間の熱変性後, 30サイクル(95°C-30秒, 62°C-30秒, 72°C-30秒, 最終伸長のみ72°C, 4分間)でサーマルサイクラー(Gene Atlas G02; アステック, 福岡)により行った。PCR産物は, 1.5%アガロースゲル(アガロースS; ニッポンジーン, 東京)を用いて電気泳動した後, 臭化エチジウムで染色し, *M. psychrotolerans*に特異的な110 bpのバンドの有無を確認した。PCR法での陽性管数より, 食品または海水試料100 gまたは100 ml当たりのMPN値を算出した。

3. 食品からの*M. psychrotolerans*の分離および同定

実際の食品試料から*M. psychrotolerans*の分離株を得るため, 以下の方法で*M. psychrotolerans*の分離を試みた。MPN-PCR法で陽性となった試験管1本から培養液を取り出し, 適宜希釈後, その0.1 mlをNiven's agar(トリプトン(BD) 5 g/L, 酵母エキス(BD) 5 g/L, 炭酸カルシウム1 g/L, L-ヒスチジン塩酸塩一水和物25 g/L, 塩化ナトリウム5 g/L, プロモクレゾールパープル0.06 g/L, 寒天20 g/L)¹⁵⁾に塗抹し, 25°Cで48~72時間培養した。紫色のハローを形成した平板上のコロニーを2株採取し, コロニーPCR法により*M. psychrotolerans*であるかを確認した。PCRは前述の条件で行った。コロニーPCR法で*M. psychrotolerans*と判別したコロニーの1株を純粋分離後, グラム染色, オキシダーゼ試験, カタラーゼ試験, フェニルアラニンデアミナーゼ試験, 硝酸塩還元性試験, OF試験, D-ガラクトースからの酸産生性試験, ならびに2, 37°Cおよび8.5% NaClでの発育試験を行った。なお, これらの検査項目はこれまでに報告されている*M. psychrotolerans*の性状^{4,5)}および腸内細菌科²⁾, *Morganella*属¹⁰⁾の同定項目から決定した。グラム陰性, オキシダーゼ陰性, カタラーゼ陽性, フェニルアラニンデアミナーゼ陽性, 硝酸塩還元性, グルコース発酵性, D-ガラクトースからの酸非産生性, 2°C発育性, 37°Cおよび8.5%塩分非発育性を示す株を*M. psychrotolerans*と同定した。

4. *M. psychrotolerans*分離株のヒスタミン生成量測定

*M. psychrotolerans*分離株37株についてヒスタミン生成量を測定した。各分離株について1% L-ヒスチジン塩酸塩を添加したTryptic soy broth (BD) (TSBH, pH 6.0)で25°C, 18時間静置培養後, その菌液を濁度0.5 (OD₆₆₀)となるよう0.1%ペプトン加生理食塩水で適宜希釈し, これをさらに0.1%ペプトン加生理食塩水で100倍に希釈して菌液を得た。この希釈菌液0.1 mlをTSBH 9.9 mlに接種(終濃度約10³ CFU/ml)し, 25°Cで静置培養した。24または48時間培養後, 培養液中に産生されたヒスタミン量はチェックカラーヒスタミン(キッコーマン バイオケミファ, 東京)を用いて測定した。測定は付属のプロトコールに従い行った。比較対照区として, *M. psychrotolerans* JCM 16473^T(TSBHで25°C, 18時間), *M. morgani* subsp. *morgani* NBRC 3848^T(TSBHで30°C, 18時間)および*P. phosphoreum* NBRC 103031^T(2.0%NaCl改変TSBHで20°C, 24時間)の静置培養液を上述と同様の方法で希釈し, TSBHまたは2.0% NaCl改変TSBHに接種し, ヒスタミン産生量を測定した。なお, *M. psychrotolerans*は25°C, *M. morgani*は30°C, *P. phosphoreum*は20°Cで培養した。

5. 低温および低塩分濃度条件下における*M. psychrotolerans*と*P. phosphoreum*の増殖挙動およびヒスタミン生成量の比較

上述の実験方法4と同様の方法で作製した*M. psychrotolerans* JCM 16473^Tおよび分離株Mps. 3または*P. phosphoreum* NBRC 103031^Tの希釈培養菌液0.1 mlを0.1% NaClとした改変TSBH (pH 6.0) 9.9 mlに接種した(終濃度約10³ CFU/ml)。これを4°Cで静置培養し, 経日的に培養液を採取して生菌数およびヒスタミン量を測定した。また, 2.0%NaClとした改変TSBH (pH 6.0)においても同様の実験を行った。生菌数測定には表面塗抹法を使用し, *M. psychrotolerans*はTryptic soy agar (TSA; BD)を用いて25°C, 48時間培養後, *P. phosphoreum*は2%NaCl添加TSAを用いて20°C, 48時間後の生菌数を測定した。ヒスタミンの定量にはチェックカラーヒスタミンを用いた。

結 果

1. 食品における*M. psychrotolerans*汚染率

全供試192検体(うち食品183検体, 河川水7検体, 海水2検体)中, 85検体(食品78検体, 河川水7検体)でMPN-PCR後に少なくとも陽性管が1本以上確認され, 汚染率にすると44.3%と高い値を示した。食品検体だけの汚染率は42.6%であった。生菌数別に比較すると, 10¹~10² MPN/100 gの範囲にある検体数は44検体(22.9%), 10²~10³ MPN/100 gの範囲のものは25検体(13.0%), 10³~10⁴ MPN/100 gの範囲のものは8検体(4.2%), 10⁴ MPN/100 gを超えたものが8検体(4.2%)で

あった。検体種類別の陽性検体数（汚染率）は、赤身魚（加工品含む）が98検体中31検体（31.6%）、白身魚（加工品含む）が56検体中35検体（62.5%）、イカ・タコ、貝類、エビが29検体中12検体（41.4%）であった。河川水では7検体すべて（100%）で陽性となったが、海水2検体からはいずれも非検出であった（Table 1）。ヒスタミン食中毒の原因魚種となりやすい赤身魚に比べ、白身魚での汚染率は約2倍であった。特に、カレイの仲間では21検体中13検体（61.9%）で陽性となり、白身魚の中でも高い汚染率を示した。生菌数で比較すると、カサゴ目魚種のヤナギノマイ1検体（函館産）、その他魚種のイラコアナゴ1検体（釧路産）、その他白身魚のウミタナゴ1検体（函館産）、白身魚加工品のホッケすり身1検体（北海道産）では 10^4 MPN/100 gを超えていた。赤身魚では、米国食品医薬品庁（FDA）がヒスタミン食中毒のリスクを有すると定めた魚種であるマアジやブリで検出検体数が多く、アジ1検体（函館産）、その他赤身魚のサワラ1検体（岩手産）、赤身魚加工品の生干し身欠きニシン1検体（オランダ産、函館加工）で 10^4 MPN/100 gを超えていた。食品検体を購入地域別に比較すると、函館市およびその近郊で購入した140検体のうち陽性のものは60検体

（42.9%）、札幌市およびその近郊で購入した43検体のうち陽性のものは18検体（41.9%）であった（Table 2）。いずれの購入地域においても、生菌数が $10^2 \sim 10^3$ MPN/100 gの範囲の検体が全体の半数近くを占めた。また、検体の産地別に比較すると、陽性検体数は北海道産が141検体中67検体（47.5%）、東北産が10検体中3検体（30%）、関東産が7検体中4検体（57.1%）、四国産が2検体中1検体（50%）、九州産が10検体中4検体（40%）、その他地域産が12検体中6検体（50%）であった（Table 3）。北海道をさらに地域別に比較したところ、道北が4検体中2検体（50%）、道東が26検体中10検体（38.5%）、道央が11検体中1検体（9.1%）、道南が76検体中44検体（57.9%）、地域不明のものが24検体中10検体（41.7%）で陽性であった（Table 3）。陽性検体のうち、道東産1検体、道南産4検体、詳細地域が不明な北海道産1検体、東北産1検体、その他地域産1検体の生菌数は 10^4 MPN/100 gを超えていた。

2. *M. psychrotolerans*の分離、同定とヒスタミン生成量

実際の食品試料から以後の実験に使用する *M. psychrotolerans* の分離株を得るため、MPN-PCR法で陽性

Table 2. The number of MPN-PCR positive samples in different sampling points (%)

Sampling point (kind of samples)	Tested sample number	MPN of <i>M. psychrotolerans</i> (N; MPN/100 g of sample)					Total positive sample number
		ND	$10^1 < N \leq 10^2$	$10^2 < N \leq 10^3$	$10^3 < N \leq 10^4$	$10^4 < N$	
Hakodate (Food)	140	80 (57.1)	29 (20.7)	18 (12.9)	7 (5.0)	6 (4.3)	60 (42.9)
Hakodate (Water)	9	2 (22.2)	3 (33.3)	2 (22.2)	1 (11.1)	1 (11.1)	7 (77.8)
Sapporo	43	25 (58.1)	12 (27.9)	5 (11.6)	0 (0)	1 (2.3)	18 (41.9)
Total	192	107 (55.7)	44 (22.9)	25 (13.0)	8 (4.2)	8 (4.2)	85 (44.3)

ND: No detection.

Table 3. The number of MPN-PCR positive samples in different production area (%)

Region	Tested sample number	MPN of <i>M. psychrotolerans</i> (N; MPN/100 g of sample)					Total positive sample number
		ND	$10^1 < N \leq 10^2$	$10^2 < N \leq 10^3$	$10^3 < N \leq 10^4$	$10^4 < N$	
Hokkaido							
North	4	2 (50.0)	1 (25.0)	0 (0)	1 (25.0)	0 (0)	2 (50.0)
East	26	16 (61.5)	5 (19.2)	4 (15.4)	0 (0)	1 (3.8)	10 (38.5)
Central	11	10 (90.9)	1 (9.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (9.1)
South	76	32 (42.1)	22 (28.9)	13 (17.1)	5 (6.6)	4 (5.3)	44 (57.9)
Unknown	24	14 (58.3)	5 (20.8)	3 (12.5)	1 (4.2)	1 (4.2)	10 (41.7)
Hokkaido Total	141	74 (52.5)	34 (24.1)	20 (14.2)	7 (5.0)	6 (4.3)	67 (47.5)
Tohoku	10	7 (70)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	3 (30.0)
Kanto	7	3 (42.9)	3 (42.9)	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	4 (57.1)
Chubu	6	6 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Shikoku	2	1 (50)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (50.0)
Kyushu	10	6 (60)	2 (20)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	4 (40.0)
Okinawa	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Other	12	6 (50)	3 (25)	2 (16.7)	0 (0)	1 (8.3)	6 (50.0)
Unknown	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	192	107 (55.7)	44 (22.9)	25 (13.0)	8 (4.2)	8 (4.2)	85 (44.3)

ND: No detection.

(85検体)となった試験管1本から培養液を取り出し、Niven's agarで陽性となった2株/検体について、コロニーPCR法で*M. psychrotolerans*か否かを再び調べ、37検体から各1株ずつ合計37菌株のPCR陽性株を得た。さらに、これら37菌株の一般性状が*M. psychrotolerans*と一致するか調べたところ、すべての菌株の性状が*M. psychrotolerans*のものと一致した。そこで、これら分離37菌株を*M. psychrotolerans* Mps. 1~37株と名づけ、以後の実験に供試した。なお、これら菌株の分離源は北海道産の検体が多いが、魚種は赤身魚、白身魚、その他の水産物など多岐なものであった。次に、これらの分離株のヒスタミン生成量を測定したところ、すべての菌株でヒスタミンの生成が確認され、生成ヒスタミン量の平均値は24時間目で約3,800 mg/L (1,887~4,908 mg/L)、48時間目で約4,900 mg/L (4,212~5,697 mg/L)となった。なお、*M. psychrotolerans* JCM 16473^Tの生成ヒスタミン量は24時間目に3,100 mg/L、48時間目には5,500 mg/Lであった。一方、*M. morgani* NBRC 3848^T

および*P. phosphoreum* NBRC 103031^Tの生成ヒスタミン量は、それぞれ24時間目に5,800 mg/Lと1,300 mg/L、48時間目に6,700 mg/Lと3,400 mg/Lであった。

3. 低温、低塩分濃度条件下における*M. psychrotolerans*と*P. phosphoreum*の増殖挙動およびヒスタミン生成量

M. psychrotolerans JCM 16473^Tと分離した37株の中で24時間後のヒスタミン生成量の最も少なかったMps. 3株(分離源:カジカ, 道南産)、*P. phosphoreum* NBRC 103031^Tの0.1および2.0% NaCl加改変TSBH (pH 6.0)における低温環境下での生菌数変化と生成ヒスタミン量をFig. 1Aおよび1Bに示した。*M. psychrotolerans* JCM 16473^T株とMps. 3株はいずれの塩分濃度条件においても同様の増殖挙動を示した。すなわち、0.1%NaCl条件下では、両株とも培養6日目で約7.0 log CFU/ml、8日目に約8.2 log CFU/mlに達し、12日目には約9.0 log CFU/mlとなった(Fig. 1A)。2.0%NaCl条件下では、培養6日目で約6.5 log CFU/ml、8日目で約7.8 log CFU/mlとな

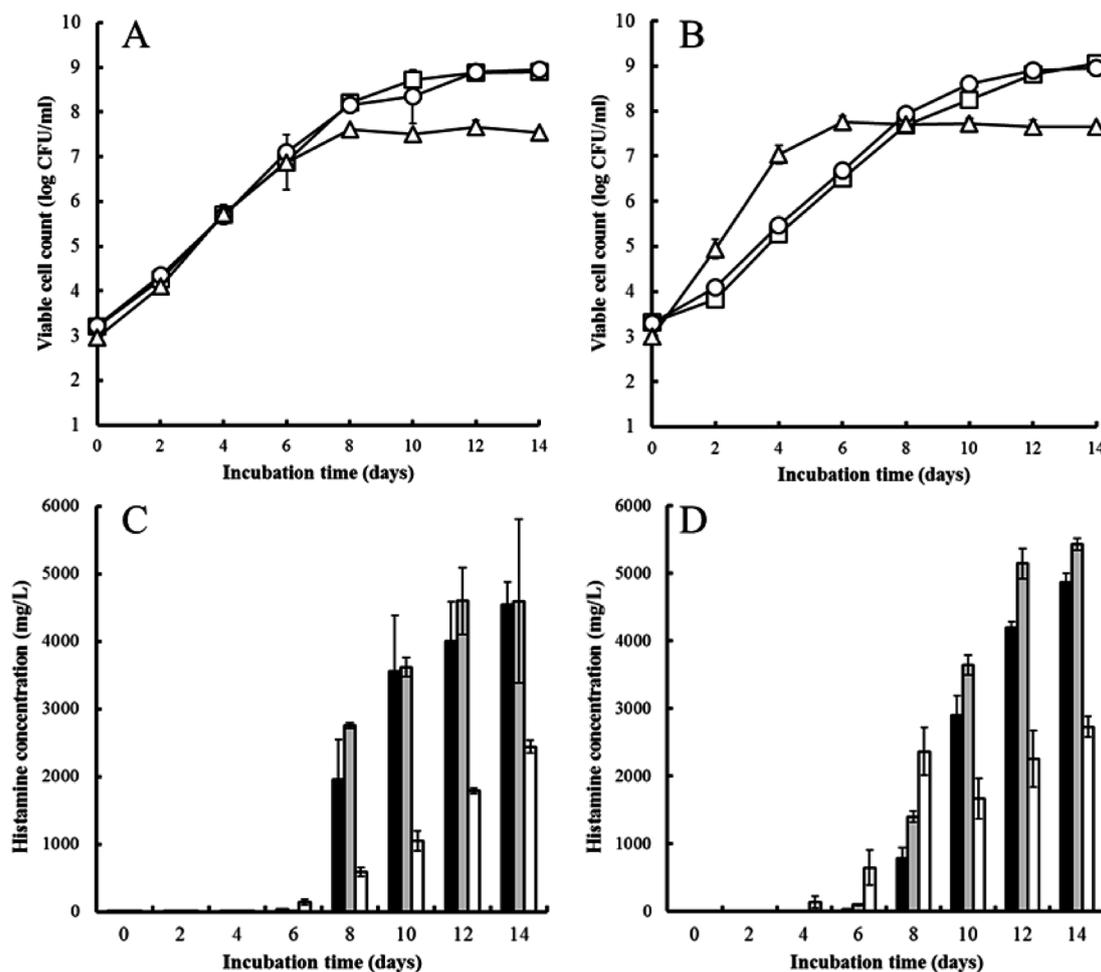


Fig. 1. Growth and histamine production of *M. psychrotolerans* JCM 16473^T, isolated strain Mps. 3 and *P. phosphoreum* NBRC 103031^T in modified TSBH supplemented with 0.1% NaCl (A, C) or 2% NaCl (B, D) (pH 6.0) at 4°C for 14 days. In A and B, squares, circles and triangles represent viable cell counts of *M. psychrotolerans* JCM 16473^T, Mps. 3, *P. phosphoreum* NBRC103031^T, respectively. In C and D, black, gray and white columns represent histamine concentration of *M. psychrotolerans* JCM 16473^T, Mps. 3, *P. phosphoreum* NBRC103031^T, respectively.

り、0.1%NaClの場合と比べやや生菌数の増加が遅かったが、12日目には約9 log CFU/mlに達した。また、Mps. 3株の生菌数は、培養10日目までJCM 16473^T株の生菌数よりも僅かに多く推移したが、培養12日目以降はJCM 16473^T株の生菌数とほとんど差がなくなった (Fig. 1B)。一方、*P. phosphoreum*は、0.1%NaCl条件下において培養6日目まで*M. psychrotolerans* 2株と同様の増殖挙動を示したが、培養8日目に約7.6 CFU/mlに達し、それ以降はほぼ一定の生菌数となった (Fig. 1A)。*P. phosphoreum*の至適発育条件である2.0%NaCl条件下では生菌数が培養4日目で約7.0 log CFU/ml、6日目には約7.7 log CFU/mlに達し、0.1%NaCl条件下の場合よりも増殖速度は速かったが、6日目以降の生菌数はほぼ一定となった (Fig. 1B)。

0.1%NaCl条件下では、JCM 16473^T、Mps. 3株ともに培養8日目に生菌数がおよそ8 log CFU/mlに達し、ヒスタミン量が著しく増加して、JCM 16473^T株では約2,000 mg/L、Mps. 3株では約2,800 mg/Lに達した。さらに、14日目には約4,500 mg/Lまで上昇した。一方、*P. phosphoreum*では培養6日目で約150 mg/L、8日目で約600 mg/Lとなり、14日目に2,000 mg/Lを超えたが、*M. psychrotolerans* 2株におけるヒスタミン生成量よりは少ないものであった (Fig. 1C)。2.0%NaCl条件下においても*M. psychrotolerans* JCM 16473^TおよびMps. 3両株ともに培養8日目からヒスタミンの増加が見られるようになったが、JCM 16473^T株では約800 mg/L、Mps. 3株では約1,400 mg/Lとなり、0.1%NaCl条件の場合よりも生成量は少なかった。しかし、14日目にはJCM 16473^T株で約4,900 mg/L、Mps. 3株で5,400 mg/Lに達した。一方、*P. phosphoreum*は4日目で約100 mg/Lに達し、6日目には約650 mg/L、8日目には2,000 mg/Lを超えた。0.1%NaClの場合とは異なり、2.0%NaClにおいては*P. phosphoreum*のほうが早期に食中毒を引き起こすヒスタミン量に達した (Fig. 1D)。

考 察

本研究では*M. psychrotolerans*を特異的に検出するMPN法とPCR法を組み合わせた方法を採用した。特に*M. psychrotolerans*の特異検出に重要なPCR法は、水産食品から*M. psychrotolerans*の検出で特異性が確認されているPodeurらの開発したリアルタイムPCR法¹⁶⁾に基づいて行った。筆者らも、本方法のPCRの特異性を再確認するため、予備実験として実験方法3に記載した方法でMPN-PCR法での陽性管からNiven's agar上で陽性集落を形成したコロニーに対してコロニーPCRを行い、陽性となった菌株を無作為に3株選抜し、それらの16S rRNA塩基配列を決定し、近縁種 (*M. morgani*, *Providencia* 属および*Proteus*属) との系統解析 (NJ法) を行った。解析に使用した菌株の16S rDNA塩基配列は、*M. psychrotolerans*ではU2/3株 (Accession No.

DQ358135), U2/5株 (DQ358137), JB-T16株 (DQ358134), U2/6株 (DQ358138), JB-T12株 (DQ358133), FD24株 (DQ358141), JB-T11 (DQ358132), F39-3株 (DQ358128), F39-1株 (DQ358127) および1F10株 (DQ358142), *M. morgani*ではLMG7874株 (DQ358131), U6/1 (DQ358140), NCIMB865株 (DQ358145), 03A11株 (DQ358129) および03B10株 (DQ358130), *M. morgani* subsp. *sibonii* DSM1450^T株 (DQ358146), *P. alcalifaciens* PAOGL172株 (AY994312), *P. heimbachae* DSM3591 (AM040490), *P. rettgeri* DSM4542T (AM40492), *P. stuartii* (AM40491), *P. penneri* ENT299株 (AJ634474), *P. vulgaris* Knp3株 (DQ205432) とした。その結果、解析した3菌株はいずれも*M. psychrotolerans*のクラスター内に入ったことから、本試験法が特異的に*M. psychrotolerans*を検出できると判断した。また、PCR法における検出感度についてもPodeurらは報告しており10⁴ CFU/mlの細胞が必要としている。そのため、*M. psychrotolerans*の発育挙動試験の結果から増菌培養条件としてMoE培地で10°C、72時間を設定し、増菌培養した汚染試料での検出感度は50 CFU/ml未満と報告している。一方、本研究におけるMPN-PCR法における培養条件は、損傷菌の存在も考えられるため12°C、7日間とした。したがって、本研究におけるPCR法における検出感度はPodeurらと同等以上と考えられる。

本研究で得られた食品検体の*M. psychrotolerans*汚染率は42.6%であり、Toridoらが過去に報告した魚介類検体における*M. psychrotolerans*検出検体数 (143検体中1検体) から求めた汚染率 (0.7%) と比較して60倍以上であった¹⁸⁾。これは、Toridoらが実験に使用した培地 (50%人工海水含有培地) が*Photobacterium*属の増殖に適した培地であったため、増菌培養時に*M. psychrotolerans*の発育よりも*Photobacterium*属の細菌が優先して増殖したのではないかと考えられる。また、Toridoらの方法では、Niven's Agar表面に検体の培養菌液を塗抹後、明瞭な紫色のハローを形成したコロニーを5~10個採取し、ペーパークロマトグラフィー法にてヒスタミン生成菌と同定したものをPCR法に供し、増幅産物の配列解析から菌種同定を行っている。したがって、コロニーとして分離するためには増菌培養液の菌叢に占める*M. psychrotolerans*の割合が多くないと平板培地上から分離できない。一方、本研究では検体の培養菌液から直接DNAを抽出し、PCRに供して*M. psychrotolerans*の有無を調べているため、Toridoらの報告よりも*M. psychrotolerans*をより高感度に検出したものと考えられる。実際に、本研究において、*M. psychrotolerans*の陽性検体から分離菌株の取得を試みたが、分離できたのは85陽性検体のうち37検体からのみであった。これは、Table 1にあるように、陽性検体の約半数で*M. psychrotolerans*の菌数が極めて少ない (10¹~10² MPN/100 g) ため、増菌培養後における*M. psychrotolerans*の菌数が

夾雑菌に比べて少ないことによって、平板培地上でコロニーとして出現していないか、または平板培地からの釣菌時に見逃している可能性が推察できる。したがって、特定の細菌のみを検出する場合には、増菌培養後に平板培地上の一部の菌株を釣菌して検査するよりも、増菌培養液から直接PCR法によって対象菌種の存在を確認したほうが感度良く検出できると考えられる。なお、本研究での*M. psychrotolerans*の検出率は、一般的な生菌数測定で使用する混積平板法で直接検査したとすると、混積平板法での検出限界は理論的に 10^3 CFU/100 gである。したがって、今回MPN-PCRで陽性となった検体から 10^3 MPN/100 g以上の汚染が見られたものは192検体中16検体となり、*M. psychrotolerans*の汚染率は8.3%となる。

MPN-PCR陽性検体を魚種別に比較すると、白身魚からの*M. psychrotolerans*の検出率が赤身魚からよりも高かった(Table 1)。また、白身魚で生菌数が 10^4 MPN/100 gを超えたものは4検体あり、赤身魚の3検体より多かった。白身魚自体はヒスチジン含量が少ないため、ヒスタミン食中毒の原因食品にはなりにくいとされている⁸⁾。しかし、魚体および魚肉加工工場の*M. morgani*の汚染調査では、*M. morgani*が魚体だけではなく加工工場からも同様に分離されている¹³⁾ことから、加工や流通の場において*M. psychrotolerans*汚染のある白身魚から赤身魚への交差汚染が起り、ヒスタミン食中毒の発生につながる可能性も十分に考えられる。そのため、本研究で初めて明らかになった白身魚における*M. psychrotolerans*汚染は看過できない事象といえる。

函館市近郊の河川水からも*M. psychrotolerans*が検出された。また、道南地域(42.9%)と道央地域(41.9%)で購入した食品検体は、その産地が異なるにもかかわらず、*M. psychrotolerans*の汚染率は同程度であった。したがって、*M. psychrotolerans*は環境中にも広く分布しているものと推察される。

本研究では、極めて近縁な*M. morgani*と*M. psychrotolerans*を区別するために特異性の高いプライマーを用いたPCR法と種々の一般性状、すなわちグラム染色、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験、フェニルアラニンデアミナーゼ試験、硝酸塩還元性試験、OF試験、D-ガラクトースからの酸生成性試験、ならびに2, 37°Cおよび8.5% NaClでの発育試験により*M. psychrotolerans*を同定した。一方、ヒスタミン食中毒の原因菌は、API 20E (シスメックス ビオメリユー、東京)やAPI 32E (シスメックス ビオメリユー)、BBLクリスタル(BD)などの簡易同定キットを用いて簡易同定される場合も多い^{1,14)}。しかし、これらのキットでは*M. psychrotolerans*が検査対象菌に含まれておらず、*M. morgani*に適した37°C培養で試験したときには*M. psychrotolerans*は発育できない。また、*M. psychrotolerans*が発育可能な温度帯で同定試験を行ったとしても、これらのキット

での性状検査では*M. morgani*と同定されてしまう可能性が高い。したがって、従来ヒスタミン食中毒の原因菌として*M. morgani*が特定された事例において誤同定されている可能性も推察される。

本研究で食品から分離した*M. psychrotolerans*分離株はすべてTSBH中で25°C、48時間培養後に4,000 mg/Lを超えるヒスタミンを生成した。強力なヒスタミン生成菌として知られる*M. morgani*は30°C、24時間の培養で5,000 mg/Lを超える高濃度のヒスタミンを生成するため、*M. psychrotolerans*のヒスタミン生成能は*M. morgani*よりもやや弱いと考えられる。Kankiらは、*P. phosphoreum*に関する論文の中で、20°Cにおける*P. phosphoreum*のヒスタミン量を、24時間目で約1,000 mg/L、48時間目で約3,000 mg/Lと報告している¹¹⁾。本研究の実験系においても、*P. phosphoreum* NBRC 103031^Tのヒスタミン生成量はこれと同程度であったことから、*M. psychrotolerans*のヒスタミン生成能は中温では*M. morgani*ほど強くはないが、*P. phosphoreum*と同等以上であった。

*M. psychrotolerans*と同じ低温増殖性のヒスタミン生成菌である*P. phosphoreum*は、塩分要求性の海洋細菌である¹¹⁾。そこで、塩分濃度を生マグロ魚肉に近い0.1%と*P. phosphoreum*の至適発育条件である2.0%にした培地での*M. psychrotolerans*と*P. phosphoreum*の増殖挙動およびヒスタミン生成量を比較したところ、*M. psychrotolerans*は低塩分環境で*P. phosphoreum*と同程度の速度で発育し、ヒスタミン生成量は*M. psychrotolerans*のほうが多くなった。したがって、塩分濃度の低い食品において*M. psychrotolerans*はヒスタミン蓄積への関与の大きい細菌であると考えられる。また、Codex委員会が定めるヒスタミン蓄積量の衛生および取扱の基準値は200 mg/kgである⁷⁾。*M. psychrotolerans*が生成するヒスタミン量は4,000 mg/L以上となったことから、*M. morgani*や*P. phosphoreum*と同様に*M. psychrotolerans*のヒスタミン生成能は極めて高く、ヒスタミン食中毒の重要なリスク要因となる微生物と考えるのが妥当といえる。

以上の結果から、低温性ヒスタミン生成菌*M. psychrotolerans*はさまざまな魚種を汚染しており、場合によっては比較的高濃度で食品を汚染している場合もある。また、低温下において*P. phosphoreum*と同程度で発育し高濃度のヒスタミンを生成することから、鮮魚およびその加工品におけるヒスタミン食中毒のリスク要因になる可能性が高いと考えられる。

要 約

低温性ヒスタミン生成菌*M. psychrotolerans*はヒスタミン食中毒の原因菌となりうるものの、食品の汚染状況といったリスク評価に必要な調査がほとんど行われていない。そこで、函館、札幌地域で購入した食品および函館近郊で採取した海水、河川水を検体とし、従来法に比

べより感度の高い検出が可能なMPN-PCR法を用いた *M. psychrotolerans* の汚染度調査を行った。その結果、192検体中85検体でMPN-PCR陽性となり、購入地域、産地、魚種によらず、広範囲にわたる汚染が生じていることが示唆された。汚染検体から37株の *M. psychrotolerans* を分離し、ヒスタミン生成量を調べたところ、25℃で48時間後にはいずれの株も4,000 mg/L以上の高濃度のヒスタミンを生成した。さらに、*M. psychrotolerans* JCM 16473^T および分離株Mps. 3について、*P. phosphoreum* を比較対象として異なる塩分濃度 (0.1および2.0%NaCl) の培地での増殖挙動とヒスタミン生成量を調べたところ、低温(4℃)における0.1%NaClでは *P. phosphoreum* よりも *M. psychrotolerans* の増殖能は高く、またヒスタミン生成能も高いことが判明した。さらに、2%NaCl条件でも *M. psychrotolerans* は高濃度のヒスタミンを生成した。以上の結果から、生鮮魚介類において *M. psychrotolerans* はヒスタミン食中毒のリスク要因となる可能性のあることが明らかとなった。

謝 辞

本研究は、2016年度公益社団法人下財団「低温耐性菌による危害除去法の研究等」の研究助成金によって実施されました。

文 献

- 1) 新井輝義, 池内容子, 岸本泰子, 石崎直人, 柴田幹良ら: 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, 東京都健康安全研究センター研究年報, **58**, 245-250 (2007).
- 2) Brenner, D. J. and Farmer, J. J.: Family I. Enterobacteriaceae. Bergey's manual of systematic bacteriology, second edition, **2**, 587-606 (2005).
- 3) Bermejo, A., Mondaca, M. A., Roeckel, M. and Marti, M. C.: Growth and characterization of the histamine-forming bacteria of jack mackerel (*Trachurus symmetricus*). J. Food Process Pres., **26**, 401-414 (2003).
- 4) Emborg, J., Dalgaard, P. and Ahrens, P.: *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **56**, 2437-2479 (2006).
- 5) Emborg, J.: *Morganella psychrotolerans*—Identification, histamine formation and importance for histamine fish poisoning. Ph.D. thesis. Technical University of Denmark, Lyngby (2007).
- 6) Emborg, J. and Dalgaard, P.: Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans*—development and evaluation of predictive models. Int. J. Food Microbiol., **128**, 234-243 (2008).
- 7) FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization], Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fisheries Products. Meeting report, Italy, FAO and WHO, 2013, 126 p. (ISBN 978-92-5-107849-5).
- 8) 藤井建夫: アレルギー様食中毒の現状と対策 (特集 海洋生物から来る食品危害要因), 月刊フードケミカル, **25**(10), p. 71-78, 食品科学新聞社, 東京 (2009).
- 9) Hummerfold, J. M.: Scombroid poisoning: A review. Toxicol., **56**, 231-243 (2010).
- 10) Janda, J. M. and Abbott, S. L.: Genus XXI *Morganella*. Bergey's manual of systematic bacteriology, second edition, Vol. 2. Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. and Garrity, G. M., p. 707-709, Springer Science + Business Media, Inc., New York (2005).
- 11) Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M. and Tsukamoto T.: *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. Int. J. Food Microbiol., **92**, 79-87 (2004).
- 12) Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T. and Baba, E.: Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine tuna and dried saury. Appl. Environ. Microbiol., **73**, 1467-1473 (2007).
- 13) Kim, S.-H., An, H., Wei, C.-I., Visessanguan, W., benjakul, S., Morrissey, M. T., Su, Y.-C. and Pitta, T. P.: Molecular detection of a histamine former, *Morganella morganii*, in albacore, mackerel, sardine and a processing plant. J. Food Sci., **68**, 453-457 (2003).
- 14) 宮崎麻由, 平本郁香, 山口友美, 有田富和, 加藤浩之, 那須 務, 渡邊 節, 沖村容子, 御代田恭子: 生食用鮮魚介類等におけるヒスタミン生成菌に関する調査. 宮城県保健環境センター年報, **28** (2010).
- 15) Niven, C. F. Jr., Jeffrey, M. B. and Corlett, D. A. Jr.: Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 321 (1981).
- 16) Podeur, G., Dalgaard, P., Leroi, F., Prevost, H., Emborg, J., Martinussen, J., Hansen, L. H. and Pilet, M. F.: Development of a real-time PCR method coupled with a selective pre-enrichment step for quantification of *Morganella morganii* and *Morganella psychrotolerans* in fish product. Int. J. Food Microbiol., **203**, 55-62 (2015).
- 17) Rodtong, S., Nawong, S. and Yongsawtdigul, J.: Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Microbiol., **22**, 475-482 (2005).
- 18) Torido, Y., Oshima, C., Takahashi, H., Miya, S., Iwakawa, A., Kuda, T., Kimura, B.: Distribution of psychrophilic and mesophilic histamine-producing bacteria in retailed fish in Japan. Food Cont., **46**, 338-342 (2014).