

博士學位論文

内容の要旨

及び

審査の結果の要旨

第 14 集

平成 29 年度
(2017 年度)

実践女子大学

は し が き

本篇は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、平成30年3月5日日本学において学位を授与した者の、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を収録したものである。

学位記番号に付した甲は、学位規則第4条第1項（いわゆる課程博士）によるものであることを示す。

目 次

課程の修了によるもの（課程博士）

甲第8号 博士(食物栄養学) 半 田 彩 実 5

漬物中における不揮発性アミン類含有量とそれらの含有に関わる要因

課程の修了によるもの
(課程博士)

氏名（本籍）	はんだ あやみ 半田 彩実（新潟県）
学位の種類	博士（食物栄養学）
学位記番号	甲第8号
学位所授与年月日	平成30年3月5日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項 該当
論文題目	漬物中における不揮発性アミン類含有量とそれらの含有に関する要因
論文審査委員	主査 教授 井部 明広 副査 教授 秋田 修 副査 安田 和男（一般財団法人 東京顕微鏡院 食と環境の科学センター学術顧問）

内容の要旨

序論

アレルギー様食中毒の原因物質であるヒスタミン (Him) は、魚介類やそれらの水産加工品が主な原因食品であるが^{1),2)}、その他にもチーズをはじめ、醤油や味噌などの発酵食品中にも含有し、これらの発酵食品では、Himのみならずチラミン (Tym) などの不揮発性アミン類 (以下、アミン類) も比較的多く含有することが知られている³⁾⁻⁸⁾。これら発酵食品中のアミン類は、製造過程中に、ヒスチジン (His) およびチロシン (Tyr) 脱炭酸酵素を持った微生物によって生成され、発酵食品中に含まれている。発酵食品のうち、漬物も一部発酵により製造されているが、野菜の漬物に関してのアミン類の報告^{9),10)}は少なく、国産の漬物についての報告はほとんど見られない。健全な食生活を過ごす上で、漬物中のアミン類について調査し、その結果を把握することは必要であると考ええる。

また、食品中に含まれるアミン類の分析法には、ダンシル誘導体化法などがある。この分析法は、操作が煩雑であるとの指摘が多いが、その一方で、良好な選択性と再現性が確保されているとの報告もある^{11),12)}。アミン類の含有量調査を行う上で、ダンシル誘導体化の簡便な分析法を確立することができれば、迅速にアミン類の含有量調査ができると考えられ、アミン類の含有量調査を行う上で分析法の検討は必要であると考ええる。

以上の点から、本研究では、まず、迅速に漬物中の含有量調査が行えるよう、食品中のアミン類の分析法について検討した。そして、その分析法を用い、漬物中のアミン類含有量調査を行うと共に、漬物の原材料である主な食品中のアミン類含有量もあわせて調査し、各種の漬物に含有されるアミン類の由来について明らかにした。さらに、それらの漬物中から Him および Tym の生成に関わる微生物の探索を行い、漬物中に含まれるアミン類の含有に関わる要因について明らかにすることを試みた。

第1章 ダンシル誘導体化によるアミン類の分析法

食品中のアミン類含有量調査を迅速に行えるよう、最も広く使用されている HPLC によるダンシル誘導体化法を検討した。アミン類の相互作用による影響も考え、Him, Tymをはじめ、プトレシン (Put)、カダベリン (Cad) およびスペルミジン (Spd) を含めた一斉分析法を検討した。

実験方法

1. 試料

東京都内で購入した鮮魚 2 検体 (カツオ 1 検体、マグロ 1 検体)、アジの開干し、カツオ節、赤ワイン、プロセスチーズ、塩漬 (白菜)、濃口醤油、米味噌を使用した。

2. 試薬など

固相抽出カラム：ジーエルサイエンス(株)製 InertSep MC-1 強カチオン交換カラム (250 mg/6 mL).

内標準溶液：1, 8-ジアミノオクタン (和光純薬工業(株), 和光一級).

ダンシルクロリド：和光純薬工業(株)製, 生化学用.

3. HPLC 条件

HPLC システム：(株)日本分光製 LC-2000Plus series, 分析カラム：Inertsil ODS-4 (3 μm , 2.1 ϕ \times 150 mm), カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$, 流量：0.3 mL/min, 注入量：10 μL , 移動相：アセトニトリル・水=60：40, 測定波長：励起波長 325 nm, 蛍光波長 525 nm

4. 試験溶液の調製

(1) 試料溶液の調製

魚介類および加工品などの食塩濃度 10 %以下の試料は細切して 5 g を採取し, 20 %トリクロロ酢酸 5 mL を加えた後, 水で 100 mL に定容した. 食塩濃度が 10 %を超える濃口醤油と米味噌は 5 g を量り採り, 20 %トリクロロ酢酸 10 mL を加えた後, 水で 200 mL に定容した. 定容後はよく混和して 30 分間静置し, ろ紙でろ過をして試料溶液とした.

(2) 精製

(1) の操作で得られた試料溶液 3 mL を固相抽出カラムに負荷し, 水 5 mL で洗浄後, 1 mol/L 炭酸カリウム溶液 5 mL で溶出した.

(3) ダンシル誘導体化

(2) の溶出液に, 内標準溶液 1 mL, 次いで 2 %ダンシルクロリド・アセトン溶液 1 mL を加えてよく混和した後, 遮光下, 室温で 10~24 時間放置した.

反応後, トルエン 5 mL を加えて振とうし, トルエン層を分取した. トルエン層は減圧下で留去し, 残留物にアセトニトリル 1 mL を加えて溶解し, 共栓付試験管に移した後, 5 %プロリン・1 mol/L 炭酸カリウム溶液 1 mL を加えて振とうした. 振とう後, 分離したアセトニトリル層 (上層) を 0.45 μm のフィルターでろ過し, HPLC 用の試験溶液とした.

5. 添加回収試験

魚介類および加工品などの食品は, 食品 5 g 中に各アミン標準溶液をアミンとして 10 $\mu\text{g/g}$ および 50 $\mu\text{g/g}$, 濃口醤油と米味噌については, 50 $\mu\text{g/g}$ および 100 $\mu\text{g/g}$ となるように添加し, 回収率を求めた.

結果および考察

1. InertSep MC-1 カラムによる精製

(1) 試料溶液負荷量の検討

固相抽出カラムには, 強カチオン交換カラムである InertSep MC-1 を用いることとし, 検討を行った. 多くの食品には塩分が含まれていることも考慮し, 1 %トリクロロ酢酸に

より作製した各アミン標準溶液 (10 $\mu\text{g/mL}$) を, 食塩濃度が 0.5 % となるよう調製して検討した. その結果, 3 mL の負荷までであればカラムに 5 種のアミン類を吸着できることが分かった. このことから, 本法では, 試料溶液 3 mL を固相抽出カラムに負荷することとした.

(2) 溶出液の検討

InertSep MC-1 カラムからの溶出には, 少ない溶出量と確実に 5 種のアミン類を溶出することを考え, 1 mol/L 炭酸カリウム溶液で検討を行った. 検討した結果, 図 1 に示したように, 1 mol/L 炭酸カリウム溶液を 4 mL 通液することで 5 種のアミン類をほぼ 100 % 溶出できた. 本法では, 溶出を確実にするため 5 mL で溶出することとした.

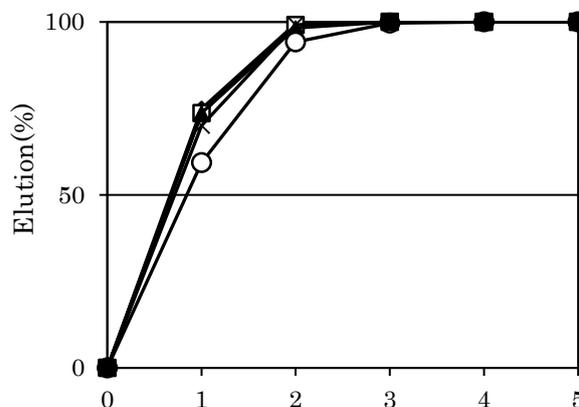


図 1 InertSep MC-1 からの 5 種のアミン類の溶出率

◆: プトレシン □: カダベリン ▲: ヒスタミン
○: チラミン ×: スペルミジン

2. ダンシル誘導体化

(1) 炭酸カリウム溶液中でのダンシル誘導体化

アミン類のダンシル誘導体化の検討をカラムの溶出液である 1 mol/L 炭酸カリウム溶液において行い, この生成量を内標準のピーク面積との比でアミンごとに表したものを図 2 に示した. 5 種のアミン類全てで 10~24 時間の間ではピーク面積比は増減することなく安定した誘導体を生成したことから, MC-1 カラムの溶出液に直接ダンシル誘導体化剤を加え, 室温で 10~24 時間放置し, ダンシル誘導体化することとした. 今回, 炭酸カリウム溶液中においてもダンシル誘導体化は可能であることが分かったことから, 溶出液の減圧濃縮操作が不要となり, 操作の簡略化に繋げることができた.

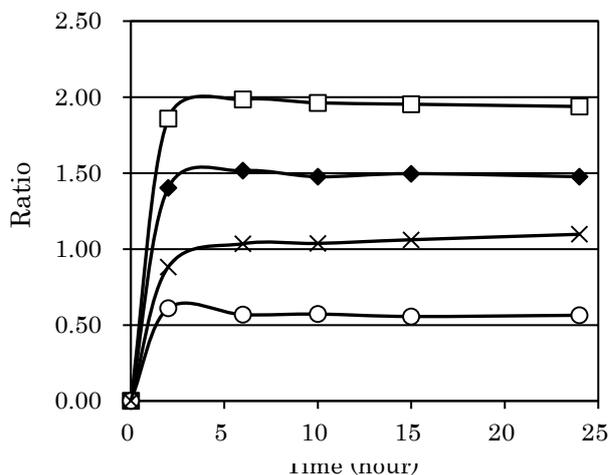


図 2 1 mol/L 炭酸カリウム溶液中でのダンシル反応時間との関係

◆: プトレシン □: カダベリン ▲: ヒスタミン
○: チラミン ×: スペルミジン

(2) 妨害ピークの除去

検査指針の参考法 (A) ¹³⁾では, Him 付近までの妨害ピークを除去するため, ダンシル誘導体化反応を行った後に 10 %プロリン溶液を加えている. 本法も同様に加えてみたが, 図 3 (A) に示したように Put, Cad, Him のピークと妨害ピークが重なってしまった.

そこで, 新たな方法として, トルエン抽出後の濃縮残留物をアセトニトリルで溶解した溶液に, 5 %プロリン・1 mol/L 炭酸カリウム溶液 1 mL を直接加えたところ, 図 3 (B) に示したようなベースラインの安定した分離のよいクロマトグラムを得ることができた. このことから, この方法により妨害ピークを除去することとした.

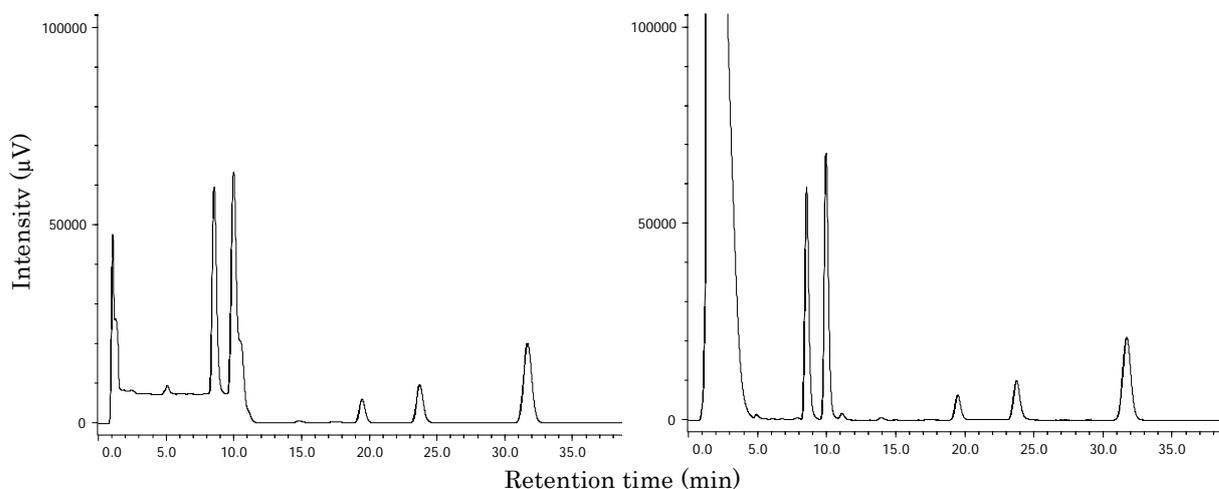


図 3 アミン類の HPLC クロマトグラム

- (A) ダンシル誘導体化後に 10 %プロリン溶液を加えたクロマトグラム
(B) アセトニトリル溶解後に 5 %プロリン・1 mol/L 炭酸カリウム溶液を加えたクロマトグラム
1) プトレシン 2) カダベリン 3) ヒスタミン 4) 内標準溶液 (1,8-ジアミノオクタン)
5) チラミン 6) スペルミジン

3. 検量線および定量下限

検量線は 0.03~100 $\mu\text{g}/5 \text{ mL}$ の範囲内で直線性を得ることができた ($r^2=0.9943\sim 0.9998$). また, 本法の定量下限 ($S/N \geq 10$) は, 試料あたり Put, Cad で 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$, Spd で 0.8 $\mu\text{g}/\text{g}$, Tym で 2.0 $\mu\text{g}/\text{g}$, Him で 5.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ であり, 食塩濃度が 10 %を超える食品では, Put, Cad で 0.4 $\mu\text{g}/\text{g}$, Spd で 1.6 $\mu\text{g}/\text{g}$, Tym で 4.0 $\mu\text{g}/\text{g}$, Him で 10.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった. 検査指針の参考法 (A) ¹³⁾に比べて低い値まで測定でき, 高感度な分析を可能とした.

4. 添加回収試験

本試験法を用いて 9 食品について各アミンの添加回収試験を行った. 魚介類および加工品などの食品には 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ および 50 $\mu\text{g}/\text{g}$, 濃口醤油と米味噌には 50 $\mu\text{g}/\text{g}$ および 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ となるよう各アミン標準溶液を添加して行った結果, 5 種のアミン類の平均回収率は 80~

135%，相対標準偏差（RSD）は0.0～14.1%と良好な結果であった。食品により差はあるものの、いずれの食品にも適用できる結果が得られた。より簡便なダンシル誘導体化法として、十分使用できる分析法を確立することができた。

第2章 市販漬物中のアミン類含有量と含有由来

発酵を伴う食品はアミン類の含有が疑われ、そのうち漬物には、既にアミン類が含まれる報告のある醤油や味噌が使われているものもあるが³⁾、国産の漬物におけるアミン類に関する報告はほとんど見られない。そこで今回、漬物中のアミン類含有量調査を行うと共に、漬物の原材料中のアミン類含有量もあわせて調査することで、各種の漬物に含有されるアミン類の由来についても明らかにした。

実験方法

1. 東京都内の小売店およびスーパーマーケットで購入した以下の試料を用いた。

漬物類：醤油漬，味噌漬，もろみ漬，塩漬，酢漬，辛子漬，ぬか漬，かす漬，こうじ漬，赤唐辛子漬（キムチ）の10種43検体。これらの食用に供する部位を試料とした。

漬け原材料：濃口醤油，米味噌，もろみ，食塩，醸造酢，辛子，米ぬか，酒かす，みりんかす，米こうじ，赤唐辛子，乾燥昆布，砂糖の13種38検体。

生鮮野菜：キュウリ，ハクサイ，ダイコン，カブ，ナスの5種15検体。

2. 分析方法

「第1章 ダンシル誘導体化によるアミン類の分析方法」に従った。

結果および考察

1. 漬物中のアミン類含有量

漬物類のアミン類含有量の調査結果を表1に示した。5種のアミン類のうち、Putは全ての漬物から0.4～61.7 μg/g 検出された。Cadは醤油漬，味噌漬，もろみ漬，かす漬，こうじ漬および赤唐辛子漬全てから0.2～28.9 μg/g 検出された。また、HimおよびTymの含有量は、それぞれ6.0～264，2.0～369 μg/g と比較的高い値を示した。特に醤油漬，味噌漬およびもろみ漬では含有量が高かった。Spdは種類に差があるものの、ほとんどの漬物から0.9～17.2 μg/g 検出された。

今回の調査結果から、漬物中にはアミン類が存在することが認められた。特に、味噌漬やもろみ漬ではHimおよびTymの含有量が他のアミンと比較して高かった。また、同じ種類の漬物によっても含有量に差が見られたのは、使用された原材料の違いやそれらの配合割合、漬け期間など、製造方法の違いによると考えられた。

表 1 漬物類中の不揮発性アミン類含有量

group	Total No. of samples	vegetable	No. of samples	(n=3)									
				Put		Cad		Him		Tym		Spd	
				No. positive	Range (µg/g)								
soy sauce pickles (shoyu-zuke)	5	cucumber	2	2	3.4, 12.7	2	0.3, 1.2	2	9.1, 12.9	2	2.5, 39.0	2	2.3, 4.5
		Japanese radish	2	2	6.0, 34.0	2	1.2, 8.0	2	7.2, 31.6	1	ND, 64.3	2	8.2, 8.3
		nozawana	1	1	41.6	1	0.4	1	8.3	1	34.0	1	5.7
soybean paste pickles (miso-zuke)	5	cucumber	1	1	6.5	1	0.4	1	11.6	1	20.9	1	2.8
		Japanese radish	4	4	1.6—61.7	4	0.4—16.4	4	6.8—20.0	3	ND—369	4	1.3—3.8
moromi pickles (moromi-zuke)	1	cucumber	1	1	8.1	1	0.2	1	264	1	243	1	1.2
salt pickles (shio-zuke)	7	cucumber	2	2	6.0, 11.3	0	ND	0	ND	0	ND	2	5.3, 6.4
		Chinese cabbage	2	2	1.4, 2.8	0	ND	0	ND	0	ND	2	5.4, 12.1
		Japanese radish	2	2	0.8, 1.0	1	ND, 0.9	0	ND	0	ND	2	2.7, 6.1
		plum	1	1	0.8	0	ND	0	ND	0	ND	1	1.5
vinegar pickles (su-zuke)	5	turnip	3	3	0.8—3.3	0	ND	1	ND—8.4	0	ND	3	5.5—10.1
		shallots	1	1	0.8	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND
		ginger	1	1	0.4	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND
mustard pickles (karashi-zuke)	3	eggplant	3	3	5.2—7.1	1	ND—1.0	0	ND	1	ND—5.6	3	1.1—8.9
rice bran pickles (nuka-zuke)	5	cucumber	4	4	2.3—55.1	2	ND—26.3	1	ND—6.3	2	ND—7.4	4	10.9—17.2
		Japanese radish	1	1	1.3	1	0.4	0	ND	0	ND	1	3.5
sake less pickles (kasu-zuke)	4	cucumber	2	2	7.0, 24.8	2	0.2, 28.9	2	6.9, 13.9	2	2.0, 5.1	1	ND, 0.9
		melon	1	1	4.7	1	1.4	0	ND	0	ND	0	ND
		wasabi	1	1	14.5	1	4.9	0	ND	0	ND	1	1.4
malt pickles (koji-zuke)	4	Japanese radish	3	3	1.1—2.4	3	1.8—2.4	2	ND—8.7	0	ND	3	4.1—6.7
		eggplant	1	1	11.7	1	0.6	1	10.7	0	ND	0	ND
red pepper pickles (kimchi)	4	Chinese cabbage	3	3	4.0—10.5	3	0.8—3.0	2	ND—12.0	2	ND—8.3	3	6.1—14.3
		Japanese radish	1	1	2.4	1	1.7	1	6.0	0	ND	1	3.9
total positive rate (%)				100		65.1		48.8		37.2		88.4	
ND : not determined				ND<0.2 µg/g		ND<0.2 µg/g		ND<5.0 µg/g		ND<2.0 µg/g		ND<0.8 µg/g	

2. 原材料中のアミン類含有量

漬物中に含まれるアミン類の由来を明らかにするため、試料として用いた各漬物製品の塩や酢、醤油や米ぬかなどといった主な漬け原材料および漬けられていた野菜、さらに、漬物中の味を調えるために比較的含まれている頻度の高い昆布と砂糖について調査を行った。

(1) 漬け原材料について

主な漬け原材料中のアミン類含有量を表 2 に示した。全てのアミン類が検出されたのは醤油ともろみであり、特に Him および Tym の含有量が他の漬け原材料と比較して高く、逆に塩および砂糖からは検出されなかった。

その他、Put は 13 種中 10 種から検出され、米ぬかや米こうじが比較的高い含有量を示した。Cad は 5 種から検出されたが、いずれも 3.8 $\mu\text{g/g}$ 以下と低い含有量であった。Him は、醤油、味噌およびもろみ以外では、乾燥昆布から最大 7.0 $\mu\text{g/g}$ 検出された。発酵が関与しない天然の食材から Him が検出されることは少なく、昆布からは初めての報告であると思われる。Tym は醤油およびもろみから検出され、それ以外の食品からは検出されなかった。Spd は 8 種の原材料から検出され、辛子や米ぬか、米こうじで高い含有量を示した。

(2) 生鮮野菜について

漬物によく使われる 5 種の生鮮野菜について、アミン類の含有量を表 3 に示した。5 種のアミン類のうち、Put および Spd は全ての野菜から検出され、Put はナスから 13.2~32.7 $\mu\text{g/g}$ と高い値を示したが、他の野菜は 8.9 $\mu\text{g/g}$ 以下と低く、Spd は野菜による差はなく、10 $\mu\text{g/g}$ 前後とほぼ同程度の含有量であった。また、Cad はダイコンのみから検出されたが、含有量は 2.7 $\mu\text{g/g}$ 以下と低かった。そして、Him および Tym はナスから検出され、特に Him は 3 検体全てから 42.7~65.6 $\mu\text{g/g}$ と天然の食材としては非常に高い値を示した。また、ナスからは Tym も 3 検体中 2 検体から検出されたが 3.6, 3.7 $\mu\text{g/g}$ と低い値であった。今回の調査により、国産のナスからも Him および Tym は検出されること、またその含有量は、Him では比較的高い値であることが明らかとなった。

表 2 主な漬け原材料中の不揮発性アミン類含有量

pickling ingredient	No. of pickling ingredients	Put		Cad		Him		Tym		Spd	
		No. positive	Range (μg/g)	No. positive	Range (μg/g)	No. positive	Range (μg/g)	No. positive	Range (μg/g)	No. positive	Range (μg/g)
soy sauce (shoyu)	3	3	10.9 — 20.1	3	0.3 — 0.5	3	13.6 — 40.7	3	29.8 — 56.6	3	8.8 — 19.5
soybean paste (miso)	3	3	22.5 — 33.2	3	2.4 — 3.8	2	ND ^a — 20.6	0	ND ^b	1	ND ^c — 5.8
moromi	3	3	20.4 — 20.8	3	0.5 — 0.8	3	13.5 — 69.3	3	54.6 — 155	3	0.5 — 3.3
salt	3	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND
vinegar	3	3	0.3 — 6.5	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND
mustard	3	3	3.7 — 17.8	0	ND	0	ND	0	ND	3	64.6 — 107
rice bran (kome nuka)	3	3	44.8 — 54.2	3	0.2 — 0.4	0	ND	0	ND	3	52.8 — 90.5
sake cake (sake kasu)	3	3	6.1 — 15.3	0	ND	0	ND	0	ND	1	ND — 1.9
mirin lees (mirin kasu)	3	3	0.9 — 4.4	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND
malt (kome koji)	3	3	11.5 — 162	1	ND — 0.2	0	ND	0	ND	3	41.8 — 144
red pepper	3	3	3.1 — 16.8	0	ND	0	ND	0	ND	3	10.5 — 18.9
kelp (konbu)	3	1	ND — 0.3	0	ND	2	ND — 7.0	0	ND	0	ND
sugar	2	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND
ND : not determined			ND < 0.2 μg/g		ND < 0.2 μg/g		ND < 5.0 μg/g ND ^a < 10.0 μg/g		ND < 2.0 μg/g ND ^b < 4.0 μg/g		ND < 0.8 μg/g ND ^c < 1.6 μg/g

表 3 生鮮野菜中の不揮発性アミン類含有量

sample	No. of samples	(n=3)									
		Put		Cad		Him		Tym		Spd	
		No. positive	Range (μg/g)								
cucumber (kyuri)	3	3	4.3—8.9	0	ND	0	ND	0	ND	3	9.6—9.9
Chinese cabbage (hakusai)	3	3	2.7—6.5	0	ND	0	ND	0	ND	3	10.1—14.1
Japanese radish (daikon)	3	3	0.8—2.1	3	1.0—2.7	0	ND	0	ND	3	5.6—8.5
turnip (kabu)	3	3	1.8—3.3	0	ND	0	ND	0	ND	3	8.9—9.6
eggplant (nasu)	3	3	13.2—32.7	0	ND	3	42.7—65.6	2	ND—3.7	3	6.3—10.3
ND : not determined		ND < 0.2 μg/g		ND < 0.2 μg/g		ND < 5.0 μg/g		ND < 2.0 μg/g		ND < 0.8 μg/g	

3. 各漬物中の各アミン類含有由来

漬物製品中から検出されたアミン類について、それらの漬け原材料および各生鮮野菜のアミン類含有量の結果から、各漬物製品中に含有するアミン類の由来を類推した。

Put, Cad および Spd は、漬け原材料および野菜から検出されたことから、漬物中に検出されるこれら3つのアミンはほとんどが原材料に由来すると考える。一方、Him および Tym は、これらが検出された漬物類のうち醤油漬、味噌漬、もろみ漬および赤唐辛子漬では漬け原材料中に Him および Tym が存在し、野菜に移行すること、また、昆布およびナスを原材料とするものでは、それら自身に含まれる Him あるいは Tym に由来することが分かった。そして、これら以外の漬物であるぬか漬、かす漬およびこうじ漬から検出された Him および Tym は、主な漬け原材料および野菜からは検出されなかったことから、製造過程に微生物の作用によって生成したと考えられた。Him および Tym については、漬物の種類によって、含有由来が異なることが明らかとなった。

4. 漬物類中のアミン類含有量から見た健康への影響

本調査の結果から、もろみ漬では、Him および Tym 含有量が、味噌漬では Tym 含有量が比較的高く、最も高かった Him 含有量は 264 $\mu\text{g/g}$ 、Tym 含有量は 369 $\mu\text{g/g}$ であった。Him については NOAEL が 50 mg¹⁴⁾であることから、これらの漬物を喫食した際に Him 摂取量が 50 mg に達する量は 190 g と推定され、この量を一度に喫食した場合には、健康への影響が見られる可能性が考えられる。漬物の喫食量は個人差が大きいと考えられることから、漬物の種類にもよるが、喫食量に注意し食する必要があると考えられた。さらに、子どもは成人よりも体が小さく、Him の感受性は高いと考えられているため、子どもの場合はさらに少量でも症状が見られる可能性があり、留意する必要があると考えられた。Tym については、30 g 喫食した場合 MAOI 服用者の発症レベルである 6 mg¹⁵⁾以上に達する。そのため、特定の医薬品を服用している場合には、注意を要する必要があると考えられた。

第3章 漬物中のヒスタミンおよびチラミン産生菌とヒスタミンおよびチラミンの生成

第2章の結果より、ぬか漬、かす漬およびこうじ漬においては、発酵の間に微生物が関与し、Him および Tym が生成されていると推察された。これまで、キムチ⁹⁾やからし菜の塩漬¹⁰⁾から Him 産生菌を単離している報告はあるが、漬物における Tym 産生菌の存在はほとんど知られていない。そこで、Him および Tym の生成において、発酵の間に微生物が関与していると推察された漬物類から、どのようなアミン産生菌が存在するのか確認をした。

実験方法

1. 試料

第2章で用いた、HimまたはTymの含有が認められたぬか漬3検体（試料A～C）およびかす漬2検体（試料D, E）を使用した。

2. アミン産生用液体培地

Difco Laboratories製のTrypticase Soy Broth (TSB) およびLactobacilli MRS Broth (MRS-B) にL-ヒスチジンおよびL-チロシン（いずれも和光純薬工業株，特級）1%，塩化ナトリウム（和光純薬工業株，特級）2%をそれぞれ調製し，小試験管に5 mLずつ分注後，オートクレーブで滅菌した（121℃，15分）。

3. ヒスタミンおよびチラミン産生菌の探索

(1) 菌液の調製

ぬか漬およびかす漬の周りに付着している米ぬかおよび酒かすを採取できるだけ3～5g秤量し，その9倍量のリン酸緩衝生理食塩水を加えて混合した後，段階希釈菌液を作製した。そして，塩化ナトリウム2%を含むDifco Laboratories製のTrypticase Soy Agar (TSA) およびLactobacilli MRS Agar (MRS-A)，塩化ナトリウムは含まないXM-G寒天培地（XM-G，日水製薬株）の平板培地にそれぞれ0.1 mL滴下し，コンラージ棒で塗抹した後，36℃でXM-Gは24時間，TSAおよびMRS-Aは48時間培養した。なお，MRS-Aについては，嫌氣的に培養を行った。

24～48時間の培養後，TSAおよびXM-Gから出現したコロニーはTSB，MRS-Aから出現したコロニーはMRS-Bで作製したアミン産生用液体培地に，色調や大きさなどを観察してそれぞれ無作為に単一のコロニーを10株ずつ釣菌し，各アミン産生用液体培地で，36℃，24時間培養した。

(2) TLCによるアミン類の定性試験

釣菌したコロニーのアミン産生能の有無を確認するため，各アミン産生用液体培地で培養後，薄層クロマトグラフ法（定性法）¹³⁾に準じて産生能を確認した。

結果および考察

1. ヒスタミンおよびチラミン産生菌の探索

塗抹した各種平面寒天培地から出現したコロニーを釣菌し，各アミン産生用液体培地で培養後，TLCでアミン産生能を確認したところ，表4に示したように，試料BからHim産生菌1株およびTym産生菌5株を，試料CからTym産生菌2株を，いずれもぬか漬から確認することができた。試料A，DおよびEにおいては，産生菌を確認することはできなかった。今回の結果より，ぬか漬中に各アミン産生菌の存在が明らかとなった。

表 4 単離菌の各アミン産生能

sample	strain	Him	Tym
B	BT-2	+	-
	BM-5	-	+
	BM-6	-	+
	BM-8	-	+
	BM-9	-	+
	BM-10	-	+
C	CT-7	-	+
	CM-6	-	+

+ : positive , - : negative

2. 食塩濃度による生育および産生能の確認

ぬか漬中には食塩が含まれていることから、食塩濃度による各アミン産生能の確認を行った。アミン産生用液体培地の混濁により生育を確認したところ、Tym 産生菌の中では BM-6 が最も生育がよかったことから、Him 産生菌として BT-2、Tym 産生菌として BM-6 を用いた。

Him 産生菌は TSB 培地、Tym 産生菌は MRS-B 培地で食塩濃度 2, 4, 6, 8 および 10% に調製したアミン産生用液体培地に、それぞれ画線培養したコロニーを釣菌して入れ、36°C で 24 時間培養し、生育と TLC で Him および Tym の産生を確認した結果を表 5 に示した。Him 産生菌は 10 %, Tym 産生菌は 6 % までの生育と産生能が認められた。一般的にぬか漬の食塩濃度は高くても 5 % 程度¹⁶⁾であることから、Him 産生菌および Tym 産生菌共に、ぬか漬中でも生育可能な菌であり、それぞれ Him および Tym を産生することができると考えられた。

表 5 食塩濃度による Him および Tym 産生菌の生育とアミン産生能

amine	strain	salinity concentration (%)					
		2	4	6	8	10	
Him	BT-2	growth	+	+	+	+	+
		productivity	+	+	+	+	+
Tym	BM-6	growth	+	+	+	-	-
		productivity	+	+	+	-	-

総括

本研究は、食品中のアミン類について、それらの含有量と含有要因について明らかにす

ることを目的とし、水産加工品に比べると調査研究が少ない、発酵食品のアミン類に焦点を絞り行った。

はじめに、これまで操作が煩雑であるとの指摘が多いダンシル誘導体化を用いたアミン類 5 種の簡便な一斉分析法を検討した。固相抽出カラムの変更などにより、簡便なダンシル誘導体化法として、食中毒時のアミン類の分析においても、十分使用できる分析法を確立することができた。

次に、確立した分析法を用いて、市販漬物中のアミン類含有量調査を行った。漬物のアミン類に関する報告はほとんど見られない中、市販漬物中のアミン類含有量だけでなく、主な原材料中のアミン類含有量から各漬物中のアミン類の由来を類推し、漬物の種類により含有由来は異なることを明らかにすることができた。

発酵を伴う漬物では、製造中に Him および Tym の生成が示唆されたことから、ぬか漬およびかす漬中から Him および Tym 産生菌を探索した結果、ぬか漬中からそれぞれの産生菌を単離することができた。ぬか漬中に各アミン産生菌の存在が確認された。

以上の結果から、漬物中に含まれるアミン類は、漬け原材料、野菜中にもともと含まれるアミン類の他、発酵中に細菌が産生するアミン類に由来することが考えられ、漬物中のアミン類は、漬物の種類によって含有要因は異なることが明らかとなった。今後、漬物中のアミン類、特に Him および Tym を制御する上で、産生菌の混入経路や温度管理の徹底などに関する検討が必要であると考ええる。

文献

- 1) 観公子, 牛山博文, 新藤哲也, 斉藤和夫. 市販魚介類およびその加工品中のヒスタミン含有量調査, 食品衛生学雑誌, 46, 127-132 (2005).
- 2) 登田美桜, 山本都, 畝山智香子, 森川馨. 国内外におけるヒスタミン食中毒, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 127, 31-38 (2009).
- 3) 井部明広, 田村行弘, 上村尚, 田端節子, 橋本秀樹, 飯田真美, 二島太一郎. 市販味噌及び醤油中の不揮発性アミンの分析法及びその含有量, 衛生化学, 37, 379-386 (1991).
- 4) 井部明広, 上村尚, 田端節子, 早野公美, 田村行弘. 発酵食品中の不揮発性アミン類の含有量調査 (第 1 報), 東京都立衛生研究所年報, 46, 102-107 (1995).
- 5) 井部明広, 上村尚, 田端節子, 早野公美, 木村祐起子, 友松俊夫. 発酵食品中の不揮発性アミン類の含有量調査 (第 2 報), 東京都立衛生研究所年報, 47, 90-94 (1996).
- 6) Kung, H. F., Tsai, Y. H., Wei, C. I. Histamine and other biogenic amines and histamine-forming bacteria in miso products. Food Chemistry, 101, 351-356 (2007).
- 7) Byun, B. Y., Mah, J. H. Occurrence of Biogenic Amines in Miso, Japanese Traditional Fermented Soybean Paste. Journal of Food Science, 77, 216-223 (2012).

- 8) Guidi, L. R., Gloria, M. B. Bioactive amines in soy sauce: Validation of method, occurrence and potential health effects. *Food Chemistry*, 133, 323-328 (2012).
- 9) Tsai, Y. H., Kung, H. F., Lin, Q. L., Hwang, J. H., Cheng, S. H., Wei, C. I., Hwang, D. F. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in kimchi products in Taiwan. *Food Chemistry*, 90, 635-641 (2005).
- 10) Kung, H. F., Lee, Y. H., Teng, D. F., Hsieh, P. C., Wei, C. I., Tsai, Y. H. Histamine formation by histamine-forming bacteria and yeast in mustard pickle products in Taiwan. *Food Chemistry*, 99, 579-585 (2006).
- 11) Jia, S., Kang, Y. P., Park, J. H., Lee, J., Kwon, S. W. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 9174-9182 (2011).
- 12) Konakovsky, V., Focke, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Schmid, R., Scheiner, O., Moser, P., Jarisch, R., Hemmer, W. Levels of histamine and other biogenic amines in high-quality red wines. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 28, 408-416 (2011).
- 13) 社団法人 日本食品衛生協会. 食品衛生検査指針 理化学編 2015. 東京, 2015, p.784-795.
- 14) FAO/WHO. Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products.http://www.who.int/foodsafety/publications/histamine_risk/en/(参照 2017-10-13).
- 15) Edwards, S. T., Sandine, W. E. Public health significance of amines in cheese. *Journal of Dairy Science*, 64, 2431-2438 (1981).
- 16) 白石泰夫. 日本食品成分表 2017 七訂 本表編. 東京, 医歯薬出版, 2017, p.38. (ISBN 978-4-263-70677-0).

関連する業績

・ 発表論文

1. 半田彩実, 川鍋ひとみ, 井部明広. ダンシル誘導体化反応の改良による食品中の不揮発性アミン類分析法, *食品衛生学雑誌*, 58, 149-154 (2017).
2. 半田彩実, 川鍋ひとみ, 井部明広. 市販漬物中の不揮発性アミン類含有量とそれらの含有由来, *食品衛生学雑誌*, 59, 36-44 (2018).

平成 29 年度 食物栄養学専攻 博士後期課程（博士）論文
主査・副査講評要旨

氏 名 半田 彩実

論文名 「漬物中における不揮発性アミン類含有量とそれらの含有に関わる要因」

講 評

食品中の不揮発性アミン類、特にヒスタミン（Him）やチラミン（Tym）は腐敗時に産生され食中毒の原因となるとして注意が喚起されている。また、Him、Tym を含む 5 種類の不揮発性アミン類は腐敗時ばかりでなく、特に発酵食品からも検出され健康への影響が懸念されている。本研究は、これまで調査がほとんどされていない漬物を選び、これらのアミン類含有量と含有由来について検討し、市販の漬物および原料中のアミン含有量からそれらの含有原因を明らかにし、さらに Him と Tym が漬物製造中、発酵にかかわる細菌によって産生されることを明らかにした。

本研究では研究を始めるにあたり、漬物における HPLC による分析法の検討をして、これまでの分析法を精査し、新たな精製カラムを考案することで調査に適用できるより良い分析法を確立した。これを用いて、市販の漬物およびそれらの原材料についてアミン類の分析を行いそれらの含有量を求めた。その調査結果から漬物の種類ごとに製品に含まれるアミン類の含有量は異なること、また、その含有原因がもともとの原料に由来するもの、あるいは製造中に生成するものに分かれることを明らかにした。この中で、乾燥昆布から高い Him を検出したことや、国産ナスから Him, Tym を検出したことは注目すべき新たな知見である。特に糠漬け等漬物の種類によっては Him、Tym が製造中に生成されるとして、それを実証するため市販の糠漬けから産生菌の探索を行った。漬物から検出される膨大な細菌の中から、一つ一つ培養、TLC により産生菌を見つけるといった地道な作業によって、Him 産生菌 2 種、Tym 産生菌 3 種を単離した。さらに、これらの細菌の菌種の同定を試み、化学分析のみならず細菌学試験にも果敢に挑戦して、基礎的な細菌試験から高度な分離、同定試験に取り組んだ。同時に 16SrRNA 遺伝子による確認も行った。その結果、Him 産生菌として 1 種、Tym 産生菌として 3 種および両産生菌として 1 種を新たに同定した。糠漬けからアミン産生菌の検出は初めてのことであり、さらに、漬物製造中にこれらの菌による産生を確認するため、実際の漬物を想定した培地中でこれらの菌が各アミンを産生することを証明した。これまで産生菌の検出は行われても、実際の食品中で生成することを確認したことは本研究が初めてである。

本研究の成果は、今後食品特に発酵食品でのアミン類の生成防止や制御につながるものであり、我々の食生活の安全を評価する上で、また、アミン類による危害防止に大いに役立つと思われる。

以上より、本論文は博士論文として学位授与に値するものと評価する。

博士学位論文 内容の要旨及び審査の結果の要旨 第14集 平成29年度

2018年 4月 1日

編集・発行 実践女子大学大学院
東京都日野市大坂上4-1-1
〒191-8510 Tel 042(585)8817

機関リポジトリにより公表