

## 食中毒関連原材料サバからのヒスタミン産生菌の 分離と原因菌推定

清水 裕美子    青田 達明    池田 伸代    井澤 麻由\*  
山本 美和子    京塚 明美    松室 信宏    石村 勝之

### はじめに

ヒスタミン(Hm)食中毒は、Hmの蓄積した食品を摂食することで引き起こされる。Hmは食品中の遊離ヒスチジンから、ヒスチジン脱炭酸酵素(Hdc)を有する細菌により産生され、蓄積するため、原因食品の多くは、遊離ヒスチジンを多く含有するマグロ・サバなどの赤身魚である。Hm産生菌として中温性の *Morganella morganii*, *Raoultella planticola* 等の腸内細菌群や *Photobacterium damselae*(好塩性)、低温性の *Photobacterium phosphoreum*(好塩性)等が報告されている。今回、平成27年8月に発生した食中毒事例において、原材料サバより当所生活科学部の試験により Hm が検出された。そこで、原材料サバからの Hm 産生菌の分離を試みたので報告する。

### 方 法

#### 1 検査試料

原材料サバ(冷凍保存品)に滅菌生理食塩水を9倍量加えてストマッカー処理し、試料原液(×10)とした。

#### 2 ヒスタミン産生中温菌の分離及び菌数測定

試料原液(×10)、×100希釈液、×1000希釈液の各1mlを、2種類の0.1%グルコース加ニーベン寒天(N)培地<sup>1)</sup>(2%NaCl加及び0.5%NaCl加)15mlで混釈(各々2枚)し、30°C48時間培養した。周辺が紫色を呈したコロニーをHm産生菌と推定して計数した。釣菌した菌株はHm産生確認培地<sup>2)</sup>による呈色反応を確認した。

#### 3 ヒスタミン産生低温菌(好塩性)の分離及び菌数測定

2%NaCl加ニュートリエントブロス(pH4.7)を用いて図1の要領でMPN3本法を実施した。20°C72時間培養後、2%NaCl加TSA平板へ分離塗抹し、20°C48時間培養後Hm産生確認培地へ接種し陽性本数を求めた。また陽性管から分離した菌株のHm産生能を確認した。

#### 4 菌種同定

Hm産生確認培地陽性の菌株は、TSI培地、LIM培地、VP培地で生化学的性状を調べ、性状の異なる株について、PCR法によるHdc遺伝子の有無の確認<sup>3)</sup>と同定キット(アピ20E、アピ50CH:Bio Merieux製)による菌種同定を行った。さらに16SrDNA及びHdc遺伝子のシーケンス解析を行った。

#### 5 低温発育性試験

ヒスチジンブロス(pH5)<sup>4)</sup>に分離菌5株(菌株No.1・2・3・7・9)を各々10<sup>8</sup>cfu/mlで接種し、10°Cで1週間、5°Cで2週間培養し、菌数測定及びヒスタミン定性検査キット(NEOGEN製)によるHm産生確認を行った。

#### 6 PCR法によるサバ中Hdc遺伝子半定量からの菌数推定及びシーケンス解析による優勢菌種推定

PCR法により既知濃度の菌液抽出試料との比較で原材料サバ中のHdc遺伝子の半定量を行い、菌数推定を試みた。菌株No.3(*Raoultella* sp.)を

希釈倍率	2%NaCl加 ニュートリエントブロス	試料液	本数
×10	90ml	試料原液10ml	3本
×100	9ml	試料原液1ml	3本
×1000	9ml	×100希釈液1ml	3本



図1 ヒスタミン産生低温菌(好塩性)の分離及び菌数測定

\*: 現 健康福祉局保健部食肉衛生検査所

TSB で増菌後, 10<sup>1</sup>~10<sup>8</sup>cfu/ml の 8 段階に希釈した検体 25 μl からの抽出試料と, サバ 25 mgからの抽出試料で Hdc 遺伝子の PCR を実施し, 泳動像のバンドの濃淡を比較した。また, サバ抽出試料の Hdc 遺伝子のシーケンス解析を実施し, 優勢菌種の推定を試みた。

## 結 果

### 1 菌数測定

中温菌の菌数は 2%NaCl 加 N 培地では 45cfu/g, 0.5%NaCl 加 N 培地では 30cfu/g であった。低温菌の MPN 陽性本数は, ×10 : 3 本, ×100 : 1 本, ×1000:0 本で MPN 法の菌数は 430/100 g となった。

### 2 菌種同定

菌種同定には, 中温菌は 2%NaCl 加 N 培地からの 3 株と 0.5%NaCl 加 N 培地からの 2 株を, 低温菌は分離された 5 株を用いた。

同定した 10 株の生化学的性状等を表 1 に, 同定結果を表 2 に示す。No. 7 と 8 はシーケンス解析の結果より *Photobacterium phosphoreum* とした。その他は, アピ 20E で多くが *Klebsiella oxytoca* となったが, 取扱説明書で *Raoultella planticola* の可能性が示唆されており, また No. 1 と 5 はアピ 20E での同定確率が低いためアピ 50CH での検査を実施し表 2 の結果を得た。しかし非典型反応の確率等を考慮し, さらに Hdc 遺伝子のシーケンス解析を実施したが, 99%の一致率で複数菌種が提示されたため, 菌種同定には至らず, *Raoultella* sp. とした。

### 3 低温発育性試験

*Raoultella* sp. (No. 1・2・3・9) と *Photobacterium phosphoreum*(No. 7) を用い初濃度 10<sup>3</sup>cfu/ml から実施した。10℃では, No. 7 は 2 日目で 10<sup>7</sup>cfu/ml となり Hm 産生が確認され, 他も 6 日目に 10<sup>8</sup>

表 1 生化学的性状

培養条件	菌株No.	Hm 産生 確認培地	TSI 斜面/高層	リジン	運動性	ガス	インドール	VP	Hdc 遺伝子
中温培養 2%NaCl 加 N 培地	1	+	Y/Y	-	弱+	+	+	+	+
	2	+	Y/Y	+	弱+	+	+	-	+
	3	+	Y/Y	+	弱+	+	+	+	+
中温培養 0.5%NaCl 加 N 培地	4	+	Y/Y	+	弱+	+	+	-	+
	5	+	Y/Y	-	弱+	+	+	+	+
低温培養	6	+	Y/Y	+	弱+	弱+	+	+	+
	7	+	R/Y	+	弱+	-	-	+	+
	8	±	R/Y	+	弱+	-	-	弱+	+
	9	+	Y/Y	+	-	弱+	+	+	+
	10	+	Y/Y	+	-	弱+	+	-	+

表 2 同定結果(同定キットの結果が同じ株はまとめて記載)

菌株 No.	アピ 20E 同定菌名・確率	アピ 50CH 同定菌名・確率	Hdc 遺伝子解析結果・一致率
1・5	<i>Pantoea agglomerans</i> 76.4%	<i>Raoultella planticola</i> 99.7%(非典型 LDC100% URE75% IND20%)	1~6・9 で実施(10 は 9 とアピ 20E 結果が同一のため 50CH, Hdc 遺伝子シーケンス実施せず)
	<i>Klebsiella oxytoca</i> 18.0%		
2・4	<i>Klebsiella oxytoca</i> 97.5%	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 89.1%(非典型 ODC99% VP75%)	結果が同一のため 50CH, Hdc 遺伝子シーケンス実施せず)
		<i>Raoultella planticola</i> 10.7%(非典型 IND20% VP100%)	
3・6	<i>Klebsiella oxytoca</i> 96.8%	<i>Raoultella planticola</i> 80.3% (非典型 IND20%)	<i>Raoultella planticola</i> 99%
		<i>Raoultella ornithinolytica</i> 19.5% (非典型 ODC99%)	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 99%
9・10	<i>Klebsiella oxytoca</i> 88.4%	<i>Raoultella planticola</i> 91.3% (非典型 URE75% IND20%)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 99%
		<i>Raoultella ornithinolytica</i> 8.6% (非典型 ODC99% URE89%)	
7	35℃反応せず	16SrDNA 解析結果 <i>Photobacterium phosphoreum</i> 100%	<i>Photobacterium phosphoreum</i> 97%
8	35℃・30℃発育せず 20℃発育暗所で蛍光発色あり	16SrDNA 解析結果 <i>Photobacterium phosphoreum</i> 99%	<i>Photobacterium phosphoreum</i> 97%

cfu/ml 以上となり Hm 産生が確認された。5℃では、No. 7 は 6 日目で  $10^6$ cfu/ml となり Hm 産生が確認され、No. 1 は 12 日目に  $10^7$ cfu/ml となり Hm 産生が確認された。No. 3 と 9 は 12 日目に  $10^8$ cfu/ml となり Hm 産生が確認された。No. 2 は 12 日目に  $10^8$ cfu/ml となったが Hm 産生は確認されず、15 日目で Hm 産生が確認された。(図 2, 図 3)

#### 4 PCR 法によるサバ中 Hdc 遺伝子半定量からの菌数推定及びシーケンス解析による優勢菌種推定

サバの抽出試料の泳動像の濃度(図 4)は、菌数  $10^5$  と  $10^6$ cfu/ml からの抽出試料の間であった。また PCR 産物のシーケンス解析の結果は、*Photobacterium phosphoreum* と 99%、*Photobacterium damselae* と 79%、*Raoultella planticola* 及び *Raoultella ornithinolytica* と 76%の相同性であった。

#### 考 察

Hm 食中毒事例での原材料サバから Hm 産生菌の分離同定を試みた結果、中温培養から *Raoultella* 属が、低温培養では *Raoultella* 属と *Photobacterium phosphoreum* が分離された。今回分離された菌はいずれも、培地では 5℃、10℃で増殖し、 $10^6 \sim 10^8$ cfu/ml で Hm を検出した。しかし、生菌数は中温培養で 30cfu/g、低温培養 MPN で 430/100g と少数であった。これは、冷凍保管検体を供試したため、菌が当所保管中に死滅した可能性があると考えられた。

そこで、死菌も含めた菌数推定の試みとして、サバ中の Hdc 遺伝子量を既知濃度の菌液抽出試料の PCR 泳動像と比較した。その結果から  $10^5 \sim 10^6$ cfu/g(以上)の Hdc 遺伝子保有菌が存在していたことが推定された。また、シーケンス解析の結果から、優勢菌種としては *Photobacterium phosphoreum* が推定されたことから、今回の食中毒は本菌が主な起因菌となった可能性が高いと考えられた。

これらの菌が今回の Hm 食中毒で、どの過程で増殖したのかは不明であるが、海水や環境に棲息しており、10℃以下の低温でも発育可能である。従って、初期の菌数が少量であっても増殖し Hm を産生する可能性があるが、食品の適切な保存温度を維持し、増殖を極力抑制することが Hm 産生を抑え、食中毒予防につながると思われる。

#### 文 献

- 1) Niven CF et al.: Differential planting medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria, *Appl. Environ. Microbiol*, 41(1), 321~322(1981)
- 2) Yamani MI et al.: Development of a histidine decarboxylase medium and its application to detect other amino acid decarboxylases, *Int. J. Food Microbiol*, 2, 273~278(1985)
- 3) Takahashi H et al.: Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish, *Appl. Environ. Microbiol*, 69, 2568~2579(2003)
- 4) Takahashi H et al.: Evaluation of the PCR single strand conformational polymorphism analysis for identification gram negative histamine producing bacteria isolated from fish, *J. Food Prot*, 70(5), 1200~1205(2007)

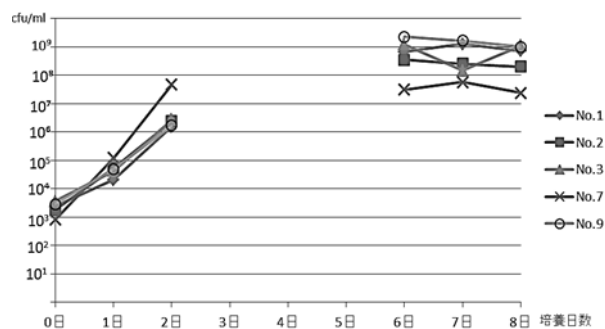


図 2 低温発育試験 10℃

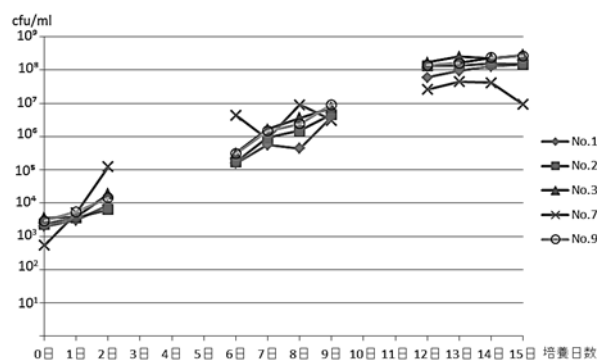


図 3 低温発育試験 5℃

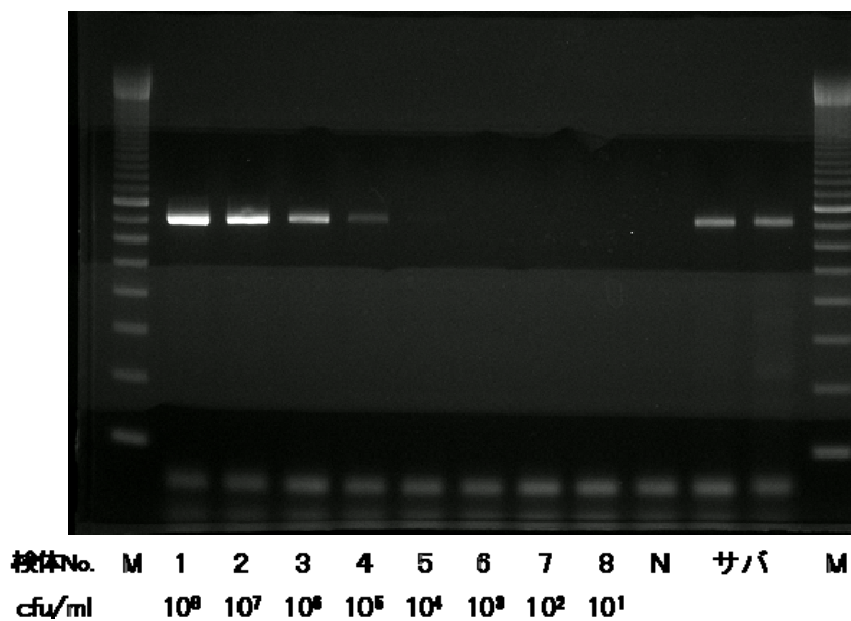


図4 サバ中のHdc遺伝子PCR泳動像