

令和3年度秋田県保健環境業務研究発表会抄録

食品中のヒスタミン分析法の検討

古井真理子 藤井愛実 若狭有望 松渕亜希子 中村淳子 小川千春

1 はじめに

不揮発性腐敗アミン類の一種であるヒスタミンは、腐敗や発酵の過程で食品中のヒスチジンにヒスタミン産生菌の酵素が作用して生成する化学物質である。ヒスタミンによる食中毒は、食後数分から数時間以内に顔面紅潮、頭痛、じんま疹、発熱などの症状を呈することから、アレルギー様食中毒とも言われ、国内の化学性食中毒の中では最も発生件数が多い。過去10年間の発生状況を見ると、年間約10件、患者数は200名程度で推移しており、保育所や学校などの給食施設で大規模食中毒も発生している。

ヒスタミン食中毒の原因食品は、主にサバ、マグロ、イワシなどの赤身魚やその加工品、調理品である。ヒスタミンは熱に安定であることから、加熱済みの食品でも食中毒が発生する。また、食品中に一定程度存在していることがあるため、食中毒の原因探索においてはその存在の有無だけではなく、含有量と食中毒濃度域との比較が重要となる。一般的には、食品中のヒスタミン量が100 mg/100 g以上の場合に発症するとされている¹⁾。日本ではヒスタミンの規格基準は示されていないが、Codex委員会の国際食品規格をはじめ、諸外国では水産物中の基準が設定されている。したがって、これらの基準や発症濃度域を目安とした分析法が必要となってくる。

食品中のヒスタミンの分析法は、高速液体クロマトグラフ(HPLC)法²⁾が従来から利用されているが、近年、高感度かつ高選択性を有する液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた分析法も多数報告されている^{3,4)}。そのほか、生魚や魚醬などを対象として迅速にヒスタミンの定量が可能なヒスタミン測定キットが市販されている。

当センターでは、食中毒の原因探索の一助とすることを目的に、ヒスタミンの分析法について、HPLC法、LC-MS/MS法、ヒスタミン測定キット法(以下「キット法」)の3種の方法について検討を

行ったので、その概要について報告する。

2 実験方法

2.1 標準品

富士フィルム和光純薬(株)製のヒスタミン二塩酸塩を0.1 M塩酸に溶解し、ヒスタミン1,000 µg/mLの標準液を調製した。

2.2 試料及び添加回収試験

ヒスタミンが不検出であることを確認した魚肉製品を主としたペーストを使用した。

試料にヒスタミン濃度が500 µg/gとなるよう標準液を添加し、添加回収試験を行った。

2.3 前処理及び測定法

HPLC法、LC-MS/MS法、キット法の各前処理法を図1～3に示す。ヒスタミンはガラスへ吸着するため³⁾、なるべくガラス器具を使用せずに実施した。

HPLC法は、食品衛生検査指針の方法²⁾と半田らの方法⁵⁾を参考とし、ダンシルクロライドを用いてヒスタミンを誘導体化し、蛍光検出器付きHPLCで測定した。LC-MS/MS法は、試料を100,000倍希釈したものを、HILICカラムを用いて測定した。キット法はキッコーマンバイオケミファ製「チェックカラーヒスタミン」を用い、添付のマニュアルを参考に抽出液を酵素反応によって発色させ、分光光度計で吸光度を測定した。

2.4 測定条件

HPLC法、LC-MS/MS法、キット法の各測定条件を表1～3に示す。

3 結果及び考察

添加回収試験の結果を表4に、検討した3種の方法の比較を表5に示す。添加回収試験の結果は厚生労働省通知⁶⁾を参考とし、回収率70%～120%、併行精度10%以下を目標値として評価した。

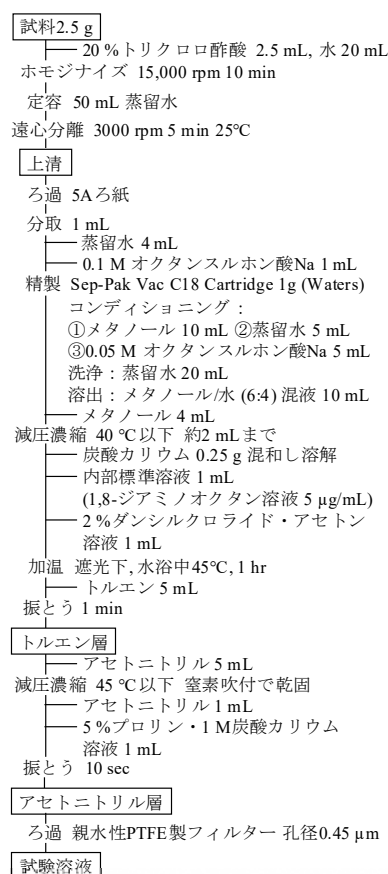


図1 HPLC法

表1 HPLC法

HPLC装置: L-7000 Series (HITACHI), カラム: Inertsil ODS-3V (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 µm), 移動相: アセトニトリル: 超純水 = 65 : 35, 流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40 °C, 注入量: 10 µL
励起波長: 325 nm, 蛍光波長: 525 nm

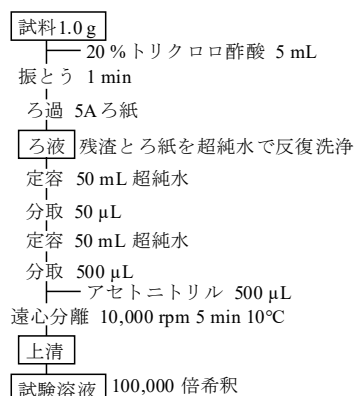


図2 LC-MS/MS法

表2 LC-MS/MS法

LC-MS/MS装置: QTRAP4500 (AB SCIEX), カラム: Atlantis HILIC Silica (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 µm), 移動相: A液 (0.2% ぎ酸, 60 mM ぎ酸アンモニウム水溶液), B液 (アセトニトリル: メタノール = 4 : 1混液), グラジエント time (min) / B液 (%): 0/70→3/70→4/40→6/40→7/5→14/5→15/70→35/70, 流速: 0.2 mL/min, カラム温度: 40 °C, 注入量: 5 µL
イオン化条件: ESI Pos, 測定モード: Scheduled MRM, イオン源温度: 500 °C, イオン源電圧: 5000 V, カーテンガス: 20 psi, イオンソースガス1: 50psi, イオンソースガス2: 50psi, コリジョンガス: 6psi, MRM条件Q1>Q3: 定量112.0>95.0 (DP=36, CE=21) 定性112.0>68.0 (DP=36, CE=29)

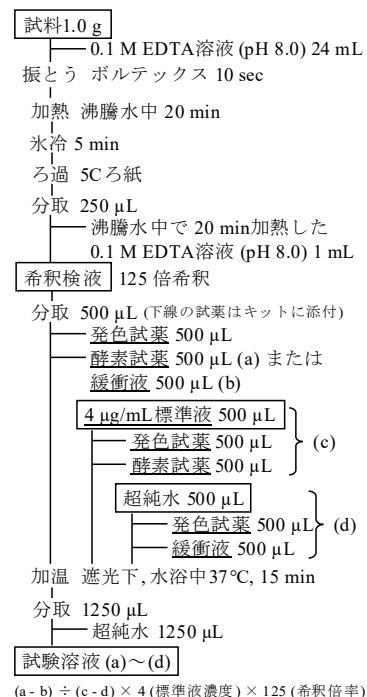


図3 キット法

表3 キット法

分光光度計装置: UV-2600 (SHIMADZU), セル: 可視光線用, 材質ポリスチレン, 測定範囲340 nm~900 nm, 光路幅10 mm, 寸法12.5 × 12.5 × 45 mm, 容量2.5 mL~4.5 mL (BRAND)
測定波長: 470 nm

3.1 HPLC法

第1級及び第2級アミンと反応するダンシルクロライドによりヒスタミンを誘導体化し蛍光検出器により定量した。検量線は0.3 µg/mL~10 µg/mLの範囲 (6点) で良好な直線性 (相関係数 0.998 以上) が得られた。回収率は 140.4%, 併行精度は 12.9%と目標値より高い値となった。原因としては、ヒスタミン以外の夾雑物も誘導体化されたことが考えられた。そのため、本法で分析を行うには精製や反応の条件を見直し、前処理法を改良する必要があると考えられる。

LC-MS/MS 法より分析機器が安価であるが、前処理工程が煩雑かつ、誘導体化に時間を要するため、迅速に結果を得ることは困難であった。

3.2 LC-MS/MS法

0.5 ng/mL~15 ng/mL の範囲 (8点) でピーク面積による絶対検量線を作成したところ、良好な直線性 (相関係数 0.999 以上) が得られた。回収率は 102.4%, 併行精度は 3.0%と良好な結果であった。高価な分析機器を用いるが、移動相 B 液の 2 割をメタノールにすると感度が上がり、0.5 ng/mL で S/N 比が 10 以上であった。試料の 100,000 倍希釈には精密な操作が求められるが、食品のマトリクス効果 (食品由来の妨害効果) を十分に低減することが可能と考えられる。ただし、HILIC カラムは食品由来の成分の影響を受けて感度の低下が起こることがあるため、カラム洗浄をこまめに行い、試料によっては希釈だけでなく精製も検討したほうが良いと考えられた。

表4 添加回収試験の結果

	HPLC法	LC-MS/MS法	キット法
添加回収試験の 平均回収率 (n=3)	140.4 % (12.9)	102.4 % (3.0)	92.5 % (1.9)

()内は併行精度(%)

表5 3法の比較

	HPLC法	LC-MS/MS法	キット法
検査所要日数	3日	2日	1日
前処理	煩雑 (誘導体化が必要)	簡便 (精密な操作は必要)	簡便
前処理のコスト	高 (誘導体化試薬が高価)	低	中
分析機器のコスト	中	高	低
検査対象食品	生魚, 調理加工品, 発酵食品		生又は冷凍魚, 魚缶詰, 魚醬 (調理加工品は不可)
検査項目	他の不揮発性腐敗アミン類 (チラミン, カダベリン, ブトレシン等) も一斉分析する文献あり		ヒスタミンのみ
注意点	誘導体化率に注意する必要がある	特殊なカラムの操作に慣れた検査員が必要	アグマチンやブトレシンがあると影響を受ける

3.3 キット法

今回検討した中では最も迅速に結果が得られた方法で、回収率が92.5%, 併行精度が1.9%と良好な結果であった。しかし、この方法が適用できる食品は生又は冷凍の魚, 魚缶詰, 魚醬で、調理加工品や発酵食品など、食品の種類によっては酸化還元物質の影響を受けるため、精製工程などを追加する必要がある⁷⁾。食中毒事件の際にはスクリーニング検査とし、他の方法と組み合わせて活用するとよいと考えられた。

4 まとめ

HPLC法, LC-MS/MS法, キット法の3種の方法を検討し、ヒスタミン食中毒発生時の迅速な原因究明の方法を模索した。構築したLC-MS/MS法とキット法では添加回収試験において良好な結果となり、食中毒時の分析に十分に適用できるものと考えられた。HPLC法では添加回収試験が目標値を満たすことができず、前処理法の更なる改良が必要である。

今後は、ヒスタミンによる食中毒症状を増強するといわれている他の不揮発性腐敗アミン類を含めた一斉分析法の開発や、切り身, 魚醬, 缶詰, 干物, 調理加工品など、多様な食品試料においても幅広く適用することが可能な分析法についても検討していきたい。

参考文献

- 1) 食品安全委員会:ファクトシート(ヒスタミン). 最終更新日:令和3年3月30日, URL. https://www.fsc.go.jp/factsheets/index.data/210330_histamine.pdf [accessed December 24, 2021].
- 2) 井部明広:不揮発性腐敗アミン, 食品衛生検査指針理化学編2015, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京, 2015, pp. 785-791.
- 3) 西名武士他:LC/MS/MSを用いた食品中不揮発性腐敗アミン類の迅速一斉分析法の検討, 熊本県保健環境化学研究所報, **44**, 2014, 38-47.
- 4) 太田康介他:水産物中に含まれる不揮発性アミンの分析法の検討, 山形県衛生研究所報, **46**, 2013, 11-14.
- 5) 半田彩実他: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**, 3, 2017, 149-154.
- 6) 厚生労働省通知:食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について, 平成22年12月24日, 食安発1224第1号.
- 7) 太田康介:ヒスタミン測定キットを利用した水産調理加工品中のヒスタミン分析法検討, 山形県衛生研究所報, **48**, 2015, 9-12.