

安全性を指向した食品試料の高次処理法及び 分析法に関する研究

三重大学大学院 工学研究科
博士後期課程 材料科学専攻
418DD01 小林尚

目次

序論

第1章 本研究の背景

1.1 食品中の化学物質分析.....	7
1.2 食品中の化学物質の分析方法.....	7
1.3 ヒスタミンおよび遊離ヒスチジン.....	9
1.3.1 ヒスタミン.....	9
1.3.2 ヒスチジン.....	9
1.4 魚介類の腐敗とヒスタミンおよび遊離ヒスチジン.....	10
1.4.1 魚介類の腐敗と食中毒.....	10
1.4.2 ヒスタミンによる食中毒.....	10
1.4.3 ヒスタミン生成菌と生成機構.....	11
1.4.4 国内外におけるヒスタミンの規制.....	12
1.5 ヒスタミンおよび遊離ヒスチジンの定量分析法.....	13
1.5.1 ヒスタミンの定量分析法.....	13
1.5.2 遊離ヒスチジンの定量分析法.....	14
1.6 果糖、ブドウ糖およびショ糖.....	14
1.6.1 果糖.....	14
1.6.2 ブドウ糖.....	15
1.6.3 ショ糖.....	15
1.7 果実に含まれる糖類.....	16
1.8 糖類の定量分析法.....	16
1.9 本研究の目的.....	17

本論

第2章 ヒスタミンの生成と遊離ヒスチジンの変化に対する 魚介類の保存温度の影響

2.1 はじめに.....	31
---------------	----

2.2 実験	32
2.2.1 試料	32
2.2.2 試薬および試液	32
2.2.3 標準物質および標準原液	33
2.2.4 装置	34
2.2.4.1 高速液体クロマトグラフ	34
2.2.4.2 高速アミノ酸分析計	34
2.2.5 分析方法	34
2.2.5.1 試料の調製	34
2.2.5.2 試料溶液の調製	35
2.2.5.3 高速液体クロマトグラフによるヒスタミンの定量	36
2.2.5.4 高速アミノ酸分析計によるヒスチジンの定量	37
2.3 結果および考察	37
2.3.1 赤身魚のモデル試料	37
2.3.2 白身魚のモデル試料	39
2.3.3 その他魚介類のモデル試料	40
2.3.4 ヒスタミンと遊離ヒスチジンの相関	42
2.4 まとめ	43
第3章 果実類の糖分析における前処理方法の検討および糖含量の比較	
3.1 はじめに	91
3.2 実験	92
3.2.1 試料	92
3.2.2 試薬および試液	93
3.2.3 標準物質および標準原液	93
3.2.4 装置	93
3.2.5 分析方法	94
3.2.5.1 試料の調製	94
3.2.5.2 試料溶液の調製	95

3.2.5.3 高速液体クロマトグラフによる糖類の定量.....	95
3.3 結果および考察.....	96
3.4 まとめ.....	99
結論	
第4章 総括	
4.1 ヒスタミンの生成と遊離ヒスチジンの変化に対する 魚介類の保存温度の影響.....	124
4.2 果実類の糖分析における前処理方法の検討および糖含量の比較.....	124
4.3 今後の展望.....	126
謝辞.....	127
文献.....	128
本学位論文に関連する学術論文.....	137

序論

第 1 章 本研究の背景

1.1 食品中の化学物質分析

食品中の化学物質の分析は、一般的に、摂取することが望ましい食品由来の栄養成分の分析と、食品に含まれることが望ましくない有害成分の分析に大別される。前者は、たんぱく質や脂質、ビタミン、ミネラルなど、生命活動に必要な栄養素や、生活習慣病の予防といった機能性をもつ有効成分の分析である。後者は、食中毒菌やカビ毒、農薬など、摂取すると健康を害し、摂取量によっては重篤な疾病に繋がる有害性をもつ成分の分析である。

日常の食生活において、必要な栄養素をバランス良く摂取したり、食品や原材料の安全性を確保するため、分析化学が重要な役割を果たしている。食品においては、品質、安全性、機能性など、さまざまな項目に科学的根拠が求められており、その根拠を示すためにも分析化学が多用されている。例えば機能性評価に関して、多種多様な成分が混在する食品中から、特定の機能性成分を抽出し、その有効量を決定することが必須であり、さまざまな分離精製の分析技術により、成し遂げられている。安全性においても、有害成分や混入物について、その成分の有無や含有量を高精度に分析できなければならない。そこで、近年では、液体クロマトグラフィー（High performance liquid chromatography：HPLC）や、ガスクロマトグラフィー（Gas Chromatography：GC）といった分離検出技術が広く用いられ、これらの課題を解決している。消費者が安全な食品を安心して入手したり、生産者がより良い食品を提供するためには、信頼性の高い分析技術が不可欠であり、食品中の化学物質分析は、健康の維持・増進や、国内外に流通する食品の安全性確保などに重要な役割を果たしている。

1.2 食品中の化学物質の分析方法

食品中の化学物質分析の一般的な流れは、試料の粉碎・均質化、分析対象物質の抽出、不純物の除去（精製）、分析対象物質の測定に大別される。

「試料の粉碎・均質化」は、試料から分析対象物質を抽出し易くすること、また分析操作における試料採取時に、試料を代表する部位を採取できるよう均

一化することを目的とする操作である。一般的な食品は、動物試料や植物試料、固形試料や液体試料など試料の状態がさまざまである。特に固形試料において、固形状態のまま、試料の内部から分析対象物質を抽出することは困難である。また、分析対象物質が食品中に均一に存在することは稀であり、分析時に採取する部位により濃度差が生じる。一般的な分析操作では、試料の数 g 程度を採取することが多く、採取する数 g の試料の状態について、試料の内部から分析対象物質が抽出し易いよう細かく粉碎し、かつ分析対象物質が均一な状態とするため、試料の粉碎・均質化の操作を行う。この操作は、分析対象物質の抽出効率に関わり、試料全体を代表する分析結果とするためにも重要な操作である。

「分析対象物質の抽出」は、試料から分析対象物質を抽出溶媒へ移行させる操作である。抽出溶媒は、分析対象物質を十分に溶解し、かつ試料への浸透性を有する溶媒を選択する必要がある。一般的には、エタノール、アセトニトリルなどの有機溶媒が用いられることが多く、塩酸溶液、水酸化カリウム溶液といった酸・アルカリが用いられることもある。試料に抽出溶媒を加え、振とう器やホモジナイザーを用いて試料と抽出溶媒を接触させることで抽出を行う。

「不純物の除去(精製)」は、分析対象物質以外の成分を除去する操作である。抽出の操作で得られた抽出液中には、試料由来の分析対象物質以外の食品成分(食品マトリクス)が多量に存在していることが殆どであり、食品マトリクスは分析上の妨害物質となり、誤検出や測定不良の要因となる。食品マトリクスの量が多いほど影響も大きくなるため、適切な分析結果を得るためには、出来る限りの食品マトリクスの除去が必要である。主な精製法として、液液抽出法(Liquid liquid extraction : LLE)、固相抽出法(Solid phase extraction : SPE)が挙げられる。どちらも基本的な原理は、二相間での溶質の分配に基づくものである。一般的な LLE の操作を、図 1.1 に示す。

「分析対象物質の測定」は、分析対象物質を検出できる測定器を用いて、分析対象物質の有無を確認することや、その量を測る操作である。抽出や精製の操作によって食品マトリクスを完全に除去することは困難なことが殆どであるため、近年では、ガスクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーと検出器を組み合わせた分析機器を用いることが多い。クロマトグラフィーにより

分析対象物質と食品マトリクスを分離し検出させることで、より食品マトリクスの影響を除いた分析対象物質の測定が可能となる。

食品中の化学物質分析の操作や使用機器の例を図 1.2 に示す。

1.3 ヒスタミンおよび遊離ヒスチジン

1.3.1 ヒスタミン

ヒスタミン (histamine) とは、分子式 $C_5H_9N_3$ 、分子量 111.14 の活性アミンであり、アミノ酸の一種のヒスチジンの誘導体である。遊離のヒスチジンが多く含まれているマグロ類、カツオ類、サバ類などの赤身魚を加工、保管する際に、加工温度や保管時間において不適切な管理が行われた結果、魚に存在する細菌の一種であるヒスタミン生成菌が増殖し、このヒスタミン生成菌によって遊離のヒスチジンからヒスタミンが生成される。

ヒスタミンが多く含まれる魚や加工品を摂取した場合、その摂取量によってアレルギー様の食中毒を発症することが知られている。症状としては、発疹、顔面紅潮、頭痛、吐き気、嘔吐、下痢、動悸、目の充血、腹痛などが報告されている [1]。ヒスタミンは熱に安定であるため、加工や加熱による分解がされず、一度生成されると調理済みの食品であっても食中毒の発生原因となる。

ヒスタミンは、魚のほか、ワインやチーズなどの発酵食品にも含まれることが報告されている [2]。

1.3.2 ヒスチジン

ヒスチジン (histidine) とは、分子式 $C_6H_9N_3O_2$ 、分子量 155.15 のアミノ酸である。たんぱく質を構成する 20 種類のアミノ酸の一つであり、体内で合成することができない必須アミノ酸である。特に乳幼児の成長に必須なアミノ酸とされている。また、アレルギー反応に関与するヒスタミンの前駆体であることが知られている [3]。

日本においては、食品添加物としての使用が認められている化合物であり、指定添加物として L-ヒスチジン塩酸塩、既存添加物として L-ヒスチジンが、と

もに調味料、強化剤として用いられており、使用基準は定められていない[4]。

L-ヒスチジンは、育児用調整粉乳などの栄養食品にも広く利用されているほか、ヒト用医薬品としてアミノ酸輸液、経口、経腸栄養剤などに使用されている[5]。

1.4 魚介類の腐敗とヒスタミンおよび遊離ヒスチジン

1.4.1 魚介類の腐敗と食中毒

日本では、魚介類は重要な栄養源として、古くから食されてきた。しかし、魚介類は保存性が悪く、腐敗しやすい。また、日本においては魚介類を生で喫食することも多く、腐敗により増殖した微生物に起因する食中毒が毎年多く発生している。

厚生労働省による統計資料より、令和2年(1月~12月)に発生した食中毒は総数883件と報告されている。このうち魚介類および魚介類加工品による食中毒は、計312件であり、原因食品の中で最も割合が多く、約35%を占めている[6]。このことから、魚介類の取り扱いや微生物の増殖に対する対策は、食の安心・安全に関する取り組みとして、食品事業者や消費者にとって非常に重要であると考えられる。魚介類による食中毒の発生防止については、各都道府県や市町村から多くの注意喚起がなされている[7][8][9]。

1.4.2 ヒスタミンによる食中毒

近年、魚介類における加工技術や流通技術の発達に伴い、食中毒のリスクは低減している傾向が確認される。厚生労働省による統計資料より、生の魚介類における食中毒の代表的な食中毒菌である腸炎ビブリオによる食中毒患者数は、1998年には約12000人と報告されているが、過去5年の間では250人以下まで減少している。

食中毒統計における化学物質による代表的な食中毒として、マグロ、イワシ、サンマなどの赤身魚を原因とするヒスタミンの食中毒が挙げられる。ヒスタミン食中毒は、発生件数は多くないものの、大量調理施設や飲食店、家庭などの

身近なところで発生し、2011年からの10年間において、毎年数件から数十件発生し、数十人から数百人の患者数が報告されている。また、2011年から2015年の5年間と2016年から2020年の5年間の平均を比較すると、発生件数、患者数ともに増加している。2011年から2020年のヒスタミンによる食中毒発生状況を図1.3に示す。

食中毒全体のうち、化学物質性食中毒の殆どはヒスタミン食中毒であり、ヒスタミン食中毒についての統計に関する研究の報告もなされている[10]。報告によると、最も多く発生した施設は飲食店であり、原因食品はマグロ、イワシが大半を占める。また、主な発生原因は、流通過程による原材料の汚染、温度管理不良、室温放置、長期保存であると報告されている。

ヒスタミンによる食中毒の実例として、平成3年に発生した自宅でのウルメイワシ干物による食中毒（患者数1人）、平成21年に発生した保育所でのカジキマグロの竜田揚げによる食中毒（患者数45人）、平成25年に発生した保育所でのイワシのつみれ汁による食中毒（患者数109人）と、数人から百人を超える患者数となる場合もあり、食中毒の予防策として、官公庁によるヒスタミン食中毒事例の紹介や、注意喚起も多い[2][11][12][13]。

1.4.3 ヒスタミン生成菌と生成機構

食品におけるヒスタミンの生成と蓄積は、ヒスタミン生成菌の働きのみによって起こると報告されている[14]。ヒスタミンを生成するヒスタミン生成菌に関する研究は古くからなされており、ヒスタミン生成菌の種類や特徴が示されている[15]、[16]、[17]。

ヒスタミン食中毒の原因菌として最も報告の多い細菌は、*M. morgani* であることが知られている。この細菌は、腸内細菌科のグラム陰性菌であり、オキシターゼ陰性、カタラーゼ陽性、周毛性の鞭毛で運動する細菌である。増殖至適温度は37℃であり、10℃～43℃で増殖し、pH=4.5以上で増殖できる。通性嫌気性で、グルコースとマンノースを分解して酸とガスを産生する[18]。

海洋由来の主なヒスタミン生成菌として、低温性と中温性の2種、*Photobacterium phosphoreum* (*P. phosphoreum*) および *Photobacterium damsela*

(*P. damselae*)が報告されている。*P. phosphoreum*は、単極毛で運動するグラム陰性桿菌であり、グルコースを分解し、酸とガスを産生する通性嫌気性菌である。増殖至適温度は 20 付近であり、2.5 では増殖するが 35 では増殖できない低温菌である。また食塩無添加の培地では増殖できず、至適食塩濃度が約 2%の好塩菌である。増殖下限 pH は 4.6 付近である。*P. damselae*も *P. phosphoreum*と同様に単極毛で運動するグラム陰性桿菌であり、グルコースを分解し、酸とガスを産生する通性嫌気性の好塩菌である。増殖温度は *P. phosphoreum* と異なり、35 で増殖し、4 では増殖できない中温菌である。

これらヒスタミン生成菌の特徴から、ヒスタミン生成菌によって増殖至適温度や至適食塩濃度が異なるため、魚介類に存在するヒスタミン生成菌の種類によって、一般的な冷蔵温度である約 5 でもヒスタミン生成菌が増殖し、ヒスタミンが生成されることにより、ヒスタミン食中毒が発生する可能性がある。

ヒスタミン生成菌は、菌自身を持つヒスチジン脱炭酸酵素 (Histidine decarboxylase : HDC) により、魚肉に含まれる遊離のヒスチジンを脱炭酸し、ヒスタミンへと変化させる。遊離ヒスチジンからヒスタミンが生成される反応機構を図 1.4 に示す。

HDC はグラム陰性菌由来のものと、グラム陽性菌由来のもの 2 種類に分けられ、前者がピリドキサル五リン酸 (PLP) 依存型 HDC であり、後者がピルポイル型 HDC であると報告されている [14]。HDC は酵素であるため、ヒスタミン生成菌が殺菌され死滅した場合も、酵素自体が活性を有している場合、酵素単独でも遊離ヒスチジンをヒスタミンに変化させる。そのため、魚介類を凍結保存し、ヒスタミン生成菌が死滅したとしても、HDC は活性を維持し続け、徐々にヒスタミンが生成されることにより、ヒスタミン食中毒が発生する危険性がある。

1.4.4 国内外におけるヒスタミンの規制

日本においては、現在のところヒスタミンに対する基準値や規制は定められていないが、各都道府県における食品の流通実態や食中毒の発生状況から、食品衛生法に基づき、流通する食品や飲食店などの監査指導が行われている。国内におけるヒスタミンに対する監査指導について表 1.1 に示す。

国際機関や諸外国においては、リスク評価機関がヒスタミンについてのハザード評価を行っている[2]。欧州食品安全委員会（EFSA）では、ヒスタミンのヒトに対する無毒性量（NOAEL：No-Observed-Adverse-Effect Level）である 50 mg（大人一食あたりの量）から、ヒトが 24 時間またはそれより短い時間経口摂取した場合に健康に悪影響を示さないと推定される一日当たりの摂取量である急性参照用量（ARfD：acute reference dose）を、健康な大人一人あたり 50 mg としている。WHO/FAO 合同専門家会議では、EFSA が定めたヒトのヒスタミンの無毒性量である 50 mg が採用され、この量は健康な人でヒスタミンによる食中毒を発症しない量であると考えられている。また各国の栄養調査や魚・水産加工品の消費データから求めた一食当たりの魚類の最大摂取量 250 g と、ヒスタミンの閾値 50 mg を基に、ヒスタミンの最大許容濃度を 200 mg/kg としている。

食品中のヒスタミン濃度については、国際機関などによって基準値が定められている。Codex 委員会、諸外国におけるヒスタミンの基準値を表 1.2、表 1.3 に示す。

1.5 ヒスタミンおよび遊離ヒスチジンの定量分析法

1.5.1 ヒスタミンの定量分析法

ヒスタミンの定量分析法としては、いくつかの方法が示されている。国際的に用いられている方法であり、アメリカ食品医薬品局（FDA：Food and Drug Administration）や米農務省（USDA：United States Department of Agriculture）において広く用いられている AOAC 法（Official Methods of Analysis of AOAC International）には 3 つのヒスタミン分析法（954.04，957.07 および 977.13）がある。954.04 はモルモット小腸を用いてキモグラフで測定する生化学的試験であり、957.07 および 977.13 はヒスタミンをカラム分画した後、誘導體化したものを可視吸収または蛍光強度で測定する方法である。

最近では、感度が良く、ヒスタミン以外の夾雑成分との分離ができる方法として、高速液体クロマトグラフを用いた分析方法が一般的に用いられている。この方法は、国内において広く用いられている食品衛生検査指針[19]や、衛生

試験法・注解[20]に不揮発性アミンの分析方法として掲載されている方法である。また、この方法ではダンシルクロリド（ダンシルクロライド）を用いて誘導体化し、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフで測定する方法とされているが、一部変更した方法として、紫外吸収検出器付き高速液体クロマトグラフで測定する方法も示されている[21]。不揮発性アミンのダンシルクロリド反応を図 1.5 に示す。

1.5.2 遊離ヒスチジンの定量分析法

遊離ヒスチジンの定量分析法は、遊離アミノ酸の分析法としていくつかの報告がなされている。遊離アミノ酸の抽出方法としては、蒸留水を用いて抽出する方法[22]、酸性溶媒（スルホサリチル酸溶液）を用いて抽出する方法[23]、75%エタノール溶媒や熱水を用いて抽出する方法[24]など、さまざまな方法が示され、何れも水や高極性の溶媒を用いて遊離のアミノ酸を抽出する方法である。また、抽出したアミノ酸を検出する方法としては、アミノ酸には特徴的な紫外・可視の吸収域や蛍光性の無い化合物がほとんどであることから、一般的にアミノ基を選択的に修飾して、可視や蛍光性物質に変化させる誘導体化を行い、検出させる方法が用いられる。また多くのアミノ酸を感度良く一斉分析する専用機器として、アミノ酸分析計も用いられている。国内において用いられている主要なアミノ酸分析計である L-8900（株式会社日立ハイテク）は、ニンヒドリンを分析試薬として用いるポストカラム誘導体化法により、アミノ酸を誘導体化し、検出させている[25]。アミノ酸のニンヒドリン反応を図 1.6 に示す。そのほかにも、ダンシルクロリド(DABS-Cl)を反応試薬として用いたプレカラム誘導体化法や、オルトフタルアルデヒド(OPA)を反応試薬として用いたポストカラム誘導体化法も用いられている。アミノ酸のダンシルクロリド反応と、オルトフタルアルデヒド反応を図 1.7 および図 1.8 に示す。

1.6 果糖、ブドウ糖およびショ糖

1.6.1 果糖

果糖(フルクトース)は、分子式 $C_6H_{12}O_6$ 、分子量 180.16 の糖類の一種である。ケトン基をもつ六単糖(ケトヘキソース)であり、ケトースに属する化合物である。ブドウ糖と共に、ショ糖の構成成分として知られている。甘味はショ糖の 1.3~1.7 倍とされており、糖類の中でもっとも強い。果物やハチミツなどに多く含まれる甘味の代表的な成分である[26]。

広く食品中に存在し、ショ糖の構成成分として摂取されると、小腸のスクラーゼにより果糖とブドウ糖に加水分解され、吸収される[27]。近年では、菓子類やソフトドリンクなどの嗜好品に多く用いられていることから摂取量が増大している。一般的な食品に含まれている量を適切に摂取する場合は安全であるとされているが、過剰摂取は中性脂肪の蓄積をまねき、コレステロールの合成を促進するため、注意が必要とされている。

1.6.2 ブドウ糖

ブドウ糖(グルコース)は、分子式 $C_6H_{12}O_6$ 、分子量 180.16 の糖類の一種である。果糖と共に、ショ糖の構成成分として知られている。甘味はショ糖の 0.7 倍とされており、果物や穀類などに多く含まれる成分である。

天然にもっとも広く分布している単糖であり、植物の光合成によって作られることが知られている。穀類やいも類はブドウ糖をデンプンという形で蓄えており、食べ物から摂取されると、消化吸収を通してブドウ糖に分解され、エネルギー源として利用される。脂質よりも早く分解吸収されるため、運動で消耗した時や、糖尿病などインスリンの異常で血糖値が低くなり過ぎた場合、素早くエネルギーを補給し血糖値を上げるのに適している。また、脳がエネルギーとして利用できる唯一の物質であり、人体にとっても重要な栄養素である[28][29]。

1.6.3 ショ糖

ショ糖(スクロース)は、分子式 $C_{12}H_{22}O_{11}$ 、分子量 180.16 の糖類の一種である。単糖である果糖とブドウ糖が α -1,2-グリコシド結合した二糖類である。

もっとも代表的な糖類の一つであり、サトウキビや甜菜から抽出され、精製

過程を経て作られ、グラニュー糖、上白糖、黒糖などの主成分である。日本においては、約 4 割が、国内で生産された原料をもとに作られ、残りの 6 割は、海外から輸入された粗糖が国内の工場で精製され作られている[30]。また、甘味料の甘味の強さを評価する「甘味度 (かんみど)」の基準となる糖である。

摂取されたショ糖は、小腸壁に存在する消化酵素であるサッカラーゼ (インベルターゼ) により、果糖とブドウ糖に加水分解され、小腸で吸収されて血流に入る。この反応は短時間で起こり、血糖値を急激に上昇させる。エネルギー源として重要である一方、砂糖の摂取による虫歯の発症や、肥満を誘発する原因とされることから、過剰摂取に対する注意喚起が多くなされている[31]。

1.7 果実に含まれる糖類

果物 (果実) には、ビタミン・ミネラル・食物繊維などの多くの栄養成分が含まれている。果実が野菜と異なる点は、糖質 (糖類) を多く含むものが多いことである。果実には、主に果糖、ブドウ糖、ショ糖の 3 種類の糖が含まれることが知られている[32]。

果実に含まれる糖類に関しては、果実の食味に大きく関与する成分であり、近年では食味を重視した品種改良も盛んに行われていることから、果実の品種間における糖の含有量の違いや糖組成に関するさまざまな研究が報告されている[33][34]。また、果実は収穫時期、貯蔵によって糖組成が変化し、食用に適した美味しい状態にする追熟や、焼く・蒸すなどの加熱調理によっても糖組成が変わることから、より美味しく食すため、糖に関する多くの研究が報告されている[35][36][37]。

1.8 糖類の定量分析法

日本における糖類の定量分析法としては、食品表示法 (平成二十五年法律第七十号) に基づいて定められた食品表示基準の栄養成分等の分析方法等 (以下、表示基準の分析法) に、糖類の分析法が記載されている[38][39]。食品表示基

準には、さまざまな表示のルールが定められており、食品の製造者、加工者、輸入者、販売者などに対して、食品表示基準の遵守が義務付けられている。そのため、表示基準の分析法は、日本において最も広く用いられている分析法の一つである。食品表示基準では、糖類とは、単糖類または二糖類であって、糖アルコールでないものとされている。単糖類である果糖およびブドウ糖と、二糖類であるショ糖も食品表示基準における糖類に分類される。表示基準の分析法には、食品中の糖類を、水もしくは 50 v/v% エタノールを用いて抽出し、塩類や脂質を多く含む食品の場合には電気透析装置を用いた脱塩や、石油エーテルを用いた脂質の除去を行った後、トリメチルシリル化を行いガスクロマトグラフで測定するガスクロマトグラフ法と、ガスクロマトグラフ法と同様に抽出した糖類の抽出液を屈折率検出器付き高速液体クロマトグラフで測定する高速液体クロマトグラフ法が記載されている。一般的には、操作が簡易であり、装置の安定性や再現性が良好な高速液体クロマトグラフ法が多く用いられている。

1.9 本研究の目的

本研究では、食品中に存在する有害物質や、栄養成分に関する調査、分析技術の開発、評価を行うことで、より安心で安全な食品の流通や、よりよい食生活に繋げることを目的としている。食品中の有害物質を摂取したことにより、毎年多くの患者が発生する食中毒について、その発生原因や挙動に関する調査研究は、食中毒の発生を防ぎ、より安全な食品の流通や加工、摂取のため不可欠である。また、食品を摂取する際に、美味しく食べるということは、我々の食生活において重要な要素であり、より美味しい食べ物を作ることは、農業従事者や食品事業者にとって重要な課題の一つである。栄養成分の中でも美味しさに関する成分について、より正確な分析結果を得ることは、美味しい食べ物を作り、食べることに繋がり、豊かな食生活を得られることが期待できる。

第 2 章では、魚介類の保存における遊離ヒスチジンとヒスタミンの変化に関して調査した。食品、主に魚介類を食した際に発生する食中毒のうち、ヒスタミンによる食中毒は、化学物質による食中毒の原因として最も多い。そのため、

ヒスタミンに関する研究は多くなされており、赤身魚に多く含まれる遊離ヒスチジンからヒスタミンが生成され、アレルギー様食中毒を発症することは広く知られている。しかしながら、魚介類に存在する遊離ヒスチジン量と、生成されるヒスタミン量について調べ、その相関性に関して研究した報告はみられない。また、ヒスタミン食中毒の主な原因とされている赤身魚に関する報告は多くなされているが、白身魚や、その他の魚介類についての報告は少ない。魚介類に含まれる遊離ヒスチジン量と、保存によって生成されるヒスタミン量の変化を調査し、その相関性を研究することで、ヒスタミンの生成に対する遊離ヒスチジンの関係を明らかにし、ヒスタミン食中毒の知見を広げ、食の安心・安全を担保した食生活が送れるようになることを期待する。

第 3 章では、果実類の糖分析における前処理方法とショ糖分解酵素の影響に関して調査した。糖類が多く含まれる代表的な食品である果実において、糖類の分析操作中にショ糖分解酵素の影響を受け、果実に含まれる糖の含量や糖組成が変化することが知られている。そのため、果実本来の糖含量を、分析結果として得ることが困難である。本来と異なる糖組成や糖含量の分析結果が得られた場合、その分析結果をもとにした美味しさの評価や、品種改良などが行われることは、目的と異なる結果に繋がる恐れがある。果実における正確な糖含量を分析するための前処理方法を検討し、ショ糖分解酵素の影響や、検討した前処理方法による分析結果を比較調査することで、より正確な分析結果が得られる糖類の分析法の構築に繋がり、適切な美味しさの評価や、正しい知見に基づいた考察ができることで、より美味しい食品の生産や豊かな食生活に繋がることを期待する。

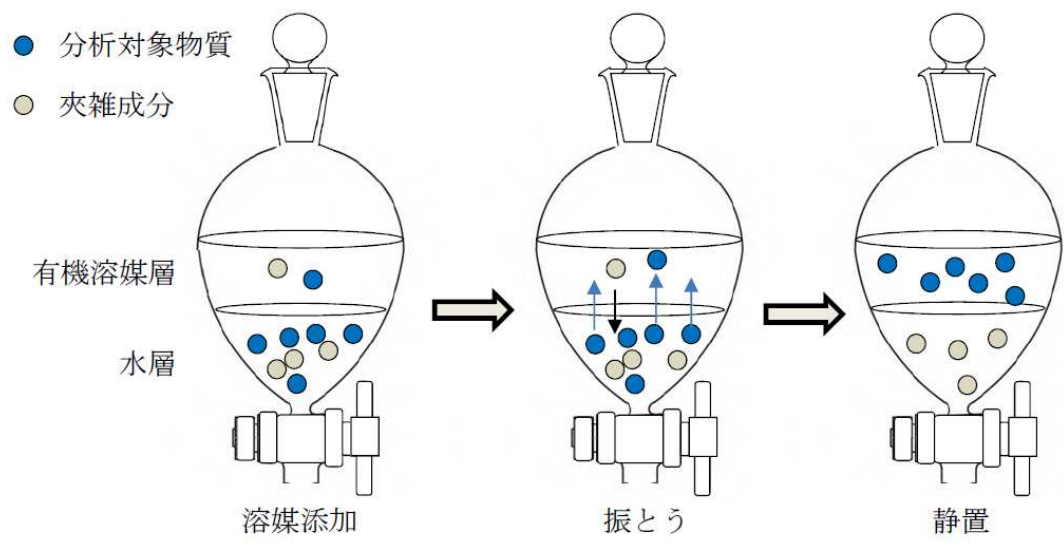


図 1.1 一般的な LLE の操作

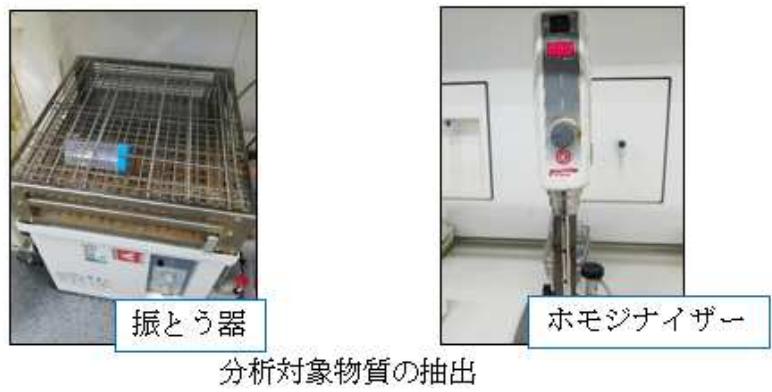


図 1.2 食品中の化学物質分析の操作・使用機器の例



図 1.3 ヒスタミンによる食中毒発生状況（厚生労働省）

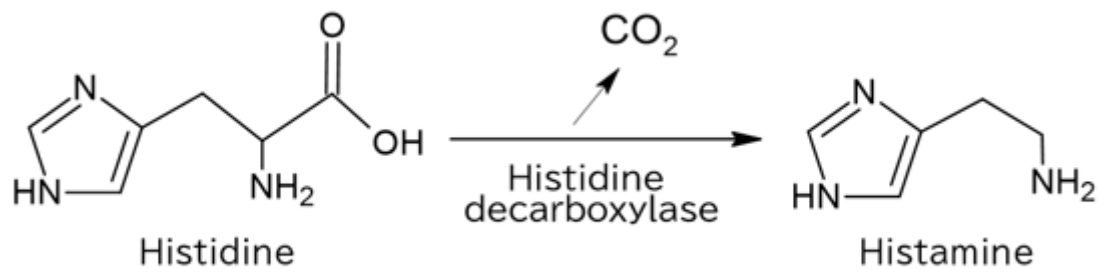


図 1.4 遊離ヒスチジンからヒスタミンが生成される反応機構

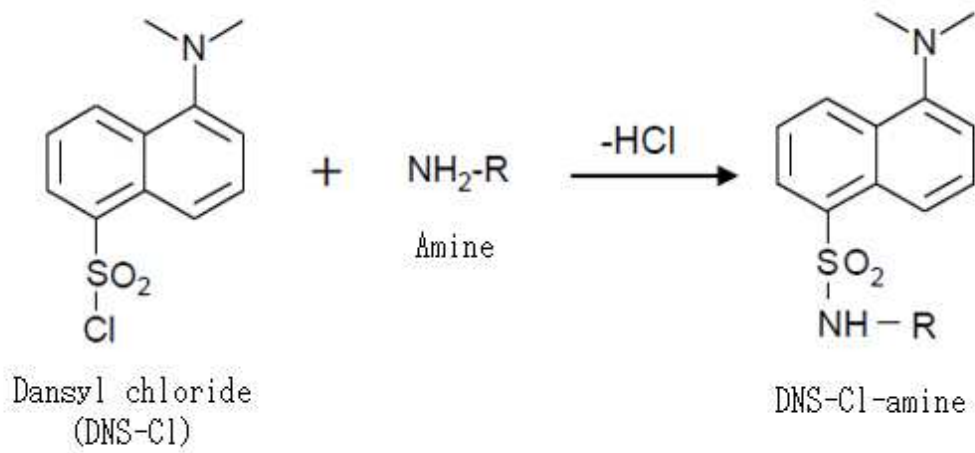


図 1.5 不揮発性アミンのダンシルクロリド反応

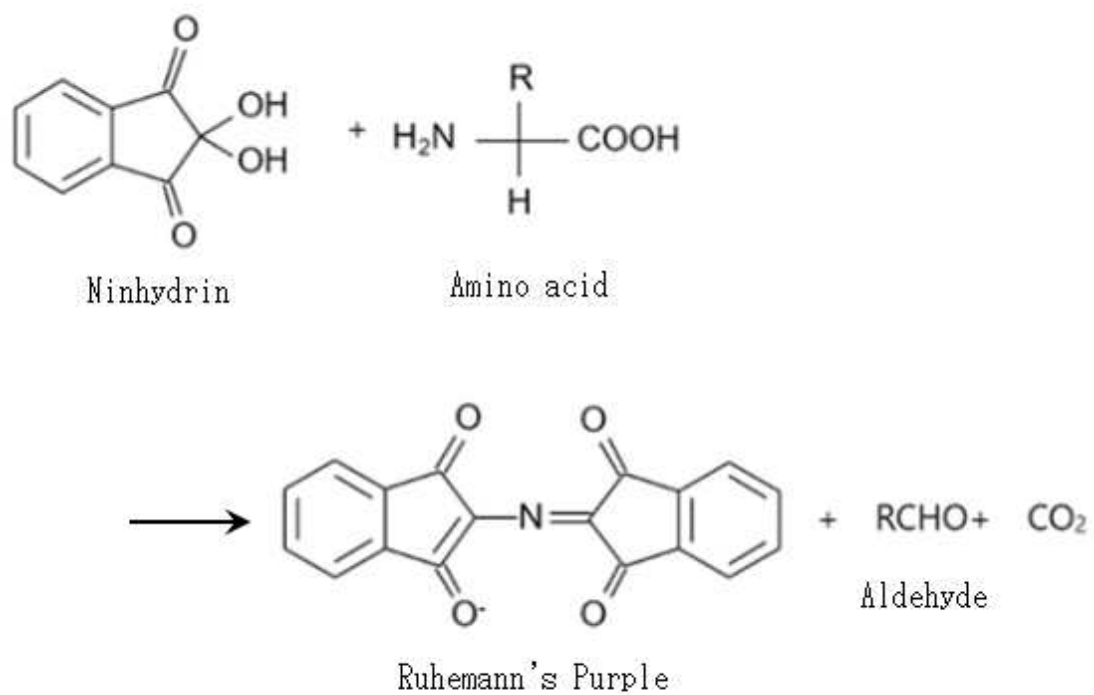


図 1.6 アミノ酸のニンヒドリン反応

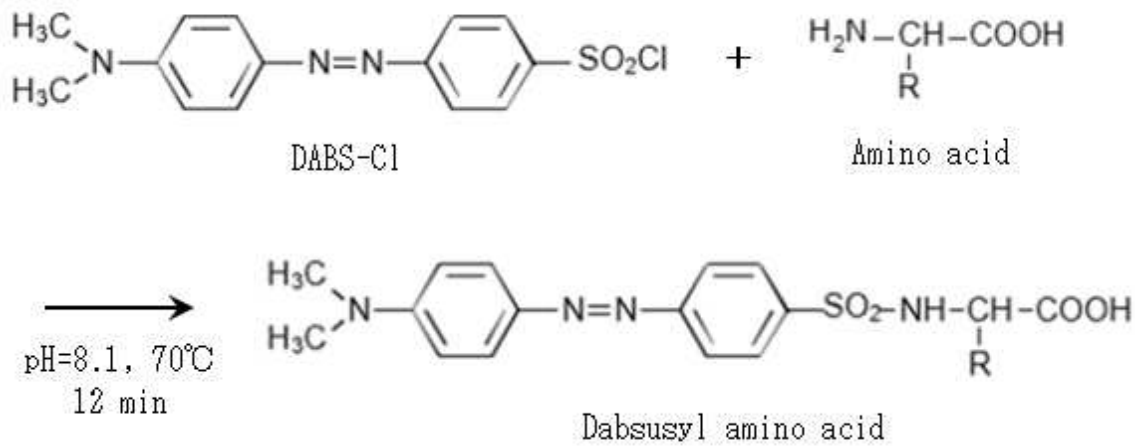


図 1.7 アミノ酸のダンシルクロリド反応

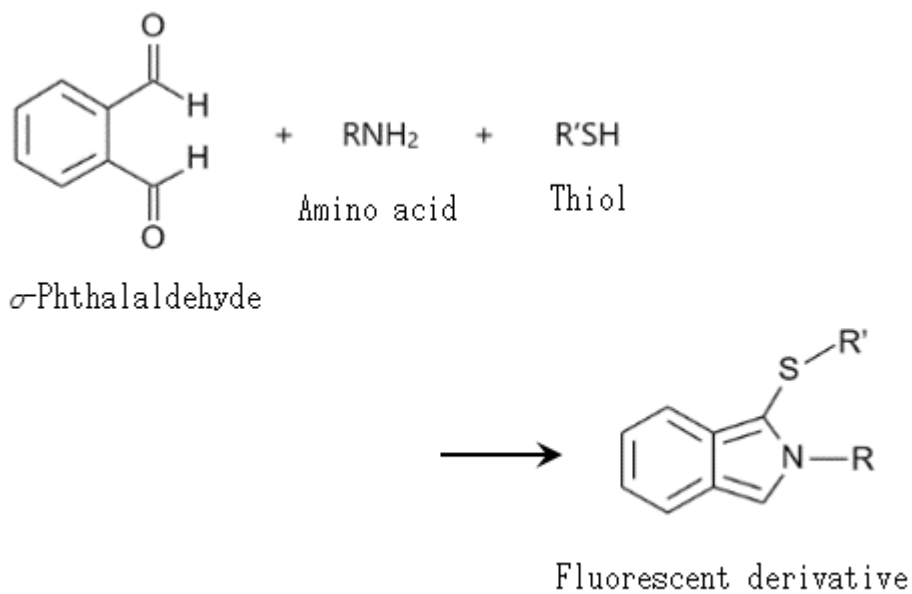


図 1.8 アミノ酸のオルトフタルアルデヒド反応

表 1.1 国内におけるヒスタミンに対する監査指導

指導・規制当局	内容
<p>食品安全委員会</p>	<p>ヒスタミン食中毒の対策について「魚を保存する場合は、速やかに冷蔵・冷凍し、常温での放置時間を最小限とする衛生管理を徹底する。</p> <p>ひとたび蓄積されたヒスタミンは加熱をしても分解しないため、鮮度が低下した恐れのある魚は食べないこと。また、ヒスタミンが高濃度に蓄積されている食品を口に入れたときに唇や舌先に通常と異なる刺激を感じる場合があるので、そのような場合は食べずに処分すること。」としている。</p>
<p>厚生労働省</p>	<p>都道府県知事等は、必要があると認めるときは営業者その他の関係者から必要な報告を求め、営業上使用する食品等の検査を行うことができるとされており、国内に流通する食品や飲食店等の監視指導は、各都道府県等における食品流通等の実態や食中毒の発生状況等の地域実情を踏まえ策定した監視指導計画に従って、施設への立入調査、製品の収去検査等を実施している。(食品衛生法第24条、第28条)</p> <p>水産加工業者を含む原則として全ての食品等事業者においては、政令で定める日(令和2(2020)年6月1日)から、HACCPに沿った衛生管理等の実施に取り組むことが求められることとなっている。(「食品衛生法等の一部を改正する法律」(平成30年法律第46号))</p>

表 1.2 Codex 委員会におけるヒスタミンの基準値

品目	品質基準	衛生基準
急速冷凍された魚（骨付き及び骨抜き）	10 mg/100g （サバ, サンマ, ニシン, シイラ, オキスズキ）	20 mg/100g （サバ, サンマ, ニシン, シイラ, オキスズキ）
マグロ類及びカツオの缶詰	10 mg/100g	20 mg/100g
イワシ及びイワシ製品	10 mg/100g	20 mg/100g
魚類の缶詰	10 mg/100g （サバ, サンマ, ニシン, シイラ, オキスズキ）	20 mg/100g （サバ, サンマ, ニシン, シイラ, オキスズキ）
急速冷凍された魚の切り身ブロック、魚のすり身、及びそれらの混合物	10 mg/100g （サバ, サンマ, ニシン, シイラ, オキスズキ）	20 mg/100g （サバ, サンマ, ニシン, シイラ, オキスズキ）
急速冷凍されたフィッシュスティック、魚の切り身（パン粉又は衣付き）	10 mg/100g （サバ, サンマ, ニシン, シイラ, オキスズキ）	20 mg/100g （サバ, サンマ, ニシン, シイラ, オキスズキ）
急速冷凍された魚の切り身	10 mg/100g （サバ, サンマ, ニシン, シイラ, オキスズキ）	20 mg/100g （サバ, サンマ, ニシン, シイラ, オキスズキ）
塩漬けアンチョビーの煮干	10 mg/100g	20 mg/100g
塩漬けニシン及び塩漬けスプラット	10 mg/100g	20 mg/100g
魚醤		40 mg/100g

表 1.3 諸外国におけるヒスタミンの基準値

国名	内容
EU	<p>ヒスチジン含有量が多い魚類由来の魚介類食品</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 1ロット当たり9検体について検査を行い、以下のヒスタミン量の基準で判定 ・ 全ての検体の平均値がヒスタミン 100 mg/kg を超えない ・ うち2検体はヒスタミン 100 mg/kg 以上 200 mg/kg 未満でも可 ・ 全ての検体がヒスタミン 200 mg/kg を超えない <p>ヒスチジン含有量が多い魚類を塩水中で酵素による熟成工程を経た魚介類製品（魚醤を除く。）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 1ロット当たり9検体について検査を行い、以下のヒスタミン量の基準で判定 ・ 全ての検体の平均値がヒスタミン 200 mg/kg を超えない ・ うち2検体はヒスタミン 200 mg/kg 以上 400 mg/kg 未満でも可 ・ 全ての検体がヒスタミン 400 mg/kg を超えない <p>魚醤（魚介類製品の発酵によって得られた液体）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 1バッチ当たり1検体について検査を行い、ヒスタミン 400 mg/kg を超えない
米国	<p>（腐敗しているか否かを判断するための基準）</p> <p>マグロ、シイラ：少なくとも2検体でヒスタミン濃度が 50 mg/kg 以上 マグロ、シイラ以外の魚：少なくとも2検体でヒスタミン濃度が 50～500 mg/kg ・健康への有害影響：1検体が 500 mg/kg 以上</p>
カナダ	<ul style="list-style-type: none"> ・ アンチョビー、魚醤、発酵させた魚ペースト：200 mg/kg ・ その他魚類及び魚製品：100 mg/kg
オーストラリア・ニュージーランド	<p>魚及び魚製品中のヒスタミン濃度の上限値：200 mg/kg</p>

第2章 ヒスタミンの生成と遊離ヒスチジンの 変化に対する魚介類の保存温度の影響

2.1 はじめに

日本は海に囲まれた島国であり、魚介類が豊富に採れたことから、魚介類は古くから日本人の食生活に密接に関わっている食品の一つである。煮魚、焼き魚といった加熱調理のほか、刺身に代表される生の魚も日常的に喫食されている。そのため、魚介類による食中毒も多く発生している。化学性食中毒の最も多い原因物質はヒスタミンであり、主に遊離ヒスチジン含量の多い赤身魚を喫食して発生する。そのため、ヒスタミンの生成や、魚介類に含まれる遊離ヒスチジンおよびヒスタミン含量の調査、研究を行い、ヒスタミン食中毒の知見とすることは、食中毒の防止、食の安心・安全の確保のため重要である。また、ヒスタミンの生成や、ヒスタミン食中毒の危険性を予測することは困難とされており、予防法としては、魚介類を保存する場合には速やかに冷蔵および冷凍し、常温での放置時間を最小限とすることや、鮮度が低下した可能性のある魚は食べないといった一般的な食中毒と同様の方法が、ヒスタミン食中毒の予防法として示されている。

魚介類のヒスタミンについての研究は、古くからなされており、市販されている鮮魚および魚介類加工品についてヒスタミン含有量の調査を行った結果、総数 637 検体のうち、約 1 割もの 66 検体から、5~340 mg/100g の範囲で検出され、中毒が発生するとされている 100 mg/100g を超えた検体もあったと報告されている[40]。また、多くの魚介類は冷凍して輸送された後、解凍し加工されることから、冷解凍や保存条件がヒスタミンの生成に及ぼす影響を調査した報告もなされている。冷凍カツオを用いた研究では、比較的高い温度で解凍した場合、細菌による腐敗の前にヒスタミンが蓄積する危険性が示唆されており、細菌の変化からヒスタミン量の蓄積を予測することが困難であることが示されている[41]。遊離ヒスチジンからヒスタミンを生成するヒスタミン生成菌に関する研究では、菌種による増殖至適温度、至適食塩濃度や増殖可能な pH が異なること、また季節によって出現するヒスタミン生成菌が異なることや、海域によっても菌種が異なることが示されている[18]。これらの主に赤身魚に関するヒスタミンの生成や、ヒスタミン生成菌に関する研究は多くなされているが、魚介類の保存におけるヒスタミンの生成量と、ヒスタミン生成の元である遊離

ヒスチジン量の変化を調査し、その相関性について研究した報告はみられない。また、白身魚を原因とするヒスタミン食中毒について、件数は少ないものの事例の報告[42]はなされているが、白身魚やその他の魚介類についてのヒスタミンに関する研究や報告は少ない。

本研究では、赤身魚、白身魚と、その他魚介類を対象として、温度を変えて保存し、保存日数ごとのヒスタミン含量と遊離ヒスチジン含量を分析し、保存温度と保存日数によるヒスタミン含量と遊離ヒスチジン含量の変化、およびその相関性について研究した。

2.2 実験

2.2.1 試料

実験に用いた試料は、三重県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赤身魚、白身魚、およびその他魚介類を用いた。

赤身魚：

ビンナガマグロ、キハダマグロ、天然ブリ、養殖ブリ、真アジ、真サバ、サンマ、カツオ、真イワシ、ヒラマサ

白身魚：

真ダイ、真ダラ、銀サケ、メカジキ、ワカサギ

その他魚介類：

紋甲イカ、バナメイエビ、ホタテ

2.2.2 試薬および試液

使用する水は、オルガノ株式会社製のカートリッジ純水器 G-10 および同純水器用ポリプロピレンフィルターと活性炭フィルターでろ過した精製水を用いた。

ヒスタミンの分析においては、以下の試薬および試液を用いた。

トリクロロ酢酸（試薬特級）：シグマアルドリッチジャパン合同会社製

炭酸ナトリウム（試薬特級）：ナカライテスク株式会社製

塩酸（試薬特級）：関東化学株式会社製

ダンシルクロライド (けい光分析用): 関東化学株式会社製
アセトン (試薬特級): ナカライテスク株式会社製
プロリン: 関東化学株式会社製
トルエン (試薬特級): 関東化学株式会社製
アセトニトリル (高速液体クロマトグラフィー用): 関東化学株式会社製
遊離ヒスチジンの分析においては、以下の試薬および試液を用いた。
無水エタノール (99.5): キシダ化学株式会社製
塩酸 (試薬特級): 関東化学株式会社製
生体液分析法用緩衝液 PF-1 KANTO (日立高速アミノ酸分析計用)
: 関東化学株式会社製
生体液分析法用緩衝液 PF-2 KANTO (日立高速アミノ酸分析計用)
: 関東化学株式会社製
生体液分析法用緩衝液 PF-3 KANTO (日立高速アミノ酸分析計用)
: 関東化学株式会社製
生体液分析法用緩衝液 PF-4 KANTO (日立高速アミノ酸分析計用)
: 関東化学株式会社製
生体液分析法用緩衝液 PF-RG KANTO (日立高速アミノ酸分析計用)
: 関東化学株式会社製
ニンヒドリン溶液 (日立用ニンヒドリン発色溶液キット)
: 和光純薬株式会社製
緩衝液 (日立用ニンヒドリン発色溶液キット)
: 和光純薬株式会社製

2.2.3 標準物質および標準原液

ヒスタミンの分析においては、標準物質として、富士フイルム和光純薬株式会社製のヒスタミン二塩酸塩 (和光特級) を用いた。ヒスタミンの標準原液は、標準物質約 16.56 mg を精密に量り、0.5 mol/L 濃度の塩酸溶液に溶解し、精製水で 50 mL として用いた。また、内部標準物質 (Internal standard: ISTD) として、富士フイルム和光純薬株式会社製の 1,8-ジアミノオクタン (1,8-オクタ

ンジアミン)を用いた。内部標準原液は、内部標準物質約 10 mg を精密に量り、0.5 mol/L 濃度の塩酸溶液に溶解し、精製水で 50 mL として用いた。

遊離ヒスチジンの分析においては、標準物質として、和光純薬株式会社製のアミノ酸混合標準液 AN-2 型 (アミノ酸自動分析用) およびアミノ酸混合標準液 B 型 (アミノ酸自動分析用) を混合した混合標準溶液中のヒスチジンを用いた。

2.2.4 装置

2.2.4.1 高速液体クロマトグラフ

ヒスタミンの測定に用いる高速液体クロマトグラフとして、株式会社島津製作所製の Prominence および UV-VIS (紫外可視光) 検出器 (SPD-20A) を用いた。ヒスタミンを分離するカラムには、関東化学株式会社製の Mightysil RP-18 GP (粒子径 5 μm 、内径 4.6 mm、長さ 250 mm) を用いた。

2.2.4.2 高速アミノ酸分析計

ヒスチジンの測定に用いるアミノ酸分析計として、株式会社日立ハイテック製の高速アミノ酸分析計 L-8900 を用いた。ヒスチジンを分離するカラムには、株式会社日立ハイテック製の高速アミノ酸分析計 L-8900 用反応カラム (内径 4.6 mm \times 長さ 60 mm) および分析カラム (内径 4.6 mm \times 長さ 60 mm \times 粒子径 3 μm) を用いた。

2.2.5 分析方法

2.2.5.1 試料の調製

魚介類中のヒスタミン生成菌、遊離ヒスチジンは、試料中に均一ではないことから、試料を粉碎調製し、均質化 (前処理) を行った。分析に用いる試料は、包丁を用いて、骨や頭部、ヒレ、尾、内臓がある場合は除去し、皮は含めた状態で、数 cm 角に切った後、岩谷産業製のミルミキサー (型番: IFM-800DG) を用いて細かく粉碎する前処理を行った。これをヒスタミン生成モデル試料 (以下、モデル試料) として用いた。前処理に用いたミルミキサーを写真 2.1 に示す。また、魚介類の前処理の例として、銀サケの前処理の概要を写真 2.2 に、サン

マの前処理の概要を写真 2.3 に示す。前処理を行った試料は、ポリエチレン製のボトルに小分けした後、フタを閉めて密閉し、5℃、10℃ または 25℃ の保管庫に保存した。5℃ の保管には、三菱電機株式会社製の冷蔵庫 MR-P15E を 5℃ となるよう設定して用いた。10℃ および 25℃ の保管には、アズワン株式会社製のクールインキュベーター「i-CUBE」を 10℃ または 25℃ の温度設定にして用いた。

保存温度は、一般的に魚介類を保存または加工する時の温度を想定して設定した。5℃ は、一般的な冷蔵庫の温度を想定した。10℃ は、大量調理施設衛生管理マニュアル[43]において、原材料及び調理済み食品の温度管理の項に記載されている食中毒菌の増殖を抑制するための管理温度のうち、低温の上限温度を想定した。25℃ は、同衛生管理マニュアルにおいて、施設設備の管理の項に記載されている望ましい調理場の温度とされている温度の上限温度を想定した。

2.2.5.2 試料溶液の調製

ヒスタミンおよび遊離ヒスチジンの分析は、各魚介類のモデル試料を用いて実施した。各モデル試料は、モデル試料の調製直後に、調製日（保存 0 日）の分析として、約 5 g を採取した後、蓋を閉め密閉し、各温度に設定した保管庫に入れて保存した。1 日後、2 日後、4 日後、7 日後に取り出して蓋を開け、スパーテルで良く攪拌した後、速やかに約 5 g を採取して、蓋を閉め、密閉して保管庫に戻した。

採取したモデル試料からヒスタミンを抽出する方法は、一般的に用いられている高速液体クロマトグラフ法[44][45][46]を参考にした。モデル試料約 5 g を、ポリプロピレン製の遠心チューブに正確に採取し、20 w/v%トリクロロ酢酸溶液を 5 mL 加え、振とう器で約 30 分間振とうした。3000rpm で 5 分間の遠心分離後、上澄みを取り、精製水で 50 mL として、ヒスタミンおよび遊離ヒスチジンの抽出液とした。これにより、ヒスタミンと遊離ヒスチジンの分析を同時に同環境で行い、分析日や環境による誤差を抑えた。ヒスタミンについては、抽出液の 1 mL を正確に取り、内部標準として 20 µg/mL 濃度の 1,8-ジアミノオクタン溶液を 0.5 mL 加えた後、無水炭酸ナトリウム 0.2 g および 1 w/v%ダンシルクロライド・アセトン溶液 1 mL を加えて混合し、蓋をした後、暗所に静置

して1晩(約16時間)反応させ、10 w/v%プロリン水溶液0.5 mLを加えて攪拌し、トルエン5 mLを加えて振とう器で10分間振とうし、3000rpmで5分間の遠心分離後、有機溶媒(トルエン)層を分取した。分取した有機溶媒層は、エバポレーターを用いて減圧留去し、残留物にアセトニトリル4 mLを加えて溶解し、孔径0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過して試料溶液とした。また、定量に用いる検量線用の標準溶液として、ヒスタミンの標準原液を4 v/v%トリクロロ酢酸溶液で0.2、1.0、10、40 μ g/mL濃度となるよう希釈した検量線用標準溶液についても、抽出液と同様に1 mLを正確に取り、同様の操作を行って用いた。遊離ヒスチジンについては、抽出液の1 mLを正確に取り、孔径0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過して試料溶液とした。ヒスタミンまたはヒスチジン濃度が高く、検量線用標準溶液濃度や、測定機器の検出上限を超えた場合、抽出液を精製水で適宜希釈した希釈液を用いて、同様の操作を行い試料溶液とした。

試料溶液の調製のフローチャートを図2.1に示す。

2.2.5.3 高速液体クロマトグラフによるヒスタミンの定量

ヒスタミンの分析用に調製した試料溶液を高速液体クロマトグラフに注入した。高速液体クロマトグラフの移動相は、アセトニトリルと精製水を65:35(v/v)で混合した混液を用いてアイソクラティックモードで分離、溶出した。流速は1.3 mL/分、検出波長は254 nm、カラム温度は40 $^{\circ}$ C、試料溶液の注入量は10 μ Lとした。また、ヒスタミンの検量線用標準溶液も同様に注入し、ヒスタミンおよび内部標準物質のピークは、標準溶液および試料溶液の保持時間の同一性によって同定し、内部標準物質のピークとヒスタミンのピーク面積比と濃度から検量線を作成し、内部標準法でヒスタミンの含有量を定量した。高速液体クロマトグラフの感度やカラムの状態は、使用時の環境や状況により変わるため、試料溶液の測定動作の都度、検量線用標準溶液を同様に測定し、検量線を作成して定量に用いた。

ヒスタミンの分析に用いた高速液体クロマトグラフの測定条件を表2.1に示す。

2.2.5.4 高速アミノ酸分析計によるヒスチジンの定量

遊離ヒスチジンの分析用に調製した試料溶液を高速アミノ酸分析計に注入した。移動相は日立高速アミノ酸分析計用の各生体液分析法用緩衝液および日立用ニンヒドリン発色溶液キットのニンヒドリン溶液と緩衝液を用いた。また、アミノ酸混合標準液 AN-2 型およびアミノ酸混合標準液 B 型を 0.02 mol/L 濃度の塩酸溶液で 0.1 μ mol/L 濃度となるよう希釈した検量線用混合標準溶液も同様に注入し、ヒスチジンのピークは、混合標準溶液および試料溶液の保持時間の同一性によって同定し、混合標準溶液中のヒスチジンのピーク面積と濃度から検量線を作成し、絶対検量線法で遊離ヒスチジンの含有量を定量した。高速アミノ酸分析計の感度やカラムの状態は、使用時の環境や状況により変わるため、試料溶液の測定動作の都度、検量線用標準溶液を同様に測定し、検量線を作成して定量に用いた。

高速アミノ酸分析計の測定条件を表 2.2 に示す。

2.3 結果および考察

2.3.1 赤身魚のモデル試料

赤身魚のモデル試料について、保存温度および保存時間を変えて保存した各モデル試料のヒスタミン含量と遊離ヒスチジン含量の分析を行った。赤身魚のヒスタミンの高速液体クロマトグラフのクロマトグラムの一例として、真アジのクロマトグラムを図 2.2 に示す。また同試料のヒスチジンの高速アミノ酸分析計のクロマトグラムを図 2.3 に示す。各魚種のモデル試料における保存温度および保存時間ごとのヒスタミンおよび遊離ヒスチジン含量の分析結果を表 2.3 に示す。

赤身魚のモデル試料において、調製日（保存 0 日）の分析結果では、何れの試料からもヒスタミンは検出されなかった。また、遊離ヒスチジン含量が最も低い試料は、真アジの 112 mg/100g であり、最も高い試料は、カツオの 1552 mg/100g であった。真アジ以外の何れの試料も 500 mg/100g 以上の遊離ヒスチジン含量であった。

モデル試料の 5 の保存においては、1 日および 2 日保存後の分析結果から、何れの試料もヒスタミンは検出されなかったが、4 日保存後の分析結果からは、サンマから 0.3 mg/100g および真イワシから 9.2 mg/100g のヒスタミンが検出された。また 7 日保存後の分析結果から、ビンナガマグロ、真サバ、サンマ、真イワシおよびヒラマサの 5 試料からヒスタミンが検出され、特にサンマから 60.9 mg/100g、真イワシから 106 mg/100g と高濃度のヒスタミンが検出された。遊離ヒスチジン含量については、1 日～4 日保存後の分析結果から有意な変化は確認されなかったが、7 日保存後には、サンマおよび真イワシにおいて減少していることが確認され、サンマおよび真イワシから特に高濃度のヒスタミンが検出されたこととの相関が確認された。

モデル試料の 10 の保存においては、1 日保存後の分析結果では、何れの試料からもヒスタミンは検出されなかったが、2 日保存後の分析結果からは、サンマおよび真イワシの 2 試料からヒスタミンが検出され、4 日～7 日保存後の分析結果から、ビンナガマグロ、真アジ、真サバ、サンマ、真イワシおよびヒラマサの 6 試料からヒスタミンが検出された。真アジ以外の何れのモデル試料からも 200 mg/100g 以上の高濃度のヒスタミンが検出され、真アジからは比較的低い 41.1 mg/100g のヒスタミンが検出された。この結果は、真アジの遊離ヒスチジン含量が、他の赤身魚に比べ低いことと相関があると考えられた。遊離ヒスチジン含量については、1 日～2 日保存後の分析結果から、優位な変化は確認されなかったが、4 日～7 日保存後の分析結果から、ヒスタミンが検出された何れのモデル試料においても減少していることが確認された。

モデル試料の 25 の保存においては、1 日保存後の分析結果から、真サバ、真イワシおよびヒラマサの 3 試料からヒスタミンが検出され、2 日保存後の分析結果から、ビンナガマグロ、真アジ、真サバ、サンマ、真イワシおよびヒラマサの 6 試料からヒスタミンが検出された。また 4 日～7 日保存後の分析結果から、6 試料に加え、5 および 10 の保存ではヒスタミンが検出されなかったキハダマグロ、養殖ブリおよびカツオの 3 試料からもヒスタミンが検出された。これは、試料によって、存在するヒスタミン生成菌の菌種が異なり、5 および 10 の保存でヒスタミンが検出された魚種には、ヒスタミン生成菌の中でも

Photobacterium phosphoreum に代表される低温菌が存在し、25 の保存でヒスタミンが検出されたキハダマグロ、養殖ブリおよびカツオには、ヒスタミン生成菌の中でも *Morganella morganii* や、*Photobacterium damsela* に代表される中温菌が存在[18]したためと推測される。また、真アジからは 52.2 mg/100g、カツオからは 2.3 mg/100g のヒスタミンが検出され、その他の試料からは 200 mg/100g 以上の高濃度のヒスタミンが検出された。真イワシでは、4 日保存後の分析結果で 330 mg/100g であったヒスタミン含量が、7 日保存後の分析結果で 282 mg/100g に減少した。これはヒスタミン分解細菌[47]の影響を受けた可能性が示唆される。遊離ヒスチジン含量については、5 および 10 の保存と同様に、何れのモデル試料においても、ヒスタミンの検出に伴い、減少することが確認された。

2.3.2 白身魚のモデル試料

白身魚のモデル試料について、保存温度および保存時間を変えて保存した各モデル試料のヒスタミン含量と遊離ヒスチジン含量の分析を行った。白身魚のヒスタミンの高速液体クロマトグラフのクロマトグラムの一例として、銀サケのクロマトグラムを図 2.4 に示す。また同試料のヒスチジンの高速アミノ酸分析計のクロマトグラムを図 2.5 に示す。各魚種のモデル試料における保存温度および保存時間ごとのヒスタミンおよび遊離ヒスチジン含量の分析結果を表 2.4 に示す。

白身魚のモデル試料において、調製日（保存 0 日）の分析結果から、ワカサギから 1.1 mg/100g のヒスタミンが検出された。また、遊離ヒスチジン含量が最も低い試料は真ダラの 2.6 mg/100g であり、最も高い試料はワカサギの 12.4 mg/100g であった。赤身魚の遊離ヒスチジン含量と比較すると、何れの白身魚も赤身魚の約 10 分の 1 以下の量であった。

モデル試料の 5 の保存においては、1 日～7 日保存後の分析結果から、ワカサギのみヒスタミンが検出された。ワカサギにおいては、7 日保存後の分析結果からは、9.3 mg/100g のヒスタミンが検出された。遊離ヒスチジン含量については、1 日～7 日保存後の分析結果から、ワカサギにおいて減少していることが

確認され、ヒスタミンが検出されたこととの相関が確認された。また銀サケにおいては、モデル試料調製日（保存0日）の6.4 mg/100g から、7日保存後には11.9 mg/100g まで増加していることが確認された。これは、保存中に微生物が増殖し、たんぱく質が分解され、たんぱく質に由来する遊離ヒスチジンが増加[48]したためと推測される。

モデル試料の10の保存においては、1日～4日保存後の分析結果から、5と同様にワカサギのみヒスタミンが検出され、7日保存後の分析結果から、真ダイおよびワカサギの2試料からヒスタミンが検出された。遊離ヒスチジン含量については、真ダイおよびワカサギにおいて減少していることが確認され、何れもヒスタミンが検出された試料であった。また、5と同様に、銀サケにおいては、遊離ヒスチジン含量の増加が確認された。

モデル試料の25の保存においては、1日保存後の分析結果では、真ダイおよびワカサギの2試料からヒスタミンが検出された。2日～7日保存後の分析結果では、真ダイおよびワカサギに加え、5および10ではヒスタミンが検出されなかった銀サケからも検出された。これは、赤身魚のキハダマグロなどと同様に、魚種によって存在するヒスタミン生成菌の菌種が異なるためと考えられる。遊離ヒスチジン含量は、ヒスタミンの検出に伴い、減少することが確認されたが、真ダラおよびメカジキについては、何れの保存温度においてもヒスタミンは検出されず、遊離ヒスチジン含量の減少が確認された。これは存在する遊離ヒスチジン含量が少なく、ヒスタミンが生成されても検出されにくいことや、ヒスタミン分解細菌の影響により検出される濃度に達しなかったことが考えられる。また、銀サケにおいては、ヒスタミンの検出量が低い2日目までは増加が確認されたが、以降はヒスタミンの増加に伴い減少していることが確認された。

2.3.3 その他魚介類のモデル試料

その他魚介類のモデル試料について、保存温度および保存時間を変えて保存した各モデル試料のヒスタミン含量と遊離ヒスチジン含量の分析を行った。その他魚介類のヒスタミンの高速液体クロマトグラムのクロマトグラムの一例と

して、バナメイエビのクロマトグラムを図 2.6 に示す。また同試料のヒスチジンの高速アミノ酸分析計のクロマトグラムを図 2.7 に示す。各魚種のモデル試料における保存温度および保存時間ごとのヒスタミンおよび遊離ヒスチジン含量の分析結果を表 2.5 に示す。

その他魚介類のモデル試料において、調製日（保存 0 日）の分析結果では、何れの試料からもヒスタミンは検出されなかった。遊離ヒスチジン含量が最も低い試料はホタテの 7.0 mg/100g であり、最も高い試料はバナメイエビの 19.9 mg/100g であった。赤身魚の遊離ヒスチジン含量と比較すると、何れの試料も赤身魚の約 5 分の 1 以下の量であった。

モデル試料の 5 の保存においては、1 日～2 日保存後の分析結果では、何れの試料からもヒスタミンは検出されなかったが、4 日保存後以降では、紋甲イカおよびバナメイエビの 2 試料からヒスタミンが検出された。紋甲イカにおいては、7 日保存後の分析結果では、8.7 mg/100g のヒスタミンが検出された。遊離ヒスチジン含量については、ヒスタミンの検出された紋甲イカにおいて減少していることが確認され、バナメイエビおよびホタテにおいては、モデル試料の調製日から 7 日保存後まで遊離ヒスチジン含量の増加が確認された。

モデル試料の 10 の保存においては、1 日保存後の分析結果では、何れの試料からもヒスタミンは検出されなかったが、2 日保存後の分析結果では紋甲イカからヒスタミンが検出され、4 日保存後以降の分析結果では、紋甲イカおよびバナメイエビの 2 試料からヒスタミンが検出された。遊離ヒスチジン含量については、紋甲イカおよびバナメイエビにおいて減少していることが確認され、バナメイエビにおいては、ヒスタミンの検出量が少ない 4 日保存後までは遊離ヒスチジン含量の増加が確認されたが、ヒスタミンの検出量が増加した 7 日保存後には遊離ヒスチジン含量の減少が確認された。また、ホタテにおいては、遊離ヒスチジン含量の増加が確認された。

モデル試料の 25 の保存においては、1 日～7 日保存後の分析結果において、紋甲イカおよびバナメイエビの 2 試料からヒスタミンが検出された。ホタテにおいては、何れのモデル試料からもヒスタミンは検出されなかった。遊離ヒスチジン含量については、ヒスタミンの検出に伴い、減少していることが確認さ

れた。

何れの保存温度のモデル試料においても、遊離ヒスチジン含量の増加は、銀サケと同様に、微生物の増殖に伴い、たんぱく質に由来する遊離ヒスチジンが増加したためと推測される。

2.3.4 ヒスタミンと遊離ヒスチジンの相関

モデル試料で得られた結果から、生成したヒスタミンと遊離ヒスチジンの増減変化割合を、以下の式を用いて計算した。

$$v1 (\%) = a/c \times 100$$

$$v2 (\%) = b/c \times 100$$

ここで、v1 と v2 は、それぞれヒスタミンと遊離ヒスチジンの増減変化割合とする。a は保存期間中（1 日～7 日）で最も高いヒスタミン量（mg/100g）の重量あたりのモル数、b は a と同日の遊離ヒスチジン量（mg/100 g）の重量あたりのモル数、c は調製日（保存 0 日）のヒスタミン量（mg/100 g）と遊離ヒスチジン量（mg/100 g）の重量あたりのモル数の合計である。各モデル試料において、ヒスタミンが一定濃度（5 mg/100g）以上検出されたモデル試料のヒスタミンと遊離ヒスチジンの増減変化割合（v1 および v2）を図 2.8 に、ヒスタミンと遊離ヒスチジンの含量（mg/100g）を図 2.9 および図 2.10 に示す。

赤身魚においては、真アジの増減変化割合が約 67%と最も低く、他のモデル試料は約 75%～110%であった。白身魚においては、特に銀サケが約 170%と高く、他のモデル試料も約 105%～140%と高い割合であった。白身魚は遊離ヒスチジン含量が低いこと、また、保存中の遊離ヒスチジン含量の増加の影響があり、調製日（保存 0 日）と比較した増減変化割合は、高い傾向になったと考えられた。その他魚介類では、何れのモデル試料も約 80%～140%であり、白身魚と同様に遊離ヒスチジン含量の増加の影響から高い傾向になったと考えられた。これらの結果から、殆どの赤身魚のモデル試料において、調製日（保存 0 日）の遊離ヒスチジン含量に相当するヒスタミンが生成されていることが確認され、ヒスタミンの生成量と遊離ヒスチジン含量の変化には相関性が確認された。また白身魚およびその他魚介類のモデル試料においては、一部の試料において保

存による遊離ヒスチジンの増加の影響が確認されたが、赤身魚と同様にヒスタミンの生成量と遊離ヒスチジン含量の変化には相関性が確認された。

2.4 まとめ

市販の赤身魚 10 試料 9 種、白身魚 5 試料 5 種、およびその他魚介類 3 試料 3 種について、ヒスタミン生成モデル試料を調製し、モデル試料の保存温度におけるヒスタミンおよび遊離ヒスチジンの変化に関する研究を行った。研究の結果、保存期間や温度によってヒスタミンの生成が異なり、一般的な冷蔵庫の温度である 5 °C においても、一部の試料からヒスタミンの生成が確認された。ヒスタミン食中毒の主な原因である赤身魚においては、食中毒を生じる可能性が高く、重篤な症状を呈すとされている 100 mg/100g 以上のヒスタミンが、複数の魚種から検出された。ヒスタミン食中毒の原因とされることが少ない白身魚やその他魚介類においては、一部の魚種から食中毒を生じる可能性があるとして報告されている 10 mg/100g 程のヒスタミンの生成が確認されたことから、赤身魚以外の魚介類においても、ヒスタミン食中毒は発生する可能性が示唆された。また、ヒスタミンが生成された試料においては、何れの試料もヒスタミンの生成量に応じて遊離ヒスチジン量は減少していることが確認された。

殆どの赤身魚において、生成したヒスタミン量は、存在する遊離ヒスチジン相当量と同等量であることが確認されたことから、赤身魚の遊離ヒスチジン含量を調査することで、その魚を保存して生成されるヒスタミンの最大量が推測できる可能性が示唆された。この推測された量から、その魚によって発生するヒスタミン食中毒の危険性や重篤性を予測する指標に用いることができると考えられた。白身魚やその他魚介類においては、存在する遊離ヒスチジン量を超えたヒスタミン生成量が確認されたが、存在する遊離ヒスチジン量は少なく、生成される遊離ヒスチジン量も 10 mg/100g 未満であり、食中毒への影響は少なく、赤身魚と同様に、遊離ヒスチジン含量を調査、発生するヒスタミン食中毒の危険性や重篤性を予測できると考えられた。今後、ヒスタミン食中毒の予防のため、多くの魚介類の遊離ヒスチジン含量の調査・研究が必要である。

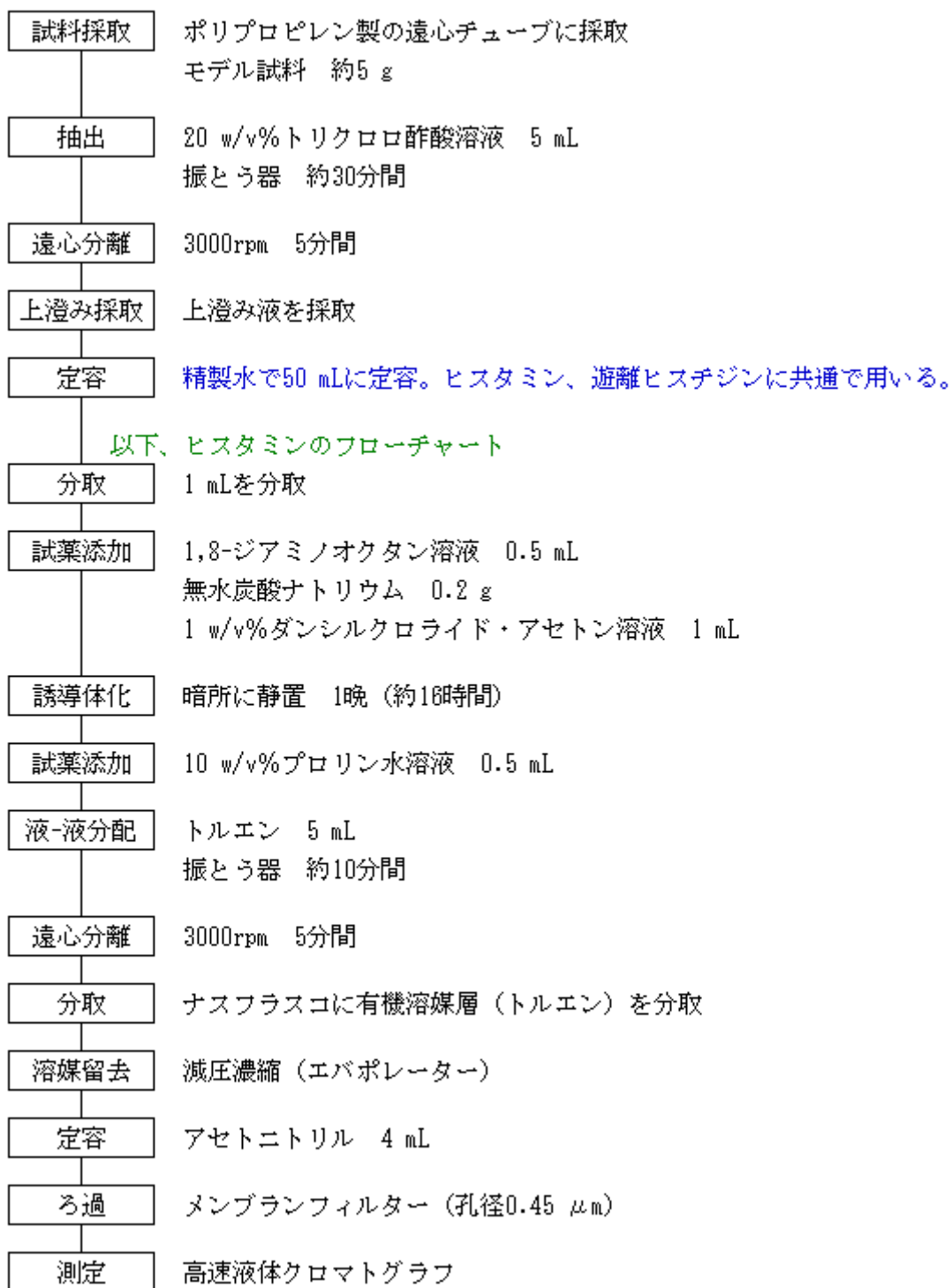


図 2.1 ヒスタミン、遊離ヒスチジンの試料溶液調製フローチャート

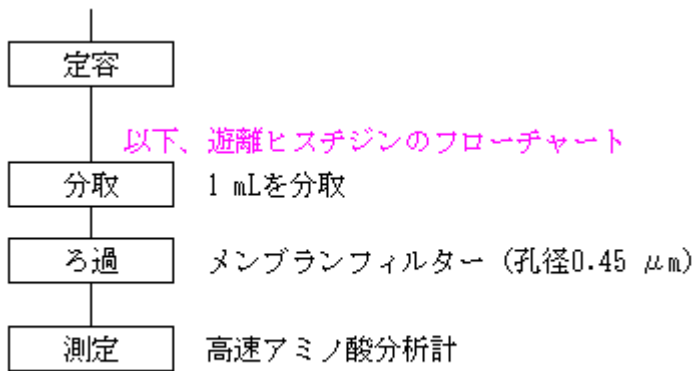


図 2.1 ヒスタミン、遊離ヒスチジンの試料溶液調製フローチャート (続き)

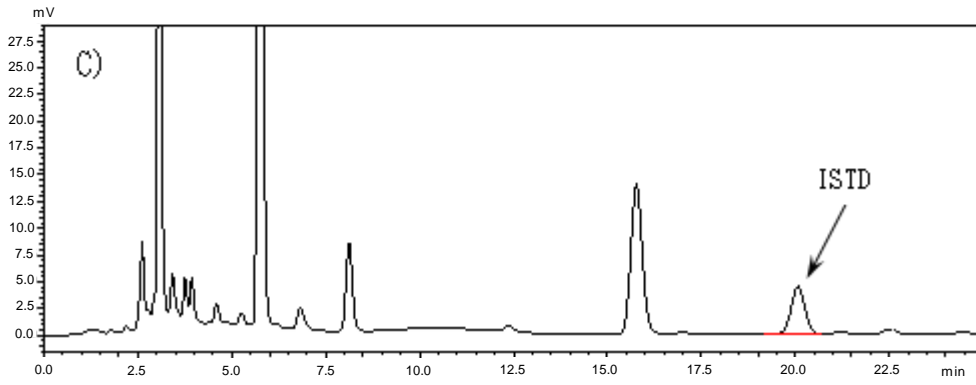
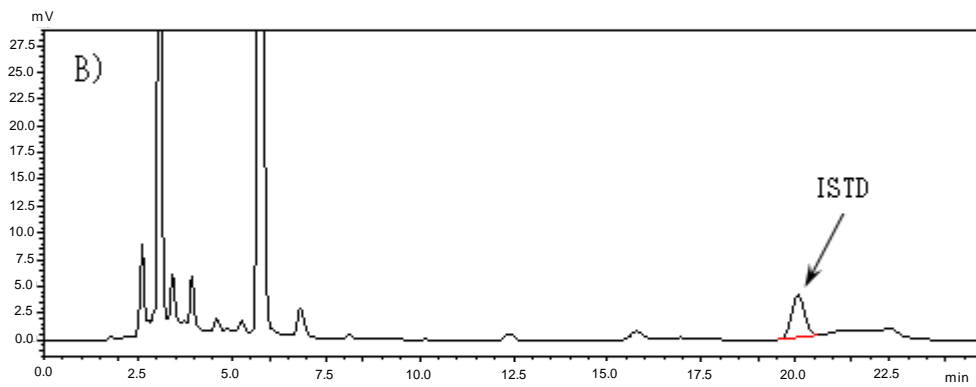
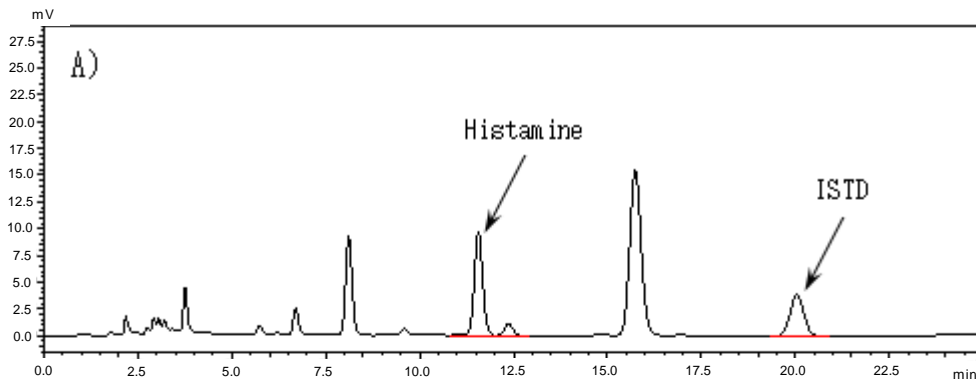


図 2.2 真アジのヒスタミンのクロマトグラム

A) 標準溶液 (B~Dの定量用)

B) 調製日 (保存0日)

C) 5 (保存1日)

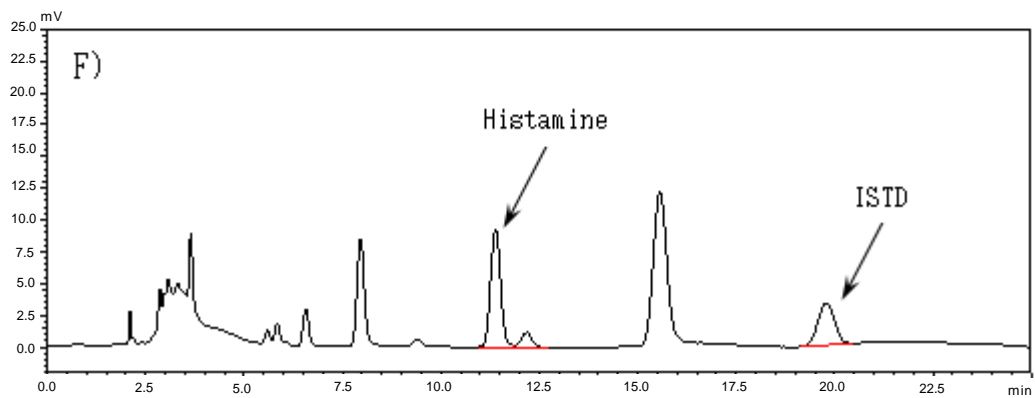
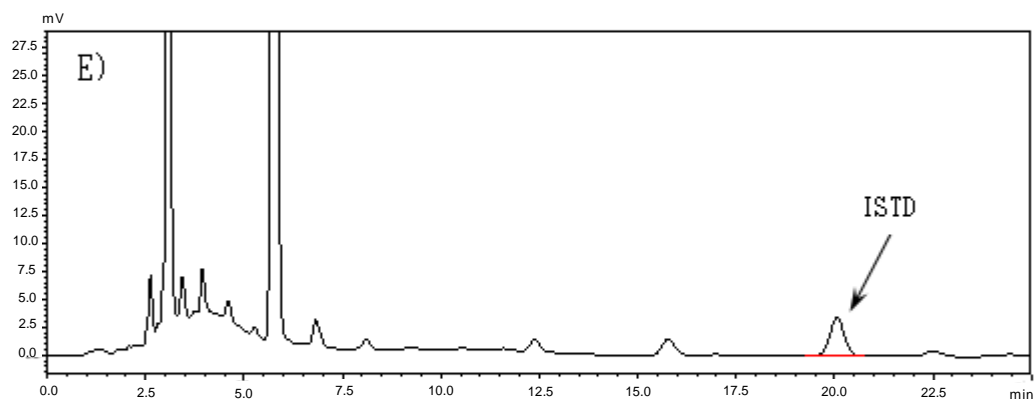
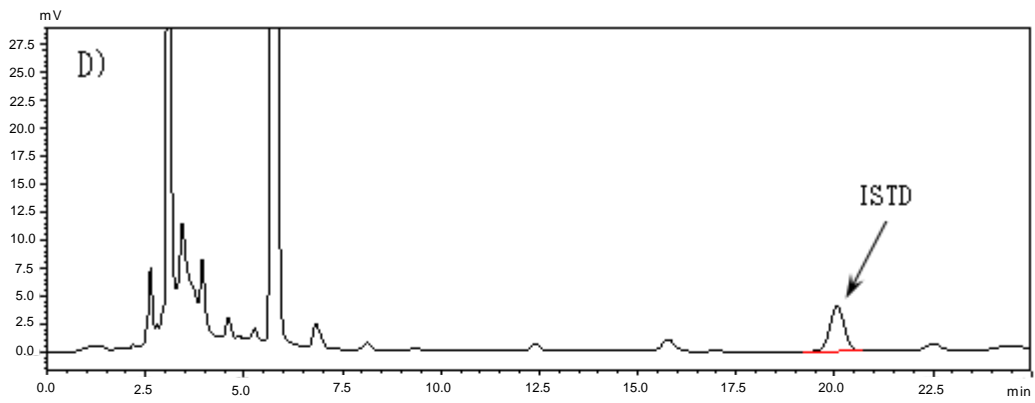


図 2.2 真アジのヒスタミンのクロマトグラム (続き)

D) 10 (保存 1 日)

E) 25 (保存 1 日)

F) 標準溶液 (G~L の定量用)

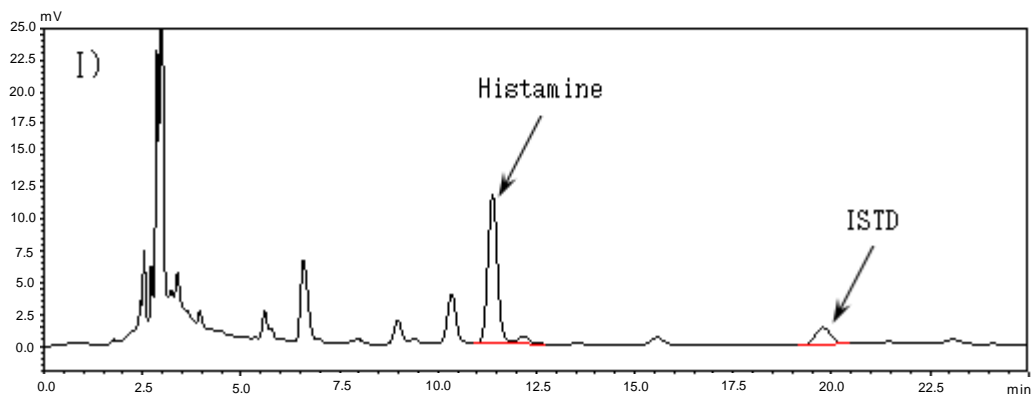
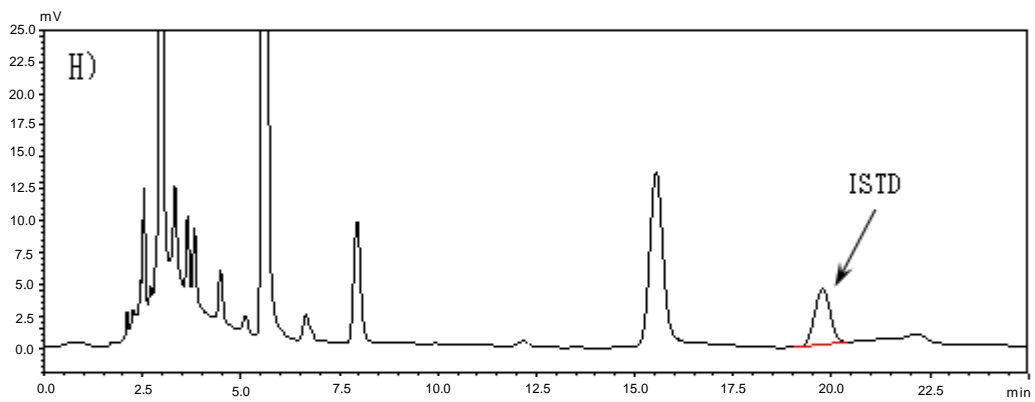
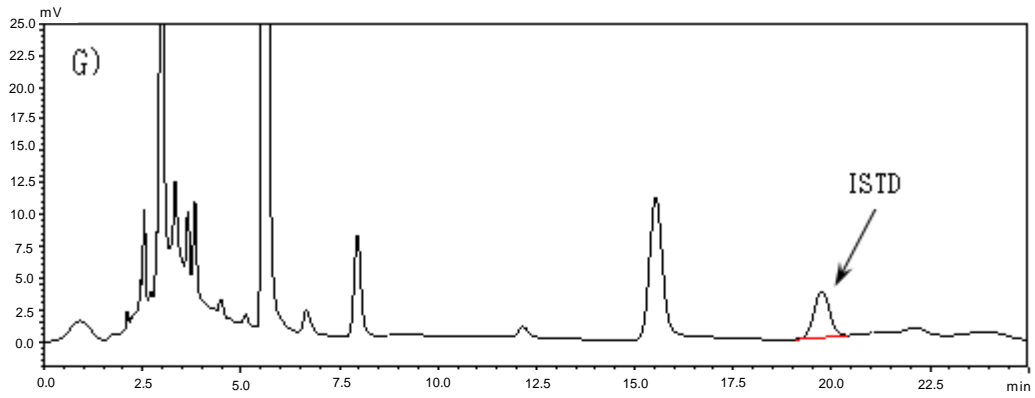


図 2.2 真アジのヒスタミンのクロマトグラム (続き)

G) 5 (保存 2 日)

H) 10 (保存 2 日)

I) 25 (保存 2 日)

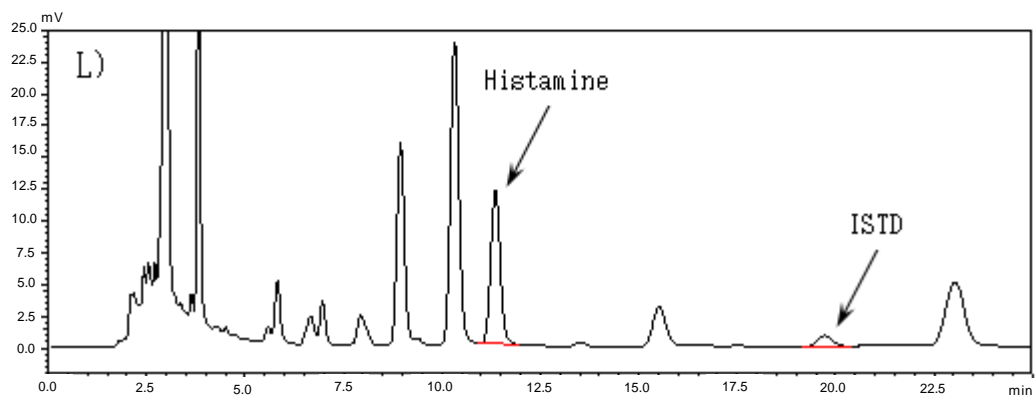
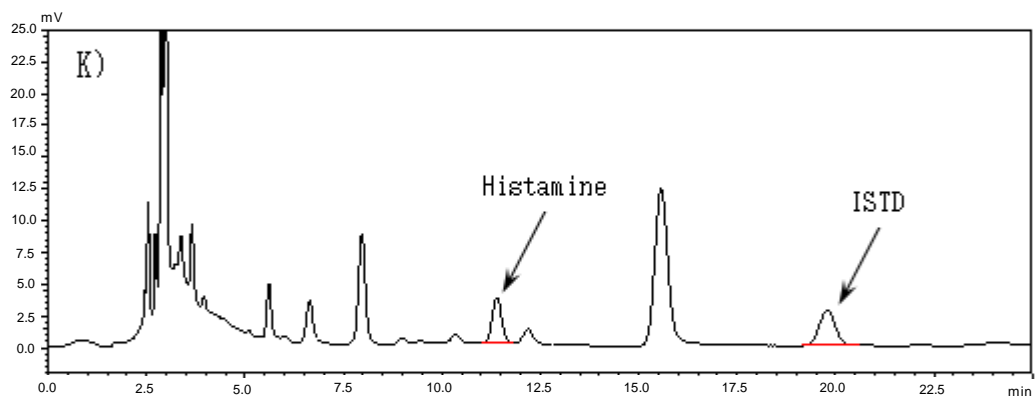
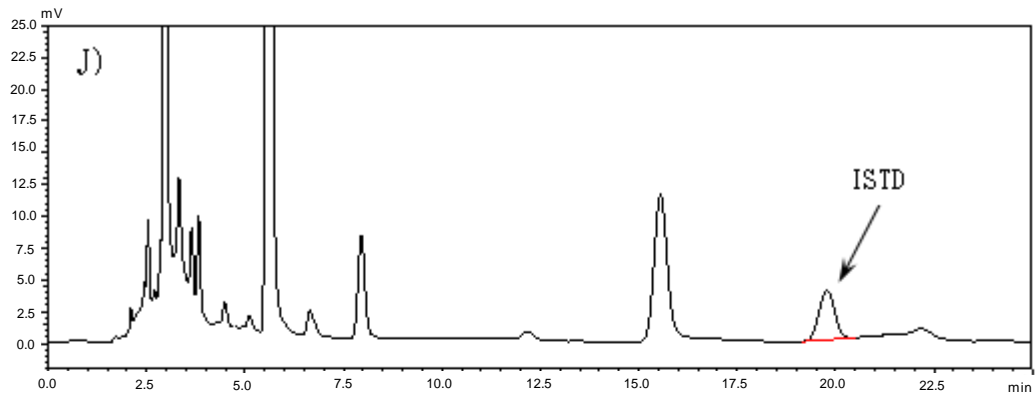


図 2.2 真アジのヒスタミンのクロマトグラム (続き)

J) 5 (保存 4 日)

K) 10 (保存 4 日)

L) 25 (保存 4 日)

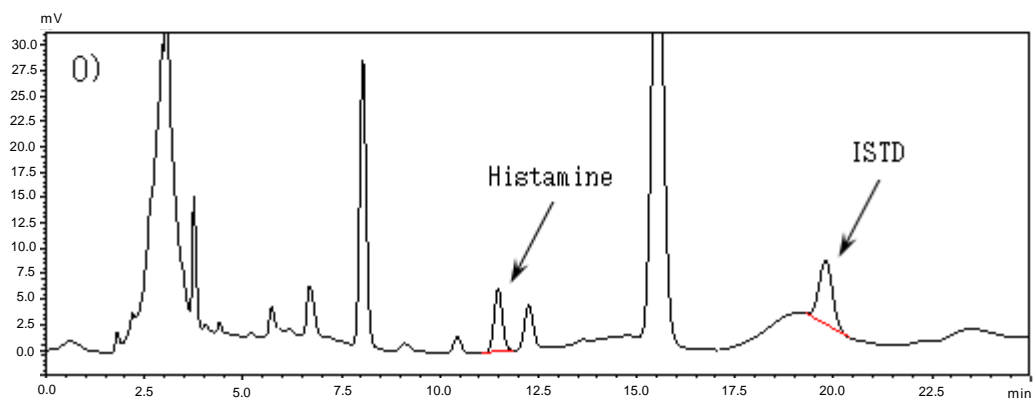
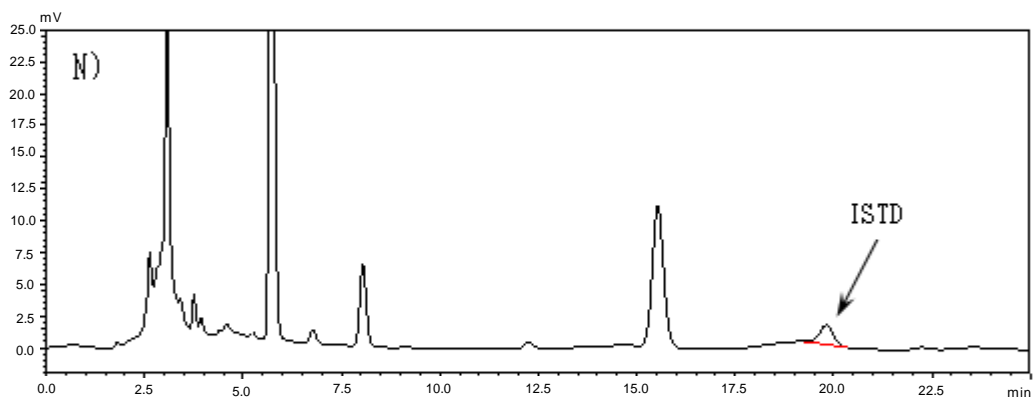
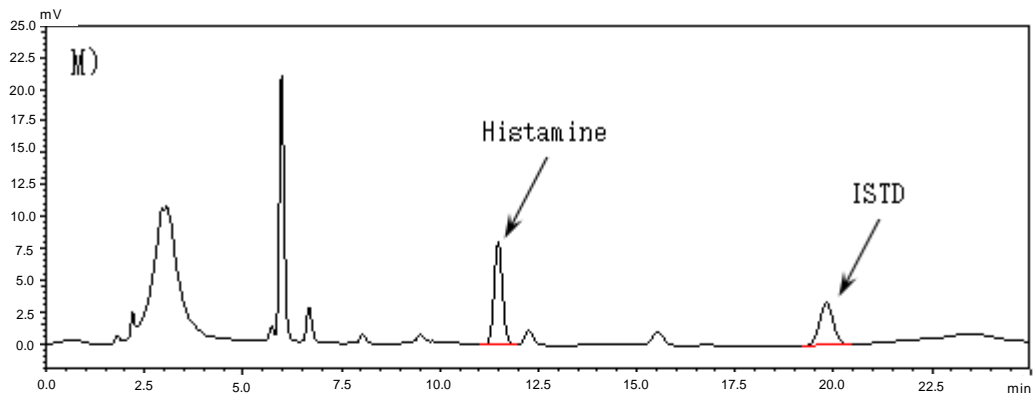


図 2.2 真アジのヒスタミンのクロマトグラム (続き)

M) 標準溶液 (N~P の定量用)

N) 5 (保存 7 日)

O) 10 (保存 7 日)

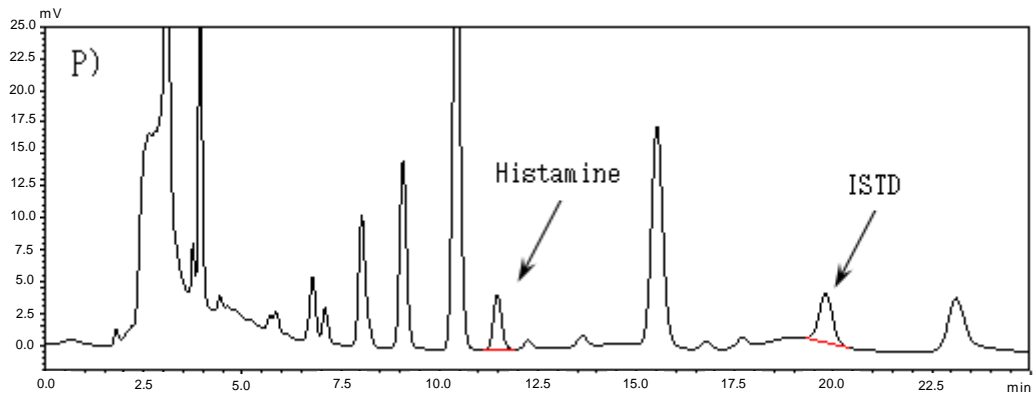


図 2.2 真アジのヒスタミンのクロマトグラム (続き)
P) 25 (保存 7 日)

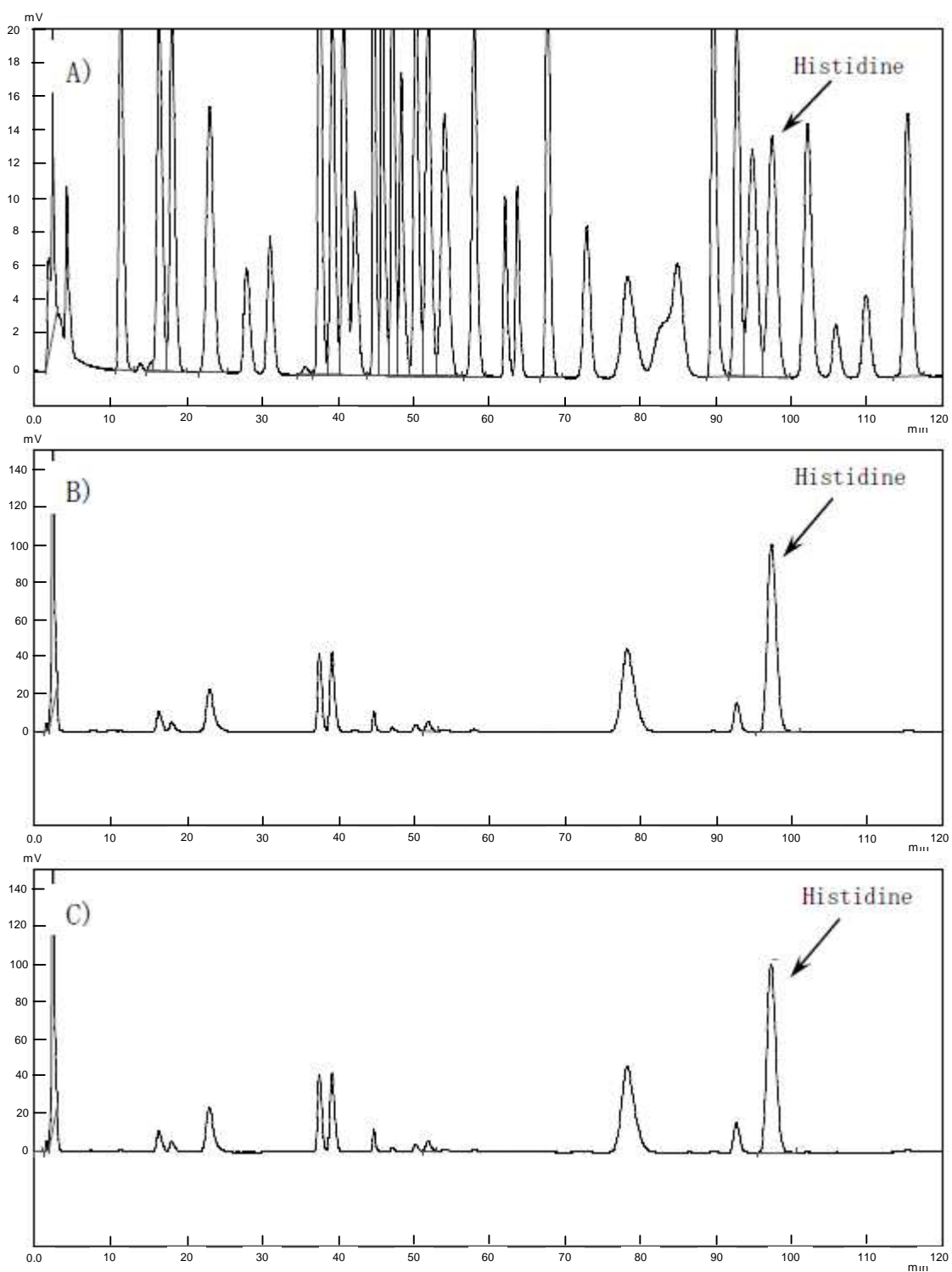


図 2.3 真アジのヒスチジンのクロマトグラム

- A) 標準溶液 (B~E の定量用)
- B) 調製日 (保存 0 日)
- C) 5 (保存 1 日)

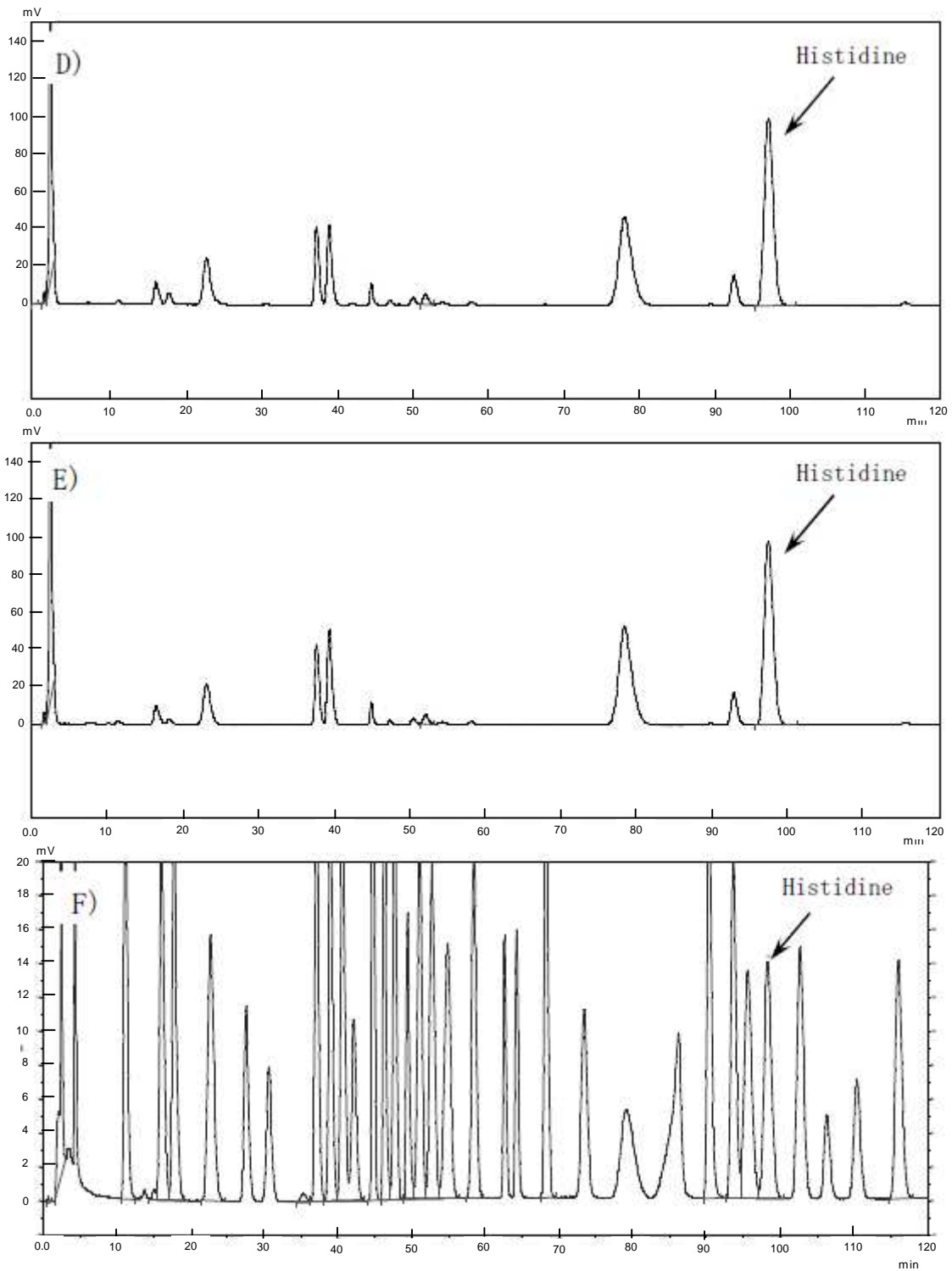


図 2.3 真アジのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

D) 10 (保存 1 日)

E) 25 (保存 1 日)

F) 標準溶液 (G ~ L の定量用)

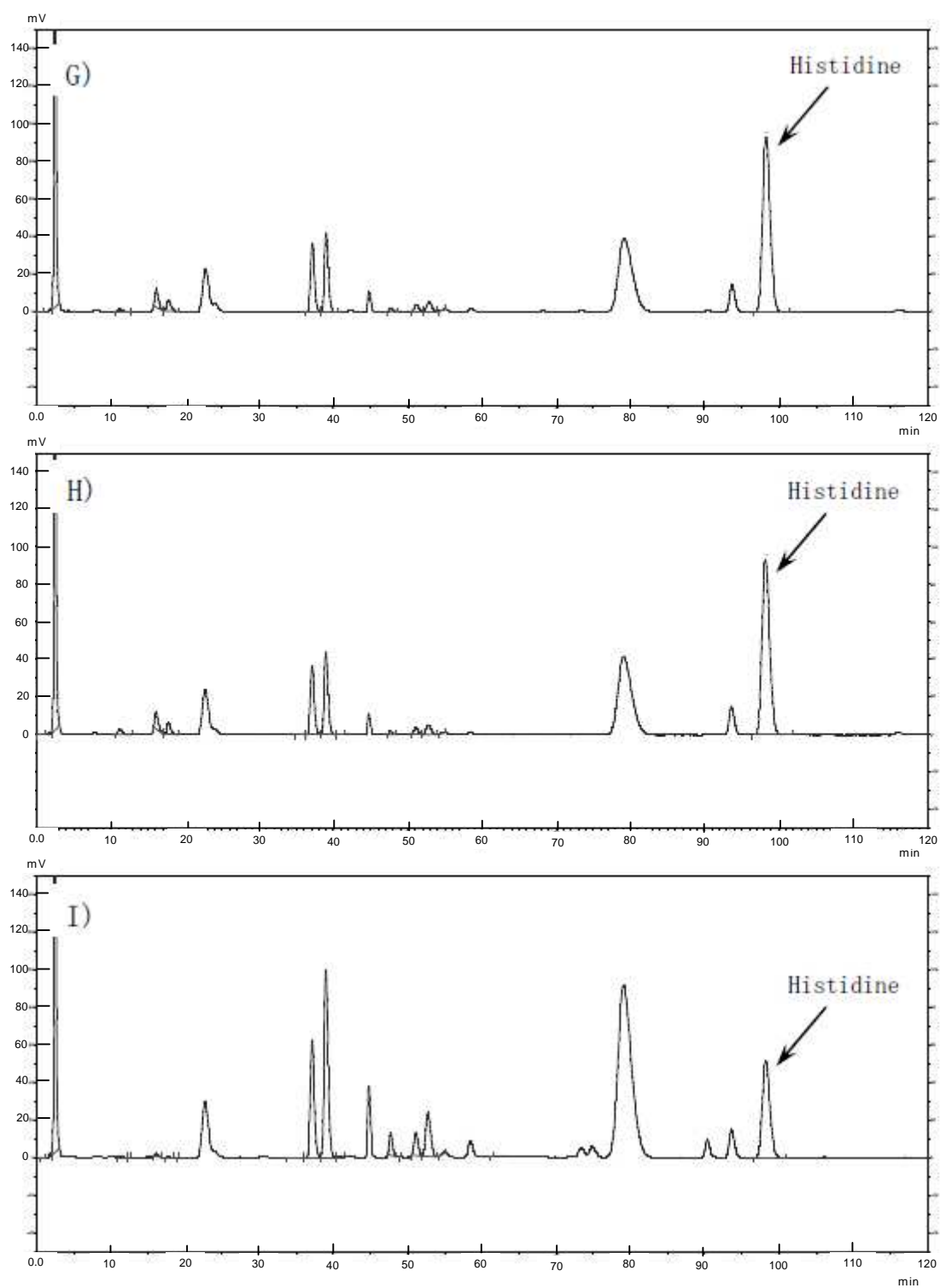


図 2.3 真アジのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

G) 5 (保存 2 日)

H) 10 (保存 2 日)

I) 25 (保存 2 日)

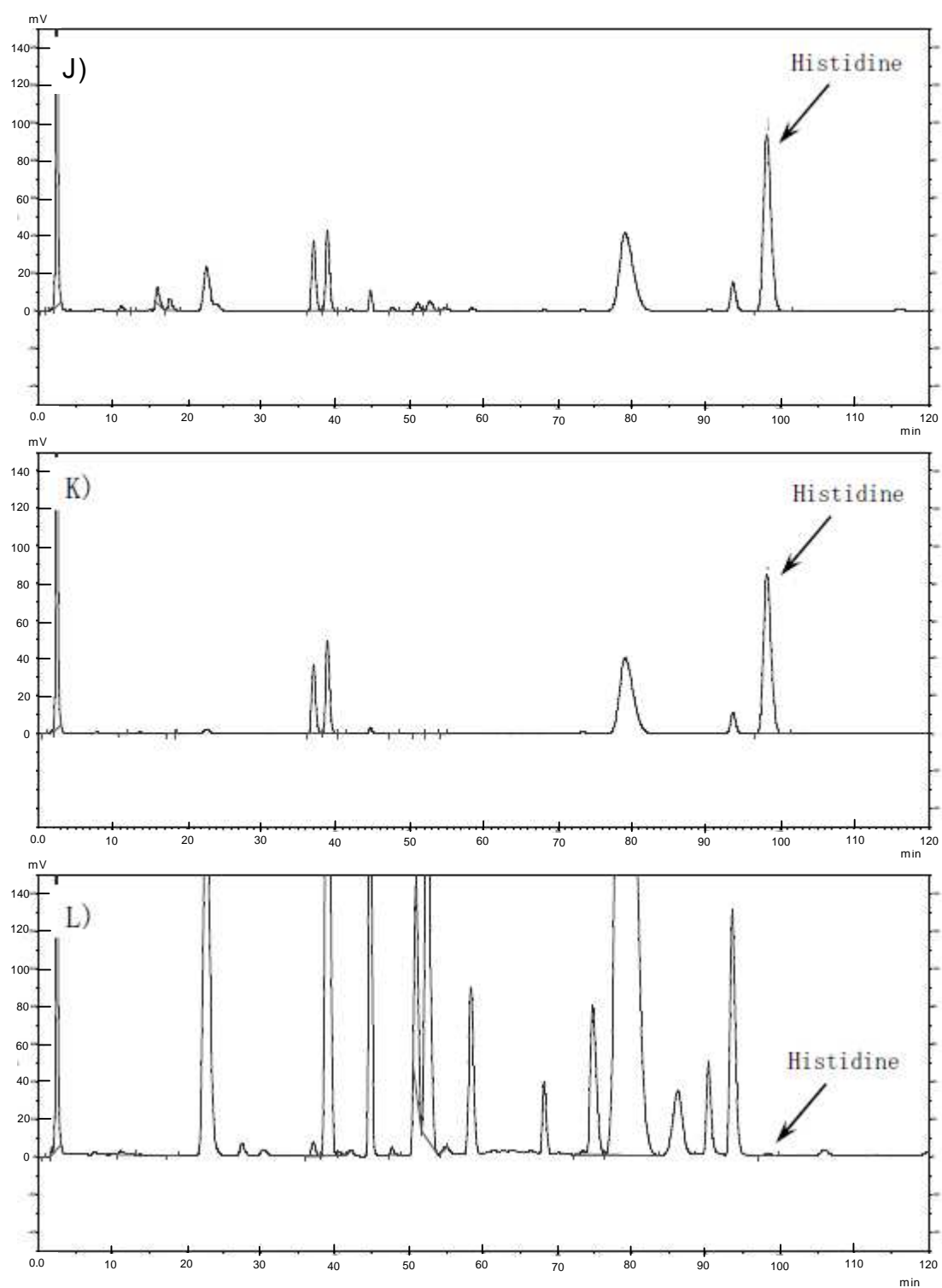


図 2.3 真アジのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

J) 5 (保存 4 日)

K) 10 (保存 4 日)

L) 25 (保存 4 日)

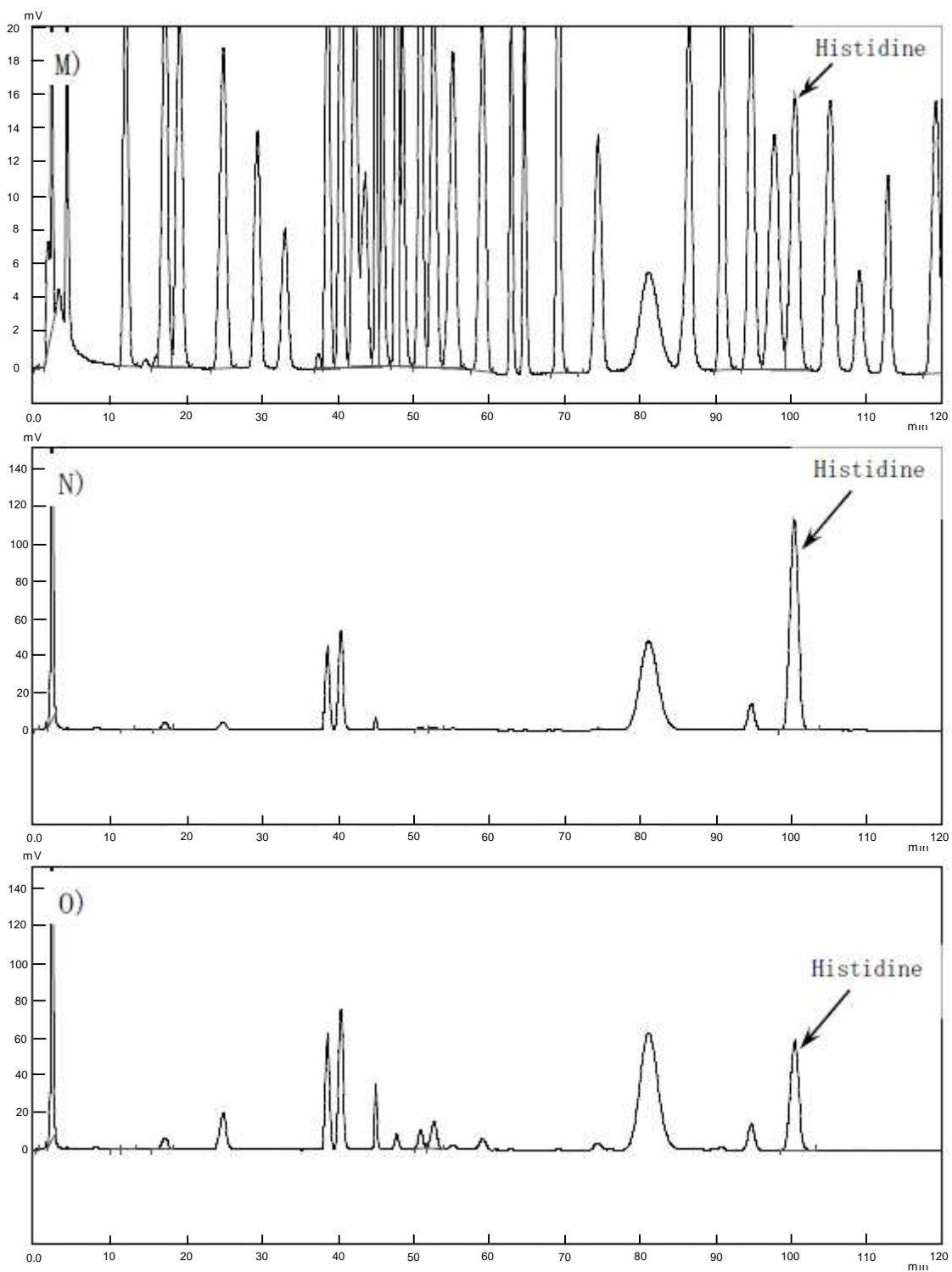


図 2.3 真アジのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

M) 標準溶液 (N~P の定量用)

N) 5 (保存 7 日)

O) 10 (保存 7 日)

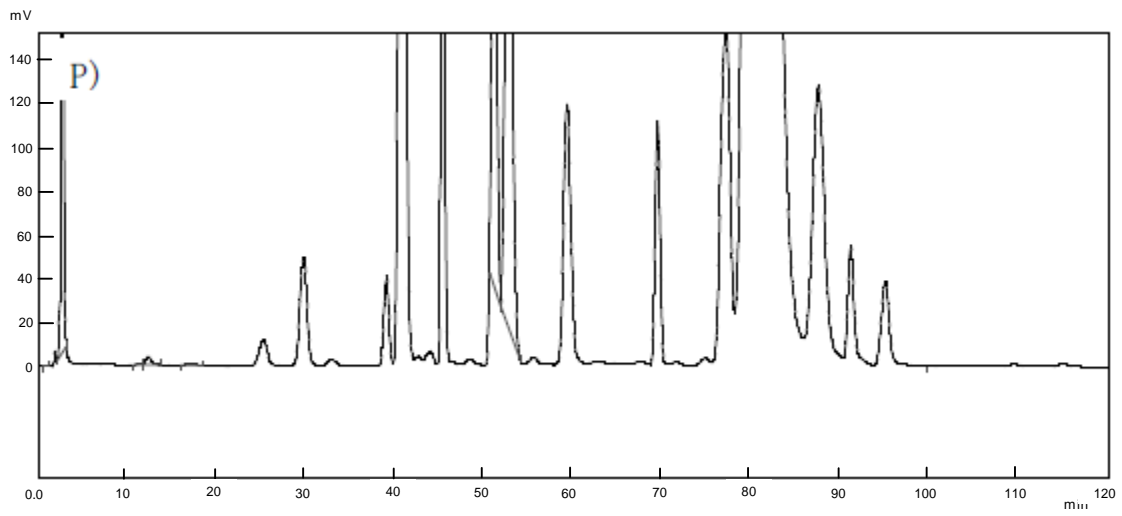


図 2.3 真アジのヒスチジンのクロマトグラム (続き)
P) 25 (保存 7 日)

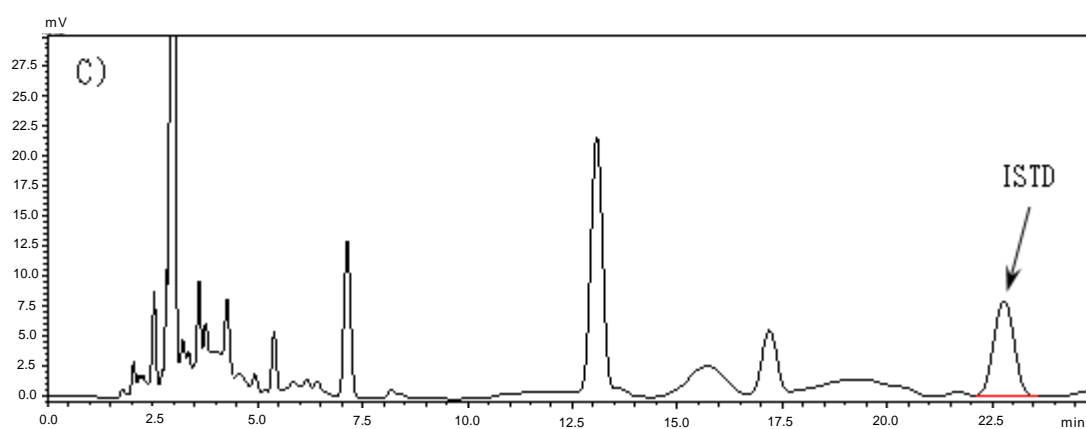
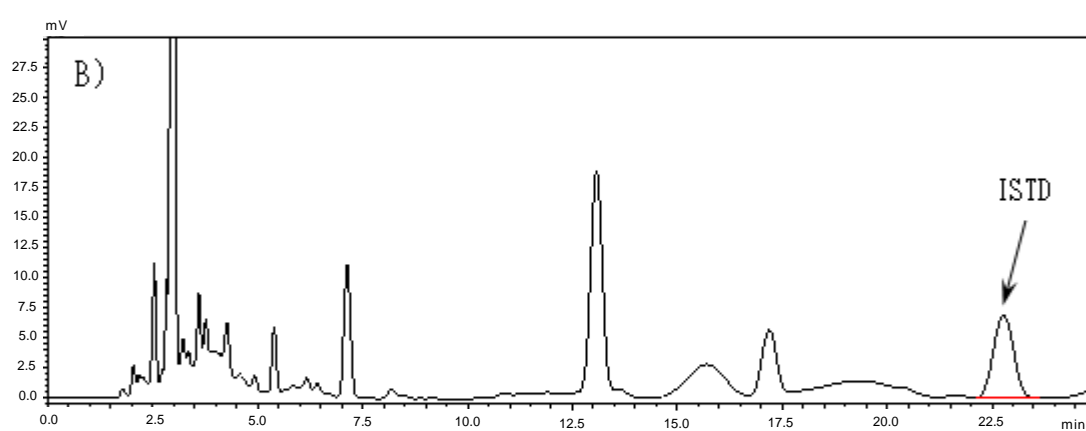
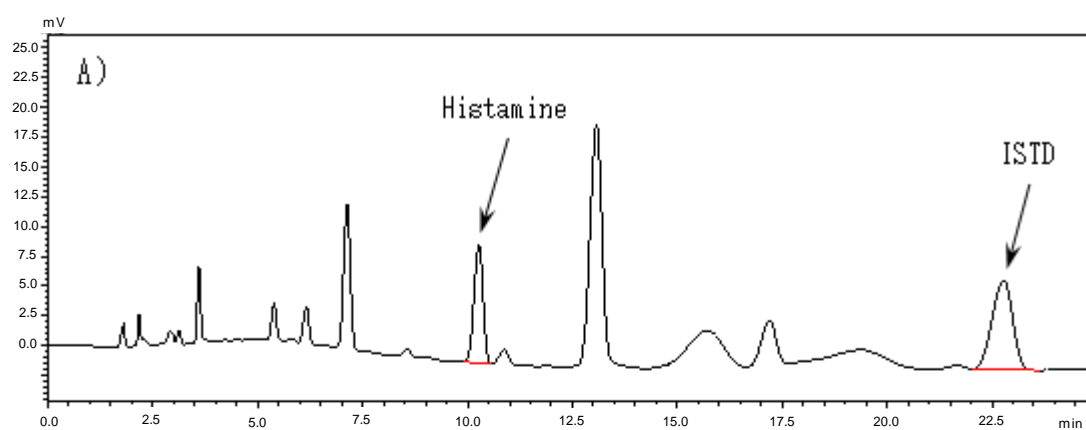


図 2.4 銀サケのヒスタミンのクロマトグラム

- A) 標準溶液 (B~Hの定量用)
- B) 調製日 (保存0日)
- C) 5 (保存1日)

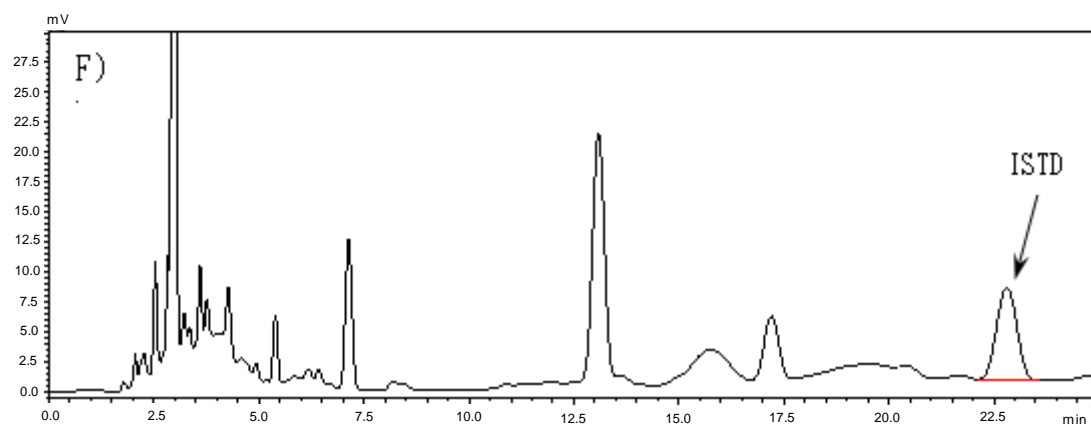
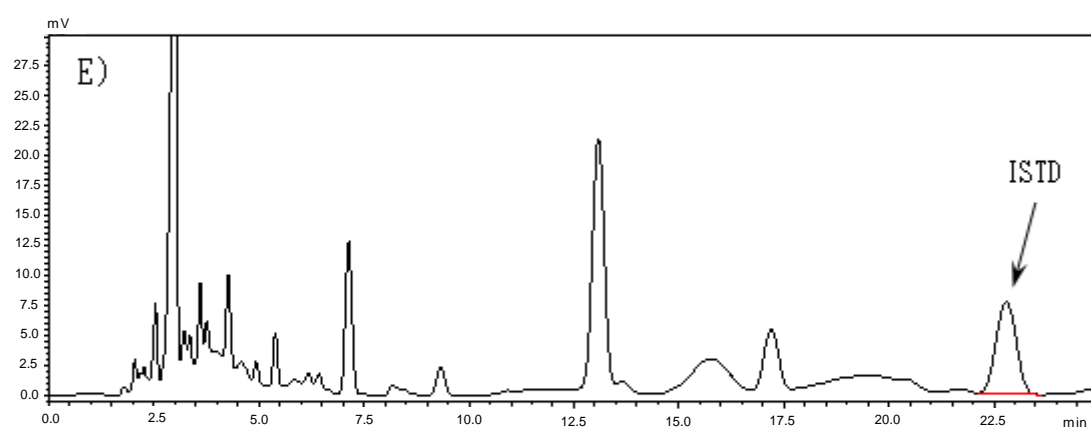
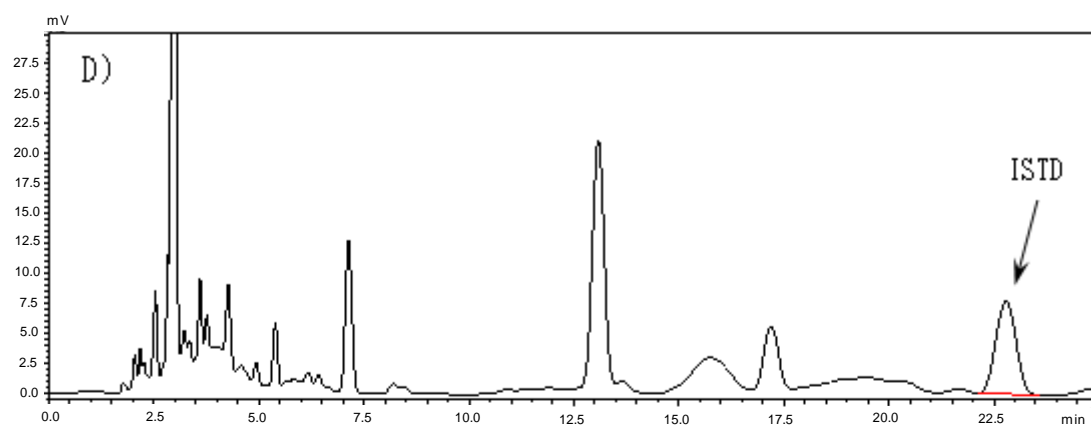


図 2.4 銀サケのヒスタミンのクロマトグラム (続き)

D) 10 (保存 1 日)

E) 25 (保存 1 日)

F) 5 (保存 2 日)

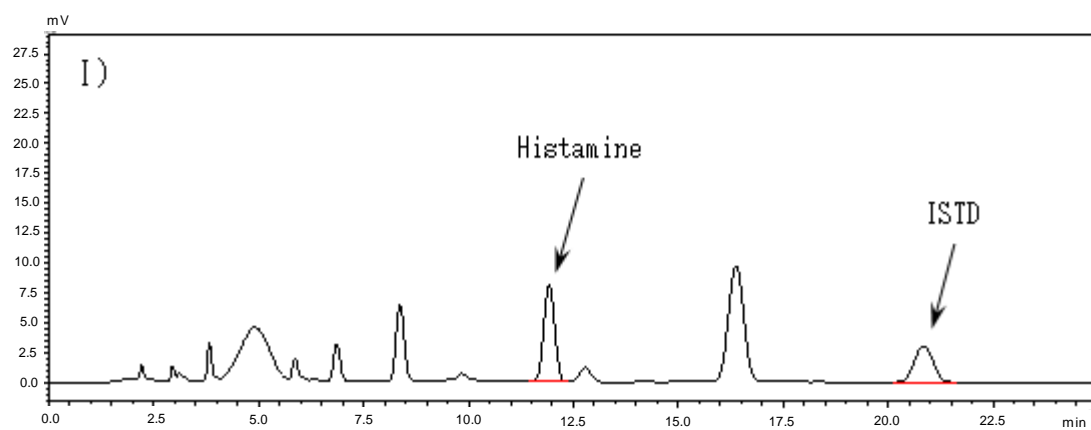
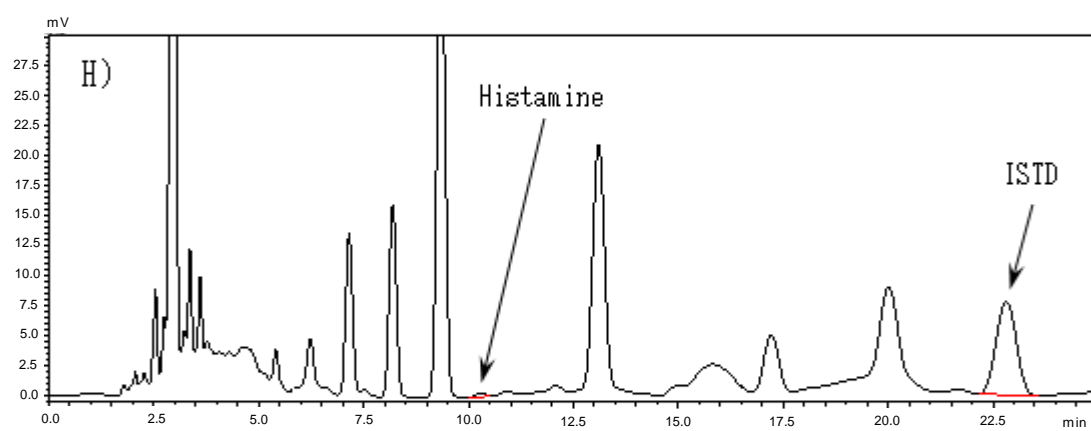
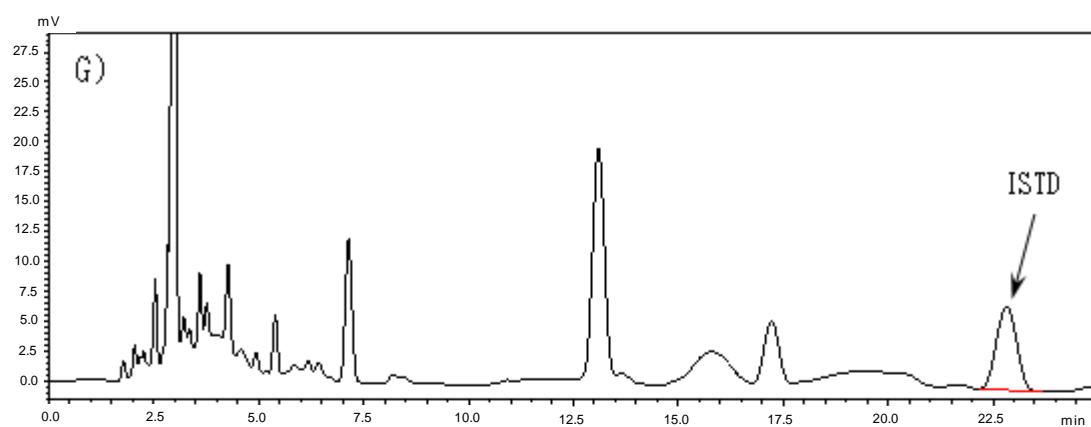


図 2.4 銀サケのヒスタミンのクロマトグラム (続き)

G) 10 (保存 2 日)

H) 25 (保存 2 日)

I) 標準溶液 (J~0 の定量用)

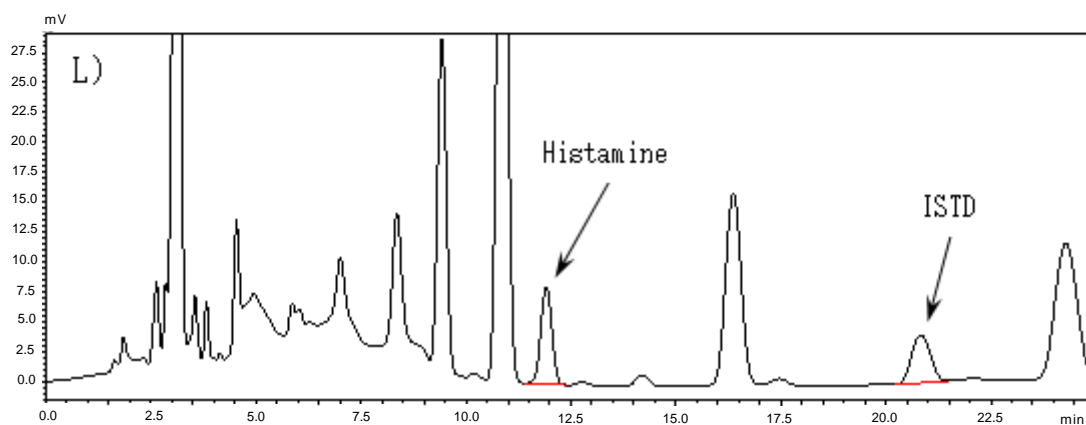
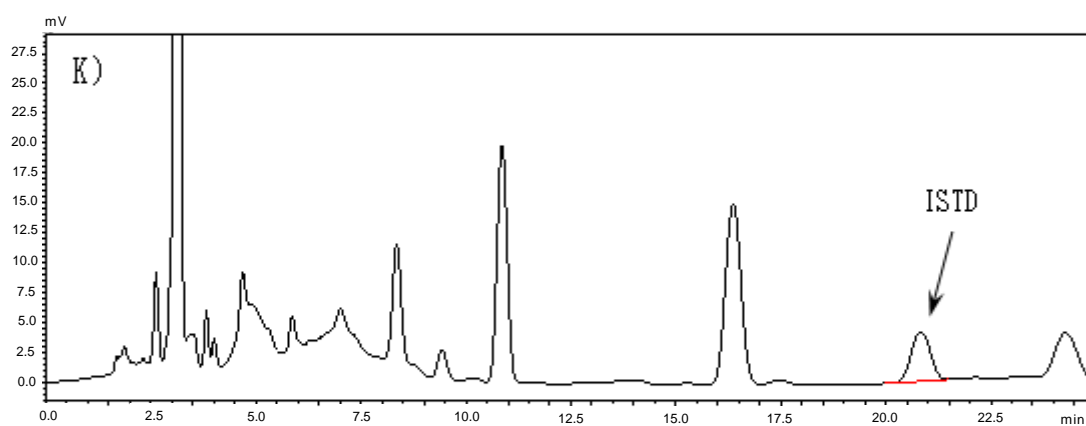
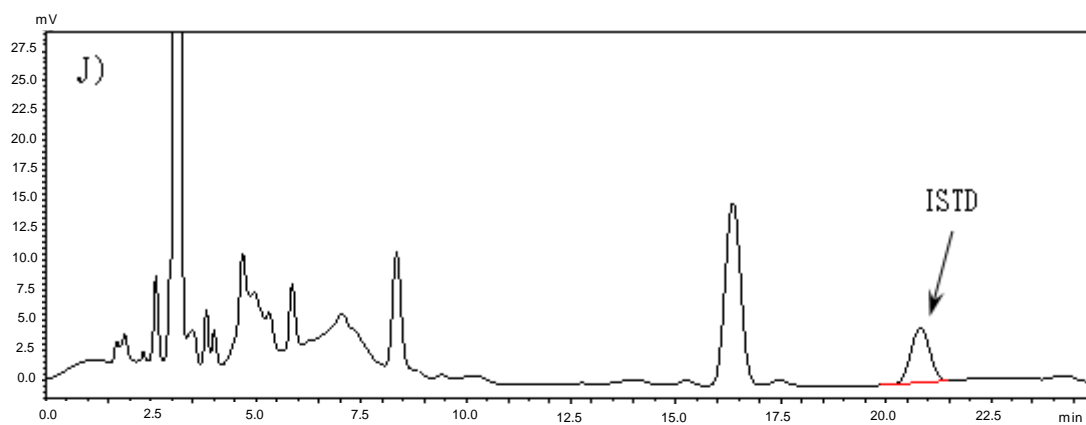


図 2.4 銀サケのヒスタミンのクロマトグラム (続き)

J) 5 (保存 4 日)

K) 10 (保存 4 日)

L) 25 (保存 4 日)

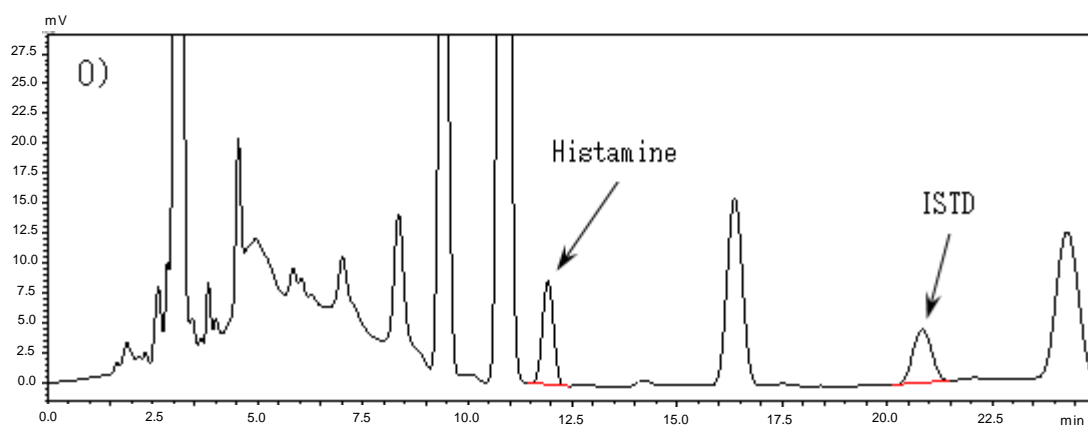
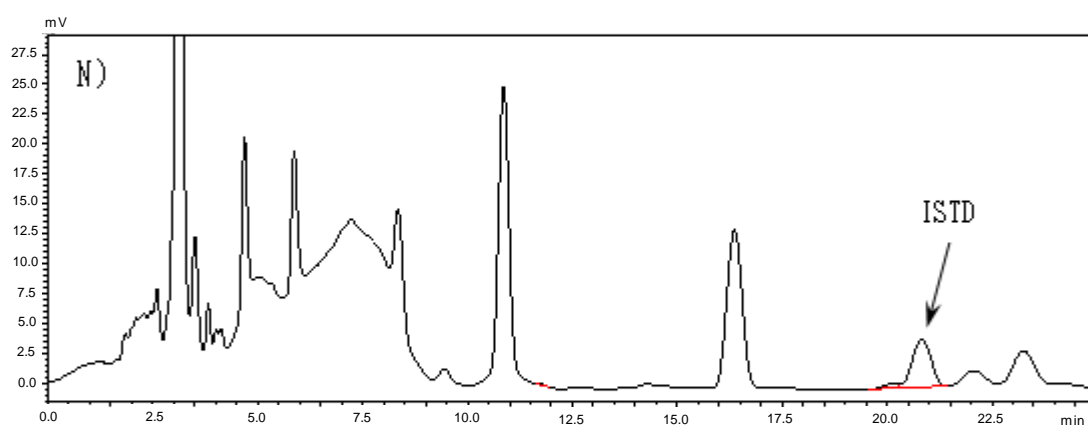
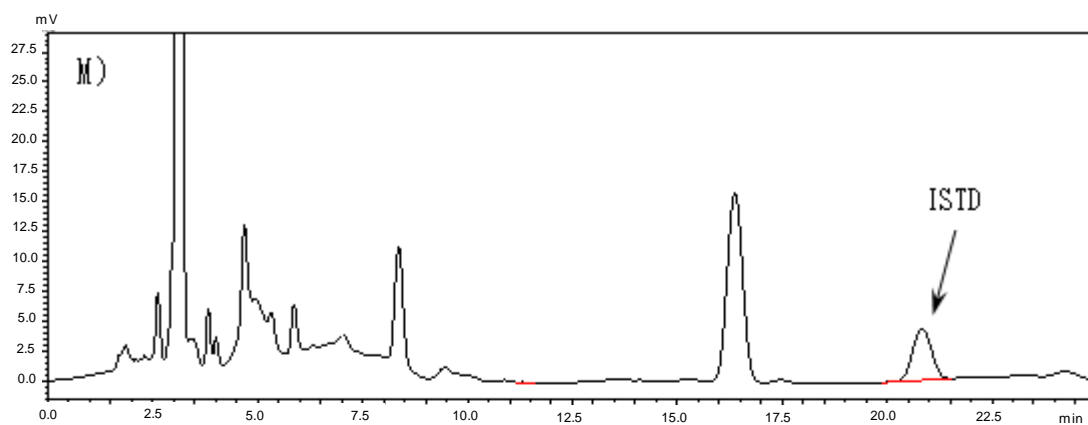


図 2.4 銀サケのヒスタミンのクロマトグラム (続き)

M) 5 (保存 7 日)

N) 10 (保存 7 日)

O) 25 (保存 7 日)

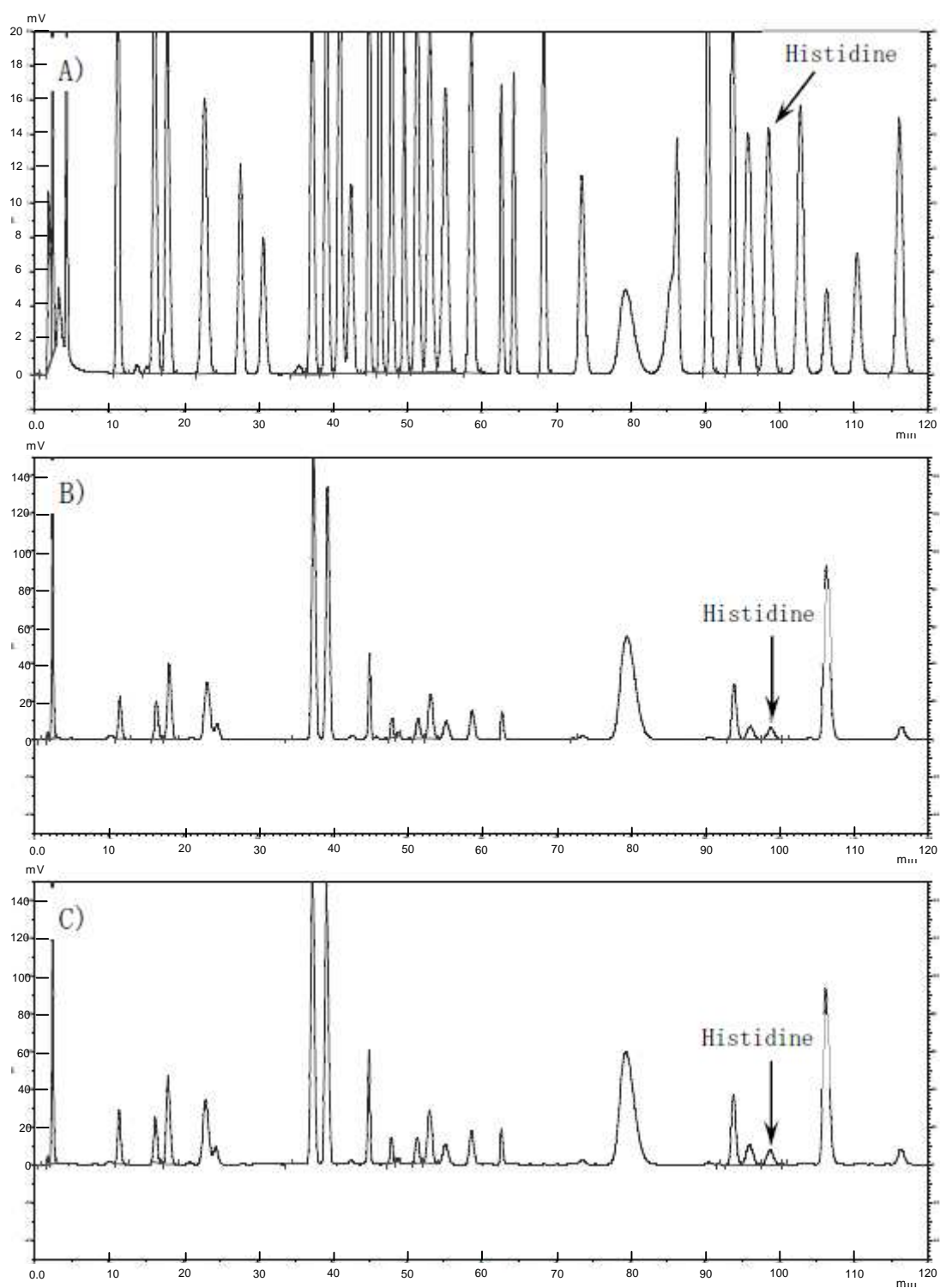


図 2.5 銀サケのヒスチジンのクロマトグラム

- A) 標準溶液 (B~Dの定量用)
- B) 調製日 (保存0日)
- C) 5 (保存1日)

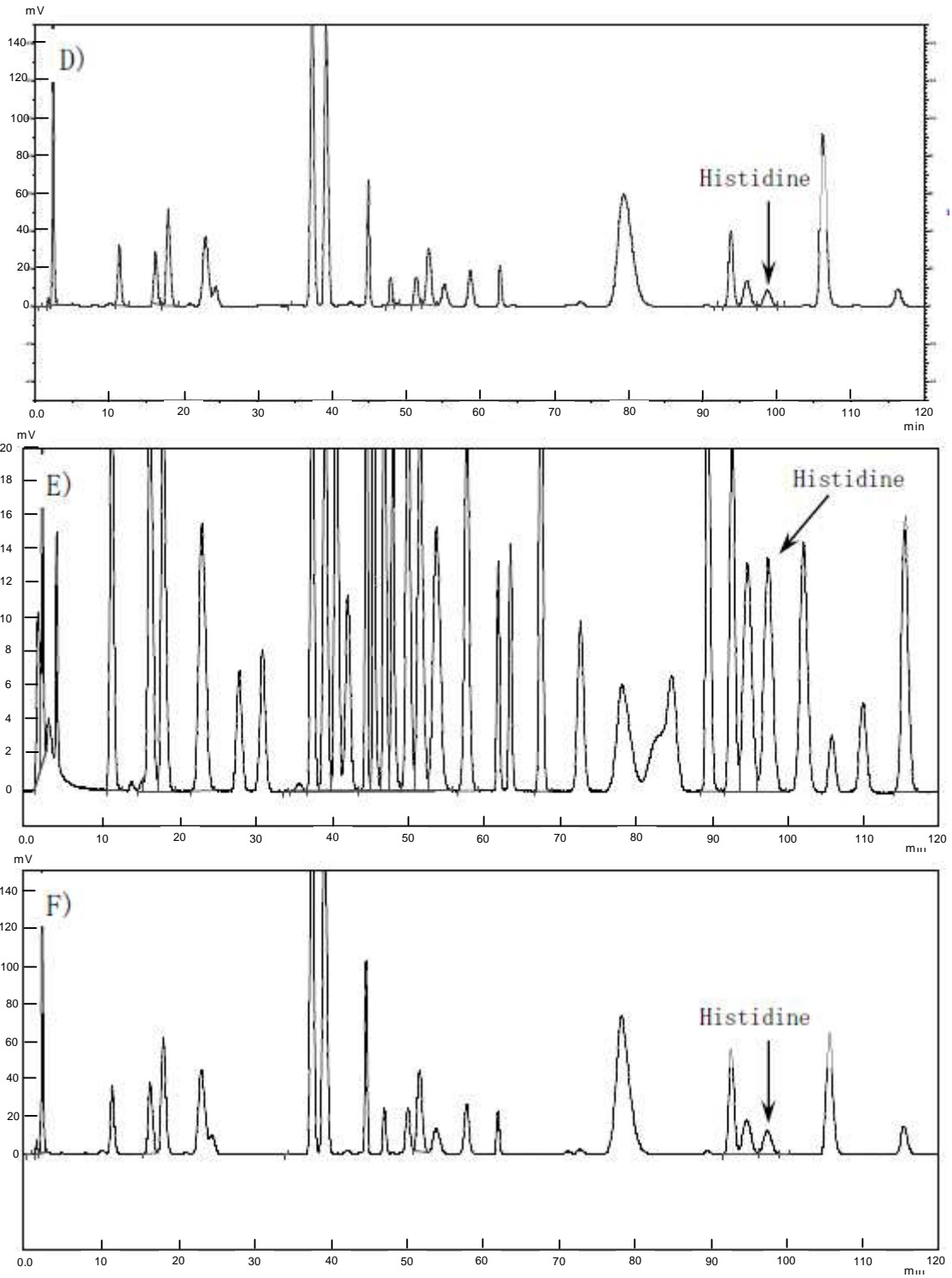


図 2.5 銀サケのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

D) 10 (保存 1 日)

E) 標準溶液 (F ~ I の定量用)

F) 25 (保存 1 日)

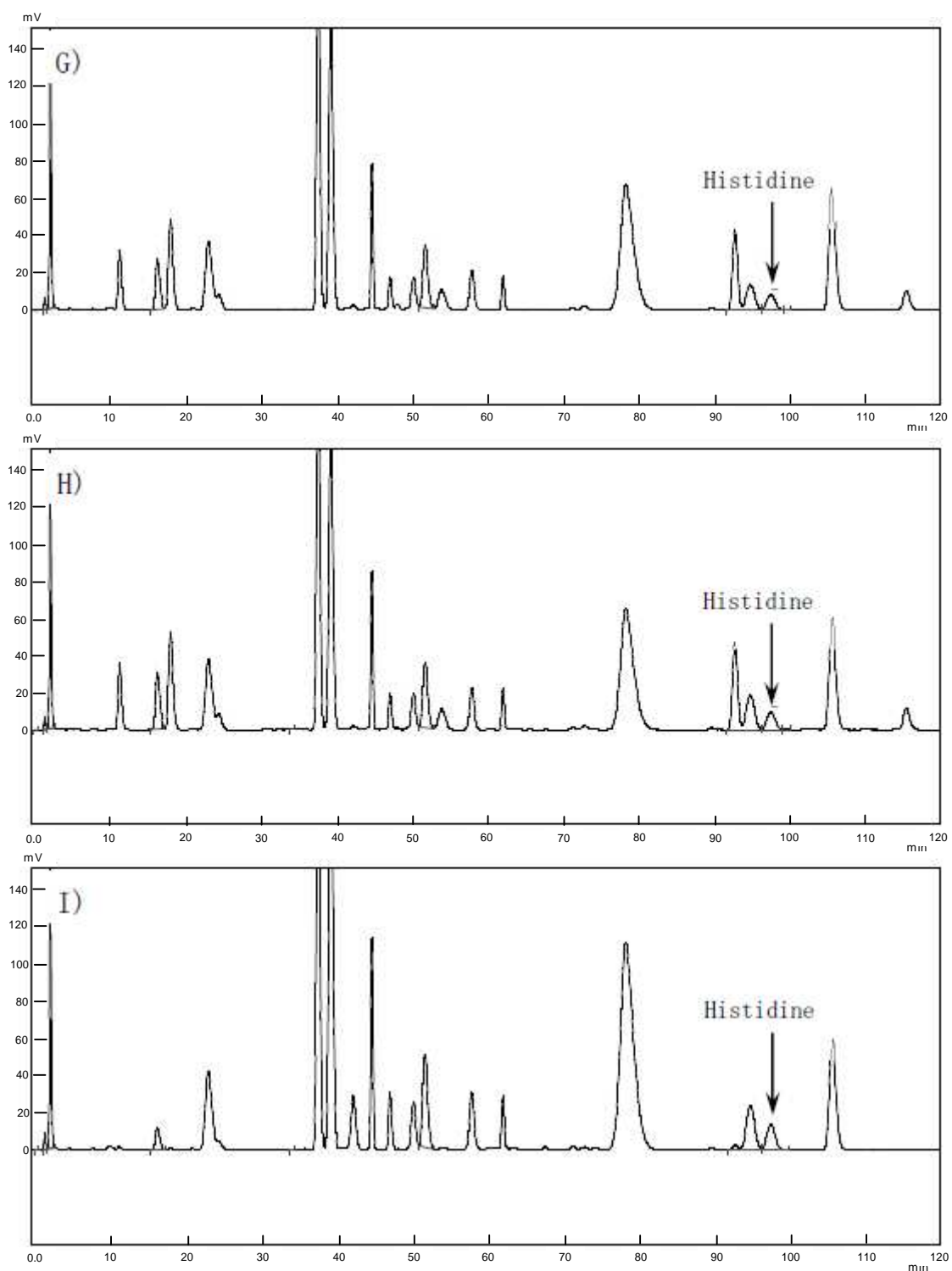


図 2.5 銀サケのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

G) 5 (保存 2 日)

H) 10 (保存 2 日)

I) 25 (保存 2 日)

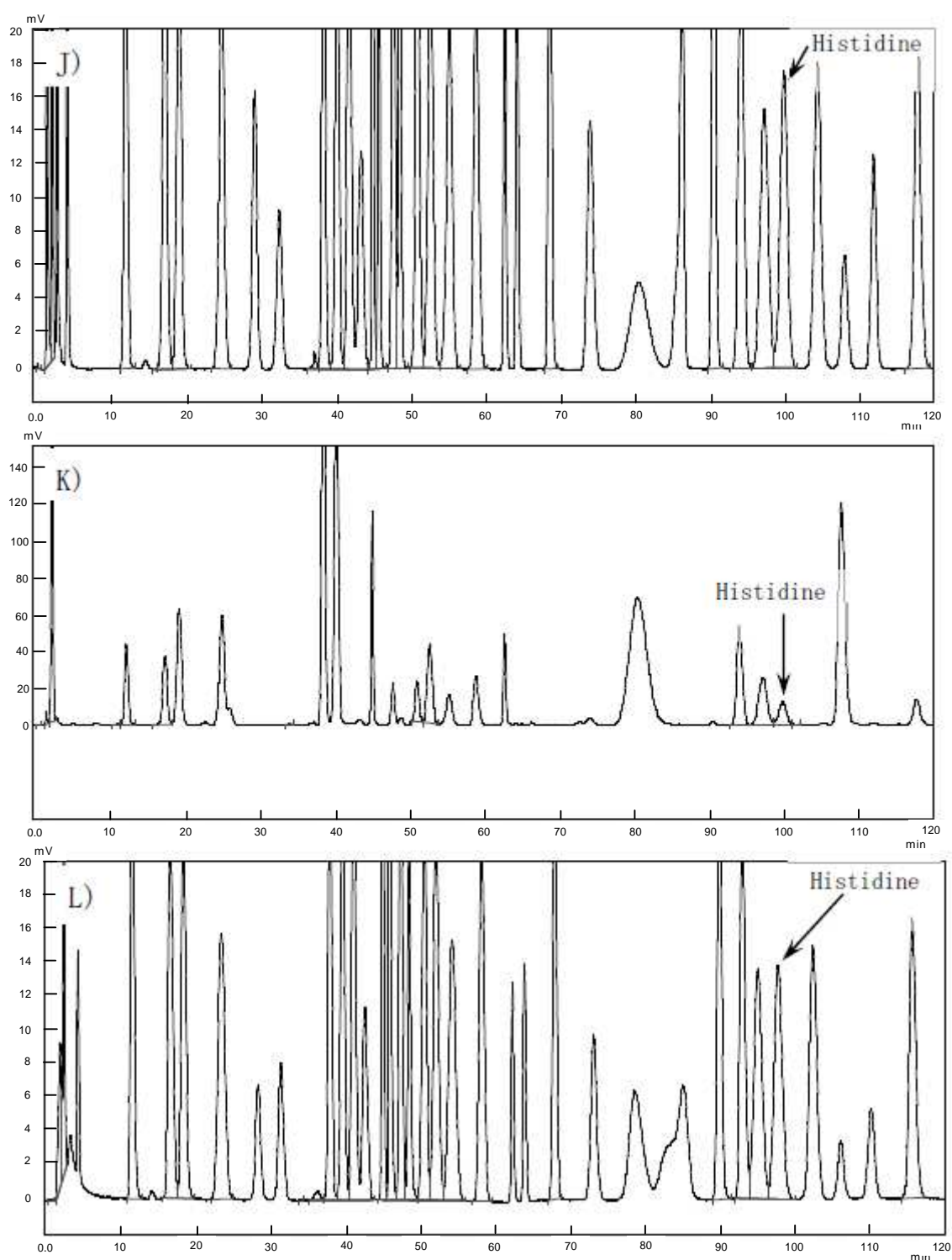


図 2.5 銀サケのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

J) 標準溶液 (K の定量用)

K) 5 (保存 4 日)

L) 標準溶液 (M ~ Q の定量用)

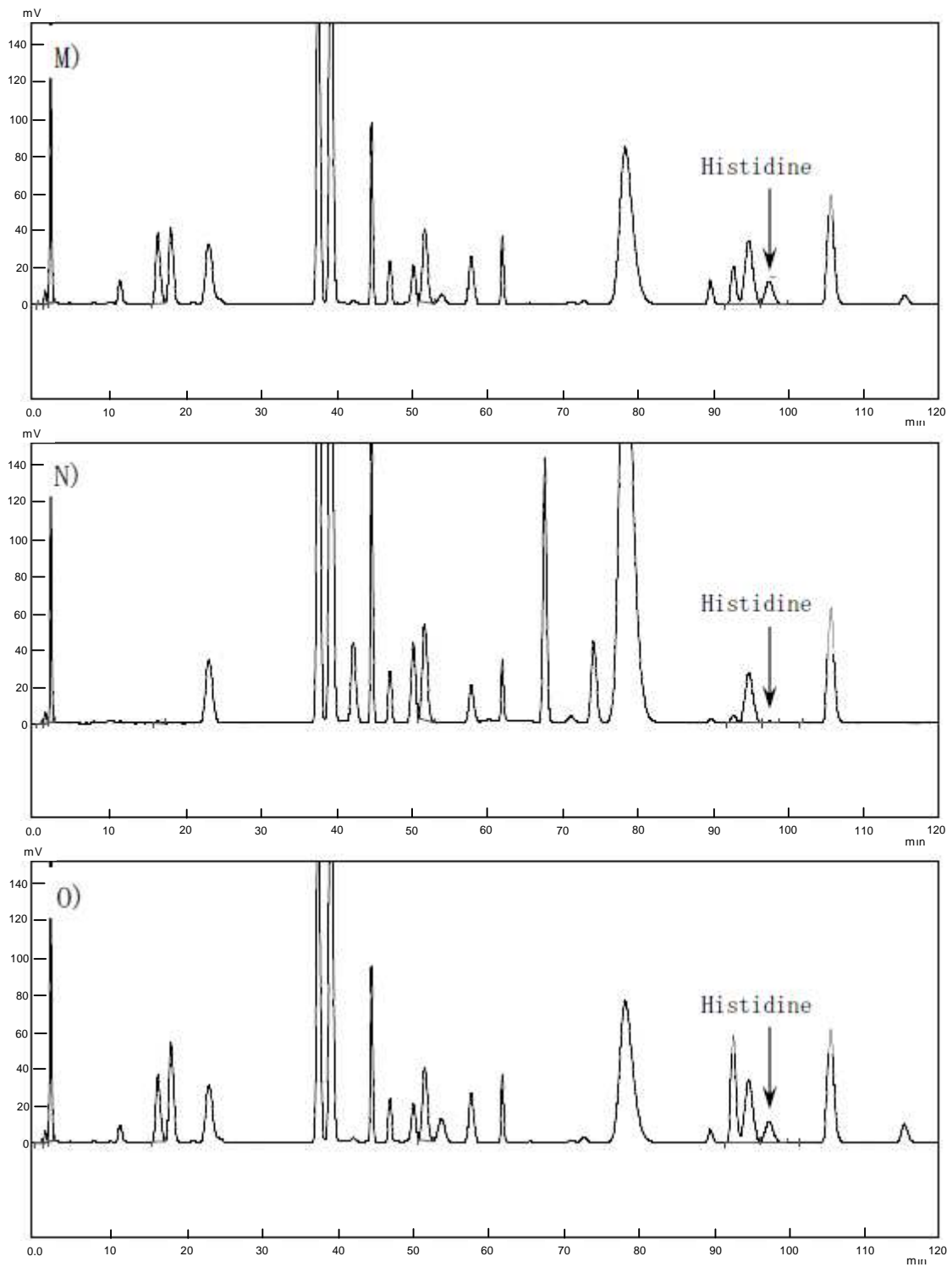


図 2.5 銀サケのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

M) 10 (保存 4 日)

N) 25 (保存 4 日)

O) 5 (保存 7 日)

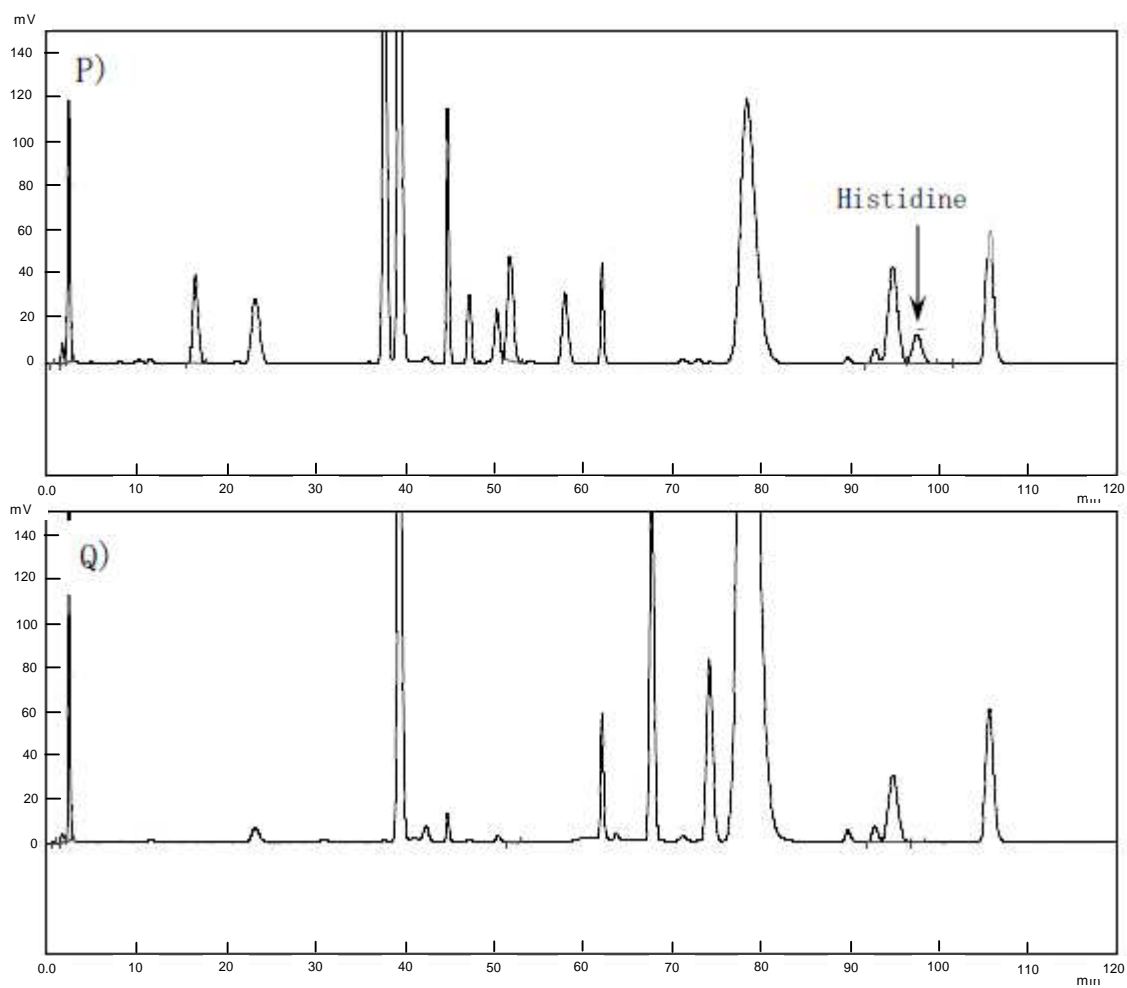


図 2.5 銀サケのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

P) 10 (保存 7 日)

Q) 25 (保存 7 日)

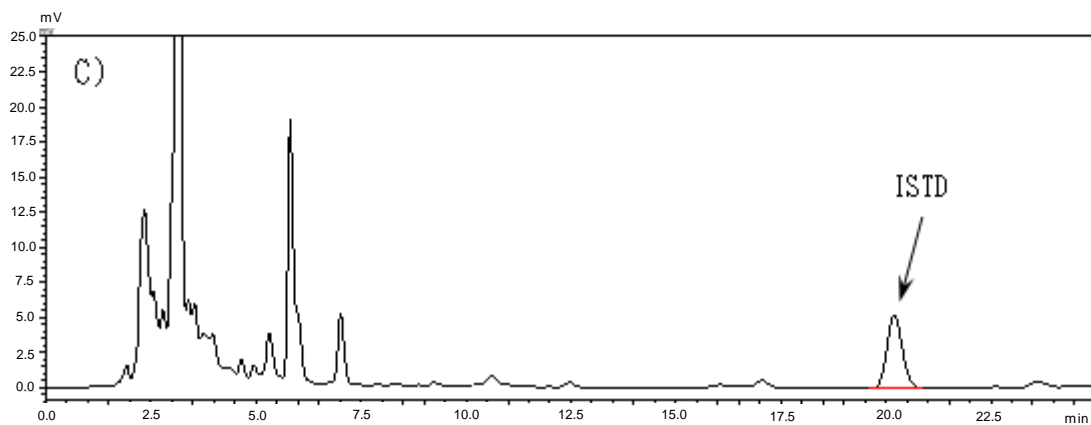
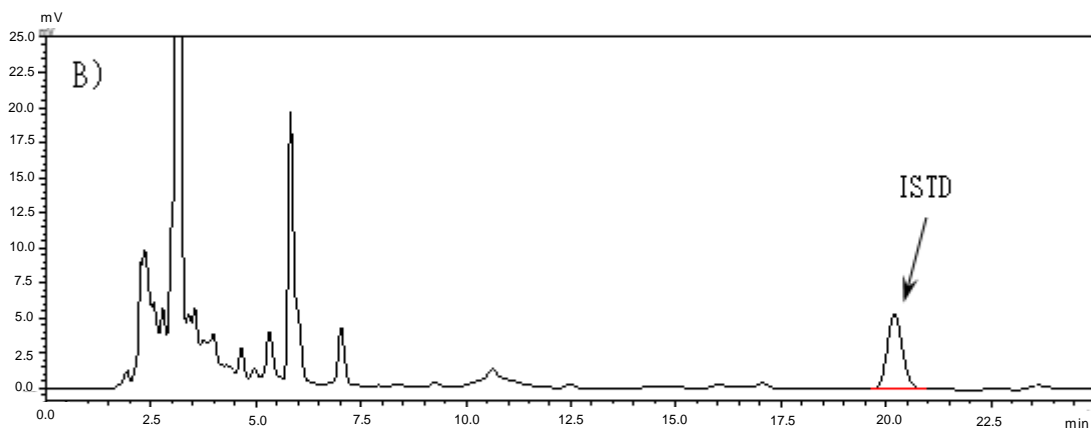
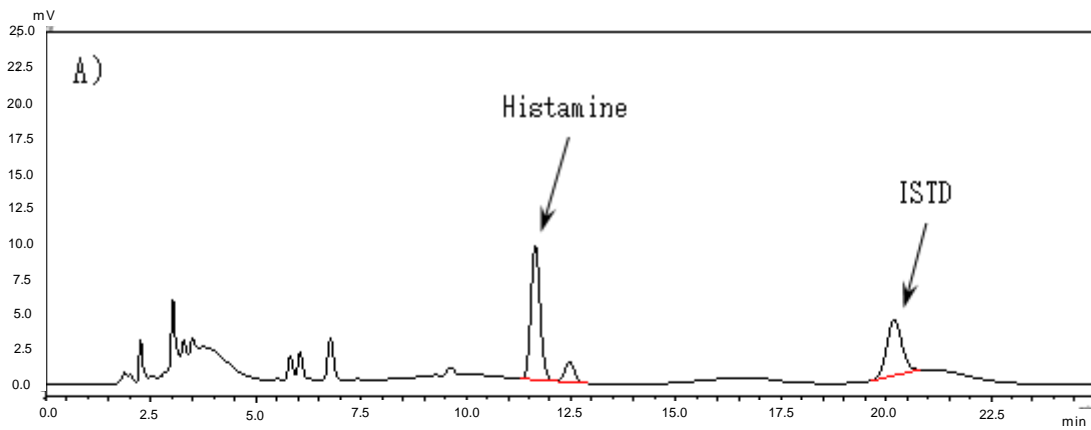


図 2.6 パナメイエビのヒスタミンのクロマトグラム

- A) 標準溶液 (B~Hの定量用)
- B) 調製日 (保存0日)
- C) 5 (保存1日)

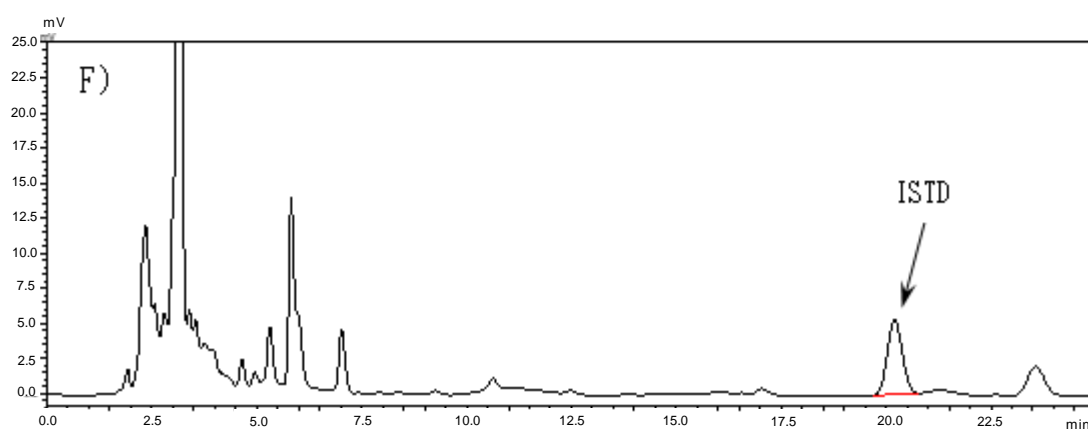
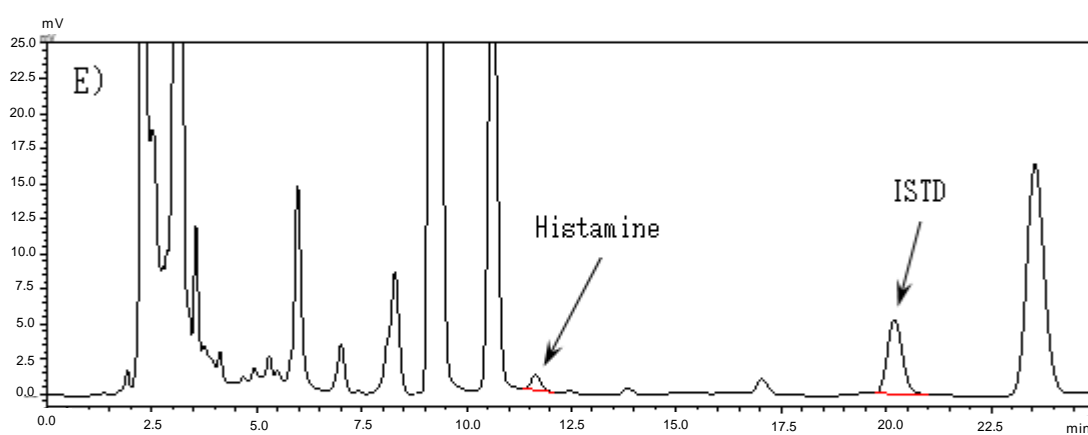
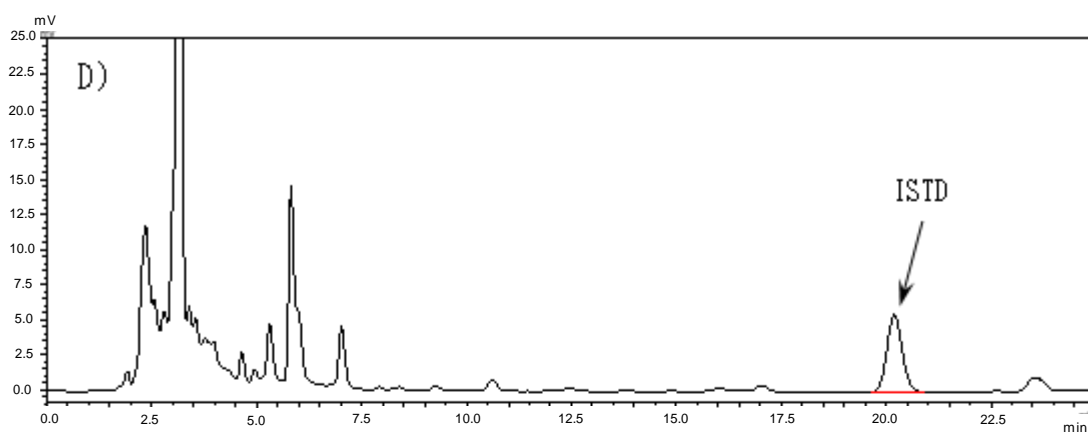


図 2.6 バナマイエビのヒスタミンのクロマトグラム (続き)

D) 10 (保存 1 日)

E) 25 (保存 1 日)

F) 5 (保存 2 日)

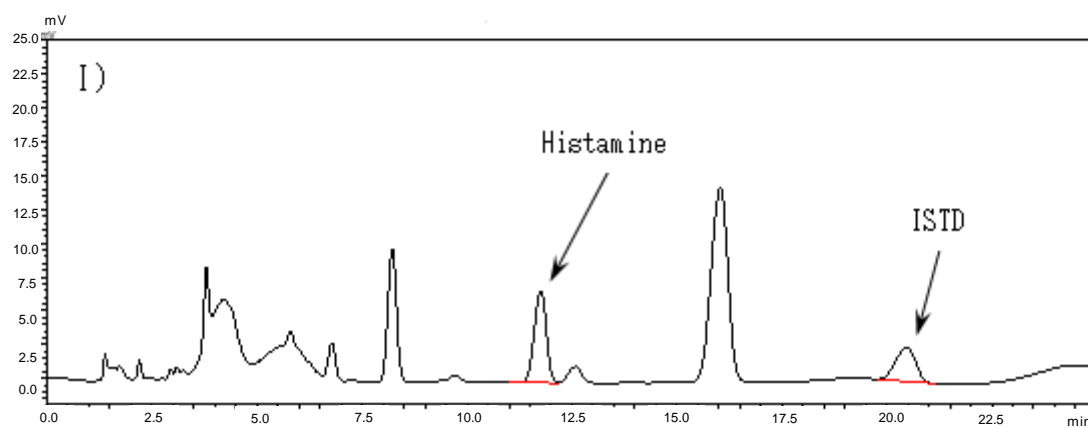
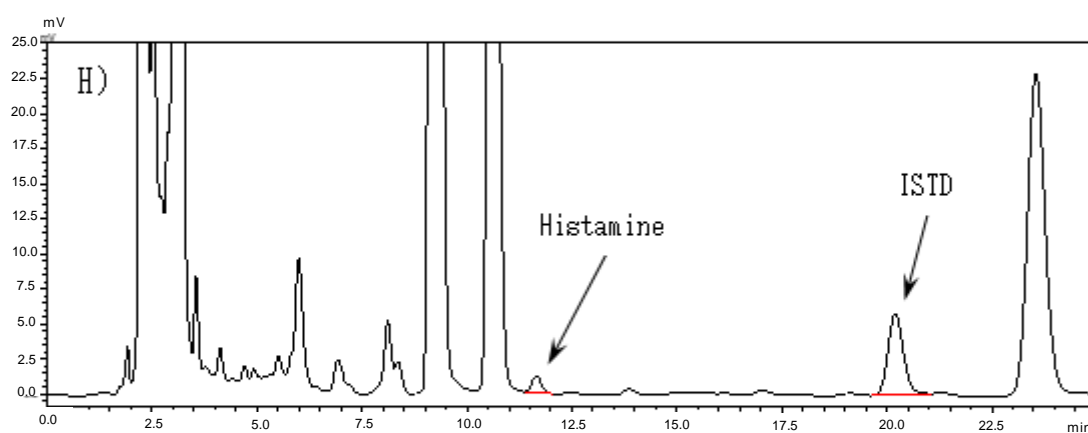
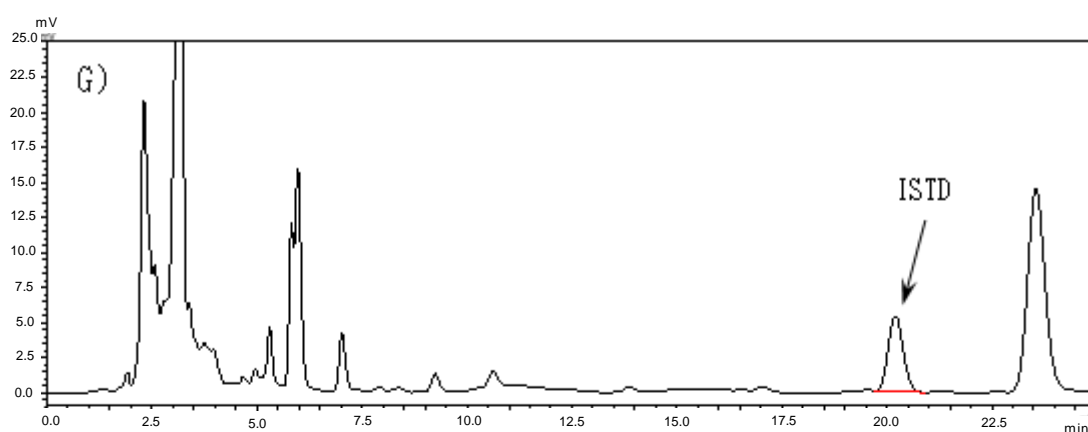


図 2.6 バナメイエビのヒスタミンのクロマトグラム (続き)

G) 10 (保存 2 日)

H) 25 (保存 2 日)

I) 標準溶液 (J~0 の定量用)

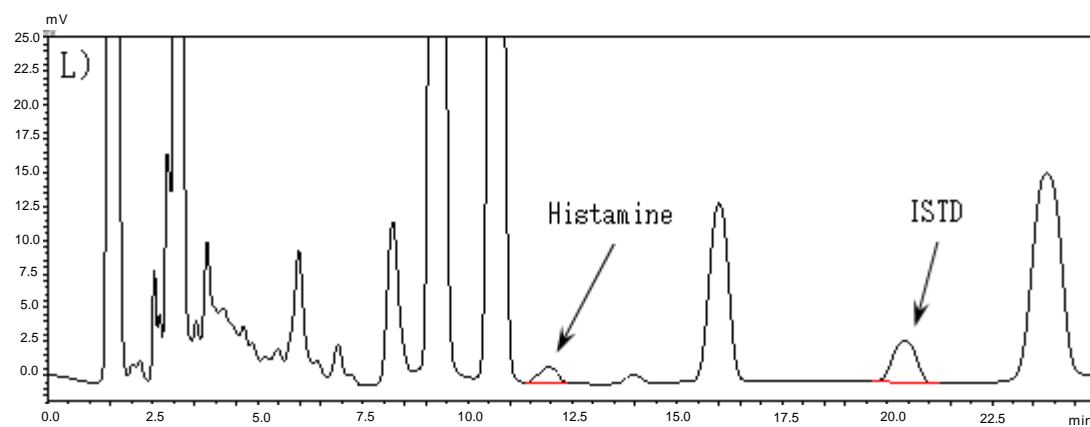
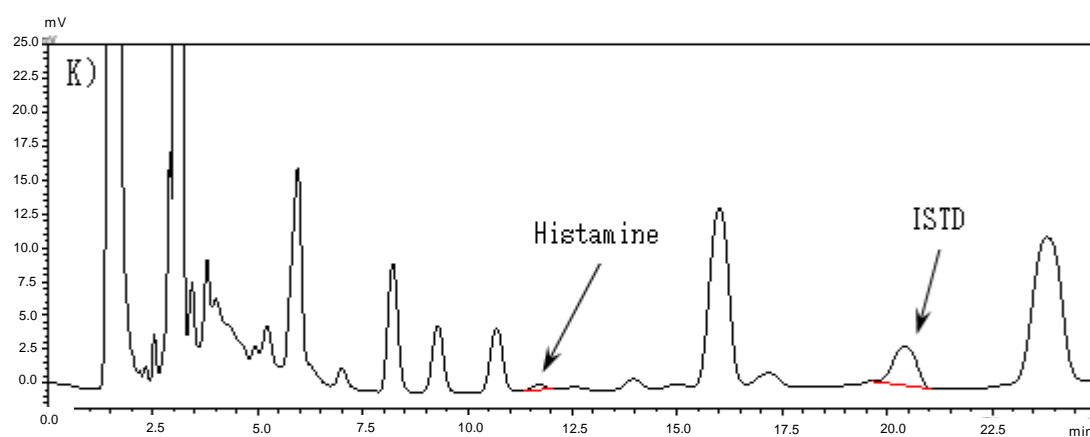
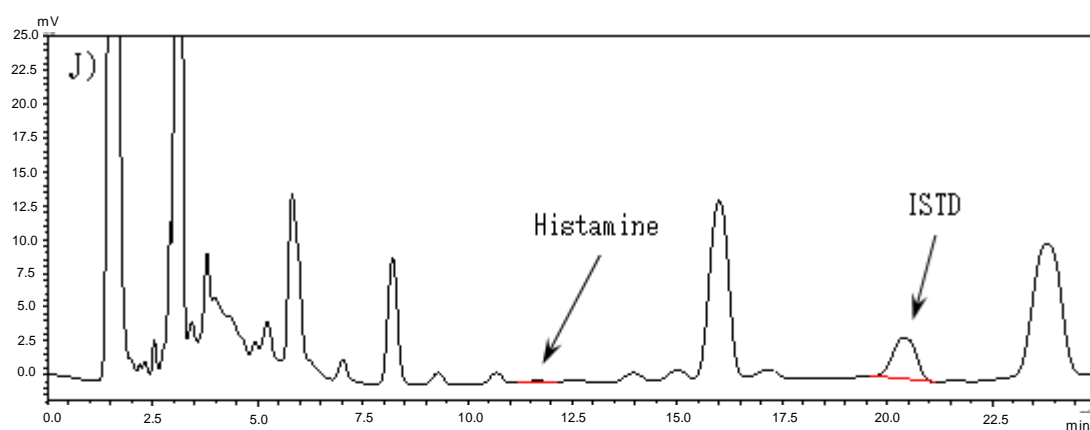


図 2.6 バナメイエビのヒスタミンのクロマトグラム (続き)

J) 5 (保存 4 日)

K) 10 (保存 4 日)

L) 25 (保存 4 日)

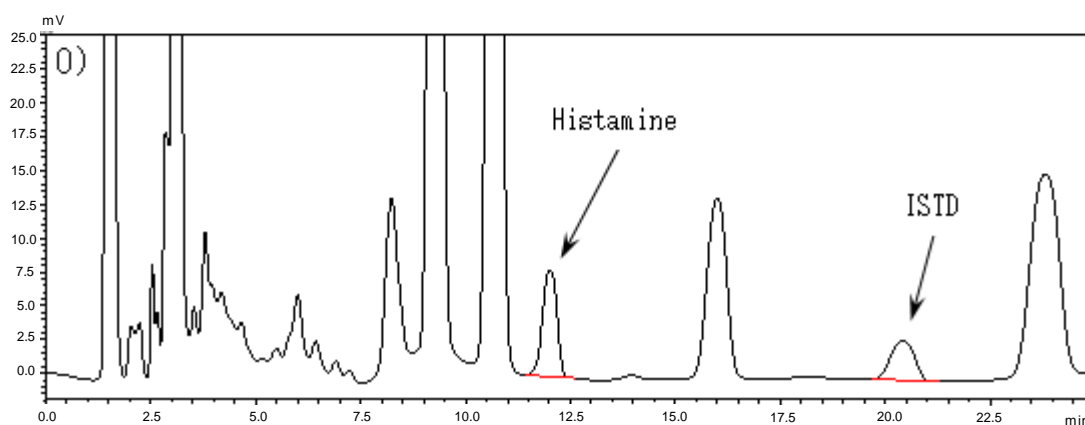
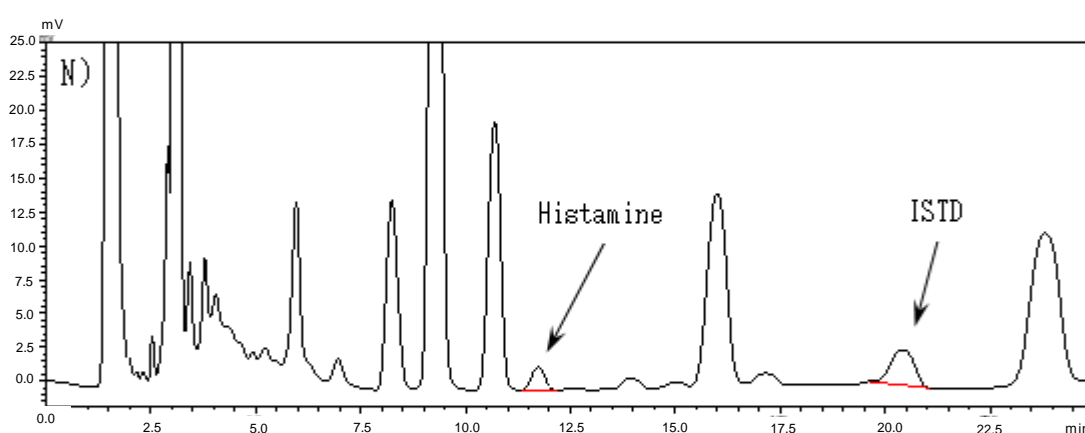
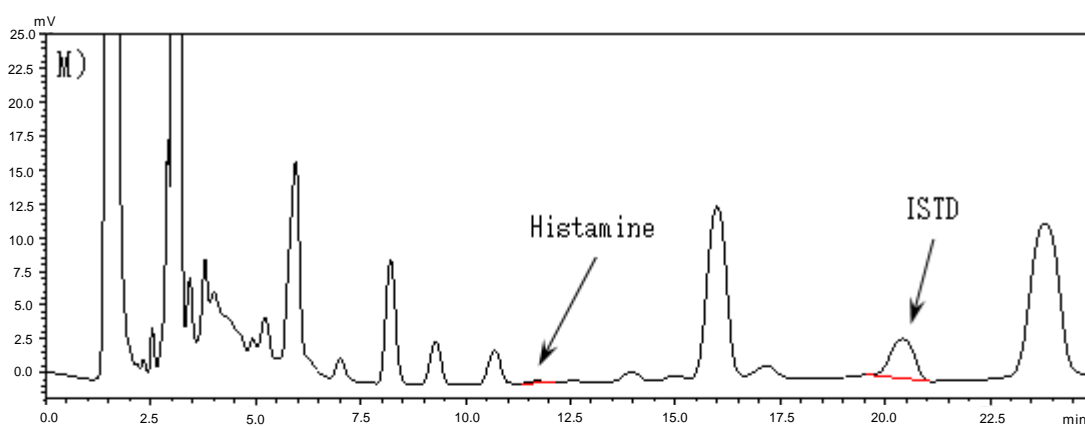


図 2.6 バナメイエビのヒスタミンのクロマトグラム (続き)

M) 5 (保存 7 日)

N) 10 (保存 7 日)

O) 25 (保存 7 日)

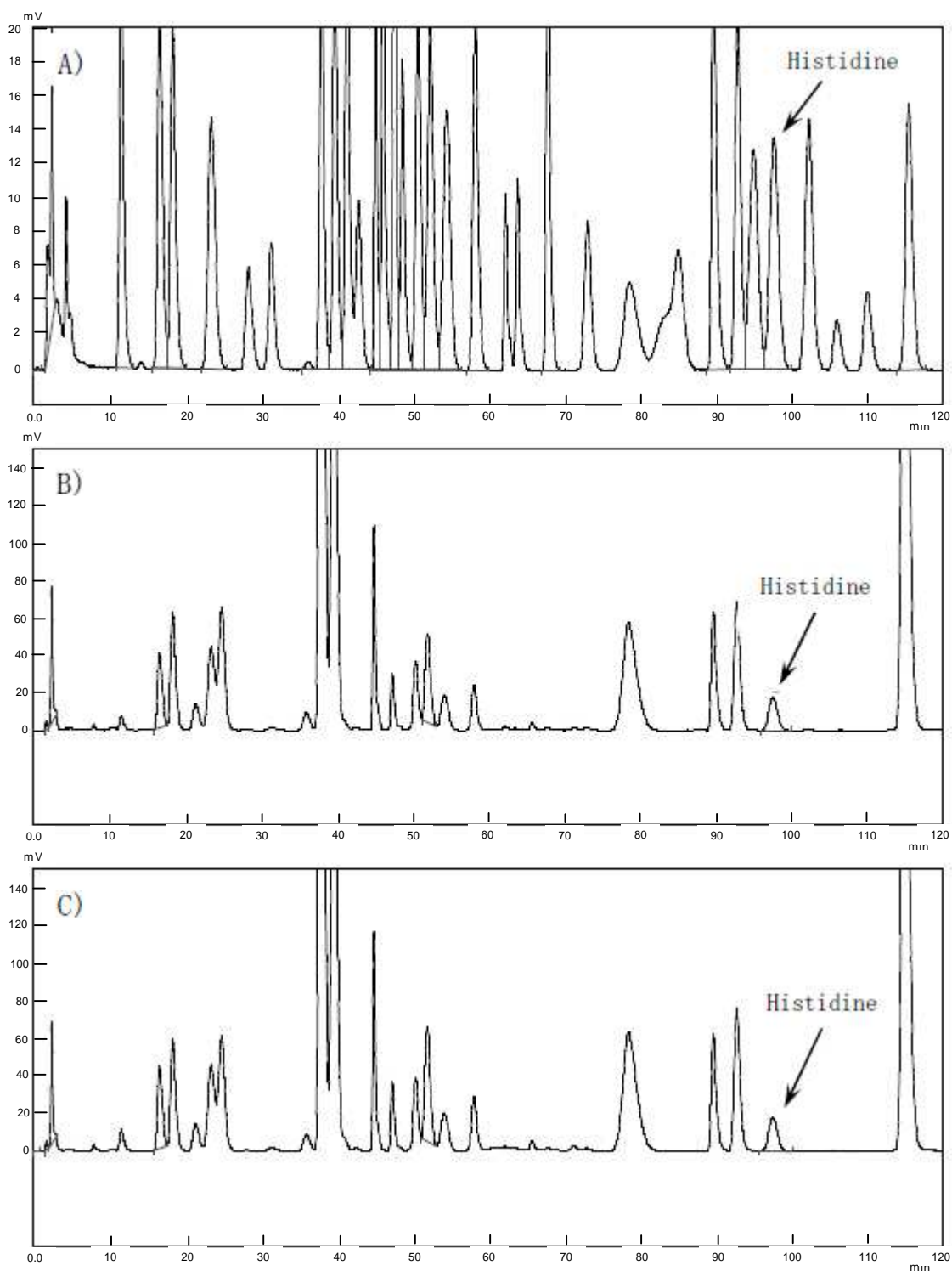


図 2.7 バナマイエビのヒスチジンのクロマトグラム

- A) 標準溶液 (B~Dの定量用)
- B) 調製日 (保存0日)
- C) 5 (保存1日)

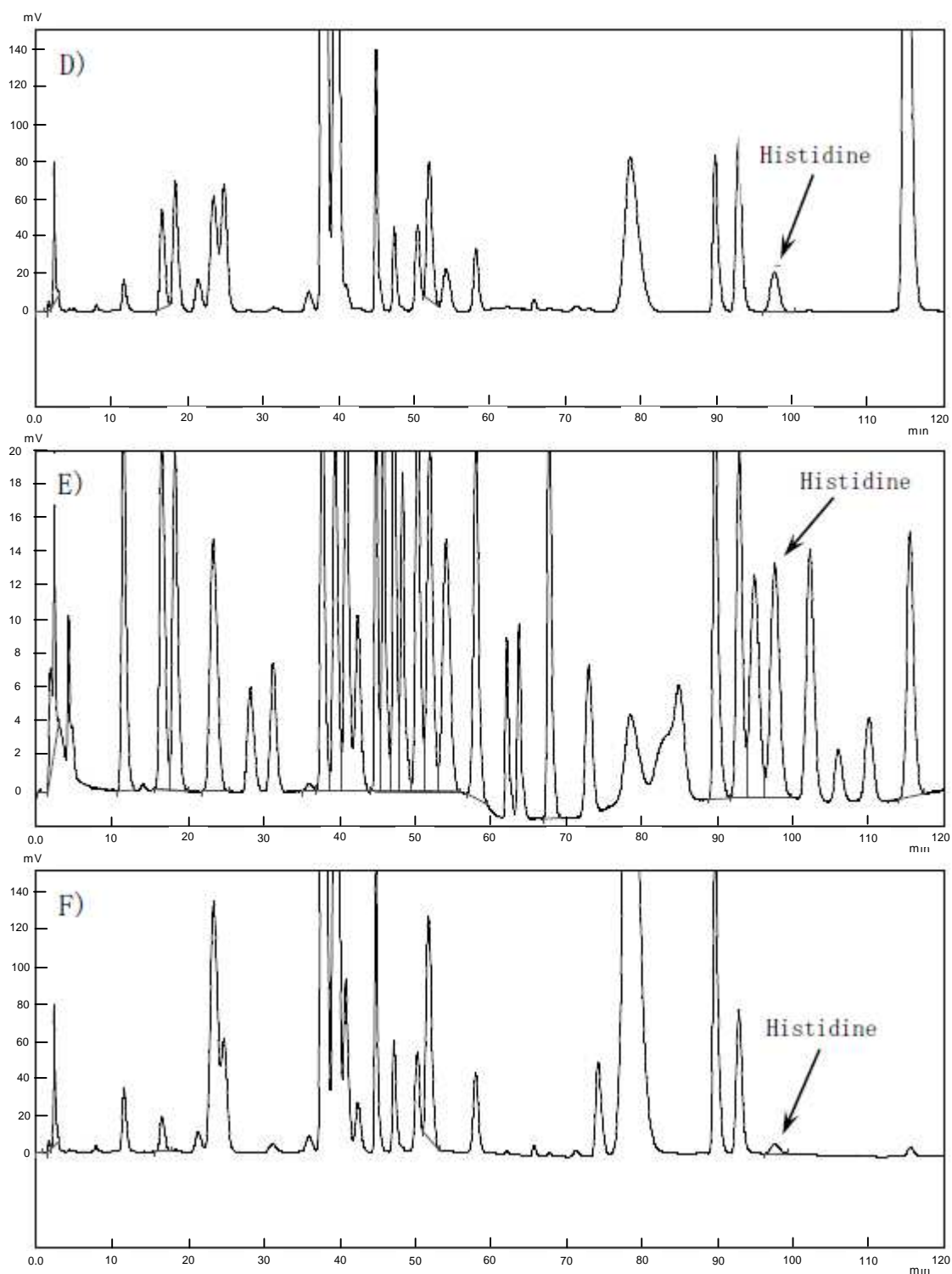


図 2.7 バナマイエビのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

D) 10 (保存 1 日)

E) 標準溶液 (F ~ I の定量用)

F) 25 (保存 1 日)

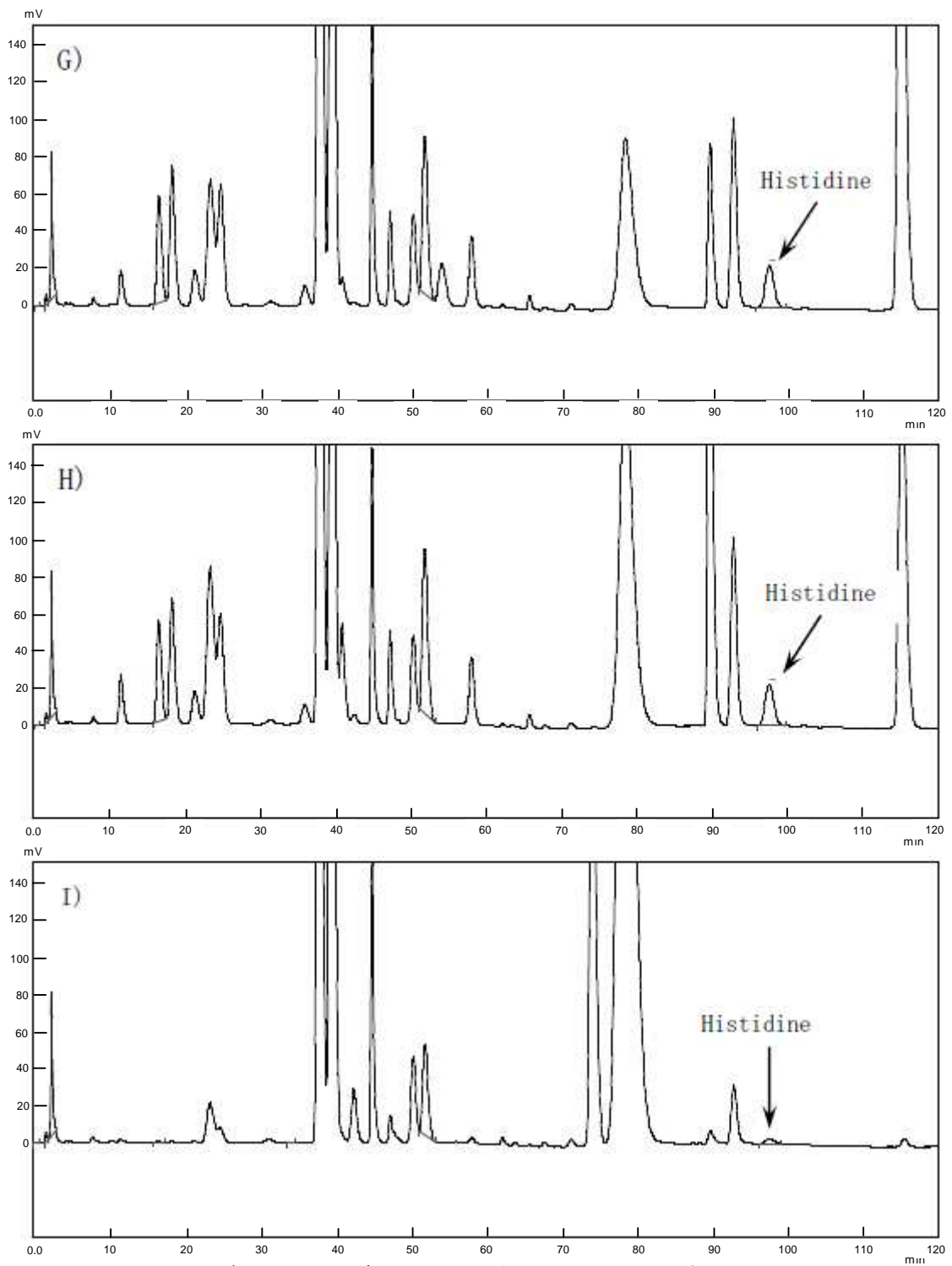


図 2.7 バナメイエビのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

G) 5 (保存 2 日)

H) 10 (保存 2 日)

I) 25 (保存 2 日)

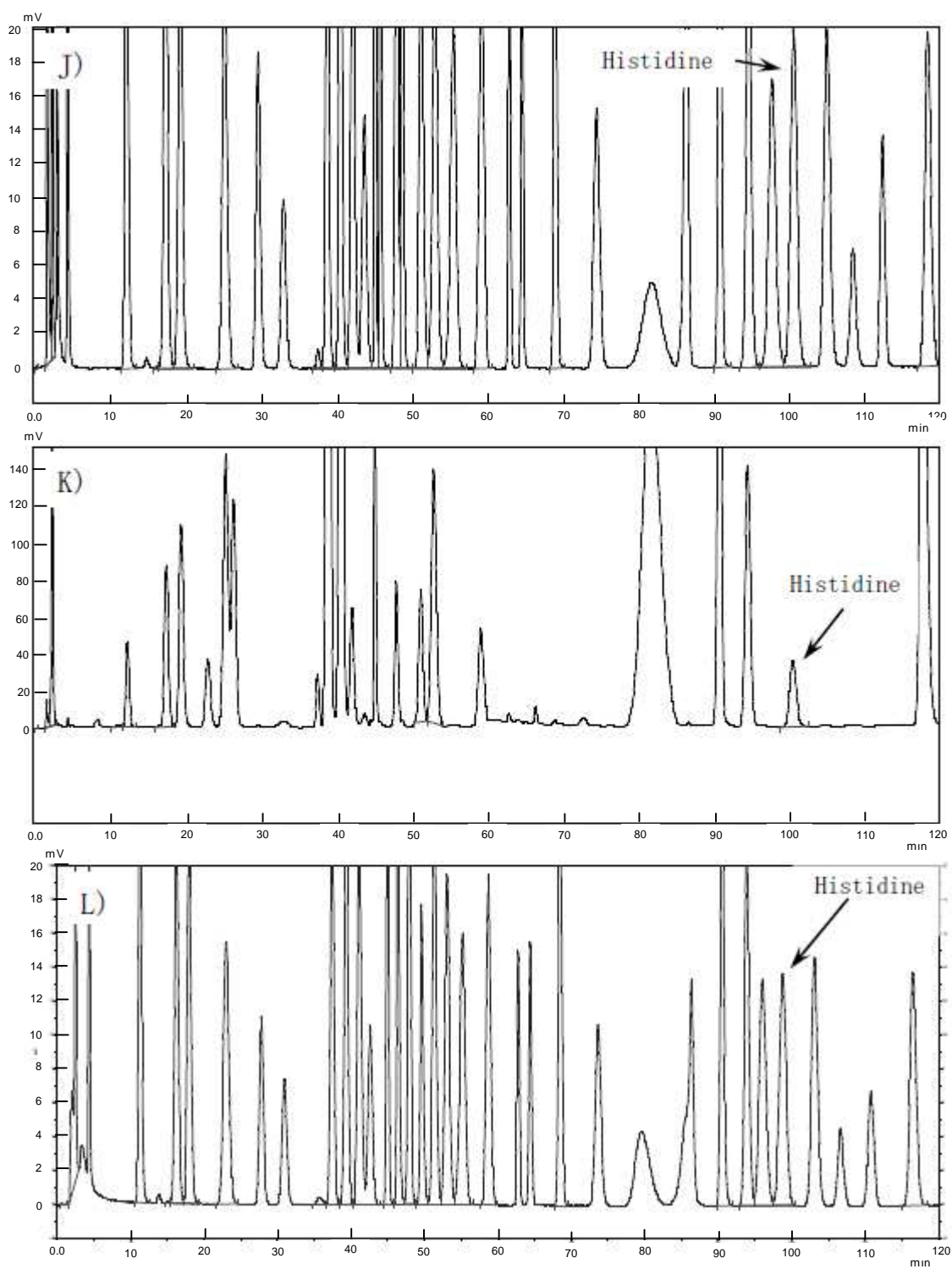


図 2.7 バナマイエビのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

J) 標準溶液 (K の定量用)

K) 5 (保存 4 日)

L) 標準溶液 (M ~ Q の定量用)

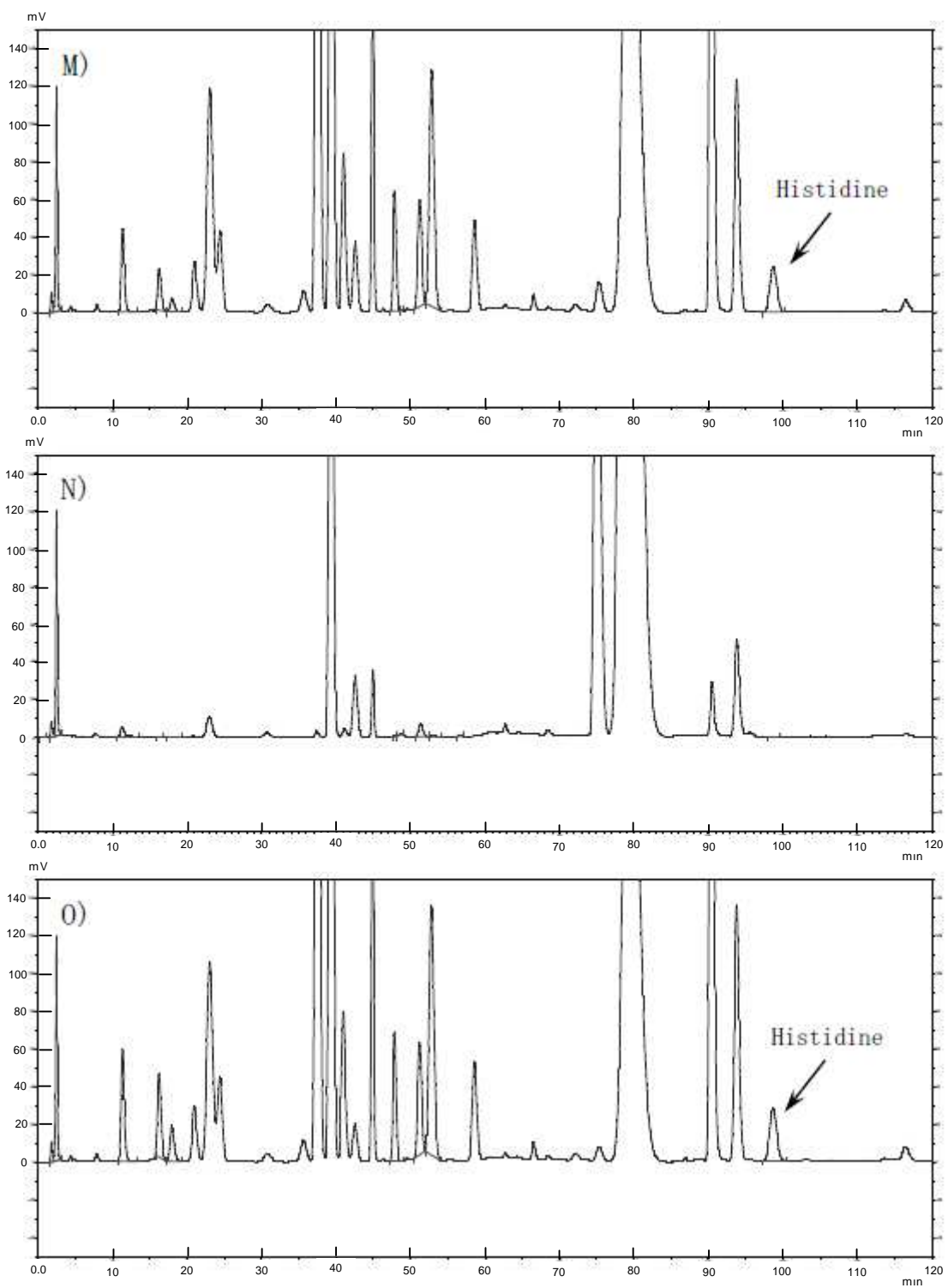


図 2.7 バナメイエビのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

M) 10 (保存 4 日)

N) 25 (保存 4 日)

O) 5 (保存 7 日)

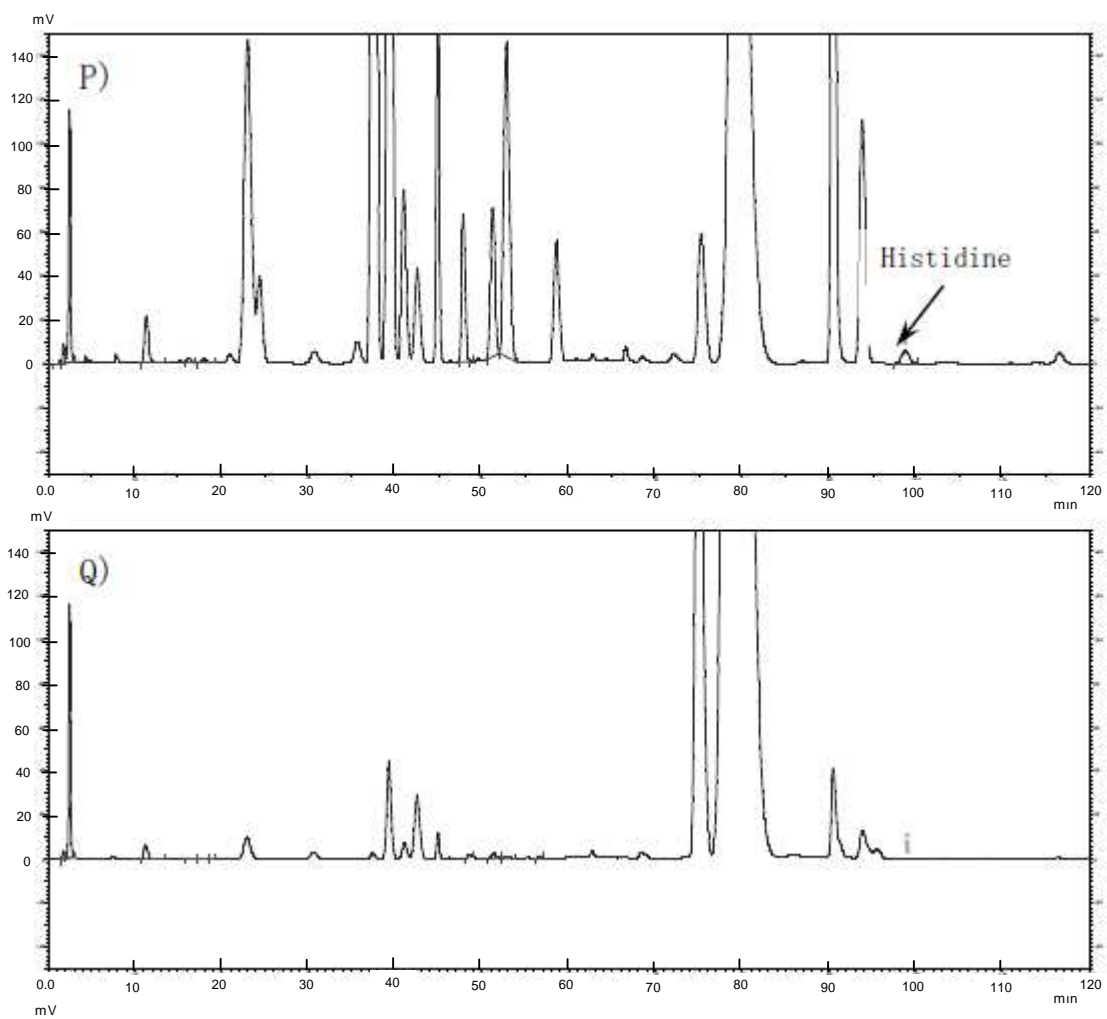


図 2.7 バナマイエビのヒスチジンのクロマトグラム (続き)

P) 10 (保存 7 日)

Q) 25 (保存 7 日)

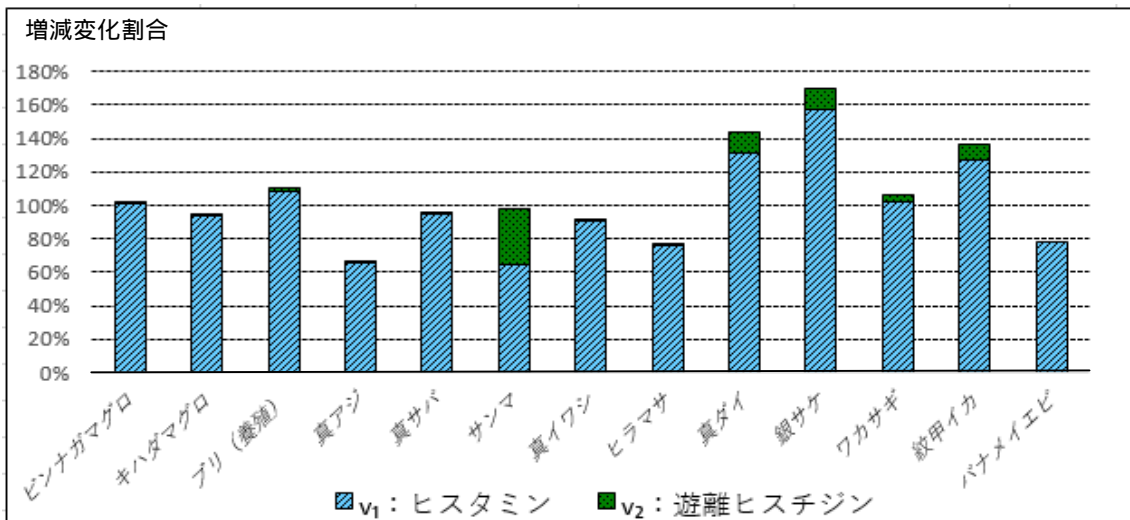


図 2.8 ヒスタミンが一定濃度 (5 mg/100g) 以上検出されたモデル試料のヒスタミンと遊離ヒスチジンの増減変化割合

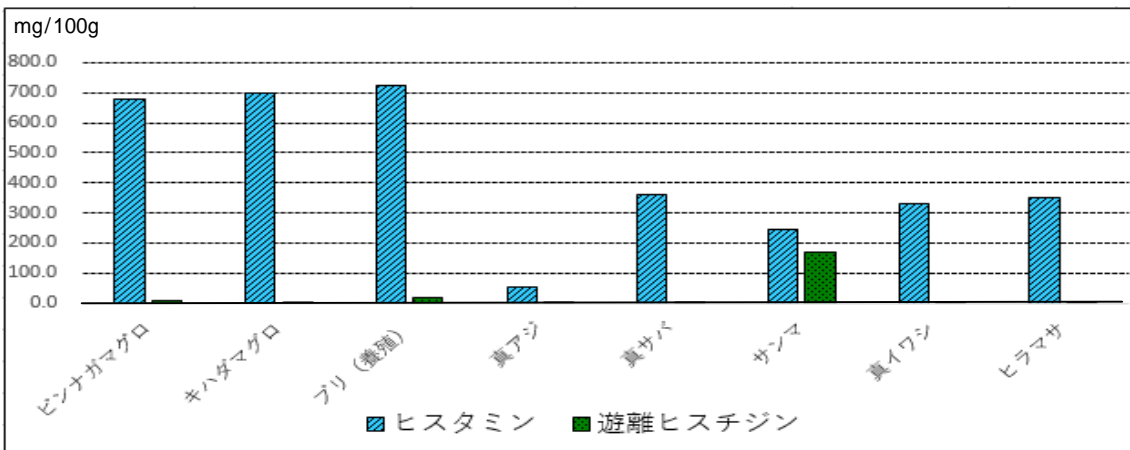


図 2.9 ヒスタミンが一定濃度 (5 mg/100g) 以上検出されたモデル試料 (赤身魚) のヒスタミンと遊離ヒスチジン含量

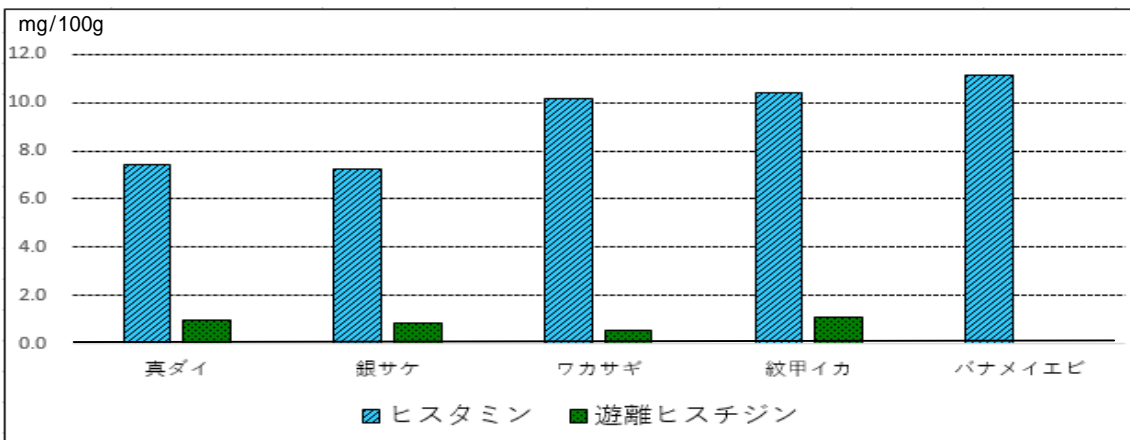


図 2.10 ヒスタミンが一定濃度 (5 mg/100g) 以上検出されたモデル試料 (白身魚・その他魚介類) のヒスタミンと遊離ヒスチジン含量

表 2.1 ヒスタミンの分析に用いた高速液体クロマトグラフの測定条件

装置	Prominence (株式会社島津製作所)
カラム	Mightysil RP-18 GP (250 mm, 4.6 mm, 5 μ m) (関東化学株式会社)
移動相	アセトニトリル：精製水 = 65 : 35 (v/v)
流量	1.3 mL/分
カラム温度	40°C
注入量	10 μ L
検出器	UV-VIS検出器 (SPD-20A) (株式会社島津製作所)
検出波長	254 nm

表 2.2 ヒスチジンの分析に用いた高速アミノ酸分析計の測定条件

装置	L-8900 (株式会社日立ハイテクノロジーズ)											
反応カラム	高速アミノ酸分析計L-8900用反応カラム (60 mm×4.6 mm)											
分析カラム	高速アミノ酸分析計L-8900用分析カラム (60 mm×4.6 mm×3 μm)											
注入量	20 μL											
検出器	UV-Vis検出器 (株式会社日立ハイテクノロジーズ)											
検出波長	570 nm											
グラジエント条件：												
時間 (min)	%B1	%B2	%B3	%B4	%B5	%B6	ポンプ1流量 (mL/min)	カラム温度 (°C)	%R1	%R2	%R3	ポンプ2流量 (mL/min)
0.0	100	0	0	0	0	0	0.350	38	50	50	0	0.300
2.1								30				
22.8	100	0	0	0	0	0						
22.9	80	20	0	0	0	0		60				
35.5	70	30	0	0	0	0						
35.6	10	90	0	0	0	0						
38.7								40				
46.1	10	90	0	0	0	0						
46.2	0	100	0	0	0	0						
53.5	0	100	0	0	0	0		70				
53.6	0	0	100	0	0	0						
72.5								45				
73.7	0	0	100	0	0	0						
73.8	60	0	0	40	0	0						
79.5	60	0	0	40	0	0						
79.6	0	0	0	100	0	0						
86.9	0	0	0	100	0	0						
87.0	0	20	0	80	0	0						
98.1								70				
105.5	0	20	0	80	0	0						
105.6	0	0	0	100	0	0						
119.3	0	0	0	100	0	0						
119.4	0	0	0	0	0	100						
123.0									50	50	0	
123.1	0	0	0	0	0	100			0	0	100	
128.8	0	0	0	0	0	100						
128.9	100	0	0	0	0	0						
132.5								38				
133.6									0	0	100	
133.7									50	50	0	
156.9	100	0	0	0	0	0						

移動相：

- ポンプ1(B1)：高速アミノ酸分析計用 生体液分析法緩衝液 PF-1 KANTO
- ポンプ1(B2)：高速アミノ酸分析計用 生体液分析法緩衝液 PF-2 KANTO
- ポンプ1(B3)：高速アミノ酸分析計用 生体液分析法緩衝液 PF-3 KANTO
- ポンプ1(B4)：高速アミノ酸分析計用 生体液分析法緩衝液 PF-4 KANTO
- ポンプ1(B6)：高速アミノ酸分析計用 生体液分析法緩衝液 PF-RG KANTO
- ポンプ2(R1)：高速アミノ酸分析計用 コントロール溶液
- ポンプ2(R2)：高速アミノ酸分析計用 緩衝液
- ポンプ2(R3)：5 (v/v)%イソプロ

反応装置温度：135°C

表 2.3 赤身魚のモデル試料におけるヒスタミン
および遊離ヒスチジン含量

魚種 (Latin name)	保存 日数	ヒスタミン (mg/100g)			遊離ヒスチジン (mg/100g)		
		5°C	10°C	25°C	5°C	10°C	25°C
ビンナガマグロ : <i>Thunnus alalunga</i>	0		ND			936	
	1	ND	ND	ND	949	939	974
	2	ND	ND	24.1	962	965	944
	4	ND	30.3	542	938	910	296
	7	3.3	351	678	1026	549	9.0
キハダマグロ : <i>Thunnus albacares</i>	0		ND			1039	
	1	ND	ND	ND	1030	969	1037
	2	ND	ND	ND	998	1062	1044
	4	ND	ND	358	1050	987	89.4
	7	ND	ND	697	1031	1068	1.2
ブリ (天然) : <i>Seriola quinqueradiata</i>	0		ND			883	
	1	ND	ND	ND	872	875	844
	2	ND	ND	ND	857	895	893
	4	ND	ND	ND	916	913	895
	7	ND	ND	ND	909	883	934
ブリ (養殖) : <i>Seriola quinqueradiata</i>	0		ND			929	
	1	ND	ND	ND	879	891	873
	2	ND	ND	ND	943	887	839
	4	ND	ND	415	951	925	410
	7	ND	ND	724	947	907	17.5
真アジ : <i>Caranginae</i>	0		ND			112	
	1	ND	ND	ND	111	111	109
	2	ND	ND	34.3	107	107	58.8
	4	ND	4.4	52.2	108	97.7	2.0
	7	ND	41.1	47.3	107	54.7	ND
真サバ : <i>Scomber japonicus</i>	0		ND			533	
	1	ND	ND	1.5	548	545	526
	2	ND	ND	196	536	562	297
	4	ND	82.2	362	612	448	2.8
	7	20.2	271	339	581	236	1.2
サンマ : <i>Cololabis saira</i>	0		ND			525	
	1	ND	ND	ND	479	536	490
	2	ND	17.6	121	518	479	360
	4	0.3	143	207	478	315	147
	7	60.9	245	203	418	171	3.8
カツオ : <i>Katsuwonus pelamis</i>	0		ND			1552	
	1	ND	ND	ND	1423	1391	1388
	2	ND	ND	ND	1475	1401	1458
	4	ND	ND	0.4	1480	1381	1444
	7	ND	ND	2.3	1392	1422	1267

ND : < 0.2 mg/100g

表 2.3 赤身魚のモデル試料におけるヒスタミン
および遊離ヒスチジン含量 (続き)

魚種 (Latin name)	保存 日数	ヒスタミン (mg/100g)			遊離ヒスチジン (mg/100g)		
		5°C	10°C	25°C	5°C	10°C	25°C
	0		ND		506		
真イワシ : <i>Sardina pilchardus</i>	1	ND	ND	23.8	500	513	458
	2	ND	2.4	298	491	500	114
	4	9.2	139	330	511	319	3.9
	7	106	256	282	321	181	1.7
	0		ND		644		
ヒラマサ : <i>Seriola lalandi</i>	1	ND	ND	0.8	601	622	612
	2	ND	ND	239	606	592	220
	4	ND	2.8	334	576	583	2.3
	7	2.9	235	349	601	232	1.3

ND : < 0.2 mg/100g

表 2.4 白身魚のモデル試料におけるヒスタミンおよび遊離ヒスチジン含量

魚種 (Latin name)	保存 日数	ヒスタミン (mg/100g)			遊離ヒスチジン (mg/100g)		
		5°C	10°C	25°C	5°C	10°C	25°C
真ダイ : <i>Pagrus major</i>	0		ND		7.9		
	1	ND	ND	1.3	8.3	7.4	7.5
	2	ND	ND	7.4	8.0	8.2	1.0
	4	ND	ND	6.4	8.5	7.6	0.2
	7	ND	3.4	6.6	8.6	1.6	ND
真ダラ : <i>Gadus macrocephalus</i>	0		ND		2.6		
	1	ND	ND	ND	2.7	2.0	1.8
	2	ND	ND	ND	2.1	1.4	ND
	4	ND	ND	ND	1.2	0.6	ND
	7	ND	ND	ND	0.5	ND	ND
銀サケ : <i>Oncorhynchus kisutch</i>	0		ND		6.4		
	1	ND	ND	ND	8.3	9.3	13.8
	2	ND	ND	0.3	9.3	10.6	15.1
	4	ND	ND	7.3	10.1	12.7	0.8
	7	ND	ND	7.0	11.9	13.2	ND
メカジキ : <i>Xiphias gladius</i>	0		ND		3.0		
	1	ND	ND	ND	3.4	3.8	4.8
	2	ND	ND	ND	3.5	3.9	5.9
	4	ND	ND	ND	3.7	4.2	ND
	7	ND	ND	ND	4.1	3.2	ND
ワカサギ : <i>Hypomesus nipponensis</i>	0		1.1		12.4		
	1	3.4	4.8	8.9	10.0	7.1	7.8
	2	5.4	6.3	10.2	6.9	3.3	0.6
	4	7.9	8.4	9.8	2.8	0.7	0.6
	7	9.3	7.8	9.6	1.6	ND	0.3

ND : < 0.2 mg/100g

表 2.5 その他魚介類のモデル試料におけるヒスタミン
および遊離ヒスチジン含量

魚種 (Latin name)	保存 日数	ヒスタミン (mg/100g)			遊離ヒスチジン (mg/100g)		
		5°C	10°C	25°C	5°C	10°C	25°C
紋甲イカ : <i>Sepia lycidas</i>	0		ND			11.4	
	1	ND	ND	3.6	12.5	12.8	13.0
	2	ND	2.8	10.4	13.8	8.8	1.1
	4	3.1	7.9	9.5	8.3	ND	ND
	7	8.7	9.8	7.7	ND	ND	ND
バナメイエビ : <i>Litopenaeus vannamei</i>	0		ND			19.9	
	1	ND	ND	0.8	19.4	23.8	5.3
	2	ND	ND	0.8	24.5	23.7	3.0
	4	0.2	0.6	2.5	27.8	27.4	ND
	7	0.3	2.6	11.2	31.9	6.5	ND
ホタテ : <i>Patinopecten yessoensis</i>	0		ND			7.0	
	1	ND	ND	ND	7.7	8.3	10.5
	2	ND	ND	ND	8.9	9.9	10.4
	4	ND	ND	ND	10.3	11.0	10.9
	7	ND	ND	ND	11.3	12.2	12.6

ND : < 0.2 mg/100g



写真 2.1 ミルミキサー（岩谷産業製、型番：IFM-800DG）



未調製の検体



検体
(骨の除去、角切り後)

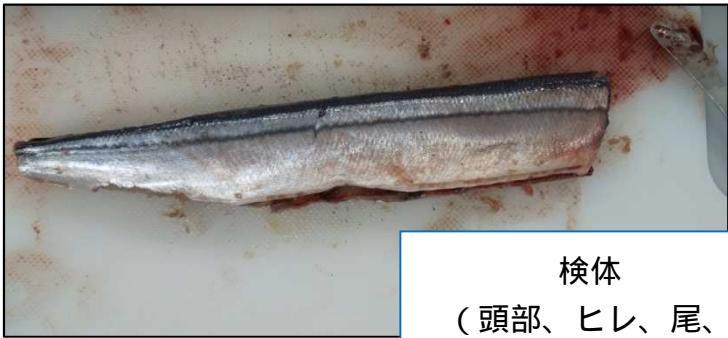


検体 (ミキサー処理後)

写真 2.2 銀サケの前処理の概要



未調製の検体



検体
(頭部、ヒレ、尾、
内臓、骨の除去後)



検体
(角切り後)



検体
(ミキサー処理後)

写真 2.3 サンマの前処理の概要

第 3 章 果実類の糖分析における前処理方法の 検討および糖含量の比較

3.1 はじめに

果実類には、呈味成分の中でも甘みの成分である果糖、ブドウ糖、ショ糖が多く含まれていることが知られている。果実は、これらの糖類が多く含まれることによって、甘く、美味しいと感じるとともに、これらの糖類を摂取した際に栄養源となることから、重要な食品である。また、果実では、一般的に成熟といわれる、果肉が柔らかくなり、芳香成分の生成、酸味の低下や、デンプンの分解と糖含量の増加、糖組成の変化といったさまざまな生化学的、生理学的な変化が起こる。十分に成熟させることで、より美味しく食べられることから、バナナやキウイフルーツなど、いくつかの果実は、一定期間、熟成室に保存し成熟させる、いわゆる追熟により熟成させ、消費者の手元に届けるといった工夫がなされている[49][50]。そのため、追熟の技術についても多くの研究がなされている。また近年、より甘く、酸味の少ない新しい品種を育成するといった品種改良も多くなされており、そのために果実に含まれる糖度、酸度や、糖類（主に果糖・ブドウ糖・ショ糖）の調査研究も多い[51][52]。ほかにも、最近では地域ブランドとなる果実も注目を集めている[53]。

果実や、果実の甘味成分である糖類は、われわれの食生活において密接に関係することから、古くから注目され多くの研究がなされている。しかし、果実にはショ糖分解酵素であるインベルターゼなどの多くの酵素が含まれることが知られており、果実に含まれる糖類を分析する際、分析操作中に、これらの酵素の影響によって、ショ糖が加水分解されることから、糖組成や、それぞれの糖含量が変化することが報告されている[54][55]。そのため、果実の糖分析において、酵素の影響を受けず分析操作を行うことは、正確な分析結果を得るための重要な課題である。インベルターゼによるショ糖の加水分解の反応機構を図3.1に示す。

食品に含まれる栄養成分の基礎的データとして公表されている日本食品標準成分表[56]においては、柿果実について、糖類の分析操作時にインベルターゼが作用することから、試料（柿）の前処理方法として、果肉を電子レンジでマイクロ波加熱し、酵素を失活させた後、破碎し、加熱後の試料を糖分析に用いることで、酵素によるショ糖の加水分解を防ぐ方法(以下、電子レンジ処理法A)

が示されている。しかし、そのほかの果実について同様の前処理方法の記載はされていないことから、日本食品標準成分表では、柿以外の果実において、糖類の分析時に酵素が作用するか示されていない。また、マイクロ波による加熱は、試料が高温となることから、試料の状態が変わることや、熱による糖組成の変化といった影響も考えられる。さらに、マイクロ波加熱に用いる試料は 10 g とされており、一般的に喫食する果実の量に比べ少ないことや、果実全体を代表する部位を縮分できるよう、外側や内側、上の方や下の方、表側や裏側など多くの部位からサンプリングしたり、複数の果実からサンプリングする場合など、より正確に果実全体の分析結果を得るためには十分ではないと考えられる。糖含量の算出時にも、マイクロ波加熱により試料中の水分が蒸発し、試料重量が変わるため、正しい定量値を得るためには、蒸発した水分量を正しく計測し、補正する操作が必要であり、多くの注意が必要である。

本研究では、柿を対象として、日本で広く用いられる日本食品標準成分表に記載されたマイクロ波加熱の方法について、より果実全体の代表的な部位を縮分して分析を行うため、用いる試料重量を増やし、マイクロ波加熱の時間を調整した前処理方法を検討し、電子レンジ処理法 A と比較検討した。また、マイクロ波加熱の方法は煩雑であるため、より簡易に実施できる前処理方法として、糖類の抽出操作において用いられる溶媒であり[57]、酵素の影響を抑えるために用いる報告[58][59]も多く、有害性が低く入手も容易であるエタノールを使用する前処理方法について、マイクロ波加熱による前処理方法と比較検討した。さらに、比較検討した前処理方法を用いて、糖類の分析操作中にインペルターゼが作用する代表的な果実である柿のほか、さまざまな果実についても同様の検討を行い、各果実の糖類の分析操作における酵素の影響の調査と、前処理方法の違いによる糖含量の比較検討を行った。

3.2 実験

3.2.1 試料

実験に用いた試料は、三重県内の小売店およびスーパーマーケットで購入し

た以下の果実 22 種を用いた。

用いた果実：

柿(富有柿)、グレープフルーツ、イチゴ(章姫)、バナナ(スウィーティオ)、
キウイフルーツ(ヘイワード)、マンゴー、ブドウ(クリームゾンシードレス)、
ブドウ(デラウェア)、リンゴ(ふじ)、リンゴ(玉林)、バレンシアオレンジ、
パイナップル(ハニーパイン)、温州ミカン、スモモ(プラム)、桃、サクラ
ボ(佐藤錦)、パパイヤ、ビワ、イチジク、アンデスメロン、梨(幸水)、プ
ル
ー
ン

3.2.2 試薬および試液

使用する水は、オルガノ株式会社製のカートリッジ純水器 G-10 および同純水
器用ポリプロピレンフィルターと活性炭フィルターでろ過した精製水を用いた。

糖類の分析においては、以下の試薬を用いた。

無水エタノール(99.5)：キシダ化学株式会社製

アセトニトリル(高速液体クロマトグラフィー用)：関東化学株式会社製

3.2.3 標準物質および標準原液

果糖の標準物質として、富士フィルム和光純薬株式会社製の D(-)-フルクトー
スを用いた。ブドウ糖の標準物質として、ナカライテスク株式会社製の D-(+)-
グルコースを用いた。ショ糖の標準物質として、富士フィルム和光純薬株式会
社製のスクロース ウルトラピュアを用いた。果糖の標準原液は、果糖標準物質
約 500 mg を精密に量り、50 v/v%エタノールに溶解し、50 mL として用いた。
ブドウ糖の標準原液は、ブドウ糖標準物質約 500 mg を精密に量り、50 v/v%エ
タノールに溶解し、50 mL として用いた。ショ糖の標準原液は、ショ糖標準物質
約 500 mg を精密に量り、50 v/v%エタノールに溶解し、50 mL として用いた。

3.2.4 装置

糖の測定に用いる高速液体クロマトグラフとして、株式会社島津製作所製の
Prominence および示差屈折率検出器(RID-20A)を用いた。糖類を分離するカラ

ムには、ジーエルサイエンス株式会社製の Inertsil NH₂ (粒子径 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 250 mm) を用いた。

3.2.5 分析方法

3.2.5.1 試料の調製

糖分析において抽出操作時にインベルターゼが作用する代表的な果実である柿を用いて、一般的な食品分析の前処理であるミキサーを用いた粉碎均質化を行う前処理（無処理）と、マイクロ波で加熱する前処理方法について、次の 4 種類の方法を用いて比較検討を行った。柿は、包丁を用いて、果皮、ヘタおよび種子を除いた可食部を約 1~2 cmの角切りにし、縮分して用いた。柿の縮分の状態を写真 3.1 に示す。

無処理：

縮分した果実を岩谷産業株式会社製のミルミキサー（型番：IFM-800DG）で粉碎調製する。

電子レンジ処理法 A：

日本食品標準成分表の柿の項に記載された方法に準じ、縮分した果実 10 g をビーカーに入れて重量を量り、シャープ株式会社製の出力 700W の電子レンジ（型番：RE-T1）を用いて 1 分 30 秒のマイクロ波加熱を行った後、室温まで冷却して重量を量り、加熱前後で減少した重量分の精製水を加え、無処理と同様にミルミキサーで粉碎調製する。

電子レンジ処理法 B：

電子レンジ処理法 A と同様に縮分した果実約 100 g を耐熱容器に入れて重量を量り、電子レンジ処理法 A と同じ電子レンジを用いて、30 秒のマイクロ波加熱を行った後、室温まで冷却して重量を量り、加熱前後で減少した重量分の精製水を加え、電子レンジ処理法 A と同様にミルミキサーで粉碎調製する。

また、電子レンジ処理法 B の電子レンジによる加熱時間を 1 分、2 分または 3 分とした方法を、それぞれ電子レンジ処理法 C、D、E とした。

これら無処理と電子レンジ処理法 A~E の前処理を行った柿をマイクロ波加熱の比較検討に用いた。

このほか、より簡易に実施できる前処理方法として、次の方法を比較検討に用いた。

エタノール処理法：

縮分した果実約 100 g に、同重量のエタノールを加え、無処理と同様にミキサーで粉碎調製する。

縮分した柿の無処理、電子レンジ処理法 A および B、エタノール処理法の状態を写真 3.2 ~ 3.5 に示す。

3.2.5.2 試料溶液の調製

マイクロ波加熱の比較検討用として、無処理、電子レンジ処理法 A ~ E の各前処理を行い調製した柿は、それぞれ約 5 g をポリプロピレン製の遠心チューブに採取し、50 v/v%エタノール溶液を 20 mL 加え、振とう器で 30 分振とうした後、遠心分離 (3000 rpm-5 分) し、上澄みをろ過した後、残渣に 50 v/v%エタノール溶液を 20 mL 加え、振とう器で 30 分振とうした後、遠心分離 (3000 rpm-5 分) し、上澄みをろ過して合わせ、50 v/v%エタノール溶液で 50 mL として、孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過して試料溶液とした。

また、マイクロ波加熱の比較検討に加え、前処理方法を変えて調製した各果実の糖分析についての比較検討も、無処理、電子レンジ処理法およびエタノール処理法を用いて調製した試料を用いて実施した。用いる電子レンジ処理法は、マイクロ波加熱の比較検討結果から、良好な結果が得られた方法を採用した。エタノール処理法の前処理を行った試料は、採取した重量の半量がエタノールであることから、果実として 5 g 相当となるよう、エタノール処理後の試料約 10 g を採取して試料溶液の調製を行った。

試料溶液の調製のフローチャートを図 3.2 に示す。

3.2.5.3 高速液体クロマトグラフによる糖類の定量

糖の分析用に調製した各試料溶液を高速液体クロマトグラフに注入した。高速液体クロマトグラフの移動相は、アセトニトリルと精製水を 75 : 25 (v/v) で混合した混合液を用いてアイソクラティックモードで分離、溶出した。流速は

1.0 mL/分、カラム温度は室温（約 25 ℃） 試料溶液の注入量は 10 μL とした。また、果糖、ブドウ糖、ショ糖の標準原液を、50 v/v%エタノール溶液で 50、1000、2000 μg/mL となるよう希釈した検量線用標準溶液も同様に注入し、果糖、ブドウ糖またはショ糖の各ピークは、標準溶液および試料溶液の保持時間の同一性によって同定し、標準溶液のピーク面積と濃度から検量線を作成し、試料溶液の各糖のピーク面積から、各糖の含有量を定量した。高速液体クロマトグラフの感度やカラムの状態は、使用時の環境や状況により変わるため、試料溶液の測定動作の都度、検量線用標準溶液を同様に測定し、検量線を作成して定量に用いた。

高速液体クロマトグラフの測定条件を表 3.1 に示す。

3.3 結果および考察

マイクロ波加熱の比較検討として実施した、無処理、電子レンジ処理法 A~E の各前処理を行った柿の果糖、ブドウ糖、ショ糖の高速液体クロマトグラフのクロマトグラムを図 3.3 、分析結果を表 3.2 に示す。

無処理の柿の分析結果においては、ショ糖は検出されず、果糖およびブドウ糖が検出された。電子レンジ処理法 A の分析結果においては、果糖およびブドウ糖と、ほぼ同量のショ糖が検出された。電子レンジ処理法 B の分析結果においては、ショ糖は検出されず、果糖およびブドウ糖が検出された。電子レンジ処理法 C~E の分析結果においては、果糖およびブドウ糖と、ほぼ同量のショ糖が検出された。また、電子レンジ処理法 A の分析結果と、電子レンジ処理法 C~E の分析結果は同等であった。これらのマイクロ波加熱方法の違いによる糖類の分析結果から、無処理および電子レンジ処理法 B の試料においては、糖類の分析操作中にインベルターゼが作用し、ショ糖が果糖およびブドウ糖に分解していると考えられ、電子レンジ処理法 A および電子レンジ処理法 C~E の試料においては、インベルターゼの作用を受けず分析操作が行われたと考えられた。また、電子レンジ処理法 A と電子レンジ処理法 B~E の分析結果から、試料 100g を用いて出力 700W の電子レンジで 1 分以上のマイクロ波加熱を行うことで、電

電子レンジ処理法 A として行った日本食品標準成分表に記載されている酵素の作用を防ぐ前処理方法と同等の効果が得られると考えられた。

以上の結果から、試料 100g を用いて出力 700W の電子レンジで 1 分のマイクロ波加熱を行う前処理方法を用いることで、果実中の酵素の作用を受けず、より果実全体の代表的な部位を縮分して糖分析を行うことができると考えられた。

また、電子レンジ処理法 A においては、マイクロ波加熱中に電子レンジ内で火花の発生が確認されたことに加え、加熱後の試料に焦げた部位が確認された。これらは電子レンジ処理法 B~E では確認されなかったことから、電子レンジ処理法 A においては、用いた試料が少ないことにより、局所的に過剰なマイクロ波加熱が起こったために、火花や焦げが発生したと考えられる。このことから、電子レンジ処理法 A は、加熱方法としての危険性や、試料の状態が高熱によって変わる可能性が考えられ、分析操作への影響も危惧された。

マイクロ波加熱による前処理方法の比較検討結果から、縮分した試料 100 g に出力 700W の電子レンジで 1 分のマイクロ波加熱を行う前処理を行うことで、果実中の酵素の作用を受けず、より果実全体の代表的な部位を縮分して糖分析を行うことができると考えられたことから、この方法を用いるマイクロ波加熱の前処理方法（以下、電子レンジ処理変法）とした。

各果実における前処理方法として、無処理、エタノール処理または電子レンジ処理変法を用いて分析した果糖、ブドウ糖およびショ糖の高速液体クロマトグラフのクロマトグラムの一例として、ビワおよびブドウ（クリムゾンシードレス）のクロマトグラムを図 3.4、図 3.5 に示す。また各前処理を行った果実の果糖、ブドウ糖およびショ糖の分析結果を表 3.3 に示す。

柿（富有柿）、イチゴ（章姫）、バナナ（スウィーティオ）、ブドウ（クリムゾンシードレス）、ブドウ（デラウェア）、スモモ（プラム）、パパイヤ、ビワ、イチジク、プルーンの 10 種類の果実において、無処理の分析結果と比較して、エタノール処理法、または電子レンジ処理変法の果糖、ブドウ糖およびショ糖の分析結果に顕著な差が確認されたことから、これらの果実は、試料の前処理時、または分析操作中に酵素が作用し、ショ糖の加水分解が起こると考えられた。

サクランボ（佐藤錦）においては、何れの前処理における分析結果からもシ

ヨ糖が検出されなかったことから、酵素の影響の有無は確認できなかったが、前処理の違いによる果糖およびブドウ糖の分析結果に差は確認されなかったため、これらの糖の分析を行うにあたり問題は無いと考えられる。

柿（富有柿）およびパパイアでは、電子レンジ処理変法に比べ、エタノール処理法の果糖およびブドウ糖含量が高く、ショ糖含量が低いことから、これら2種類についてはエタノール処理法では分析操作中の酵素の作用を十分に抑えることができず、マイクロ波加熱を行った試料を用いて分析を行うことが望ましいと考えられた。富有柿は、インベルターゼ活性が顕著に高いと報告されている [49] [54] ことから、パパイアも同様に酵素活性が高い果実である可能性が示唆され、これらの酵素活性が高い果実については、マイクロ波加熱による前処理が適している可能性が考えられた。また、ブドウ（クリムゾンシードレス）およびブルーベリーでは、電子レンジ処理変法に比べ、エタノール処理法のショ糖含量が高い分析結果が得られた。ブドウについては、インベルターゼ活性が高く、耐熱性を有するためマイクロ波加熱の効果が低いと報告されている [60] ことから、ブルーベリーも同様にインベルターゼが耐熱性を有する可能性が示唆され、これらの耐熱性を有する酵素が存在する果実については、マイクロ波加熱による酵素失活が不十分であり、エタノール処理法の方が酵素の作用を抑え、より適した分析結果が得られる可能性が考えられた。これらの結果から、果実の糖分析を行う際に、日本食品標準成分表に酵素の作用が記載されている果実である柿のほか、多くの果実においても、酵素が作用してショ糖の加水分解が起こると考えられたため、果実の糖分析を行うにあたり、果実本来の糖含量を正確に分析するため、各果実に存在する酵素の特性に応じた適切な前処理を行う必要があると考えられた。

エタノール処理法と電子レンジ処理変法の分析結果の比較から、エタノール処理法は、富有柿およびパパイアを除く果実において、電子レンジ処理変法と同等以上の分析結果が得られることが確認された。このことから、一部の果実を除き、エタノールを用いた前処理方法は、マイクロ波加熱の前処理方法に比べ簡易であり、糖類の分析操作において、マイクロ波加熱による前処理方法と同等な酵素の作用を抑制する効果が得られる方法であると考えられた。

また、富有柿と同様にエタノール処理法が適さないと考えられる果実であるパパイヤについて、実施したマイクロ波加熱の時間がショ糖の加水分解を十分に抑えているかを確認するため、マイクロ波加熱の時間を 2 分に増やした前処理を行ったパパイヤについて、無処理およびエタノール処理法、電子レンジ処理変法（マイクロ波加熱時間 1 分）との糖分析結果の比較を行った結果、マイクロ波加熱時間 1 分と 2 分において糖の分析結果に差は無く、柿と同様にマイクロ波加熱の時間は 1 分で充分であることが確認された。分析した果糖、ブドウ糖およびショ糖の高速液体クロマトグラフのクロマトグラムを図 3.6、分析結果を表 3.4 に示す。

3.4 まとめ

果実の糖分析を行う際に、酵素の作用を抑えるため用いられるマイクロ波加熱による前処理方法について検討した結果、果実 100 g に対し出力 700W の電子レンジで 1 分の加熱を行う方法が良好であった。

果実 22 種類について、無処理、マイクロ波加熱処理と、エタノールを用いた簡易な前処理を行い、糖類の分析結果を比較検討した。分析結果から、約半数の 10 種類の果実において、酵素の影響が確認された。18 種類の果実は、エタノールを用いた方法とマイクロ波加熱を行った方法は同等の結果が得られた。また、ブドウ（クリムゾンシードレス）とプルーンでは、マイクロ波加熱よりエタノールを用いた前処理の方が適切である可能性が示唆され、富有柿とパパイヤでは、マイクロ波加熱の前処理の方が適切である可能性が示唆された。

多くの果実で糖分析における酵素の影響が明らかとなったため、果実の糖分析を行う際にはショ糖分解酵素の作用を抑制する適切な前処理を行うことが必要であると考えられた。

今後、果実におけるショ糖分解酵素の影響や、果実に含まれる糖含量を正確に分析するため、より多くの果実に対して、電子レンジ処理変法やエタノール処理法を適用した試料を用いた糖分析を行い、分析結果を比較し、さらなる研究が必要である。

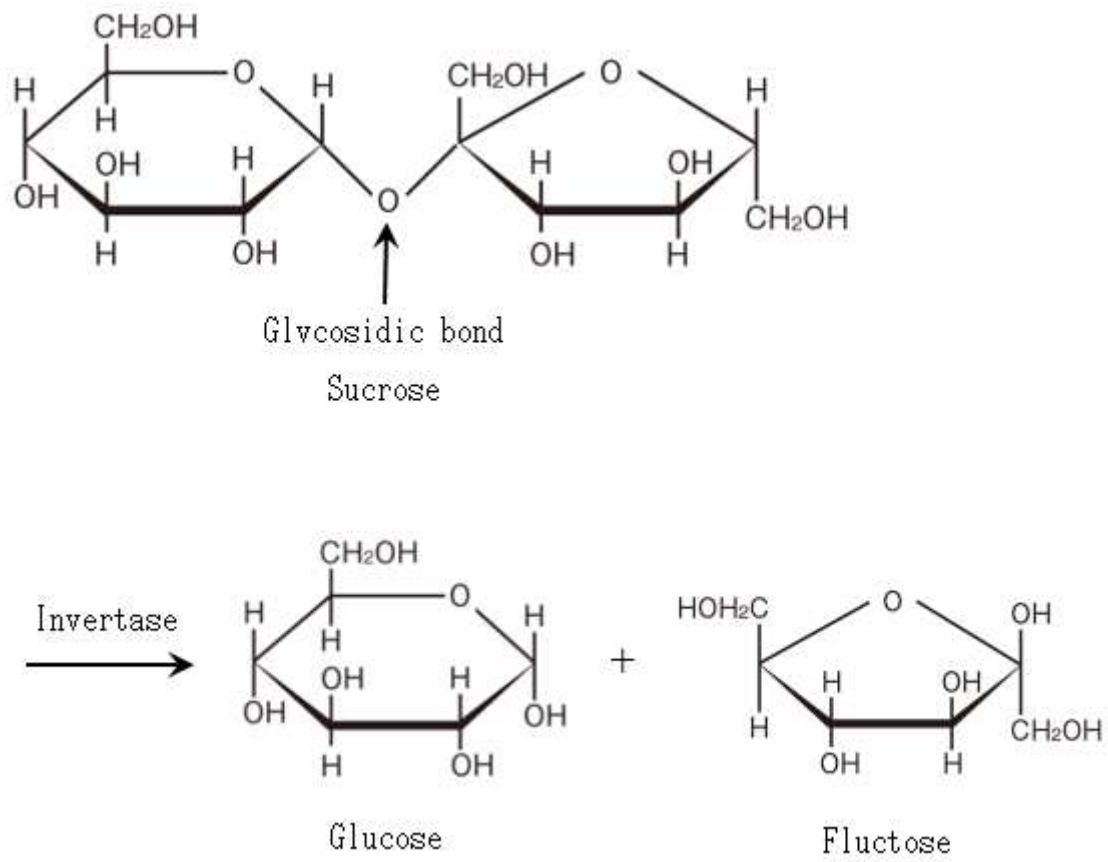


図 3.1 インベルターゼによるショ糖の加水分解反応

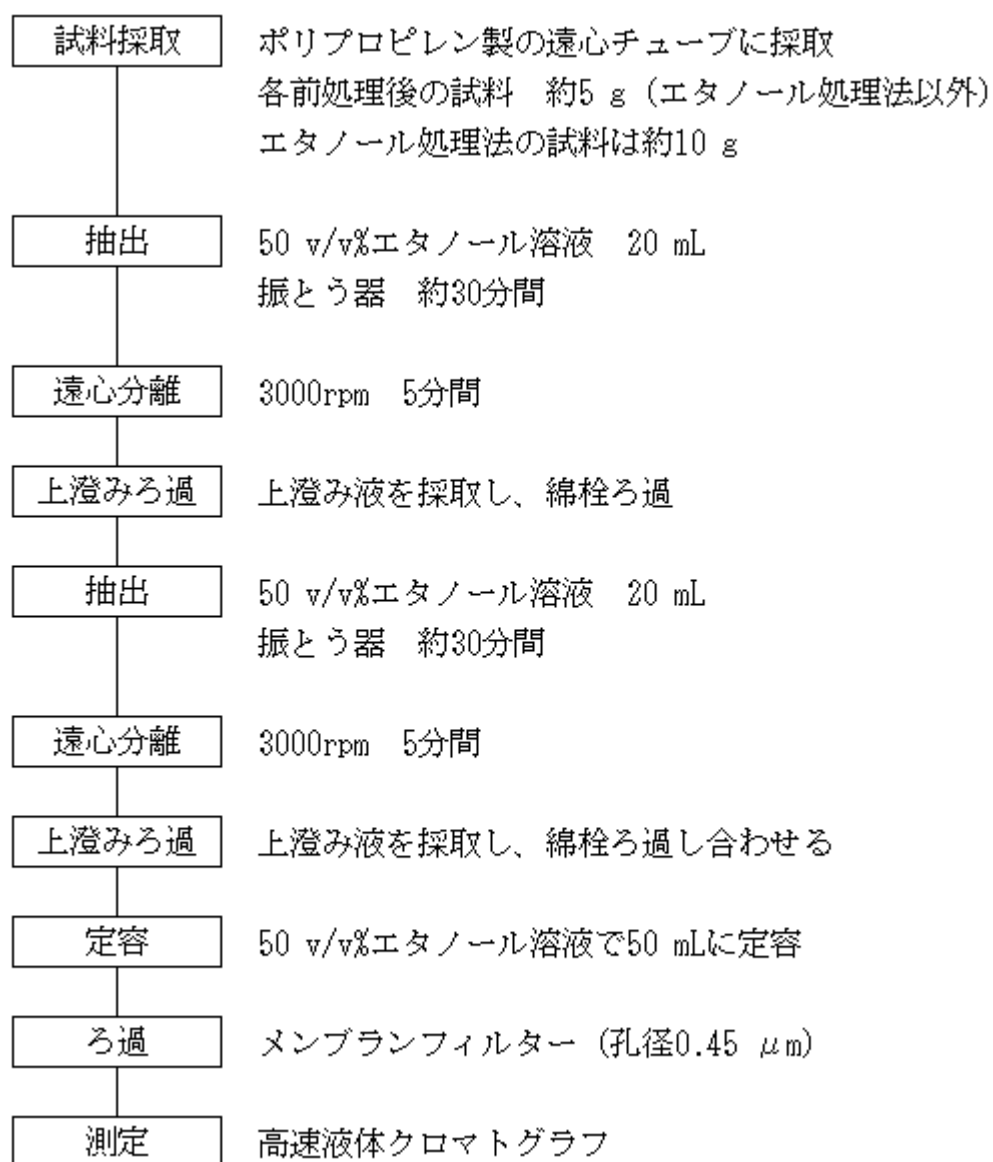


図 3.2 糖の試料溶液調製フローチャート

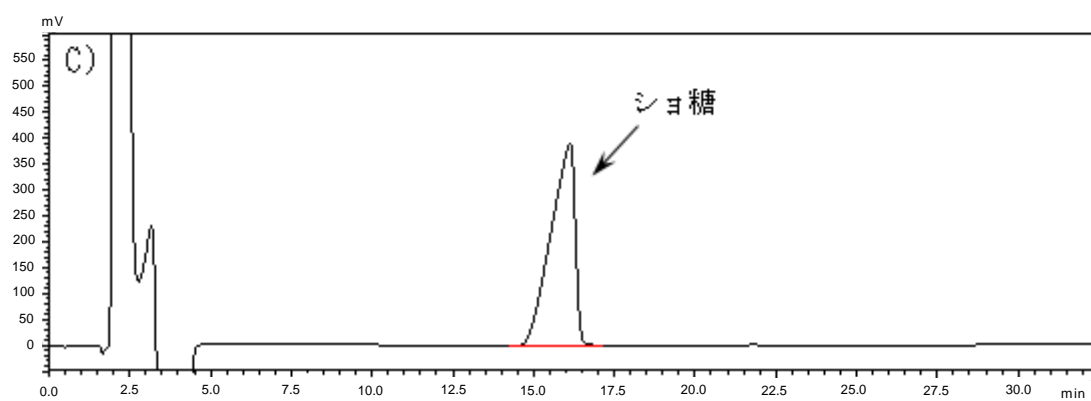
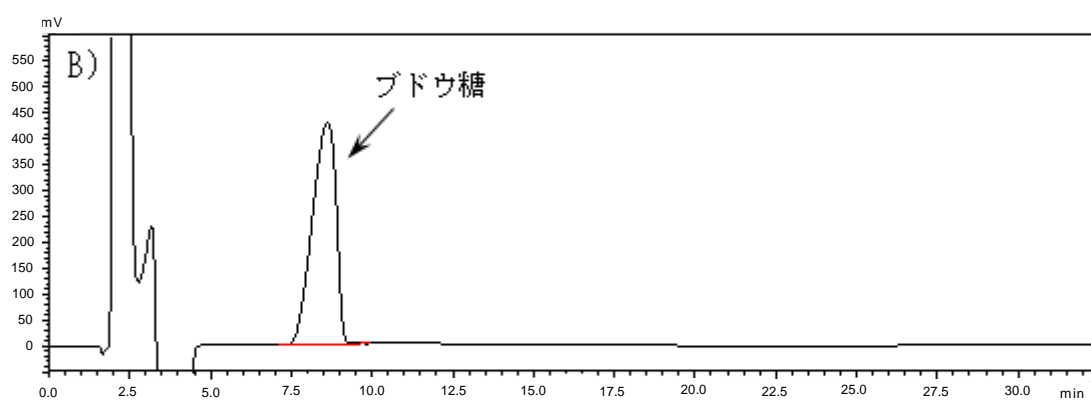
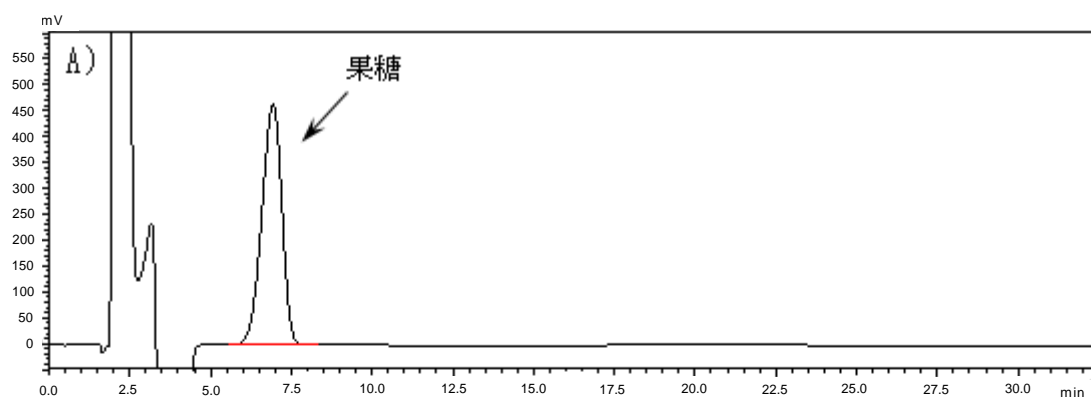


図 3.3 柿の無処理、電子レンジ処理法 A~F のクロマトグラム

- A) 果糖標準溶液
- B) ブドウ糖標準溶液
- C) ショ糖標準溶液

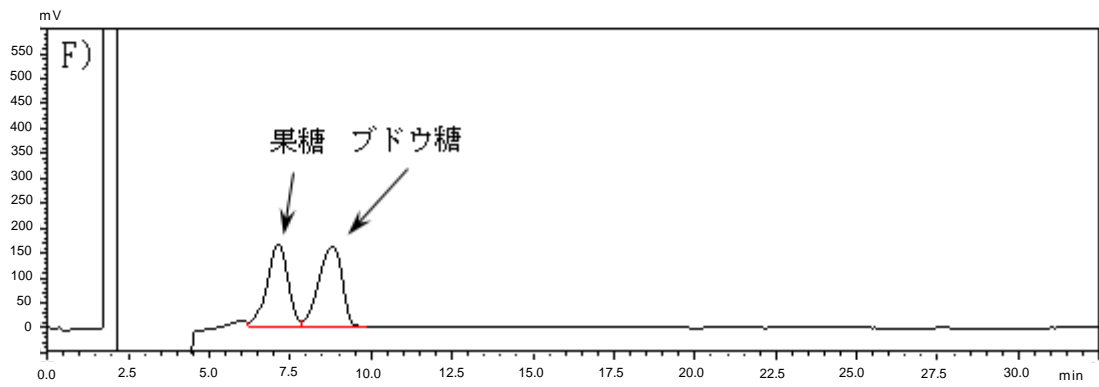
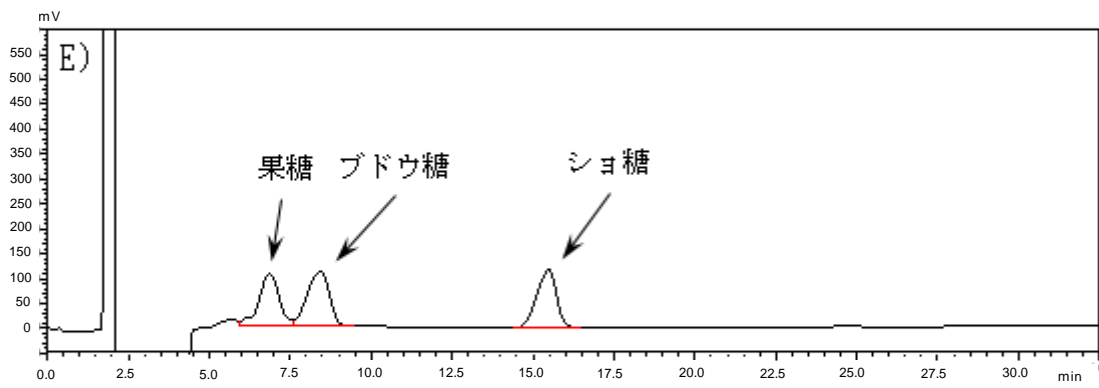
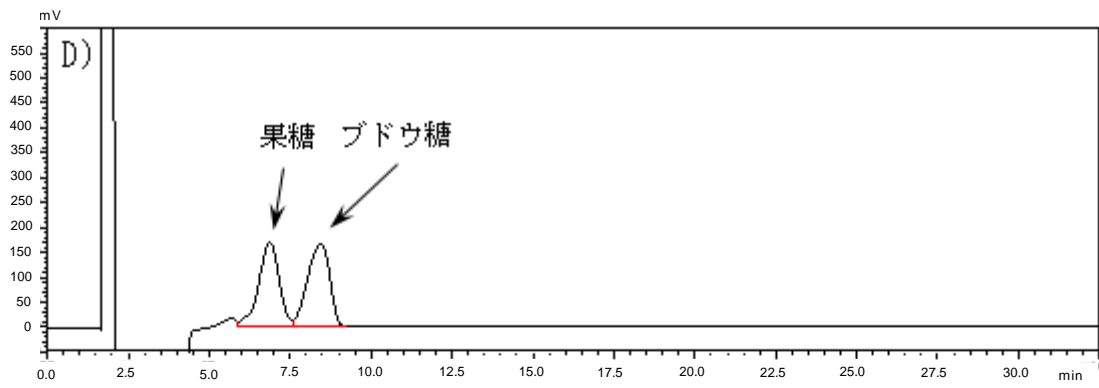


図 3.3 柿の無処理、電子レンジ処理法 A~F のクロマトグラム (続き)

- D) 柿 (無処理)
- E) 柿 (電子レンジ処理法 A)
- F) 柿 (電子レンジ処理法 B)

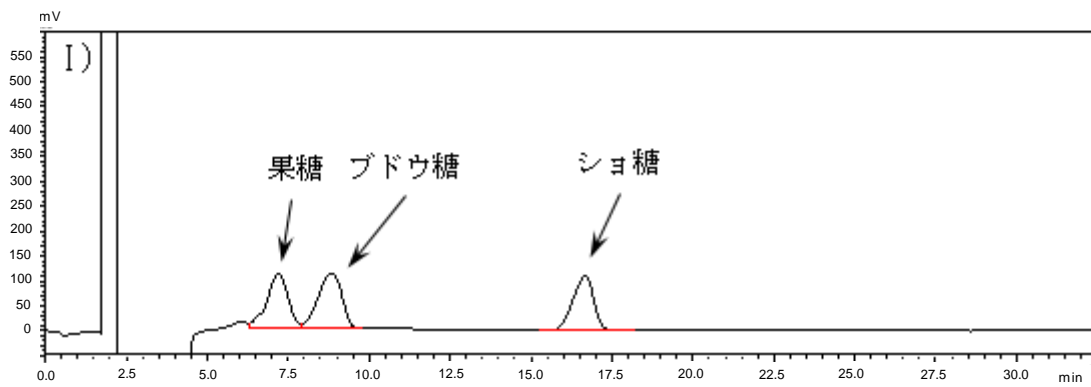
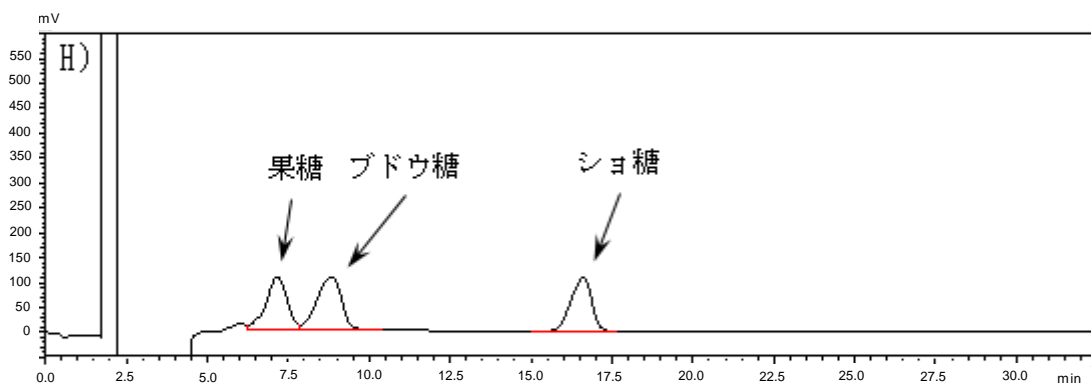
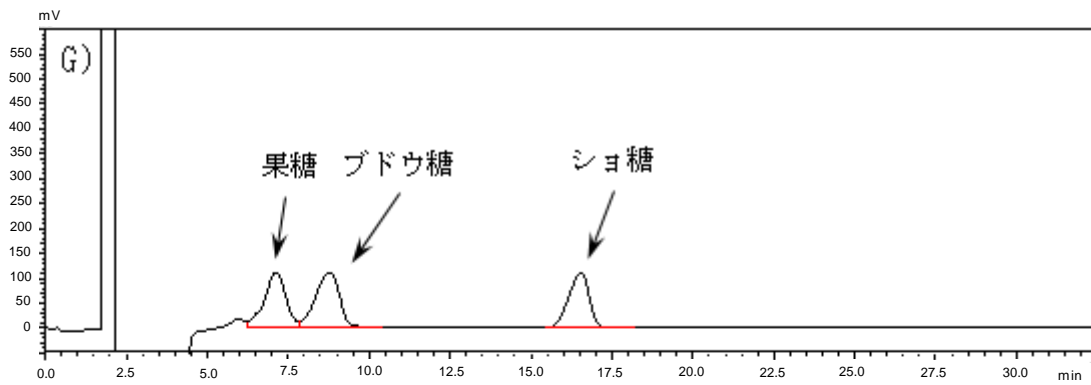


図 3.3 柿の無処理、電子レンジ処理法 A~F のクロマトグラム (続き)

G) 柿 (電子レンジ処理法 C)

H) 柿 (電子レンジ処理法 D)

I) 柿 (電子レンジ処理法 E)

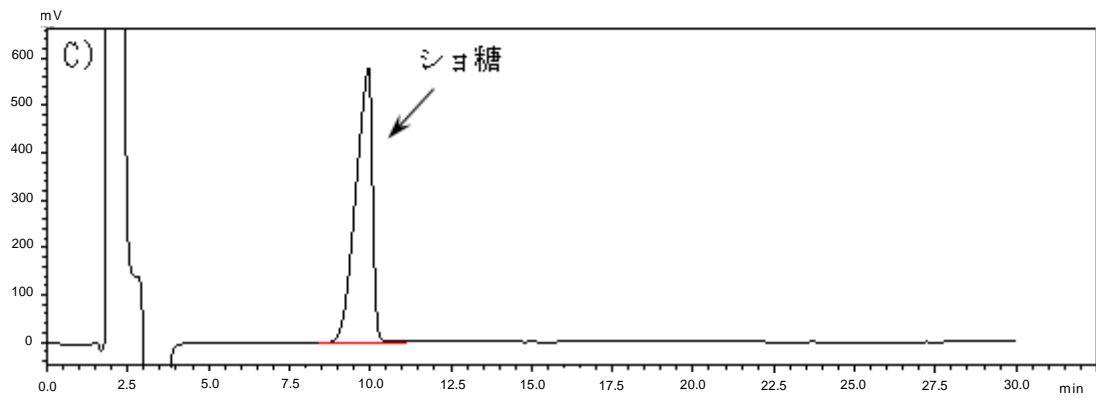
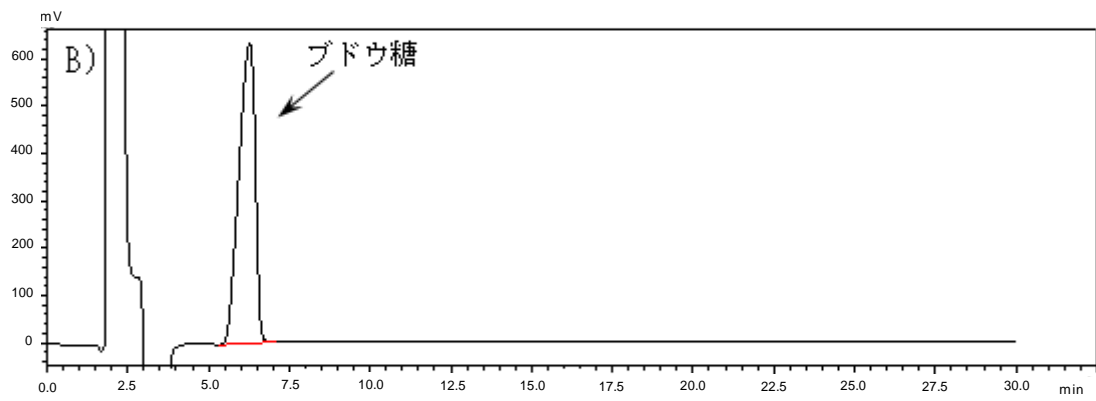
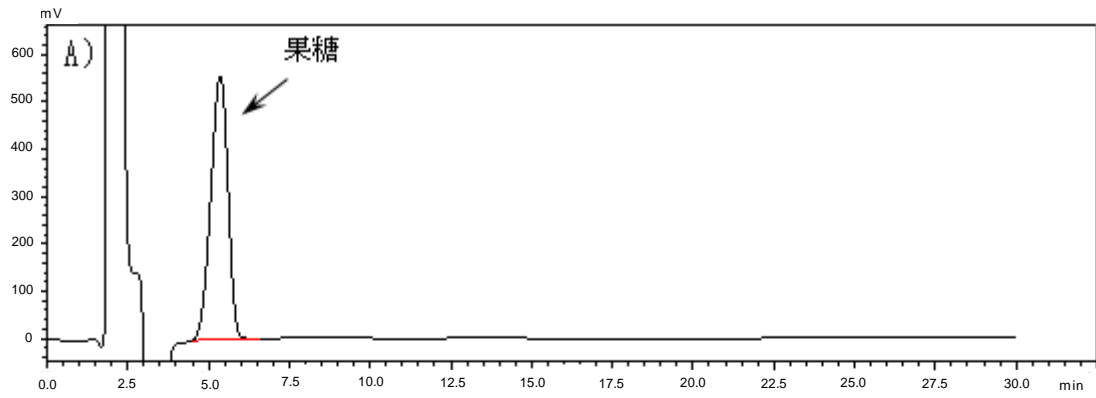


図 3.4 ビワの無処理、エタノール処理法、電子レンジ処理変法のクロマトグラム

- A) 果糖標準溶液
- B) ブドウ糖標準溶液
- C) ショ糖標準溶液

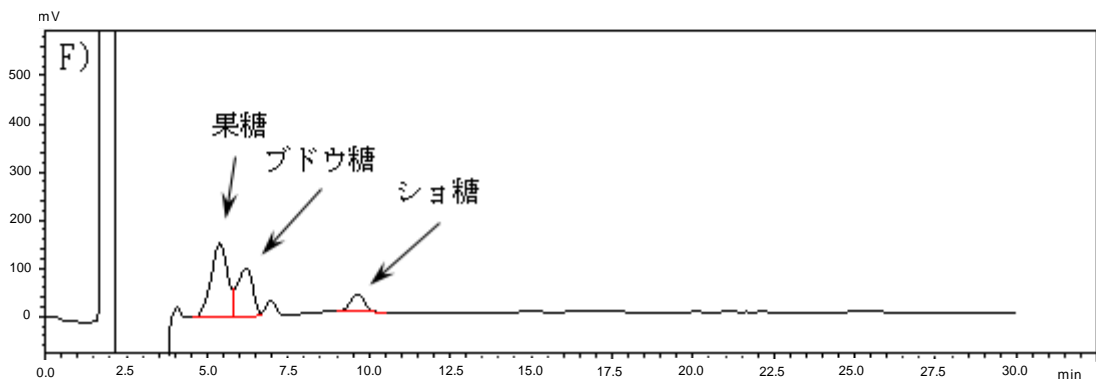
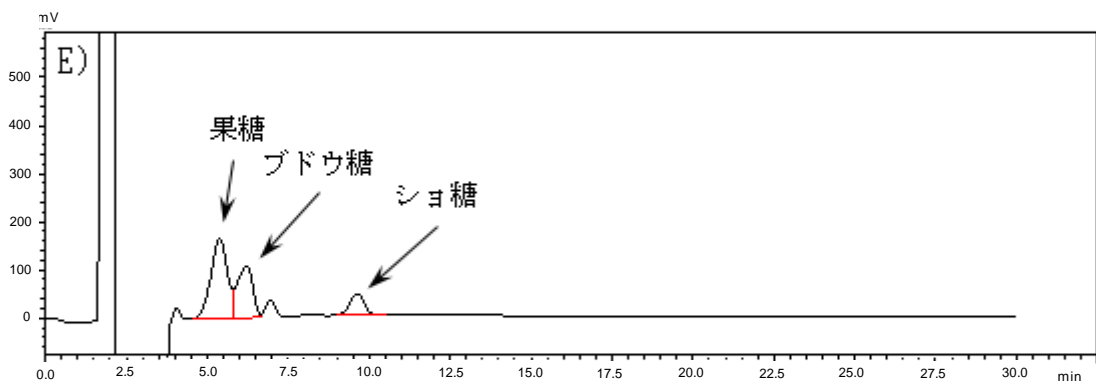
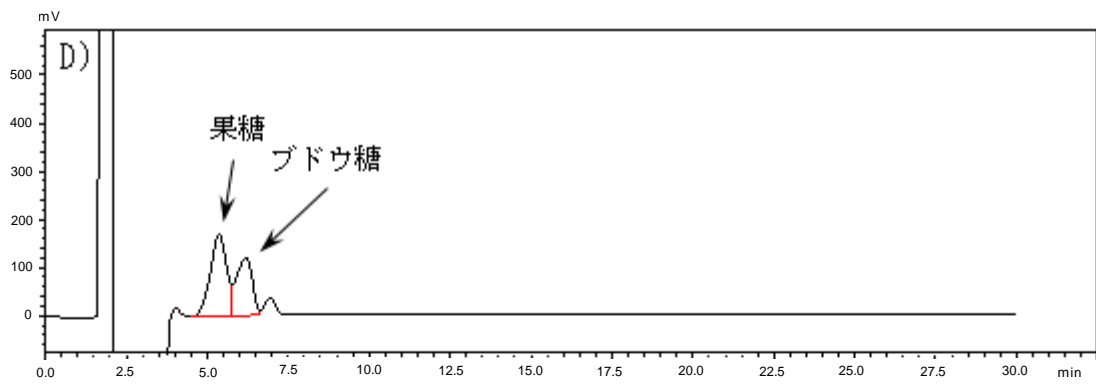


図 3.4 ビワの無処理、エタノール処理法、電子レンジ処理変法のクロマトグラム

D) ビワ (無処理)

E) ビワ (エタノール処理法)

F) ビワ (電子レンジ処理変法)

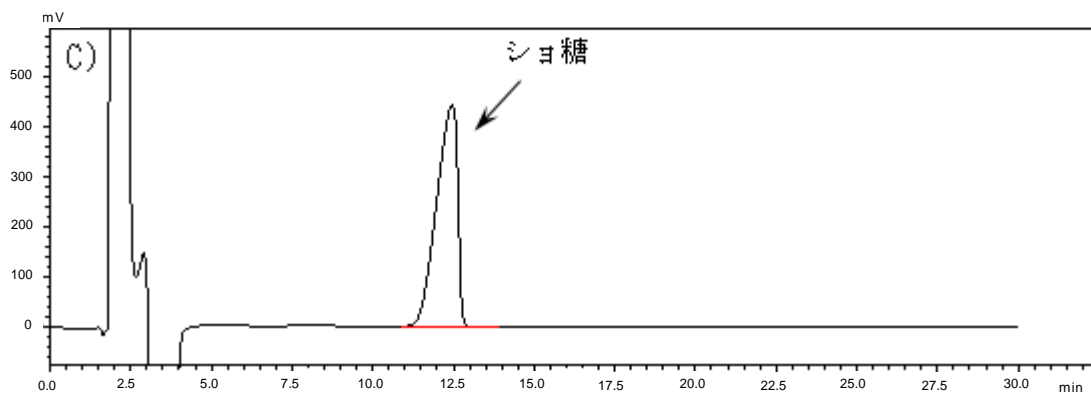
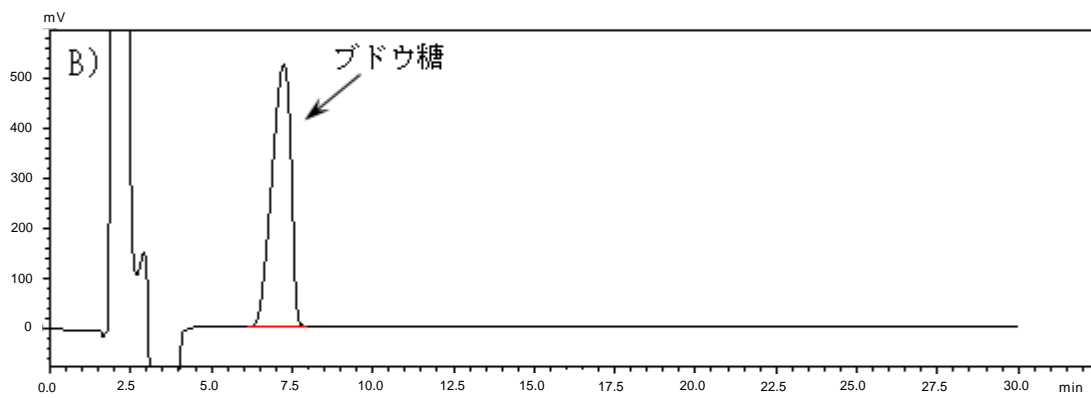
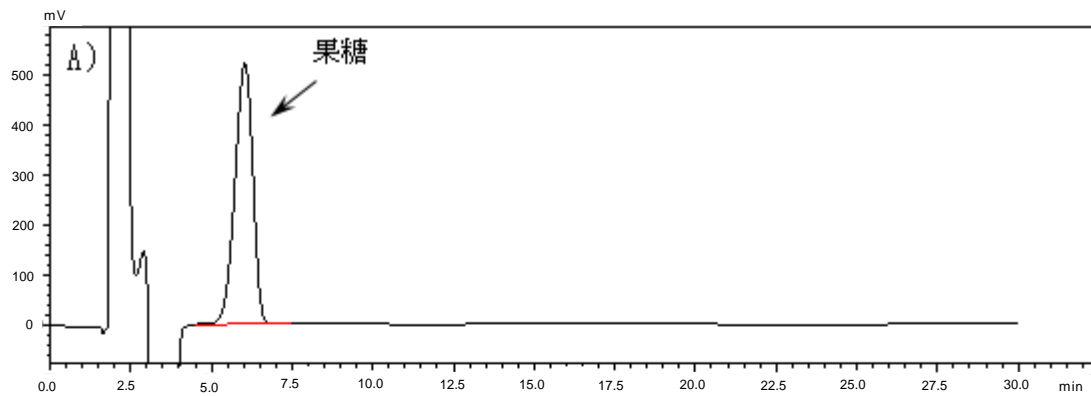


図 3.5 ブドウ（クリームゾンシードレス）の無処理、エタノール処理法、電子レンジ処理変法のクロマトグラム

- A) 果糖標準溶液
- B) ブドウ糖標準溶液
- C) ショ糖標準溶液

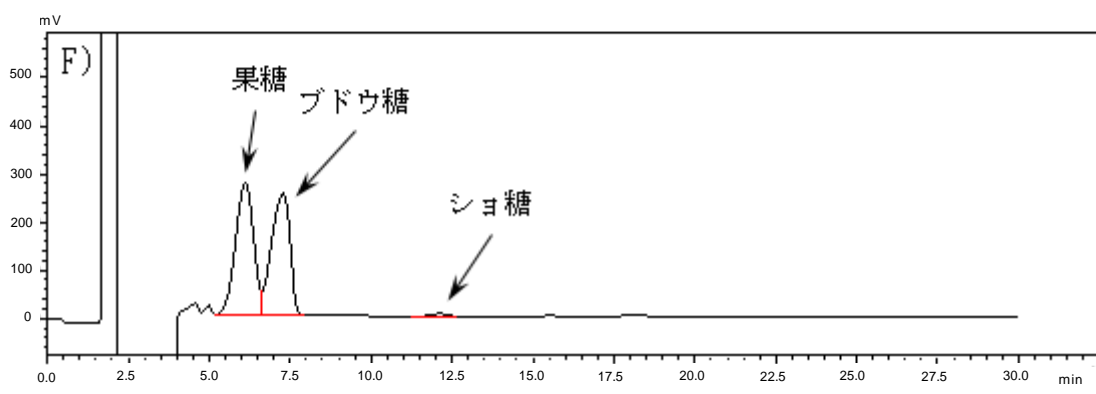
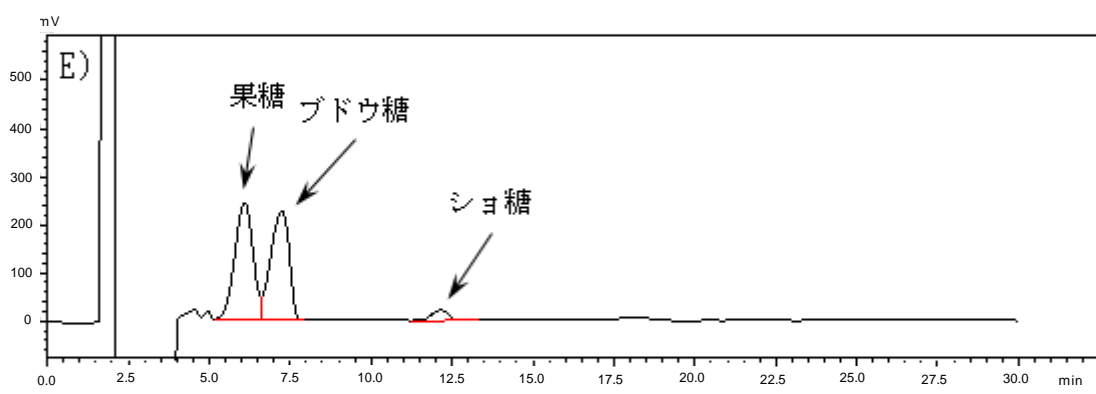
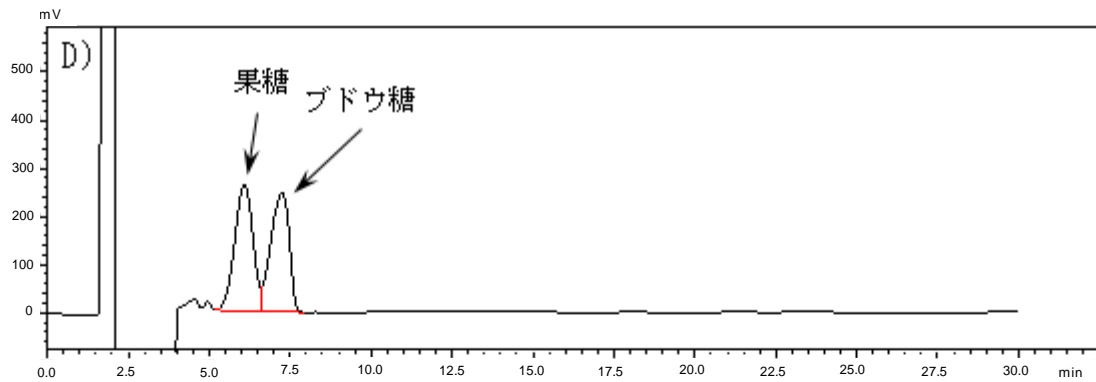


図 3.5 ブドウ(クリームゾンシードレス)の無処理、エタノール処理法、電子レンジ処理変法のクロマトグラム
 D) ブドウ(クリームゾンシードレス)(無処理)
 E) ブドウ(クリームゾンシードレス)(エタノール処理法)
 F) ブドウ(クリームゾンシードレス)(電子レンジ処理変法)

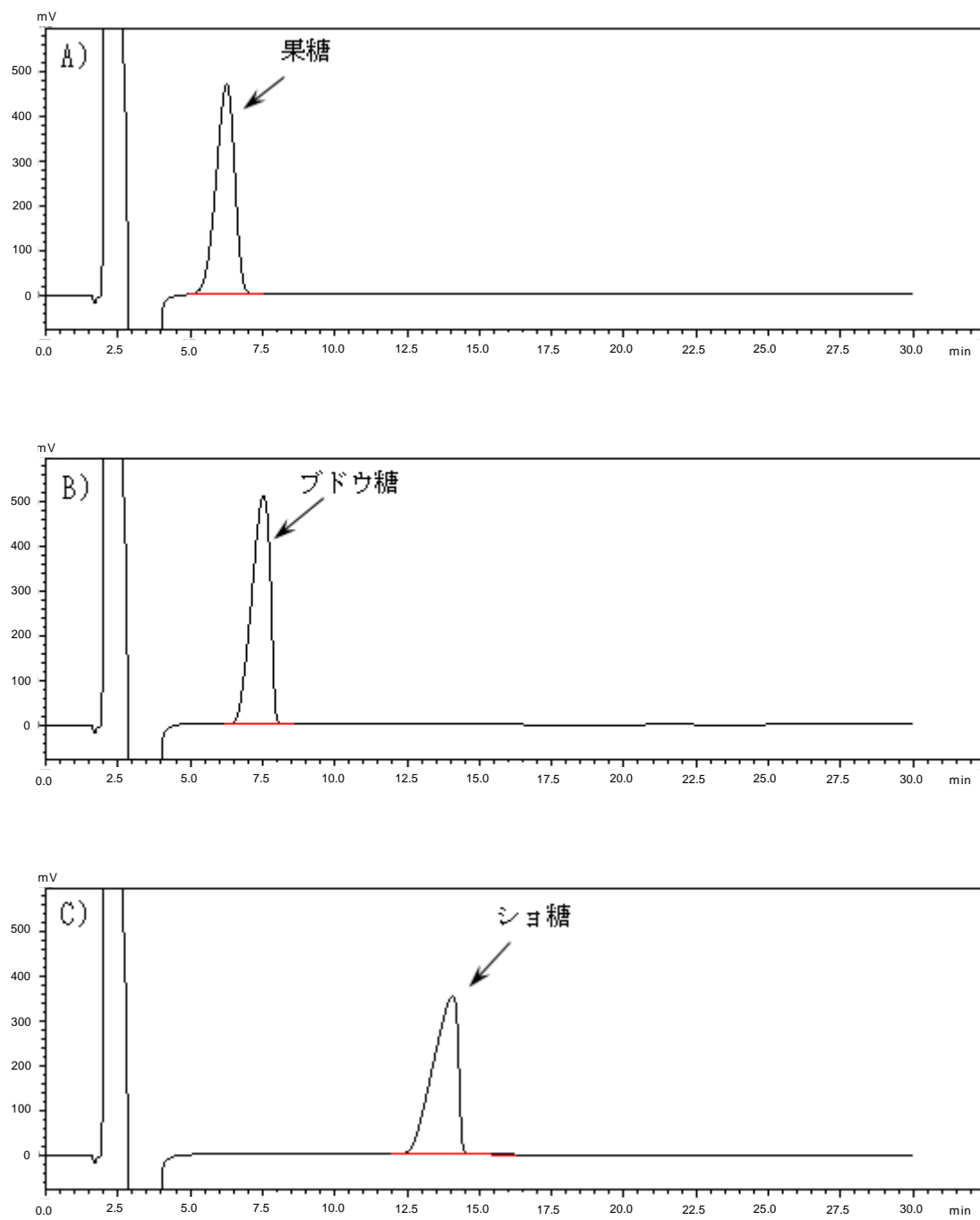


図 3.6 パパイアの無処理、エタノール処理法、
電子レンジ処理変法（加熱時間 1 分または 2 分）のクロマトグラム
 A) 果糖標準溶液
 B) ブドウ糖標準溶液
 C) ショ糖標準溶液

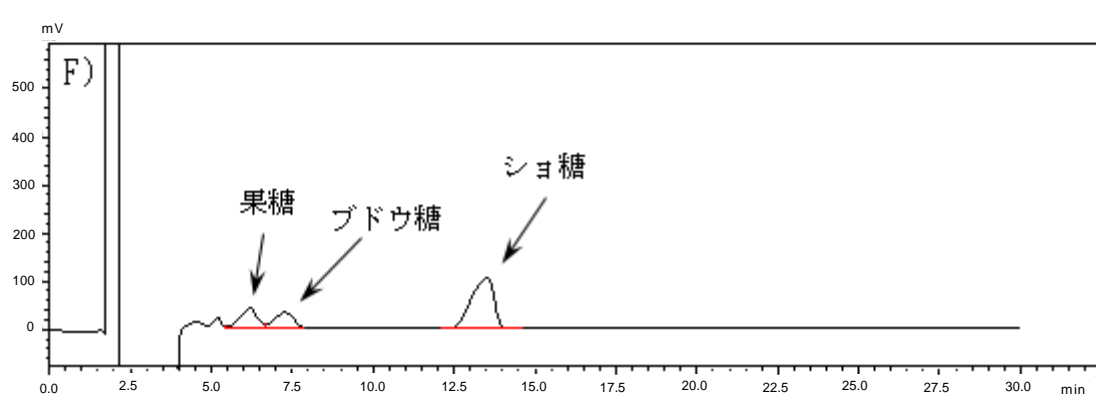
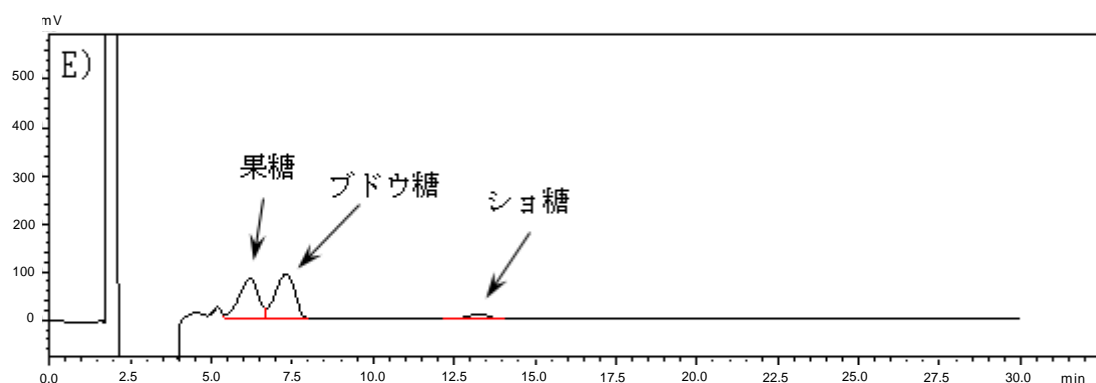
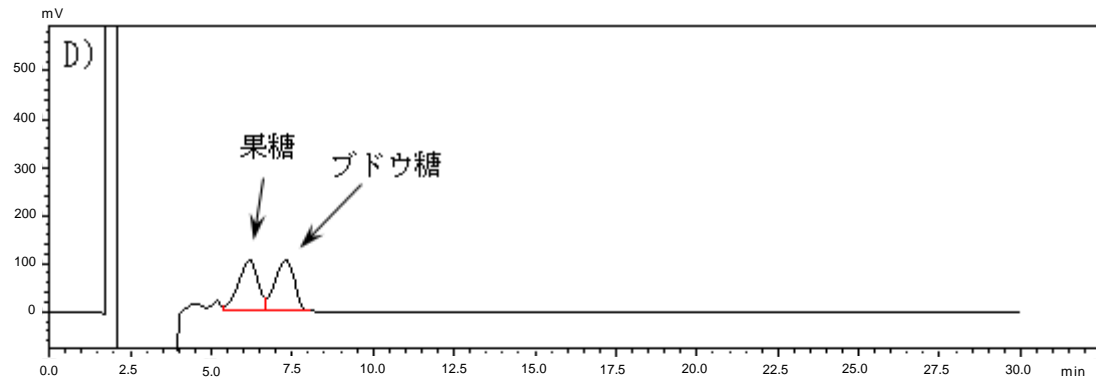


図 3.6 パパイアの無処理、エタノール処理法、
電子レンジ処理変法（加熱時間 1 分または 2 分）のクロマトグラム（続き）
D) パパイヤ（無処理）
E) パパイヤ（エタノール処理法）
F) パパイヤ（電子レンジ処理変法、加熱時間 1 分）

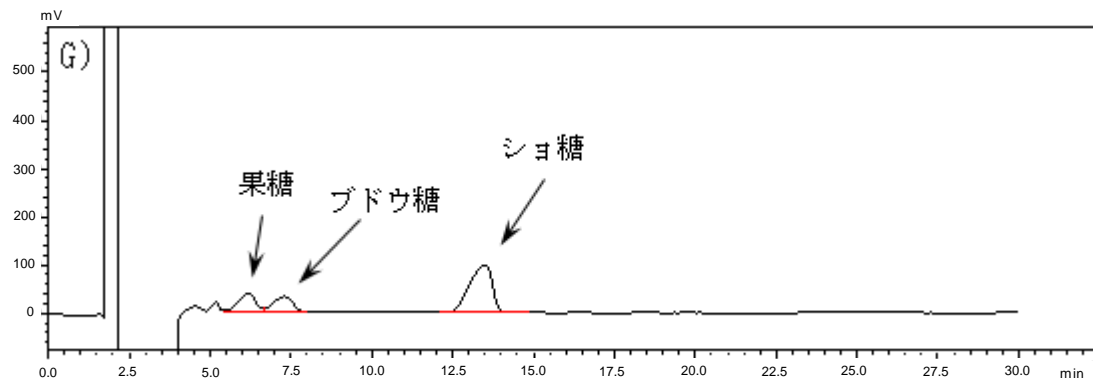


図 3.6 パパイヤの無処理、エタノール処理法、
電子レンジ処理変法（加熱時間 1 分または 2 分）のクロマトグラム（続き）
G) パパイヤ（電子レンジ処理変法、加熱時間 2 分）

表 3.1 糖の分析に用いた高速液体クロマトグラフの測定条件

装置	Prominence (株式会社島津製作所)
カラム	Inertsil NH ₂ (250 mm, 4.6 mm, 5 μm) (ジーエルサイエンス株式会社)
移動相	アセトニトリル：精製水=75：25 (v/v)
流量	1.0 mL/分
カラム温度	室温 (約25℃)
注入量	10 μL
検出器	示差屈折率検出器 (RID-20A) (株式会社島津製作所)

表 3.2 柿の無処理、電子レンジ処理法 A~E の果糖、ブドウ糖、シヨ糖の分析結果

	無処理	処理法A	処理法B	処理法C	処理法D	処理法E
果糖 ¹⁾	7.4	4.5	7.3	4.5	4.3	4.4
ブドウ糖 ¹⁾	7.1	4.7	7.2	4.9	4.9	5.0
シヨ糖 ¹⁾	ND ²⁾	4.8	ND	4.7	4.6	4.6

¹⁾100g当たりの定量値(g)

²⁾ND:<0.1 g/100g

表 3.3 各前処理を行った果実の果糖、ブドウ糖、ショ糖の分析結果

		無処理	エタノール 処理	電子レンジ 処理変法
柿 (富有柿)	果糖 ¹⁾	6.4	6.4	5.6
	ブドウ糖 ¹⁾	8.4	8.5	7.4
	ショ糖 ¹⁾	ND ²⁾	ND	1.6
グレープフルーツ	果糖	1.4	1.4	1.4
	ブドウ糖	1.6	1.6	1.6
	ショ糖	3.6	3.6	3.4
イチゴ (章姫)	果糖	2.8	2.2	2.3
	ブドウ糖	2.7	2.0	2.1
	ショ糖	0.7	2.3	2.4
バナナ (スウィーティオ)	果糖	2.5	2.1	1.9
	ブドウ糖	2.5	2.1	1.9
	ショ糖	10.4	12.0	12.0
キウイフルーツ (ハイワード)	果糖	3.9	3.9	3.7
	ブドウ糖	3.2	3.2	3.0
	ショ糖	0.7	0.9	0.9
マンゴー	果糖	2.5	2.3	2.5
	ブドウ糖	0.6	0.5	0.5
	ショ糖	6.7	6.8	6.7
ブドウ (クリームゾンシードレス)	果糖	10.3	9.5	9.9
	ブドウ糖	9.0	8.3	8.8
	ショ糖	ND	0.8	0.2
ブドウ (デラウェア)	果糖	9.7	9.4	9.6
	ブドウ糖	8.7	8.4	8.5
	ショ糖	ND	0.3	0.3
リンゴ (ふじ)	果糖	7.2	6.9	7.1
	ブドウ糖	3.2	3.1	3.1
	ショ糖	0.9	0.9	1.0
リンゴ (王林)	果糖	8.4	8.4	8.3
	ブドウ糖	2.3	2.3	2.4
	ショ糖	2.1	2.0	2.0
バレンシアオレンジ	果糖	2.8	2.8	3.0
	ブドウ糖	2.8	2.8	3.0
	ショ糖	4.9	4.9	4.7

¹⁾100g 当たりの定量値(g)

²⁾ND: < 0.1 g/100g

表 3.3 各前処理を行った果実の果糖、ブドウ糖、ショ糖の分析結果（続き）

		無処理	エタノール 処理	電子レンジ 処理変法
ハニーパイナップル	果糖	1.6	1.3	1.5
	ブドウ糖	1.3	1.1	1.3
	ショ糖	9.8	10.1	9.8
温州ミカン	果糖	1.9	2.0	2.1
	ブドウ糖	1.4	1.4	1.5
	ショ糖	6.1	6.4	6.3
スモモ (プラム)	果糖	1.6	1.3	1.3
	ブドウ糖	1.5	1.1	1.1
	ショ糖	0.7	1.4	1.5
桃	果糖	1.2	1.3	1.2
	ブドウ糖	0.7	0.7	0.6
	ショ糖	6.1	6.0	5.9
サクランボ (佐藤錦)	果糖	6.2	6.2	6.2
	ブドウ糖	6.4	6.2	6.5
	ショ糖	ND	ND	ND
パパイヤ	果糖	4.6	3.8	1.0
	ブドウ糖	4.7	4.2	0.8
	ショ糖	ND	1.3	7.2
ビワ	果糖	5.9	5.4	5.4
	ブドウ糖	3.6	2.9	2.9
	ショ糖	ND	1.2	1.0
イチジク	果糖	3.4	3.2	3.3
	ブドウ糖	4.1	3.9	3.9
	ショ糖	ND	0.3	0.4
アンデスメロン	果糖	2.2	2.0	2.1
	ブドウ糖	1.7	1.5	1.6
	ショ糖	3.4	3.4	3.5
幸水梨	果糖	5.0	5.0	5.0
	ブドウ糖	1.5	1.4	1.4
	ショ糖	0.3	0.3	0.4
プルーン	果糖	2.4	1.6	1.9
	ブドウ糖	4.0	3.3	3.6
	ショ糖	0.9	2.4	1.9

¹⁾100g 当たりの定量値 (g)

²⁾ND: < 0.1 g/100g

図 3.4 パパイアの無処理、エタノール処理法、電子レンジ処理変法
 (加熱時間 1 分または 2 分) の果糖、ブドウ糖、ショ糖の分析結果

		無処理	エタノール 処理	電子レンジ処理変法	
				加熱1分	加熱2分
パパイア	果糖 ¹⁾	3.6	3.1	1.3	1.4
	ブドウ糖 ¹⁾	3.5	3.3	1.1	1.1
	ショ糖 ¹⁾	ND ²⁾	0.4	4.7	4.5

¹⁾100g 当たりの定量値(g)

²⁾ND: < 0.1 g/100g



写真 3.1 柿の縮分方法



無処理の柿



無処理の柿
ミキシング前

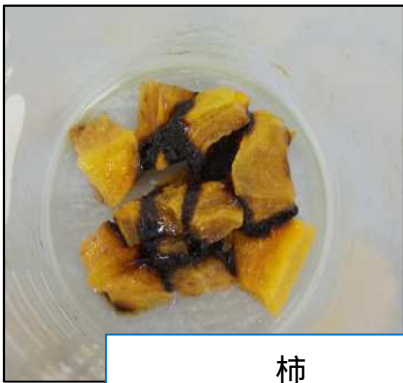


無処理の柿
ミキシング後

写真 3.2 柿の前処理状態（無処理）



柿
(電子レンジ加熱前)



柿
(電子レンジ加熱後)



柿
ミキシング後

写真 3.3 柿の前処理状態 (電子レンジ処理法 A)



柿
(電子レンジ加熱前)



柿
(電子レンジ1分加熱後)



柿
ミキシング後

写真 3.4 柿の前処理状態 (電子レンジ処理法 C)



柿
(エタノール添加前)



柿
(エタノール添加後)



柿
(ミキシング前)



柿
(ミキシング後)

写真 3.5 柿の前処理状態 (エタノール処理法)

結論

第 4 章 総括

4.1 ヒスタミンの生成と遊離ヒスチジンの変化に対する魚介類の保存温度の影響

第 2 章では、遊離ヒスチジン含有量が多いことが知られている赤身魚を主とした魚介類について、研究用のモデル試料を調製し、保存温度を変えて保存したモデル試料中の遊離ヒスチジン含量と、生成されるヒスタミン含量について、高速液体クロマトグラフ法およびアミノ酸自動分析法を用いて分析し、保存における変化と相関性を確認した。保存したモデル試料の分析結果から、魚種および保存温度によってヒスタミンの生成に違いがあることが確認され、一部の魚では一般的な冷蔵庫の温度である 5 °C においてもヒスタミンの生成が確認された。ヒスタミンが生成された魚は遊離ヒスチジンの減少が確認され、減少する遊離ヒスチジン量と、生成されるヒスタミン量には相関性が確認された。また、白身魚やその他魚介類においても、同様にヒスタミンの生成と、遊離ヒスチジン量の減少が確認されたことから、白身魚やその他魚介類によってもヒスタミン食中毒が発生する可能性が示唆された。

ヒスタミン生成菌は、菌種によって増殖至適温度が異なり、低温でも増殖する菌種が存在することから、赤身魚に限らず、魚介類の管理には十分な注意と、適切に取り扱われる必要があると考えられた。また、ヒスタミン食中毒の可能性や危険性を予測することは困難であるが、本研究により、生成されるヒスタミン量は、魚介類に含まれる遊離ヒスチジン量に近い量であることが明らかとなったことから、魚介類の遊離ヒスチジン量を調査することで、その魚介類において生成されるヒスタミン量や、発生するヒスタミン食中毒の危険性・重篤性が予測できる可能性が示唆された。さらに、さまざまな魚介類の遊離ヒスチジン量を調査することで、ヒスタミン食中毒の予防のための知見となり得ると考えられた。

4.2 果実類の糖分析における前処理方法の検討および糖含量の比較

第 3 章では、果実類の糖分析において、分析操作中にショ糖分解酵素の影響を受け、果実に含まれるショ糖が、果糖およびブドウ糖に加水分解することが

ら、正確な分析結果を得ることが困難な問題に対し、ショ糖分解酵素の影響を防ぐ前処理方法について研究を行った。また、ショ糖分解酵素の影響を防ぐ前処理方法を用いて、糖類の分析操作中における酵素の影響についての知見が少ない果実類についても同様の前処理方法を用いた糖分析を行い、結果を比較することで、前処理方法による分析結果の違いと各果実における酵素の影響を確認した。

マイクロ波を用いた加熱による酵素失活の方法は、食品の栄養成分の基礎データとして広く用いられる日本食品標準成分表に記載された柿に対する方法を元にして、その方法における課題と考えられた、用いる試料が少ないこと、加熱が過剰であることを改善したマイクロ波加熱方法を検討した。検討結果から、1~2 cmの角切りにした試料 100 g に対し、出力 700W の電子レンジを用いて、1 分間のマイクロ波加熱を行うことで、日本食品標準成分表に記載された方法と同等の酵素失活効果が得られ、より試料の代表的な部位を用いることが可能であり、過剰な加熱による組織の変性も抑えられることが確認された。

さまざまな果実について、この良好な結果が得られたマイクロ波加熱の前処理方法を適用した試料を用いて糖分析を行い、前処理を行わない試料の分析結果と比較することで、果実の糖分析における酵素の作用の有無を確認した。また、マイクロ波加熱に比べ、より簡易な前処理方法と考えられる、試料と等重量のエタノールを添加し、試料と同時にミルミキサーで粉碎均質化することで酵素を失活させる方法についても同様に比較することで、より簡易な方法で酵素を失活し、適切な分析結果が得られるかの検討を行った。検討の結果から、用いた果実 22 種中の 10 種の果実において、酵素の影響を受けたと考えられる分析結果が得られた。また、18 種の果実において、マイクロ波加熱の前処理方法と、エタノールを用いた前処理方法の分析結果は同等であった。検討に用いた果実の約半数に酵素の影響が確認されたことから、多くの果実で糖分析の操作中に酵素の影響を受けるため、適切な前処理を行う必要があると考えられた。ブドウ（クリムゾンシードレス）とブルーベリーはエタノールを用いた前処理方法の方が適切であり、柿（富有柿）とパパイアはマイクロ波加熱の前処理方法の方が適切であると考えられる結果が得られたことから、果実の種類によって適

切な前処理方法が異なる可能性が考えられた。果実の糖分析においては、より多くの果実に対し、前処理方法を変えた分析結果を比較検討し、果実ごとの適切な前処理方法を実施することが必要であると考えられた。

4.3 今後の展望

本研究では、魚介類について温度を変えて保存した時の遊離ヒスチジン含量とヒスタミン含量を分析し、変化するヒスタミン含量と遊離ヒスチジン含量には相関性が確認された。また、魚介類の遊離ヒスチジン含量を分析することは、保存した際に発生するヒスタミン食中毒の危険性を推測する有効な方法の一つであることを示した。得られた知見から、より多くの魚介類の遊離ヒスチジン含量を調査研究することで、ヒスタミン食中毒の予防に繋がることを期待する。また、魚介類を含む加工食品における相関性は不明であり、今後は加工食品の保存における遊離ヒスチジン含量とヒスタミン含量の変化を調べることで、加工食品においても食中毒の危険性を予測できる可能性を確認する検討を行い、われわれの食の安心・安全に貢献できることを望む。

果実の糖分析における前処理方法とショ糖分解酵素についての研究から、多くの果実において糖分析の操作中にショ糖分解酵素が作用することを明らかにした。また、果実の種類と前処理方法の組み合わせによって、ショ糖分解酵素の作用が異なる知見が得られた。今後は、より多くの果実について前処理を行った糖分析結果を比較することで、果実における酵素の作用を調査することや、果実ごとに適した前処理方法の技術開発に取り組み、果実に含まれる糖含量を正確に分析する技術を向上させることで、果実の品種間における甘味の差異、熟成による甘味の変化といった、果実の甘味に関する研究や、より美味しい果実を生産する技術、豊かな食生活の実現に貢献していきたいと考える。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心なご指導、ご助言を賜りました三重大学大学院工学研究科教授の金子聡先生に深謝の意を表します。

本研究の実施の機会を与えていただき、研究の遂行にご助言いただきました一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC 理事長の西中隆道様、本部長の若生信久様、事務局長の小林政人様、副本部長の菊川浩史様、検査部門統括の服部聡司様、支援部門統括の佐藤孝史様に感謝の意を表します。研究データの収集に関し、さまざまな面で多大な協力を行ってくださいました第三理化学の職員の皆様に感謝致します。

文献

- [1] 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）。
- [2] 内閣府 食品安全委員会，作成日：平成 25 年 2 月 4 日，最終更新日：令和 3 年 3 月 30 日，“ファクトシート ヒスタミン”，
<https://www.fsc.go.jp/factsheets/index.data/210330histamine.pdf>
[Accessed 30 September 2021].
- [3] 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所，“「健康食品」の安全性・有効性情報「ヒスチジン」”，
<https://hfnet.nibiohn.go.jp/contents/detail626lite.html>
[Accessed 30 September 2021].
- [4] 一般社団法人 日本食品添加物協会
<https://www.jafaa.or.jp/>
[Accessed 30 September 2021].
- [5] 谷村顕雄，棚元憲一，食品添加物公定書解説書 第 8 版，“L-ヒスチジン”，廣川書店，D1329-1331（2007）。
- [6] 厚生労働省，4.食中毒統計資料（2）過去の食中毒発生状況，“令和 2 年（2020 年）食中毒発生状況”，
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
[Accessed 30 September 2021].
- [7] 大阪府大阪市 健康局，2020，“STOP！魚介類による食中毒”，

<https://www.city.osaka.lg.jp/kenko/cmsfiles/contents/0000251/251265/gyokairui-syokutyudoku2020.pdf>

[Accessed 30 September 2021].

- [8] 広島県広島市，2020，食品衛生に関すること，“鮮魚店や寿司店の食中毒予防”，

<https://www.city.hiroshima.lg.jp/site/syokuhin-eisei/8074.html>

[Accessed 30 September 2021].

- [9] 滋賀県 保健所，“魚介類による食中毒予防のために”，

<https://www.pref.shiga.lg.jp/file/attachment/5190001.pdf>

[Accessed 30 September 2021].

- [10] 菅田仁美，鈴木春佳，高橋沙織，“ヒスタミン食中毒の統計に関する調査研究”，東京家政大学研究紀要，第45集（2），29-34（2005）。

- [11] 厚生労働省，“ヒスタミンによる食中毒について”，

<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000130677.html>

[Accessed 30 September 2021].

- [12] 農林水産省，2015，“リーフレット「水産物でヒスタミンを増やさないよう衛生管理を徹底しましょう！」”，

https://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/gyokai/g_kenko/busitu/pdf/histam_r.pdf

[Accessed 30 September 2021].

- [13] 消費者庁，“ヒスタミン食中毒”，

https://www.caa.go.jp/policies/policy/consumer_safety/food_safety/food_safety_portal/topics/topics_003/

[Accessed 30 September 2021].

- [14] 山木将悟, 山崎浩司, “水産物におけるヒスタミン食中毒とヒスタミン生成菌”, 日本食品微生物学会雑誌, 36 (6), 75-83 (2019).
- [15] 宮崎麻由, 平本都香, 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産生菌に関する調査”, 宮城県保健環境センター年報, 28, 36-38 (2010).
- [16] 宮崎麻由, 中居真代, 有田富和, 那須務, 渡邊節, 沖村容子, “生食用鮮魚介類等におけるヒスタミン産生菌に関する調査(第2報)”, 宮城県保健環境センター年報, 29, 37-39 (2011).
- [17] 与口りお, 奥積昌世, 藤井建夫, “市販鮮魚における好塩性ヒスタミン生成菌の季節的消長”, 日本水産学会誌, 56 (9), 1473-1479 (1990).
- [18] 藤井建夫, “アレルギー様食中毒”, 日本食品微生物学会雑誌, 23 (2), 61-71 (2006).
- [19] 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.
- [20] 衛生試験法・注解 (2020), 公益社団法人日本薬学会編, 金原出版.
- [21] 日本食品分析センター, “JFRL ニュース Vol.4 No.2 Oct. 2011 「ヒスタミンについて」”,
https://www.jfrl.or.jp/storage/file/news_vol4_no2.pdf
[Accessed 30 September 2021].
- [22] 大槻耕三, 奥野忍, 谷田恭子, “抹茶の総アミノ酸および遊離アミノ酸の

HPLC アミノ酸分析機による分析”, 京都府立大学学術報告「人間環境学・農学」, 50, 27-30 (1998).

- [23] 日本食品分析センター, “遊離アミノ酸”,
<https://www.jfri.or.jp/storage/file/188.pdf>
[Accessed 30 September 2021].
- [24] 新・食品分析法, “遊離アミノ酸測定用試料溶液調整法”, 日本食品科学工学会新・食品分析法編集委員会編, 499-504 (1996), 光琳.
- [25] 株式会社日立ハイテク, 2015, “SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS アミノ酸分析の進歩と L-8900”,
<https://www.hitachi-hightech.com/file/jp/pdf/sinews/reports/4968.pdf>
[Accessed 30 September 2021].
- [26] 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所, “「健康食品」の安全性・有効性情報「果糖、フルクトース、フラクトース」”,
<https://hfnet.nibiohn.go.jp/contents/detail566lite.html>
[Accessed 30 September 2021].
- [27] 河崎孝弘, 山内俊一, “フルクトース毒性”, 糖尿病, 48(6), 419-421(2005).
- [28] 厚生労働省, “e-ヘルスネット「ブドウ糖」”,
<https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/dictionary/food/ye-030.html>
[Accessed 30 September 2021].
- [29] 公益財団法人 日本薬学会, “薬学用語解説「ブドウ糖」”,

<https://www.pharm.or.jp/dictionary/wiki.cgi>

[Accessed 30 September 2021].

- [30] 独立行政法人 農畜産業振興機構, “日本の砂糖を支える仕組み”,

<https://www.alic.go.jp/content/001167600.pdf>

[Accessed 30 September 2021].

- [31] 厚生労働省, “e-ヘルスネット「甘味(砂糖)の適正摂取方法」”,

<https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/teeth/h-02-012.html>

[Accessed 30 September 2021].

- [32] 厚生労働省, “e-ヘルスネット「果物」”,

<https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/food/e-01-003.html>

[Accessed 30 September 2021].

- [33] 曽根一純, 望月龍也, 野口裕司, “イチゴにおける果実中の糖および有機酸の組成別含量の品種間差異および遺伝力”, 野菜茶業研究所研究報告, 1, 241-254 (2002).

- [34] 林田誠剛, 井手勉, 徳嶋知則, “近年育成された中晩生カンキツ数品種に含まれる糖, 有機酸, アミノ酸およびフラボノイド類の組成”, 長崎県農林技術開発センター研究報告, 8, 67-78 (2016).

- [35] 小宮山美弘, 原川守, 辻政雄, “果実類の熟度と貯蔵条件に基づく糖組成の特徴”, 日本食品工業学会誌, 32 (7), 522-529 (1985).

- [36] 福家洋子, 松岡博厚, “キウイフルーツの生育中および追熟中の糖, デン

- ブン，有機酸，遊離アミノ酸の変化”，日本食品工業学会誌，29（11），642-648（1982）。
- [37] 伊藤聖子，葛西麻紀子，加藤陽治，“バナナの追熟及び加熱調理による糖組成の変化”，弘前大学教育学部紀要，100，93-100（2013）。
- [38] 消費者庁，“食品表示法等（法令及び一元化情報）”，
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_labeling_act/
[Accessed 30 September 2021].
- [39] 消費者庁：食品表示基準について(平成27年3月30日消食表第139号)，
“別添 栄養成分等の分析方法等”，
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_labeling_act/pdf/food_labeling_cms101_200327_11.pdf
[Accessed 30 September 2021].
- [40] 観公子，牛山博文，新藤哲也，斉藤和夫，“市販魚介類および加工品中のヒスタミン含有量調査”，食品衛生学雑誌，46（3），127-132（2005）。
- [41] 鮫島陽人，鶴木隆文，下野かおり，間世田春作，“冷凍魚の品質管理に関する研究 - 冷凍カツオの処理工程におけるヒスタミンの挙動 - ”，鹿児島県工業技術センター研究報告，14，35-38（2000）。
- [42] 松雪耕一郎，“白身魚のヒスタミン食中毒”，食品衛生学雑誌，55（2），J60-61（2014）。
- [43] 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長通知，平成29年6月16日 生食発0616第1号，平成9年3月24日付け衛食第85号別添，

“大量調理施設衛生管理マニュアル”。

- [44] 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, 784-795.
- [45] 衛生試験法・注解(2020), 公益社団法人日本薬学会編, 金原出版, 216-218.
- [46] 日本食品分析センター, “ヒスタミンについて”,
https://www.jftrl.or.jp/storage/file/news_vol4_no2.pdf
[Accessed 30 September 2021].
- [47] Sato, T., Fujii, T., Masuda, T., Okuzumi, M. Changes in numbers of histamine-metabolic bacteria and histamine content during storage of common mackerel. *Fish-eries Sci.*, 60, 299-302 (1994).
- [48] 林誠, “食品と腐敗 - 主として腐敗アミンの消長を中心とした魚介類の腐敗機構 -”, *食品衛生学雑誌*, 11 (6), 429-438 (1970).
- [49] 伊藤聖子, 葛西麻紀子, 加藤陽治, “バナナの追熟および加熱調理による糖組成の変化”, *弘前大学教育学部紀要*, 110, 93-100 (2013).
- [50] 高橋克也, 吉田泰治, 矢野昌充, “新技術の経済性と流通対応 - キウイフルーツの追熟技術に関する事例 -”, *農業総合研究*, 48(3), 145-162(1994).
- [51] 二村友彬, 青木隆, “神奈川県育成キウイフルーツ‘片浦イエロー’のエチレン追熟処理を行う場合の収穫適期について”, *神奈川県農業技術センター研究報告*, 161, 47-50 (2017).
- [52] 石原良行, 高野邦治, 植木正明, 栃木博美, “イチゴ新品種「とちおとめ」

の育成 ”, 栃木県農業試験場研究報告, 44, 109-123 (1996).

- [53] 田北俊昭, 岡田真郁子, “高級果物における「地域ブランド」の評価について - 日本山形産さくらんぼを事例として - ”, 山形大学人文学部研究年報, 8, 179-197 (2011).
- [54] 辻政雄, 小宮山美弘, “果実のインベルターゼ活性について ”, 山形県工業技術センター研究報告, 5, 93-96 (1991).
- [55] 鄭国華, 杉浦明, “カキ果実の発育・成熟過程における糖組成の変化とインベルターゼ活性との関連について ”, 園藝學會雑誌, 59 (2), 281-287 (1990).
- [56] 文部科学省, “日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂) 炭水化物成分表編 ”, 99.
- [57] 安井明美, 渡邊智子, 中里孝史, 淵上賢一, “日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂) 分析マニュアル・解説 ”, 文部科学省科学技術・学術政策局政策課資源室監修, 建帛社, 214-216 (2016).
- [58] 藤原孝之, 坂倉元, 伊藤寿, 本庄達之助, “ブドウ果実の糖分析過程におけるインベルターゼによるショ糖の加水分解 ”, 日本食品化学工学会誌, 46 (1), 24-28 (1999).
- [59] 平井俊次, 六波羅明香, 清水純夫, “カキ果実の成熟, 貯蔵および加工中のインベルターゼ活性の変化 ”, 日本食品工業学会誌, 33 (6), 369-374 (1986).
- [60] 藤原孝之, 坂倉元, 伊藤寿, 本庄達之助, “高速液体クロマトグラフィー

による果実搾汁液の糖分析における簡易試料調製法”,日本食品化学工学会誌,46(2),81-88(1999).

本学位論文に関連する学術論文

1. ヒスタミンの生成と遊離ヒスチジンの変化に対する魚介類の保存温度の影響

小林尚, 佐藤孝史, 菊川浩史, 小林政人, 金子聡

科学・技術研究, 10 (2021)

2. 果実類の糖分析における前処理方法の検討および糖含量の比較

小林尚, 服部聡司, 菊川浩史, 小林政人, 金子聡

日本食品化学学会誌, 投稿中