

# Megazyme

---

## ヒスタミン分析法

### HISTAMINE ASSAY PROCEDURE

K-HISTA 01/20

K-HISTA  
(用手法 100 回分)

日本バイオコン株式会社

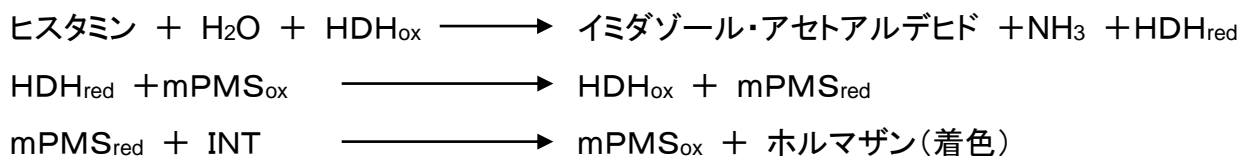
## はじめに - INTRODUCTION -

様々な食品においてその分解により高レベルのヒスタミンが発生する可能性があり、特に魚類での影響が大きいです。ヒスタミンの蓄積は、高レベルヒスチジンを含有する食品に特定の細菌種が繁殖することにより生じます。これらの細菌は、ヒスチジンをヒスタミンに変換するヒスチジンデカルボキシラーゼを有します。マグロ、カジキ、イワシ、カタクチイワシ、ニシン、サバなどの魚種はヒスチジン含有量が高いため、分解時にヒスタミンが特に蓄積し易い傾向があります。鮮度低下した食品の摂取により過剰量のヒスタミンに曝されると、スコンプロイド中毒(ヒスタミン中毒)としても知られるアレルギー様の食中毒反応を引き起こします。スコンプロイド中毒は、発疹、吐き気、嘔吐、下痢、気道の狭窄、筋力低下など、様々な症状を示すことがあり、麻痺や死亡例も報告されています。

ヒスタミンによる健康被害予防の観点から、ヒスタミンが蓄積し易い食品中のレベルを管理するために食品規制当局により厳格なガイドラインが施行されています。これらには、厳格な保管および処理要件、冷蔵記録の文書化および危害分析重要管理点(HACCP)上でのヒスタミン分析が含まれます。メガザイムのヒスタミン分析キット(**K-HISTA**)は、この法令順守支援のための簡単で便利な方法です。

## 原理 - PRINCIPLE -

ヒスタミン定量分析は、ヒスタミンデヒドロゲナーゼ(HDH)によるヒスタミンの酸化的脱アミノ化反応に基づいています。電子伝達体である 1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェート(mPMS)の存在下、塩化ヨードニトロテトラゾリウム塩(INT)は、一連の酸化還元反応により492nm に吸収を有する着色ホルマザン生成物に変換されます。サンプル中のヒスタミン濃度は、ヒスタミン品の一点標準を用いて定量することができます(3ページを参照)。



## 特異性、感度、直線性と精度

### - SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

吸光度差の最小値(検出限界)は0.009です。これは分析当たりのヒスタミン濃度約0.09 $\mu\text{g}$ 、または標準法で調製した魚類サンプル1.0mL当たり約0.75mg/kg(ppm)に相当します。定量限界は分析当たりのヒスタミン濃度約0.5 $\mu\text{g}$ 、またはサンプル1.0mL当たり約4.2mg/kg(ppm)、吸光度差0.03に相当します。この分析は0.5~12 $\mu\text{g}$ のヒスタミン濃度間で直線性があり、その結果を図2(6ページ)に示しました。

## 阻害 - INTERFERENCE -

ヒスタミンの変換が分析法で定義された時間、約20分以内に完了している場合、一般に阻害が生じていないと結論付けることができます。

サンプル中の妨害物質の存在は、内部標準を加えることにより確認することができます。標準品

の量的な回収が可能ならずです。サンプルの取り扱いおよび抽出におけるロス回収実験、すなわち抽出工程の最初にサンプルにヒスタミンを添加することによって確認することができます。

その他の生体アミンであるチラミン、プトレシン、カダベリンなどは腐敗食品に著量含まれていることがあります。このキットで採用している酵素HDHはヒスタミンに対して高い基質特異性を示し、チラミン、プトレシン、カダベリンには作用せず、アグマチンと 1,3-ジアミノプロパンに極く僅かに反応します<sup>1</sup>。

## 安全性 - SAFETY -

すべての化学物質に適用される一般的な安全対策を遵守する必要があります。この製品の安全な使用および取扱いの詳細、SDSについては日本バイオコンまでお問い合わせ下さい。

## キット - KITS -

100 検体分析用キットを提供しております。キットには以下のものが含まれます。

- ボトル1: 緩衝液(20 mL、pH 9.0)。保存剤として 0.02%w/v アジ化ナトリウム含有。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル2:(×2) INT/mPMS。凍結乾燥粉末。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル3: HDH溶液(5 mL)。保存剤として 50%グリセロールと 0.02%w/v アジ化ナトリウム含有。-10°C以下で2年以上安定です。
- ボトル4: ヒスタミン標準液(10 mL、300 µg/mL)。保存剤として 0.02%w/v アジ化ナトリウム含有。密封条件下、4°Cで2年以上安定です。

## 試薬溶液／懸濁液の調製

### - PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS -

1. 付属のボトル1をそのまま使用して下さい。4°Cで2年以上安定です。
2. 1本のボトル2の内容物を蒸留水 5mL に溶解します。良く攪拌し、基質を完全に懸濁させます。直ちに使用するか、適量ずつポリプロピレン容器に分注し冷凍保存します。-10°C以下で2年以上安定です。必要になるまで2本目は決して溶解しないで下さい。
3. 付属のボトル3をそのまま使用して下さい。ボトルを直立させて冷凍保管します。-10°C以下2年以上安定です。
4. 分析直前にヒスタミン標準品を希釈して下さい。ボトル4の 0.1mL を分取し、13mL 容ポリプロピレン試験管に分注し、サンプル抽出緩衝液(100mM EDTA, pH 8.0) 4.9mL を追加します。分析当日に毎回調製して下さい。

NOTE : ヒスタミン標準液は、分析サンプル中のヒスタミン濃度の計算に使用されるため、全ての分析セットで同時に測定する必要があります。

## 緩衝液の調製(供給外): - PREPARATION OF BUFFER (not supplied): -

### サンプル抽出緩衝液 (100mM EDTA, pH 8.0)

EDTA二ナトリウム塩 (EDTA-2Na·2H<sub>2</sub>O; MW 372.24; Sigma #E5134 または同等品) 37.2 g を蒸留水 750mL に溶解します。水酸化ナトリウム溶液で pH8.0 に調整し、蒸留水で 1L に定容します。室温で1ヶ月以上安定です。

### 機器(推奨):

1. 30mL 容ポリプロピレン試験管
2. 使い捨てプラスチック製セミマイクロキュベット(光路 1cm、1.5mL)
3. マイクロピペッター、例 Gilson Pipetman®(100µL、200µL)
4. ポジティブディスプレイメント方式ピペッター、例 Eppendorf Multipette®
  - 5.0mL Combitip® [緩衝液1 (ボトル1) 0.15mL、INT / mPMS液 0.1mL 分注用]
  - 25 mL Combitip® (蒸留水 5.0mL 分注用)
5. メスフラスコ (25mL)
6. 分析用天秤
7. 492nm に設定した分光光度計
8. ボルテックスミキサー
9. 実験室用タイマー(ストップウォッチ)

## サンプルの調製 - SAMPLE PREPARATION -

1. 魚の組織約 10g を秤量し、鋭利なナイフまたは精密ブレンダーを使用してホモジナイズします。この組織サンプル 2g を蓋付き耐熱試験管(容量 30 mL)に精秤します。
2. サンプル抽出緩衝液 約 15mL を加えて懸濁し、激しく振とうして良く攪拌します。
3. 密栓した状態で試験管を20分間煮沸します。
4. 冷却し、内容物を 25mL 容メスフラスコに全量移します。  
サンプル抽出緩衝液を加え 25mL に定容します。
5. #5C 濾紙で濾過するか、10,000×g で5分間遠心分離して、濁りを取り除きます。  
分析にはこの上清サンプルを使用します。

## A. 分析手順 (用手法) - MANUAL ASSAY PROCEDURE -

波長:	492nm
キュベット	光路 1cm セミマイクロセル(ガラスもしくはプラスチック)
反応温度	37°C
反応最終容量	1.5 mL
サンプル溶液	ヒスタミン 0.5~12 µg (サンプル液量を 1.0mL とした場合)

空気を対照(レファレンス側にセルを入れない)、または水を対照に分析

ピペットでキュベットに添加	ブランク	サンプル／標準液
蒸留水	0.20 mL	0.20 mL
サンプル溶液	-	1.0 mL
サンプル抽出液 (EDTA)	1.0 mL	-
溶液1 (緩衝液)	0.15 mL	0.15 mL
溶液2 (INT/mPMS)	0.10 mL	0.10 mL
混合*し、試薬添加の約5分後、反応液の吸光度測定 (A <sub>1</sub> ) 次に以下のものを添加し反応開始:		
溶液3 (HDH)	0.05 mL	0.05 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約20分)後、反応液の吸光度測定 (A <sub>2</sub> )。 溶液2は光感受性のため、キュベットが閉鎖系内で反応されない場合、遮光する必要があります。		

\* プラスチック製スパテルで攪拌するか、キュベット蓋またはパラフィンフィルムでキュベットに蓋をして穏やかに反転させる。

## 算出法

### A. ヒスタミン標準曲線

- ブランクと標準品の吸光度差 (A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) を測定します。標準品の吸光度差からブランクの吸光度差を差し引いて ΔA<sub>標準</sub> (以下の例を参照) を求めます。
- 以下の式でM値を求めます

$$M = \frac{\text{ヒスタミン} (\mu\text{g})}{\Delta A_{\text{標準}}} \quad [\mu\text{g} / \Delta A_{\text{標準}}]$$

### 例

「試薬溶液の調製、ステップ4」(2ページ)の手順に従って調製した標準液を用いて分析し、測定された ΔA<sub>標準</sub> が 0.34 である場合、M値は次のように計算できます。

$$M = \frac{6 (\mu\text{g})}{0.34} = 17.6$$

註> ΔA<sub>標準</sub> は毎回異なります

### B. サンプルのヒスタミン含量

ブランクとサンプルの吸光度差 (A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) を測定します。サンプルの吸光度差からブランクの吸光度差を差し引いて ΔA を求めます。

十分に正確な結果を得るには、ΔA は少なくとも 0.1 の吸光度差、かつ 0.8 を越えないことが必要です。

ヒスタミンの濃度は、以下のよう計算することができます。

$$c = \frac{M \times 25 \times 1.0}{1.5 \times 2.0} \times F \times \Delta A \quad [\text{mg}/\text{kg}; \text{ppm}]$$

### ここで:

- M = ヒスタミン標準品の分析値M値 (μg / ΔA<sub>標準</sub>)  
25 = サンプル抽出液量 (mL)

- 1.0 = 分析に用いるサンプル液量 (mL)  
 1.5 = 分析の総液量 (mL)  
 2.0 = サンプルの初発秤量値 (g)  
 F = 希釈率  
 ΔA = サンプルの吸光度変化

NOTE: 上記は、メガザイムウェブサイト(www.megazyme.com)の各製品ページからダウンロード可能な Megazyme *Mega-Calc*™を使用することで簡単に計算できます。

## サンプルの調製 - SAMPLE PREPARATION -

### 1. サンプル希釈

キュベット中に添加されるヒスタミンの量(すなわち、サンプル 1.0mL 中)は、0.5~12 μg の範囲である必要があります。従ってサンプル溶液のヒスタミンが 0.5~12 μg/mL の範囲に入るよう、濃度を調整します。希釈は必ず、希釈緩衝液にて実施して下さい。

希釈表	推定ヒスタミン濃度 (μg/mL)	希釈緩衝液 による希釈	希釈度 (F)
	< 12	希釈不要	1
	12~120	1 + 9	10
	120~1200	1 + 99	100

サンプル吸光度 ΔA の値が低すぎる(例えば<0.03)場合、結果は「定量限界以下」もしくは 4.2 ppm 以下と報告可能です。

## 付録 - APPENDIX -

### A. 分析の原理 -ヒスタミンの検出法-

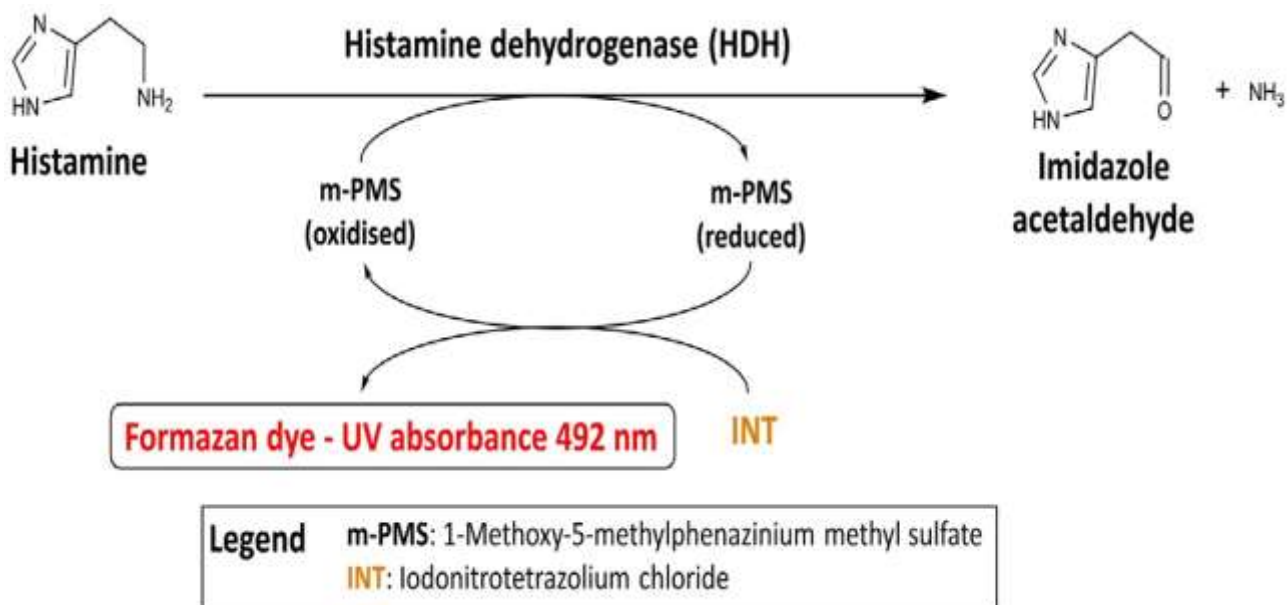


図1. ヒスタミン定量法の原理

## B. 分析の直線性

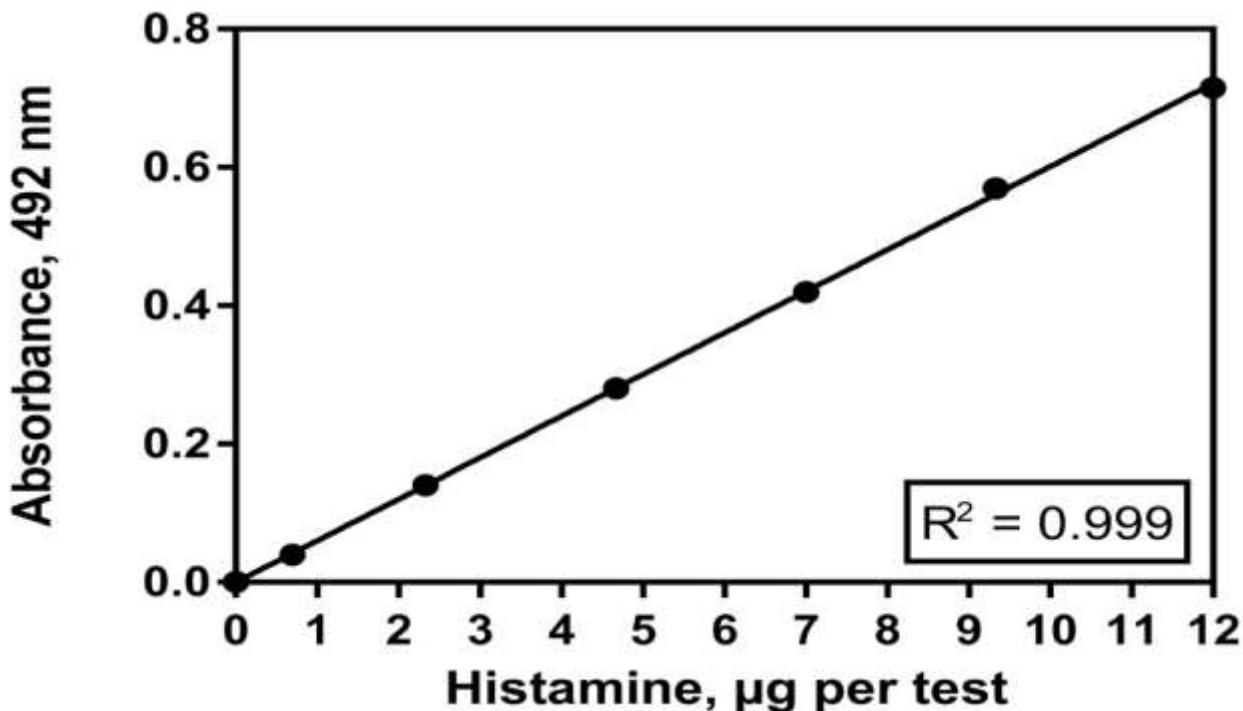


図2. ヒスタミン定量の直線性

表1. 各種魚類サンプルにおけるヒスタミン回収率とスパイク試験(mg/L)

サンプル	スパイク中のヒスタミン予想値 (mg/L)	スパイク中のヒスタミン分析値 (mg/L)	サンプルのヒスタミン分析値 (mg/L)	サンプル+スパイクによるヒスタミン分析値 (mg/L)	回収率 %
新鮮なサバ	3.7	3.70	0.29	4.00	100.3
新鮮なイワシ	3.7	3.73	0.24	3.95	99.5
マグロ油漬	4.2	4.23	1.15	5.45	101.8
マグロ水漬	4.2	4.23	1.22	5.39	98.7

表2. ヒスタミン標準系列による中間精度値

	分析数 n	ヒスタミン µg	平均 ΔA	標準偏差	% CV
ヒスタミン	12	1	0.056	0.0006	1.47
	12	4	0.236	0.0021	1.51
	12	6	0.359	0.0072	2.58
	12	8	0.484	0.0076	1.79
	12	10	0.615	0.0121	2.11
	12	12	0.716	0.0157	2.27



## 文献 - REFERENCES -

Bakke, M., Sato, T., Ichikawa, K. & Nishimura, I. (2005).  
Histamine dehydrogenase from *Rhizobium* sp.: Gene cloning, expression in  
*Escherichia coli*, characterization and application to histamine determination.  
*Journal of Biotechnology*, **119**, 260-271.

---

# 日本バイオコン株式会社

名古屋本社

〒454-0852 名古屋市中川区昭和橋通三丁目 23 番地1 バイオコンビル

TEL 052-661-8105 (代表) FAX 052-659-0888

**TEL 052-659-4898 (試薬担当直通)**

**E-mail : [bj-megazyme@biocon.co.jp](mailto:bj-megazyme@biocon.co.jp)**

**Homepage : <http://www.biocon.co.jp>**

---

この小冊子に記載されている情報は、当社が知る限りにおいて事実かつ正確に記載されていますが、使用条件が当社の管理範囲外であるため、本文中にどのような推奨や示唆があったとしても、如何なる使用も特許を侵害しないということを保証しているものではありません