

ヒスタミンセンサの構築

近藤徹弥^{*1}、松井淳子^{*1}、高橋勤子^{*2}、羽田野早苗^{*3}

Construction of Histamine Sensor

Tetsuya KONDO, Junko MATSUI, Isoko TAKAHASHI and Sanae HATANO

Food Research Center, AITEC^{*1} Research and Development Division, AITEC^{*2} Retired^{*3}

フェロセン練り込みカーボンペースト電極表面に *Alcaligenes xylosoxidans* 由来芳香族アミン脱水素酵素を固定したヒスタミンセンサを試作し、センサの作成条件、及びヒスタミンの測定条件を最適化した。フロー型センサの変動係数は 3.6% (n=22) であった。最小検出限界は 0.5 μM であり、蛍光 HPLC 法とほぼ同程度であった。本センサは、35 で 60 日保存後も約 80% の応答を維持し、長期間安定であった。本センサと蛍光 HPLC 法を用いて魚肉中のヒスタミンを定量したところ、両測定法の間に良好な相関関係が得られた。

1. はじめに

ヒスタミン (Hm) は、生体内では肥満細胞や好塩基球に蓄えられており、アレルゲン刺激によって放出され、じん麻疹、気管支喘息などのアレルギー反応を引き起こす。又、Hm は、ヒスチジン含量の高い鯖や鮪などにおいて、微生物作用により生成する不揮発性腐敗アミンの一つであり、アレルギー様食中毒の原因物質である¹⁾。現在、我が国における Hm の法的な規制値はないが、欧米諸国では法的規制値が定められている¹⁾。

したがって、Hm を簡便かつ高感度に検出できれば、アレルゲンの同定、低アレルギー食品の開発、食品の鮮度管理や衛生管理に有用である。しかし、Hm 測定に従来用いられてきた蛍光 HPLC 法²⁾では、蛍光検出器などの機器が高価である、蛍光試薬が不安定であり取り扱いに注意を要する、高度の分析技術を必要とする等、幾つかの問題点がある。

我々はこれまでに *Alcaligenes xylosoxidans* を β -フェニルエチルアミン含有培地で培養すると、菌体破碎液中に Hm 脱水素酵素活性が誘導されることを見出し、本破碎液を用いた簡単な電気化学的 Hm センサを作成した³⁾。更に、本破碎液から芳香族アミン脱水素酵素 (AADH) を精製し、その酵素化学的特性を調べた⁴⁾。本年度は、精製酵素を用いた Hm センサを作成し、その応答特性について検討した。

2. 実験方法

2.1 酵素及び試薬

Hm 二塩酸塩は Sigma 社から、フェロセン (Fc) は関東化学から購入した。AADH は、精製し⁴⁾、-60 で凍結保

存したものを用いた。本酵素は 4 で少なくとも数か月は安定であった。

2.2 電極作成法

グラファイトに流動パラフィン を 2:1 の重量比で加え、さらにフェロセンを所定の濃度となるように、良く混合して、Fc 含有カーボンペースト (Fc-CP) を作成した。Fc-CP を棒状のカーボンペースト用電極 (BAS 製、内径 3.0 mm、電極面積 7.1 mm²)、又はフローセル型電極 (BAS 製、内径 3.0 mm $\times$ 2、電極面積 14.2 mm²) に詰め、表面を滑らかに磨いた。電極の表面に AADH 液を滴下 (0.44 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$) し、ドライヤーで風乾した。続いてグルタルアルデヒド (GA) 蒸気と接触させ、0.1 M グリシン溶液に 30 分間漬けた後、蒸留水で良く洗浄して酵素電極とした。

2.3 電気化学的測定

電気化学的測定には 3 電極方式を用い、ポテンショスタットで電極電位を 0.1 V (銀/塩化銀電極基準) に設定した。バッチ法では、棒状の酵素電極を緩衝液 (0.1 M リン酸ナトリウム、pH 8.0) に浸し、酵素電極に流れる電流を経時的に測定した。Hm 添加に伴う正味の電流増加値を応答値とした。緩衝液はマグネチックスターラーで攪拌した。フロー法では、フローセル型の酵素電極に緩衝液を 0.5 ml/min の流速で流し、酵素電極に流れる電流を経時的に測定した。Hm 添加に伴い現れる正味の電流ピーク値 (I_p) を応答値とした。

2.4 魚肉中 Hm の抽出

衛生試験法²⁾に準じて行った。すなわち、Hm を含む魚肉をホモジナイズしたものを除蛋白後、イオン交換樹脂 (CG-50、アンバーライト製) カラムに注入した。0.2 M 酢

^{*1} 食品工業技術センター 応用技術室 ^{*2} 基盤技術部 ^{*3} 前食品工業技術センター 応用技術室

酸緩衝液 (pH 4.6) でカラムを洗浄後、0.2 M 塩酸でヒスタミンを溶出させた。溶出液を水酸化ナトリウムで中和して、クリーンアップ溶出液とした。

2.4 蛍光 HPLC 法による Hm の定量

衛生試験法²⁾に準じ、クリーンアップ溶出液に遮光下で *o*-フタルアルデヒドを加えて反応させたものを試験溶液として、蛍光検出器 (励起波長 350 nm、蛍光波長 450 nm) 付き HPLC にて分析した。

3 . 実験結果及び考察

3.1 バッチ法による電極作成条件の検討

バッチ法を用いて、電極の作成条件及び測定条件を検討した。応答特性の最も良い電極の作成条件は、Fc を 6.25 % 練り込んだカーボンペースト電極表面に酵素液を滴下し、風乾後、30 °C で GA 蒸気と 5 分間接触させて作成したときであった。測定の最適条件は、温度が 30 °C、印加電位 0.1 V のときであった。また、本電極は 35 °C で 60 日保存後も約 80% の応答を維持し、長期安定性に優れていた。

3.2 フロー法による応答特性の評価

図 1 は 10 μ M の Hm を 20 μ l ずつ 100 秒おきに連続的に添加した一例である。 I_p の変動係数は 3.6% (n=22) であった。図 2 に示したように、0.5-10 μ M の濃度範囲で I_p と Hm 濃度との間に直線性が得られ、蛍光 HPLC 法とほぼ同程度の検出下限 (0.5 μ M) が得られた。この下限値は、魚肉中に含まれる Hm 濃度の基準値 5mg/100g (抽出液濃度で 90 μ M) や、生体内でのアレルギー発症時の Hm 濃度 1-数百 μ M を十分にカバーできると考えられた。また、本センサは、Hm だけでなくドーパミン、チラミンやセロトニンに反応し、各種アミン濃度とピーク電流の間に 1-10 μ M の濃度範囲で直線関係が得られた。このことは、本センサで Hm のみを測定する場合には、蛍光 HPLC 法と同様に何らかのクリーンアップ手段を講じる必要があることを示している。

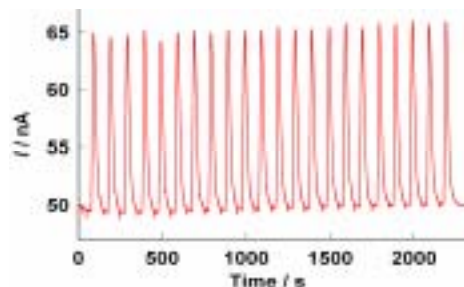


図 1 10 μ M ヒスタミン (20 μ l) の連続注入例

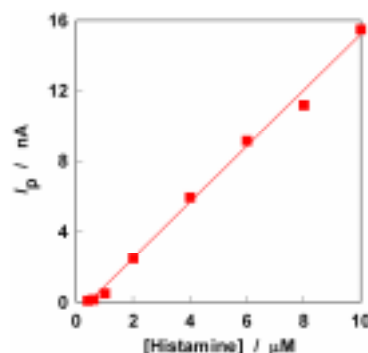


図 2 ヒスタミン濃度とピーク電流との関係

3.3 酵素電極と蛍光 HPLC 法との比較

25 °C で保存した鯖、鰹、鮪をホモジナイズ後、イオン交換樹脂でクリーンアップした試料中の Hm 量を Hm センサと蛍光 HPLC 法とで比較定量したところ、良好な相関関係が得られた ($r = 0.996$)。蛍光試薬を使う必要のある蛍光 HPLC 法では、蛍光試薬が光に不安定であることや、Hm を蛍光誘導化するために反応時間を正確に設定しなければならないという煩わしさがある。一方、今回我々が開発した方法は、蛍光 HPLC 法と同程度の検出限界である上に試料液を添加するだけなので、蛍光 HPLC 法よりも簡便であると考えられた。

4 . 結び

Fc-CP 電極表面に *A. xylosoxidans* 由来芳香族アミン脱水素酵素を固定して、長期間安定に作動する Hm センサを試作することができた。本センサと蛍光 HPLC 法を用いて魚肉中の Hm を定量したところ、両測定法の間に良好な相関関係が得られた。

文献

- 1) 藤井健夫, 山中英明 編: HACCP と水産食品, (2000) 恒星社恒星閣
- 2) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, P288(1990)
- 3) 近藤徹弥ほか: 平成 13 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, P322(2001)
- 4) 近藤徹弥ほか: 平成 14 年度日本生物工学会大会講演要旨集, P103(2002)