

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 遠藤 卓郎

平成 18 (2006) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
II. 分担研究報告書 (アニサキス編)	
1. 「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」策定とその経緯	9
1) 一般に実施されている鮮魚のアニサキス幼虫存在確認法の文献的検討	
2) 養殖魚を対象としたアニサキス幼虫検査法の検討 : 「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」作成に向けて	
3) 7県の衛生研究所担当者による「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル (案)」試行	
4) 関連資料	
2. 最近のアニサキス症発生事例の定点評価と食品混入異物の依頼鑑定にみる アニサキス幼虫の検出状況	41
3. アニサキス寄生カンパチ種苗の輸入防止のための中国および鹿児島県における カンパチ種苗育成および養殖の実態調査報告	47
1) 中国におけるカンパチ種苗の一般的育成方法	
2) アニサキス寄生が生じた原因	
3) カンパチ種苗のアニサキス寄生防止のための取り組み	
4) アニサキスの寄生したカンパチ種苗の輸入防止のための提言	
5) 中国における養殖種苗の安全性に関するアニサキス以外の懸念 《参考資料》 カンパチ種苗用のアニサキス検査法 (案) について	
4. 中国産カンパチ種苗におけるアニサキス寄生—予報	63
III. 分担研究報告書 (食品中の虫卵等編)	
1. 輸入食材からの寄生虫卵の検出方法の検討	71
1) 輸入食材からの寄生虫卵の検出方法と問題点に関する文献的検討	
2) キムチ等の回虫卵に係わる検査方法の信頼性に関する検討	
3) キムチ漬け汁中におけるブタ回虫卵 <i>Ascaris suum</i> の発育	
4) 輸入キムチから検出された回虫様卵の分子同定	
2. 食品キムチの寄生虫汚染検査法の開発	81
《資料 1》 キムチを含む数種の食品に対するクリプトスポリジウムの添加回収実験	
《資料 2》 家畜排せつ物の堆肥化-基本原理と良質堆肥生産技術について	
IV. 検査マニュアル	
1. 鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル	107
2. 別紙 アニサキス類幼虫の同定方法	113
3. 鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル・写真付き解説書	119
4. キムチ等の食品からの寄生虫卵検査マニュアル	129
V. 資料・別刷	
1. ファクトシート: 野菜等の食材を介して感染する恐れのある寄生虫・原虫類	137
2. カンパチ・キムチ問題の報道記事	161
3. 別刷	

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

総括研究報告書

輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究

主任研究者	遠藤卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部
分担研究者	川中正憲	国立感染症研究所 寄生動物部
	小川和夫	東京大学大学院農学生命科学研究科
	良永知義	東京大学大学院農学生命科学研究科

研究協力者

八木田健司	国立感染症研究所	泉山信司	国立感染症研究所
杉山 広	国立感染症研究所	森嶋康之	国立感染症研究所
荒川京子	国立感染症研究所	中井 裕	東北大学大学院
赤井紀子	香川県水産試験場	中村充志	宮崎県水産試験場
河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所	藏元 強	鹿児島県環境保健センター
吉用省三	大分県衛生環境研究センター	吉田紀美	愛媛県衛生環境研究所細菌科
絹田美苗	高知県衛生研究所	宮坂次郎	熊本県保健環境科学研究所
藏元 強	鹿児島県環境保健センター	砂原千寿子	香川県環境保健研究センター
荒木 潤	目黒寄生虫館	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所

概 要

アニサキス種苗生産に係る現況： 中国における主たるカンパチ種苗育成場は海南島で、当地の種苗生産業者および輸出入業者からの聞き取り調査と養殖場への立入調査により以下の点が明らかとなった。

1. 中国産カンパチ種苗は3月中旬まで海南島で育成され、その後、海水温の上昇にあわせて、広東省さらには福建省沿岸へと移動しながら育成され、それぞれの場所から日本に輸出される。
2. 海南島では生産者に対して輸出入業者からアニサキス問題への徹底対応が強い要請がされ、冷凍餌/ペレットへの転換が図られた結果、当地でのアニサキス汚染はほとんど排除されたと判断される。
3. 広東省、福建省においても同様の対応がとられているとの回答は得たが、これらの省への査察が必要である。
4. 広東省中山大学と広東省水産養殖病害防除中心とによりアニサキスを含む養殖魚介類の安全性確保に向けた共同研究が計画されている。日本政府からの要請を受けた当地検疫局のアニサキス問題への関心は高く、広東省近隣の登録生産者を集めて研修会を開催し、冷凍餌への転換を指導している。
5. 当該査察者は輸出検査に当たってアニサキスを検査項目に追加すべきであることを提案した。

一方、わが国の状況は

1. 鹿児島県において一部カンパチ種苗の養殖がされているが、県はその詳細を把握していない。
2. 現在、一部の種苗輸入業者と生産者間で種苗代金の支払いをめぐる訴訟が起きている。
3. 一部の水産業者はアニサキス問題への対応としてカンパチ・フィレの急速冷凍施設を建設した模様で、これまでのサシミ用商材としての流通がほとんどであったが、今後、冷凍フィレとしての流通が広がる可能性がある。

アニサキス検査法：

1. 輸入を含む種苗の移動に際してのアニサキス検査の普及に寄与すべく、検査手順書をまとめた。アニサキス幼虫は魚種によって寄生部位が異なることが指摘されており、中間種苗として輸入される魚種における寄生虫の体内分布の結果を反映させた検査指針を作成した。
2. カンパチ中間種苗に寄生するアニサキスの分類に向けて ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領域の塩基配列を決定した。その結果、本種は、イタリアでヒトへの健康被害が報告されている、*Anisakis pegreffii* と同定された。しかし、ヨーロッパの *A. pegreffii* とは 5.8SrRNA に 2 塩基の違いが認められることから、分類についてはさらに詳細に検討する必要があると考える。また、産地、感染海域等に関する traceability を担保するための研究を進めている。
3. 昨年中国産中間種苗由来の国内養殖カンパチのアニサキス汚染は、鹿児島、宮崎、熊本、大分、愛媛、香川、高知の 7 県で発生し、食品衛生の立場から養殖魚のアニサキス検査が公的機関に求められる可能性があり、鮮魚の効率的なアニサキス検査手法の確立と普及が求められている。米国 FDA の検査手法をもとに、香川と宮崎の県水産試験場の協力を得て検査マニュアルの作成を企図した。策定された「検査マニュアル」(案)の有効性を検証するために、上記 7 県の衛生研究所へ検査用器材を供与した上で「マニュアル」に沿ったスパイク試験を実施した。
4. 国内、国外で使用されている鮮魚からのアニサキス幼虫存在確認法について、文献的に検討した。わが国でのアニサキス症の発生事例についての報告は 1990 年頃までは盛んに行われてきたが、最近では学会での口頭報告も減り実際の発生状況の推定が困難な状況にある。そこで、定点病院でのアニサキス発生事例の推移について調査し、併せて、消費者から食品中の異物鑑定依頼として持ち込まれるアニサキス汚染状況の把握を試みた。

輸入キムチの寄生虫卵・原虫汚染対策

今回のキムチの寄生虫卵等による「汚染騒動」は中国－韓国間で勃発したものであるが、わが国においても輸入実績があることから汚染実態把握等の緊急対応が求められたところである。

- 1 当該研究では寄生虫・原虫汚染に係る迅速・簡便な検査法の改良・開発を行い、手順書としてまとめた。その基本的な手順は以下の通りである。
 1. キムチ (300g) を多量 (5L) の界面活性剤溶液で洗浄
 2. 洗浄液の遠心濃縮 (連続遠心法)
 3. 沈渣の部分精製 (高比重液による遠心浮遊法)
 4. 鏡検 (厚層塗抹法)

上述のように、当該方法では多量の液で検体を洗浄することで回収効率を保障し、連続遠心機 (30 万円程度) を用いることで濃縮作業の迅速化を図っている。また、キムチ

の洗浄液から得た沈渣には多量の植物残渣が含まれることから、通常の顕微鏡観察では標本枚数が多くなり、観察に要する時間がきわめて長くなる恐れがある。この問題の解決には厚層塗抹法を用いることで解決した。厚層塗抹法は、グリセリンに浸漬した厚手のセロファンを多量の検体（沈渣量として80 μ L程度）の上に被せて上から適宜圧偏し、グリセリンの浸透を待ってから（約20分）観察する方法で、もともと検便で回虫卵を観察するために開発された手法である。

クリプトスポリジウム等原虫類の検査は、上記の回虫卵要の標本作成の過程で得られる上清を用い、蛍光染色することで併せて行うことができる。

2 今後、輸入野菜の生産現場への技術指導（提言）の必要性があることから、安全な堆肥の作成法をまとめた。

あわせて、食品由来寄生虫・原虫症に係るファクトシートを作成した。

A. 研究目的

平成17年の夏以降、中国産中間種苗由来の養殖カンパチにおけるアニサキス幼虫寄生や韓国産及び中国産キムチ中の回虫卵汚染等、諸外国から輸入される食品等の寄生虫汚染が問題となっている。カンパチについては中国の種苗地における生産の実態把握とそれを踏まえた輸入種苗の汚染状況の把握が求められる状況にある。当該研究では、輸入稚魚および養殖カンパチを対象としたロット試験等に対応できる検査法の確立とその普及を図る。また、輸入キムチの寄生虫・原虫汚染に関しては、検査体制の充実に向けて検査方法の改良・開発を行うとともに、これまでに発生した輸入食品等の寄生虫汚染事例とその健康影響について検討し、健康影響の判断基準の設定に資すべき科学的な調査情報の充実を図る。

B. 研究の方法

中国のカンパチ種苗生産地において、養殖方法の検討からアニサキス汚染の可能性を調査するとともに、現地の監督官庁・研究機関との意見交換を行った。既存の検査方法を整理し、新たに生鮮魚に対するアニサキス検査法を開発し、その精度評価（添加・回収実験）を行った。既存のキムチを対象とした寄生虫卵・原虫オーシスト検査法の評価を行い、改善すべき点を明らかにした。この明らかにされた要改善点を踏まえ、新たに迅速で高精度の検査法を考案し、手引書にまとめた。また、平成17年10月に韓国産キムチから分離された回虫卵様の虫卵の遺伝子解析を行い、ヒト回虫卵であることを確認した。併せて、キムチ漬け汁中での回虫卵の発育の是非を検討した。参考資料として、食品由来の寄生虫・原虫症に係る情報整理、農産物生産における堆肥の熟成管理方法等をまとめた。

C. 研究の結果および考察

今般の養殖カンパチ（*Seriola dumerili*）におけるアニサキス寄生問題は、これまでの「養殖魚の安全性」をゆるがすところとなり、食の安全問題へ波及している。カンパチ

の海面養殖は、南九州や四国などで盛んで、年間5万トン程度の生産量がある。養殖カンパチの種苗のほとんどは中華人民共和国（以下、中国）から輸入されており、近年では年間約2000万尾におよんでいる。平成17年春、前年の11月から当年2月にかけて中国福建省から輸入されたカンパチ中間種苗に人体に健康被害を引き起こすアニサキスI型幼虫（以下、アニサキス）が多数、高頻度に寄生していることが判明した。これを受けて、厚生労働省は平成17年6月に該当する時期に中国から輸入されたカンパチ中間種苗に由来するカンパチは出荷前に冷凍処理などを執るよう指導を行った。これまで、アニサキス寄生が養殖海産魚で問題となった例は世界的に報告されておらず、また、20年におよぶ中国からのカンパチ種苗でのアニサキス寄生は知られておらず、今回の問題は中国におけるカンパチ種苗育成方法に変化があったことを示唆している。そこで、当該研究事業では中国におけるカンパチ種苗生産の実態を調査した。その結果の概略は以下のとおりであった。中国における種苗育成は適当な海水温（25℃を超えないように）を求めて季節を追って採捕海域である海南島から暫時北上すること、魚体の成長と共に餌として生雑魚をぶつ切りあるいは丸ごと与えていたこと（平成17年春にアニサキス寄生が発見された福建省由来のカンパチ種苗はこれに該当）、日本の指導により生餌から冷凍魚あるいはドライペレットの使用に移行していた。幸いにして、アニサキス寄生の原因がこの生餌を原因としていたことが明確であったことから、対応策は比較的容易に確立された。また、アニサキス問題の発生によって、養殖種苗輸入業者の連絡協議組織が生まれた。今回は中国産カンパチ種苗に着目して調査を行ったが、アニサキスの寄生はカンパチ以外にイサキ種苗にも知られている。また、中国で育成されたアナゴやトラフグの中間種苗にも見つかっている。これらカンパチ以外の魚種については、寄生状況の把握が進んでおらず、情報が限られている。また、輸入業者、養殖業者の認知度、意識ともに低い。今後は、カンパチ以外の魚種に対しても十分な注意を払う必要があるものと判断される。加えて、中国の海面養殖筏には多くの人間が生活しており、広東省や福建省の養殖場では他魚種用の養殖筏を含めると数万人に達するとされる。これらの養殖筏で生活する人間から発生する大小便は処理されることなく筏から海中に投棄されており、人体伝染病の観点からの検討も必要と考える。

これまでの魚肉中のアニサキス検出法は米国FDAの検査手法を基調としたもので、その原理は魚肉の機械的破碎と紫外線励起化でのアニサキスの確認である。アニサキス等の線虫類の角皮（cuticle）は励起波長波長365nm程度の紫外線によりネオンブルーの自家蛍光を発することが知られている。そこで、粉碎した魚体をUV照射下で観察し、自家蛍光を発する線虫体を検出するというものである。当該研究事業では、まず、一般に実施されている鮮魚のアニサキス幼虫存在確認法の文献的検討、次いで、養殖魚を対象としたアニサキス幼虫の存在確認方法の検討、その後に検査マニュアル案を作成した。得られたマニュアルについて全国7箇所の地方衛生研究所による試行と評価を行った。その過程で、電子レンジによる魚肉の加熱処理を行うと、魚肉の粉碎が極め絵容易とな

り、迅速化が図れることが判明した。なお、この熱処理は線虫角皮の自家蛍光強度には影響しないことが確認された。検査法マニュアルは関連情報と共に本報告書の巻末に別添として掲載した（別添1-4）。

今回のキムチの寄生虫卵等による「汚染騒動」は中国－韓国間で勃発したものであるが、わが国においても輸入実績があることから汚染実態把握等の緊急対応が求められた。得られた成果として、回虫卵はキムチ等の漬物の中でも発育し感染性を持つに至ること、他の研究班により輸入キムチより分離された虫卵を入手し、遺伝子解析によってヒト回虫の虫卵であることを確認した。次いで、これまでの虫卵検査法は迅速性に欠け、検出力も不十分であることを検証した。そこで、新たにキムチ等の食材を対象とした虫卵等の検査法の開発を行った。基本的に、虫卵等の検査は洗浄・濃縮・分離・精製・鏡検という工程をとる。当該研究では、夾雑物の量を減らすために密度勾配遠心沈殿法を採用したこと、これにより厳密な比重調整を行えば原虫類のシスト/オーシストの検出にも適用可能であること、顕微鏡標本の作成方法として厚層塗抹法を適用することで食材から生ずる多量の沈渣（夾雑物）を含む検体を迅速に処理することが可能とした点に特徴がある。これにより、検出率の著しい向上と検査時間の大幅な短縮を可能とした。ちなみに、厚層塗抹法は、グリセリンに浸漬した厚手のセロファンを多量の検体（沈渣量として80 μ L程度）の上に被せて上から適宜圧偏し、グリセリンの浸透を待ってから（約20分）観察する方法で、もともと検便で回虫卵を観察するために開発された手法である。当該検査法は巻末に別添として収載されている（別添5）。併せて、食品に由来する寄生虫・原虫症のfact sheetを作成し、これらの疾患への啓発に努めた。また、輸入野菜の生産現場への技術指導（提言）の必要性があることから、安全な堆肥の作成法をまとめた。

D. 結論

アニサキス種苗生産に係る現況： 中国における主たるカンパチ種苗育成場は海南島で、当地の種苗生産業者および輸出入業者からの聞き取り調査と養殖場への立入調査により以下の点が明らかとなった。

1. 中国産カンパチ種苗は3月中旬まで海南島で育成され、その後、海水温の上昇にあわせて、広東省さらには福建省沿岸へと移動しながら育成され、それぞれの場所から日本に輸出される。
2. 海南島では生産者に対して輸出入業者からアニサキス問題への徹底対応が強い要請がされ、冷凍餌/ペレットへの転換が図られた結果、当地でのアニサキス汚染はほとんど排除されたと判断される。
3. 広東省、福建省においても同様の対応がとられているとの回答は得たが、これらの省への査察が必要である。
4. 広東省中山大学と広東省水産養殖病害防除中心とによりアニサキスを含む養殖魚介類の安全性確保に向けた共同研究が計画されている。日本政府からの要請を受け

た当地検疫局のアニサキス問題への関心は高く、広東省近隣の登録生産者を集めて研修会を開催し、冷凍餌への転換を指導している。

5. 当該査察者は輸出検査に当たってアニサキスを検査項目に追加すべきであることを提案した。

一方、わが国の状況は

1. 鹿児島県において一部カンパチ種苗の養殖がされているが、県はその詳細を把握していない。
2. 現在、一部の種苗輸入業者と生産者の間で種苗代金の支払いをめぐる訴訟が起きている。
3. 一部の水産業者はアニサキス問題への対応としてカンパチ・フィレの急速冷凍施設を建設した模様で、これまでのサシミ用商材としての流通がほとんどであったが、今後、冷凍フィレとしての流通が広がる可能性がある。

アニサキス検査法：

1. 輸入を含む種苗の移動に際してのアニサキス検査の普及に寄与すべく、検査手順書をまとめた。アニサキス幼虫は魚種によって寄生部位が異なることが指摘されており、中間種苗として輸入される魚種における寄生虫の体内分布の結果を反映させた検査指針を作成した。
2. カンパチ中間種苗に寄生するアニサキスの分類に向けて ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領域の塩基配列を決定した。その結果、本種は、イタリアでヒトへの健康被害が報告されている、*Anisakis pegreffii* と同定された。しかし、ヨーロッパの *A. pegreffii* とは 5.8SrRNA に 2 塩基の違いが認められることから、分類についてはさらに詳細に検討する必要があると考える。また、産地、感染海域等に関する traceability を担保するための研究を進めている。
3. 昨年中国産中間種苗由来の国内養殖カンパチのアニサキス汚染は、鹿児島、宮崎、熊本、大分、愛媛、香川、高知の 7 県で発生し、食品衛生の立場から養殖魚のアニサキス検査が公的機関に求められる可能性があり、鮮魚の効率的なアニサキス検査手法の確立と普及が求められている。米国 FDA の検査手法をもとに、香川と宮崎の県水産試験場の協力を得て検査マニュアルの作成を企図した。策定された「検査マニュアル」(案)の有効性を検証するために、上記 7 県の衛生研究所へ検査用器材を供与した上で「マニュアル」に沿ったスパイク試験を実施した。
4. 国内、国外で使用されている鮮魚からのアニサキス幼虫存在確認法について、文献的に検討した。わが国でのアニサキス症の発生事例についての報告は 1990 年頃までは盛んに行われてきたが、最近では学会での口頭報告も減り実際の発生状況の推定が困難な状況にある。そこで、定点病院でのアニサキス発生事例の推移について調査し、併せて、消費者から食品中の異物鑑定依頼として持ち込まれるアニサキス

汚染状況の把握を試みた。

輸入キムチの寄生虫卵・原虫汚染対策

今回のキムチの寄生虫卵等による「汚染騒動」は中国－韓国間で勃発したものであるが、わが国においても輸入実績があることから汚染実態把握等の緊急対応が求められたところである。当該研究では寄生虫・原虫汚染に係る迅速・簡便な検査法の改良・開発を行い、手順書としてまとめた。その基本的な手順は以下の通りである。

1. キムチ (300g) を多量 (5 L) の界面活性剤溶液で洗浄
2. 洗浄液の遠心濃縮 (連続遠心法)
3. 沈渣の部分精製 (密度勾配遠心沈殿法)
4. 鏡検 (厚層塗抹法)

上述のように、当該方法では多量の液で検体を洗浄することで回収効率を保障し、連続遠心機を用いることで濃縮作業の迅速化を図った。また、キムチの洗浄液から得た沈渣には多量の植物残渣が含まれることから、顕微鏡標本作成には厚層塗抹法を採用した。クリプトスポリジウム等原虫類の検査は、上記の回虫卵要の標本作成の過程で得られる上清を用い、蛍光染色することで併せて行うことができる。

今後、輸入野菜の生産現場への技術指導 (提言) の必要性があることから、安全な堆肥の作成法をまとめた。あわせて、食品由来寄生虫・原虫症に係るファクトシートを作成した。

E. 危害情報

なし

F. 報告

1. 論文報告

1. 川中正憲、荒木潤. アニサキス症－発生状況とその予防－食品衛生研究、56:17-22, 2006.
2. 川中正憲、杉山広、森嶋康之、荒川京子、カンパチなど養殖魚に寄生したアニサキス幼虫とその検査法について. 食品衛生研究、56:23-34, 2006.

2. 学会報告

なし

G. 特許

なし

分担研究報告書（アニサキス編）

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
分担研究報告書

「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」策定とその経緯

分担研究者	国立感染症研究所寄生動物部	川中正憲
研究協力者	国立感染症研究所寄生動物部	杉山 広
同	国立感染症研究所寄生動物部	森嶋康之
同	国立感染症研究所寄生動物部	荒川京子
同	宮崎県水産試験場	中村充志
同	香川県水産試験場	赤井紀子
同	鹿児島県環境保健センター	藏元 強
同	宮崎県衛生環境研究所	河野喜美子
同	愛媛県衛生環境研究所	吉田紀美
同	大分県衛生環境研究センター	吉用省三
同	熊本県保健環境科学研究所	宮坂次郎
同	高知県衛生研究所	絹田美苗
同	香川県環境保健研究センター	砂原千寿子

研究の要旨：平成 16 年秋以降に中国から輸入した中間種苗由来の国内養殖カンパチからアニサキス幼虫が高頻度で認められた。食品衛生の立場から、養殖ロット毎に寄生状況を調査する為に多数の養殖魚を対象とした効率的で精密な試験法が必要となった。そこで、国内外で実施されている鮮魚のアニサキス幼虫存在確認法の文献的検討を行ったところ、現在まで国内では行われていないが米国やカナダで実施されている UV 照射による検査法の導入が図られる事になった。宮崎と香川の水産試験場の協力を得て検査手順の検討を行い「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル（案）」を作成した。その上で、九州・四国 7 県の地方衛生研究所において、同マニュアル案に基づいた検査を試行することで、「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」を策定した。その経緯と成果について述べる。

1. 一般に実施されている鮮魚のアニサキス幼虫存在確認法の文献的検討

A. 研究目的

平成 17 年に、中国産中間種苗由来の国内養殖カンパチ及びイサキの一部からアニサキス幼虫（以後アニサキスと称する）が高頻度で認められた。該当する養殖カンパチは 200 万尾にも達したが、これらは鹿児島、宮崎、熊本、大分、愛媛、香川、高知の 7 県で育成さ

れていたものである。この時点における養殖魚のアニサキス調査は各県の水産試験場で実施された。調査方法は、水産試験場によって必ずしも同じではないが、おおむね従来から行われていた方法に則って行われた。即ち、各県の養殖生簀からカンパチ 10 尾程度を単位として採集し、解剖して腹腔と諸臓器及び筋肉のアニサキス寄生状況が検査された。更に可食部の魚肉検査は、筋肉を定幅でスライスして目視するか、筋肉をガラス板にはさみ

圧縮して光源にさらして目視する方法が採られた。その結果、合計 729 尾のうちアニサキスは 329 尾(45.13%)には腹腔・内臓での寄生が認められ、1 尾(0.13%)のみ筋肉から検出されたとの成績がまとめられた(平成 17 年 6 月 15 日、食安監発第 0615001 号)。

アニサキス幼虫の存在確認法として上述の水産試験場で用いられた手法を含めて、食品衛生監視という立場から評価を行うために、国内、国外で使用されている鮮魚からのアニサキス幼虫存在確認法について文献的に検討した。

B. 研究方法

文末文献に挙げた論文、検査指針及び米国 FDA やカナダ政府の公定検査法等について検討を行った。

C. 研究結果

1. 従来から我国で行われている鮮魚のアニサキスの存在確認法：

我国でのアニサキスの存在確認法については、「食品衛生検査指針」(微生物編、厚生労働省監修、日本食品衛生協会、2004、pp536～538)に記述がある。即ち、(a) 直接観察 (b) ガラス板を用いた圧平法 (c) 人工消化液による虫体の検出分離法、及び (d) キャンドリング法がそれである。キャンドリング法とは、ガラス板上にフィレーを載せ、その上方あるいは下方から光を通して、反射あるいは透過光で観察する方法である。これらの他に、養殖魚の筋肉部分のアニサキス汚染を検査する目的で、手作業で肉部を少しずつちぎって精査し虫体を 1 隻ずつ採取するといった方法⁴⁾や、魚肉を定幅(5mm 以下)でスライスして下から光源を当てたガラス板に置いて目視という方法(一種のキャンドリング法)³⁾が実際に行われ、それによる検査結果が報告されている。一般に検査対象であるアニサキスは 1～4 cm もの大きさであるので、どの検査手法を採用したとしても労力と時間を惜しまなければ、その存在の有無を確かめることは可能

である。しかしながら、検査すべき対象魚が多い場合、代表的な方法である「ガラス板を用いた圧平法」は意外な労力を必要とし、「人工消化液による虫体の検出分離法」は、調査魚肉を収容できる容器や恒温で収納する空間確保と消化時間の確保が必要になるという問題点があることは従来から指摘されていた⁵⁾。一方、キャンドリング法に関しては、国内向けの鮮魚の検査法としては必ずしも用いられておらず、欧米向け輸出用「フィッシュ・ブロック」等の製造時に実施することになっている^{7) 8)}。

2. 米国及びカナダのアニサキス公定検査法：

米国やカナダ等では、アニサキスの衛生上の有害性が明確でなかった時代より、消費者に与える嫌悪感を除くために、タラなどのフィレーから寄生虫の除去が積極的に図られてきた。わが国では、今日に至るまで馴染みが薄いと思われるキャンドリング法(candling method)⁹⁾が、これらの国ではアニサキス等寄生虫の検出法及び除去法として、新鮮魚肉及び冷凍魚肉に広く応用されてきた。1960 年代にはキャンドリング法を容易に行うためのスライス機(Slicing machine)が考案¹⁰⁾されて寄生虫除去に効果を挙げた。また、1970 年には、長波長の紫外線(360nm)によりアニサキス虫体が鮮青白色の蛍光を発して検出し易くなるとの知見が得られ¹¹⁾、この事実を利用してアニサキス検査が行われるようになった。米国、カナダでの検査マニュアルでは、白色光での検査とともに紫外線ランプ(落射光、透過光)を用いた検査法が示されている。米国 FDA と、カナダで実施されている魚を対象としたアニサキス等の寄生虫検査マニュアルは次のような項目からなっている。

①米国 FDA の検査マニュアル¹²⁾

①-1 キャンドリング(光透過)法

①-2 圧平キャンドリング法

①-3 アニサキス検出を主目的としたキャンドリング法のための機械的粉碎と沈殿法

② カナダの公定検査マニュアル¹³⁾

②-1 非破壊検査法としてのキャンドリング

②-2 エリューション法 (ピンチコック付きの大型漏斗の内側に金網ふるいを用意する。ふるいの上に魚肉を置き生理食塩水で満たし室温で16~18時間放置する。生きているアニサキスが存在した場合は魚肉からふるいを通して漏斗の下部に移行するので、ピンチコックを開けて虫体を回収する。)

②-3 人工胃液による消化法

D. 考察

アニサキスの検出方法については、検査の目的、対象魚の種類、個体の大きさ、検体数などを考慮して選択する事が必要となる。7県の水産試験場によって採用された方法は、基本的には従来からわが国で実施されていた (a) 直接観察 (b) ガラス板を用いた圧平法のみであった。食品衛生の立場からは、特に魚肉部分のアニサキスの寄生状況が問題となる。魚肉部の検査は、ガラス板を用いた圧平法によっている。実際のところ腹腔や内臓にアニサキスの寄生が認められるカンパチで、どの程度の頻度で魚肉部分へもアニサキスの寄生拡大があるのかという問題は、今回の調査では必ずしも明らかではない。しかしながら、検査に供されたカンパチ全ての魚肉部が検査された結果ではないにも拘らず、1尾の魚肉部分からアニサキスが検出された意味は大きい。今回のカンパチ問題は、食品の衛生的監視の立場から同一条件で飼育された養殖魚を一群として取り扱い、その群全体のアニサキス汚染の有無を検査する必要が生じたという意味で新しい課題であると考えられる。

E. 結論

これまでに述べた「中国産中間種苗由来養殖カンパチのアニサキス幼虫寄生」問題を処理する過程で従来のアニサキス幼虫検査法では対処できない課題が提起された。即ち、個別の魚のアニサキス検査というよりも、統計

学的に有意な数の養殖魚を生簀から抜き取り、当該ロットについて特に可食部である魚肉にアニサキスの寄生が無いということを示しうる検査手法を確立することが必要である。しかし、従来からわが国で実施されていた方法では多数検体を対象にした検査には対応することができず、米国 FDA やカナダの公定法を参考として新規の手法を開発する必要があると考えられた。

F. 文献

1. アニサキス幼虫の食品衛生学的研究□1. アニサキス幼虫の分離検出法、日水誌、37, 186-191 (1971) 大石圭一、岡重美ら
2. 食品中の存在確認法、平沖道治、岡重美、「魚類とアニサキス」日本水産学会編 (1975)
3. 食品衛生検査指針 (1990年) 厚生省生活衛生局監修、399-403
4. 輸入生食用サケ等の寄生虫感染に関する考察について、食品衛生研究 46(6), 51-59, (1996) 新妻淳、樋口修一ら
5. Possibility of anisakid larvae infection in farmed salmon, Fisheries Science, 66, 1049-1052 (2000)
6. 食品衛生検査指針 (2004年) 厚生労働省監修、536-538
7. フィッシュ・ブロック製造時における寄生虫対策、城所清一、「魚類とアニサキス」日本水産学会編 (1975)
8. 「対 EU 輸出水産食品の取り扱い要領」 (平成7年7月5日付け、厚生省生活衛生局長通知)
9. H.E. Power: J. Fish. Res. Bd. Canada, 15, 537~542 (1958)
10. H.E. Power: J. Fish. Res. Bd. Canada, 18, 137~140 (1961)
11. J.H.C. Pippy: J. Fish. Res. Bd. Canada, 27, 963~965 (1970)
12. Bier, J.W et al. Parasitic animals in foods. In FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition/1995, 19.01-19.08 R.L.Merker

- (Ed) AOAC International, Gaithersburg, MD
13. Gov of Canada, Isolation and identification of anisakid roundworm larvae in fish. (1995) <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.
 14. 食品衛生検査指針 (2004 年) 厚生労働省監修、560-563

2. 養殖魚を対象としたアニサキス幼虫検査法の検討：「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」作成に向けて

A. 研究目的

昨年中国産中間種苗由来の国内養殖カンパチのアニサキス汚染問題を契機として、養殖魚を対象としたアニサキス幼虫存在確認法を策定することが必要となった。特に、可食部の魚肉中におけるアニサキスの有無が問題となる。そこで、米国 FDA の検査手法にある「魚肉の機械的破碎と紫外線(UV)照射によるアニサキスの存在確認法」をもとに「検査マニュアル」の作成を企図した。

B. 研究方法

米国 FDA の検査手法をもとに、「中国産中間種苗由来養殖カンパチのアニサキス幼虫検査法概要(案) 2005,09,22」(資料1)及び「同追加 2005,10,21」(資料2)を、国立感染研の本稿分担研究者が作成し、香川県水産試験場(以後水試と称す)及び宮崎県水試に提示した。両水試においては、提示された検査手法が統計学的に有意とされる検査個体数(1ロット2,000尾以上の群であれば60尾以上)を効率的に検査しうるかどうかについて検討が加えられ、再び本稿分担研究者との協議が行われた。

C. 研究結果

感染研から示した手法に関して両水試で検討が行われる過程で、香川水試により筋肉部の前処理工程に「筋肉を加熱したのち粉碎す

る方法(仮に加熱法という)¹⁾」を、追加したい旨の提案がなされた。即ち、筋肉部を電子レンジにて加熱したのち粉碎し、粉碎した筋肉片に水を加えて懸濁させ、UV照射による虫体の確認を試みたところ、筋肉と虫体の区別が容易であり、また筋肉の残渣による干渉が極めて少ないことが判った(資料3、4)、と云うものである。この提案を受け、感染研にて追試を行なったところ、加熱時間、虫体の分離方法等に検討課題が残るものの、加熱処理することで魚肉部の前処理を省力化できること、ならびに加熱後もアニサキス虫体は紫外線照射による蛍光観察が可能であることが確認された。そこで、宮崎水試に対してもこの「加熱法」による検査手法を伝え、両県で検査すべき養殖カンパチは、この新手法を組み込んで実施される事となった。両水試で実施された具体的な手法は「香川水試による検査手法」(資料5)と「宮崎水試による検査手法」(資料6)とに示した。この手法によって実施された養殖カンパチのアニサキス検査の結果は「中国産中間種苗由来養殖カンパチのアニサキス幼虫寄生に対する食品安全対策に係る検討会」(平成17年11月17日開催 <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/11/txt/s1117-2.txt>)に提出されたが、いずれも「アニサキスの寄生は確認できなかった」とするものであった。

これらの検査結果は「検討会」で承認されたが、両水試の検査手法には幾つかの相違する点があったことから、この検査法の標準化を進めるためには今後の更なる検討が必要であるとの指摘(05/11/17、議事録)があった。

この指摘を受けて、(1)内臓部の消化法、(2)筋肉部の加熱法、各々について検討課題を挙げ(資料7)、それぞれについて両水試ならびに感染研において検討を行った。得られたデータ(資料8、9)等をもとに、細部の実験条件を決定し(表1)、本稿分担研究者らにより「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル(案)及び別紙」を取りまとめた。

D. 考察

表1 マニュアルの検討課題と結論

区分	検討課題	実施機関	結論
1. 消化法			
消化操作	消化するサンプルの大きさは？	宮崎水試	20g程度の大きさならば、間歇的な攪拌であつても9時間で消化可能
	ペプシン濃度の虫体への影響は？	宮崎水試	消化時間の延長による虫体の損傷はない
	濃度を上げる事で消化時間の短縮は可能か？	感染研	1%までが現実的な濃度として可能
虫体の回収	メッシュとデカンテーションどちらが効果的？	宮崎水試	メッシュによる回収とする
2. 加熱法			
前処理	電子レンジで処理する時の適当な大きさは？	香川水試 宮崎水試	1切を約50-60gとする
加温時間設定試験	大きさに見合った電子レンジ処理時間は？	香川水試	加熱完了を確認し、不十分な場合は途中で反転する
	加熱による虫体への影響は？	宮崎水試	魚肉の加熱に要する時間内であれば、影響は認められない
加温後の粉碎処理法	虫体が破壊されぬ、適切な方法は？	感染研	プラスチック刃を装着し、最大1分間攪拌
	フードプロセッサ処理は必要か？	感染研	手作業による操作では、魚肉の均一な破碎はできない
粉碎サンプルの洗浄	虫体を見やすくする洗浄法は？	感染研	不織布ごと、温水の入ったビーカーに浸し、静かに攪拌する操作を繰返す
	デカンテーションは有効か？	感染研	容器が必要となること、沈殿するまで時間を要すること、などにより適切ではない

米国 FDA の検査手法にある「魚肉の機械的破碎と紫外線照射によるアニサキスの存在確認法」は、検討の結果、魚肉の電子レンジによる加熱処理という重要な工程が加えられる事となった。実際、新鮮なカンパチの筋肉は、プラスチック刃によるフードプロセッサでは破碎し難い。金属刃による破碎は容易であるが、アニサキス虫体をも細切るので筋肉と虫体とを識別する前処理法としては使用することが出来ない。そこで、電子レンジによる加熱処理を試みたところ、極めて短時間で容易に筋肉をほぐすことが可能であり、水で懸濁した際の濁りが少ないというメリットもあつて前処理が短時間で完了する。UV

照射の下で検出されるアニサキス虫体の蛍光に関しては、新鮮虫体よりも冷凍処理後の虫体が強い蛍光を発することは知られていた²⁾。更に今回の検討で、加熱処理後もアニサキス虫体は生鮮時と変わらない蛍光が認められることが確認され、この性質を利用すると魚肉部分の検査を実施する上で極めて効率的であることが確認された。

E. 結論

昨年中国産中間種苗由来の国内養殖カンパチのアニサキス汚染問題を契機として、香川水試、宮崎水試との共同研究により「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル(案)」をま

とめた。

F. 文献

1. 赤井紀子、長野泰三、マイクロ波加熱を利用したブリ族魚類筋肉中のアニサキス幼虫の検出法、香川県水産試験場研究報告、8（印刷中）
2. H.E. Power: J. Fish. Res. Bd. Canada, 18, 137~140 (1961)

3. 7県の衛生研究所担当者による「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル（案）」試行

A. 研究目的

前章による検討結果を基に「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル（案）」（以下、マニュアル案）を策定したが、これを最終稿とする前に、マニュアルによる検査操作上の不都合や、その他の実施上の問題点を洗い出す必要があり、そのためには策定に関っていない第三者の試行が必要と判断した。そこで、（1）このマニュアル案に従って検査を実施した場合に生じる問題点を予め把握し最終稿に反映させる、（2）当該検査法はアニサキス検査法としてはわが国での実施経験のない新規の検査法であるため周知を兼ねて機材その他一式を提供し実地に検査手法を体験してもらう、ということの主たる目的として、第三者機関に検査の実施を依頼することとした。研究協力の要請は、昨年カンパチ問題が生じたことから今後検査実施の可能性があるとと思われる7県、すなわち鹿児島、宮崎、熊本、大分、愛媛、香川、高知の各県の衛生研究所（衛研）に対して行い（資料10）、いずれからも担当者の快諾を得た。検査の実施は、アニサキス幼虫の寄生のない魚肉に、別途採取しておいた一定数のアニサキス虫体を埋め込み、所定の手順に従って検出操作を実施して検出数を確認する、いわゆるスパイク試験によった（資料11-1）。

B. 研究方法

香川、宮崎両県の水産試験場及び感染研において操作条件を検討して策定したマニュアル案に従って、7県の衛研にてスパイク試験を実施した。

実施に先立って、衛研に常設のない必要機材を搬送し（資料11-2~3）、また被検魚として用いるカンパチは各衛研の試験実施日に合わせて宮崎水漁連から送付するよう手配した（資料11-4）。スパイク試験に用いるアニサキス幼虫（資料14）は、予め感染研において市販の九州産のサバから採取したものを、写真付マニュアル案（資料15）とその他資料一式（資料12）とともに送付した。

スパイク試験は、被検魚を筋肉部と内臓とに分け、（1）筋肉部は加熱法によって前処理したのちUV照射により虫体の検出操作をする、（2）内臓は消化法によって前処理したのち虫体の検出操作をする、という手順によって実施した。

各衛研にてマニュアル案に沿って試験を実施したのち、試験結果を所定の用紙（資料16）に記入し、またその実施体験をもとにマニュアル案への提言やコメント、別途の操作法についての提案があればそれらを報告書（資料15）に纏めた上で、感染研で取り纏めを行った。

C. 研究結果

カンパチを用いたアニサキスのスパイク試験の結果を表2に示した。筋肉部からの回収率は73~100%を示し、平均は88%であった。また、内臓の消化法による試験では、何れの機関でも80~100%という高い回収率を示した。

表3に衛研担当者から提出された報告書等の内容をまとめた。今後のアニサキス幼虫検査実施の可能性については、3機関が、要請があれば実施するとしている。また、これを機に検査法の確立を図りたいとした機関も2ヶ所あった。

表2 7衛研におけるカンパチ/アニサキスのスパイク試験成績

実施 機関	従事 人数	筋肉部				内臓			
		切身 重量	スパイク試験			消化 所要時間	スパイク試験		
			埋込 虫体数	回収 虫体数	回収率		添加 虫体数	回収 虫体数	回収率
(g)	(%)	(h)	(%)	(%)					
A	2	334	15	14	93	4:00	10	9	90
B	5	261	15	13	87	3:20	10	10	100
C	2	300	15	12	80	3:32	10	9	90
D	2	290	15	- *	-	3:00	10	9	90
E	3	300	15	14	93	3:00	5	5	100
F	2	368	15	15	100	5:00	10	10	100
G	3	419	15	11	73	4:00	10	8	80
平均値					88	3:41			93

*：フードプロセッサの金属刃使用により虫体粉碎し計測不可

試験操作法及びマニュアルに対する提言&コメントについては、加熱破碎処理した筋肉をさらに消化すれば沈渣が減って、虫体の検出が楽になるという提言が最も多く、3件あった。

実施しての感想については、UV照射によるアニサキスの観察は貴重な体験だったというものが多かった。また初体験の操作法によるスパイク試験なので、操作を慎重にやる必要性を感じた、という感想も複数あった。

D. 考察

マニュアル策定上の最大の要件は、指定した操作によりカンパチの筋肉部からアニサキス幼虫を確実に検出できるかどうか、ということであった。この点については、すでに宮崎、香川の両県水試における実績があったが、これまでにアニサキス幼虫検査実績のない7ヶ所の衛研において実施した試験においても、筋肉部からの回収率は73~100%を示し、平均は88%であった。また、内臓部の寄生虫体についても、消化法により高い回収率が得られた。したがって、筋肉部からの加熱後のUV照射による虫体検出法ならびに内臓部の消化法を組み合わせた本検査法は、汎用性のある検査法であると判断した。

得られた試験結果の中に、(1) D機関では

フードプロセッサの使用法を誤り虫体の回収が出来なかったこと、(2) G機関における筋肉部からの回収率が73%と他機関に比べて低いのは電子レンジによる加熱時間が短いことから筋肉の破碎が十分でなかった可能性が考えられたこと、(3) G機関で人工消化を4時間行うも残渣が極めて多く回収率も低いのは機械的な攪拌を行わなかったことに由来すること、などの事由があった。これらは指定の操作から逸脱したことに由来するが、これらのデータからもマニュアル案を整備する上で貴重な示唆を得ることができた。

試験操作に関する衛研からの提言の中に、加熱破碎後の魚肉をさらに消化してはどうかというものが多かった。たしかに、検査サンプル量が少ない場合には、消化工程を加えることによってそのあとの検出工程は楽になる。しかし、この検査法は養殖魚のロットチェックとしての位置付けにあるため、大量のサンプルに対して消化工程を加えることは、物理的な面で無理があると判断し、マニュアルには加えなかった。しかし、細部の運用、試験法の組み合わせなどにはまだ工夫の余地があり、各実施機関での創意工夫にゆだねたい。

近年農林水産省の肝いりもあり、養殖魚の生産トン数は増加の一途をたどっていると報ぜられている。このような現状の中、養殖魚

表3 衛研報告書のまとめ

項目	コメント	該当件数
衛研におけるアニサキス幼虫検査実施の可能性	事例があれば行う	3
	検査法の確立を検討したい	2
	実施できるか検討したい	1
	大型魚の検査は困難。検査部位が限定されれば可能	1
試験操作法に関する提言&マニュアルに対するコメント	加熱後破砕処理した筋肉に「消化」工程を加え沈渣を減らす	3
	陰性と判定するための有効検査数をどのように決めるか検討が必要	1
	サンプル懸濁液から虫体を釣上げるための器具の提案	1
	マニュアル最終稿にも写真の添付があれば理解しやすい	2
	目視によるスクリーニングに重点を置く試験法は可能か	1
感想	VU照射によるアニサキスの観察という貴重な体験ができた	3
	操作を慎重にやる必要性を感じた	2
	大型魚の解体は困難な作業だった	1
	スパイク試験での回収率が低くショックだった	1
	実際に操作を行うことで全体の流れが掴め細部の検討ができた	1
	検査自体は慣れれば操作の迅速化が可能だが、UVの目への負担が大きい	1
	実際の寄生状況を把握していないため検査のポイントがつかみにくかった	1
	本マニュアル案が迅速で効率のよい試験法であるかについては疑問だ	1

のアニサキス汚染に関する監視の必要性があらためて認識されており、これは今回のスパイク試験に参加した7衛研のうち、半数近くが本庁からの要請があればアニサキス検査を実施することからもうなずける。本検査法が、今後のアニサキス汚染監視のための有効な手段となることを希望する。

E. 結論

香川と宮崎両県の水産試験場との共同研究によりまとめた「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル(案)」に従って、7県の衛研でカンパチを用いたスパイク試験を実施した。得

られた試験結果と報告書をもとに、試験法ならびにマニュアルの記述についての修正ならびに加筆を行い、「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」をまとめた。

F. 研究発表

川中正憲、杉山広、森嶋康之、荒川京子、カンパチなど養殖魚に寄生したアニサキス幼虫とその検査法について、食品衛生研究、56巻6号、23-34(2006)

4. 「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」策定とその経緯 関連資料

- 資料1：中国産中間種苗由来養殖カンパチのアニサキス幼虫検査(案) 05,09,22
- 資料2：中国産中間種苗由来養殖カンパチのアニサキス幼虫検査法概要（案）・追加
- 資料3：カンパチのアニサキス検査について（香川県水産試験場）
- 資料4：カンパチ筋肉のアニサキス幼虫簡易検査法（案）（香川県水産試験場）
- 資料5：香川県水産試験場の検査手法
- 資料6：宮崎県水産試験場の検査手法
- 資料7：検査法検討事項
- 資料8：検査法検討報告書（香川県水産試験場）
- 資料9：検査法検討報告書（宮崎県水産試験場）
- 資料10：協力研究依頼書（研究協力者所属機関の長宛）
- 資料11-1～4：試験実施スケジュール等に関する連絡文書（協力研究者宛）
- 資料12：スパイク試験実施に係る送付書（研究協力者宛）
- 資料13：試験実施報告書の作成依頼文書（研究協力者宛）
- 資料14：「送付アニサキス幼虫」の取扱説明書
- 資料15：「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル（案）」
- 資料16：アニサキス検査記録用紙

資料1、中国産中間種苗由来養殖カンパチのアニサキス幼虫検査 05,09,22

当該カンパチのアニサキス幼虫

農林水産省から示された資料（05,06,15）によれば、当該カンパチの解剖結果によるアニサキス幼虫（以下アニサキス）の寄生部位は、可食部には極めて少なく（1/729）、大部分(329/729)が内臓及び腹腔内となっている。

原則と問題点

内臓及び腹腔内にアニサキスが発見された当該カンパチは冷凍処理が必要であり、無処理では生食用として出荷出来ない。この原則を保持した上で、当該カンパチの全個体を解体時に内臓及び腹腔の肉眼検査を実施し、その部分にアニサキスが検出されなかったカンパチについて可食部分を生食用として消費者に供給した場合、安全上問題が生ずることがないかどうかについて検討する。

検査の目的

「解体時に内臓及び腹腔の肉眼検査によってアニサキスが発見されなかったカンパチ」に関して、検査での見落としの危険性を評価しておくことが必要となる。

検査の対象

検査によって見落としの危険性が生ずるとされる「内臓或は腹腔に少数のアニサキス幼虫が寄生しているカンパチ個体」に関して、可食部（ロイン、フィレー）へのアニサキスの移行の有るか無いかに関して検討を行う。この場合、カンパチ死後のアニサキスの可食部への移行の可能性も考慮して、死後一定時間経過した魚体の検査も行う。