

## 検査の方法

魚介類におけるアニサキスの検査法については「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）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 (pp536～538)である。また、米国 FDA で用いられている検査法の翻訳(pp560～563)が示されている。

アニサキスの検査方法については、対象の種類、個体の大きさ、検査の目的、検体数などを考慮して選択する事が必要となる。今回の検査の場合、例えば重量4Kgのカンパチであれば、内臓の重量は約330g、骨、皮などを外した可食部は約1.6Kgである。これを、ガラス板を用いた圧平法で、可食部だけでも処理しようとするれば、1人の検査員で5～6時間必要となる。また、人工消化液による方法では、消化液を検体重量の10倍量を必要とするので1.6Kgの処理には37ℓの恒温槽と共に16リッターの消化液を入れる容器と攪拌装置を必要とする。更にアニサキス幼虫を分離する為に必要な消化時間として、少なくとも1～3時間は必要である。これらのことを考慮すると、今回実施される検査の効率化を計るためには、米国FDAで採用しているフードプロセッサーによる可食部の破碎法（フードプロセッサーの刃に軟性プラスチックを使用することでアニサキスの細切が避けられる）と、紫外線照射装置によるアニサキス検査法を取り入れる必要がある。

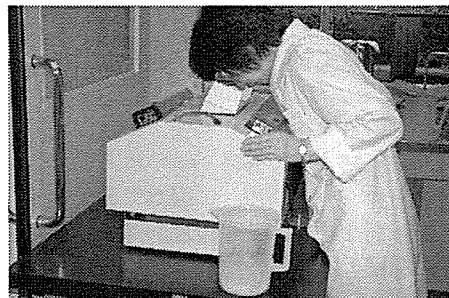
### A. 装置と器具（解体の為に用いるもの以外）

1. 蓋付フードプロセッサー
2. 卓上紫外線照射装置（波長365nm）
3. 暗箱照射装置（ブラックボックスタイプ）
4. 適切なUV防護用メガネ
5. ガラストレイ、250 x 200 x 60mm
6. プラスチックビーカー(1L, 2L, 3L, 4L)
7. 金属メッシュ
8. ガラス棒
9. ピンセット
10. 人工消化液の調整

塩酸	7 ml
ペプシン(1:10,000)	1 g
蒸留水	1,000ml
11. 恒温槽
12. スターラー及びスターラーバー
13. 虫体固定用70%エタノール
14. バイアル瓶又は標本瓶

### B. 検査の流れ

- 1、解体
- 2、内臓及び腹腔内のアニサキス検査
  - 1) 肝、胃などの表面の観察
  - 2) 肝をすり潰し、胃は切開して内部を観察する
  - 3) 腹腔全体を観察する
- 3、可食部（フィレー）のアニサキス検査
  - 1) 予め重量を測った切身や魚を軟性プラスチックの刃を装着した蓋付フードプロセッサーに入れ、重量と等量ないし2倍量までの水を加える。魚片がバラバラになる程度に1～2分間、断続的に作動させる。
  - 2) ビーカーに内容物をあけ、金属メッシュ（径 ）でろ

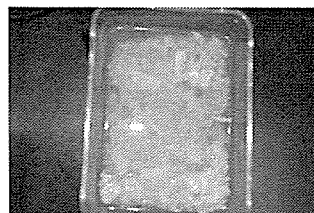
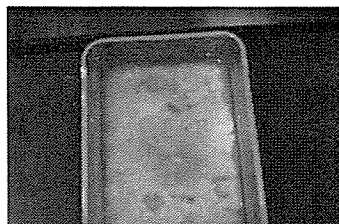


過をしてろ液を捨て、メッシュ上に残った部分を水で洗いながら全て回収する。

- 3) ガラストレーに適量の流動固形物を入れ、半透明になるまで希釈する。

検査は暗箱中の紫外線照射装置のトレイを載せ、UV防護用メガネを装着して行う。

アニサキスは青色又は黄緑色の蛍光を発する。ピンセットなどで沈殿物を攪拌しながら観察すると発見しやすい。



## 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

2005,10,21

先日送付されました水産試験場による検査データを見ると、カンパチの内臓、腹腔へのアニサキスの寄生状況には特徴的な傾向が認められるようです。例えば、スケソウダラのアニサキス検査では肝臓が重要な検査対象となるのですが、これらのデータでは肝臓からは全く検出されておらず、カンパチについてはこの臓器を特に検査するという意義は低いようです。つまりは、カンパチのアニサキスの寄生部位としては、胃袋の内外と胃組織内に殆ど集中している傾向が認められ、この部分を精査することが重要であると思われまます。

ところで、胃の組織内の検査に関しては、肝臓などと違ってガラス板による圧平法を応用する事は困難です。組織が硬い上に赤褐色をしている為に、透過光で内部を観察する事が出来ないからです。従って、誰がやっても見落としのない検査法としては、人工胃液消化によりアニサキスを組織から分離してその検出を図る方法に依らざるを得ないでしょう。例えば、4kgのカンパチで内臓の重量は300~400gですが、この程度であれば2~3Lの容器で1匹分を一挙に消化処理する事が可能であります。同時に何匹分の内臓を消化処理することが出来るのかは恒温器(水槽)の多寡に依存することになりますが、人手そのものはそれ程必要とはしません。以上のことを勘案して、多数魚体を対象として内臓及び腹腔内のアニサキスを遺漏なく検査する方法としては以下の手順がよいと思われまます。

内臓及び腹腔内のアニサキス検査

### 1、内臓及び腹腔表面の目視

- 4) 開腹し内臓全てを纏めて切除し、バット或いはトレイに移す。
- 5) 切除した後、腹腔の表面全体をくまなく観察する。
- 6) 切除した内臓のうち、肝、胃など臓器全体の表面を観察する。
- 7) 胃は切り離し切開して内部を観察する。

### 2、内臓全部(胃・腸・幽門垂・心臓・肝臓・脾臓・腎臓など)の人工胃液による消化

- 1) 胃を含む一匹分の内臓を消化し易いようにハサミなどで1~2cm角程度に切り刻み、適当な容器(ビーカー、三角フラスコ)に入れる。
- 2) 内臓の重量に対して5~10倍程度の人工胃液を注ぎ込む。
- 3) 恒温器または恒温水槽を37℃に設定し、攪拌しつつ少なくとも2時間、或いは一晚(15時間程度)消化する。

### 3、消化処理液の観察

- 1) 未消化物が多く残っている場合は、金属メッシュで濾過しメッシュ上に残った部分を水で洗い全て回収した上でアニサキスの有無を検査する。ろ液についても回収してその沈渣を調べる。必要に応じて紫外線照射装置での検査を行う。
- 2) 未消化物が少ない場合は上清を捨て、適量の水を加え更に沈渣を集めてからアニサキスの有無を検査する。

### 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）

国立感染症研究所 寄生動物部 川中正憲氏による「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（案）」および「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」について、本県水産試験場で試行し、水産試験場の施設能力、人員規模等を考慮しながら検討した。

#### 1 筋肉内への寄生の確認方法について

- 1) 「検査法（案）」では、①軟性プラスチックの刃を装着した蓋付フードプロセッサーによる粉砕、②粉砕物を金属メッシュでろ過した後、③流動固形物を半透明になるまで希釈し、④UV照射により確認する、としている。
- 2) 本県水産試験場で実施したところ、③の工程で希釈液中に懸濁物が残留し、UV照射によりアニサキス虫体と類似の蛍光を発することから、判別が難しいと判断された。  
これを防止するためには、②の工程でメッシュ上に残った残留物を数回程度洗浄する必要がある、かなりの労力と時間を要することが判明した。
- 3) 一方、本県水産試験場で各種の手法を施行する中で、“筋肉を加熱した後、粉砕する方法（仮に加熱法という）”を①電子レンジを使用して加熱、②加熱後破砕し、③ガラストレー内でさらに粉砕、④粉砕した筋肉片に水を加えて、⑤UV照射による確認を試みたところ、筋肉と虫体の区別が容易であり、UV照射時にも筋肉の残渣による干渉が極めて少ないことが判った。
- 4) 検査法（案）に比べて「加熱法」では時間と労力が大幅に軽減でき、なおかつ、精度においても同等と考えられた。

#### 2 内臓内部への寄生の確認法について

- 1) 「検査法概要（案）・追加」では、①内臓全部を切り刻み、②人工胃液により消化した後、③金属メッシュでろ過、④メッシュ上の残留物およびろ液中のアニサキスを確認するとしている。
- 2) 内臓内部の検査については、肝臓、脾臓、腎臓などの軟質性の臓器については、ハサミ、メス等により、容易に粉砕することが可能で、消化法に比べて内部寄生の確認に要する時間が短縮でき、検査精度についても消化法と比べて遜色ないと考える。
- 3) 胃、幽門垂、腸管、心臓については、筋肉性の臓器であるため、軟質性臓器に比べて均質な粉砕は困難と考えられることから、人工消化液による消化法が有効と考える。
- 4) 以上のことから、「検査法概要（案）・追加」で示された“内臓全部の消化”に比べて“胃、幽門垂、腸管、心臓”については消化法により、その他の臓器については細断、粉砕により検査する方が検査時間を短縮できる。
- 5) なお、本県水産試験場での“消化法”に使用できる施設（恒温水槽）能力から、多数の検体を処理する場合、消化する部位を限定し、処理の効率化を図る必要がある。

以上のことから、厚生労働省が提案している「検査法（案）」及び「検査法概要（案）・追加」の一部を改変して実施することを検討したい。

#### 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）

##### <検査の方法>

アニサキスの検査方法については、人工消化液による虫体の検出分離及びキャンドリング法、フードプロセッサーによる可食部の破碎法などが示されている。今回、可食部の処理について、電子レンジによる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ることが判明した。

本法は、解体した可食部を電子レンジで加熱処理後、筋肉をほぐして水に懸濁させ、紫外線照射装置で「検査マニュアル」に基づき観察、計数する。

##### <器材と材料>

1. 解剖器具
2. サランラップ
3. 電子レンジ
4. 卓上紫外線照射装置（波長 365nm）
5. ガラスシャーレ
6. ピンセット

##### <検査の流れ>

1. 解体
2. 内臓及び腹腔内表面のアニサキス検査  
\*検査マニュアルに基づき観察する。
3. 可食部(フィレ)内部のアニサキス検査
  - 1) 重量を測った可食部をサランラップに包み、電子レンジで筋肉に火が通る程度に加熱する。(30gの可食部につき 500W、30s 加熱した。)
  - 2) サランラップを開き、ピンセットでほぐす。(ビニール袋に入れて、手で揉みほぐしても良い)
  - 3) ほぐした筋肉をガラスシャーレに入れ、等量ないし2倍量の水を加える。油球が多い場合は、一度上澄み水を捨て、新たな水と取り替えるとさらに観察しやすくなる。
  - 4) ガラスシャーレを紫外線照射装置の上に乗せ紫外線を照射し（写真1）、時々シャーレを揺すりながらアニサキスを計数する。

本法を用いると、タンパク質が凝固することにより水に懸濁した際のにごりが少なく、フードプロセッサーで破碎したときに比べ（写真2）、①観察しやすい（破碎後にメッシュ上での水洗いが不要）、②短時間に処理できる、③使用器具が少なくすむ等のメリットがある。

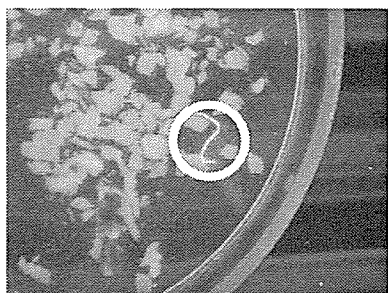


写真1 紫外線照射  
（肉眼観察では明確に識別が可能である）

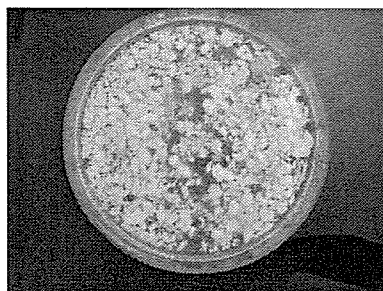


写真2

## 資料5. 香川県水産試験場の検査手法

### <精密検査1（内臓内部）>

- 持ち帰った内臓塊から個体ごとに胃および腸管を切り離し、ハサミにより切開して臓器内部への寄生の有無を目視により確認した。
- その後、胃および腸管を1センチ角程度に細断し、4～5個体分（150g程度）を2Lの三角フラスコに収容し、人工消化液 1.5Lを加えた。
- このフラスコを 37℃に設定した恒温水槽に収容し、攪拌しながら3時間消化させた。
- 消化後、フラスコの内容物を金属メッシュ（0.85mm）でろ過、洗浄し、メッシュ上の残渣をガラストレーに移した。
- ガラストレーに適量の水を加え、UV照射によりアニサキスの有無を確認した。
- 消化後のビーカー内容物を金属メッシュでろ過、洗浄したろ液、洗浄液についても別のガラストレーに収容し、静かに上澄水を捨てながらアニサキスの有無を確認した。

### <精密検査2（筋肉内部）>

- 検体魚から腹部の筋肉を切除し、1尾分を小切りにして皿に載せ、ラップで包んで電子レンジにかけた。
- 電子レンジは、500Wで3分間稼働させた後、筋肉を取り出し、金属バットの中に移して骨、腹腔膜を取り除きながら手でよく揉むようにして破碎するとともに、ピンセット、箸等でさらに細かく粉碎した。
- これをバケツに移し、温水で脂分を除去しながら洗浄し、金属メッシュ（0.85mm）でろ過した後、少量ずつガラストレーに移し、水を加えてUV照射（透過光）でアニサキスの有無を確認した。

## 資料 6. 宮崎県水産試験場の検査手法

### 精密調査の手法

#### 1 内臓摘出及び筋肉の裁断

- ①カンパチラウンド
  - ②体長、体重測定
  - ③3枚に下ろし、筋肉を30g程度の肉片に裁断
- ※断面にアニサキスの穿孔跡がないか確認

#### 2 筋肉のアニサキス寄生確認調査

##### 『電子レンジ加熱処理と沈殿』

- ①肉片を皿に並べラップに包み、電子レンジで30秒加熱する
- ②皿からビニールにうつし、入れたまま魚片をバラバラにもみほぐす
- ③肋骨を取り除く
- ④ビニールを個体でひとまとめに大きいビニールに入れておく
- ⑤フードプロセッサーに同量の水とともにいれ、約60秒かける
- ⑥1ℓのビーカーにうつす

##### 『紫外線によるキャンドリング』

- ①ガラスシャーレに入れ、同量程度の水を入れ、混ぜる。  
※半透明になるくらい水の量で、水が多すぎると見えにくい
  - ②紫外線照射装置上におく
  - ③ピンセットで沈殿物を攪拌しながら観察する
- ※寄生虫は青色の蛍光を発する  
※骨組織も同様に蛍光を発するため、ピンセットで確認  
※寄生虫がいれば、サンプルピンに採集し、尾数を記帳

#### 3 内臓のアニサキス寄生確認調査

##### 『目視観察』

- ①内臓を摘出
- ②内臓の周囲並びに胃内部寄生確認（目視：胃、幽門垂、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、腸管）

##### 『キャンドリングによる確認』

- ①内臓は人工消化液に入れる
    - ・人工消化液（塩酸：7ml、ペプシン：1g、蒸留水：1,000ml）を内臓の約10倍量入れる
    - ・インキュベーター（37℃）に入れ、1昼夜安置
  - ②ガラスシャーレに入れる
  - ③ガラスシャーレを紫外線照射装置上におく
  - ④ピンセットで沈殿物を攪拌しながら観察する
- ※寄生虫は青色の蛍光を発する  
※寄生虫がいれば、サンプルピンに採集し、尾数を記帳

## 資料 7. 検査法検討事項

### 1. 消化法

#### 1-2 前処理：

秤量したサンプルを、ハサミ、包丁等で適当な大きさに切る。

適当な大きさは？

#### 1-3 消化操作：

消化対象物の大きさは？

ペプシンの濃度は適当か？

濃度を上げる事で消化時間の短縮は可能か？

#### 1-4 虫体の回収：

メッシュによるろ過？

デカンテーション？

どちらが効率的？

### 2. 加熱法

#### 2-2 前処理：

電子レンジで処理する時の適当な大きさは？

#### 2-3 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？

#### 2-5 加温後の粉碎処理法：

適切な方法は？、

(虫体が破壊されぬよう、過剰な粉碎は避ける)

フードプロセッサー処理は必要か？

#### 2-6 粉碎サンプルの洗浄：

虫体を見やすくする洗浄法？

デカンテーション？

## 資料 8. 検査法検討報告書（香川県水産試験場）

ブリ属魚類筋肉のアニサキス幼虫簡易検出法

平成 18 年 1 月 22 日

香川県水産試験場

担当：赤井紀子 長野泰三

### A. 装置, 器具

1. 電子レンジ
2. 耐熱ガラス皿
3. ラップ
4. 卓上紫外線照射装置；波長 365nm
5. ガラスシャーレ；直径 150mm

### B. 検査の流れ

1. 魚を三枚におろし、皮付きのまま筋肉部を適当な大きさに切り分ける。
2. 切り分けた筋肉を耐熱皿に乗せ、ラップをかけ電子レンジで筋肉が簡単にほぐれるまで加熱する。※1
3. 加熱した筋肉を手で軽くほぐしシャーレに入れさらに解す※2。このとき、皮と大きな骨を取り除く。
4. シャーレに1～2倍量の水を加え、スパチラ等でかき混ぜながら紫外線照射装置で観察する。

#### ※1

○900W 型電子レンジ（SHARP RE-SD20）の場合、加熱時間は筋肉 60g で 40 秒が目安。25 秒以下では筋肉が十分にほぐせない。

○加熱時間が 60 秒でも、虫は筋肉をほぐす過程でちぎれることなく紫外線照射装置で問題なく観察可能。

#### ※2

○直径 150mm のガラスシャーレであれば、筋肉 60g 以下が観察に適している。それ以上多くなると観察しにくい。水面に油球が多い場合は、一度水を取り替えると観察しやすい。

○サンプルを大量に処理する場合にはビニール袋に筋肉を入れ、外側から揉みほぐすと効率が良いが、どちらの場合においても力を入れすぎないように注意する。

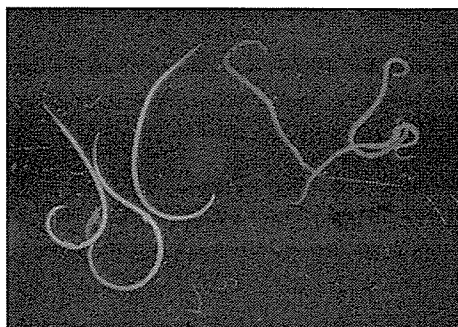


写真 1：紫外線照射による観察  
（左側が加熱，右が非加熱のアニサキス）

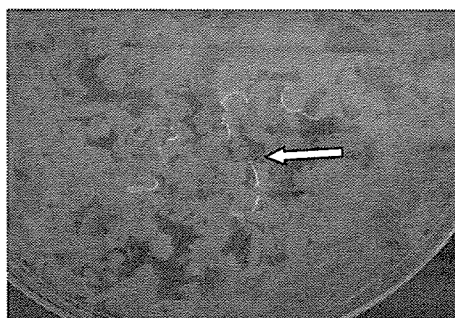


写真 2：紫外線照射による観察  
（筋肉中でも一目瞭然）



## 資料9：検査法検討報告書（宮崎県水産試験場）

（平成18年2月14日：宮崎県水産試験場：中村充志）

### 鮮魚からのアニサキス検出法:手順書作成の検討事項（1）

#### 1. 消化法

検査材料を人工胃液に浸漬し、それを37℃で加温・攪拌することによって組織のみを消化して、生きたままアニサキス幼虫を分離検出する方法である。

##### 1-1 消化法（内臓）の確認試験

- 1) 内臓を切断し、重量別に各濃度の消化液につける。
- 2) 一定時間ごとに攪拌し、消化程度を確認する
- 3) 消化程度は、メッシュで濾過した残渣の重量で評価した。※メッシュ：内径1.4mm
- 4) 工程

2月8日（水）午前9時消化開始（0時間）  
 正午 攪拌・確認（3時間後）  
 午後3時攪拌・確認（6時間後）  
 午後6時消化具合判定（9時間後）

##### 5) 結果

内臓	消化液濃度	9時間後重量	24時間後重量	試験区①	20
0g 塩酸7ml ペプシン	1g 蒸留水 1,000m	84.66g	8.0g		
試験区② 200g 塩酸7ml ペプシン	5g 蒸留水 1,000m	42.15g	0.9g		
試験区③ 200g 塩酸7ml ペプシン	10g 蒸留水 1,000m	59.07g	0.2g		
試験区④ 100g 塩酸7ml ペプシン	1g 蒸留水 1,000m	17.13g	0g		
試験区⑤ 100g 塩酸7ml ペプシン	5g 蒸留水 1,000m	18.01g	0g		
試験区⑥ 100g 塩酸7ml ペプシン	10g 蒸留水 1,000m	21.46g	0.6g		
試験区⑦ 40g 塩酸7ml ペプシン	1g 蒸留水 1,000m	8.00g	0		
試験区⑧ 40g 塩酸7ml ペプシン	5g 蒸留水 1,000m	2.50g	0		
試験区⑨ 40g 塩酸7ml ペプシン	10g 蒸留水 1,000m	6.90g	0		
試験区⑩ 20g 塩酸7ml ペプシン	1g 蒸留水 1,000m	4.45g	0		
試験区⑪ 20g 塩酸7ml ペプシン	5g 蒸留水 1,000m	0.60g	0		
試験区⑫ 20g 塩酸7ml ペプシン	10g 蒸留水 1,000m	0	0		
試験区⑬ 10g 塩酸7ml ペプシン	1g 蒸留水 1,000m	0	0		
試験区⑭ 10g 塩酸7ml ペプシン	5g 蒸留水 1,000m	0	0		
試験区⑮ 10g 塩酸7ml ペプシン	10g 蒸留水 1,000m	0	0		

##### 1-2 消化法（虫体）の確認試験

- 1) 虫体を各濃度につけ、24時間後消化されるか確認する。
- 2) 結果

虫体	消化液濃度	24時間後
試験区① 2隻 塩酸0.35ml ペプシン	0.05g 蒸留水 50ml	消化なし
試験区② 2隻 塩酸0.35ml ペプシン	0.25g 蒸留水 50ml	消化なし
試験区③ 2隻 塩酸0.35ml ペプシン	0.5g 蒸留水 50ml	消化なし
試験区④ 2隻 塩酸0.35ml ペプシン	2.5g 蒸留水 50ml	消化なし
試験区⑤ 2隻 塩酸0.35ml ペプシン	5.0g 蒸留水 50ml	消化なし

##### 1-3 虫体の確認方法試験

- 1) メッシュとデカンテーションの虫体確認時間を計測する。
- 2) 消化法で処理した液1,000mlをメッシュとデカンテーション別に処理した。  
 メッシュ処理 ... 30秒/1検体  
 デカンテーション... 2分/1検体

鮮魚からのアニサキス検出法:手順書作成の検討事項(2)

2. 加熱法

魚肉等は加熱によって身がほぐれやすくなるので、電子レンジで短時間加熱した上で、筋肉組織をほぐして、アニサキス幼虫を分離検出する方法である。 ※電子レンジ:ワット 500ワット

2-1 加熱法の確認試験

2-1-1 虫体破壊時間試験

- 1) 虫体が破壊される処理時間を計測する。  
30秒間隔で電子レンジ加熱。
- 2) 結果
  - ① 30秒...破壊なし
  - ② 60秒...破壊なし(虫体乾燥)
  - ③ 90秒...破壊なし( // )
  - ④ 120秒...破壊され始める
  - ⑤ 150秒...破壊された。

2-1-2 筋肉加熱時間試験

- 1) サイズ別に加熱時間を計測する。  
一片の大きさは変えず、厚みで重量を調整
- 2) 結果
  - 試験区① 50g...90秒
  - 試験区② 40g...80秒
  - 試験区③ 30g...55秒
  - 試験区④ 20g...30秒
  - 試験区⑤ 10g...20秒

2-2 加温後の粉碎処理試験

- 1) フードプロセッサ処理で虫体が破壊されるか処理時間を計測する。  
※50g筋肉の加熱時間を経た虫体を使用する。
- 2) 結果
  - 試験区① 50g 筋肉中 10秒処理 ...10個体中破壊なし
  - 試験区② 50g 筋肉中 30秒処理 ...10個体中破壊なし
  - 試験区③ 50g 筋肉中 60秒処理 ...10個体中破壊なし
  - 試験区④ 50g 筋肉中 90秒処理 ...10個体中2個体破壊
  - 試験区⑤ 50g 筋肉中 120秒処理 ...10個体中4個体破壊

3 供試魚、虫体

筋肉・内臓:カンパチ6尾

No.	体長(cm)	体重(g)
1	54.5	3,686
2	57.0	4,516
3	57.0	3,668
4	54.5	3,452
5	52.5	3,144
6	56.0	3,886
平均	55.3	3,725

虫体:サワラ2尾

No.	体長(cm)	体重(g)	虫体数
1	70.0	2,740	74
2	67.0	2,467	29
平均	68.5	2,604	52

## 資料10. 協力研究依頼書（研究協力者所属機関の長宛）

平成18年1月26日

### 依頼書

所長 殿

国立感染症研究所  
寄生動物部第二室  
室長 川中 正憲

平成17年度厚生労働科学研究費補助金による「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長）に係る研究を遂行すべく、各位のご協力を依頼しているところです。つきましては、下記の要領で貴所の職員に協力研究員としてご参加いただきたく、ご高配賜りますようお願い申し上げます。

### 記

1. 分担研究課題名： 「養殖魚を対象としたアニサキス幼虫検査マニュアルの作成」
2. 研究協力者職名： 殿
3. 分担研究費用： 平成17年度厚生労働科学研究費補助金による「輸入食品の寄生虫汚染制御に関する研究研究」からの分担金より支出

## 資料11-1. 試験実施スケジュール等に関する連絡文書（1）（協力研究者宛）

厚生労働科学研究費補助金  
「輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究」  
研究協力者 御中

拝啓

平成17年度の年度末も迫って参りまして何かとお忙しくお過ごしと推察致します。このような中、平成17年度の厚生労働科学研究費にかかわる研究課題実施への承諾を頂きまして有り難う御座います。期間も短く期限も迫っている事から若干の説明を申し上げます。

- 1、研究課題：  
「養殖魚を対象としたアニサキス幼虫検査マニュアルの作成」

2、背景：  
添付したファイルに、昨年6月に問題となった「養殖カンパチのアニサキス」に関する資料がありますので御覧下さい。

昨年来この事例を処理する過程で、従来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ました。つまりは、個別の魚のアニサキス検査というよりも、一定の「ロット」単位の養殖魚がアニサキスに汚染されているかどうかという、比較的多数魚のアニサキス幼虫を検査するという課題です。そして、昨年11

月 17 日に行われた「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に対する食品安全対策に係る検討会」では、香川県と宮崎県からの要請により、個別出荷方式による安全性の確認と、夫々ロットで 60 尾ものアニサキス検査を急遽実施した事例についての協議が行われた次第です。

ところで、養殖魚がアニサキス幼虫に汚染されているかどうかという問題は、農林水産関係の問題であると共に、何よりも食品衛生上の重要問題であると思われます。そこで、今回、食品衛生の観点から「養殖魚を対象としたアニサキス幼虫検査マニュアル」を整備するという必要が生じ、関係水産試験場の協力も得て検査手順書案を現在作成中です。

このマニュアルにもとづいて、貴所において実際の試験を実施して頂き、実践上のご意見を寄せてもらうというのが、今回の依頼の趣旨です。

### 3、スケジュール

- I. 貴所へ検査器材（UV トランスイルミネーター＋暗箱）送付：2 月 13～17 日
- II. 検査指針（案）、検査材料の送付、試験の実施：3 月 1 日～10 日までの期間

### 4、試験の実施

実際の試験は、2 名で 1～2 日で終了する程度のものを予定しております。試験予定日が決まりましたらば、検査魚を希望される日に送付するように手配します。

### 5、今回、試験をご依頼している機関

鹿児島県環境保健センター  
熊本県保健環境科学研究所  
宮崎県衛生環境研究所  
大分県衛生環境研究センター  
高知県衛生研究所  
香川県環境保健研究センター  
愛媛県衛生環境研究所

6、依頼書を同封いたしました。分担金については後日ご連絡申し上げます。

では、また連絡を差し上げますが、何卒宜しくお願い致します。

## 資料 1 1－2. 試験実施スケジュール等に関する連絡文書（2）（協力研究者宛）

厚生労働科学研究費補助金

「輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究」

研究協力者 御中

「養殖魚からのアニサキス検出マニュアル」の作成に関連してご連絡を申し上げます。

既にメールでご連絡を差上げておりますように、検査に伴う器材（UV トランスイルミネーター＋暗箱）が今週中に貴研究所に送付する旨が、業者の方から通知がありました。

品名 DT-20LP 卓上照射装置

BX-15LL/LL 暗箱照射装置

これらは、厚生労働科学研究費補助金により購入した備品として、貴研究所にて設置する手続きを後日取らせて頂きますので宜しくお願いします。

貴所での受取りを確認次第、当方へご一報頂ければ幸いです。

### 資料1 1 - 3. 試験実施スケジュール等に関する連絡文書（3）（協力研究者宛）

厚生労働科学研究費補助金

「輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究」

研究協力者 御中

連絡3：器材試薬と試験の概略

「養殖魚からのアニサキス検出マニュアル」の作成に関連した試験の器材試薬と試験の概略についてご連絡致します。試験に必要な器材は「添付ファイル」をご参照下さい。

以下の2点は手配いたしました。

- 1) 暗箱付き卓上紫外線照射装置（波長 365nm） 送付済
- 2) フードプロセッサー 送付手配中

更に、今回の試験に必要でかつ実験室には常備していない可能性のあるものとして

- 1) 鮮魚解体用の「出刃包丁」
- 2) 魚肉加熱処理用の「電子レンジ」
- 3) 内臓消化用の「ペプシン(力価 1:10,000)」と「スターラー用大型回転子」などがあるかと思われまので、予め用意して下さる様にお願致します。

#### 1、試験の概略

検査対象の「カンパチ」と検出対象の「アニサキス幼虫」は、別に送付します。試験検査は大きく分けて、解体観察、内臓処理、筋肉部処理、虫体検出の4工程になります。それぞれの工程については「アニサキス幼虫」と共に詳しい手順書をお送りします。

以下の作業手順について、検査記録用紙とアンケート用紙に記入して頂く事になります。

- 1) 解体観察：被検魚を3枚におろす作業工程で腹腔内部の観察を行います。ここで、内臓及び筋肉部分にアニサキスの一定数を混入させます（スパイク試験）。
- 2) 内臓処理：人工胃液で内臓を消化します。
- 3) 筋肉部処理：筋肉部を電子レンジで加熱した後、フードプロセッサーで粉砕します。そして、不織布製の袋を用いてろ過洗浄をします。
- 4) 虫体検出：目視（消化処理）およびUV トランスイルミネーター（加熱処理）により2）、3）で処理をしたサンプルからアニサキス虫体の検出を試み、回収数を算定します。

なお、虫体を検出した後、「同定」することが必要となりますが、一般には70%エタノールにアニサキス幼虫を浸漬した上で、専門家に送付することになります。

今回は、形態観察とPCR法による同定資料をお送りし、同定検査を実施するかどうかについては自由な判断に委ねたいと思います。

## 資料 1 1 - 4. 試験実施スケジュール等に関する連絡文書 (4) (協力研究者宛)

厚生労働科学研究費補助金

「輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究」

研究協力者 御中

連絡 4 : カンパチ送付日

さきに「養殖魚からのアニサキス検出マニュアル」の作成に関連した試験を3月1日～10日に実施して頂きたい旨をご連絡致しました。実際の試験は2名で1～2日で終了すると思われます。試験のための「カンパチ(約3Kg)1尾」を宮崎県漁連から送付するように手配をします。貴研究室では、何日にお届けするように連絡をすれば宜しいでしょうか?

市場は日・水曜日は休みとのことです。この辺を見込んで、出来ましたら送付日の5日前までに当方へお知らせ下さい。

以下にご記入の上、ご返送下さい。

-----  
カンパチの送付希望日

月 日 ( 曜)

## 資料 1 2. スパイク試験実施に係る送付書 (研究協力者宛)

平成 18 年 2 月 24 日

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金

「輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究」

研究協力者 殿

国立感染症研究所

寄生動物部第二室

分担研究者 川中正憲

「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」作成につきましてご協力ありがとうございます。検査実施に関わる下記の資料等をお送りしますのでよろしくご査収ください。なお、アニサキス幼虫も同封致しますので、到着後、直ちに同封の説明書にある通り、4℃と-20℃での保管をお願い致します。

記

### 物品

1. アニサキス幼虫 (冷蔵品)  
プラスチックチューブ (生存虫体) とバイアル瓶 (凍結済虫体)、それと説明書「送付アニサキス幼虫について」が入っています。  
説明書に従って到着後直ちに保存をお願いします。
2. 水きりゴミ袋 (不織布製水切り袋)  
検査に使用します。

### マニュアル (案) 等

1. 「実施報告書作成のお願い」  
今回の「マニュアル」作成に関する試験的な検査実施に当たり、幾つか要望があります。
2. 「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル (案)」(写真付き)

検査はこのマニュアルに沿って実施して下さい。

3. 「別紙 虫体の同定」
4. 「カンパチのさばき方とスパイク試験の説明」

#### 返信用書類

5. 「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル（案）」[回答用]  
修正すべきこと等について直接書き込んで返送して下さい。
6. 検査記録用紙  
検査の記録を記入するものです。
7. 返信用封筒

以上です。

### 資料 1 3. 試験実施報告書の作成依頼文書（研究協力者宛）

「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」（案）の実施報告書作成のお願い

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金

「輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究」

研究協力者 殿

研究班として「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」を作成するにあたり今回提示致しました（案）について、研究協力者の皆様に忌憚のないご意見、ご提案を頂きたいと思っております。恐縮ですが、皆様には必ずご提出願いたいと存じます。お寄せ頂いたご意見、ご提言は可能な限り最終稿に反映させより良いものとしたと考えています。

1. マニュアル（案）中にある試験操作に関する提案：  
このマニュアルにある手順は、感染研ならびに 2ヶ所の水試で検討をした上で構築したのですが、まだ改良の余地は多々あると思っております。操作上の改良点等についてのご提案をお願いします。
2. マニュアル（案）の記述について：  
意味が取りにくい、あるいは操作をする上で判断に迷う点について指摘して下さい。これは、同封の「マニュアル[回答用]」に直接記入して送り返して頂ければ幸いです。
3. アニサキス幼虫検査について：  
今後、県内で実施する可能性について担当者としてどのようにお考えでしょうか
4. 感想：  
研究班に参加され、試験的な検査を実施されたことに関する感想をお聞かせください。

項目 1、3、4 に関して、書式は問いませんので A4 で 1 枚程度、実施報告書としてお纏め下さいますようお願い致します。

2006 年 2 月 24 日

## 資料 1 4. 「送付アニサキス幼虫」の取扱説明書

送付アニサキス幼虫について

由来：九州産サバより採集したアニサキス幼虫

大部分がアニサキス I 型幼虫 (*Anisakis simplex*) です。

1. プラスチックチューブ入り：

培養用メジウムで 4℃にて 2 週間保存したもの（生存虫約 30 匹）

2. バイアル瓶入り：

-20℃にて冷凍下 2 週間保存したもの（30~40 匹）

到着後の保存法：

1. の生存虫は 4℃にて保存。

2. の冷凍処理虫体は -20℃にて保存。

使用目的

1、 実体顕微鏡での観察

観察時には両者ともに生理食塩水中に移します。

プラ・チューブ入りの生存アニサキス幼虫の特徴的な運動を確かめて下さい。

2、 UV 透過光での観察（透過 UV のみ on、落射光は off で観察します）

両者を UV 透過光で観察すると、冷凍処理虫体が明らかに蛍光が強いということが分かります。

3、 加熱後の UV 透過光での観察

生理食塩水に入れたシャーレに、生存、冷凍処理の各虫体を 2~3 匹程度をとり電子レンジで 2 分間程度加熱したものを UV 透過光で観察して下さい。

両者から同じ程度の青白蛍光が観察されます。

4、 スパイク試験への使用

予め既知数のアニサキス幼虫をサンプルに混入させて前処理法を行い、その上で直接観察と UV 透過によって虫体の回収を試みる。

スパイク試験での虫体混入法の詳細は「カンパチのさばき方とスパイク試験の説明」を参照のこと。



## 資料15. 鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル (案)

鮮魚からのアニサキス幼虫検査は、解体と観察、前処理（消化法：内臓部、加熱法：筋肉部）、虫体の検出（直接観察、UV透過法）という手順で進める。虫体の同定に関しては、一般的には専門家への依頼により行われているのでマニュアルとは区別して別紙に述べる。

### I. 器材と試薬

#### A. 装置器具

1. 電子レンジ
2. フードプロセッサー（パン生地用プラスチック刃（羽根）装着のものに限る）
3. 暗箱付き卓上紫外線照射装置（波長 365nm）
4. 恒温器又は振盪恒温水槽（37℃）
5. スターラー及び大型回転子（4.で恒温器使用の場合に必要）
6. 実体顕微鏡
7. 重量はかり
8. ものさし
9. 解剖刀（大型魚種の場合は出刃包丁）
10. まな板
11. バット
12. 耐熱皿
13. ラップ
14. ビーカー（各種、含む 3L）
15. 不織布製水切り袋（以下不織布袋と称す）
16. メスシリンダー（各種、含む 500ml）
17. ハサミ
18. ピンセット
19. ガラスシャーレ（各種、含む 直径 15cm）
20. UV 防御メガネ（暗箱に安全観察窓が付いている場合は不要）

#### B. 試薬調製

1. 生理食塩液：0.85%食塩水
2. 消化用人工胃液：

塩酸	7 ml
ペプシン(1:10,000)	1 g
蒸留水	1,000 ml
3. 検出虫体固定液：70%エタノール

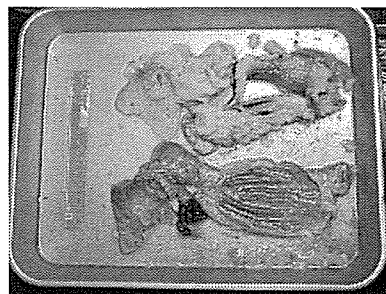
### II. 解体と観察

検査対象の魚を解体して虫体検出操作（Ⅲ、Ⅳ）を行うために、内臓と筋肉部に分ける。あわせて、解体作業時にもアニサキス幼虫の検出に努める。

#### II-1 検査対象となる魚の解体と腹腔表面の観察

- 1) 重量及び体長を測定する。
- 2) 頭部を切り離してから腹部を開く。
- 3) 内臓をまとめて切除し、バットに移す（Ⅱ-2へ）。
- 4) 内臓を取り除いたあと、腹腔の表面全体をくまなく観察し、アニサキス幼虫の有無を調べる。
- 5) 検出されたアニサキス幼虫は、Ⅳ-3に従って処理する。
- 6) 内臓を取り除いたあとの身を3枚におろし、半身2枚と中骨とする。
- 7) 得られた筋肉部（半身・フィレー）は、Ⅲ-2に従って前処理を行う。

#### II-2 内臓の観察



以下の手順に従って、内臓表面と内部のアニサキス幼虫の有無を観察する。

- 8) 胃は切り離し、切開して内部と胃壁を観察する。
- 9) その他の内臓(心臓、肝臓、脾臓、腎臓、幽門垂、腸など)表面を観察する。
- 10) 検出されたアニサキス虫体は、**IV-3**に従って処理する。
- 11) 目視による観察終了後、内臓はすべて、**III-1**に従って前処理を行う。

### III. 前処理

#### III-1 消化法

検査材料を人工胃液に浸漬し、37℃で加温・攪拌して組織を消化することで、アニサキス幼虫を分離検出する。

##### III-1-1 適用部位：

内臓などに適用する。

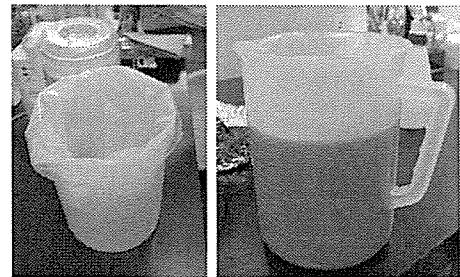
##### III-1-2 消化処理：

- 4) 胃を含む全ての内臓を、人工消化し易いようにハサミなどで2～3cm角以下に切り刻み、適当な大きさのビーカーに入れる。
- 5) 内臓の重量に対して5～10倍程度の人工胃液を注ぐ。
- 6) 恒温器または恒温水槽を37℃に設定し、攪拌しながら少なくとも3時間、消化処理を行う(\*注)。
- 7) 消化処理終了の目安は、液が混濁して未消化物が若干散見される程度とする。



##### III-1-4 虫体の回収：

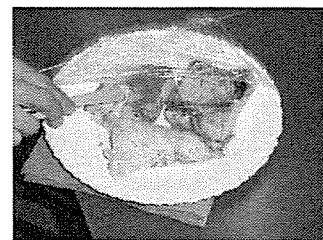
- 3) ビーカーなどに不織布袋をろ過の為にセットする。
- 4) 消化処理が終了したサンプル液を注ぐ。消化処理に用いたビーカー及び回転子表面を水で良く洗浄し、洗浄液も同様にビーカーに注ぐ。
- 5) 不織布袋を持ち上げて自然に水切りをする。
- 6) ろ液を捨て、ビーカー内に新たに水を注いで不織布袋内のサンプルを洗浄する。
- 7) 不織布袋内に残ったサンプルを、全てガラスシャーレに移しアニサキス幼虫の有無を検査する(**IV-1**及び**IV-2**へ)。



(\*注)：一般に魚介類検査に用いる人工胃液のペプシン濃度は0.1%であるが、0.5%に増量することにより消化速度を高めることが出来る。非常に大量のサンプルを消化処理する必要がある場合、もしくは適当な攪拌手段が得られない場合などでは、濃度を0.5%とする人工胃液で一晩処理(15時間、37℃)を行っても良い。

#### III-2 加熱法

魚の筋肉部は加熱することによって粉碎し易くなり、また水に懸濁した際の濁りを極力抑える事が出来る。そこで、短時間加熱の手段として電子レンジを用い、フードプロセッサーにより筋肉部を均一に粉碎し、検査用サンプルを調整する。



##### III-2-1 適用部位

筋肉部など、加熱によって均一に粉碎しやすくなる部位。

##### III-2-2 加熱操作

- 1) フィレーを適当な大きさに切り、耐熱皿に載せる。
- 2) サンプルの大きさにより加熱時間が異なるため、あらかじめ試験時と同じサイズの筋肉(切り身)

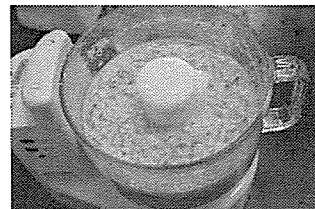
を用いて適当な加熱時間を割り出しておく。(例：カンパチの切り身の場合、約 300g なら 500W、4 分間、電子レンジ処理をする)

- 3) サンプルとなる切り身を、皿に並べてラップをかけ、2) により設定した時間で、加熱を行う。

### Ⅲ-2-3 粉碎処理

- 1) プラスチック刃を装着したフードプロセッサーに、加熱処理したサンプルを入れ、サンプル重量と等量の水を加える。

- 2) フードプロセッサーの作動時間は短い方が良く、虫体の破壊を避けながら筋肉を均一に粉碎する。長時間の連続作動は虫体を破壊するおそれがあるので避ける。(例：カンパチの場合、約 300g であれば、30 秒程度作動させる)



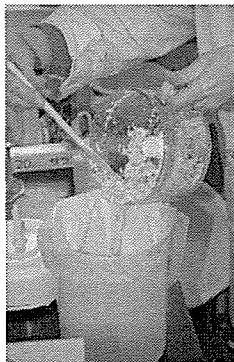
### Ⅲ-2-4 粉碎サンプルの洗浄

温水 (30~40℃) で粉碎魚肉を洗浄する。アニサキス幼虫検出の妨げとなる脂肪層や濁った液層を除去するための操作である。

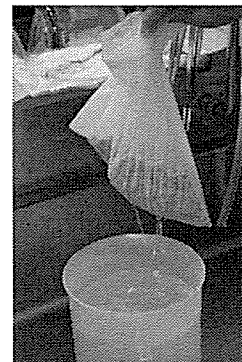
- 1) サンプル容積の約 10 倍量のビーカーに不織布袋をセットする。



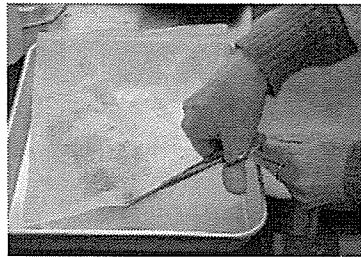
フードプロセッサーからサンプルを不織布袋内に移す。フードプロセッサーの内部を水で洗い、沈渣も不織布袋内移す。



- 2) ビーカー内のろ液を捨てる。ビーカーに温水を加え、サンプルの入った不織布袋を浸して静かに振盪し、袋を引き上げてろ液を切る。ろ液の濁りがなくなるまで、この洗浄操作を繰り返す。



- 3) 不織布袋を引き上げて自然に水切りをし、袋の中のサンプルをバットに取り出す。
- 4) 不織布に虫体が付着する事があるので、袋を切り開き、不織布も観察対象とする。(IV-2へ)



#### IV. 虫体の検出

##### IV-1 直接観察

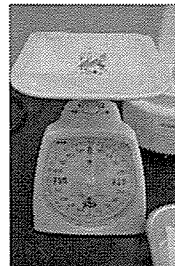
自然光下で肉眼的に虫体を検索するか実体顕微鏡下で虫体を観察する。開腹時(II-2)には、内臓表面あるいは腹壁から生きたアニサキス幼虫が検出されることがある。また、内臓などの人工消化時(III-1)にも生きたアニサキス幼虫が検出されることがある。生きたアニサキス幼虫は特徴的な蠕動運動があるので、魚体由来の残渣との識別は困難ではない。



##### IV-2 紫外線(UV)透過法

紫外線(UV)透過光によって虫体を検出する方法である。消化法(III-1)及び、加熱法(III-2)により処理したサンプルは不織布を含めて適用する。

- 1) 消化法(III-1)により得られたサンプルでも、運動性が弱いものや、不織布に絡みついたものは検出し難いので、本法で観察を行う。
- 2) 加熱法(III-2)で処理したサンプルを、適当な大きさのガラスシャーレなどに一定量の水と共に入れる。
- 3) 容器に入れる1回分のサンプル量は光が透けて見える程度とする。過剰に入れると観察し難く虫体検出の精度が落ちる。
- 4) 水を加えて、サンプルを容器全体に均一に広げる。例えば、直径15cmのガラスシャーレを使用する場合は、1度に加えるサンプル(固形分)量は10~15g程度とし、そこに約100mlの水を加える。



- 5) UV防御メガネを装着するか、暗箱の安全観察窓の存在を確認した上で、UV透過光により虫体の検出操作を行う。
- 6) ピンセットで残渣を除けながら青白色蛍光を発する虫体を検索する。
- 7) 蛍光の有無により虫体を筋肉残渣と識別するのは困難ではないが、魚体由来

