



図5 筏上でのミンチ作成作業。左奥の袋に解凍中の魚が入っている。



図6 給餌前の餌（ミンチ）



図7 カンパチ育成に使用されている抗生物質。原液は化学物質として販売されており、包装に用法・用量の記載は認められない。



図8 カンパチ育成場の筏上のトイレ。穴の下に海面が見える。

カンパチ種苗用のアニサキス検査法（案）について

魚類におけるアニサキス幼虫の検査法としては、ガラス板による圧平法、キャンドリング法、酵素による消化法、UV 検出法が知られている。圧平法は、臓器やフィレをガラス板に挟み圧力をかけて押しつぶして観察するものである。キャンドリング法は、製品である魚肉フィレを商品価値を落とすことなく、フィレに透過光をあてて観察するものである。消化法は消化酵素を用いて臓器や肉を消化し、その残渣からアニサキスを回収し、検出するものである。また、UV 法は、アニサキス虫体の自家蛍光を利用し、フードプロセッサなどを用いて魚肉や臓器をミンチにし、UV を照射してアニサキスを検出しようというものである。

一般に、前者の二法は簡便ではあるものの検出感度が低く、後者の二法は検出感度が高いものの、その実施には労力が必要とされている。

アニサキスが人体有害種であることから、一般にはできるだけ検出感度の高い手法を用いることが望まれる。しかし、実際の実施を考えると、それぞれのケースの寄生部位や寄生強度、さらには検査の目的にあわせた手法を選ぶ必要があると考える。

カンパチ輸入種苗におけるアニサキス寄生には、従来例とは異なる特徴がある。また、検査にも、1尾1尾を対象にするのではなく、群として扱うという特徴がある。ここにこれらの特徴を考察するとともに、特徴にあわせた検査法を提案する。

まず、カンパチ輸入種苗は比較的大型であり、体長30cmを超えるものもあり、検査に労力が必要である。また、寄生部位はほとんど体腔内の臓器に限られている。厚生労働省の2005年の調査では、被寄生魚137尾中、筋肉内に見られたのは1尾のみであった。また、公表はされていないものの、この際、筋肉内に認められた虫体は1虫体であった。寄生数はほとんどの場合未公表であり、解析に利用できるデータはない。限られたデータではあるが、我々の調査では、平均寄生数は50を超えており、寄生強度は一般に高いものと考えられる。これらのことから、寄生部位はほぼ体腔内の臓器に限定されていると考えられる。体腔内の内臓に全く寄生がなく筋肉にのみ寄生している魚体の確率は極めて低いであろう。従って、検査は体腔内のみを対象にすれば十分である。

さらに、飼育群を対象としているため、魚の個体ごとの検査感度と精度はそれほど高い必要がない。虫体の一部を見逃したとしても、同じ群に含まれる他の個体で1虫体でも発見されれば、当該群は被寄生群として扱われ、現状では輸入の対象にならない。従って、一尾一尾の精度を上げるより、検査魚数を増やす方向に労力を注ぐべきである。

このような特徴から、カンパチ輸入種苗のアニサキス検査に当たっては、体腔内の臓器を対象に、検査数を増やすことのできる簡便な検査手法を用いることが適している。以上の根拠をもとに、検査手法案を記載する。

#### カンパチ種苗用のアニサキス検査法（案）

- 1) 魚体を開腹し、臓器（胃、腸、肝臓、生殖腺）を取り出す。
- 2) 腹壁を肉眼で検査する。
- 3) 胃を臓器から切り出し周囲を肉眼観察し、ピンセットとハサミを用いて、胃壁を切り裂き、虫体を観察する。
- 4) 胃周辺の漿膜と幽門垂をガラス板（30 cm x 30 cm x 3-5 mm 程度）に挟み、圧力をかけ十分に圧平し、蛍光灯やライトボックスの上にかざし、肉眼で観察する。
- 5) 腸管ならびに腸間膜を、5-10 cm 長に切断し、ガラス板に挟み圧力をかけて十分に圧平し、同様に光源上にかざし、肉眼で観察する。
- 6) 虫体が見つかった場合、これを取り出し、熱した 70%アルコールで固定する。あるいは、熱した生理食塩水中に入れ、虫体を伸展させた後、70%アルコール中に固定する。
- 7) 固定した虫体は、グリセリンで封入し、穿歯、尾端突起、胃の形態を光学顕微鏡で観察し、同定する。

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）  
「輸入食品寄生虫汚染制御に関する緊急研究」

分担研究報告書

中国産カンパチ種苗におけるアニサキス寄生  
—予報—

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	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

概要 2005 年 4 - 5 月に、九州地方の多くのカンパチ養殖場において、養殖用に中国から輸入されたカンパチ種苗にアニサキス科幼虫の重篤な寄生が認められた。我々は地方自治体の研究者や養殖業者から、このアニサキス科幼虫の同定を依頼された。そこで、予備的調査として、このアニサキス科幼虫について、その分類と寄生部位について調査した。今回カンパチから得られた虫体の塩基配列は、北海道のマダラから得られ、PCR-RFLP 分析によって *A. pegreffii* と同定された虫体の塩基配列と同じであった。分類の詳細については再検討が必要であるが、人体に有害であるとみなすべきである。寄生部位を詳細に調査して 9 尾中、全ての魚体の胃壁と漿膜に虫体が観察された。また、8 尾については、腸や幽門垂の周囲の腸間膜にも虫体が観察された。一方、腹部筋肉や肝臓などの他の臓器の漿膜に虫体は観察されなかった。

A. 研究目的

2005 年 4 - 5 月に、九州地方の多くのカンパチ養殖場において、養殖用に中国から輸入されたカンパチ種苗にアニサキス科幼虫の重篤な寄生が認められた。我々は地方自治体の研究者や養殖業者から、このアニサキス科幼虫の同定を依頼された。そこで、予備的調査として、このアニサキス科幼虫について、その分類と寄生部位について調査した。

B. 研究方法

カンパチは九州と四国の 4 つの匿名の養殖場から集めた。集めた魚は 2004 年の春に中国の東南海域で採集され、2004 年の 11 月あるいは 2005 年の 1 月まで中国広東省寧徳で飼育された後、日本に養殖用種苗として輸出されたものである。試料魚は尾又長 39.5-43 cm で、各養殖場から 4-9 尾を集めた。これらの魚は、氷詰めにして研究室まで輸送した後、あるいは、養殖現場で即殺した後に調べた。虫体は氷詰めで輸送した魚体から集め、病理組織標本は即殺した魚体から得た。

42 虫体を魚の胃と腸間膜から得、熱 70%エタノールで固定し、グリセリンで透化して顕微鏡観察に供した。分子分類のため、1 尾の魚から取られ 99.5%エタノールで固定された 3 虫体から核酸を抽出した。抽出には、通常の SDS-Proteinase K 消化、フェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿を用いた。得られた核酸をテンプレートとし、ITS1-5.8S-ITS2 rDNA を NC5 (forward; 5' -GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT -3') と NC2 (reverse; 5' -TTAGTTTCTTTTCCCTCCGCT -3') をプライマーとして用いて PCR 法で増幅した<sup>1)</sup>。PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc., Germany) を用いて、

上記の二つのプライマーと NC13 (forward; 5' -ATCGATGAAGAACGCAGC -3'), NC13R (reverse; 5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT -3')、XZ1R (reverse; 5'-GGAATGAACCCGATGGCGCAAT -3') をプライマーとして用い、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)を用いてサイクルシーケンシングを行った。配列は、ABI PRISM 310 sequencer (Applied Biosystems)を用いて読みとり、Se-Al<sup>2)</sup> と PAUP 4.0. Windows Beta ver. 10. (Sinauer Associates, Inc.) を用いて解析した。

魚 9 尾については、寄生部位を詳細に調べた。胃ならびに胃の周囲の漿膜が重篤な寄生をしていたので、これらの器官は実体顕微鏡下で解剖し、集めた虫体を数えた。幽門垂、腸、腸管膜は 2 枚のガラス板の間に挟み、ライトボックスの上においてキャンドリングによって観察した。体腔を囲んでいる腹部筋肉は 2-3 mm 程度のスライスにし、ライトボックスの上においてキャンドリングによって観察した。

### C. 結果と考察

得られた虫体は、穿歯が体前端、排泄孔が穿歯の直下に存在し、胃は円筒状で、微小突起が体後端に存在した。胃盲嚢、腸盲嚢は存在しなかった。虫体は、特徴は既報のアニサキス I 型幼虫の特徴<sup>3,4)</sup>を備えていた。

形態学的測定値ならびに測定指数以下のとおりである。数値は最大値と最小値、カッコ内の数値は平均値である。

body length	16.4-25.0 (21.5) mm	body width	307-565 (449) μm
esophagus length	1570-2025 (1792) μm	ventriculus length	571-826 (674) μm
tail length	76-116 (96) μm	body ventriculus / body width	38.4-57.7 (48.4)
body length / (esophagus + ventriculus length)	7.0-10.3 (8.7)	body length / oesophagus length	10.2-14.7 (12.0)
body length / ventriculus length	22.5-38.2 (32.1)	body length / tail length	174-329 (228)

これらの数値は既報の数値と重なっており<sup>4)</sup>、虫体は形態学的には *Anisakis* I 型幼虫と分類された。

*Anisakis* I 型幼虫は、従来、人体に被害を与える *Anisakis simplex* の 3 期幼虫と考えられていた。しかし、近年のアイソザイム分析により、*Anisakis* I 型幼虫には、少なくとも 5 種が含まれているものとされる。すなわち、*A. simplex sensu stricto*, *A. pegreffii*, *A. simplex* C, *A. typica* and *A. ziphidarum* である。このうち、最初の 3 種は、形態学的識別が困難であるため、*A. simplex complex* (= *A. simplex sensu lato*) (広義の *A. simplex*) として扱われている。さらに、*A. simplex complex* に含まれる 3 種は ITS 領域の PCR-RFLP 分析によって区別されるようになった<sup>9)</sup>。今回カンパチから得られた虫体の塩基配列は、北海道のマダラから得られ、PCR-RFLP 分析によって *A. pegreffii* と同定された虫体の塩基配列 (AB196670 and AB196671) と同じであった<sup>10)</sup> (Table 1)。今回の虫体にも、*A. pegreffii* を *A. simplex* と区別する 2 箇所の違い<sup>11,12)</sup> が認められた (Fig. 1A)。この結果から、カンパチの虫体は *A. pegreffii* と非常に近縁であると判断された。しかし、カンパチの虫体と以前北海道のマダラから得られた虫体は、どちらも、*A. pegreffii* の type locality である地中海の *A. pegreffii* とは 5.8S rDNA の塩基配列に 2 箇所の違いが認められた (Fig. 1B)。 *A. pegreffii* が *A. simplex sensu stricto* と 2 箇所の塩基配列の違いで区別されることを考えると、極東の *A. pegreffii* は地中海のそれとは異種である可能性も残されている。そのため、我々は、極東の *A. pegreffii* を地中海のそれと区別するため、*A. pegreffii* JP と呼称することを提案する。*A. pegreffii* は当

初アイソザイム分析によつて *A. simplex* と区別されたことから、今後分類を確定するためには極東の虫体についてもアイソザイムによる分析を行う必要がある。

カンパチから得られた虫体は、形態学的には人体に健康被害を与える *Anisakis* I 型幼虫と分類された。また、*A. pegreffii* による健康被害もイタリアで報告されている。<sup>13)</sup> 今回カンパチから得られた虫体は、分類の詳細については再検討が必要であるが、人体に有害であるとみなすべきである。

カンパチにおける主要な寄生部位は胃壁内と胃漿膜であった。特に、胃後部への寄生が顕著であった。被寄生魚には短く変形した胃がしばしば観察された。これらの変形は胃壁内の大きな虫塊が胃壁を内側に押し出すことによって生じていた。重篤な寄生を受けた魚体では、胃腔の狭窄や閉塞が時として認められた(Fig. 2A)。胃壁内では、虫体は粘液下層に存在しており、血球の浸潤などの炎症性の反応はほとんど認められなかった (Fig. 2B)。胃壁内の虫体は、腸間膜の虫体と同様、宿主由来の薄い膜に覆われていた。

寄生部位を詳細に調査して 9 尾中、全ての魚体の胃壁と漿膜に虫体が観察された。また、8 尾については、腸や幽門垂の周囲の腸間膜にも虫体が観察された。胃および腸間膜における平均寄生数はそれぞれ 58、9.5 虫体であった。腹部筋肉や肝臓などの他の臓器の漿膜に虫体は観察されなかった。

胃への重篤な寄生は明らかに魚に病理学的変化を引き起こしていた。一般に、アニサキス科の線虫は腸間膜や内臓の漿膜に多く寄生し、時として筋肉にも寄生する。しかし、宿主への影響は低いと考えられている。今回の例は、我々の知る限り、アニサキスが魚の胃壁内に寄生した、また魚に病理学的影響を与えた、はじめての例である。今回の調査で虫体が筋肉内に認められなかったことから、虫体が可食部に侵入する確率は極めて低いと考えられた。

また、海産養殖魚におけるアニサキスの寄生例はこれまで報告されていない。養殖魚に人体に有害な寄生虫が寄生していないことは、養殖魚の利点であると考えられていた。しかし、今回の例は、養殖魚も必ずしも安全ではないことを示すこととなった。厚生労働省の調査により、カンパチ種苗へのアニサキスの寄生は中国で育成中に生じたことが明らかとなっている。魚類に起因するヒトの健康被害を防ぐためには、食用魚ばかりでなく、魚の種苗についても 当局による監視下におくべきだと考える。

#### D. 結論

近年のアイソザイム分析により、*Anisakis* I 型幼虫には、*A. simplex sensu stricto*, *A. pegreffii*, *A. simplex* C, *A. typica* および *A. ziphidarum* の少なくとも 5 種が含まれており、前 3 種は、形態学的識別が困難なことから、*A. simplex complex* (= *A. simplex sensu lato*) (広義の *A. simplex*) として扱われている。近年、*A. simplex complex* の 3 種は ITS 領域の PCR-RFLP 分析によって分別・同定されるようになった。今回カンパチから得られた虫体の塩基配列は、北海道のマダラから得られ、PCR-RFLP 分析によって *A. pegreffii* と同定された虫体の塩基配列と同じであった。分類の詳細については再検討が必要であるが、人体に有害であるとみなすべきである。

寄生部位を詳細に調査して 9 尾中、全ての魚体の胃壁と漿膜に虫体が観察された。また、8 尾については、腸や幽門垂の周囲の腸間膜にも虫体が観察された。一方、腹部筋肉や肝臓などの他の臓器の漿膜に虫体は観察されなかった。

#### E. 参考文献

1. Zhu, X., R. B. Gasser, M. Podolska and N. B. Chilton (1998): *Int. J. Parasitol.*, **28**, 1911-1921.
2. Rambaout, A. (1996) Available at <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/>.
3. Berland, B. (1961): *Nematodes from some Norwegian marine fishes*, *Sarsia*, **2**, 1-50.
4. Koyama, T., A. Kobayashi, M. Kumada, and Y. Komiya (1969): *Jpn. J. Parasitol.*, **18**,

466-487 (in Japanese).

5. Nascetti, G., L. Paggi, P. Orecchia, J. W. Smith, S. Mattiucchi and L. Bullini (1986): *Int. J. Parasitol.*, **16**, 633-640.
6. Mattiucci S., G. Nascetti, R. Cianchi, L. Paggi, P. Arduino, L. Margolis, J. Bratley, S. Webb, S. D'Amelio, P. Orecchia and L. Bullini (1997): *J. Parasitol.*, **83**, 401-416.
7. Mattiucci, S., L. Paggi, G. Nascetti, H. Ishikura, K. Kikuchi, N. Sato, R. Cianchi, and L. Bullini (1998): *System. Parasitol.*, **40**, 81-92.
8. Mattiucci, S., L. Paggi, G. Nascetti, C. P. Santos, G. Costa, A. P. Di Benedetto, R. Ramos, M. Argyrou, R. Cianchi and L. Bullini (2002): *Syst. Parasitol.*, **51**, 159-170.
9. D'Aemio, S., K. D. Mathiopoulos, C. P. Santos, O. N. Pugachev, S. C. Webb, M. Picanoco and L. Paggi (2000): *Int. J. Parasitol.*, **30**, 223-226.
10. Abe, N., N. Ohya and R. Yanagiguchi (2005): *J. Helminthol.*, **79**, 303-306.
11. Abollo, E., L. Paggi, S. Pascual and S. D'Ameiilo (2003): *Infect. Gen. Evol.*, **3**, 175-181.
12. Nadler, S. A., S. D'Amelio, M. D. Dailey, L. Paggi, S. Siu and J. A. Sakanari (2005): *J. Parasitol.*, **91**, 1413-1429.
13. D'Amelio, S., K.D. Mathiopoulos, O. Brandonisio, G. Lucarelli, F. Doronzo, and L. Paggi (1997): *Parassitologia*, **41**, 591-593.

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産のの出願

なし



Table 1. Pairwise comparison of ITS1, 5.8S and ITS2 sequences between *Anisakis* species. The differences are presented as the absolute number of differences between numbered sequence pairs.

	Accession													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>Anisakis</i> sp. (present study)	-													
2 <i>A. pegreffii</i>	2	-												
3 <i>A. pegreffii</i>	0	2	-											
4 <i>A. pegreffii</i>	0	2	0	-										
5 <i>A. simplex</i> s.s.*	2	4	2	2	-									
6 <i>A. simplex</i> s.s.*	2	4	2	2	0	-								
7 <i>A. simplex</i> C	4	6	4	4	4	4	-							
8 <i>A. simplex</i> C	4	6	4	4	4	4	0	-						
9 <i>A. simplex</i> C	4	6	4	4	4	4	0	0	-					
10 <i>A. typica</i>	108	110	108	108	106	107	106	105	106	-				
11 <i>A. ziphidarum</i>	57	59	57	57	57	57	58	57	58	58	-			
12 <i>A. brevispeculata</i>	100	102	100	100	99	99	99	99	99	120	96	-		
13 <i>A. phyteteris</i>	99	101	99	99	99	99	100	100	100	124	90	36	-	
14 <i>A. phyteteris</i>	99	101	99	99	99	99	100	100	100	125	90	36	5	-

		275													300													
<b>A: ITS1</b>		A	G	C	A	G	C	A	G	C	T	T	A	A	G	G	C	A	G	A	G	T	C	G	A	G	C	
1	Asp Japan	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	Apg Italy	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	Apg Japan	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	Apg Japan	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	Ass Norway	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
6	Ass Japan	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
		455													480													
<b>B: 5.8S</b>		A	T	A	G	T	G	C	G	A	A	T	T	G	C	A	G	A	C	A	C	T	T	G	A	G	C	
1	Asp Japan	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	Apg Italy	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	N	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	Apg Japan	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	Apg Japan	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	Ass Norway	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	Ass Japan	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Fig. 1. Differences in the sequences of ITS (A) and 5.8S rDNA (B) among the present species (Asp), *Anisakis pegreffii* (Apg) and *A. simplex sensu stricto* (Ass) of different localities. The numbers on species correspond to those in Table 1.

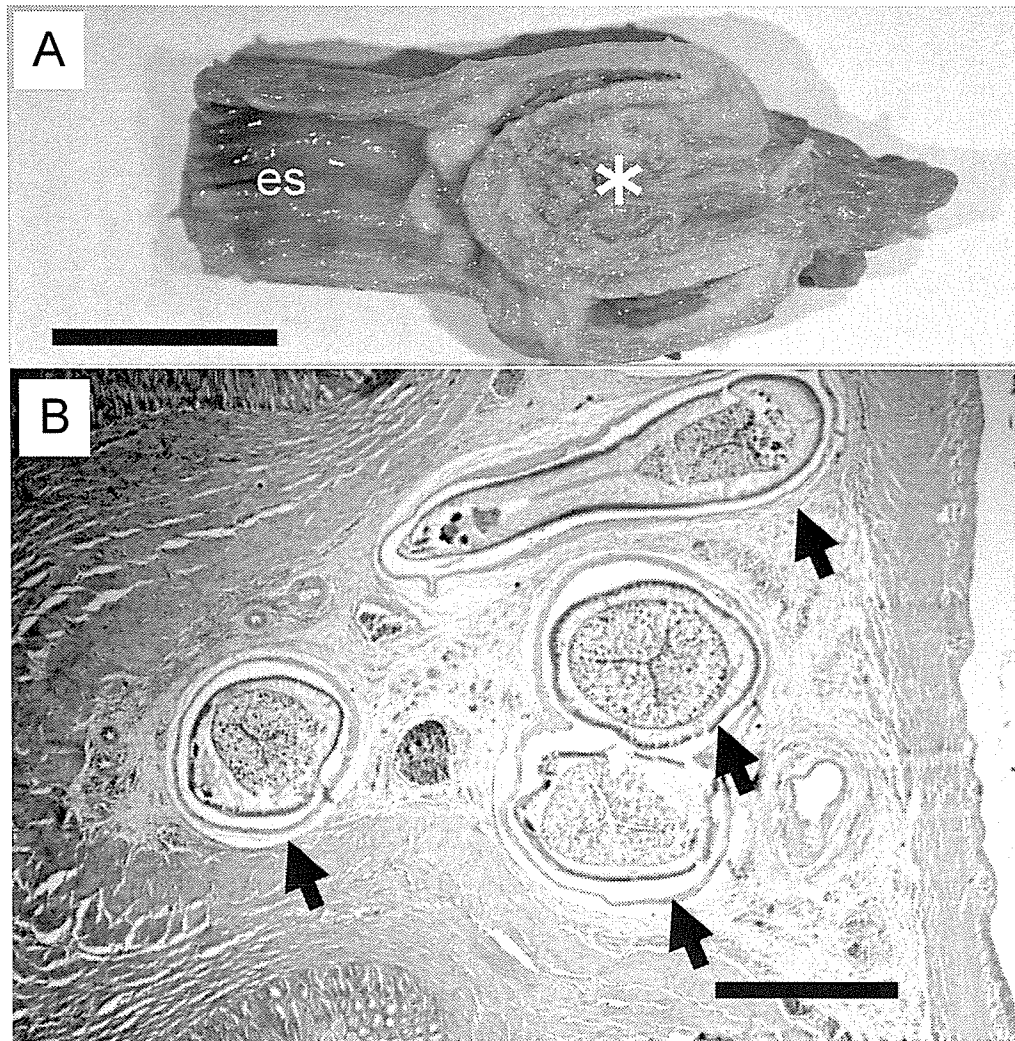


Fig. 2. The stomach of greater amberjack infected with anisakid larvae. A, a longitudinal section. A large cluster of worms (asterisk) was observed in the posterior stomach wall. es: esophagus. B, a histological section. Worms (arrows) were observed in the submucosa. Scale bars are 2 cm and 0.5 mm for A and B, respectively.

## 分担研究報告書（食品中の虫卵等編）

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

輸入食材からの寄生虫卵の検出方法の検討

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

研究の要旨：平成 17 年 10 月に、韓国及び中国において、キムチから寄生虫卵が検出されたというマスコミ報道があり、これらの国から日本に輸入しているキムチについて寄生虫卵汚染が問題となった。現在の日本では、ほとんどの検査機関で、かつて実施した野菜や漬物の寄生虫卵検査の経験の蓄積が失われている。そこで、国内外で実施されている野菜等の食品からの寄生虫卵検査法を、改めて文献的に検討した。そして、検査法として暫定的に適用した「食品衛生検査指針」の方法について、キムチを対象としたときの寄生虫卵の検出限界を検討した。また、回虫卵は、宿主体内より排出された後、外界で発育して幼虫包蔵卵となる事で感染性となる。実際の健康被害の可能性を推定する為に、異なる保存温度を設定した上でキムチ漬け汁内でのブタ回虫卵の発育状況を検討した。更に、昨年 11 月に輸入されたキムチから検出された回虫様の虫卵について DNA の特定領域の解析を試みたところ、形態学的特徴と塩基配列からヒト回虫 *Ascaris lumbricoides* 卵と判定された。

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

A. 研究目的

平成 17 年 10～11 月に起きたキムチの寄生虫卵等による「汚染騒動」は、中国と韓国との間で起きたものであるが、わが国へも「汚染キムチ」の輸入実績があったことから汚染実態の把握などの緊急対応が求められた。野菜やキムチなどの食材から寄生虫卵を検出する方法に関しては、我国においては 1950 年代に盛んに検討されていた。迅速・簡便な検査法の改良・開発のために、国内外の検査方法に関する文献を蒐集し内容を整理する。

B. 研究方法

文末に掲げた報告について検討を行なった。

C. 研究結果

野菜、土壌の中に存する蛔虫卵の浮遊検査法について笛木（1950）は回収した沈渣の量が多いので浮遊法がよいとしている。莓に付着する寄生蠕虫卵について清水（1952）は沈殿法によっている。今園（1953）は漬物の回虫卵検査を沈渣の沈殿法によった。Bier, J.W et al.（1991）は FDA のガイドラインで、また Robertson（2000）らは野菜と果物からの虫卵検出に沈殿法で、Rude（1982, 1984）はキャベツ、キュウリ、レタス、セロリ、にんじん etc. からの回収

に沈殿法で検出を行った。今回の問題の発端となった韓国においては、下記に示す沈殿法によって検査を行っている。

〔韓国で実施されている寄生虫卵検出法〕

- 1) 検体を 200 g ずつ分離する
- 2) 1.0 L detergent solution (0.5% Sodium Dodecyl Sulfate, 0.1% Tween 80) を入れて一時間程度沈漬液だけを残す
- 3) 沈漬液を 2 回茶漉しでろ過し、液量計に、集めた後 30 分間そのまま置いておく
- 4) 液量計の下部の沈殿物を 6 回繰返して蒸留水で洗浄する
- 5) 50 ml centrifuge tube に移して 1,500 x g で 10 分間遠心分離した後、上澄み液は捨てる
- 6) 沈殿物 (2~3 ml) を蒸留水で 2 回洗ってから残る沈殿物を 10% formaldehyde に 10 分間固定して鏡検する前まで保管
- 7) 沈殿物をスライドグラスに載せて顕微鏡で鏡検する (100 倍→400 倍)

注)厚生労働省食品安全部監視安全課情報:2006.3

#### D. 考察

わが国においては、野菜等に付着した回虫卵の調査報告は 1950 年代の初頭までで、その後は文献上での報告は殆ど実施されなくなる。1950 年代に回虫卵の検出法について、浮遊法を推奨しているのは苗木 (1950) のみであり、その他はほぼ沈殿法によっている。その後、検査法に関する新規の動きは 2002 年に東京都衛研の村田が浮遊法による溶媒の検討法を示すまで見られない。この中で村田らは浮遊法(村田:1997)による方法を基にしている。一方、今回のキムチ騒動の一方の当事者である韓国では、沈渣を全て鏡検する沈殿法によって検査を行っている。しかしながら何れの方法も、虫卵検出の可否が検査員の熟達の程度に相当依存することになると考えられる。

#### E. 結論

野菜等の蛔虫卵検出法について文献調査

を行った。その結果、主たる手法は沈殿によって得られた沈渣を全量について顕微鏡で観察する方法で、沈渣を浮遊法によって処理することを推奨しているのはむしろ少数であった。

#### F. 文献

1. イヌ回虫卵添加キムチからの効率的な虫卵検査法の検討:村田理恵、鈴木淳、柳川義勢、村田以和夫、東京衛研年報、53、10-13 (2002)
2. 野菜・果実、有機肥料、栽培土壌及び砂場からの寄生虫卵検査手法:村田以和夫、食品寄生虫ハンドブック、171-177 (1997)藤田絃一郎、村田以和夫 編者、Tokyo
3. 野菜、土壌の中に存する蛔虫卵の浮遊検査法について:笛木賢司、医学と生物学、16、58-60 (1950)
4. 蛔虫感染経路に関する研究:今園義盛、最新医学、8、718-729 (1953)
5. 武蔵野市に販売される苺に付着する寄生蠕虫卵について:清水重矢、医学と生物学、24、200-202 (1952)
6. 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 Isolation of parasites on fruits and vegetables.: Bier JW,. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1991 Dec;22 Suppl:144-5.
7. Isolation and enumeration of Giardia cysts, cryptosporidium oocysts, and Ascaris eggs from fruits and vegetables.: Robertson LJ, Gjerde B., J Food Prot. 2000 Jun;63(6):775-8. Recovery of eggs of two parasitic nematodes, Ascaris sp. and Trichuris sp.: Interlaboratory study.: Rude RA, Bier JW, Jackson GJ, McClure FD., J

Assoc Off Anal Chem. 1982  
Jan;65(1):79-81.

8. Survey of fresh vegetables for nematodes, amoebae, and Salmonella. : Rude RA, Jackson GJ, Bier JW, Sawyer TK, Risty NG., J Assoc Off Anal Chem. 1984 May-Jun; 67(3):613-5.

## 2. キムチ等の回虫卵に係る検査方法の信頼性に関する検討

### A. 研究目的

2005年11月、厚生労働省は、中国および韓国製造の食品から寄生虫卵および原虫類が検出されたとの情報を得たことから、所管検疫所に対して該当製造者製「キムチ、唐辛子みそ、焼肉用のたれ」を対象食品とするモニタリング検査の実施を指示し、その方法として『食品衛生検査指針・微生物編』に準ずるものを指定した（食安輸発第1102002号、同1107002号）。

しかしながら、この方法は食品中に混入した原虫類の検出を目的として作成されたものであり、より大型の寄生虫卵に対して適用された場合の検出感度は知られていない。そこでキムチへの虫卵添加・回収実験を行い、「キムチ等の寄生虫卵に係る検査」として指定された方法の検出力について検討を加えた。

### B. 研究方法

キムチへ添加する回虫卵は、キムチ漬け汁中における発育試験（本報告書）と同様、埼玉県産ブタ由来のブタ回虫 *Ascaris suum* 雌成虫から得た未成熟受精卵を用いた。今回の添加・回収実験では、回虫卵蛋白膜の強い粘着性による実験器具への付着ならびに回収時の損失を防ぐため、使用器具はすべて Sigmacote (SIGMA) を用いてシリコン処理を施した。

回虫卵の添加対象試料には市販の国産白菜キムチを用い、100 g あたりの上記回虫卵添加数がそれぞれ  $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  個となる A～E の 5 添加数級群を設けた。回収実験は各群につきそれぞれ 4 回行うこととし、群別の回収数（平均±標準偏差）を算出した。

キムチからのブタ回虫卵回収の方法は「食安輸発第 1107002 号・別添 1」の指示にしたがった。すなわち、回虫卵添加キムチ 100 g を界面活性剤（0.1% Tween 20）を加えた脱イオン水 500 ml 中において試験管ブラシを用いて洗浄した。次いで粗大夾雑物を取り除く目的で金属製茶漉しを通し、洗浄液をハルンカップへ回収した。洗浄液は 30 分以上静置後、水流ポンプを用いて上清を捨てて最終沈渣を得、全量について検鏡を行った。

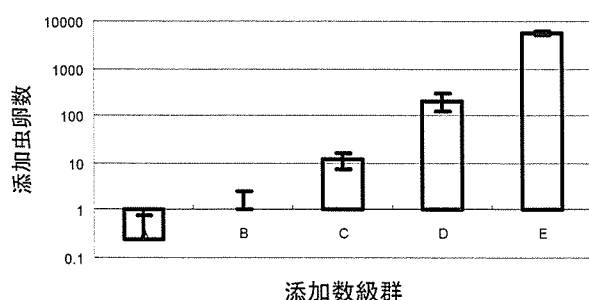
本法の検出力をみるため、まず添加虫卵数と回収虫卵数の関係を Pearson の積率相関を用いて検討した。添加・回収虫卵数はいずれも正規分布しないので常用対数への変換を行った。また、検出限界を推定する目的で回帰分析を行った。添加虫卵数を独立変数、回収虫卵数を従属変数として非線形最小二乗法（Marquardt 法）を用いて指数モデルを作成し、その式にもとづいて検出力を評価した。解析には市販ソフトウェア（S-PLUS 6.1 for Windows）を用いた。

### C. 研究結果

ブタ回虫卵添加キムチから虫卵回収結果を図に示す。 $10^0 \sim 10^4$  まで設けた添加数級群について回収実験をそれぞれ 4 回試行した場合の平均虫卵回収数±標準偏差は、A 群：0.3 ± 0.5、B 群：1.0 ± 1.4、C 群：11.5 ± 4.4、D 群：208.3 ± 88.2、E 群：5727.5 ± 566.4 であった。

添加虫卵数と回収虫卵数の相関に関する検討では、A・B の 2 群で回収虫卵数 0 の試行があったため、すべての例に +1 の操作を加えてから対数変換を行ったところ、

図 キムチ洗浄液沈渣からの添加回虫卵回収数



両者には強い順相関の関係が認められた ( $r=0.971$ ,  $n=20$ ,  $P<0.01$ )。

本法を回虫卵混入キムチに適用した際の感度を評価するため、添加虫卵数および回収虫卵数を用いて Marquardt 法による非線形回帰を行い、指数式、

$$Y=0.0101X^{.4388}$$

を得た。

この式を用いた場合、本法による最小検出数近似値 ( $Y=1.037$ ) は添加虫卵数 25 個 ( $X=25$ ) のとき得られた。この式は添加虫卵数  $10^0 \sim 10^4$  個までの回収結果にもとづくので、独立変数である添加虫卵数にきわめて大きい値を与えた場合は適合しない。しかし、モニタリング検査の目的は汚染が疑われる対象食品から虫卵を最低 1 個検出すれば果たされ、かつその予測値は実測値範囲内にあるので有効とみなした。

#### D. 考察

本研究では輸入キムチ等における寄生虫卵汚染のモニタリングを目的として実施される検査法の信頼性を評価した。実験的に回虫卵を添加したキムチに本法を適用した場合、添加数が大量の場合は虫卵は比較的よく回収されたものの、少量添加の場合は回収率が低いことが示された。本法の検出力は、虫卵汚染の程度により可変と考えられた。

本法をキムチ 100 g に適用した場合の検出感度は、指数モデルによる予測結果から

汚染虫卵数 25 個以上と推定された。輸入キムチにおける虫卵汚染程度は、陽性か陰性かの結果のみ報告され、具体的な検出数は与えられていないが、かつての回虫症高度流行時の日本での研究結果を例にとると、白菜漬物平均 61 g 中最大 9 個の虫卵が発見されている (小宮山, 1954)。すなわち 100 g あたり虫卵数は約 15 個である。この値が汚染虫卵全数を回収したものとは考えにくい。仮にこの数値が 100% の回収率であったと想定すれば (15 個程度という) 軽度の汚染食品に適用した場合、本法では偽陰性が多く、検出力の不足が指摘される。一方、回収率を 20~50% 程度と想定すると、100 g 中の虫卵数は単純計算で 75~30 個程度となり、かろうじて当該検査法の適用範囲と判断される。

ところで、食安輸発 1102002 号、同 1107002 号の別添に示された検査方法は目安として 100 g の試料を設定しているが、汚染が軽度な場合は被検試料が多量であるほどその中に含まれる虫卵数は多くなることから、より多量の検体を処理できる方法が望まれる。その際には、残渣量を極力減らす方向での改良が必要となる。今後、検査所での定型的業務として行う検査法として、上記指摘の問題点を解決した方法の開発が期待される。

#### E. 結論

キムチ等の回虫卵検査法として適用される方法について、ブタ回虫卵を用いて検出力を評価した。本法の検出限界はキムチ 100 g あたり虫卵 25 個以上と考えられ、感度の低さが指摘された。より簡便かつ高感度な検査法の開発が必要と考えられた。

#### F. 文献

1. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課輸入食品安全対策室長 (食安輸発第 1102002 号). 平成 17 年 11 月 2 日.
2. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視



安全課輸入食品安全対策室長(食安輸発第1107002号)、平成17年11月7日。

3. 小宮山隆三(1954) 漬物およびアイスキャンデー中の蛔虫卵の検出. 医学と生物学 33, 199-200.

### 3. キムチ漬け汁中におけるブタ回虫卵

#### *Ascaris suum* の発育

##### A. 研究目的

寄生虫の感染媒体として食品は大きな地位を占めている。寄生虫の感染源となる食品には、それ自体が感染体(虫卵あるいは感染期幼虫)の宿主であるものと、製造・加工の過程で感染体に汚染されるものとは大別される。たとえばヒト回虫 *Ascaris lumbricoides* は本来は土壌媒介性ではあるが、食品、とりわけ施肥によって汚染が生じやすい野菜類やその加工物である漬物類は、主要な感染経路のひとつであると言える。しかし、これら食品由来寄生虫は、公衆衛生行政の諸活動、原因食品の生産現場における技術的・環境的改変にともない、近年日本国内で製造される食品に限ってみれば、アニサキス症など魚介類由来の一部を除いて極めてまれな存在になってきた。

ところが、2005年10月、日本へも輸出実績をもつ中国産および韓国産キムチから複数の人体感染種を含む寄生虫卵が検出され、厚生労働省は輸入時の手続き保留ならびにモニタリング検査の実施を指示するに至った(食安輸発第1102002号)。だが、これら検出された寄生虫卵の感染性については言及されておらず、キムチとともに摂取された場合、消費者に健康危害を生じさせるかどうか明らかでない。上記のとおり、わが国の回虫症においては、加熱不十分な状態で摂食する機会が多い漬物類は「伝統的な」感染経路であり、かつては、回虫症予防と関連づけた基礎的研究として、ヒト

回虫や近縁なブタ回虫 *A. suum* の虫卵を用い、その発育動態が食塩・米糠・カラシなどの製造時添加物との関係から検討が進められてさまざまな知見が集積されている(森下, 1964b)。しかしながら、キムチに関しては、比較的最近になって消費量が増加した非加熱発酵食品であるため、混入回虫卵の発育の態度は不明である。そこで今回検討を加えたので報告する。

##### B. 研究方法

発育の観察材料には埼玉県内の食肉検査場で採集されたブタ回虫雌成虫に由来する虫卵を用いた。すなわち、雌成虫から採取した臍部および子宮最末端部を眼科鉗で細切後、滅菌蒸留水とともに15 ml 試験管に移して強く震盪、さらに100メッシュの茶漉しを通して虫卵を分離した。得られた虫卵の一部は光学顕微鏡下で観察し、蛋白膜の有無から受精卵であることを確認したうえで観察に供した。

虫卵培養液には、RPMI-1640 (SIGMA)、滅菌蒸留水、市販の国産白菜キムチ漬け汁、擬似キムチ漬け汁(pH 4.2 HCl)の4種を使用した。48穴平底プレート(IWAKI)1穴あたり上記の培養液を2 ml、ブタ回虫卵100個をそれぞれ加えた。さらに防黴を目的としてホルマリンを0.1%濃度となるよう添加した。観察数は培養液1種につき5穴とし、4°Cおよび室温の温度条件下で4週間まで培養を行った。観察は幼虫形成の有無についてのみ行い、その発育段階に関しては検討を行わなかった。

各培養液における幼虫形成率の差異の比較は、等分散性をBartlett検定で確認した上で、一元配置分散分析を用いて行った。各培養液間の形成率の多重比較にはScheffeの方法を用いた。統計解析には市販ソフトウェア(S-PLUS 6.1 for Windows)を用い、 $\alpha = 0.05$ 未満を有意とみなした。

##### C. 研究結果

培養液 4 種中におけるブタ回虫卵のそれぞれの発育状況を表に示した。室温保存では虫卵内における幼虫形成が確認されたのに対し、4°C 保存では観察終了時まで卵割等は一切認められず、単細胞卵にとどまった。前者幼虫はいずれも活発な運動性を示した。観察終了時点における各培養液の平均幼虫形成率±標準偏差は、RPMI-1640 が最も高く (96 ± 6%)、次いで滅菌蒸留 (95

± 5%)、擬似キムチ漬け汁 (82 ± 7%)、キムチ漬け汁 (79 ± 10%) の順であった。培養液間の幼虫形成率は有意に異なっていた (F = 6.974, P = 0.0032)。これをさらに多重比較した結果、形成率に有意な差を認めたのは RPMI-1640 とキムチ漬け汁 (F = 4.416, P = 0.019)、滅菌蒸留水とキムチ漬け汁 (F = 3.894, P = 0.029) の組み合わせであった。

表 各種培養液・保存温度におけるブタ回虫卵の幼虫包蔵卵形成率 (%)

A. 室温保存

	1 週間後	2 週間後	3 週間後	4 週間後
RPMI-1640	0 ± 0	13 ± 4	70 ± 11	96 ± 6
滅菌蒸留水	0 ± 0	15 ± 4	69 ± 12	95 ± 5
キムチ漬け汁	0 ± 0	8 ± 2	46 ± 5	79 ± 10
擬似キムチ漬け汁	0 ± 0	8 ± 2	43 ± 11	82 ± 7

B. 4°C 保存

	1 週間後	2 週間後	3 週間後	4 週間後
RPMI-1640	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
滅菌蒸留水	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
キムチ漬け汁	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
擬似キムチ漬け汁	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

D. 考察

固有宿主から糞便とともに排出された回虫卵は外界で発育し、幼虫を形成して感染性を有するようになる。消費者に健康危害を与えるのはこの幼虫包蔵卵を摂取した場合であり、未成熟卵は摂取したとしても感染が成立しない。そのため、食品を汚染している回虫卵がどの発育段階にあるかは、その食品の摂取によって引き起こされる健康被害の可能性を論じる上できわめて重要な事項である。

日本の伝統的漬物を想定した研究では、ほとんどの添加物が回虫卵の発育に大きな影響を及ぼすことはなかった (森下,

1964b)。今回の検討でも、室温条件下においた場合、キムチ漬け汁に浸漬したブタ回虫卵は幼虫形成率が有意に低かったが、発育の完全阻害あるいは死滅効果は認められなかった。幼虫包蔵卵形成率には差が認められたが、その原因として水素イオン濃度が考えられる。回虫卵の発育における至適 pH は中性域であり (森下, 1964a)、pH 4.2 ~ 4.5 のキムチ漬け汁や pH 4.2 の擬似キムチ漬け汁での幼虫形成率が中性の培養液と比べて低い値にとどまった。つまり、低 pH 条件で発育が遅延したことにより観察期間中の幼虫形成率が低下したものと考えられた。

次に温度条件であるが、キムチは低温発酵食品であり、製造時から流通の過程にいたるまで過度の発酵を抑制する目的で冷蔵条件下におかれる。今回の実験で4°Cでは幼虫形成がまったく認められなかったことから、原材料野菜が未成熟回虫卵で汚染されたのであれば、人体への感染性を有するまで発育する可能性は低いと思われた。しかしながら汚染回虫卵がすでに幼虫を包蔵するまで発育していた場合、低温下で保存・流通するキムチは虫卵の生存にとってきわめて良好な環境となる。これに加え、今回は代表的な寄生虫として回虫類に関して検討を行ったが、中韓両国の発表では複数種の寄生蠕虫・原虫が検出されている。これらの中には回虫と異なり、宿主体外へ排出された時点ですでに感染性を有するものも含まれている。一般に寄生虫卵は低温に対する抵抗性が高く、幼虫形成卵による汚染の場合と同様、冷蔵で流通によって感染性を長期間維持し、消費者に健康危害を起す可能性がある。

現在、キムチのような加工食品のみならず、多くの農産物が海外から日本国内へ輸入され消費されている。それにもかかわらず、原産国でどのような寄生虫が流行しているのか情報が不十分な場合が多く、輸入食品を原因とする新たな寄生虫症の国内発生が危惧される。

#### E. 結論

キムチ漬け汁に添加したブタ回虫未成熟卵について、異なる保存温度を設定し、発育状況の差異に関する検討を行った。その結果、虫卵の発育阻害作用はキムチ漬け汁そのものによっては期待できないことが明らかになった。

#### F. 文献

1. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課輸入食品安全対策室長 (2005) 輸入キムチ等の取扱いについて (食安輸発

第 1102002 号). 平成 17 年 11 月 2 日。

2. 森下薫 (1964a) 回虫の生物学に関する研究—その形態・生態・生化学・発育及び感染—. 日本における寄生虫学の研究 4 (森下薫・小宮義孝・松林久吉編), 財団法人目黒寄生虫館, pp 1-64.
3. 森下薫 (1964b) 回虫の疫学及び予防の基礎的研究. 日本における寄生虫学の研究 4 (森下薫・小宮義孝・松林久吉編), 財団法人目黒寄生虫館, pp 65-197.

### 4. 輸入キムチから検出された回虫様卵の分子同定

#### A. 研究目的

厚生労働省の新興再興感染症事業「輸入蠕虫疾患の疫学および予防に関する研究」班では、国内で流通・市販されている輸入キムチの寄生虫卵検査を実施し、29 検体のうち 11 検体から何らかの寄生虫卵を検出した<sup>1)4)</sup>。検出された虫卵の中には、回虫卵に極めて類似したものも見られた。この虫卵 (1 個) の分与を受けたので、当該研究ではその種同定を目的に塩基配列の解読・解析を試みた。

#### B. 研究方法

虫卵から、まず DNA の抽出を試みた。方法は既報に準じた<sup>5)</sup>。すなわち、虫卵に SDS (最終濃度 0.5%) とプロテイナーゼ K (最終濃度 0.1mg/ml) を加えてタンパクを変性溶解し、エタノール沈殿により DNA を精製回収した。DNA 量を分光光度計で測定した後、リボソーム DNA の ITS-1 領域を標的として PCR 増幅した。プライマーには、線虫類からの PCR 増幅に汎用されている NC5 (フォワード, 26-mer) と NC13R (NC13 に相補的な配列のプライマー, リバース, 18-mer) とを用いた<sup>6)</sup>。得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動し、更にゲルから標的の

ラグメント (約 520bp) を回収した。これを PCR に使用した各プライマーでサイクルシーケンス用に蛍光標識し、塩基配列を解読した。配列の解析には、市販のプログラム (GENETIX-WIN) を活用した。人体症例由来の回虫卵 (含子虫卵に発育させた後に -80°C で保存, 約 10,000 個) から同様に DNA を抽出し, PCR の後に塩基配列を解読して比較した。

### C. 研究結果

キムチ由来の回虫様卵から抽出された DNA 量を知るため, 虫卵 1 個に由来する DNA 抽出液を総量 50  $\mu$ L とし, 波長 260nm で吸光度を測定した。その値は 0.0471 を示し, すべて核酸と仮定するならば, その量は約 118ng と算出された。この DNA をテンプレートとして PCR を行った。その結果, 予想サイズと一致する約 520bp のフラグメント

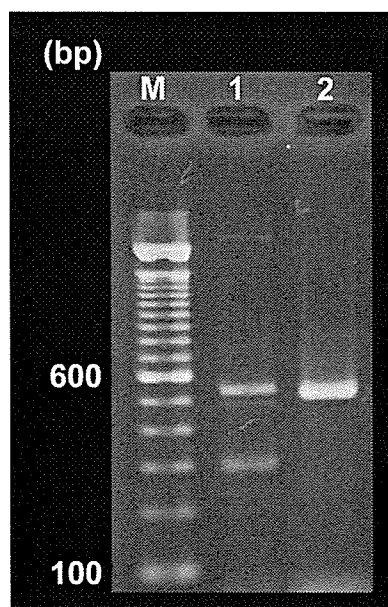


図 1 キムチ由来虫卵の DNA (レーン 1), 人体症例由来の回虫卵 DNA (レーン 2) をテンプレートとする PCR 産物のアガロースゲル電気泳動所見。線虫類のリボソーム DNA・ITS-1 領域の増幅に汎用されている NC5 と NC13R とを用いて PCR 増幅させた。塩基配列の解読には, 約 520 bp のフラグメントをゲルから切り出し, これをテンプレートとした。フラグメントのサイズは DNA マーカー (レーン M, 100 bp ラダー, Invitrogen) で推定した。

が増幅された (図 1)。これよりも小さいサイズのフラグメントも増幅されたので, 約 520bp のフラグメントだけをゲルから切り出し, これを材料に塩基配列を解読した。その結果, プライマー領域を除いた PCR 産物のサイズは約 480bp である事が分かった。

人体症例由来の回虫卵の配列も約 480bp であった。キムチに由来する虫卵の配列と比較したところ, 両者は完全に一致した。この配列を用いて, ホモロジー検索を行った。その結果, ヒト回虫 *Ascaris lumbricoides* (GenBank Accession No. AB110019) の配列とは, 一箇所を除いて完全に一致した (図 2, GenBank に登録されている回虫の配列に 1 塩基の欠失を認めた)。回虫に次いで相同性が高かったのはブタ回虫 *A. suum* (AB110022) であった。しかしながらブタ回虫とは 6 箇所に違いが認められた。すなわち, 4 箇所で塩基が相違し, 2 箇所でブタ回虫に 1 塩基ずつの付加が見られた (図 2)。

以上の結果から, キムチに由来する回虫様の虫卵は, ヒト回虫 *A. lumbricoides* の虫卵であると判定した。

### D. 考察

本研究で用いたキムチ由来の虫卵は, 形態学的にも回虫卵と極めて良く類似する事が示唆されていた<sup>4)</sup>が, 虫種の確定には至っていなかった。そこでこの虫卵から DNA を抽出し, リボソーム DNA の ITS-1 領域を PCR 産物として増幅させ, 塩基配列を解読して種の同定を試みた。その結果, 虫卵はいずれもヒト回虫と判定する事ができた。回虫とブタ回虫とは形態鑑別が難しく, 加えて今回の検索材料はキムチからの検出虫卵で, 鑑別は一層困難であった<sup>4)</sup>。このような加工食品由来の材料を対象として種同定・鑑別を行う場合には, 本研究で示したような分子同定が極めて有用と考えられた。

線虫類の種の同定や鑑別には, ITS-2 領域の配列が指標として頻用されている<sup>3)</sup>。