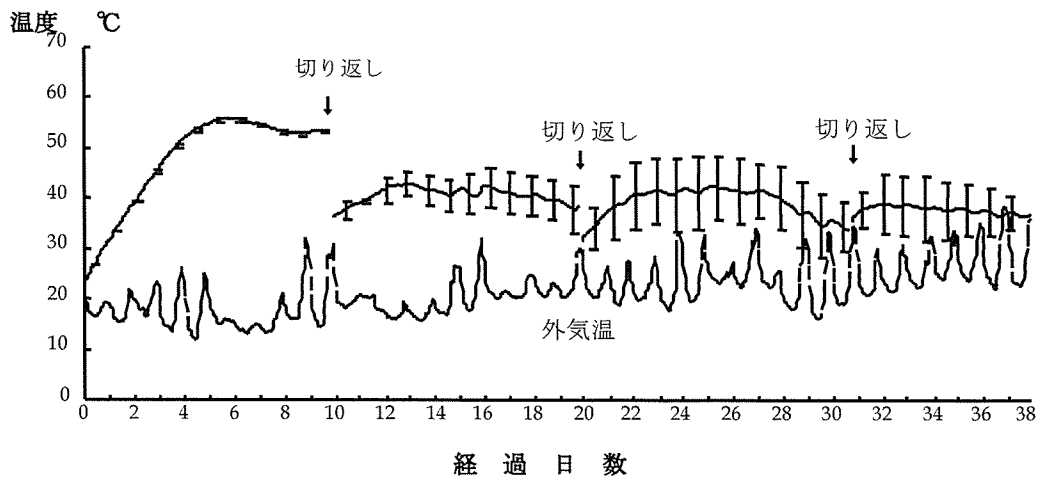


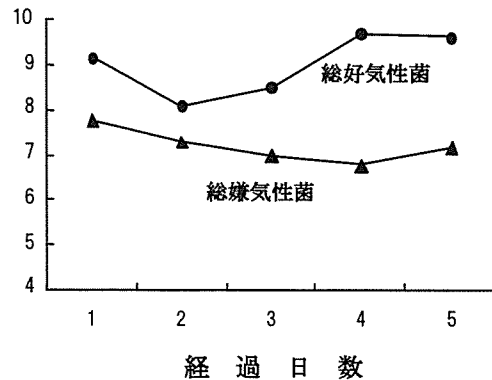
れる。しかし、その中で生残したものもあり、堆肥の品温が低下後に再増殖がみられた。腸管由来の細菌の多くは中温菌であるため、堆肥化過程の温度上昇による殺滅効果は期待できるものの、堆肥温が低下した後に再増殖する可能性は否定できない。この例に限らず、最終堆肥製品中に多くの中温菌が残存している例も見られ、堆肥化過程の温度上昇によって中温菌のすべてが死滅・除去される訳ではなく、腸管由来の

図 2 堆積堆肥化過程における温度推移



病原菌が生残する可能性には十分に留意する必要がある。

図3 総嫌気性菌および総好気性菌の推移 (37 °C)



コンポスト化： 堆積方式のコンポスト化実験の結果を示す。ここでは、牛糞と敷き藁に戻し堆肥を混合して約 1 m<sup>3</sup> を堆積し、雨の当たらない条件において。温度変化を図 2 に示した。約 10 日間隔で切り返し（攪拌）

を行った。切り返しを繰り返すにしたがって、水分含量が低下し、品温の上昇が鈍った。

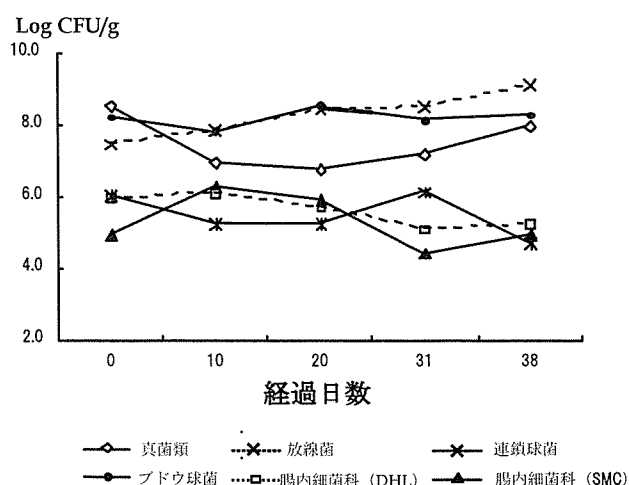
37°Cの培養で検出された中温菌数を図 3 および図 4 に示した。1 回目の堆積では好気性菌および嫌気性菌ともに減少したが、切り返し後のその後の堆積では好気性菌の数は上昇した。これを詳しく見てみると、真菌はそれぞれの堆積過程で減少したが、

その後回復・上昇している。

放線菌は増加し続け、ブドウ球菌および連鎖球菌ともに1次堆積で減少する傾向があったが、その後はほぼ横ばい状態を保っていた。Enterobacteriaceaeは2種の培地で測定したが、いずれの条件でも1次堆積で増加しその後は減少する傾向にあった。すなわち、これらの中温菌は、Enterobacteriaceaeを除いて1

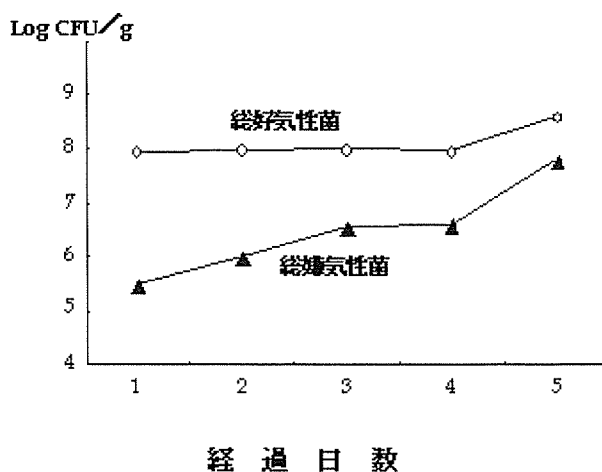
次堆積時の高温の影響を受けたことが明らかであった。

図4 堆積堆肥化過程における微生物叢推移



55℃の培養で検出された高温菌を図5および図6に示す。好気性菌はほぼ横ばいで、最終堆積で上昇し、嫌気性菌は増加していた。高温の真菌は若干減少傾向にあったが、最終堆積で増加していた。高温性のブドウ球菌も増加傾向が認められた。これらのことから、

図5. 高温性の嫌気性菌および好気性菌の推移 (55℃)



から、高温性の細菌および真菌は堆肥化過程で繰り返される高温状態の中で、選択されて増加していると考えられる。好気性菌のデータを比較すると、堆肥化過程を通して常に中温菌の数は高温菌を上回っており、高温菌が優占種となることはなかった。

他のスクープ方式と堆積方式の堆肥施設の温度変化と中温菌および高温菌の推移を観察した(図7)。施設による差はあるものの、品温の上昇に伴って中温菌は減少して高温菌が増加することが一般的であった。しかし、中温菌から高温菌へのシフトは明確なものではなく、堆肥化後期においても中温菌は残存しており、高温菌が絶対的な

優占種になることがないことは注目すべき現象と考える。

堆肥化過程を「病原菌などの中温菌が殺滅されて高温菌が支配する世界」と位置づけがちであるが、堆肥化は実に曖昧な世界であり、病原細菌を含む中温菌が完全に殺滅されるといった厳格な世界ではない。

また、攪拌と通気を行っていたスクープ方式においても、多数の嫌気性菌が検出されており、堆肥化過程は「好気性菌の世界」でもないことが示された。

図6. 高温性の真菌およびブドウ球菌の推移 (55°C)

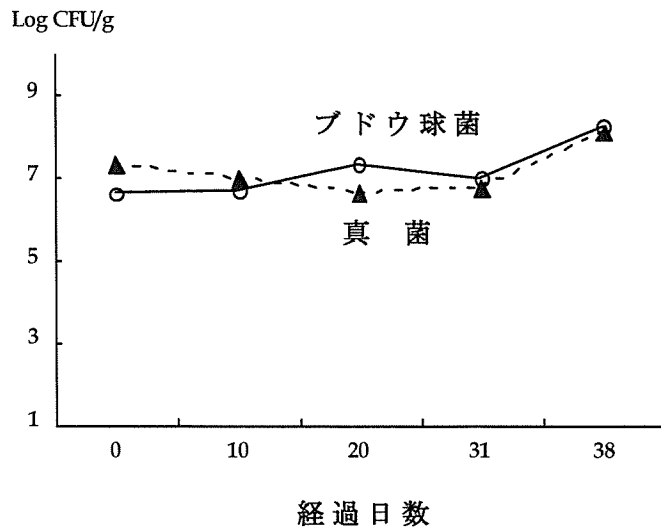
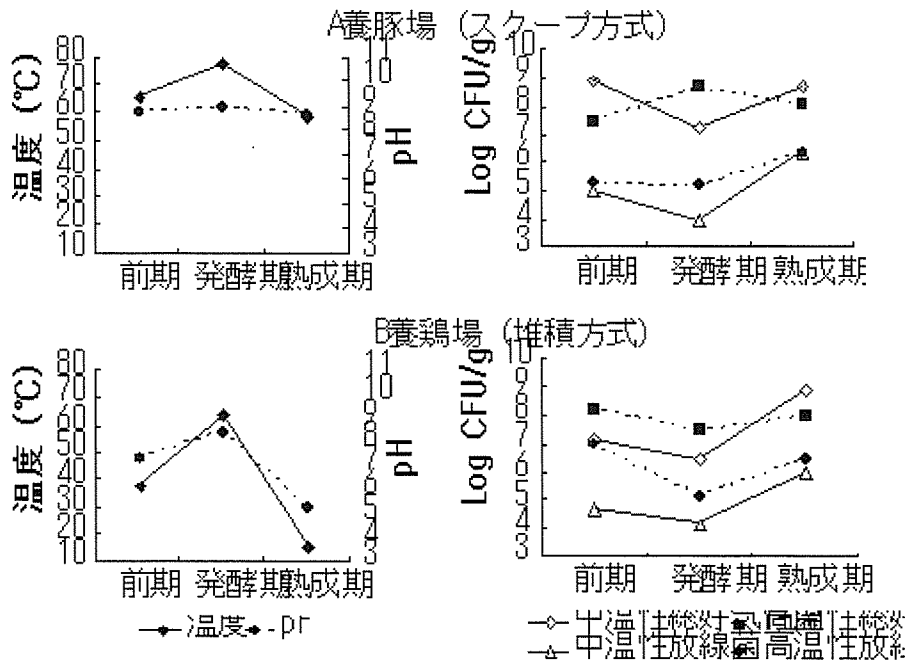


図7 他の農場の堆肥化過程における温度、pH、総好気性菌数および放線菌数の変化



これらの研究では、細菌の大まかグループ分けを行ってその数の変化を観察したが、

実際はグループ内で微生物の種や株の消長・増減が起こっているものと思われる。すなわち、発酵期から分離された放線菌と熟成期から分離された放線菌が同じ種の同じ性質の株の放線菌である保証はない。

#### (b) 遺伝子解析法による微生物群集の観察

これまでの微生物群集の解析は、もっぱら何らかの培地を用いてそこで増えてきた微生物の数や性質を解析するものであった。しかし、近年、微生物を培養せずに遺伝子を解析することによって、微生物の群集構造を解明することが行われている。これにはいくつかの方法があるが、しばしば PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法を用いた解析が用いられている。これは、微生物の遺伝情報である DNA を取り出し、その塩基配列を直接に増幅して、特殊な加工をした後に、電気泳動法で解析する手法である。この方法を用いることにより、1塩基の DNA の違いを持つ微生物を区別することが可能とされる。この方法により、1つのサンプルに含まれる微生物群集のうち数が多い方から 10 種程度の優占種の情報を容易に得ることができる。すなわち、その場に存在する微生物でベスト 10 に入る種の名前を探ることができる。

この方法を用いて数種の堆肥を解析したところ、堆肥化開始時には広範なグループに属する微生物種が存在するものの、堆肥化の進行に伴い微生物群集構造は分類学的に近接化し、優占種が特定のグループに収束する傾向が示されている。高温期以降の優占種は *Bacillus* 属の細菌であったが、下水汚泥の堆肥化では CFB グループの細菌種が明らかに優占となった。しかし、これらの優占種は *Bacillus* 属や CFB グループに属すものの、堆肥化過程の進行に伴って種レベルでの推移が存在することも明らかになった。すなわち、堆肥化過程において、大きな流れとして優占となる細菌種は特定のグループのものとなるが、グループ内における優占種はめまぐるしく変化することを示すものであった。

#### 4. 堆肥過程への微生物の接種

微生物資材は多種が販売されている。羽賀 (2003) がまとめた家畜ふん尿に関する各種添加資材一覧から主原料として微生物を含むものを抜き出してみた。総計で 94 種に上り、そのうち、微生物のみを使用しているものが 44 種、微生物に酵素を添加しているものが、10 種、その他の米ぬかやミネラルなどを添加しているものが 40 種であ

った。1 菌種のみを使用しているものが、細菌では 11 種、酵母では 6 種、真菌では 1 種であり、2 菌種を使用しているものが 4 種、3 菌種以上を使用しているものが 10 種、種数が不明であるものが 62 種あった。

この中の 1 つの微生物資材とこの微生物資材を用いた堆肥化過程のサンプルを入手し、優占となる微生物種を PCR-DGGE 法を用いて解析を行った。その結果、微生物資材中の優占種および微生物資材を単体で培養したときに出現する優占種は、堆肥化過程の優占種としては検出されなかった。すなわち、供試した微生物資材中の微生物が堆肥化過程でベスト 10 に入るほどには増えなかったことを示している。しかし、数としてベスト 10 に入らない細菌種であっても、堆肥化過程でなんらかの機能を発揮することは十分に想像でき、微生物資材中の優占種の働きを否定するものではない。汚水処理過程の観察からはその過程でアンモニア酸化が十分に行われ、アンモニア酸化細菌が分離培養できるにもかかわらず、ほとんどの施設においてアンモニア酸化細菌は優占種ではなかった。このことと同じ様に、微生物資材の微生物が少数でなんらかの機能を発揮している可能性も十分あり、今後、機能性遺伝子をターゲットとした解析などにより、詳細を明らかにする必要があると考えている。

家畜排泄物の堆肥化の場合には、膨大な種類の化合物が含まれており、微生物は基質をめぐる競争、共同を繰り広げ、さらに分解産物を標的に新たな微生物が参入する。また、堆肥化過程においては、温度や酸素濃度、微生物によって作り出される化学物質の種類や濃度がめまぐるしく変化しており、微生物の増殖は刺激、または抑制され、微生物群集を構成する微生物の種は時々刻々変化するいわゆる動的平衡状態を形成しているものと判断される。

## 参考文献

1. 「微生物を活用した堆肥化大全」中井裕監修著. 肉牛新報 (2004)
2. 「糞尿処理対策ブック」羽賀清典監修. チクサン出版 (2004)
3. 「動物環境レメディエーション」扇元敬司・中井裕編著. 養賢堂 (1999)
4. 中井裕. 感染リスクを低減させるふん尿処理技術. 「21世紀へのマニユア・テクノロジー」市川治他編著、89-98、酪農学園大学エクステンションセンター (2000)
5. 「新畜産ハンドブック」扇元敬司・中井裕ら編. 講談社 (1995)
6. 「応用動物科学ハンドブック」扇元敬司監修. チクサン出版 (1995)
7. 「動物生産学概論」扇元敬司・中井裕ら共著. 川島書店 (1992)
8. 「畜産衛生学」扇元敬司・柏崎守・中井裕著. 川島書店 (1989)
9. Sasaki H, Maruyama G, Suzuki H, Nonaka J, Sato M, Sasaki T, Ohta M, Nakai Y. Distribution of ammonia-assimilating bacteria in the composting process. *Compost Science and Utilization.*, in press (2004)
10. Sasaki H, Kitazume O, Sasaki T, and Nakai Y. Ammonia-assimilating microbes in microbial community in a lagoon for wastewater from paddock of dairy cattle. *Animal Science Journal.*, 75: 79-84 (2004)
11. Sasaki H, Maruyama G, Suzuki H, Nonaka J, Sato M, Sasaki T, Ohta M, Nakai Y. Characterization of ammonia-assimilating bacteria in a lagoon for wastewater from a paddock of dairy cattle. *Animal Science Journal.*, 73(1):73-76 (2002)
12. Nakai Y, Niino T, Ando T, Kohda C. Microorganisms aerobically degrading skatole and indole in composting processes. *Animal Science Journal.*, 70(1): 32-37 (1999)
13. Nakai Y, Abe T, Kohda C, Ando T. Characteristics of water and microorganisms of a lagoon system for the wastewater from the paddock of dairy cattle. *Animal Science Journal.*, 70(1): 38-42 (1999)
14. Nakai Y, Yabiku A, Ando T, Kohda C. Facultatively anaerobic bacteria degrading skatole or indole isolated from compost. *Animal Science Journal.*, 70(5): 367-369 (1999)
15. Nakai Y, Abe T, Kohda C, and Ando T. Water Characteristics and Microbial Flora in a Lagoon System for Wastewater from a Paddock of Dairy Cattle. *Animal Science Journal.*, 71(1): 38-42 (1999)
16. Kohda C, Ando T, Inamoto T, Nakamura S, Nakai Y, Ogimoto K. Identification of genus *Clostridium* isolated from the rumen of Malaysian water buffalo. *Anim. Sci. Technol.*, 69(3): 271-275 (1998)
17. Nakai Y, Saito M, Nakatani M, Kohda C, Ando T, Inamoto T, Ogimoto K. Changes in microbial flora of animal faeces after excretion. *Anim. Sci. Technol.*, 68(2): 138-143 (1997)
18. Kohda C, Ando T, Nakai Y. Anaerobic microorganisms degrading 3-methylindole (skatole) and indole in composting processes. *Anim. Sci. Technol.*, 68 (11): 1045-1051 (1997)

19. Kohda C, Ando T, Nakai Y. Isolation and characterization of anaerobic indole- and skatole-degrading bacteria from composting animal wastes. *J.Gen. Appl. Microbiol.*, 43: 249-255 (1997)

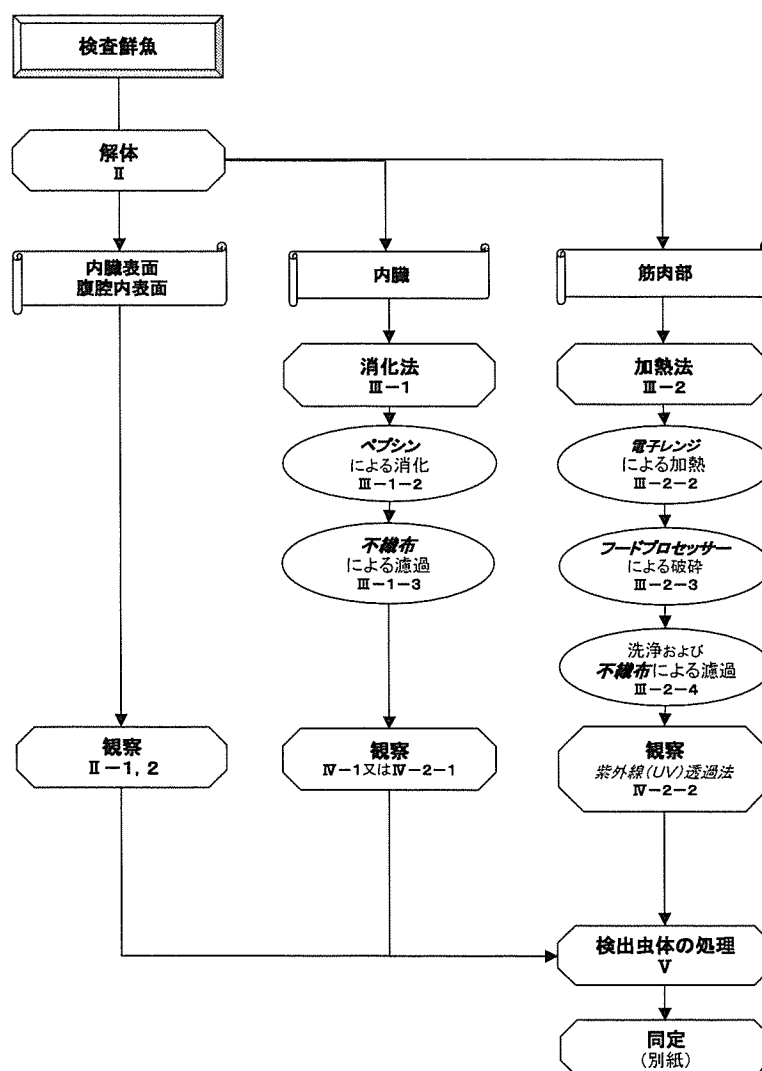
# 検査マニュアル



## 鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル

魚介類に寄生するアニサキス幼虫（以後、アニサキスと称す）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、いくつかの方法が記載されている。検査法の選択は、対象となる魚の種類、大きさ、検体数、検査の目的などを考慮してなされる。本マニュアルは、比較的大型の鮮魚を対象とし、しかも多数の個体について食品衛生上の検査が必要な場合に、アニサキスを検出する為の高い効率と精度を併せ持つ改良法として作成したものである。検査は、解体と観察、前処理（内臓部は消化法、筋肉部は加熱法）、虫体の検出（直接観察および紫外線（UV）透過法）という手順で進める。検出された虫体の種同定に関しては、専門家に依頼するのが一般的なので本マニュアルとは別に述べる。

### マニュアルのフローチャート



## I. 器材と試薬

### I-1. 装置器具

1. 暗箱付き卓上 UV 照射装置 (UV ランプの波長 : 365nm)
2. フードプロセッサー  
(注 : プラスチック刃 [パン生地用の羽根] 装着のものに限る。金属刃を装着するとアニサキスは細切されてしまうので、検出には用いる事が出来ない)
3. 電子レンジ
4. 振盪恒温水槽 (37°Cに設定)、又は恒温器 (37°Cに設定、この場合スターラー及び大型回転子を併用する)
5. 実体顕微鏡
6. 重量はかり
7. 定規、又は巻き尺
8. 解剖刀 (大型魚種を検査する場合は出刃包丁)
9. まな板
10. バット (各種)
11. 耐熱皿
12. ラップ
13. ビーカー (3,000ml を含む各種、ガラス製、又はプラスチック製)
14. 不織布製水切り袋 (台所用市販品、以下「不織布袋」と称す)
15. 洗浄瓶
16. メスシリンダー (500ml を含む各種)
17. ハサミ
18. ピンセット
19. 有柄針 (針の先端を L 字形に曲げる)
20. ガラスシャーレ (直径 15cm を含む各種)
21. 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)
22. UV 防御の為の手袋、又はクリーム

### I-2. 試薬の調製

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

(注：塩酸を水に加えて攪拌した後に、ペプシンを加えて完全に溶かす)

3. 検出虫体の固定液：70%エタノール

## II. 解体と目視による観察

検査対象の魚を解体し、虫体の検出操作(III 前処理 及び IV 虫体の検出)に進むために、内臓部と筋肉部に分ける。解体作業時にも虫体(体長 10~40mm)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) 魚種と重量及び体長を記録する。
- 2) 頭部を切り離し、腹部を開く。
- 3) 内臓をまとめて切り離し、バットに移す(内臓部は、II-2 内臓部の観察へ)。
- 4) 内臓を取り除いた後の腹腔の表面全体を観察し、アニサキスの有無を調べる。
- 5) 検出された虫体は、V (検出虫体の処理)に従って処理する。
- 6) 身を3枚におろし、皮をはぎ、半身(以下、フィレーと称す)2枚と中骨とする。
- 7) 得られたフィレーは、III-2 (加熱法)に従って前処理を行う。

### II-2. 内臓部の観察

- 1) 胃を他の臓器から切り離す。
- 2) 胃を切開して内腔と胃壁を観察しアニサキスの有無を調べる。
- 3) その他の臓器の表面を観察して、アニサキスの有無を調べる。
- 4) 検出された虫体は、V (検出虫体の処理)に従って処理する。
- 5) 目視による観察終了後、内臓部はすべてIII-1 (消化法)に従って前処理を行う。

## III. 虫体検出のための前処理

### III-1. 消化法

検査材料を人工胃液に浸漬し 37℃で加温・攪拌する。組織を消化して虫体を分離検出する。

#### III-1-1. 適用部位：

主として内臓に適用する。

#### III-1-2. 消化処理：

- 1) 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幅 2~3 cm 以下に切り刻み、適当な大きさのビーカーに入れる。

- 2) 内臓の重量に対して5～10倍の人工胃液を注ぐ。
- 3) 振盪恒温水槽または恒温器（スターラーと回転子使用）を37℃に設定し、攪拌しながら十分な消化処理を行う。  
(注：一般に魚介類の検査に用いる人工胃液のペプシン濃度は、0.1%で十分有効であるが、1%程度まで増量することにより消化時間を短縮できる事もある。攪拌装置を用いて振盪・攪拌が出来ない場合には、時々かき混ぜながら長時間処理（例えば1晩）を行う。)
- 4) 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-1-3. 虫体の回収：

- 1) ろ過の為に不織布袋をビーカーに、セットする。
- 2) 消化処理が終了したサンプル液を、不織布袋内に注ぐ。消化処理に用いたビーカー及び回転子を水で良くすすぎ、すすぎ液も同様にビーカーに注ぐ。
- 3) 不織布袋を持ち上げて自然に水切りをする。
- 4) ろ液を捨て、ビーカー内に新たに水を静かに注いで、不織布袋内のサンプルを洗浄する。
- 5) 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す。
- 6) アニサキスの有無を、Ⅳ-1（直接観察）及びⅣ-2-1（UV透過法）で調べる。

## Ⅲ-2. 加熱法

魚の筋肉部は、適当に加熱することによって均質に破碎することが容易となり、水に懸濁した際の濁りも抑える事が出来る。そこで、電子レンジを用いた短時間加熱を行い、その後フードプロセッサーで均質に破碎して、検査用サンプルを調整する。

### Ⅲ-2-1. 適用部位

筋肉部に適用する。内臓部には適用しない。

### Ⅲ-2-2. 加熱操作

- 1) フィレーを切り、適当な大きさの切り身として耐熱皿に載せる。
- 2) サンプルの大きさと、使用する電子レンジの能力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切り身を用いて、筋肉が容易にほぐれる加熱時間を求めておく。
- 3) サンプルとなる切り身を、耐熱皿に並べてラップをかけ、2)により設定した時間で加熱する。切り身が厚い場合は途中で反転し、均一に熱が通るようにする。

### Ⅲ-2-3. 破砕処理

- 1) プラスチック刃（金属刃でない事を確認）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) スイッチを入れて作動させ、切り身を破砕し筋肉懸濁液（破砕サンプル）とする。  
（注：筋肉を均一に破砕するためのフードプロセッサーの作動時間は、短い方が望ましい。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。）

### Ⅲ-2-4. 破砕サンプルの洗浄

調整した破砕サンプルを温水（30～40℃）ですすぎながら洗浄する。脂肪分など懸濁液の濁りの原因を除去し、アニサキスの検出効率を高めるための処置である。

- 1) 適当な大きさのビーカーに不織布袋をセットする。
- 2) フードプロセッサーから破砕サンプルを不織布袋内に移す。
- 3) 洗浄瓶を用いて、フードプロセッサーの内部、フタ、刃などを水で洗い、洗浄液を不織布袋内に流し込む。
- 4) 不織布袋を静かに持ち上げて水を切り、ビーカー内のろ液を捨てる。ビーカーに温水を入れ、破砕サンプルの入った不織布袋をそれに浸して静かに攪拌し、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。
- 5) 不織布袋を引き上げて自然に水切りをし、袋を切り開いて袋の中の破砕サンプルをバットにのせる。不織布に虫体が付着する事があるので、不織布も検査対象とする。
- 6) 虫体の検出操作は、Ⅳ-2-2（UV透過法）に従う。

## Ⅳ. 虫体の検出

### Ⅳ-1. 直接観察

アニサキスは、特別な操作をしなくても肉眼で検出できる場合が多いが、虫体であるかどうか紛らわしい場合には、実体顕微鏡による確認が必要である。開腹時（Ⅱ-2）には、内臓表面などに渦巻状態で被囊しているか、あるいは遊離した状態で見出されることがある。また、内臓の消化の際（Ⅲ-1）には、活発に運動をする生きたアニサキスが検出されることがある。検出された虫体は、Ⅴ（検出虫体の処理）に従って処理する。

### Ⅳ-2. UV透過法

UV照射によって、アニサキスの表皮（クチクラ層）が蛍光を発するという性質を利用する。虫体が発する青白色蛍光は、UV防御のフィルターを通して容易に目視することが出来る。

#### IV-2-1. 消化法で前処理したサンプル

- 1) 消化法(Ⅲ-1)により得られたサンプルを直接観察した後に適用する。アニサキスの運動性が弱い場合、本法によって初めて検出されることもある。
- 2) 不織布に虫体の付着がないかどうかをチェックする。
- 3) 検出された虫体は、V(検出虫体の処理)に従って処理する。

#### IV-2-2. 加熱法で前処理した破砕サンプル

- 1) 加熱法(Ⅲ-2)で処理した破砕サンプルは、適当な大きさのガラスシャーレなどに一定量ずつ入れる。
- 2) 水を加えて、破砕サンプルを容器全体に均一に広げる。  
(注：容器に入れる1回分の破砕サンプル量は水を加えた時に光が透けて見える程度とする。入れ過ぎると観察しにくくなり、虫体検出の精度が落ちる。)
- 3) 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する。
- 4) 水で薄めた破砕サンプルを、暗箱中の卓上紫外線照射装置の上に載せて観察する。  
(注：ピンセットか有柄針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とよい。蛍光の有無により虫体と筋肉残渣とを識別するのは困難ではないが、魚体由来の骨や鱗などもUV照射により蛍光を発することがあるので注意を要する。判別に慣れるまでは、蛍光を発するもの全てを採取し、実体顕微鏡下で虫体かどうかを観察する。)
- 5) 上記操作を繰り返し、すべての破砕サンプルを観察する。
- 6) 最後に不織布に虫体の付着がないかどうかをチェックする
- 7) 検出された虫体は、V(検出虫体の処理)に従って処理する。

### V. 検出虫体の処理

- 1) 検出された虫体は、生理食塩液を入れた小型シャーレに有柄針等で移す。
- 2) 実体顕微鏡下で虫体を観察し、その表面に付着したゴミなどを良く洗う。
- 3) 虫が活着している場合は、60~70℃程度に加熱した70%エタノールに浸漬して伸展させて固定し、液が常温となった後に新しい70%エタノールと交換する。
- 4) 虫体に運動性がない場合は、常温の70%エタノールで固定を行なう。
- 5) 70%エタノールに入れた虫体は、密閉容器に入れて室温で保存する。
- 6) 虫体の同定については、別紙を参考にする。

## 別紙 虫体の同定

### I. アニサキス類幼虫の形態同定

アニサキス科線虫幼虫はある程度まで形態学的に種同定が可能である。日本近海産の魚介類からは多くの種が報告されているが、ここでは検出の可能性が最も高く、かつ人体感染例も多いアニサキス I 型 (*Anisakis simplex*) について述べる。近年の研究の進展から、形態学的には鑑別困難な別種 (同胞種 sibling species) の存在が明らかになってきた。同胞種の鑑別方法は次項「B. アニサキス類幼虫の分子同定」・「関連情報」等を参照されたい。

#### 手順

##### (1) 試薬調整

検出虫体透過観察液：ラクトフェノール

(組成)

グリセリン	20 mL
フェノール (加温して溶解)	10 mL
乳酸	10 mL
蒸留水	10 mL

- (2) 回収と洗浄：回収の際、アニサキス幼虫をピンセット等で強くつまむと破損することがある。先端を L 字形に曲げた有柄針を用いることが望ましい。回収した虫体に試料残渣が付着している場合は、生理食塩水中に移し、震盪して夾雑物を取り除く。
- (3) 固定と保存：70%エタノールで行う。固定液の温度は、加熱処理試料由来の虫体は常温でかまわないが、人工消化処理試料由来の新鮮虫体は 60~70°C 程度に加温した 70%エタノールで固定する。幼虫は小型なので、新鮮でも加熱処理されていても速やかに固定される。保存には固定に用いたエタノールをそのまま用いてかまわないが、加温固定した場合は固定液が常温となった段階で液交換することが望ましい。
- (4) 透過：新鮮虫体は半透明で、消化管等の内部構造が見えるが、加熱を行うと不透明になる。そこで内部構造を観察するために透過を行う。まず、固定・保存した材料から眼科鉗またはカミソリ刃で頭部および尾部を切り離し、50%ラクトフェノールに浸漬・透徹する (残りの虫体中央部は分子同定に用いる)。ラクトフェノールは、通常はホルマリン固定標本用の透過液であるが、アルコール固定標本でも透過に問題は無い。透過に要する時間は虫体の大きさにより異なるが、60°C 程度に加温すると透過が早く進行する。通常は 50%ラクトフェノールで透過は十分であるが、もし透過が

不足しているならばラクトフェノール原液に移し替え、さらに透過を行う。透過しすぎた場合は固定液に戻せば復元する。

- (5) 鏡検・観察：透過が完了した試料は透過液数滴とともにスライドグラス上にのせ、さらにカバーグラスを上載し、光学顕微鏡下で頭部・尾部・消化器官について形態学的観察を行う。アニサキス I 型の形態学的特徴は以下のとおりである（右図も参照）。

- ① 頭端に穿歯を有し、
- ② 食道部と胃の移行部は斜めに接続し、
- ③ 胃および腸に盲嚢を持たず、
- ④ 尾端は鈍円に終わり、
- ⑤ その先端に尾突起を有する。

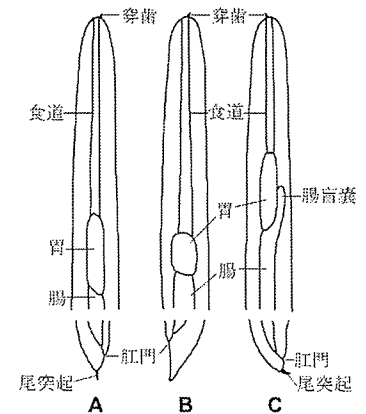


図. おもなアニサキス亜科線虫幼虫の頭部と尾部の形態  
A: *Anisakis simplex*  
B: *A. physeteris*  
C: *Pseudoterranova decipiens*

- (6) 観察終了後の虫体は 70%エタノールでリンスし、固定液に戻しておく。ラクトフェノール中に放置すると、虫体が黄変し、破損しやすくなる。

## II. アニサキス類幼虫の分子同定

### 手順

- (1) DNA の調整：70%エタノールで固定された虫体から、虫体の中央部を切り離し（虫体の頭部および尾部は形態観察に用いる）、DNA 抽出キット（DNeasy, QIAGEN）を用いて DNA を抽出する。分光光度計で波長 260 nm における吸光度を測定し、DNA 濃度を算出する。
- (2) PCR 法による標的領域の増幅：線虫類のリボソーム DNA を増幅する際に汎用されるコンセンサスなフォワード・プライマー NC5 (5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') と リバース・プライマー NC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') を用いて、Internal transcribed spacer (ITS) 領域を PCR 増幅する。反応には以下の試薬を括弧内の量で各 PCR チューブに加え、最終液量が 50  $\mu$ L となるように蒸留水で調節して PCR 増幅させる。
  - ① DNA ポリメラーゼ (*TaKaRa Z-Taq*, Takara Shuzo, 2.5 units/ $\mu$ L を 0.5  $\mu$ L)
  - ② PCR 緩衝液 (*Z-Taq* に同梱されている 10 $\times$  *Z-Taq* Buffer を 5  $\mu$ L)
  - ③ dNTP mixture (*Z-Taq* に同梱されている各 2.5 mM を 4  $\mu$ L)
  - ④ フォワード・プライマー NC5 (20  $\mu$ M を 1.25  $\mu$ L)



- ⑤ リバーズ・プライマー NC2 (20  $\mu$ M を 1.25  $\mu$ L)
- ⑥ テンプレート DNA (50 ng)

PCR の条件は以下のとおりとする。

- ① 変性が 98°C で 5 秒→アニールが 60°C で 10 秒→伸長が 72°C で 10 秒このサイクルを 35 回繰り返す。
  - ② さらに最終的な伸張として、72°C で 10 分処理する。
- (3) PCR 産物の確認：PCR 反応後のチューブ内の溶液 4  $\mu$ L を色素液（ゲルローディングバッファー）と混ぜ、TBE 緩衝液（89 mM Tris-HCl、89 mM ホウ酸、2 mM EDTA、pH 8.0）で 1% に調整したアガロースゲルを用いて電気泳動する。ゲルはエチジウムブロマイドで染色後に、トランスイルミネーターで紫外線照射し、写真撮影して増幅を確認する。約 950 bp の明瞭なバンドが 1 本観察される。
- (4) 塩基配列の解読・解析：PCR 産物を DNA 調整キット（QIAEX II, QIAGEN）を用いてアガロースゲルから切り出し精製する。PCR に用いた何れかのプライマーとサイクルシーケンス用の試薬（BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems）で蛍光標識する。その後、オートマチックシーケンサー（ABI310, Applied Biosystems）で配列を解読する。得られた塩基配列を用いて、FASTA 等でホモロジー検索する。検索虫体が例えば *Anisakis simplex sensu stricto* であれば、検索配列は当該種に由来する登録配列（AB196672）と一致する。
- (5) PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP：PCR 産物の制限断片長多型) による解析：PCR 産物を制限酵素 *Hinf*I で処理し、2% アガロースを用いて電気泳動する。写真撮影してバンドの切断パターンを調べる。検索虫体が例えば *A. simplex sensu stricto* であれば、約 950 bp のバンドが切断され、約 620 bp と約 240 bp の 2 本のバンドが目視される（約 70 bp および約 30 bp のバンドも生成されるが、これらはサイズが小さく、確認が難しい）。

## 注意点

### (1) DNA 抽出に用いる虫体の選択

- ① 分子同定には少数（例えば 2～5 匹）の虫体を選ぶ。固定前、あるいは 70% エタノールで固定された虫体のいずれを用いてもよい。虫体の保存のために 70% エタノール固定を行うが、短期間の固定では DNA 抽出操作への影響はない。
- ② 虫体 1 個体毎の結果を出し、形態所見と遺伝子配列の関係を明らかにする。これが分子同定に関して重要な点となる。複数匹をまとめて処理することは、避けるのが望ましい。

### (2) DNA 抽出に関して

- ① DNA 抽出に先立つ前処理として、幼虫を細切して PBS に入れ、凍結・溶解を 3 回繰り返す、更に 10 分煮沸する事を薦める論文がある。しかしながら、QIAGEN の

- キット (DNeasy) で DNA を調整する場合には、この様な前処理は必要がない。
- ② DNA 抽出にあたり、固定液であるエタノールの残存が気になる場合は、虫体 (中央部) を 1.5mL のエッペンチューブに入れた後、軽くスピニングして底に集まるエタノールをマイクロピペットで吸い取れば良い。蒸留水で洗浄してエタノールを置換する、などの操作は不要である。
  - ③ DNA 抽出時にホモゲナイズ用のペッスル (内筒) を用いて虫体をすり潰せば、抽出時間を短縮できる。しかしながら、この様な器具を使わなくても、また虫体を更に細かく切ったりしなくても、時々チューブを上下に傾けて攪拌するだけで、DNA 抽出キットの抽出液 (Buffer ATL と Proteinase K) により 1 時間以内に虫体タンパクが溶解、DNA がほぼ完全に抽出される。
  - ④ アニサキス虫体は、発育状況などにもよるが、その重量は 1 匹あたり数 mg から 10 数 mg である。また実際の作業に用いるのは虫体の中央部だけなので、その重量は一層軽くなる。従って、QIAGEN のキット (DNeasy) で 1 匹ずつ DNA 抽出するのであれば、使用する抽出液 (Buffer ATL と Proteinase K) は、合計 200  $\mu$ L (それぞれ 180  $\mu$ L と 20  $\mu$ L) で十分である。
  - ⑤ キットで抽出された DNA を分光光度計でスキャンしても、典型的な核酸の波形を得る事は、しばしば困難となる。例えば 260 nm 前後でのピーク、235 nm 前後でのバレー等は、まず観察できない。サンプルのフェノール抽出やエタノール沈殿を試みても、この状況は改善されないので、260 nm での吸光度で DNA 量を算定し、以後の検討 (PCR 増幅) に進む。

### (3) PCR 用プライマーに関して

PCR に用いるフォワードプライマー NC5 とリバースプライマー NC2 は、線虫類のリボソーム DNA を対象として、その ITS 領域を増幅する際に汎用されてきた、いわゆるユニバーサルなプライマーである。しかしながら、市販はされていないと思われる。このため使用に当たっては、自分で合成するか、受託機関に合成を依頼する必要がある。

### (4) PCR-RFLP による同定に関して

- ① *A. simplex* の 3 種類の同胞種を区別するには、PCR 産物を制限酵素 *Hinf*I (および *Hha*I) で処理する。反応条件は添付の指示書 (メーカーのカatalog) に従う。反応時間に関しては、37°C で 1 時間処理すれば、切れるものなら (完全に) 切れる。
- ② 制限酵素処理に用いる PCR 産物の量に関しては、未処理の産物を事前に電気泳動して、至適量を決める必要がある。

### 関連文献

1. 阿部仁一郎. PCR 法によるアニサキス亜科幼線虫の同定. 生活衛生 49, 168–171, 2005.
2. Abe, N., Ohya, N. and Yanagiguchi, R. Molecular characterization of *Anisakis pegreffii* larvae in Pacific cod in Japan. Journal of Helminthology 79, 303–306, 2005.

## 関連情報

従来、アニサキス・シンプレックス *Anisakis simplex* (*As*) と呼ばれ、形態学的特徴に基づいて単一種と同定されてきたアニサキス線虫（いわゆる広義の *As*）には、遺伝的多型（遺伝子配列の多様性）が認められることが明らかにされてきた。また、その多型に基づいて広義の *As* は、少なくとも3つの同胞種（形態では区別できない別々の種）に分類するのが妥当との考えが、世界的に見て一般的なものとなってきた。その3種を以下に示す。

- 1) *A. simplex sensu stricto*（狭義の *As*）
- 2) *A. pegreffii*
- 3) *A. simplex C*

広義の *As* が人体寄生性であることは広く知られてきた。そこで人体症例から得た虫体について、新しい観点からの検索が進められたところ、*A. simplex sensu stricto* と *A. pegreffii* が共に人体寄生性であることが確認された。

我が国の漁港に水揚げされる魚を調べた成績では、*A. simplex sensu stricto* は北方系の魚（例えば北海道のスuketウダラ、マダラ）に多く、本州以南（以西）の魚（例えば北九州のマサバ）には *A. pegreffii* の寄生が多いことが示されている。この *A. pegreffii* の配列は AB196670 で GenBank 登録されており、配列に基づいて *A. simplex sensu stricto* とは正確に鑑別できる。

アニサキス由来の PCR 産物（約 950 bp）を制限酵素 *HinfI* で処理した場合、*A. simplex sensu stricto* であれば、約 620 bp と約 240 bp の2本のバンドが目視されることは既に述べた。一方、*A. pegreffii* であれば、目視されるバンドは3本となり、そのサイズは約 330 bp、約 280 bp、および約 220 bp となる（約 70 bp および約 30 bp のバンドも生成されるが、これらはサイズが小さく、確認が難しい）。配列を解読せずとも、PCR-RFLP で両種は迅速に鑑別できる。制限酵素 *HhaI* は、*A. simplex C* の特定に有用な酵素である。

## 鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル・写真付き解説書

「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」に示した検査法は、文書のみでは理解しがたい部分も多いと考えられるので、写真付き解説書を併せて作成した。検査の一助とされたい。

魚介類に寄生するアニサキス幼虫（以後、アニサキスと称す）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、いくつかの方法が記載されている。検査法の選択は、対象となる魚の種類、大きさ、検体数、検査の目的などを考慮してなされる。本マニュアルは、比較的大型の鮮魚を対象とし、しかも多数の個体について食品衛生上の検査が必要な場合に、アニサキスを検出する為の高い効率と精度を併せ持つ改良法として作成したものである。検査は、解体と観察、前処理（内臓部は消化法、筋肉部は加熱法）、虫体の検出（直接観察および紫外線（UV）透過法）という手順で進める。検出された虫体の種同定に関しては、専門家に依頼するのが一般的なため本マニュアルとは別に述べる。

### マニュアルのフローチャート

