

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. 洗淨瓶
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

2.の解説 : フードプロセッサーはプラスチック刃を装備していないものが多いので、購入の際に注意を要する。また、容器の蓋などに突起物があるとその隙間に破砕サンプル等が入り込むため、なるべく突起物のない機種を選定するのが望ましい。

3.の解説 : PCR 用の UV 照射装置の使用も可能である。しかし、大型の養殖魚のロット検査などで大量のサンプルをこなす場合は装備したほうが作業効率は上がる。

14.の解説 : 初めて使用する製品については、生きたアニサキス幼虫を用いて捕捉が確実に出来ることを予め確認しておく。アニサキス幼虫は、市販のサバの内臓などから比較的高い頻度で採取できる。

19.の解説 : 加熱処理をしたアニサキスはもろくなるので、有柄針で吊り上げる。

20.の解説 : 台所用品として市販されているガラス製の角型バットを用いても良い。

I - 2. 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

(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)

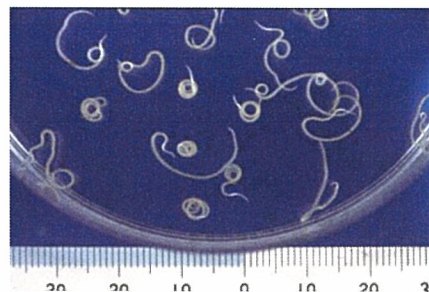
3. 検出虫体の固定液：70%エタノール

2の解説：消化用人工胃液は、調製順の指示を守ること。ペプシンを溶解したあとに濃塩酸を加えると、濃塩酸に接触したペプシンが分解され力価の低下を招く。また、用時調製が望ましい。

II. 解体と観察

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。

写真：アニサキス幼虫の虫体



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。

6)の解説：魚皮や鱗、骨などにはUV照射時に蛍光を発するものがあり、アニサキス幼虫検索の妨げとなるので、可能な限り除去しておくことが望ましい。ただし、腹腔内の肋骨に相当する骨は、この部位へのアニサキス寄生の可能性が高いため、解体時に除去してはならない。Ⅲ - 2 - 2（加熱操作）に従って加熱したあと、虫体の付着がないことを確

認しながら注意深く取除く。

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。

1) の解説：胃の観察を求めたのは、魚種にもよるが、アニサキス幼虫の分布が最も多い部位であり、また観察が容易であることによる。

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。

小型の魚種、あるいは少数の個体を検査する場合は、筋肉部についても消化法によって前処理を行うことができる。

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。

1) の解説：サンプルの処理量が多い場合はプラスチック製の取手付ビーカーが軽くて扱いやすい(写真)。



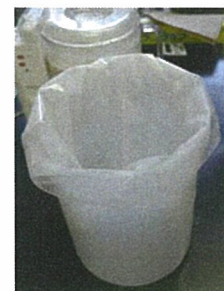
4) の解説：消化が不十分な場合は、未消化物にアニサキス幼虫が紛れ込んで検索が困難となる。十分な消化が必要である(写真)。



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。

1) の解説：不織布袋のセットは写真を参照。



5) の解説：消化が十分であれば残渣は少量なので、可視光下で肉眼による検索が可能である。

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、その後に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。

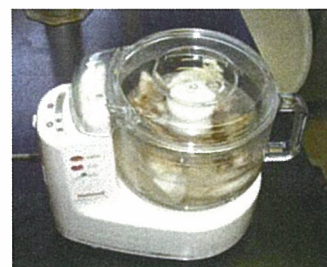
2)の解説：加熱が十分であるかどうかは、切り身の中央部に薬匙などを差込んで容易に耐熱皿まで突き抜けることで確認できる(写真)。過度の加熱は、アニサキス虫体がもろくなり破碎処理の操作中に破損する可能性があるので、避ける。



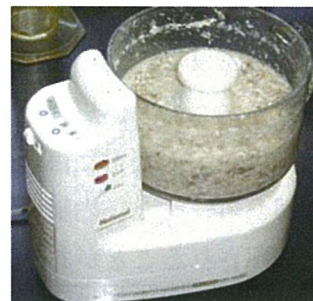
Ⅲ-2-3. 破碎処理

- 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、切り身を破碎し筋肉懸濁液(破碎サンプル)とする。
- 3) (注：筋肉を均一に破碎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。)

1)の解説：構造や性能がメーカーによって異なるため、1度に入れられるサンプル量、ならびに虫体が破壊されずに破碎処理できる時間等を予め割り出しておく(写真)。このとき用いるアニサキス幼虫は市販のサバなどから採取する。



2) の解説：間歇的に1分間処理した状態(写真)。加熱によって虫体もろくなっているため過度の破碎処理は避ける。

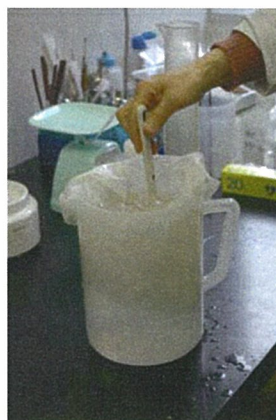


Ⅲ-2-4. 破碎サンプルの洗浄

調整した破碎サンプルを温水（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) フードプロセッサから破碎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、破碎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碎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。

3) の解説：不織布がサンプル等の重みで破損する可能性があるため、洗浄水の交換時に、不織布袋内に直接温水を注ぎ込んではいけません。破碎サンプルは温水に浸した状態で静かに攪拌する(写真左)。



4) の解説：洗浄は水の濁りがほぼなくなるまで行う(写真右)。



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. 紫外線（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。）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。
- 3) 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。）
- 4) 上記操作を繰り返し、すべての破砕サンプルを観察する。
- 5) 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
- 6) 検出された虫体は、Ⅴ（検出虫体の処理）に従って処理する。

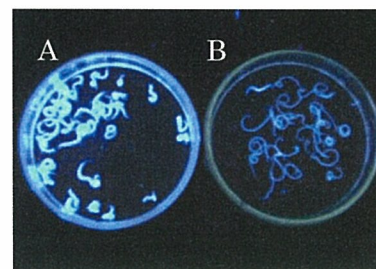
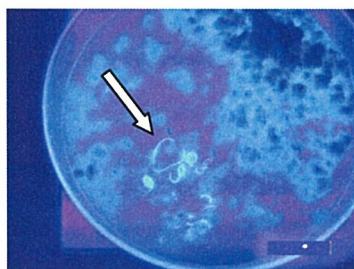
4)の解説：例えば、直径 15 cm のガラスシャーレを使用する場合は、1 度に加えるサンプル（固形分）量は5～10 g 程度とし、そこに約 100 ml の水を徐々に加えながら均一に広げる（写真）。



5) の解説：暗箱付き卓上紫外線照射装置（写真）



6) の解説：UV 透過光によりサンプル懸濁液内で青白色の蛍光を発するアニサキス幼虫（写真左：矢印）。写真右の(A)は加熱した虫体。同(B)は生きている幼虫で、加熱虫体の方が強い蛍光が認められる。



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) 虫が生きている場合は、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。

1) の解説：加熱処理をしていない虫体であれば容易に千切れない程度の強度があるが、ピンセットを用いる場合はで軽くつまむようにする。

キムチ等の食品からの寄生虫卵検査マニュアル

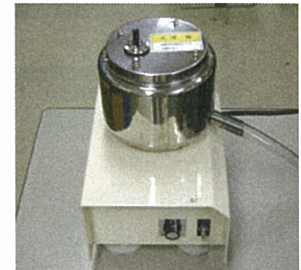
当該検査マニュアルはキムチ等の食品中に混入する寄生虫卵や原虫のオーシストやシストの検出を目的として開発されたものである。基本的な手技は、食材の洗浄、洗浄液からの沈渣回収（連続遠心機使用）、密度勾配遠心法による精製（原虫検査に限る）、厚層塗抹法によるプレパラート作製、および鏡検からなる。原虫類の検出には精製試料の免疫蛍光染色法が適用される。

本マニュアルの手技の理解を助けるために主要な処理工程を写真によって示した写真解説版を別途用意されている。写真解説を参照しつつ実用に供してほしい。

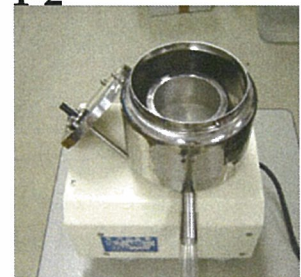
<実験器具類>

- 1) 連続遠心機（KOKUSAN 社製、型式：H-112、写真 1-1、2）
- 2) 定量送液ポンプ（EYELA 社製、型式：RP-1000、写真 1-3）
- 3) 顕微鏡（一般の生物顕微鏡で可）
- 4) 5L ビーカー（最低 3 個を使用する。ポリプロピレン製）
- 5) 送水チューブ（TYGON チューブ、SAINT-GOBAIN 社製、規格 R-3603）
- 6) 2×2 mm および 1×1 mm 金属メッシュ（径 20cm）
- 7) 50ml 遠心管（ポリプロピレン製）
- 8) 300ml サンプルカップ（プラスチック製）
- 9) 10ml ピペット（プラスチック製）
- 10) 10ml ピペット用ゴム球
- 11) 2ml スポイト（プラスチック製）
- 12) 洗浄瓶（プラスチック製）
- 13) ビニール袋（厚手、240mm×170mm、0.08mm 厚）
- 14) 竹ぐし（長さ 15 - 20cm）
- 15) ガーゼ（30cm×30cm）
- 16) セロファン紙（28mm×26mm、20～24μm 厚）
- 17) スライドグラス

1-1



1-2



1-3

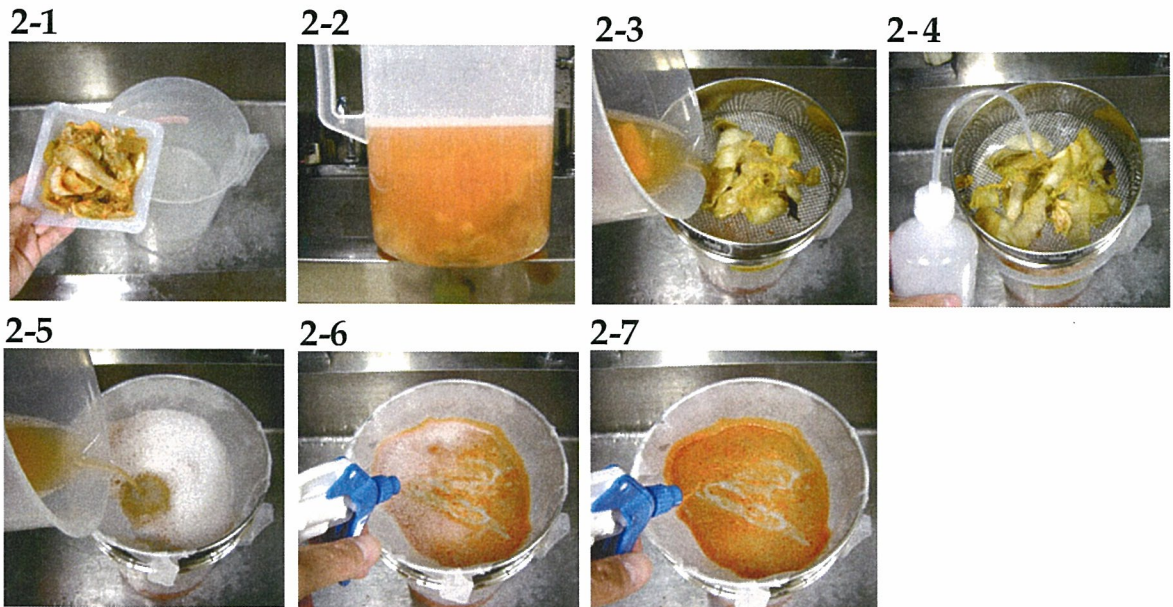


<試薬類>

- 1) 10%ローレス 12 溶液： Laureth12（ポリオキシエチレンラウリルエーテル（日本エマルジョン社）50 g を蒸留水で溶解し 500ml に調整。
- 2) 0.1%Tween80 溶液： Tween80（SIGMA）を蒸留水で 10%に希釈した溶液を保存溶液とし、使用時に蒸留水で 100 倍希釈し 0.1%に調整。
- 3) 比重 1.20 のショ糖溶液： ショ糖 500 g を蒸留水で溶解し 1L に調整する（蒸留水 650ml）
- 4) 比重 1.10 のショ糖溶液： ショ糖 250 g を蒸留水で溶解し 1L に調整。または、比重 1.20 のショ糖液に等量の蒸留水を加え完全に混合
- 5) 6%フェノール溶液： フェノール（結晶）を秤量し、6g を蒸留水で溶解し 100ml に調整。
- 6) 3%マラカイトグリーン溶液： 色素粉末 3g を蒸留水で溶解し 100ml に調整する。
- 7) 洗浄液： 5L の水道水に 10%ローレス 12 溶液を 50ml 加えて 0.1%ローレス 12 溶液を調整する。

キムチからの寄生虫・原虫類の検査手順

《キムチ等の食品の洗浄方法》



1) 食品の洗浄

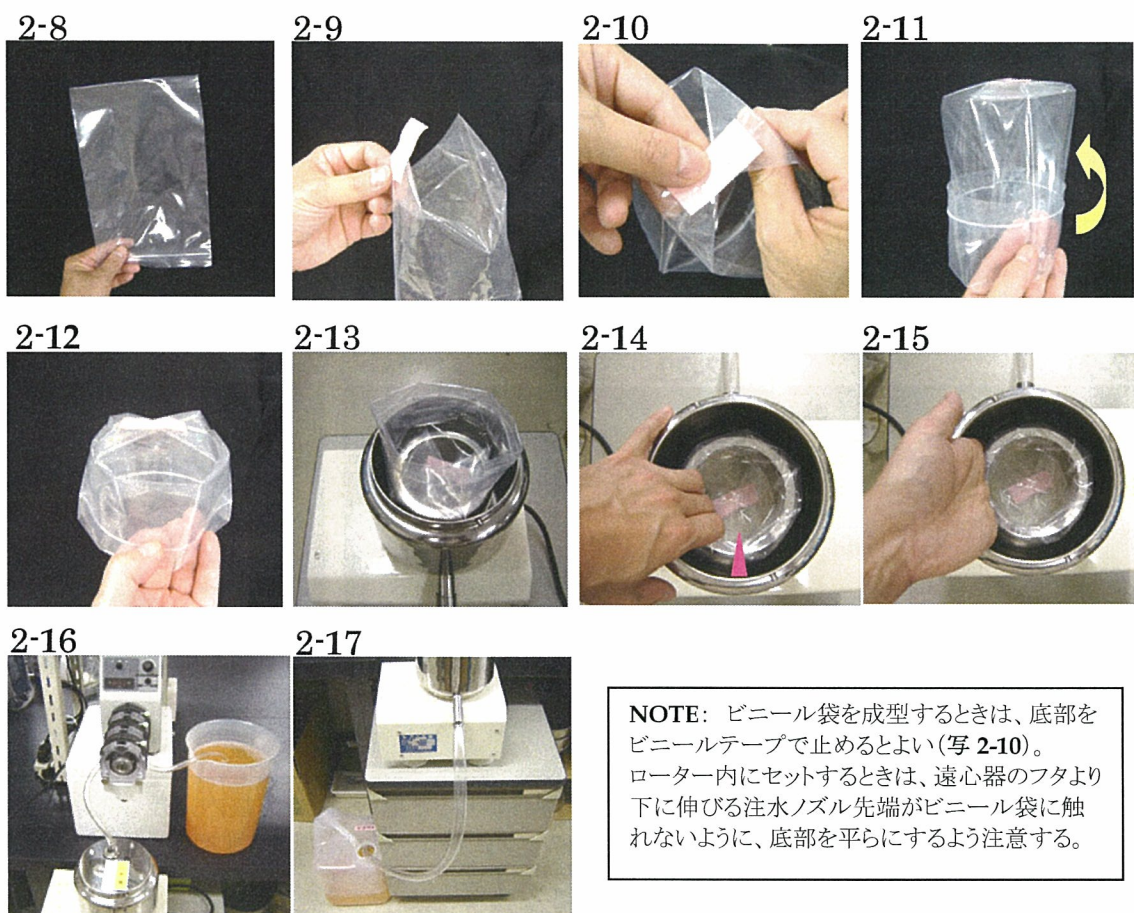
1-1) 5L ビーカーに 2L の洗浄液 (0.1% ローレス 12 溶液) を入れておく。キムチを 300g 秤量し、2L の洗浄液に入れる。容器に付着した試料もすべて洗浄液で洗い流し、これに加える (写真 2-1, 2)。

1-2) 1 分間ほど攪拌した後、金属メッシュ (網目: 2×2mm) でろ過し、ろ液を別の 5L ビーカーに受ける (写真 2-3)。メッシュ上の野菜片を元のビーカーに戻し、さらに 2L の洗浄液を加えて 1 分間ほど攪拌した後、同様にして 2 回目のろ過を行う。メッシュ上に残った野菜片をすすぎ洗いを (写真 2-4)。300g のキムチに含まれる野菜片は多量なため、3 回に分けてメッシュ上ですすぐ。洗浄液は泡立ちやすいが、消泡には 70% エタノールのスプレーが効果的である。

1-3) 次に、1×1 mm の金属メッシュにガーゼを 1 枚被せ、2) で得られたろ液をろ過する (写真 2-5)。ビーカー内の付着物や泡を残さないように 2) の時と同様にして内壁を充分すすぐ。メッシュ上に残る泡はエタノールをスプレーすることで消泡し (写真 2-6、-7)、ガーゼ上に残る残渣もよくすすぐ。

NOTE: 容器に付着した試料もすべて洗い流して加える。ろ過作業中は 70% エタノールスプレーでビーカー内壁あるいはメッシュ上の野菜片を適宜スプレー (写 2-6、7) し消泡する。

連続遠心機の準備



NOTE: ビニール袋を成型するときは、底部をビニールテープで止めるとよい(写 2-10)。ローター内にセットするときは、遠心器のフタより下に伸びる注水ノズル先端がビニール袋に触れないように、底部を平らにするよう注意する。

1-4) 遠心機のローターはカップ状になっており、予めその形状に合うように底部を平らに成形した厚手のビニール袋(写真 2-8~12)を被せ、指先でローター内壁に密着させる(写真 2-13~15)。この時指先でビニール袋を傷つけないように注意するとともに、遠心器のフタより下に伸びる注水ノズル先端がビニール袋にあたらないように設置する。特に、底部が平らになるように注意する。

1-5) 連続遠心機にフタを被せ、注水ノズルに送水チューブを接続し、チューブの中間に定量ポンプカセットを組み込んで、チューブ末端をビーカーに入れる。末端がビーカー底に達していることを確認する(写真 2-16)。排液受けは大き目の容器を用いる(写真 2-17)。

ローター内にセットするビニール袋の成型方法

- 1) ビニール袋の底部に2つの三角形が対称的に立つようにして、片方の角先にビニールテープを貼る(写 2-9)。
- 2) 両方の角先が5mmほど重なるようにして2つの三角形を先端部分で貼り合わせる(写 2-10)。
- 3) ビニール袋の長さを3等分し、まず下から1/3を外側へ折り(写 2-11)、さらにもう1回同じ長さで外側に折りたたむと、形はカップ状になる(写 2-12)。
- 4) ビニール袋をローターに被せる時は、1)で底で貼ったビニールテープがローターの中央に位置するようにすると、歪みがなく密着させることができる。指先でローターの内側から(写 2-14)さらに外側(写 2-15)からビニール袋を押しえつけながら密着させる。

連続遠心濃縮

2-18



2-19



2-20



2-21



2-22



2-23



2-24



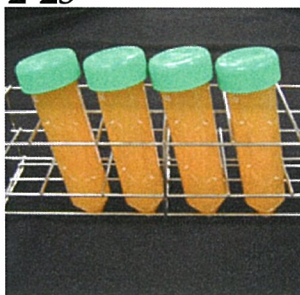
NOTE: 漏れがあった場合は、まず袋内に残る洗浄液をプラスチックカップに移し、袋の内側をこすってから 20ml ほどの洗浄液ですすぎ、プラスチックカップに入れる。ローター内に漏れた洗浄液はピペットで回収し、ローター内壁も洗浄瓶ですすぎ、プラスチックカップに入れる。

- 1-6) 連続遠心濃縮定量ポンプを作動させ、高速 (100rpm) で、勢い良く送水しチューブ内の空気を追い出す。チューブがキムチ洗浄液で満たされたことを確認したら、回転数を 30rpm に下げる。
- 1-7) 遠心機を作動させ、遠心機の回転数を 3,000rpm にセットする。遠心開始後はローター内に設置したビニール袋が破損していないか、1 分間ほど異常音に注意する。
- 1-8) 連続遠心の開始後は試料水の水位が下がるので露出したビーカー内壁およびチューブの付着物をすすぎ洗いする (およそ 1L の送水毎に 100ml ほどの洗浄液ですすぎ)。遠心終了少し前にはビーカーを 30 度ほど傾けてビーカーの底部をすすぎ洗いしながら、すべての洗浄液を送水する (写真 2-18)。
- 1-9) 送水が完了したら定量ポンプを停止し、次いで遠心機を停止する。遠心機のフタのノズルよりチューブをはずし、続いてフタをはずす。フタ下に伸びるノズルを洗浄瓶で軽くすすぐ。ローター内に収容したビニール袋を注意しながら取出し (写真 2-19~21)、漏れがないか確認する (写真 2-22)。

1-10) 指先で外側からビニールをはさみ、内壁を揉み洗いして付着物を剥離させる。濃縮洗浄液が溜まっている部分（下側1/3ほど）をよく揉みほぐしてから、回収液を300ml容量のプラスチックカップに移す。濃縮回収液を移し終えてからさらにビニール袋を揉み洗いし、洗浄液でビニール袋の内側を2回（各10mlほど）すすぎ、すすぎ液を回収する（写真2-23、-24）。

2) 濃縮液の分画・精製

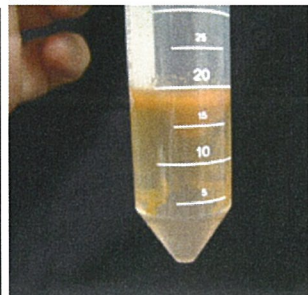
2-25



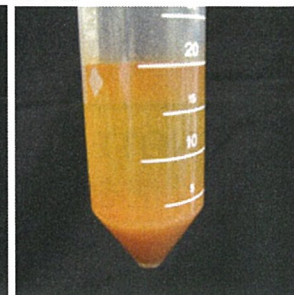
2-26



2-27



2-28



2-1) 回収した濃縮洗浄液を50ml遠心管4本に分注する（写真2-25）。液量により適宜遠心管本数を増やす。プラスチックカップ内壁は少量の洗浄液ですすぎ、すすぎ液は遠心管へ移す。

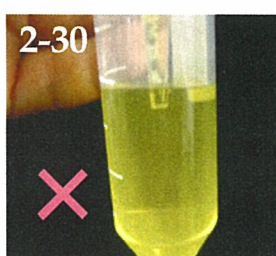
2-2) 3,000rpm、10分間、室温（20℃程度）で遠心する。

2-3) 沈渣は浮遊しやすいので注意しながら10mlピペットで上清を除去する。上清を10ml残し、さらに3,000rpm、5分間、室温で遠心し沈さを固めてから沈渣を回収する。

2-4) 丁寧に上清を除去し、竹ぐしを用いて沈渣を崩し、均一にする（写真2-26）。比重1.20のショ糖溶液を加えて20mlに調整し（写真2-27）、10秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、均一な懸濁液を得る。

2-5) 3,000rpm、10分間、室温で遠心する。ほとんどの夾雑物は沈渣に集まる（写真2-28）。

2-6) 虫卵の比重は1.16から1.20の範囲にあることから、虫卵はショ糖層表面付近に浮遊しているので、ゴム球をつけた10mlピペットを用いて、ショ糖層表面から吸取るように15ml程度回収し（写真2-29）、新しい50ml遠心管に移す。その際、表面付近には微小なゴミが浮遊しているが、それらを回収するように工夫するとよい。沈渣は浮遊しやすいので吸い込まないように注意する。



○（写2-29）ピペットの先端を液面に接するようにして、液面を回収する。

×（写2-30）ピペットの先端が液面に没しており、液面が回収できない。

2-7) 回収シヨ糖液 15ml を移した各遠心管 (4 本) に 0.1%Tween80 溶液を加えて液量を 40ml となるように調整する。10 回ほど転倒混和した後、新しい遠心管を用いて再び 20ml ずつとなるように分注する (計 8 本の遠心管に 20ml ずつ分注)、これに再び 0.1% Tween80 溶液を加えて 40ml となるように調整し、10 回ほど転倒混和する。

2-8) 3,000rpm、15 分間、室温で遠心する。

2-9) 数 ml を残してピペットで上清を除去する。沈渣をスポイトで崩しながら均一にし、8 本の遠心管の沈渣を 1 本にまとめる。残りの 7 本の遠心管には 2 - 3ml の 0.1% Tween80 溶液を加えて内壁をボルテックスミキサーで攪拌・洗浄し、洗浄液を遠心管に回収する。回収液をボルテックスミキサーで充分混和する。

2-10) 3,000rpm、10 分間、室温で遠心し、沈渣を得る。

NOTE: 虫卵に限った検査を行う場合には、操作 2-10) で得られた沈渣を最終試料とし、顕微鏡観察に移行することができる。
原虫検査を併せて行う場合には、継続して操作 2-11) 以降を行う。

2-11) ピペットで上清を除去し、竹串等で沈渣を崩す。比重 1.10 のシヨ糖溶液を加え 20ml に調整した後、10 秒間ボルテックスを行い沈渣を均一に浮遊させる。

2-12) 3,000rpm、10 分間、室温で遠心する。

2-13) 操作 4-6) と同様に、シヨ糖層の表層から 15ml 程度を回収し、新しい 50ml 遠心管に移し、沈渣と上清を分ける。

3) 虫卵検査用試料 (沈渣分画)

3-1) 操作 5-2) で得られた沈渣に 0.1%Tween80 溶液を加えて液量を 20ml に調整し、ボルテックスミキサーで十分に浮遊・懸濁する。

3-2) 3,000rpm、10 分間、室温で遠心する。

3-3) 上清をピペットで除去し、回収した試料は虫卵検査用に供する。

4) 原虫検査用試料 (上清分画)

4-1) 回収上清に 0.1%Tween80 溶液を加えて 40ml となるように調整する。10 回ほど転倒混和した後、新しい遠心管に 20ml ずつ分注し、再び 0.1%Tween80 溶液を加えて液量を 40ml に調整する。10 回ほど転倒混和する。

4-2) 3,000rpm、10 分間、室温で遠心する。

4-3) 上清をピペットで除去し、得られた沈渣をオーシストの検査に供する。

《 虫卵検査方法 》

5) セロファン厚層塗沫法

5-1) 厚手のセロファン (20~23 μ m 程度の厚さ) を 22×22mm に切り、1 枚ずつ浸漬液 (6%フェノール溶液 500ml、グリセリン 500ml、3%マラカイトグリーン溶液 5ml) に入れ、1 昼夜以上浸漬させる (写真 3-1)。

5-2) あらかじめ、先端を 5mm 程度切断した 200 μ l 用のピペットチップを用いて沈渣試料を 80 μ l 程度とり、スライドガラス上に載せる。ピペットの先端で直径 1cm 程度の広さに試料を広げる (写真 3-2)。

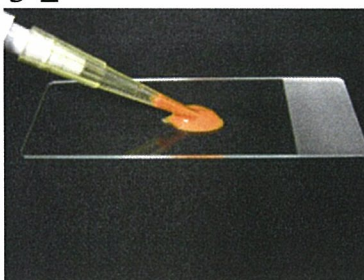
5-3) 浸漬液中よりセロファン片を取り出し、軽く余剰の浸漬液を落としてから気泡ができないように試料の上に被せる。セロファン片の上からゴム栓で圧して一様に広げる (写真 3-3~5)。

5-4) 概ね 20 分間ほど放置し、セロファン片の表面がやや乾燥したところで (写真 3-6)、100 倍の倍率で鏡検する。

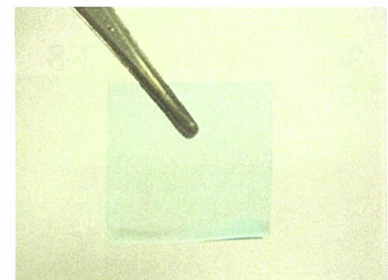
3-1



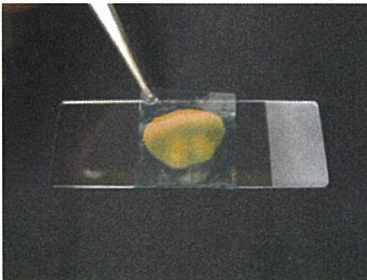
3-2



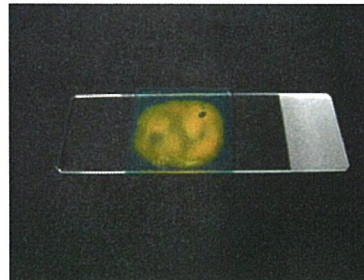
3-3



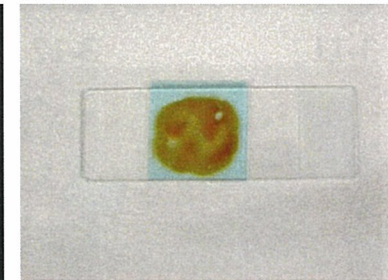
3-4



3-5



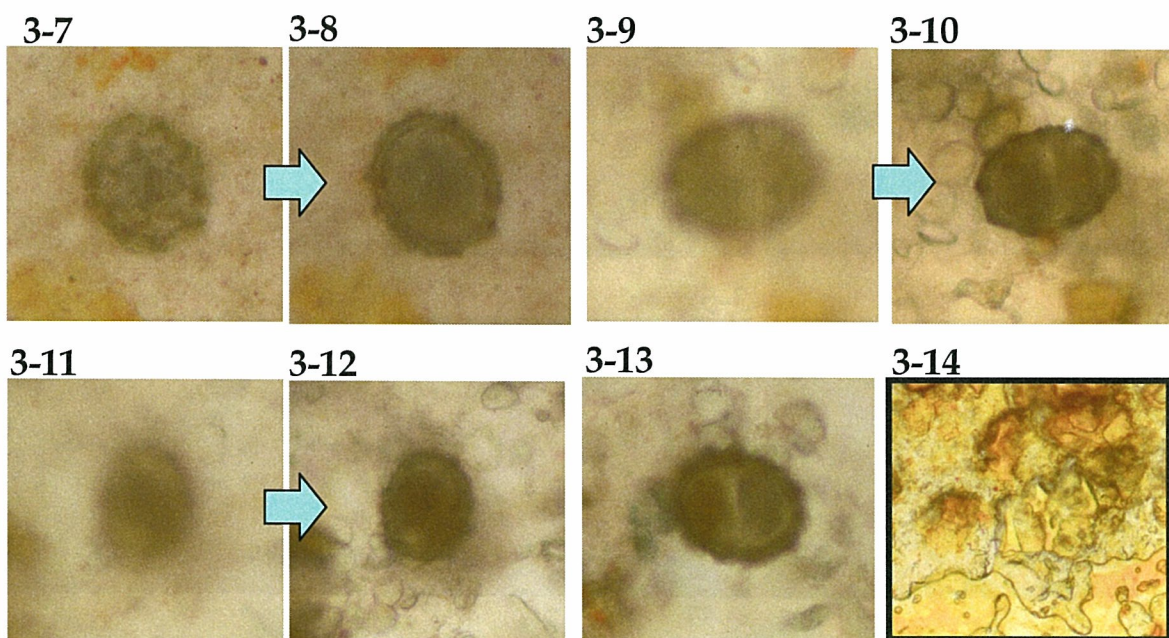
3-6



標本の観察

- 6) 回虫受精卵は長径が 70-100 μ m の短楕円形で、卵殻が厚く、外周は特徴的なタンパク膜により覆われている。虫卵内容は分裂中の卵細胞から幼虫に発育したものまで多様である。回虫卵の不受精卵はまったく異なった形状を呈することから、寄生虫学の教科書等であらかじめ基礎知識を得ておく必要がある。
- 7) 10 倍の対物レンズを用いて観察する。厚層塗沫標本 1 枚あたりの観察にはおよそ 10 分程度を要する。
- 8) 顕微鏡の焦点を変えながら、蛋白膜など虫卵の特徴を観察する（写 3-7~13）。

NOTE: 標本が過度に乾燥すると観察に支障をきたすので注意が必要である。また、セロファンとガラスの間に空気が入り込んだ標本は観察に適さない（写 3-14）。そのような場合、セロファンを静かに剥がし、浸漬液を必要量添加して再びセロファンを被せる。特に小さな空気の泡は試料の下層にあると紛らわしい場合がある）。



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

資料・別刷

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（H17-特別-060）

平成17年度分担研究報告

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

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
協力研究者	古屋 宏二	国立感染症研究所 寄生動物部
	八木田健司	国立感染症研究所 寄生動物部
	杉山 広	国立感染症研究所 寄生動物部
	森嶋 康之	国立感染症研究所 寄生動物部
	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所 微生物学

概要：中国産および韓国産キムチから寄生虫卵が検出されたことを中国および韓国両政府が発表したことから、キムチを中心とした輸入野菜の寄生虫学的安全性の確保が問題となっている。野菜に由来する寄生虫感染のリスクを評価、解析するためには基礎となる情報の収集が重要となる。土壌媒介寄生虫、水生植物媒介寄生虫および水系感染寄生虫/原虫などの、野菜に関連して感染する可能性のある寄生虫/原虫の疫学、健康被害、食品の関連性について、情報の収集を行った。食品の安全性を確保するには、輸入食品の検査を積極的に進めて病原体に汚染された食品が国内で消費されることを未然に防ぐことがきわめて重要で、あわせて現地での生産方法等の詳細な情報の入手が必須である。さらに、生産地における安全な農業用水の確保や下肥の利用方法あるいは化学肥料の利用方法については輸入－輸出国双方でのあらかじめの合意が求められよう。

A.研究目的

輸入キムチから寄生虫卵が検出されたことを中華人民共和国（中国）および大韓民国（韓国）が互いに発表し、さらに自国産のキムチから寄生虫卵が検出されたことも韓国政府により公表された。これにより寄生虫卵に汚染されているキムチの製品があることがわが国でも広く知られるようになり、輸入食品を介した寄生虫感染がにわかに注目されている。しかし、こうした輸入食品や有機栽培野菜と称する堆肥を用いて育成した野菜類での寄生虫問題は、以前から寄生虫の専門家が指摘していたところでもある。

野菜類を介して感染する寄生虫や原虫には、土壌媒介寄生虫である回虫、鉤虫、鞭虫、有鉤条虫や水生植物に付着する吸虫類、さらに水系感染を起こす寄生虫や原虫が挙げられる。今回問題となっているキムチに寄生虫卵による汚染が起きるのは、野菜、薬味、その他の材料に付着している、あるいは食材に寄生している寄生虫や原虫が材料とともにキムチに加工されることによる。野菜類に寄生虫や原虫が付着するのは、下水や畜産排水を灌漑用水に用いたり、ヒトや動物の便を堆肥として使用することで作物を寄生虫や原虫が汚染することによる。さらに、野菜類を洗浄するための水が汚染されていることも寄生虫や原虫が混入する原因となる。セリなどの水生植物には吸虫のメタセルカリアが付着して、宿主動物に摂食される機会を窺っており、これらが混入することもある。材料に種々の魚介類が用いられる場合、それらを中間宿主として寄生している寄生虫がキムチに混入する可能性も存在する。

そこで、これまでにキムチが関連したとされる症例や、農作物を対象とした寄生虫の調査報告を検討し、野菜類を介して感染する寄生虫や原虫に関する fact sheet を作成した。

B. 寄生虫ファクトシート

1) 線虫

(1) 回虫

1. 概要

回虫 (*Ascaris lumbricoides*) の成虫は小腸上部に寄生し、雄は 14~22cm、雌は 20~35cm に達する。回虫は世界中に分布し、最も代表的な寄生虫のひとつである。世界中で毎年 2 億 5 千万人が感染し、毎年子供を中心に 6 万人が命を奪われており、14 億人以上が回虫を保有しているととされている^{1~3}。わが国でも過去には国民の寄生率は 70%以上に達していたが、現在では寄生率はほぼ 0 (0.002%) となっている⁴。

一方、中国における回虫の寄生率は現在でも高率で、行政区分上の市や省別の統計によると 6.0~71.1%、平均 47.0%となっている⁵。寄生率が 50%を超える地域は遼寧省、浙江省、福建省、江西省、湖南省、貴州省、海南省、雲南省と、広範にわたっている。また、北京市郊外は 29.5%、天津市郊外は 28.3%、上海市郊外は 29.8%と、都市周辺でも高い寄生率を示しており、回虫感染は中国において未だに解決されていない公衆衛生上の重大な問題と言える。

これに対して、韓国における回虫の寄生率は韓国寄生虫撲滅協会などによる撲滅対策が効を奏して激減している。感染のリスクが高い集団である生徒を対象とした調査では 1969 年には 55.4%であったが、1989 年には 0.3%となった⁶。また、幅広い年齢層を対象とした 1986 年の調査では、都市部では 0.7%に対して郊外では 4.4%であったと報告されている⁷。

2. 健康影響

症状は少数寄生では無症状のこともある。腸管で孵化した幼虫による体内移行に伴ってみられる症状の1つに、肺を通過する際の発熱、咳嗽、喘鳴が知られている。多数の幼虫により肺炎（Loeffler 症候群）を起こす場合もある。小腸上部に寄生すると下痢、腹痛、消化障害、頭痛、痙攣などがみられ、多数寄生すると腸閉塞や腸捻転を起こすことがある。また成虫の迷入により胆管炎や膀胱炎が起きることも知られている。回虫症の治療には、パモ酸ピランテルあるいはメベンダゾールが用いられる¹⁰⁾。

3. 環境中での挙動

便とともに排出された直後の虫卵は感染性が無く、外界で2~3週間の発育を経て感染性を有する成熟卵となる。土壌などの環境中では数ヶ月から年余にわたって感染性が持続する。

予防には流水による野菜表面の洗浄や、熱処理が有効である。乾燥や消毒薬、低温といった外界の環境条件には抵抗性を示す。

4. 感染経路

回虫卵に汚染された野菜などを経口的に摂取することで感染する。摂取された虫卵は小腸で孵化し、幼虫が小腸壁を突き抜けてリンパ流や血流を通過して肝臓や肺に入る。肺から気管をさかのぼって咽頭から食道、胃を経て再び小腸に戻り、そこで成虫となる。雌虫は交尾ののちに産卵し、虫卵は便とともに排出される。虫卵を経口的に摂取し、腸管で孵化した幼虫は門脈に入って肝臓に運ばれ、さらに血流を介して肺に達する。肺で一定の発育を行った後、気管支、気管を朔上して咽頭に達し、嚥下されて再び小腸に到達して成虫に発育する。

5. 食品との関係

回虫は土壌媒介寄生虫とされており、便とともに排出された虫卵が土壌を汚染、あるいは下肥として農地に散布されて作物を汚染する。虫卵に汚染された野菜などを生、あるいは不十分な加熱調理の状態で摂食することで感染する。

第2次大戦直後には東京の市場の野菜の約80%から回虫などの寄生虫卵が検出されたされていた¹²⁾。1967年に報告された韓国の調査では、回虫卵の野菜への汚染を調べ、キャベツの56%、タマネギの28%、ニンジンの40%から検出された¹³⁾。

生下水を農業用水として散布することで農作物の汚染につながることを示されている。ある調査によれば、コリアンダーから2.7個/kg、ミントは4.63個/kg、ニンジンから0.7