

当時の新聞記事から

カンパチのアニサキス問題

中国産養殖カンパチが高頻度でアニサキス寄生

2005/06/16/新聞報道



中国産カンパチに寄生虫／鹿児島など6県で養殖

国が冷凍死滅指導

南日本新聞 [2005 06/16]

中国産カンパチに寄生虫 コスト削減策があだ

鹿児島内養殖業者ら 風評被害懸念も

南日本新聞 [2005 06/17]

厚労省は農林水産省などからの情報として、昨年秋以降に中国から輸入し、国内で養殖されているカンパチを調査したところ、ランダムサンプリングで554匹中192匹(約34.7%)と、3匹に1匹を超える高頻度でアニサキス幼虫が寄生していることが分かった。厚労省によると、国内で養殖カンパチとイサキからアニサキスが検出されたのは初めて。中国で養殖中に餌として与えられたイワシに寄生していたのが原因とみられる。いずれもまだ国内では出荷されていないという。

当時の新聞記事から

キムチ問題

中国産キムチから寄生虫卵 緊急回収・廃棄命令
2005年10月22日 (朝鮮日報)



中韓日キムチ問題の経過

- 10/21 中国産キムチから寄生虫の卵が検出された。
- 10/26 中国の「寄生虫キムチ」9社が稼働中断
- 10/28 さらに15種の中国産キムチから寄生虫卵
- 11/01 韓国産キムチや焼肉のたれから寄生虫卵検出
中国、韓国産キムチに輸入禁止措置
- 11/03 韓国「自国産キムチからも寄生虫卵」日本にも輸出
- 11/04 検疫所で中韓産キムチの寄生虫卵検査実施の方針

キムチの寄生虫卵問題は、まず韓国に輸入されている中国産キムチから寄生虫卵が検出されたとして、韓国国内で問題になりました。しかしその後、韓国食品医薬品安全庁の調べによれば、韓国産の白菜キムチの中からも寄生虫卵が検出される事態になり、そのうち一社の製品は日本にも輸入されているということで、騒動は日本にも及んできそうです。中国のキムチから見つかった寄生虫は回虫、鉤虫、東洋毛様線虫、戦争イソスポーラの4種類。いずれも化学肥料ではなく、人糞などを肥料として使い、原料の洗浄が不十分なためこのようなことが起きてしまうようです。

アニサキス症 —発生状況とその予防—

Anisakidosis — Status and Prevention —

国立感染症研究所寄生動物部¹⁾
財団法人目黒寄生虫館²⁾

川中 正憲¹⁾, 荒木 潤²⁾

Department of Parasitology, National Institute
of Infectious Diseases¹⁾
Meguro Parasitological Museum²⁾

Masanori KAWANAKA¹⁾, Jun ARAKI²⁾

I はじめに

アニサキスという寄生虫の幼虫が原因となって起きるアニサキス症は、海産魚介類を食材の中心とする寿司、刺身といった日本人の日常食に起因している。アニサキス幼虫は、極めて多種類の海産魚に寄生が認められているが、養殖魚に関してはその心配がなく一般に安全と考えられてきた。ところが平成17年の夏、中国の中間種苗由来の養殖カンパチから、高い頻度でアニサキスが寄生していることが見つかり、食品安全の立場から200万匹もの対象魚に対して緊急措置がとられた¹⁾。これはわが国のアニサキス症対策の上で、養殖魚に対してなされた初めての行政的措置であったといえる。

そこで、アニサキスとはどのような寄生虫なのか、養殖魚は安全か？ アニサキスによる健康被害にはどのようなものがあるのか、また、その発生状況と予防策についてはどうか、などについて述べたい。

II アニサキスについて

1 概要

アニサキスは本来ヒトの寄生虫ではなく、その成虫がクジラなどの海産哺乳類の胃に寄生する回虫の仲間である。成虫によって生み出された虫卵は、糞便とともに海中に放出されてふ化幼虫となり、オキアミなどの甲殻類に捕食されて第三期幼虫に発育する。オキアミとともに体内に潜む幼虫が小魚に摂食されると、新しい宿主の体内で同じ第三期幼虫のままとどまって寄生を続ける。こうして自然界の「食う・食われる」という関係で、イワシなどの小魚からカンパチなどの大きな魚やイカなどへと伝播してゆく。このときの第三期幼虫は十分に肉眼で見える大きさ(10～40 mm)であり、わが国の近海産の魚とイカを調査したところ、165種以上のものから実際に見出されている。そして、これらのオキアミ類と魚介類(運搬宿主という)が、幼虫とともに本来の終宿主であるクジラな

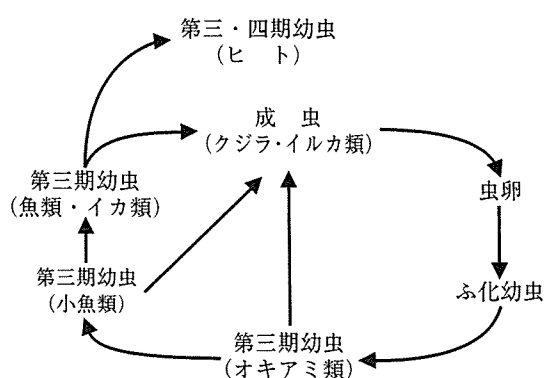


図1 アニサキスの生活環

どに摂食されると、幼虫は発育して胃の中で成虫となって虫卵を生み出すようになり生活環は完結する。

ところが図1で示すように、ヒトがこれらの海産魚やイカを生食すると幼虫は通常とは違った運命をたどることになる。ヒトは本来の終宿主でも運搬宿主でもないで、ヒトの体内で成虫にまで発育したり、幼虫が長期間発育せずに生き続けるということはない。生きた幼虫がヒトに摂取され、胃壁や腸壁に迷入すると、ときに激しい腹痛などをヒトに引き起こして幼虫は死滅することになる。アニサキス症の原因となるアニサキス幼虫には、アニサキスI型(*Anisakis simplex*)とテラノバA型(*Pseudoterranova decipiens*)があり、終宿主は前者がクジラ類で後者が鰯脚類(トド、アザラシなど)であるが基本的な生活環は同じである。

2 養殖魚のアニサキス汚染

ところで、養殖魚が一般にアニサキスについては安全と考えられているのは、自然状態の海産魚(自然魚)と異なり、図1に示すような「アニサキスの生活環」から切り離された環境で生育していると思われるからであった。しかしながら、養殖

魚であっても給餌法や養殖条件が適切でなければアニサキス汚染を防ぐことはできない。昨年問題とされた養殖カンパチは、稚魚から中間種苗(体重300g~1kg程度)まで中国で育てられたものを輸入し国内で養殖していた。汚染の原因は、中国において育成する際に生餌が使用されており、この生餌がアニサキスの汚染源として良く知られているカタクチイワシであったことによると推定された。

実は、以前から養殖魚が感染源と思われるアニサキス症の症例報告は存在する。安治らは、夕食として瀬戸内海産の養殖ハマチを食し、翌朝腹痛を訴えてその夜腹部の疝痛様発作を起こした患者から開腹手術によってアニサキス幼虫を検出した例を報告している²⁾。この原因として、瀬戸内海の養殖ハマチに生餌として与えられた北海道や北陸産のイワシ、オオナゴ、アジ等にアニサキス汚染があったと推測している。これは生餌によって育成されたために養殖魚がアニサキスで汚染されていた事例であったが、現在国内で汎用されているペレット状の固形飼料による養殖でも、場合によっては安全性にやや疑問な点が指摘された例がある。

荒木は、昨年の「養殖カンパチのアニサキス汚染問題」に際して「これまでに養殖魚におけるアニサキス汚染の報告がない」という一般的な評価に対し、かつて、養殖ギンザケからアニサキス幼虫を検出した事例を報告した³⁾。見つかったアニサキス幼虫は、1987年9月に、埼玉県桶川市のスーパー・マーケットで販売されていた三陸産ギンザケの切り身に付着していたものであった。このギンザケは、産地、魚種、時期、価格等から養殖魚であると推定された。当時三陸地方でギンザケを養殖していたある水産会社の話によれば、当時でも餌としては生餌でなくペレット化された魚肉が使用されていたということで、給餌による汚染ではないと考えられた。とすれば、生餌によるアニサ

キス汚染のない養殖条件であっても、海中に設けられた網で囲われた生け簀の中に、網をかい潜って入ってきたオキアミや小魚によって養殖魚がアニサキスに汚染されたという可能性が示唆されるのである。

3 アニサキス症とは

ヒトに生きたまま摂取されたアニサキス幼虫が、胃や腸から組織に侵入した時にアニサキス症が起きる。しかし、その後の経過は必ずしも一様ではなく、その症状の強さによって激症型と軽症型がある。激症型は、即時型過敏反応による消化管の攣縮を伴うもので、あらかじめアニサキス抗原で感作されているか再感染の場合であるといわれている。また、発症部位によって次のように分けられる。

1) 胃アニサキス症

胃アニサキス症では原因食品摂取後2時間から8時間で発症するものが多く、心窩部に差し込むような痛みが起き、それが持続して悪心、嘔吐を伴う場合がある。これがアニサキス症としては最も一般的な症状であるが、時に下痢、蕁麻疹、大量吐血を見ることもある。

2) 腸アニサキス症

腸アニサキス症では原因食品の摂取後、数時間から数日して臍部を中心に差し込むような痛みが出現し、悪心、嘔吐を伴う。発熱はないが虫垂炎、腸閉塞、腸穿孔などが見なされた場合、急性腹症として開腹手術を受けることがある。

3) 腸管外アニサキス症

まれに消化管を穿通し消化管以外の臓器に迷入して種々の症状を起こすか、他疾患の処置に当たって偶然に虫体が発見されることがある。発見部位は、腹腔、腸管膜、肝、胸腔、肺、リンパ節、皮下など体内のあらゆる所に及び、現在までに報告は100例を超える。

4 食中毒の原因としてのアニサキス

上述のようにアニサキス症は、ときに極めて重篤な症状を起こす疾病でありながら、その対策に関してはいささか軽視される傾向があったと思われる。「食中毒」とは有害、有毒物質が飲食物とともに摂取されて起こる急性胃腸炎をいい、多くの原因微生物や物質が届出の対象となっている。しかしながら、わが国では近年まで、アニサキス症を食中毒として届出の対象として取扱い、これを予防対策の役に立てようという認識は薄かったと思われる。しかし、1999年末に食品衛生法施行規則の一部改正が行われ(平成11年厚生省令第105号)、これに伴って、食中毒統計作成要領も一部改正と変更が加えられた。その中ではじめて、「原虫および寄生虫による飲食に起因する健康被害についても食中毒としての取扱いを明確にするため⁴⁾」食中毒事件票における食中毒病因物質の分類『その他』の欄で、「アニサキス等」が例示された。

他方で、アニサキス症の原因となるアニサキス幼虫は、他の食中毒病因物質とは明らかに異なる特徴がある。第一に肉眼で十分に見える大きさであること、第二にわれわれが食材とするほとんどすべての海産魚に寄生が認め得ること、第三にたとえ一匹でもヒトに侵入すれば発症しうること、第四に冷凍処理(−20℃以下、24時間以上)あるいは通常の加熱調理によって不活性化できるということ、第五にはアニサキスの検査は現在のところ魚肉を破壊することなしには行い得ないことなどである。第一、第二の特徴からアニサキス幼虫は、食品としての調理あるいは加工の過程や、消費者自身が食前に虫体を発見して除去することが可能なので、「病原体」としてではなく「異物」として取り扱われることがある。この実態に関しては後で述べる。そして第三、第四の特徴により、完全除去が不可能であるから食品衛生上、加熱調理

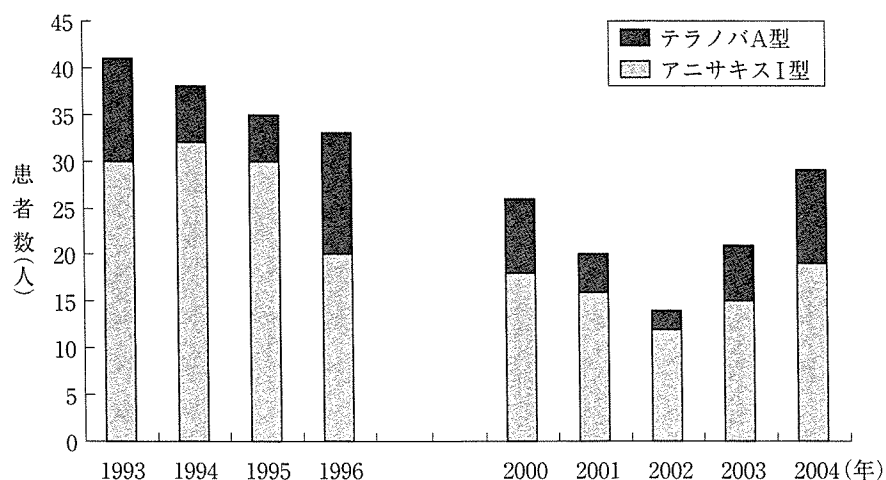


図2 北海道旭川の病院でのアニサキス症発生動向

をするか、生食に当たっては冷凍処理(-20℃以下、24時間以上)後にするよう勧告が行われてきた。そして、第五の特徴により、検査を行った後の鮮魚は商品にはならないため、今までは實際上、食品衛生上の検査対象とはされてこなかった。

ところで、生鮮出荷を前提としたアニサキスの検査は、自然魚ではほとんど不可能であったが、養殖魚では可能であると思われる。自然魚のアニサキスを検査するとすれば、個体ごとに成育条件が異なるためにすべての個体についての検査が必要となり、商品としての価値を失う。これに対して、養殖魚ではロット単位で成育条件が同一であるために、抜き取り検査の方法で汚染状況を把握することが可能であり、検査後の同一ロット内の残りの魚はすべて商品とすることができる。こういった意味においては、養殖によってアニサキス汚染のない鮮魚を生産するという技術革新が、今後のアニサキス症の減少につながり得る可能性は十分にある。ただしその場合も、養殖魚のアニサキス監視および検査体制を有効に構築することが前提となるのである。

5 アニサキス症の発生状況

日本人の食習慣からみてアニサキス症は昔からあった病気と考えられるが、原因となる虫種が同定されたのは今から40年ほど前の1964年である。しかし、当初は診断が困難で、その急激な腹部症状から患部を開腹切除されて病理学的に初めてアニサキス症であることがわかったケースがほとんどであった。70年代以降になって、内視鏡検査の普及とともに生検用鉗子での虫体摘出が可能となり、意外な多数例が発生していることが明らかになってきた。石倉によれば、1987～1991年までの5年間のアニサキス症患者数は、学会などで発表された数とアンケートから集計すると14,302人という数であった⁵⁾。この数字を根拠として、わが国では1年間に少なくとも2,000～3,000名のアニサキス幼虫による急性胃腸炎患者があると推定されている。

ところで最近では、アニサキス症に関する学会報告などはあまり目立たなくなった。また、冷凍魚や養殖魚の普及などによってその発生数は激減しているのではないかという声も聞かれる。そこで、

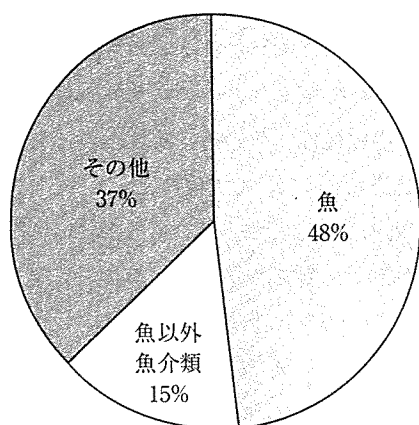


図3 (財)目黒寄生虫館の異物鑑定状況 2002～2004年 (3年間)

それが事実かどうか、アニサキス症について一貫して診断と治療に当たっている病院の、いわば定点での発生状況を見てみることにしよう。北海道旭川市の唐沢病院のデータであるが、1993年から1996年の4年間に胃アニサキス症と診断され内視鏡によって幼虫が摘出された患者の数はすでに学会で報告⁶⁾されている。今回、同病院の理事長・唐沢洋一氏のご好意により直近の5年間(2000～2004年)のデータを提示していただいたので、それらを合わせたデータを図2に示す。これによれば、唐沢病院では1993年から2004年にわたり、1年間の患者数がおおむね40人から20人の幅で推移し全体として激減といった傾向は見られていない。したがって、現時点では、先に引用したアニサキス症患者の全国的な推定数から大きな変動はないと考えても良さそうである。

6 食品に混入する異物としてのアニサキス

(財)目黒寄生虫館では、食品に混入する異物の鑑定を行っており、年間200件以上の依頼を受けている。2002～2004年に依頼された検体の種類

を分類してみると、全体の48%が魚関係で、魚以外の魚介類を含めると2/3近くにも及ぶ(図3)。これは人々が寄生虫のようなものを発見する材料としていかに魚介類からのケースが多いかを示している。

依頼された検体のうち、アニサキス幼虫として鑑定されたものは合わせて163件に上った。表1に、その内訳を示す。アニサキス症の原因となるアニサキスI型とテラノバA型の比率は、ほぼ1

表1 (財)目黒寄生虫館のアニサキス類検出件数 (2003～2005年)

| 区分 | 品名 | アニサキス I型 | テラノバ A型 | 総計 |
|-----|--------|----------|---------|-----|
| 魚関連 | サケ | 26 | 14 | 40 |
| | ホッケ | | 14 | 14 |
| | タラ | 2 | 11 | 13 |
| | サバ | 8 | | 8 |
| | タラコ | 7 | 1 | 8 |
| | イカ | 4 | | 4 |
| | スジコ | 4 | | 4 |
| | メロ | | 4 | 4 |
| | アンコウ | 3 | | 3 |
| | イワシ | 3 | | 3 |
| | メルルーサ | 2 | 1 | 3 |
| | アカウオ | | 2 | 2 |
| | アジ | 2 | | 2 |
| | アナゴ | 2 | | 2 |
| | カレイ | 1 | 1 | 2 |
| | サンマ | 2 | | 2 |
| | ヒラメ | | 2 | 2 |
| | イトヨリ | | 1 | 1 |
| | エビ | 1 | | 1 |
| | カジカ | | 1 | 1 |
| | カズノコ | 1 | | 1 |
| | カンパチ | 1 | | 1 |
| | ハタハタ | 1 | | 1 |
| マグロ | 1 | | 1 | |
| メバル | | 1 | 1 | |
| 寿司 | 2 | 1 | 3 | |
| 明太子 | 2 | 1 | 3 | |
| 魚 | 1 | 1 | 2 | |
| 刺身 | 2 | | 2 | |
| 加工品 | | 1 | 1 | |
| 小計 | | 78 | 57 | 135 |
| その他 | 食肉 | 4 | 15 | 19 |
| | 弁当等加工品 | 2 | 4 | 6 |
| | 調理器具 | 1 | 2 | 3 |
| | 総計 | 85 | 78 | 163 |

対1である。これらのアニサキス幼虫は、生きている限り紛れもない「病原体」であるが、「ヒラメ刺身に見つかった」「寿司ネタに混入」「生鮭に混入」など、刺身や寿司で見つかった場合も少なからずあり、これは消費者が摂食する直前にアニサキス症を予防したともいえる発見であろう。魚種では多いものの順に、サケ、ホッケ、タラ、サバと続き、焼き魚や缶詰になったものを含めて25種から見つかっている。その他として魚以外の「ほうれん草」、「鶏モモ肉」、「豚ロース」および「キムチ」からアニサキスが検出されている。さらには、調理器具等からで、おそらく生産、加工、貯蔵および流通の過程で混入したと見られるものである。これらの鑑定依頼のあったアニサキスは、水産会社で見つかったもの、水産会社で見つかって検査会社に依頼したもの、消費者が見つめて販売元や水産会社あるいはさらに検査会社を介したものなど様々であった。

Ⅲ ま と め

本稿では、平成17年に起きた「養殖カンパチのアニサキス汚染問題」にできるだけ沿うようにアニ

サキス症について述べ、わが国での本症の発生状況と、異物として検出されるアニサキス幼虫の実態などについてもふれた。アニサキス症を含む食品媒介寄生虫症は、その基本的な原因として日本人が歴史的に培ってきた食文化としての「なまもの嗜好」がある⁷⁾。したがって、その根絶には現実に即した対応が必要であり、容易に実現し得ることではない。1960年に世界で最初にアニサキス症が発見されたオランダでは、その後、原因食材となったニシンの冷凍処理(-20℃, 24時間)をいち早く法律で義務付け、この法律制定によってアニサキス症をほとんど根絶したといわれている。翻ってわが国では、アニサキス症の原因となる海産の食材が多様であり、また、食用魚介類の冷凍処理は種類によっては大きく商品価値を損なうなど状況は大いに異なっている。しかしながら、昨今の「食の安全・安心」を確保する立場から行政の役割は決定的に重要であることは論を俟たない。平成17年以来クローズアップされた養殖魚のアニサキス問題を奇貨として、具体的な監視および検査体制が構築されることを期待したい。

参 考 文 献

- 1) 平成17年6月15日付食安監発第0615001号「中国産中間種苗由来養殖カンパチ等のアニサキス対策について」
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2005/06/dl/h0615-4a.pdf>
- 2) 安治敏樹 他：瀬戸内海産養殖ハマチにて惹起されたと思われるアニサキス症とその考察，寄生虫学雑誌，33(2補)，49(1984)
- 3) 荒木潤：養殖魚におけるアニサキス感染について，第65回日本寄生虫学会東日本支部大会講演要旨，9(2005)
- 4) 平成11年12月28日付衛食第166号「食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行等について」
http://www1.mhlw.go.jp/topics/syokueihou/tp1228-1_13.html
- 5) 石倉肇：日本における Anisakidosis の発生状況の解析，臨床と研究，72(5)，1152-1158(1995)
- 6) 荒木潤 他：最近4年半の旭川・唐沢病院におけるアニサキス症の検討，日本臨床寄生虫学会雑誌，8(1)，103-109(1997)
- 7) 川中正憲：食品によって媒介される寄生蠕虫症一国内での最近の話題一，食品衛生研究，48(2)，41-50(1998)

平成17年度 厚生労働科学特別研究事業 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

Anisakis Larvae Found in Farmed Fish: Development of a New Inspection Method Using UV Illumination

国立感染症研究所寄生動物部

川中正憲, 杉山 広, 森嶋康之,
荒川京子

Department of Parasitology
National Institute of Infectious Diseases

Masanori KAWANAKA, Hiromu SUGIYAMA,
Yasuyuki MORISHIMA, Kyoko ARAKAWA

I はじめに

アニサキス症の原因となるアニサキス幼虫(以後、アニサキスと称す)は、極めて多種類の海産魚に寄生が認められる。したがって、アニサキス症の最も確実な予防法は、生食用の海産魚すべてを適正に冷凍処理しアニサキスを不活性化することである。しかしながら、わが国の消費者には「刺身魚は生鮮で」という根強い嗜好があるために、冷凍出荷した場合、魚種によっては価格の大幅な下落を招くという事実がある。一方で、海産魚の養殖に際して人工種苗の作成やペレットによる人工的な食餌の開発、そして養殖場の立地条件などを工夫することでアニサキスの寄生を防ぐ方法が普及してきた。実際、輸入養殖サケでは、アニサキス汚染のない鮮魚を消費者へ供給することに基本的には成功している^{1,2)}。国内でもブリ、タイ、カンパチなど多くの魚種について、養殖による生鮮刺身商材として一層の生産拡大が図られてきた。ところが昨年、アニサキスの寄生は無いと一般的

な評価を得ている養殖魚で大規模なアニサキス汚染が明らかとなり、その食品安全対策が緊急課題として取り上げられる事態があった。そして、これをきっかけとして、カンパチなど比較的大型の鮮魚を多数検査するための効率的で精密な試験法の開発が急務となった。

本稿のⅡでは、この経緯と従来の検査法の概要と限界、および新しい試験法の要点について述べ、Ⅲでは、その結果できあがった“鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル”を収載し、Ⅳでは、別紙として「虫体の同定法」に関して述べる。

Ⅱ 試験法開発の経緯

1 養殖カンパチのアニサキス汚染問題

平成16年秋以降に中国から輸入した、中国産中間種苗由来の国内養殖カンパチとイサキの一部からアニサキスが高頻度で認められた。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、該当する中国由来

の養殖カンパチは、合せて200万尾にも達した。このアニサキス調査は各県の水産試験場が実施し、検査されたカンパチ729尾のうち330尾(45%)に寄生が認められた³⁾。このアニサキス汚染の原因は、中国において種苗育成時に生餌として与えられたカタクチイワシ(アニサキスの感染源としてよく知られている)であると推定された。これらは、①寄生の頻度が高く、一部魚肉中からも寄生虫が検出されたこと、②通常生食用として販売されること、③カンパチやイサキにアニサキスが高頻度に寄生することが一般的に認識されていないことから、農水省から連絡を受けた厚労省は、平成17年6月15日、該当するすべてのカンパチとイサキについて、出荷に際し冷凍などのアニサキスが死滅するような処置を徹底するよう関係方面に対して指導を行った。しかしその後、当該養殖カンパチのうち特定のロットについて、①中国での生産・出荷の状況が明らかであること、②出荷前に生産ロットごとに寄生状況の詳細を調査すること、③加工時にすべての個体について寄生虫の有無を確認することなどにより、アニサキス寄生が無いことを確認したうえで、生鮮での出荷を認めて欲しい旨の要請が提出され、検討が行われることになった。ただしロットごとに寄生状況の詳細を調査するためには、多数のカンパチを対象とした効率的で精密な試験法が必要であり、どのような検査手法をとるべきかが問題となった。

2 従来から行われている鮮魚のアニサキス検査法

わが国で従来から実施されているアニサキスの検査法については、「食品衛生検査指針」⁴⁾に記載がある。すなわち、(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などである。検査対象であるアニサキスは体長が10～40mmの線虫であるので何よりも注意深

く行うことが検査の要諦である。しかしながら、検査すべき魚が大型でしかもサンプル数が多い場合、魚肉に適用される代表的な検査方法である「ガラス板を用いた圧平法」では、非常に多くの労力と時間とを必要とする。また、「人工消化液を使用した虫体の検出分離法」を、魚肉と内臓全体の検査に適用するとなれば、多くの器具・装置を使いこなす労力のほかに消化時間の確保が必須であり、効率的とは言い難い。

一方、米国やカナダ等では、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、タラなどの切り身からアニサキス等寄生虫の除去が積極的に図られてきた。わが国では、今日に至るまで国内向けの検査法としては馴染みが薄いと思われるキャンドリング法(ガラス板上に切り身を載せ下方から光を当てて透過光で寄生虫を見つける方法)が、これらの国では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が考案されてさらに寄生虫除去に効果をあげてきたという。しかしながら、これらの方法によって寄生しているアニサキスすべてを検出、除去することは、到底不可能であり、まして、生鮮刺身魚に適用するには困難がある。また、1970年には、紫外線(UV)照射によりアニサキス虫体が青白色の蛍光を発して検出しやすくなるとの知見が得られ、この原理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FDA⁵⁾、カナダの公定検査マニュアル⁶⁾では、白色光のキャンドリング法とともにUVランプを用いた検査法が述べられている。

3 養殖カンパチ検査の実施

ロットごとの寄生状況を詳細に調査するための検査手法に関しては、従来からわが国で行われてきたアニサキスの検査法や米国・カナダの検査マニュアルにある方法などについて検討された。そ

の結果、米国FDA検査マニュアルにある方法を基本として検査を実施することが決められた。それは、魚肉をフードプロセッサーで機械的に破碎し、得られた筋肉懸濁液にUVを照射することで、アニサキスの発する蛍光を感知し虫体の検出を行うという方法である。その後の経緯から、実際に養殖カンパチのアニサキス検査を担当することになったのは、宮崎県水産試験場(以下「宮崎水試」という)と香川県水産試験場(以下「香川水試」という)であった⁷⁾。両水試において多数のカンパチを検査すべく効率的な方法が模索された結果、米国FDAの検査手法に改良が加えられることになった。それは、検査に先立って魚肉を電子レンジによって加熱処理をするというものである⁸⁾。FDA法ではプラスチック刃を装着したフードプロセッサーで魚肉を機械的に破碎するとされているが、実際、新鮮なカンパチの筋肉は強い弾力性を持ち、プラスチック刃によるフードプロセッサーでは破碎し難い。そこで、電子レンジによる加熱処理を行うことで、短時間で容易に筋肉をほぐすことが可能になった。またこの加熱処理は、水に懸濁した際の濁りを抑えるというメリットもあって、その後の虫体の観察・検出が容易になる。最も肝要なUVの透過光により検出されるアニサキス虫体の蛍光に関しては、加熱処理後も生鮮時と変わらないか、むしろ増強が認められることが確認された。カンパチなど比較的大型の養殖魚を対象とした効率的で精密な試験法の概略は、以上の経過の中で基本的には定まったが、「マニュアル」とするには細部の検討が必要であった。

4 新しい「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」の作成

Ⅲに収載した「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」は、平成17年度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(主

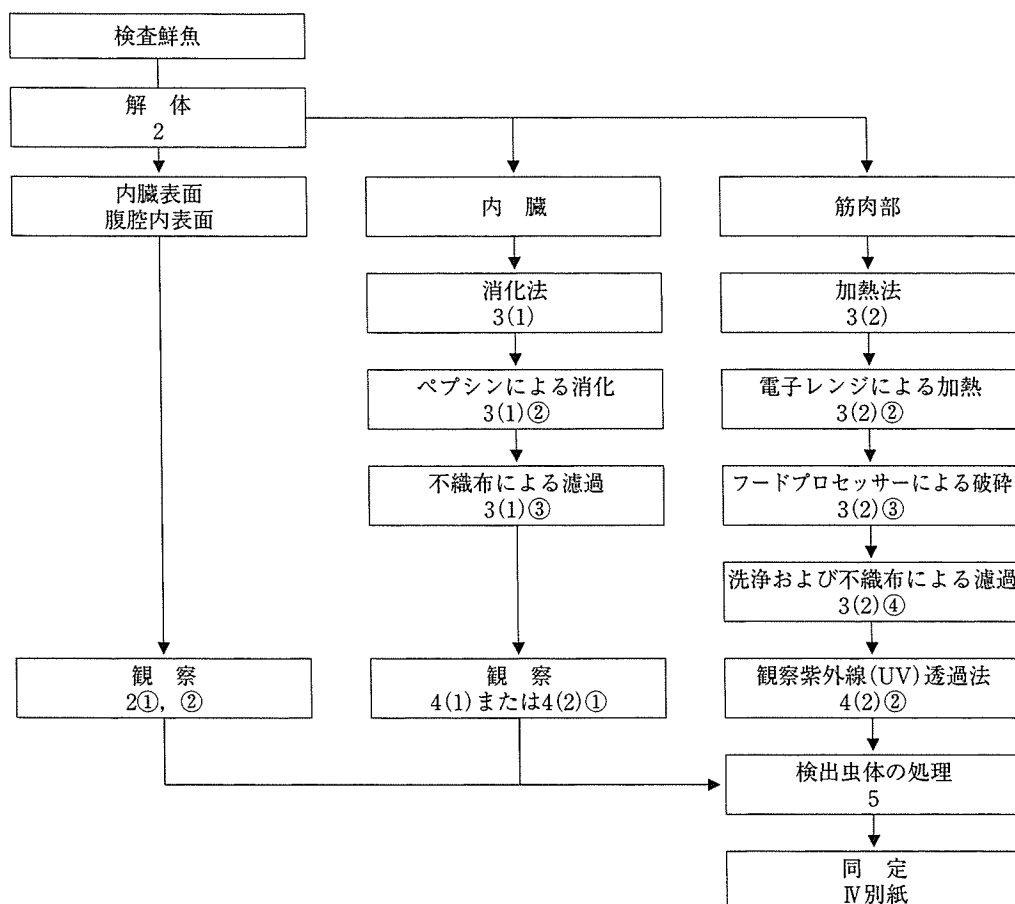
任研究者 遠藤卓郎 国立感染症研究所寄生動物部長)」の分担研究として上記の検討成果を基に改良し作成されたものである。国立感染症研究所(以下「感染研」という)と宮崎水試・香川水試と連絡をとりながら、検査手順の(再)評価を実施し、「マニュアル(案)」をまとめた。そして、昨年「養殖カンパチのアニサキス汚染問題」が起きた7県の衛生研究所に、「マニュアル(案)」にもとづいて実際にカンパチとアニサキスを使用した添加・回収実験の実施を依頼した。実施した試験結果とコメントを感染研に集約し、それらを参考の上、本稿著者らにより、「鮮魚のアニサキス幼虫検査マニュアル」の作成を行った。分担研究班のメンバーは、本稿著者の他に、中村充志(宮崎県水産試験場)、赤井紀子(香川県水産試験場)、藏元 強(鹿児島県環境保健センター)、河野喜美子(宮崎県衛生環境研究所)、宮坂次郎(熊本県保健環境科学研究所)、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)、砂原千寿子(香川県環境保健研究センター)、絹田美苗(高知県衛生研究所)(順不同、敬称略)で構成された。

また、本研究班のメンバーである小川和夫東京大学教授(魚病学)から、「マニュアル(案)」に対して有益なコメントをいただいた。

Ⅲ 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)2004」(厚生労働省監修、社団法人日本食品衛生協会)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ための

マニュアルのフローチャート



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)という手順を進める。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。

1 器材と試薬

① 装置器具

- 1) 暗箱付き卓上UV照射装置(UVランプの波長：365 nm)
- 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、検出には用いることができない)

- 3) 電子レンジ
- 4) 振盪恒温水槽(37℃に設定)、または恒温器(37℃に設定、この場合スターラーおよ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、または巻き尺
- 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(3,000 mlを含む各種, ガラス製, またはプラスチック製)
- 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) 洗淨びん
- 16) メスシリンダー (500 ml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15 cm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防御のための手袋, またはクリーム

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

2 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(3前処理および4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10~40 mm)の検出に努める。

① 検査対象となる魚の解体と腹腔表面の観察

- 1) 魚種と重量および体長を記録する。
- 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, 2②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, 5(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, フィレと称す)2枚と中骨とする。

7) 得られたフィレは, 3(2)(加熱法)に従って前処理を行う。

② 内臓部の観察

- 1) 胃をほか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) そのほか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, 5(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3(1)(消化法)に従って前処理を行う。

3 虫体検出のための前処理

(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。

① 適用部位

主として内臓に適用する。

② 消化処理

1) 胃を含むすべての内臓を, 人工消化しやす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こともある。攪拌装置を

用いて振盪・攪拌ができない場合には、時々かき混ぜながら長時間処理(例えば一晚を行う。)

- 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。

③ 虫体の回収

- 1) ろ過のため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および回転子を水でよくすすぎ、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、すべてガラスシャーレに移す。
- 6) アニサキスの有無を、4 (1) (直接観察)および4 (2) ①(UV透過法)で調べる。

(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ことができる。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。

① 適用部位

筋肉部に適用する。内臓部には適用しない。

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。

③ 破碎処理

- 1) プラスチック刃(金属刃でないことを確認)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。
(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。)

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) フードプロセッサーから破碎サンプルを不織布袋内に移す。
- 3) 洗浄びんを用いて、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ことがあるので、不織布も検査対象とする。

6) 虫体の検出操作は、4 (2)②(UV透過法)に従う。

4 虫体の検出

(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(2②)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(3(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、5(検出虫体の処理)に従って処理する。

(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できる。

① 消化法で前処理したサンプル

1) 消化法(3(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、5(検出虫体の処理)に従って処理する。

② 加熱法で前処理した破碎サンプル

1) 加熱法(3(2))で処理した破碎サンプルは、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、破碎サンプルを容器全体に均に広げる。

(注：容器に入れる1回分の破碎サンプル量は水を加えたとき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) 水で薄めた破碎サンプルを、暗箱中の卓上紫外線照射装置の上のせて観察する。

(注：ピンセットか有柄針で残渣をよけながら、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、蛍光を発するものすべてを採取し、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、すべての破碎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、5(検出虫体の処理)に従って処理する。

5 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よく洗う。

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。

IV 別 紙

1 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「2. 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℃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ハサミ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ない。透過に要する時間は虫体の大きさにより異なるが、60℃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ガラス上にのせ、さらにカバーガラスを uploads 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 (下図も参照)。

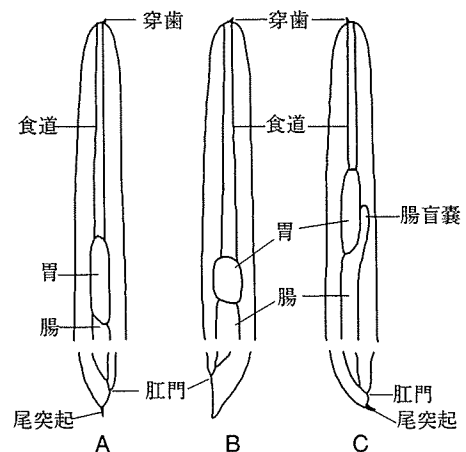


図 おもなアニサキス亜科線虫幼虫の頭部と尾部の形態
 A: *Anisakis simplex*
 B: *A. physeteris*
 C: *Pseudoterranova decipiens*

- (a) 頭端に穿歯を有し,
 - (b) 食道部と胃の移行部は斜めに接続し,
 - (c) 胃および腸に盲嚢をもたず,
 - (d) 尾端は鈍円に終わり,
 - (e) その先端に尾突起を有する。
- (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。

2 アニサキス類幼虫の分子同定^{9,10)}

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260nm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'-GTAG-GTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3')とリバーサ・プライマーNC2(5'-TTAGTTTCTTTTC-CTCCGCT-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 μ lとなるように蒸留水で調節してPCR増幅させる。
 - (a) DNAポリメラーゼ(*TaKaRa Z-Taq*, タカラバイオ株式会社, 2.5 units/ μ lを0.5 μ l)
 - (b) PCR緩衝液(*Z-Taq*に同梱されている10 \times *Z-Taq* Bufferを5 μ l)
 - (c) dNTP mixture(*Z-Taq*に同梱されている各2.5 mMを4 μ l)
 - (d) フォワード・プライマー
NC5(20 μ Mを1.25 μ l)
 - (e) リバーサ・プライマー
NC2(20 μ Mを1.25 μ l)
 - (f) テンプレートDNA(50 ng)
- PCRの条件は以下のとおりとする。
- (a) 変性が98 $^{\circ}$ Cで5秒 \rightarrow アニールが60 $^{\circ}$ Cで10秒 \rightarrow 伸長が72 $^{\circ}$ Cで10秒
このサイクルを35回繰り返す。
 - (b) さらに最終的な伸張として、72 $^{\circ}$ 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 μ 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に用いたいずれかのプライマーとサイクルシーケンシング用の試薬(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*Hin* fI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。虫体の長期保存のために 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 個体ごとの結果を出し、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

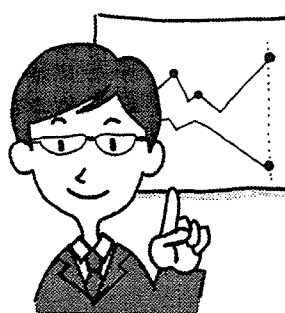
- ① DNA 抽出に先立つ前処理として、幼虫を細

切して PBS に入れ、凍結・溶解を 3 回繰り返す、さらに 10 分煮沸することを推奨する論文がある¹⁰⁾。しかしながら、QIAGEN のキット (DNeasy) で DNA を調整する場合には、このよう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 1.5 ml のエッペンチューブに入れた後、軽くスピンド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よい。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ベッスル(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、このような器具を使わなくても、また虫体をさら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

文部科学省認定・通信教育 「統計手法」を「仕事」に活かす。「統計実務講座」

統計の資格と実力



資格 — 「統計士」の資格が取得できる。
(「統計士」資格認定試験制度・詳細は資料で)

★統計の基本から統計的手法がマスターできる!
★いろいろな統計的手法が実際に活用できる!
★エクセルによる統計解析力をつける!

- あらゆる分野でパソコン活用の今日、統計の基本をマスターした人が求められています。●本講座なら、統計の基本から、回帰相関、推定検定、調査法、品質管理、実験計画法など、各種統計的手法が実例を通して身につきます。
- 企画・調査・医学・薬学・品質管理・看護・金融・証券・生保・損保関係者に最適です。
- 大学生・院生には、研究や就職に必須の講座・資格です。
- 修了後は、統計スペシャリストとして活躍できます。
- 指導委員=芳賀敏郎・野澤昌弘先生他。修了者に「修了書」と「統計士」資格認定証書を交付します。
- ◆無料進呈中!ご希望の方はハガキがTEL、FAXで下記まで!

●受講生募集中●
詳しい案内書
無料進呈
●ご希望の方は下記へ!

●特 色●本講座のテキストに対応したパソコン利用の方法をまとめた「エクセルによるデータ解析・統計プログラム集/CD付き」を特別に提供いたしますので初心者には最適!

〒160-0015 東京都新宿区大京町4の408
TEL.03-3357-8153
http://www.jitsumu.or.jp FAX.03-3358-7259

ATLとProteinase K)により1時間以内に虫体タンパクが溶け、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から十数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。したがって、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 μ l(それぞれ180 μ lと20 μ 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ことは、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等を試みても、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Hin 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℃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*がともに人体寄生性であることが確認された。

わ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(例えば北海道のスケトウダラ、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*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Hin I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Hha Iは、*A. simplex C*の特定に有用な酵素である。

参 考 文 献

- 1) 新妻淳ら：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)
- 2) 鈴木淳：都内流通サケ・マス類からのアニサキス I 型 (*Anisakis simplex*) 第 3 期幼虫の検出状況，東京都微生物検査情報，24 巻 3 号，(2003) <http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/epid/2003/tbkj2403.html>
- 3) 平成 17 年 6 月 15 日，食安監発第 0615001 号，「中国産中間種苗由来養殖カンパチ等のアニサキス対策について」
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2005/06/dl/h0615-4a.pdf>
- 4) 『食品衛生検査指針(微生物編)2004』：社団法人日本食品衛生協会(2004) 536-538
- 5) 『食品衛生検査指針(微生物編)2004』：社団法人日本食品衛生協会(2004) 560-563
- 6) Gov of Canada, Isolation and identification of anisakid roundworm larvae in fish, (1995)
<http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>
- 7) 平成 17 年 11 月 17 日開催「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」議事録 <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/11/txt/s1117-2.txt>
- 8) 赤井紀子，長野泰三：マイクロ波加熱を利用したブリ属魚類筋肉中のアニサキス幼虫検出法，香川県水産試験場研究報告書 8。(印刷中)
- 9) 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
- 10) 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

最新刊

食品衛生法規 2006

食品衛生法をいつも身近に!!

食品衛生法をはじめ食品衛生法施行令，食品衛生法施行規則を収載。食品衛生法の各条文には参考条文を示し，引きやすくしました。食品関係の方に，ぜひ一冊!!

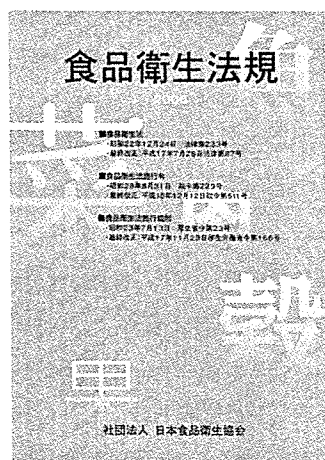
[最終改正]

食品衛生法 平成17年7月26日

食品衛生法施行令 平成15年12月12日

食品衛生法施行規則 平成17年11月29日

- A5判 140ページ
- 定価1,575円(税込) 送料240円



社団法人 日本食品衛生協会 出版部普及課
FAX 03-3403-2384