

厚生労働科学特別研究事業（厚生労働行政推進調査事業）
カツオの生食を原因とするアニサキス食中毒の発生要因の調査と
予防策の確立のための研究

分担研究報告書

8. 「アニサキス形態同定に関する手順書」の作成

研究分担者	国立感染症研究所寄生動物部	杉山 広（執筆者）
研究協力者	国立感染症研究所寄生動物部	森嶋 康之
	福島県保健福祉部食品生活衛生課	門馬 直太
	福島県衛生研究所	菅野 奈美，塚田 敬子

研究要旨 患者から摘出された虫体，あるいは魚介類や食品残品等から検出された虫体が，アニサキスであるとの同定に関しては，検査のための公定法が見当たらない。また画像を示しながら，形態同定の要点を簡便に記述した資料も乏しい。そこで「アニサキス形態同定に関する手順書」を作成した。

A. 研究目的

アニサキス（*Anisakis* 属および *Pseudoterranova* 属の線虫）が寄生した海産魚介類をヒトが喫食すると，時に虫体が胃壁や腸壁に刺入し，急性胃腸炎を主徴とするアニサキス食中毒が発生する。このようなアニサキス食中毒の患者を診断した医師は，食品衛生法に則して保健所に届け出る義務があり，保健所長が食中毒と断定した場合，事例は最終的に厚労省で取り纏められて，食中毒統計に収載される。アニサキス食中毒の原因であるアニサキスに汚染された食品の販売は，食品衛生法で禁止されており，違反した場合は行政処分の適用対象となる（営業停止など）。したがって患者から摘出された虫体がアニサキスであるとの同定は重要である。併せて魚介類や食品残品等から検出された虫体が，アニサキスであるとの同定に関しても，現場で使用できる簡便

な「アニサキス形態同定に関する手順書」が欲しいとの声を，各地の施設でたびたび聞いた。そこで本研究班では，福島県の研究協力者が中心となって，手順書の作成作業に取り組んだ。

B. 研究方法

寄生虫学の教科書・専門書や文献を参照して，アニサキス食中毒の原因となるアニサキス亜科線虫（*Anisakis* 属および *Pseudoterranova* 属）の形態を調べ，魚介類から検出した虫体を用いて画像を作成し，手順書を取りまとめた。市販の安価な機材を組み合わせ，アニサキス虫体の画像撮影と保存・転送が可能なシステムを構築し，併せて手順書に記載した。

C. 研究結果

「アニサキス形態同定に関する手順書」

は次ページ以降に添付した。参照されたい。なお患者由来虫体の同定に使用が可能なことを、実際に確認している。

D. 考察

アニサキスに関しては、検査のための公定法がない。厚労省から通知として発出された「対 EU 輸出水産食品の取扱いについて(2009年6月4日)」においては、衛生基準の項で「水産物を出荷する前に寄生虫の目視検査が必要」と記され、検査対象とする寄生虫種にアニサキスが含まれるのは、当然と思われる。しかし検査・同定に関する具体的な記述は極めて乏しい。食品衛生検査指針(微生物編 改訂第2版 2018, 公益社団法人 日本食品衛生協会・編)でも、アニサキスの検査法は詳しいが、形態同定に関する略図が示されるだけで、画像は提示されていない。これらの点を補完する「アニサキス形態同定に関する手順書」の作成に、今回、取り組むことにした。

この手順書が福島県内だけでなく、全国で広く活用されることが希望される。内容に不適切・不十分な記述があれば、ご指摘を頂きたいと希望しており、データを追加できるような改訂の機会があれば、とても有難いと考えている。

E. 結論

患者から摘出された虫体、あるいは魚介類や食品残品等から検出された虫体が、アニサキスであるとの同定に関しては、検査のための公定法がない。また画像を示しながら、形態同定の要点を簡便に記述した資料も乏しい。そこで「アニサキス形態同定に関する手順書」の作成に取り組んだ。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

アニサキス形態同定に関する手順書

福島県保健福祉部食品生活衛生課

福島県衛生研究所

目次

1	目的	P. 1
2	アニサキスについて	P. 1
	(1) 寄生虫「アニサキス」	P. 1
	(2) アニサキス食中毒	P. 2
3	実施手順	P. 2
	(1) 同定の流れ	P. 2
	(2) 手順	P. 2
4	アニサキス虫体の種類と特徴	P. 4
	(1) <i>Anisakis</i> type I	P. 5
	(2) <i>Anisakis</i> type II	P. 5
	(3) <i>Pseudoterranova</i> spp.	P. 6
5	形態同定	P. 7
	(1) 検体の保存	P. 7
	(2) 観察方法	P. 7
6	遺伝子検査	P. 11
	(1) DNA 抽出	P. 11
	(2) PCR-RFLP 法	P. 11
	(3) 塩基配列解析 (シーケンス法)	P. 11
7	参考文献	P. 11

1 目的

アニサキス食中毒患者の体内から摘出されたアニサキス虫体を同定するため、検体確保の注意点や顕鏡による確認の基礎的な知識やポイントを整理することを目的とする。

本県はアニサキス食中毒の多発県であり、平成30年は集計開始以降最も多い58件の食中毒事例の報告があった。科学的根拠に基づくアニサキス食中毒の行政判断を行うため、各保健所及び衛生研究所は本手順書に従い、アニサキス虫体の確保と顕鏡による確認を行う。

2 アニサキスについて

(1) 寄生虫「アニサキス」

アニサキスはクジラやアザラシなどの海産哺乳類を終宿主とする線虫で、成虫は終宿主の胃に寄生する。その虫卵は糞便とともに海中に放出され、中間宿主であるオキアミなどの甲殻類に捕食され第3期幼虫に发育する。この幼虫を宿主オキアミが魚介類（サバやイカなど）に捕食され、その体内で第3期幼虫のまま寄生を続ける。アニサキス幼虫が寄生した魚介類を海産哺乳類が捕食すると、その胃内で成虫となり生活環が完結する（図1）。

ヒトは第3期幼虫が寄生する魚介類を生食することにより感染し、幼虫が胃壁や腸管壁に刺入して食中毒を引き起こすが、ヒトの体内では成虫にまで发育できないため、感染は拡大しない。なお、幼虫の多くは魚介類の内臓部分に寄生しているが、筋肉部分（刺身部分）へも移行する。

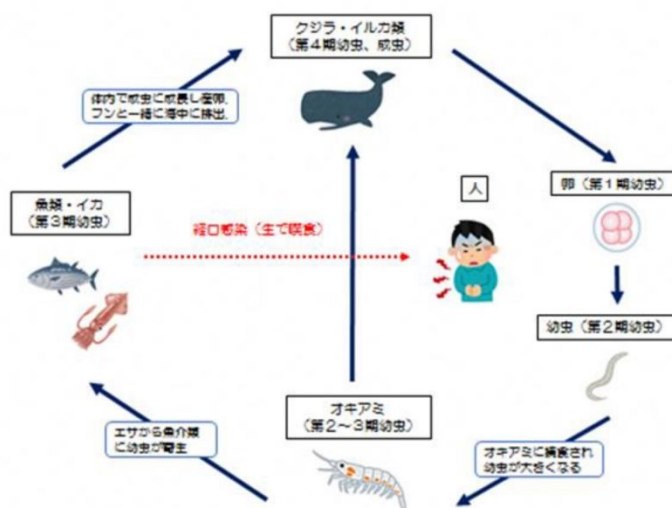


図1：アニサキスの生活環

(2) アニサキス食中毒

ア 急性胃アニサキス症 (症例の大半を占める)

食後数～数十時間後に、激しい胃痛、悪心、嘔吐を呈する。

イ 急性腸アニサキス症

食後十時間後～数日後に、激しい下腹部痛、腹膜炎、ときに腸閉塞や腸穿孔を併発する。

ウ その他

まれではあるが、消化管を通過して腹腔内へ脱出後、腸間膜、腹壁皮下などに移行し、肉芽腫を形成し、虫体寄生部位に応じた症状が現れる消化管外アニサキス症を引き起こすこともある。

また、魚介類の生食後に蕁麻疹を主症状とするアニサキスアレルギーを認めることがある。

3 実施手順

(1) 同定の流れ

確認のポイント	1) アニサキス虫体かの確認	2) 虫体の種類 <i>Anisakis</i> type I、 <i>Anisakis</i> type II、 <i>Pseudoterranova</i> spp.	3) 虫体の分子同定 (例) <i>Anisakis simplex</i> 、 <i>Anisakis pegreffii</i>
手法	デジタル顕微鏡	デジタル顕微鏡 実体顕微鏡	PCR-RFLP法、 塩基配列解析

(2) 手順

ア アニサキス虫体の確保

医師からアニサキス食中毒の届出があった時は、速やかに患者の胃から摘出されたアニサキス虫体を確保するため、医療機関へ協力を要請する。

イ 各保健所が行う形態同定

医療機関から提供された検体がアニサキス虫体であることを簡易型デジタル顕微鏡等により確認する。検体の状態等により同定が困難な場合は、撮影した画像データを衛生研究所を含む関連する公所に送付し、ダブルチェックを行う。

各保健所は、デジタル顕微鏡による顕鏡を行った後、アニサキス虫体を衛

生研究所に搬入する。

ウ 衛生研究所が行う形態同定及び遺伝子解析

衛生研究所は、実体顕微鏡等を用いた詳細な形態同定や遺伝子解析による種の同定を行い、魚種とアニサキスの種の関係など、基礎的な情報を収集する。

4 アニサキス虫体の種類と特徴

魚介類から検出されるアニサキス第3期幼虫は、形態学的特徴から下記3群に区分される。特に、胃の形を特徴としてとらえる（図2）。

なお、さらに詳細な分類もある（図3）。北海道から本州の太平洋側で漁獲される魚には主に *Anisakis simplex*、九州北部から日本海沿岸の魚には主に *Anisakis pegreffii* が寄生している。国内のアニサキス症患者の99%は *Anisakis simplex* が原因であったという報告もある。

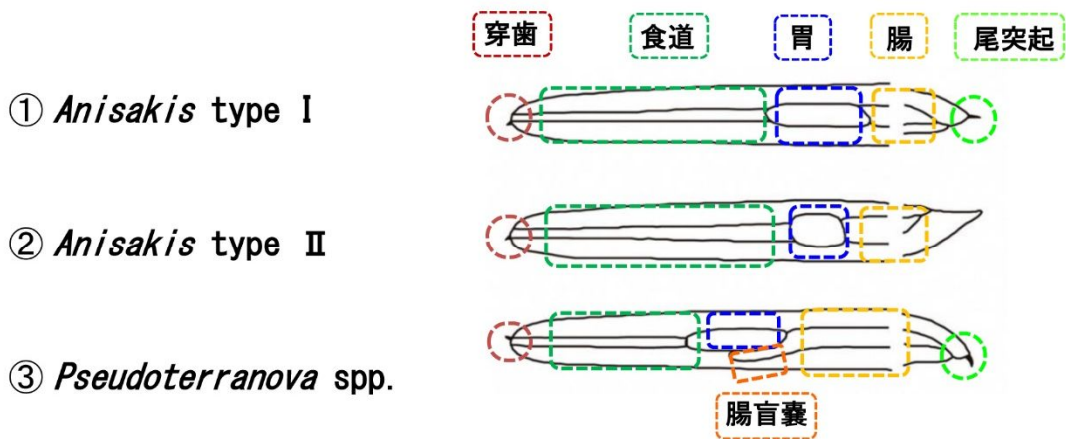


図2：アニサキス幼虫の形態模式図

第3期幼虫の形態に基づく分類	成虫の形態に基づく分類	塩基配列に基づく分類 (同胞種レベルでの分類)
<i>Anisakis</i> Type I *	<i>A. simplex</i> sensu lato *	<i>A. simplex</i> sensu stricto *
	<i>A. typica</i>	<i>A. pegreffii</i> *
	<i>A. ziphidarum</i>	<i>A. berlandi</i> (<i>A. simplex</i> C)
	<i>A. nascettii</i>	
<i>Anisakis</i> Type II *	<i>A. physeteris</i> *	
	<i>A. brevispiculata</i>	
	<i>A. paggiae</i>	
<i>Pseudoterranova</i> spp. *	<i>P. decipiens</i> sensu lato *	<i>P. decipiens</i> sensu stricto <i>P. azarasi</i> *

*: 人体症例の原因として報告のあるもの
sensu lato; 広義の種(形態種)であることを示す用語
sensu stricto; 狭義の種(分子種)であることを示す用語

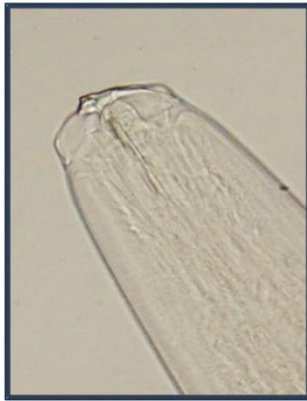
図3：アニサキスの幼虫、成虫の形態および塩基配列に基づく分類

(1) *Anisakis type I*

大きさ19~36×0.4~0.6mm、半透明白色、渦巻き状であることが多い。アニサキス症患者から検出される虫体の大多数はI型である。

頭端に穿歯を有する。筋性の食道に続いて腺性の長い胃（長方形）を有し、その胃と腸の移行部は斜めに接続している。尾端は鈍円に終わり、その先端には尾突起が見られる。

頭部
(穿歯 boringtooth 有)



胃部
(長方形)



尾部
(尾突起 mucron 有)



(2) *Anisakis type II*

大きさ25~33×0.5~0.7mm、半透明白色、渦巻き状であることが多い。

頭端に穿歯を有する。筋性の食道に続いて腺性の短い胃（正方形）を有し、その胃と腸の移行部は水平である。

尾端は次第に先細りし、全体としては円錐形を示す。尾突起は無い。

頭部
(穿歯 boringtooth 有)



胃部
(正方形)



尾部
(尾突起 mucron 無)



(3) *Pseudoterranova* spp.

アニサキス虫体と種類は異なるが、引き起こされる症状が似ていることから、発症時には、ひとくくりにアニサキス症とされる。

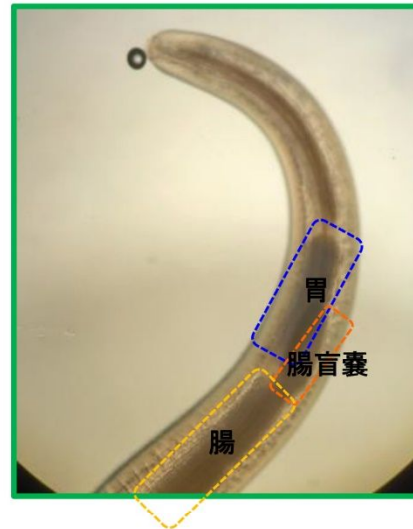
大きさ11～37×0.3～0.95mm、渦巻き状になりにくい。茶褐色でアニサキス虫体より太くやや大きめである。

頭端に穿歯を有する。筋性の食道に続いて腺性の胃があり、胃に沿って腸から上部に向けて突出する胃よりやや短い腸盲囊が見られる。腸盲囊は、虫体を回転させて色々な角度から観察することで、確認されることも多い。

尾端はやや鈍円に終わり、その先端には尾突起が見られる。

北日本に多く、北海道でのアニサキス症の約4割が本虫に起因とされている。

アニサキス症と同様に激しい腹痛を示す他、無症状で吐出されるケースがある。



5 形態同定

(1) 検体の保存

患者体内から摘出されたアニサキス虫体は医療機関にて速やかに生理食塩水に保存し、冷蔵保管されることが望ましい。

虫体の運動が確認されない場合や体色が白く変化している場合、内視鏡による虫体摘出時に虫体が大きく破損した場合は、70%エタノールに保存・保管する。

(2) 観察方法

ア 準備物

簡易デジタル顕微鏡、パソコン。

なお、ピンセット、シャーレ、保存溶液（生理食塩水または70%エタノール）、水分吸収剤（ティッシュ等）も必要に応じて準備するとよい。

イ 簡易型デジタル顕微鏡操作方法

- ① パソコンに「Micro Capture Plus」ソフトをインストールする。
- ② 簡易型デジタル顕微鏡のUSBをパソコンに差し込み、パソコン画面上のアイコンをクリックする。
ソフトが立ち上がるのを確認する
- ③ 簡易デジタル顕微鏡は観察ステージに固定して使用する。



- ④ 乾燥を避けるため保存液体ごとシャーレ等に検体（アニサキス虫体）を移し、観察する。

（容器が透明の場合等で直接観察可能な場合はこれに限らない。）



...

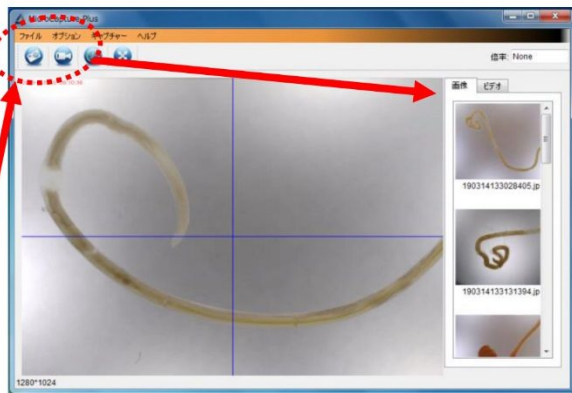
- ⑤ ステージ（観察台）裏の光源を調節し、簡易デジタル顕微鏡の位置を操作する。



- ⑥ アニサキス虫体の全体像を観察・撮影する場合は、簡易デジタル顕微鏡をステージから約2 cm 離し、ピント（焦点及び拡大）を合わせる。
簡易デジタル顕微鏡は3段階（拡大）ピントを合わせることが可能である。



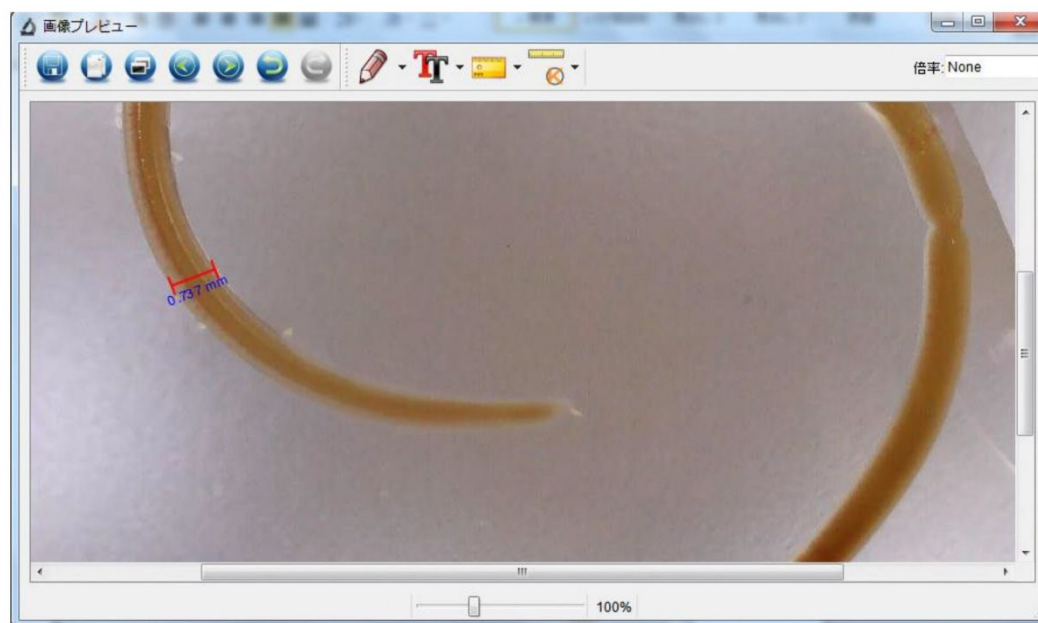
「静止画像」「動画」撮影



- ⑦ 詳細確認のため拡大して観察する場合は、できるだけ簡易デジタル顕微鏡をアニサキス虫体に近づけ、ピントを合わせる。
(この時、アニサキス虫体を押しつぶしてしまわないよう注意する。)

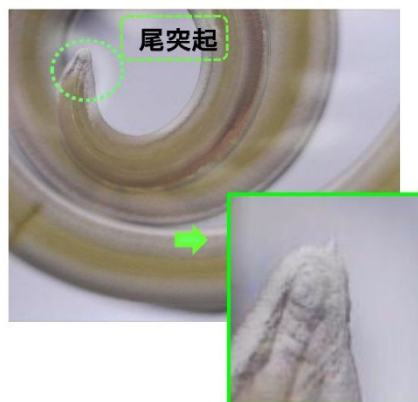
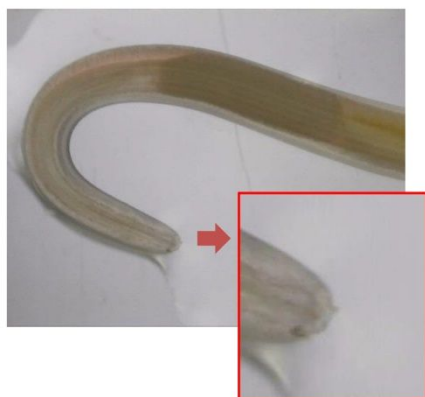
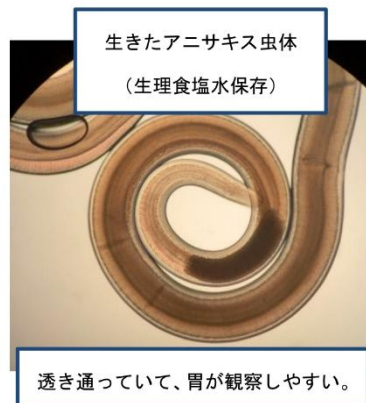
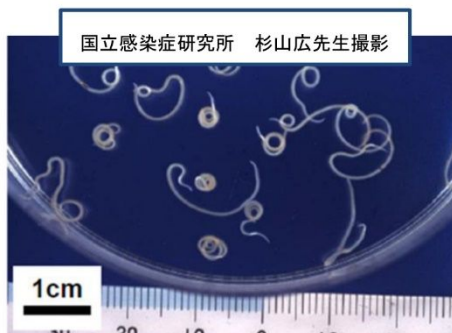


- ⑧ 撮影した画像をクリックし、「画面プレビュー」にて加工（スケールを用いた採寸）や保存（jpg）が可能になる。保存後は画像データを衛生研究所を含む関連する公所に送付可能となる。



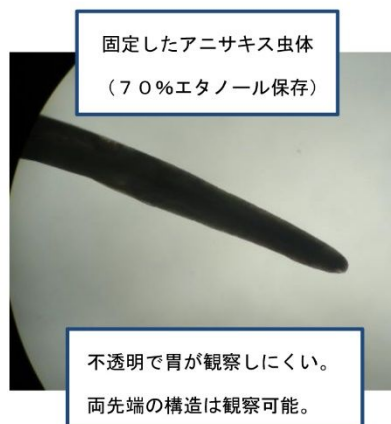
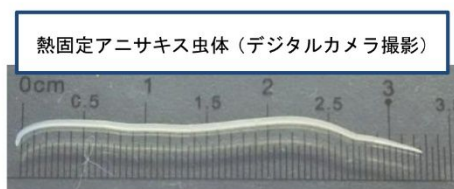
ウ 生きた虫体を直接観察（生理食塩水）：胃の形態観察

医療機関から提供された検体がアニサキス虫体であることを簡易型デジタル顕微鏡により確認する。



ウ 虫体の固定と観察：胃・胃以外の形態観察とその後の作業

- ① 熱固定（60～70℃のお湯）→ 虫体が伸長し観察しやすくなる。
- ② 速やかに70%エタノール固定 → 観察が難しくなる。虫体観察後の保存・遺伝子解析に適している。
- ③ ホルマリンを固定液として使わない。遺伝子解析が困難となる。



6 遺伝子検査

(1) DNA 抽出

- ア 虫体鏡検後、メスで切断し頭部（胃部含む）及び尾部は70%エタノールで保存し、残りの部分を使用する。
- イ DNeasy Blood & Tissue Kit（キアゲン）を使用し、DNA を抽出する（所要時間2～3時間）。

(2) PCR-RFLP 法

- ア ITS 領域遺伝子を増幅する。
- イ PCR 増幅産物を用いて制限酵素（*Hinf* I）で処理後電気泳動を実施する。

(3) 塩基配列解析（シーケンス法）

シーケンサーで DNA 塩基配列を解析する。

7 参考文献

- (1) 食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018
公益財団法人 日本食品衛生協会
- (2) アニサキス症 ファクトシート（科学的知見に基づく概要書）
内閣府 食品安全委員会
- (3) 横山 博ほか 「水産食品の寄生虫・異物検索図鑑」、緑書房
- (4) 中島祥、山本淳 「日本近海（東シナ海）と南シナ海における Anisakis I 型幼虫の分子生物学的特徴による識別」水産増殖（Aquaculture Sci.）
57（4）、525－530（2009）
- (5) 鈴木淳、村田理恵 「わが国におけるアニサキス症とアニサキス属幼線虫」東京都健康安全研究センター年報 62、13－24（2011）

8 謝辞

本マニュアルは、平成30年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）「カツオの生食を原因とするアニサキス食中毒の発生要因の調査と予防策の確立のための研究【研究代表者：小川和夫（公益財団法人目黒寄生虫館）】」の補助を受けて実施された分担課題に資するため、研究分担者杉山広先生（国立感染症研究所 寄生動物部）監修のもと作成したものである。