

令和元～3年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

研究課題名 (研究項目名)	アニサキス汚染実態調査およびリスク低減策の評価に関する研究 (課題番号：1909) (アニサキス食中毒におけるリスク評価及びリスク低減策に関する研究)
主任研究者	研究者名：大西 貴弘 所属機関：国立医薬品食品衛生研究所

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

令和元年度～令和3年度（3年間）

2 研究目的

アニサキス食中毒のリスク評価を行うために必要な知見を収集する目的で本研究を行う。アニサキス食中毒のリスク評価を行うにあたって以下の知見が不足していると考えられる。

1. これまでにアニサキスの汚染実態調査としてマサバを対象とした定点調査が実施されており、太平洋側のマサバには人体症例の主要病原種である *Anisakis simplex* sensu stricto が寄生することが報告されている。一方、日本海・東シナ海側のマサバには、症例発生にほとんど結びつかない *Anisakis pegreffii* が主に寄生するとされている。しかし寄生率や寄生部位に関して、季節的な変動を認めるのか等は、統一的な調査成績がなく、感染予防の啓発などに取り組む上で、データが不足している。さらにマアジや近年患者数が急増したカツオに関するデータも不足している。
2. アニサキスのリスク評価を行うためにはアニサキスのばく露リスクに関する知見が必要である。しかし、現在わが国では丸魚を一尾購入し家庭で喫食することは少なくなり、すぐに喫食可能な状態で販売されている刺身や鰻を購入することが一般的になっている。しかし、商業施設で水産食品を購入する場合、魚は解体されアニサキス線虫を取り除くなどの処置が行われているため、魚個体レベルだけでなく、喫食直前の食品レベルでの汚染実態も調査する必要がある。しかし、統一的な調査成績がなく、データが不足している。
3. 大型商業施設ではそれぞれの施設が独自の方法でアニサキスの検出、除去を行なっている。しかしながらこれらの方法の有効性に関するデータが不足している。

以上のような背景を踏まえ、まず、研究に必要な *A. simplex* 同胞種の簡易・迅速検査法を確立した後、魚個体レベルでの汚染実態調査を行い、魚介類における具体的な寄生種、寄生率、寄生部位等の実態調査に取り組む。次に消費者が喫食する直前の水産食品レベルでの汚染実態調査を行う。さらに大型商業施設で行われているアニサキス検出・除去法の有効性を科学的に検討する。以上の結果を総合しアニサキス食中毒リスクを検討する。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
アニサキス食中毒におけるリスク評価及びリスク低減策に関する研究	アニサキス迅速検査法の確立	大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）
	アニサキスによる日本近海魚の汚染状況の調査	杉山 広（国立感染症研究所）
	すぐに喫食可能な水産食品におけるアニサキス汚染状況の調査	大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）
	大型商業施設で実施されるリスク低減策の科学的検証	杉山 広（国立感染症研究所）

4 倫理面への配慮について

ヒトに関する検体や情報を取り扱わないため、本研究には該当しない。

Ⅱ 研究内容及び成果等

1 研究項目：アニサキス食中毒におけるリスク評価及びリスク低減策に関する研究

(1) 個別課題：アニサキス迅速検査法の確立（大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所））

【研究内容】

食中毒の主な原因となる *Anisakis simplex* には遺伝的多形が認められ、*A. simplex sensu stricto* (s. s.)、*A. pegreffii*、*A. berlandi* の三つの同胞種に分類されている。さらに近年、*A. simplex sensu stricto* と *A. pegreffii* のハイブリッドの存在が指摘されている。これら同胞種は形態学的に区別することが困難であるため、遺伝学的な検査法が使用されている。これら同胞種は rDNA の ITS 領域に 2 か所の SNPs を持つため、DNA シークエンシングで SNPs 確認、もしくは PCR による ITS 領域の増幅産物を制限酵素で切断しその切断パターンを比較するなどの方法で従来より同定されてきた。しかしこれらの方法は煩雑で、結果が出るまでに 1 日以上時間を要する。そこで本研究ではこれら 3 種の同胞種とハイブリッドを検出することのできる迅速検査法の確立を目標とした。

【研究方法】

ITS 領域の 2 か所の SNPs の検出を行うこととした。SNPs を簡便な方法で検出するために、本研究では Amplification Refractory Mutation System (ARMS 法) を検討した。ARMS 法は PCR プライマーの 3' 末端にミスマッチがあると PCR 反応が進まないことを利用した方法である。*A. simplex* (s. s.) と *A. pegreffii* は ITS 領域上に 2 箇所の SNPs が存在するため、上流プライマーの 3' 末端を 2 か所ある SNPs の内のひとつに一致するように作成し、下流プライマーの 3' 末端をもうひとつの SNP に一致するように作成し、*A. simplex* (s. s.) と *A. pegreffii* を同定する 2 組のプライマーセット (Simp-F, Simp-R および Peg-F, Peg-R) を作製した (図 1、表 1)。今回は選択性をさらに強めるために、各プライマーの 3' 末端から 3 番目の塩基に意図的なミスマッチを挿入した (図 1)。さらに、*A. berlandi* のミトコンドリア DNA を標的とした *A. berlandi* 検出用のプライマー (Ber-F, Ber-R) を作製した (表 1)。PCR は二つの反応で行った。反応 1 は 12.5 μ L の Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO CO., LTD., Japan)、0.2 μ M のそれぞれのプライマー (Simp-F, Simp-R, Ber-F, and Ber-R)、1 μ L の sample DNA からなる。反応 2 は 12.5 μ L の Quick Taq HS DyeMix、0.2 μ M のそれぞれのプライマー (Peg-F, Peg-R, Ber-F and Ber-R)、1 μ L の sample DNA からなる。PCR 反応は 94°C、120 秒の後、94°C、30 秒、58°C、30 秒、68°C、48 秒を 30 サイクル行い、最後に 68°C、500 秒を行った。反応終了後、増幅産物の電気泳動を行い、反応 1 に 57 塩基のバンドが検出された場合、*A. simplex* (s. s.) と判定し、反応 2 に 58 塩基のバンドが検出された場合、*A. pegreffii* と判定する。反応 1 と反応 2 の両方でバンドが検出された場合、ハイブリッドと判定する。また、1,011 塩基のバンドが反応 1、反応 2 の両方に現れた場合、*A. berlandi* と判定する。

【研究成果】

すでに遺伝学的に同定を行った 201 検体のアニサキス属 DNA を用いて、今回作製した PCR 法の特異性を確認した (表 2)。試験に供した DNA 検体は *A. simplex* (s. s.) 66 検体、*A. pegreffii* 63 検体、*A. simplex* (s. s.) と *A. pegreffii* hybrid の 14 検体、*A. berlandi* 3 検体、*A. physeteris* 29 検体、*A. typica* 8 検体、*A. brevispiculata* 1 検体、*Pseudoterranova azarasi* 14 検体、*Contracaecum* spp. 2 検体、*Hysterothylacium* sp. 1 検体からなる。試験の結果、全ての *A. simplex* の同胞種 (*A. simplex* (s. s.)、*A. pegreffii*、*A. berlandi*、hybrid genotype) は、それぞれ正しく判定された (表 2)。*A. simplex* 以外のアニサキス属は全て陰性と判定された (表 2)。また、偽陽

性もなかった。これらの結果から、今回作製した PCR 法は、*A. simplex* の同胞種を同定するのに十分な特異性を有していることが明らかになった。*A. simplex* の同胞種を同定するために従来から行われてきた方法（DNA シークエンシングや PCR-RFLP など）は、非常に手間がかかり、結果が得られるまでに少なくとも 1 日以上の日が必要である。それに対して、今回確立した PCR 方は結果を得るまでに約 2 時間しかかからないため、実験室における作業時間の短縮に大いに貢献できるものと思われる。

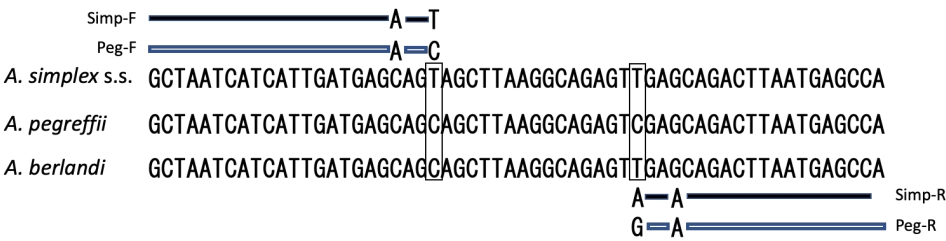


図 1 本研究で用いたプライマーのデザイン

表 1 プライマー配列

Target	Primers	Sequences (5'→3')	Amplicon (bp)
<i>A. simplex</i> (s.s.)	Simp-F	GCTAATCATCATTGATGAGAAAGT	57
	Simp-R	GTGGCTCATTAAAGTCTGATCA	
<i>A. pegreffii</i>	Peg-F	GCTAATCATCATTGATGAGAAGC	58
	Peg-R	TGGCTCATTAAAGTCTGATCG	
<i>A. berlandi</i>	Ber-F	CTCTAGTGTTTTGGGAATGATTGTT	1,011
	Ber-R	ATCACTAGTACAGATAGCCTAGATTTGAT	

表 2 特異性の確認

Origines of DNA samples	No. of samples	Results of identification				
		<i>A. simplex</i> (s.s.)	<i>A. pegreffii</i>	Hybrid	<i>A. berlandi</i>	Negative
<i>A. simplex</i> (s.s.)	66	66	0	0	0	0
<i>A. pegreffii</i>	63	0	63	0	0	0
Hybrid	14	0	0	14	0	0
<i>A. berlandi</i>	3	0	0	0	3	0
<i>A. physteris</i>	29	0	0	0	0	29
<i>A. typica</i>	8	0	0	0	0	8
<i>A. brevispiculata</i>	1	0	0	0	0	1
<i>P. azarasi</i>	14	0	0	0	0	14
<i>Contracaecum</i> spp.	2	0	0	0	0	2
<i>Hysterothylacium</i> sp.	1	0	0	0	0	1

(2) 個別課題：アニサキスによる日本近海魚の汚染状況の調査（杉山 広（国立感染症研究所））

【研究内容・方法】

日本では、人体への主要なアニサキスの感染魚種がマサバであると従来から認知されており、マサバのアニサキスの汚染実態調査（あるいはマサバを対象を含めた調査）は、全国規模で実施されてきた。しかしマサバにおいても、寄生率や寄生部位などに季節的変動を認めるのか等に関して、統一的な知見は得られていない。マサバ以外にアニサキス食中毒の重要な感染源と見なされるマアジやサンマ、および2018年に感染者数急増の原因魚種となったカツオに関しては、アニサキス幼虫の寄生状況や検出された虫種の分子同定に関する詳しいデータ自体が不足している。これらのデータ欠損を補うため、日本近海で漁獲された上述4種類の海産魚における調査が、アニサキス食中毒対策のための喫緊の課題として浮上した。そこで、太平洋、日本海、東シナ海という日本周辺の海域において漁獲され、地域の主要漁港に水揚げされた上述4種類の海産魚を検索材料として入手し、寄生状況の季節的変動を含めた調査を実施した。なお本報告で季節に関し、4～9月を夏季、10月～翌3月を冬季として、便宜上、表現したが、具体的な検査日（その数日前に漁獲）は添付資料に記載したので、必要に応じて参照されたい。

まず本研究で用いた魚種を海域別に述べて、その数を記載したい。マサバは太平洋で70尾、日本海で67尾、東シナ海で80尾の合計217尾、マアジは太平洋で201尾、東シナ海で111尾の合計312尾、カツオは太平洋で76尾、東シナ海で75尾の合計131尾、またサンマは太平洋で200尾となる。これらの検体を入手して、本研究を実施した。

これらの魚から、当初は「圧平法」でアニサキス幼虫を検出する計画であった。顕微鏡下にアニサキス幼虫を検出する「圧平法」が、最も簡便・安価で信頼性も高い検出法であると認識しており、また食品衛生学関連の成書でも、「圧平法」を第1選択の検査法として推すものを見る。しかし「圧平法」より人工胃液を用いる「消化法」の方が、検査効率や信頼性が高くなるとの観点から、アニサキス幼虫の検出法としては、「圧平法」に「消化法」を併用した。

検査対象の魚から検出された各虫体は、形態同定および分子同定を実施して、いずれもアニサキス属であることを確認した。その上で同胞種レベルまでの種同定に関しては、分子生物学的な方法として主にリボソームDNA・ITS領域の遺伝子解析を行った。このために、魚より検出した各虫体から、常法に従いDNAを調製し、その後にユニバーサルなプライマーで対象領域を増幅して、制限酵素で切断、そのバンドパターンを電気泳動で確認するPCR-RFLP法を行った。さらにユニバーサルプライマー等を用いたPCR産物の遺伝子配列解読等で、種同定を確認した。

なお本研究を遂行中に、新型コロナウイルス感染症流行の影響により、当初の予定とは異なり、東シナ海のマサバについて検出虫体の検索が形態同定に留まるものが一部に含まれている。ただしこれらの検体についても、分子生物学的手法により同定された同所的検体の成績から類推して、研究成果に関してはほぼ同じ一定の知見が得られたと考えた。詳細は、考察の項で述べたい。

アニサキス食中毒の病因物質となるのは、回虫目（Askaridida）・アニサキス科（Anisakidae）に分類される線虫ではあるが、その総ての種類ではない。アニサキス属（*Anisakis* spp.）およびシュードテラノバ属（*Pseudoterranova* spp.）に限定されることに注意が必要である。これは、アニサキス

食中毒を引き起こす虫種が、行政的な定義に基づくアニサキスであることを意味する。さらに今回の検索では、寒海域の魚種（例えばマダラ）を対象に含めなかったため、シュードテラノバ属に分類される虫体は全く検出されず、総てがアニサキス属の線虫であった。

魚から検出されるアニサキス属の幼虫は、便宜的にType I からType IVの4グループに形態分類できる（本研究ではType IVに分類されるアニサキス幼虫は検出されなかった）。日本近海の魚からは、Type Iに分類される*Anisakis simplex* sensu stricto（狭義の*A. simplex*, 以下**As**と略す）および*Anisakis pegreffii*（以下**Ap**と略す）が高率に検出される。また両者の交雑種であるHybrid genotype（以下**HG**と略す、この遺伝子型が本当に交雑により生じたのか否かは諸説ある）も時に認める。このほか本研究では、Type Iに分類されるものとして、*Anisakis berlandi*（以下**Ab**と略す）、あるいは*Anisakis typica*（以下**At**と略す）も検出された。さらにType IIに分類される*Anisakis physeteris*（以下**Ah**と略す）およびType IIIに分類される*Anisakis brevispiculata*（以下**Av**と略す）も検出された。

上述の各虫種の中でも、Asの感染によるアニサキス食中毒が日本では極めて多い。これは魚の内臓にもっぱら多数寄生するアニサキス幼虫のうち、Asだけは他の虫種に比べて魚の内臓から筋肉に移行する割合が高いからだと説明されてきた。またAsは太平洋に分布する魚に主に寄生し、日本海・東シナ海に生息する魚にはApが主として寄生するとの知見も得られていた。従って、太平洋で漁獲される魚がアニサキス食中毒の主たる原因だと考えられてきた。今回は、このような従来からの知見が、最近でも同様に認め得るかも検証した。以下に、本研究で得られた研究成果、考察、今後の課題について、魚種別に記述する。

【研究成果・考察】

1) マサバ

日本におけるアニサキス食中毒の主要病因魚種がマサバであることは、従来から知られてきた。しかしマサバにおいても、寄生率や寄生部位などに季節的変動を認めるのかは、統一的なデータがない。そこで太平洋、日本海、東シナ海で漁獲されたマサバを対象に、まず寄生状況の季節性変動を明らかにし、次に海域ごとの主要寄生種とアニサキス幼虫の筋肉への移行状況に関して、従来からの知見を検証した。

まず太平洋で漁獲されたマサバ70尾を対象に調査した（表1）。その結果、筋肉から検出された虫種はAsのみで、1尾あたりの検出数は平均15.3隻であった。筋肉寄生の虫体を季節別に見ると、夏季は1尾あたり平均11.6隻、冬季は同17.4隻と冬季の方がやや多かった。なお、内臓からのAsの検出数は1尾あたり平均14.3隻であり（夏季は14.2隻で、冬季は14.3隻）、筋肉からの検出数との間には、ほとんど差異を認めなかった。

表1. マサバ太平洋から検出されたアニサキス幼虫

魚体NO.	検査尾数		検出虫体数		部位別・虫種別・虫体数																		
	陽性	陰性	合計	内臓	筋肉	合計	内臓							筋肉							合計		
							As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av	小計	As	Ap	HG	Ab	At	Ah		Av	小計
春夏 1～25	25	0	25	381	290	671	355	17	0	4	3	2	0	381	290	0	0	0	0	0	0	290	671
秋冬 26～70	42	3	45	663	781	1,444	647	11	0	3	1	0	1	663	781	0	0	0	0	0	0	781	1,444
計	67	3	70	1,044	1,071	2,115	1,002	28	0	7	4	2	1	1,044	1,071	0	0	0	0	0	0	1,071	2,115

As, *Anisakis simplex* sensu stricto; Ap, *Anisakis pegreffii*; HG, hybrid genotype; Ab, *Anisakis berlandi*; At, *Anisakis typica*; Ah, *Anisakis physeteris*; Av, *Anisakis brevispiculata*

次に日本海で漁獲されたマサバとしては、67尾を対象に調査した（表2）。その結果、筋肉からもアニサキス幼虫が検出された（内臓が64.4%に対し、筋肉は35.6%）。また筋肉由来虫体のほとんど（99.3%）がAsであった（他はHGを1隻のみ検出した）。しかし1尾の筋肉から検出される虫体数は平均2.1隻で、太平洋側で漁獲されたマサバに比べると、検出虫体数はかなり少なかった。また筋肉からの検出数を季節別に見ると、夏季は1尾あたり平均2.3隻、冬季は同1.7隻と、夏季の方がやや多かった。なお内臓からのAsの検出数は1尾あたり平均3.0隻であり（夏季は4.0隻で、冬季は1.3隻）、季節により差異はあるが、筋肉からの検出数も同様の季節性を持ち、虫体数でも顕著な差異はなかった。

表2. マサバ日本海から検出されたアニサキス幼虫

魚体NO.	検査尾数			検出虫体数			部位別・虫種別・虫体数																
							内臓							筋肉									
							As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av	小計	As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av	小計	合計

As, *Anisakis simplex sensu stricto*; Ap, *Anisakis pegreffii*; HG, hybrid genotype; Ab, *Anisakis berlandi*; At, *Anisakis typica*; Ah, *Anisakis physeteris*; Av, *Anisakis brevispiculata*

さらに東シナ海で漁獲されたマサバとしては、80尾を対象に調査した。このうち分子同定まで実施した40尾の成績を先に述べる（表3）。魚からの検出虫体数は平均39.7隻であり（夏季は37.8隻で、冬季は42.6隻）、他の海域で漁獲されたマサバに比べ、魚1尾から検出されるアニサキス幼虫数が多かった（冬季が夏季よりわずかに多い）。ただし検出部位を内臓と筋肉に分けると、内臓からは平均39.0隻（全体の98.2%）であるのに対し、筋肉からは平均0.7隻（全体の1.8%）と、圧倒的多数の虫体が内臓から検出された。筋肉からの検出数は極めて少数であったが、季節による大きな差異を認めた。すなわち夏季は1尾あたり平均1.2隻（検査したマサバ24尾から29隻）が検出されたが、冬季は0隻（全く検出なし）であった。夏季に筋肉から検出された29隻について、アニサキスの種類を見ると、18隻はAsであったが、Apが10隻、残り1隻はHGであった。本研究で、Ap（やHG）もマサバの筋肉から検出されることが分かった。なお内臓からの検出虫体（1,559隻）を分子同定した結果では、Apが最も多く1,131隻（72.5%）、Asはそれに次いで390隻（25.0%）であった。なお熱帯～亜熱帯の海域に分布するAtが夏季にのみ22隻（1.4%）も検出され、地球温暖化の影響かとも考えられた。なお後述するが、マアジやカツオからは冬季にもAtが検出されている。

表3. マサバ東シナ海(遺伝子同定) から検出されたアニサキス幼虫

魚体NO.	検査尾数			検出虫体数			部位別・虫種別・虫体数																
							内臓							筋肉									
							As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av	小計	As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av	小計	合計

As, *Anisakis simplex sensu stricto*; Ap, *Anisakis pegreffii*; HG, hybrid genotype; Ab, *Anisakis berlandi*; At, *Anisakis typica*; Ah, *Anisakis physeteris*; Av, *Anisakis brevispiculata*

東シナ海で水揚げされ、形態同定された40尾からの検出虫体数は平均392.4隻であり（夏季は277.5隻で、冬季は469.0隻）で、分子同定された虫体数の約10倍という極めて多数の虫体が検出された（表4）。検出部位を内臓と筋肉に分けると、内臓からは平均391.7隻であるのに対し、筋肉からは平均0.8隻と、圧倒的多数の虫体が内臓から検出されたが、これは検出虫体を分子同定したマサバの場合と同じ傾向であった。またアニサキス食中毒の原因となるAsやApはType Iと同定されるが、筋肉から検出されたのは総てType Iのアニサキス幼虫で、検出虫体を分子同定したマサバの場合と同じ傾向であった。このように検出虫体の分子同定を行った場合と同じ傾向の知見が得られたことになる。

表4. マサバ東シナ海(形態同定) から検出されたアニサキス幼虫

魚体NO.	検査尾数			検出虫体数			虫種別虫体数							
							内臓			筋肉				
	陽性	陰性	合計	内臓	筋肉	合計	Type1	Type2	小計	Type1	Type2	小計	合計	
春夏 25～40	16	0	16	4,418	22	4,440	4,418	0	4,418	22	0	22	4,440	
秋冬 1～24	24	0	24	11,249	8	11,257	11,249	0	11,249	8	0	8	11,257	
計	40	0	40	15,667	30	15,697	15,667	0	15,667	30	0	30	15,697	

東シナ海のマサバの筋肉から検出されるアニサキス幼虫が極めて少ないのは、従来通りの所見であったが、日本海で水揚げされたマサバの筋肉からアニサキス幼虫（特にAs）が検出されたことは、この2~3年の間に公表された報告と一致した。そこで日本海でも、より西部に位置して、九州にも近い海域で、冬季に水揚げされたマサバ10尾を入手し、調査した（表5）。その結果、筋肉から検出されるアニサキス幼虫は少なく（内臓90.4%に対して、筋肉は9.6%）、同じ日本海産のマサバでも、アニサキス幼虫の寄生状況に差異があることが分かった。ただし10尾の検査で11隻のAsが筋肉から検出された。このように、日本海で漁獲されたマサバの調査結果は、日本海のマサバとアニサキスの寄生との間に何か異変が起きていることを示唆する。アニサキス食中毒に関して、日本海の魚はマサバであっても、比較的安全という通説が崩れつつある。今後の課題として、アニサキス幼虫の寄生率に関して、日本海でさらに詳しく季節的な変動も併せて調べるなら、この変化の要因を解く鍵が得られるかも知れない。

表5. マサバ日本海から検出されたアニサキス幼虫

魚体NO.	検査尾数			検出虫体数			部位別・虫種別・虫体数																
	陽性 陰性 合計			内臓 筋肉 合計			内臓							筋肉									
							As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av	小計	As	Ap	HG	Ab	At	Ah			
秋冬 1~10	4	6	10	103	11	114	10	93	0	0	0	0	0	103	11	0	0	0	0	0	0	11	114
計 1~10	4	6	10	103	11	114	10	93	0	0	0	0	0	103	11	0	0	0	0	0	0	11	114

As, *Anisakis simplex* sensu stricto; Ap, *Anisakis pegreffii*; HG, hybrid genotype; Ab, *Anisakis berlandi*; At, *Anisakis typica*; Ah, *Anisakis physeteris*; Av, *Anisakis brevispiculata*

2) マアジ

青魚（青背の魚）でのアニサキス幼虫の寄生状況をサバと比較する意図からも、太平洋と東シナ海で漁獲された個体群を対象に、寄生状況の季節性変動を調べ、海域ごとの主要寄生種とアニサキス幼虫の筋肉への移行状況に関して、従来の知見を確認した。

まず太平洋のマアジとしては、201尾を対象に調査した（表6）。その結果、冬季にAtが1隻、内臓から検出されただけであった。この虫体を除けば、季節（夏季あるいは冬季）や部位（内臓あるいは筋肉）を問わず、これらのアジからは、アニサキス幼虫は全く検出されなかった。

表6. マアジ太平洋から検出されたアニサキス幼虫

魚体NO.		検査尾数			検出虫体数			部位別・虫種別・虫体数																
		陽性 陰性 合計			内臓 筋肉 合計			内臓							筋肉							小計 合計		
								As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av	小計	As	Ap	HG	Ab	At	Ah			Av
春夏	1～80	0	80	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
秋冬	81～201	1	120	121	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
計		1	200	201	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	

As, *Anisakis simplex* sensu stricto; Ap, *Anisakis pegreffii*; HG, hybrid genotype; Ab, *Anisakis berlandi*; At, *Anisakis typica*; Ah, *Anisakis physeteris*; Av, *Anisakis brevispiculata*

東シナ海で漁獲されたマアジとして111尾を対象に調査した（表7）。魚からの検出虫体数は平均10.9隻であった（夏季は14.8隻で、冬季は7.7隻）。検出部位を内臓と筋肉に分けると、内臓からは平均10.6隻（全体の97.2%）であったのに対し、筋肉からは平均0.3隻（全体の2.8%）と、圧倒的多数の虫体が内臓から検出された。筋肉からの検出数は極めて少数であったが、季節による検出数に大きな差異を認めた。すなわち、冬季は1尾あたり平均0.6隻（検査したマサバ61尾から34隻）が検出されたが、

夏季は0隻（全く検出なし）であった。冬季に筋肉から検出された34隻は、総てApと同定された。マジジの筋肉からApが検出されたことから、本虫がアニサキス食中毒の原因虫種になる危険性が伺われた。なお内臓からの検出虫体（1,176隻）を分子同定した結果を見ると、Apが最も多く1,170隻（99.5%）、HGがそれに次いで4隻（0.3%）、またAtが夏季・冬季に1隻ずつ（計0.2%）検出された。なおAsは、内臓・筋肉の何れからも検出されなかった。

表7. マジ東シナ海から検出されたアニサキス幼虫

魚体NO.	検査尾数			検出虫体数			部位別・虫種別・虫体数																			
	陽性	陰性	合計	内臓	筋肉	合計	内臓								筋肉								小計	合計		
							As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av	As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av						
春夏	1~45,107~111	41	9	50	741	0	741	0	738	2	0	1	0	0	741	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	741
秋冬	46~106	42	19	61	435	34	469	0	432	2	0	1	0	0	435	0	34	0	0	0	0	0	0	34	469	
計		83	28	111	1,176	34	1,210	0	1,170	4	0	2	0	0	1,176	0	34	0	0	0	0	0	34	1,210		

As, *Anisakis simplex* sensu stricto; Ap, *Anisakis pegreffii*; HG, hybrid genotype; Ab, *Anisakis berlandi*; At, *Anisakis typica*; Ah, *Anisakis physeteris*; Av, *Anisakis brevispiculata*

As, *Anisakis simplex* sensu stricto; Ap, *Anisakis pegreffii*; HG, hybrid genotype; Ab, *Anisakis berlandi*; At, *Anisakis typica*; Ah, *Anisakis physeteris*; Av, *Anisakis brevispiculata*

3) カツオ

原因魚種がカツオと推定されるアニサキス食中毒が2017年より増加し、翌2018年には食中毒統計に収載された全国のアニサキス食中毒の中で、カツオが本症原因の最重要魚種となった。そこで本研究では、太平洋と東シナ海で漁獲された個体群を対象に、アニサキス幼虫の寄生状況を調べた。

表8. カツオ太平洋から検出されたアニサキス幼虫

魚体NO.	検査尾数	検出虫体数		部位別・虫種別・虫体数																		小計	合計
				内臓						筋肉													
		陽性	陰性	合計	内臓	筋肉	合計	As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av	As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av		
春夏 1～16,他	42	4	46	192	5	197	77	2	0	11	7	95	0	192	5	0	0	0	0	0	0	5	197
秋冬 17～36,他	28	2	30	134	2	136	91	0	0	1	3	39	0	134	2	0	0	0	0	0	0	2	136
計	70	6	76	326	7	333	168	2	0	12	10	134	0	326	7	0	0	0	0	0	0	7	333

As, *Anisakis simplex* sensu stricto; Ap, *Anisakis pegreffii*; HG, hybrid genotype; Ab, *Anisakis berlandi*; At, *Anisakis typica*; Ah, *Anisakis physeteris*; Av, *Anisakis brevispiculata*

まず太平洋で漁獲されたカツオとしては、76尾を対象に調査した（表8）。その結果、筋肉から検出された虫種はAsのみで、5尾から計7隻（夏季および冬季）が検出された。なお内臓からは、As、Ap、Atという既述のアニサキス幼虫の他、Type Iに分類されるAb、Type IIに分類されるAhが検出された。特にAhは深海魚にしばしば認めるアニサキスで、カツオが深海を遊泳することの反映と考えられた。なおAhは極めて稀ではあるが、人体寄生例の報告がある。

次に東シナ海で漁獲されたカツオとして、75尾を対象に調査した（表9）。その結果、筋肉から検出された虫種はApのみで、3尾から3隻が検出された。内臓は75尾中43尾が陽性（陽性率57.3%）で、特にApおよびAhが高い寄生率（96.2%）で検出された。これらの虫種も人体寄生の報告があることから、調理にあたっては速やかに内臓を除去して、これらの虫体が筋肉に移行することを阻止すべきと考えられた。

表9. カツオ東シナ海から検出されたアニサキス幼虫

魚体NO.	検査尾数			検出虫体数			部位別・虫種別・虫体数																			
	陽性	陰性	合計	内臓	筋肉	合計	内臓										筋肉								小計	合計
							As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av	小計	As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av	小計				
春夏 1～20	17	3	20	113	2	115	3	42	1	0	0	67	0	113	0	2	0	0	0	0	0	0	2	115		
秋冬 21～70,他	26	29	55	124	1	125	4	87	0	0	1	32	0	124	0	1	0	0	0	0	0	0	1	125		
計	43	32	75	237	3	240	7	129	1	0	1	99	0	237	0	3	0	0	0	0	0	0	3	240		

As, *Anisakis simplex* sensu stricto; Ap, *Anisakis pegreffii*; HG, hybrid genotype; Ab, *Anisakis berlandi*; At, *Anisakis typica*; Ah, *Anisakis physeteris*; Av, *Anisakis brevispiculata*

カツオを全体で見ると、本研究で151尾を検索し、内臓から563隻、筋肉から10隻、全体で673隻のアニサキス幼虫を検出した（1尾あたり平均3.8隻）。2018年に漁獲されたカツオからの検出成績と比較して、筋肉からの検出数も少なく、現時点ではカツオがアニサキス食中毒の重要な原因魚種とはい

難いと思われた。しかしカツオは、突然にアニサキス幼虫の寄生数が増加して、アニサキス食中毒の主要原因魚種になる可能性を秘めることから、継続的な調査を実施するなど、今後も注意が必要な魚種であることに間違いはない。

4) サンマ

アニサキス食中毒の感染源として、サンマの重要性が認識されるようになった。サンマの鮮度を保持する技術の開発や、消費地への輸送時間を短縮するための工夫により、サンマの非加熱摂食が容易になった結果と考えられる。本研究では、計200尾のサンマを対象に調査した（表10）。その結果、筋肉から検出された虫種はAsのみで、1尾あたりの検出数は平均0.4隻であった（200尾から79隻を検出）。内臓から検出された虫種もHG・1隻を除き、Asのみであった（200尾から計95隻を検出）。注目すべきは、1尾の筋肉に8隻、13隻および15隻という多数のAsが検出されたサンマの混在である。サンマの非加熱喫食により、多数のアニサキス幼虫に同時に感染する危険性について、注意すべきである。

表10. サンマ太平洋から検出されたアニサキス幼虫

魚体NO.		検査尾数			検出虫体数			部位別・虫種別・虫体数																
		陽性 陰性 合計			内臓 筋肉 合計			内臓							筋肉							小計 合計		
								As	Ap	HG	Ab	At	Ah	Av	小計	As	Ap	HG	Ab	At	Ah			Av
北海道	1～180	57	123	180	94	70	164	93	0	1	0	0	0	0	94	70	0	0	0	0	0	70	164	
青森・岩手	31～50	2	18	20	1	9	10	1	0	0	0	0	0	1	9	0	0	0	0	0	0	9	10	
計		59	141	200	95	79	174	94	0	1	0	0	0	0	95	79	0	0	0	0	0	79	174	

As, *Anisakis simplex sensu stricto*; Ap, *Anisakis pegreffii*; HG, hybrid genotype; Ab, *Anisakis berlandi*; At, *Anisakis typica*; Ah, *Anisakis physeteris*; Av, *Anisakis brevispiculata*

【総合考察および今後の課題】

本研究の結果から、アニサキス食中毒の発生予防に資する情報として、以下の知見に注目すべきと考えた。日本海で漁獲されたマサバには、本食中毒の主要原因虫種であるAsが筋肉から検出された。この事実を消費者や営業者に啓発する必要がある。北陸地方以西の九州に至る海域での同様の調査も実施すべきである。併せて、その海域でマアジなど、マサバ以外の魚種についての調査も検討すべきである。

東シナ海のマアジやカツオの筋肉から、少数ではあるがApが検出された。本虫もアニサキス食中毒の原因虫種になる危険性があり、啓発の必要がある。

カツオで経験したように、アニサキスの寄生状況は短期間のうちに大きく変動することがある。カツオを含めて、非加熱で喫食される代表的な魚種を選択し、本研究で実施したような監視を、今後も続けていく意義が高いと思われた。

(3) 個別課題：すぐに喫食可能な水産食品におけるアニサキス汚染状況の調査（大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所））

【研究内容】

アニサキスのリスク評価を行うためにはアニサキスのばく露リスクに関する知見が必要である。そのためには喫食直前の食品レベルでの汚染実態も調査する必要がある。そこで商業施設からすぐに喫食可能な水産食品を購入し、アニサキスの汚染状況を調査した。

【研究方法】

すぐに喫食可能な水産食品（切り身、刺身など）を購入し、アニサキスの検出を行なった。検出したアニサキスは「個別課題：アニサキス迅速検査法の確立」で確立した方法を用い分子同定を行なった。本研究ではサバ、アジ、イワシ、サンマ、カツオ、サーモンを対象とした。分離したアニサキスは生理食塩水中に約2時間置き、ピンセットで刺激し、運動性を確認した。本研究では運動性を確認できたものを生きているアニサキス（生アニサキス）、確認できなかったものを死んだアニサキス（死アニサキス）と定義した。サバに関連した月別のアニサキス食中毒事例数は、厚生労働省の食中毒統計資料（2019～2021年）を「サバ」および「鯖」のキーワードで検索し、該当した事例の合計とした。

【研究成果・考察】

1) サバの汚染状況

シメサバ 215 検体中 138 検体（64%）がアニサキス陽性となり、検体 100 g あたりの総アニサキス数（生アニサキス＋死アニサキス）は平均 3.5 隻、陽性検体 100 g あたりでは平均 5.6 隻となった（表 1）。しかし、生アニサキスはほとんど検出されなかった。刺身は 33 検体中 3 検体陽性（9%）とシメサバに比べて陽性率は低く、アニサキスが丁寧に取除かれているか、アニサキス陽性率の低い産地の個体が使用されているのではないかと考えられた。しかし、陽性検体 100 g あたりの総アニサキス数は平均 5.2 隻とシメサバと差は認められなかった。刺身から生アニサキスは検出されなかった。生アニサキスがほとんど検出されなかったことから、シメサバ、刺身は安全であると思われた。

サバに関しては、シメサバ、刺身以外に切り身の状態で販売されているものがある。今回はサバの切り身の内、「加熱用」等の表示のないものを調査した。切り身 448 検体中 244 検体（54%）がアニサキス陽性となり、検体 100 g あたりの総アニサキス数は平均 1.8 隻、陽性検体 100 g あたり平均 3.1 隻となった（表 1）。また切り身の陽性検体からは、生アニサキスが 919 隻検出され、検体 100 g あたり平均 0.5 隻、陽性検体 100 g あたり平均 0.9 隻の生アニサキスが検出された。切り身 100 g あたりのアニサキス数の分布を見てみると、総アニサキス数が検体 100 g あたり 22 隻（図 1）、生アニサキス数で検体 100 g あたり 15 隻（図 2）が最高であった。以上の結果から、今回調査した切り身の多くは冷凍等の処理が行われていないことが示唆された。また、多量の生アニサキスが検出されたことから、このような切り身もアニサキス食中毒の原因になっている可能性が示唆された。

サバからは *A. simplex* (s.s.) が 3,840 隻（99%）、*A. pegreffii* が 27 隻（0.7%）、*A. simplex* (s.s.) と *A. pegreffii* の hybrid genotype は 25 隻（0.6%）が分離された（表 2）。*A. berlandi* は検出されなかった。

表 1 サバの汚染状況

	検体数	検体重量 (g)	陽性検体数	陽性検体重量 (g)	陽性率 (%)	総アニサキス (4-死)			生アニサキス		
						アニサキス数	アニサキス数/ 検体100g	アニサキス数/ 陽性検体100g	アニサキス数	アニサキス数/ 検体100g	アニサキス数/ 陽性検体100g
シメサバ	215	20,357	138	12,557	64	709	3.5	5.6	3	0.01	0.02
刺身	33	3,895	3	249	9	13	0.3	5.2	0	0.0	0.0
切り身	448	177,834	244	100,670	54	3,170	1.8	3.1	919	0.5	0.9
合計	696	202,086	385	113,476	55	3,892	1.9	3.4	922	0.5	0.8

表 2 サバから分離されたアニサキス数 (種別)

	<i>A. simplex</i> s.s.	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. berlandi</i>	Hybrid
シメサバ	709	0	0	0
刺身	13	0	0	0
切り身	3,118	27	0	25
合計	3,840	27	0	25

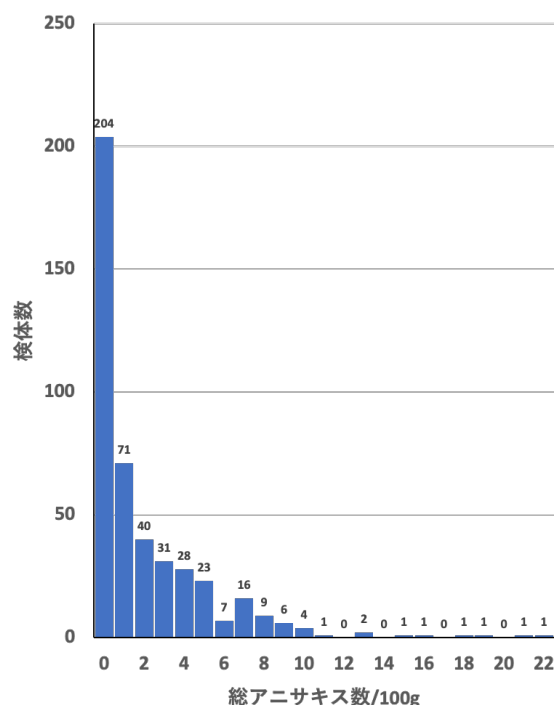


図 1 総アニサキス数の分布

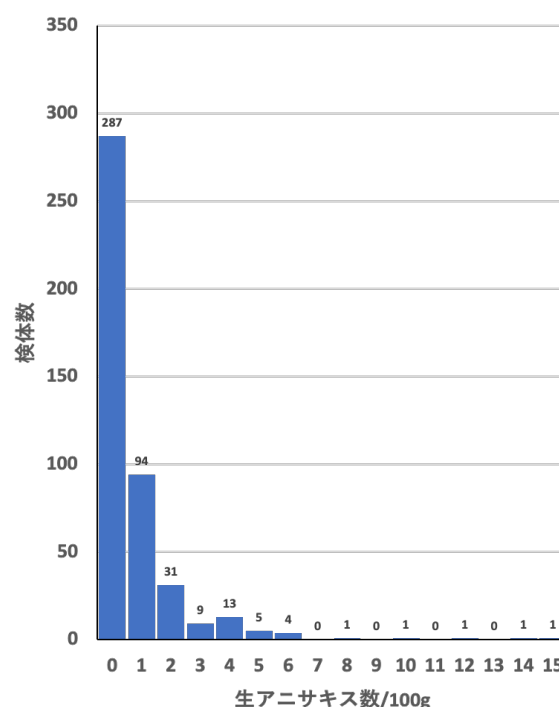


図 2 生アニサキス数の分布

市場に流通しているサバはマサバとゴマサバがある。ゴマサバもマサバ同様に一般に流通しており、消費者は両者を特に区別することなくサバとして購入しているため、今回の調査でも区別することなく購入し、調査に使用した。調査に使用した切り身の内、マサバは 391 検体中 234 検体が陽性で、陽性率は 60%、検体 100 g あたりの総アニサキス数は 2.0 隻、陽性検体 100 g あたりの総アニサキス数は 3.2 であった (表 3)。一方、ゴマサバは 57 検体中 10 検体が陽性で、陽性率は 18%、検体 100 g あたりの総アニサキス数は 0.3 隻、陽性検体 100 g あたりの総アニサキス数は 1.3 隻であった。生アニサキス数は陽性検体 100 g あたり、マサバは 1.0 隻、ゴマサバは 0.2 隻であった。また、ゴマサバから分離されたのは *A. simplex* (s.s.) だけであった (表 4)。以上の結果から、ゴマサバはマサバと比べて食中毒リスクが低いことが示唆された。

表3 マサバとゴマサバの汚染状況の比較

	検体数	検体重量 (g)	陽性検体数	陽性検体重量 (g)	陽性率 (%)	総アニサキス (生+死)			生アニサキス		
						アニサキス数	アニサキス数/ 検体100g	アニサキス数/ 陽性検体100g	アニサキス数	アニサキス数/ 検体100g	アニサキス数/ 陽性検体100g
マサバ (切り身)	391	152,421	234	95,584	60	3,105	2.0	3.2	911	0.6	1.0
ゴマサバ (切り身)	57	25,413	10	5,086	18	65	0.3	1.3	8	0.0	0.2

表4 マサバとゴマサバから分離されたアニサキス数 (種別)

	<i>A. simplex</i> s.s.	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. berlandi</i>	Hybrid
マサバ (切り身)	3,053	27	0	25
ゴマサバ (切り身)	65	0	0	0

2) サバの地域別汚染状況

これまでの報告では日本海で水揚げされたサバには筋肉移行しにくい *A. pegreffii* が多く寄生しているため、筋肉からアニサキスはあまり検出されないとされている。また、九州地方で水揚げされるサバも比較的安全であると考えられている。そこで、今回調査した切り身の検体の汚染状況を地域別に集計した (表5)。陽性率を比較すると、太平洋、北日本がそれぞれ 68%、72%であるのに対して、日本海、九州地方はそれぞれ 32%、24%と、日本海と九州地方の陽性率は他の地域に比べて低いことが明らかになった。しかし、陽性検体 100 g あたりの総アニサキス数は太平洋、北日本、日本海、九州地方それぞれ、3.1、3.4、2.9、2.7 隻と大きな差は見られなかった。これらの結果から、日本海および九州地方で水揚げされたサバは、太平洋や北日本で水揚げされたサバと比較して、陽性率は半分以上と低い、陽性検体におけるアニサキス数は大きな差はないため、食中毒の原因となりうる可能性が示唆された。日本海、九州地方で水揚げされたサバも他の地域で水揚げされたサバと同様に注意が必要である。地域ごとに分離されたアニサキスの種をまとめてみたところ、地域間でサバに寄生しているアニサキスの種差は認められなかった (表6)。これまでの報告では、日本海で水揚げされたサバには *A. pegreffii* が多く寄生しているとの報告があるが、筋肉移行しにくい種であるため、多くは内臓に留まっているものと思われる。このため、筋肉部位を対象とした今回の調査では検出できなかったと考えられた。

表5 地域別のサバの汚染状況

	検体数	検体重量 (g)	陽性検体数	陽性検体重量 (g)	陽性率 (%)	総アニサキス (生+死)		
						アニサキス数	アニサキス数/ 検体100g	アニサキス数/ 陽性検体100g
太平洋	234	97,364	158	65,652	68	2,242	2.3	3.1
日本海	130	45,266	41	14,710	32	425	0.9	3.4
北日本	50	19,831	36	15,598	72	420	2.1	2.9
九州地方	29	12,977	7	3,425	24	42	0.3	2.7
不明	5	2,396	2	1,285	40	41	1.7	1.2
合計	448	177,834	244	100,670	54	3,170	1.8	3.2

表6 サバから分離された地域別・種別アニサキス数

	<i>A. simplex</i> s.s.	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. berlandi</i>	Hybrid
太平洋	2,205	19	0	18
日本海	421	2	0	2
北日本	415	1	0	4
九州地方	37	5	0	0
不明	40	0	0	1
合計	3,118	27	0	25

3) サバの月別汚染状況

切り身の汚染状況を月別に集計した（図 3）。サバにおけるアニサキスの陽性率は、夏場の 7～9 月頃に最小で、10 月頃から増加に転じ、4 月にピークに達した後に減少を始めた。この様にサバにおけるアニサキス陽性率は秋～春に高く、夏に低くなるという季節性が見られた。陽性検体 100 g あたりのアニサキス数は、感染率の推移と完全には一致しなかったが、秋～春に高く、夏に低くなるという季節性は感染率と同様に認められた。しかし、このような季節性が生じる原因を今回の研究では明らかにすることはできなかった。

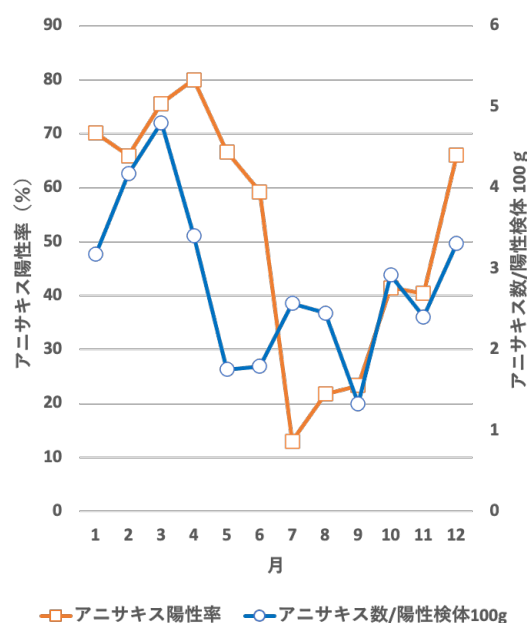


図 3 サバにおけるアニサキス陽性率とアニサキス数の季節変化

4) サバに関連したアニサキス食中毒と汚染状況との相関性

今回の汚染実態調査結果とサバが原因と考えられるアニサキス食中毒事例数との相関性について検討した。まず、サバが原因と考えられるアニサキス食中毒の月別事例数を調査した。しかし、刺身の盛り合わせなどが提供された事例では、サバが原因食であったかどうか断定することは難しい。そこで、厚生労働省食中毒統計資料を「サバ」および「鯖」のキーワードで検索し、該当したアニサキス食中毒の事例数をサバに関連したアニサキス食中毒事例数とした。今回、汚染実態調査を行った 2019～2021 年の 3 年間の月別平均事例数は図 4 の様になった。サバに関連した食中毒事例数は、3 月にピークとなり、5～9 月が最小、その後、10 月ごろより増加していく季節性が認められた。

まず、サバに関連した食中毒事例数とサバにおけるアニサキス陽性率とを比較した（図 5、6）。陽性率は秋～春にかけて高く、夏に低い季節性を示し、食中毒事例数と同様の季節性が見られたが、相関性は高くなかった。

次に食中毒事例数と今回調査したすぐに喫食可能なサバ製品の内、アニサキスが検出された検体 100 g あたりのアニサキス数とを比較した（図 7、8）。その結果、食中毒事例数と陽性サバ検体中のアニサキス数の季節変化はよく一致していることが明らかになった（図 7）。相関性を調べたところ、食中毒事例数と陽性サバ検体中のアニサキス数との間には強い相関性が認められた（図 8）。陽性検体 100 g あたりのアニサキス数が 1.3 の場合、1 ヶ月あたりの事例数は 2 件であった。アニサキス数

が 1.7～2.5 隻までの場合、1 ヶ月あたりの事例数は 4 件未満でとどまっていた。しかし、陽性検体 100 g あたりのアニサキス数が 3 隻を超えると、事例数が急増し始め、陽性検体 100 g あたりのアニサキス数が 4.8 隻では 1 ヶ月あたりの事例数は 15.7 件になった。

今回の結果をさらに検討してみると、5 月、6 月は、陽性率は高いが、陽性検体 100 g あたりのアニサキス数は低く、食中毒事例数も高くなかった。また、2 月と 5 月の陽性率はほぼ同じであるが、アニサキス数はそれぞれ 4.2 隻と 1.8 隻であった。この時の 2 月と 5 月の事例数はそれぞれ 9.3 件と 3 件であった。この様に、筋肉中にアニサキス数の低い検体が多く存在していても、食中毒事例数は大きく増加せず、食中毒事例数の増加には陽性検体 100 g あたりのアニサキス数の増加が重要であることが明らかになった。このような結果が得られた原因として、アニサキス食中毒は用量依存性に発症する可能性が考えられた。

次にサバに関連したアニサキス食中毒事例数と豊洲市場におけるサバの取扱量（2019～2021 年の平均）を比較したところ、緩やかな相関性が認められた（図 9、10）。

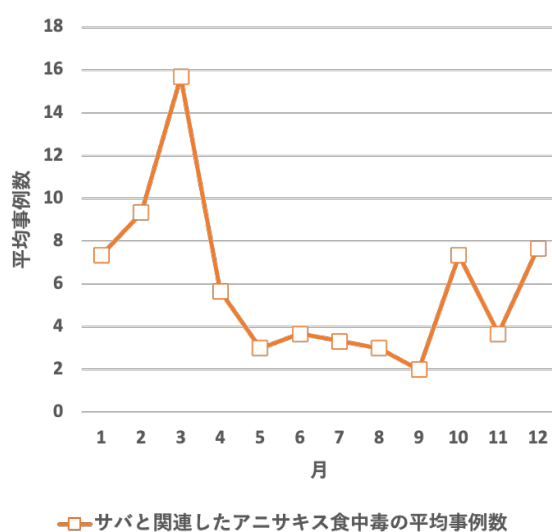


図 4 サバに関連したアニサキス食中毒の平均事例数

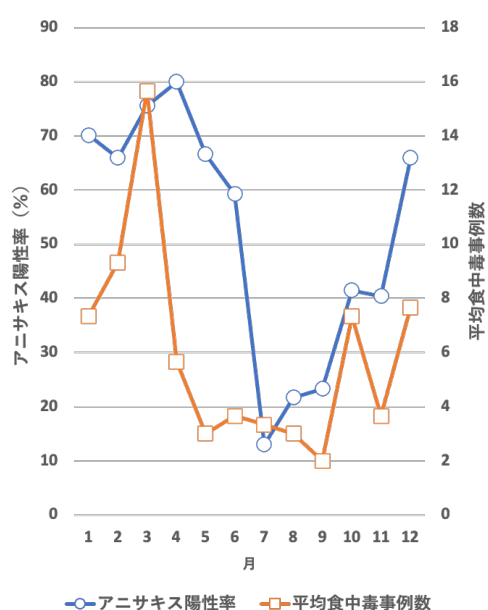


図 5 サバにおけるアニサキス陽性率とサバに関連した食中毒事例数の季節変化

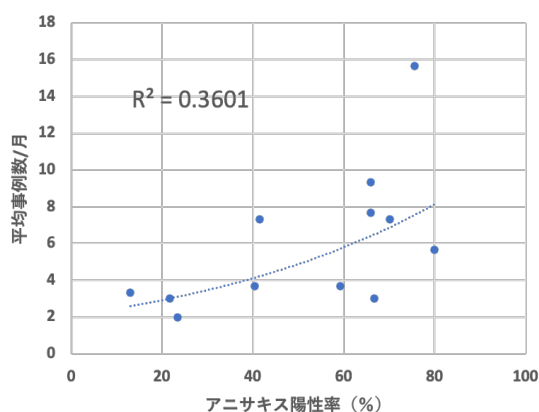


図 6 サバにおけるアニサキス陽性率とサバに関連した食中毒事例数の相関性

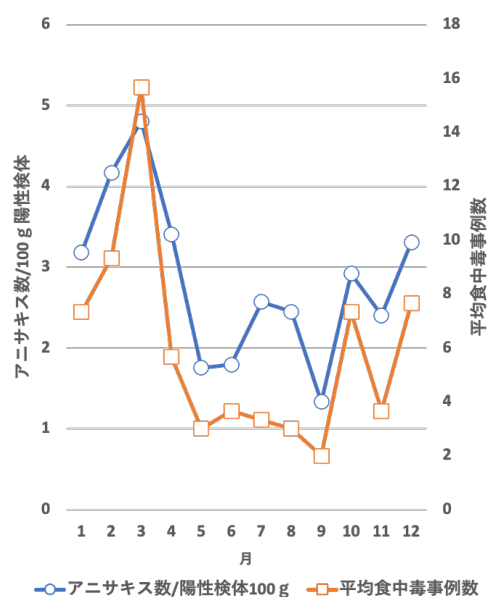


図7 陽性検体中のアニサキス数とサバと関連した食中毒事例数の季節変化

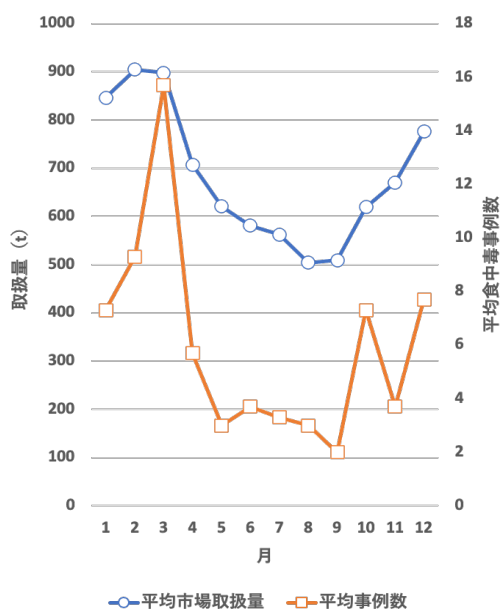


図9 サバの市場取扱量とサバと関連した食中毒事例数の季節変化

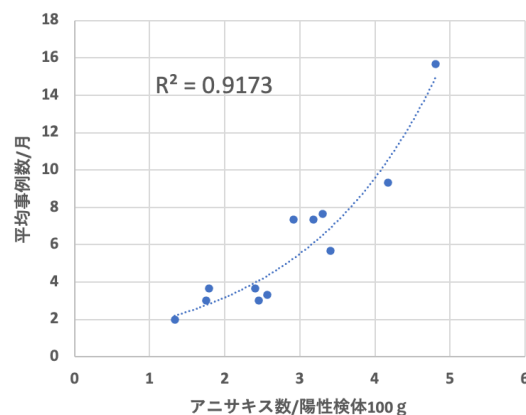


図8 陽性検体中のアニサキス数とサバと関連した食中毒事例数との相関性

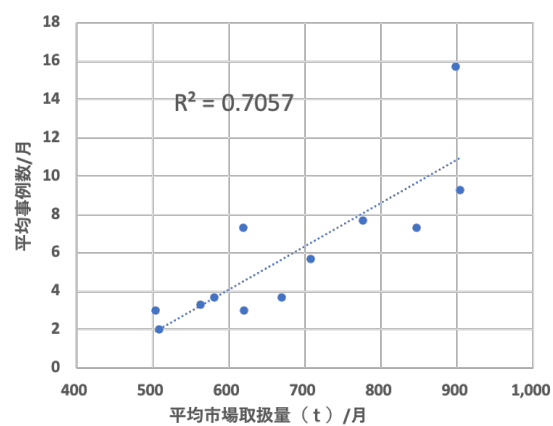


図10 サバの市場取扱量とサバと関連した食中毒事例数の相関性

5) サバ以外の魚種における汚染状況

サバ以外の魚種の調査を行った(表7、8)。サーモン、サンマ、アジ、イワシ、カツオを対象とした。アニサキスが検出されたのはサンマ、アジ、イワシで、サーモン、カツオからは検出されなかった(表7)。陽性率はサンマ、アジ、イワシでそれぞれ9、1、2%であった。サンマの陽性率は若干高

かったが生アニサキスは検出されなかった。また、アジとイワシからは生アニサキスが検出されたが、陽性検体 100 g あたりのアニサキス数はそれぞれ 0.3、0.4 隻と大変低かった。サンマとイワシからは *A. simplex* (s. s.) が、アジからは *A. pegreffii* が検出された（表 8）。以上の結果から、すぐに喫食可能な状態で流通しているサーモン、サンマ、アジ、イワシ、カツオは比較的安全ではないかと考えられた。

表7 サバ以外の魚種における汚染状況

	検体数	検体重量 (g)	陽性検体数	陽性検体重量 (g)	陽性率 (%)	アニサキス (生+死)			アニサキス (生)		
						ア. サキス数	アニサキス数 /100g	アニサキス数 /陽性検体 100g	ア. サキス数	アニサキス数 /100g	アニサキス数 /陽性検体 100g
サーモン	453	55,821	0	0	0	0	0.0	0.0	0	0.0	0.0
サンマ	101	7,560	9	647	9	10	0.1	1.5	0	0.0	0.0
アジ	397	53,266	3	867	1	3	0.0	0.3	3	0.0	0.3
イワシ	133	18,760	2	263	2	2	0.0	0.8	1	0.0	0.4
カツオ	418	79,510	0	0	0	0	0.0	0.0	0	0.0	0.0

表8 サバ以外の魚種から分離されたアニサキス数 (種別)

	<i>A. simplex</i> s.s.	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. berlandi</i>	Hybrid
サーモン	0	0	0	0
サンマ	10	0	0	0
アジ	0	3	0	0
イワシ	2	0	0	0
カツオ	0	0	0	0

6) 食品加工工程における汚染低減効果

魚がすぐに喫食可能な水産食品に加工される過程で、どの程度アニサキス汚染が低減しているのかを考察するために、本研究の個別課題「アニサキスによる日本近海魚の汚染状況の調査」(杉山)のデータを用いて魚個体レベルでのアニサキス筋肉内陽性率と虫体数を算出し、すぐに喫食可能な水産食品の結果と比較した。

調査において、サンマのすぐに喫食可能な水産食品は全て刺身であった。サンマ個体レベルでの筋肉内陽性率は 18% で、検体あたりの平均虫体数/検体数は 0.4 隻であった(表 9)。一方、サンマの刺身の陽性率は 9%、検体あたりの平均虫体数/検体数は 0.1 隻であった(表 9)。サンマは個体レベルと比べ、食品(刺身)に加工され流通する段階で、陽性率、虫体数が大きく減少していることが明らかになった。

サバのすぐに喫食可能な水産食品は切り身と刺身であった。サバ個体レベルと切り身で陽性率、平均虫体数/検体数を比較したところ、産地に関わらず両者間での顕著な差は認められなかった(表 10)。一方、今回調査したサバの刺身の多くは、もともと調査結果では陽性率の低かった九州地方で水揚げされたサバ個体が使用されていたこともあるが、陽性率は 9%、平均虫体数/検体数は 0.4 隻と、個体や切り身と比べ、刺身として加工され流通する段階で、陽性率、虫体数が大きく減少していることが明らかになった(表 10)。

今回の結果から、生食を前提として販売されている刺身の汚染は、魚個体レベルと比較して大きく

低減していることが明らかになった。おそらく、何らかの汚染低減につながる処理が行われているものと考えられる。

表9 サンマの個体・食品別のアニサキス汚染状況

	筋肉内陽性率%	筋肉内虫体数/検体数
個体（筋肉内）	18	0.4
刺身	9	0.1

表10 サバの個体・食品別のアニサキス汚染状況

検体（産地）	筋肉内陽性率（%）	筋肉内虫体数/検体数
個体（日本海）	39	2.0
切り身（日本海）	32	3.3
個体（九州）	19	0.7
切り身（九州）	24	1.5
個体（太平洋）	84	15.3
切り身（太平洋）	79	11.6
刺身	9	0.4

7) まとめ

- 加工品として流通しているシメサバおよびサバ刺身からは生アニサキスがほとんど検出されなかったことから、多くの製品で冷凍処理等が行われており、概ね安全であることが示唆された。
- 冷凍処理されていないサバの切り身が流通しており、生アニサキスが多数検出された。
- 日本海および九州地方で水揚げされるサバのアニサキス陽性率は、他の地域と比較して低かったが、アニサキス陽性検体における寄生強度は他の地域と大きな差は見られなかった。
- サバにおけるアニサキス陽性率、寄生しているアニサキス数は秋～春に多く、夏に最低になった。
- サバに関連するアニサキス食中毒事例数は、陽性検体中のアニサキス数と相関し、サバのアニサキス陽性率とは相関しなかったことから、アニサキス食中毒は用量依存性に発症する可能性が示唆された。
- 加工品として流通しているサーモン、サンマ、アジ、イワシ、カツオによるアニサキス食中毒のリスクは高くないと考えられた。
- 生食を前提として販売されているサバ、サンマの刺身のアニサキス汚染は、魚個体レベルと比較して大きく低減していることが明らかになった。

(4) 個別課題：大型商業施設で実施されるリスク低減策の科学的検証(杉山 広(国立感染症研究所))

【研究内容・方法】

アニサキスを原因物質とする食中毒は、2018年以降、食中毒統計に収載される総ての食中毒の中で、事件数が最多を続ける。アニサキス食中毒の重要な原因魚種はマサバとされるが、2018年だけはカツオが最重要の魚種となった。すなわち2018年には、食中毒統計に収載された全国のアニサキス食中毒468件の中で、原因魚種の推定が可能な事例(208件)の39%(82件)が、カツオを原因魚種とし、サバを原因魚種とするのは35%(73件)に留まった。さらにカツオを原因魚種とする食中毒82件中、33件(40%)が福島県での発生であった(2018年の福島県内のアニサキス食中毒58件のうちの57%)。総務省家計調査によると、県庁所在地別の食品消費状況では、福島市のカツオ購入の量と金額が、高知市に次いで一世帯当たり全国第2位とされる。福島県ではカツオが多く喫食され、それに応じてアニサキス食中毒の発生が多発するという事実が見て取れる。

カツオ喫食に伴うアニサキス食中毒が一層増加し始めてから、福島県内に70以上の店舗を持つ某大型商業施設では、生食用カツオの販売前の検査強化を決定された。その具体的な方法、すなわち原因カツオの特定と排除を確実にする内臓の目視検査について、県庁の食品衛生担当者と対策の相談を開始される状況にあった。その時点で福島県と我々は、食品媒介寄生虫全般に関する行政対策の情報交換と共同研究を始めており、本研究課題である「大型商業施設で実施されるリスク低減策の科学的検証」についても、協働して検証作業に取り組むことになった。さらに福島県衛生研究所も、県内最大手の商業施設が実施する作業の検証であることから、調査への積極的な参画を申し出られた。ここに福島県をベースとしたチームとしての検証活動が始まった。このような背景のもとに取り組んだ検証の具体的な方法を、以下に述べていきたい。

本個別課題の対象とした魚種であるカツオは魚食性の大型魚類で、その体内でアニサキス幼虫は以下の移行経路をとり、刺身として喫食される「筋肉」に最終的に到達すると考えられる。

- (1) 中間宿主のオキアミや待機宿主の小魚をカツオが経口摂食して、アニサキス幼虫に感染
- (2) アニサキス幼虫が消化管壁を穿通
- (3) 消化管周囲の内臓深部への侵入・蓄積
- (4) 目視可能な内臓表面への移行
- (5) 腹腔を経由して筋膜を穿通し筋肉に到達

従来の知見から、アニサキス幼虫が筋肉にだけ寄生するカツオ(上述の(5)だけのカツオ)は認められず、筋肉に幼虫が寄生するカツオでは、内臓から必ず幼虫が検出される(上述の(3)および(4)の状態にあるアニサキス幼虫を認める。この知見は他のアニサキス幼虫陽性の魚種でも同様である)。従って、上述の(5)のカツオを選別して除去するためには、目視可能な内臓表面からアニサキス幼虫を確実に検出する目視方法の開発が重要となる(上述の(4)の状態にあるアニサキス幼虫が寄生したカツオを検出する)。この目的に合致した内臓表面の目視法を構築して、大型商業施設で販売前に確実に実施すれば、筋肉にアニサキス幼虫が寄生する商品の排除に貢献できると考えた。また、内臓表面の目視法が確実であるかは、アニサキス幼虫が蓄積する内臓深部から虫体を検出することで確認できると考えた。あわせて、対象としたカツオの筋肉を、ハラス(肛門周囲の脂の乗る腹身)、腹身、背身の3つ

の部位に分けてアニサキス幼虫の検出に努め、アニサキス食中毒の発生に直接的に関連する筋肉寄生幼虫の部位別の寄生状況・寄生濃度について、内臓表面のアニサキス幼虫の検出数との関連を明らかにし、アニサキス食中毒予防に貢献する指標を得ようと考えた。なおハラスは、アニサキス幼虫の寄生数が最も多いと、水産業者がよく知る筋肉部位である。アニサキス食中毒の予防を考えると、決して非加熱で喫食してはいけない部位となる。

虫体の検出作業は福島県衛生研究所で実施した。当初は、アニサキス幼虫が蓄積する内臓深部に加えて、筋肉でのアニサキス幼虫の検出も、「圧平法」で実施する計画であった。顕微鏡下にアニサキス虫体を検出する「圧平法」が最も簡便・安価で、信頼性も高い検出法であると認識しており、また食品衛生学関連の成書の記述なども参照し「圧平法」を指定した。一方で、「圧平法」ではなく人工胃液を用いた「消化法」の方が、検査の効率と信頼性が高いとの見解もあったことから、検査法として「消化法」を選択した。

まず、予備試験的に合計14尾のカツオを対象として、内臓表面の目視検査によるアニサキス幼虫の検出と消化法による筋肉・内臓深部からのアニサキス幼虫の検出を試み、成績を比較・検討した。その結果、非常に驚いたことに、検索に用いた14尾のカツオの筋肉から、アニサキス幼虫が全く検出されなかった。2019年秋以降、カツオの筋肉からアニサキス幼虫がほぼ検出されなくなったとの噂は聞いており、後から考えると、福島県の大型商業施設に届くカツオだけでなく、日本全国に流通するカツオにおけるアニサキス幼虫の寄生状況が、2018年とは大きく変化したと思われる。その理由を科学的に説明することは困難であるが、カツオの回遊に影響する黒潮の流路が変化したことと関係すると推察されている。ただしその結果として、カツオ喫食を原因としたアニサキス食中毒が全国的に激減したことを付記したい。なお我々が検査したこれら14尾のカツオの内臓におけるアニサキス幼虫の寄生状況であるが、総ての個体の内臓からアニサキス幼虫が検出された。

そこで、本調査として新たに合計10尾のカツオを対象とし、内臓表面の徹底した目視検査を実施して、アニサキス幼虫を検出した。その後、内臓を消化して内臓深部に寄生するアニサキス幼虫の検出を実施した（表1）。この消化法により、内臓に寄生する総てのアニサキス幼虫の検出を試みたことになる。その結果、9尾のカツオの内臓表面から、また10尾総てのカツオの内臓深部からアニサキス幼虫が検出された。しかし、これら10尾のカツオの筋肉からは、アニサキス幼虫は全く検出されず、筋肉にアニサキス幼虫の寄生はなかったと考えられた（表1）。

表1. カツオからのアニサキス幼虫(隻)の検出状況

カツオ 番号	内臓表面 (目視)	内臓深部 (消化)	筋肉
1	8	6	0
2	1	1	0
3	2	1	0
4	0	2	0
5	1	2	0
6	18	7	0
7	24	21	0
8	2	6	0
9	2	4	0
10	2	3	0
計	60	53	0

次に、内臓表面（目視検査）および内臓深部（消化法）から検出された虫体が、確実にアニサキス幼虫であるかについて、検出虫体の分子同定による正確な種同定に努めた。すなわち各虫体から常法に則してDNAを抽出し、リボソームRNA遺伝子を対象としてユニバーサルプライマーを用いたPCR法を行い、増幅産物を得て遺伝子配列を解読した。そして得られた配列を用いてblast検索を行い、いずれもアニサキス属の4種類の線虫であることを確認した（表2）。これらは総て、アニサキス食中毒を引き起こす原因の虫種であることが報告されている。

表2. 検出虫体の種に関する分子同定結果

カツオ 番号	内臓表面（目視）					内臓深部（消化）				
	As	Ap	At	Ah	計	As	Ap	At	Ah	計
1	2	0	0	6	8	2	0	0	4	6
2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
3	0	0	0	2	2	0	0	0	1	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
5	0	0	0	1	1	0	0	0	2	2
6	17	0	1	0	18	6	1	0	0	7
7	24	0	0	0	24	20	0	0	1	21
8	1	0	0	1	2	0	0	0	6	6
9	0	0	0	2	2	0	0	0	4	4
10	2	0	0	0	2	0	0	0	3	3
計	46	0	1	13	60	29	1	0	23	53

As, *Anisakis simplex* sensu stricto; Ap, *Anisakis pegreffii*;

At, *Anisakis typica*, Ah, *Anisakis physeteris*

大型商業施設では内臓表面の検査時に、紫外線ブラックライトを用いた虫体検索も実施されている。本試験で対象とした10尾のカツオについても、紫外線ブラックライトを用いた検査で、内臓表面に虫体が残存していないか確認した。しかしアニサキス幼虫は全く検出されなかった。この結果からも、大型商業施設における目視検査の感度は高いと考えられた。さらに内臓表面の目視検査の後、内臓深部に紫外線ブラックライトを照射したが、アニサキス幼虫は検出されなかった。

そこで以上のカツオ10尾を対象とした検査の結果を用いて、目視検査の有効性を1標本母比率検定により、検証した。

【研究成果、考察、今後の課題】

検定結果は以下の表3に示したとおりとなり、大型商業施設が実施する内臓表面の目視によるアニサキス幼虫の検出に関して以下の結果が得られた。

表3. 検定結果

検定の種類	観測			観測値- 検定値 ^a	漸近標準 誤差	有意		95%信頼区間	
	成功数	試行	比率			片側p値	両側p値	下限	上限
正答率A = 1.00 正確2項	9	10	0.900	0.400	0.095	0.011	0.021	0.555	0.997

^a 検定値 = .5

すなわち、アニサキス幼虫の寄生がランダムに発生すると判断する場合と比べて（帰無仮説を0.5）、大型商業施設で実施する目視検査で、カツオの内臓表面に寄生するアニサキス幼虫が統計的に有意に発見できることが示された（90%、表3）。ただし、今回の検定に用いたサンプル数は10と少なく、信頼区間が広い値となった。大型商業施設自身により、検査数を増やした検討を今後も継続されるなら、信頼区間は狭まり、より望ましい結果が得られるものと期待される。今後の精度管理とも関連して、この点を福島県から大型商業施設に指摘した。なお検出虫体数を用いた検定も考えたが、例えば表1の各値が、実験的に感染させた材料を用いた検査結果を示す訳ではなく、また本試験の目的が内臓表面の目視検査の有効性の判定であることから、虫体検出の有無を指標とした検定結果を尊重した。

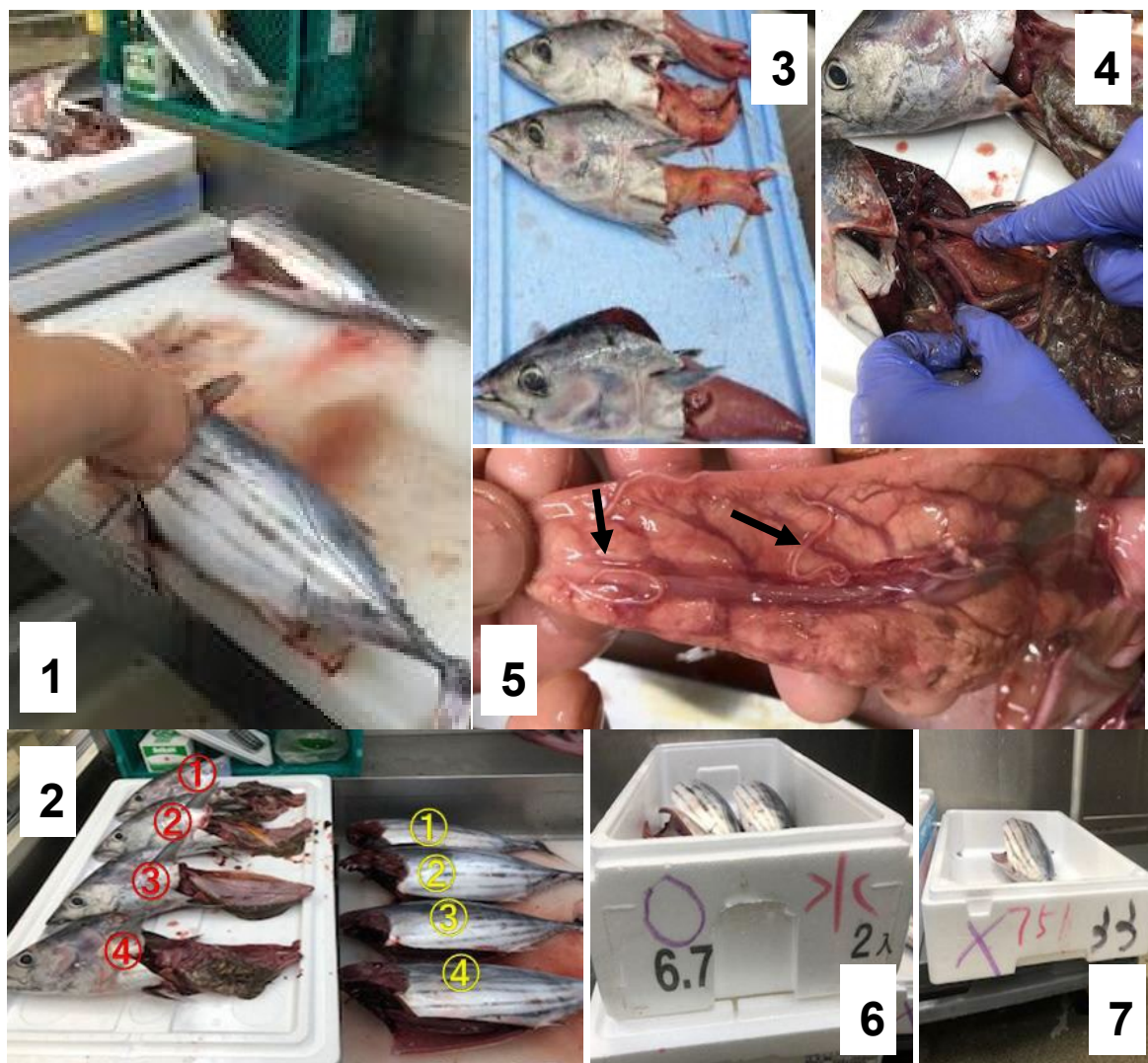
今回の検討により、大型商業施設が実施する自主的な目視検査は、アニサキス幼虫の内臓表面からの検出に有効であることが証明された。この検査を継続し、さらに精度の向上が図られれば、将来、カツオの筋肉からアニサキス幼虫が検出されるような状況に至った場合でも、対応は確実だと考えられた。

紫外線ブラックライトを用いた検索であるが、内臓表面の目視検査の後に虫体が残存していないか確認した。しかしアニサキス幼虫は全く検出されなかった。内臓表面の検査のあと、内臓深部に紫外線ブラックライトを照射した。しかし蛍光を発する線状の構造物であるアニサキス幼虫は全く検出されなかった。従って、紫外線ブラックライトの使用は、今回の大型商業施設において、アニサキス幼虫検出のための有効なツールとはなり得ないことが分かった。

本研究のリミテーションであるが、本来ならば 筋肉にアニサキス幼虫が寄生するカツオを用いた検証が望ましいと考えられた。この点が今後の大きな課題となる。これに加えて、本研究の実施期間内に、新型コロナウイルス感染症の発生が継続し、特に衛生研究所ではその対応に傾注せねばならなかった。さらに、これに伴う人事異動もあり、アニサキス食中毒の検討を継続することが困難となった。研究期間の1年間延長を認めて頂いたが、カバーすることができなかったのは、分担研究者としての大きな反省点となる。

本試験で協力を頂いた大型商業施設では、生食用カツオを原因としたアニサキス食中毒は、2019年以降、全く報告されていない（2018年は3事例が報告されている）。目視による内臓表面の検査を行い、アニサキス幼虫を内臓表面から検出する目視検査は、現在、指導者を決めて解体の担当者に対面で継続的な教育が行われ、さらにe-ラーニングの資料も整備され、いつでも誰でも学習することが可能となっている。虫体検出の記録も保管されている。本研究課題である目視による内臓表面の検査に大型商業施設が取り組み、その結果としてアニサキス食中毒のリスク低減が図られたと考えられ、実際に地域住民の食品衛生の確保にも繋がったと考えている。

写真. 大型商業施設におけるカツオの解体状況と検査の要領



写真の説明

1. 大型商業施設・バックヤードに入荷したカツオの解体状況
2. カツオを頭部と頭部に付着させた内臓（左）および胴体部（右）に分離する。
3. 頭部と頭部に付着させた内臓の拡大図。この写真では内臓の後半部が離断されているが、離断部の検査も実施されている。
4. 内臓表面の目視検査の要領を示す。
5. 内臓表面（肝臓）に付着するアニサキス幼虫（矢印）
6. 内臓表面にアニサキス幼虫が検出されなかったカツオの胴体部（○印の容器に一時保管）
（背身が刺身やたたきとして処理販売される）
7. 内臓表面にアニサキス幼虫が検出されたカツオの胴体部（×印の容器に一時保管）
（竜田揚げなどの加熱商品に処理されて販売される）

2 研究全体の成果、考察及び結論

本研究では、近年、食中毒事例数が急増しているアニサキス食中毒のリスク評価を行う上で、不足している知見を収集するために研究を行った。

まず最初に、日本で食中毒の原因となっている *A. simplex* 同胞種の迅速検査法の作製を試みた。*A. simplex* 同胞種は形態学的に区別するのが難しく、遺伝学的にわずかな SNPs を DNA シークエンシングや RFLP などの時間を要する方法で検出するしかなかった。そこで、ARMS 法を応用した PCR 検査法を作製した。これにより、従来 2 日近くを要していた検査時間が 2 時間程度になり、検査時間を大幅に短縮することに成功した。

次に魚個体レベルでのアニサキス寄生状況の調査を行った。従来、太平洋で漁獲されるマサバには *A. simplex*(s.s.) 多く、日本海、東シナ海で漁獲されるサバには *A. pegreffii* が多いとされてきた。しかし、寄生部位や季節変動に関するデータが少なく、またサバ以外の魚種に関してもデータが不足しているため、調査を行った。その結果、日本海で漁獲されたマサバの筋肉から、*A. simplex*(s.s.) が検出された。また、サンマの筋肉から多数の *A. simplex*(s.s.) が検出され、非加熱のサンマによる食中毒の可能性が危惧された。さらに、アジやカツオの筋肉から、少数ではあるが、*A. pegreffii* が検出された。*A. pegreffii* も食中毒の原因となる危険性があるため注意が必要である。

次に、すぐに喫食可能な水産食品におけるアニサキスの汚染状況を調査した。現在、多くの家庭で柵や刺身などの既加工された水産食品を購入することが一般的となっている。そこで、より消費実態に即した形でアニサキス食中毒のリスクを評価するために、すぐに喫食可能な水産食品（切り身、柵、刺身など）の調査を行った。その結果、非加熱のサバの切り身が流通しており、生きているアニサキスが検出された。また、日本海および九州で水揚げされるサバのアニサキス陽性率は、他の地域と比較して低かったが、アニサキス陽性検体における寄生強度は他の地域と大きな差は見られなかったことから、食中毒の原因となる可能性があるため注意が必要である。サバに関連するアニサキス食中毒事例数は、陽性検体中のアニサキス数と相関し、サバのアニサキス陽性率とは相関しなかったことから、アニサキス食中毒は用量依存性に発症する可能性が示唆された。加工品として流通しているサーモン、サンマ、アジ、イワシ、カツオによるアニサキス食中毒のリスクは高くないと考えられた。

大型商業施設ではそれぞれの施設が独自の方法でアニサキスの検出、除去をおこなっている。しかしながらこれらの方法の有効性に関するデータが不足している。今回は福島県の施設で行われているカツオの内臓表面の目視検査の有効性を検討した。従来の知見から、アニサキス幼虫が筋肉にだけ寄生するカツオは認められず、筋肉に幼虫が寄生するカツオでは、内臓から必ず幼虫が検出される。そこで、カツオの内臓表面のアニサキスを目視で検出することによって、筋肉にアニサキスが寄生しているカツオを検出できるかどうか検討を行った。その結果、大型商業施設が実施する自主的な目視検査は、アニサキス幼虫の内臓表面からの検出に有効であることが証明された。この検査を継続し、さらに精度の向上が図られれば、将来、カツオの筋肉からアニサキス幼虫が検出されるような状況に至った場合でも、対応は確実だと考えられた。

以上、今回の研究で得られた成果は、アニサキス食中毒の発生予防に資する情報として、消費者や営業者に周知していく必要があると思われる。

Ⅲ 本研究を基にした論文等

1 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト

該当なし

2 本研究を基にした学会発表の実績

該当なし

3 特許権等の出願・申請等の状況

該当なし

4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物

該当なし

5 その他（各種受賞、プレスリリース等）

該当なし

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) アニサキス迅速検査法の確立	5	簡便かつ迅速で、特異性の高い <i>A. simplex</i> 同胞種の検査法を確立することができた。
(2) アニサキスによる日本近海魚の汚染状況の調査	5	アニサキス食中毒の原因虫種の寄生現況を魚種と漁獲地別に明らかにした。寄生状況は変化するため、継続的調査が重要と示した。
(3) すぐに喫食可能な水産食品におけるアニサキス汚染状況の調査	5	6 魚種のすぐに喫食可能な水産食品におけるアニサキス汚染調査を行い、研究目標を達成した。
(4) 大型商業施設で実施されるリスク低減策の科学的検証	5	大型商業施設の目視検査がアニサキス幼虫検出に有効と証明した。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

2 研究全体の自己評価

項 目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	迅速検査法の確立、魚個体レベルおよびすぐに喫食可能な水産食品におけるアニサキス汚染調査、大型商業施設におけるリスク低減策の検証を行い、概ね研究目標を達成することができた。
(2) 研究成果の有用性	5	本研究成果はアニサキス食中毒のリスク評価を行う上で有用であると考えられた。
総合コメント 新型コロナウイルス感染症対応のため、研究を思いどおり行えない時期があったが、概ね研究目標を達成できたと考えられた。本研究成果は、我が国におけるアニサキス食中毒のリスク評価に資するものであると考えられた。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。

本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。