

令和4～5年度 食品健康影響評価技術研究

アニサキス食中毒リスク評価に関する調査研究

(課題番号: JPCAFSC20222204)

成果概要

主任研究者 大西 貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究者 杉山 広 国立感染症研究所

分担研究者 手島 玲子 岡山理科大学

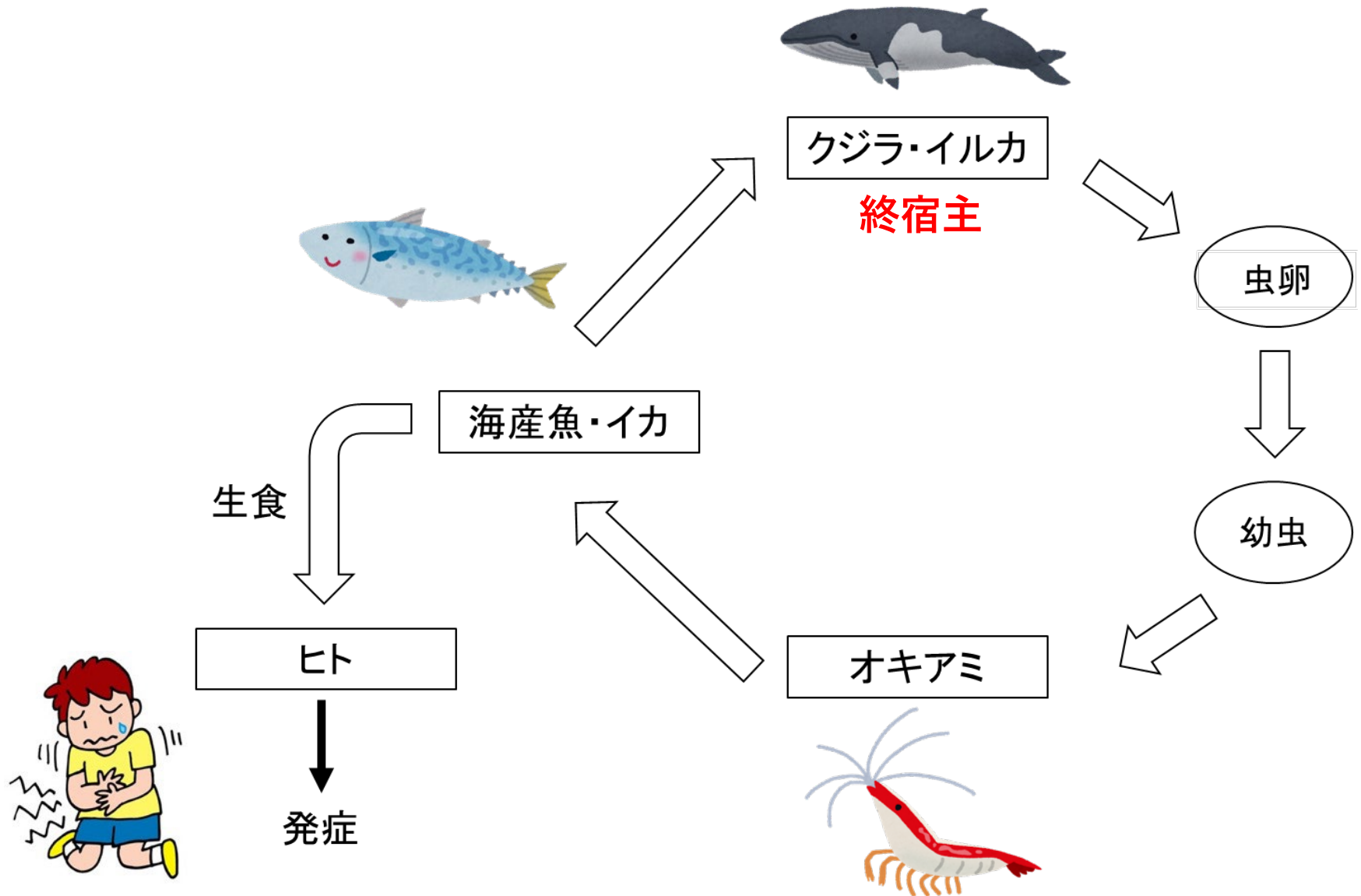
アニサキス食中毒

- *Anisakis*属線虫が原因寄生虫
- サバ、アジ、イカ、イワシ
- 喫食後2～8時間で発症
- 腹部の激痛、悪心、嘔吐

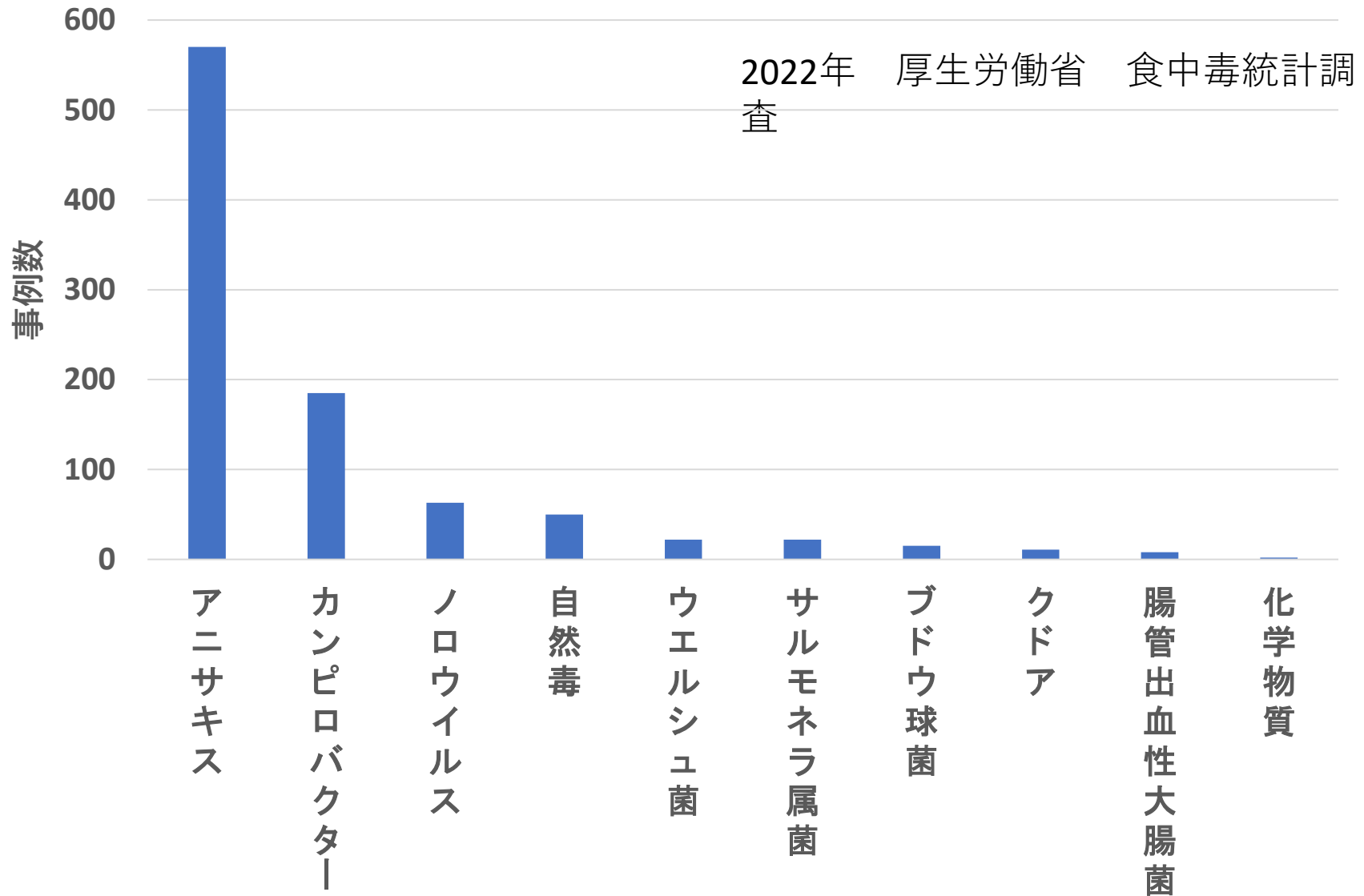


近年、事例数が急増している

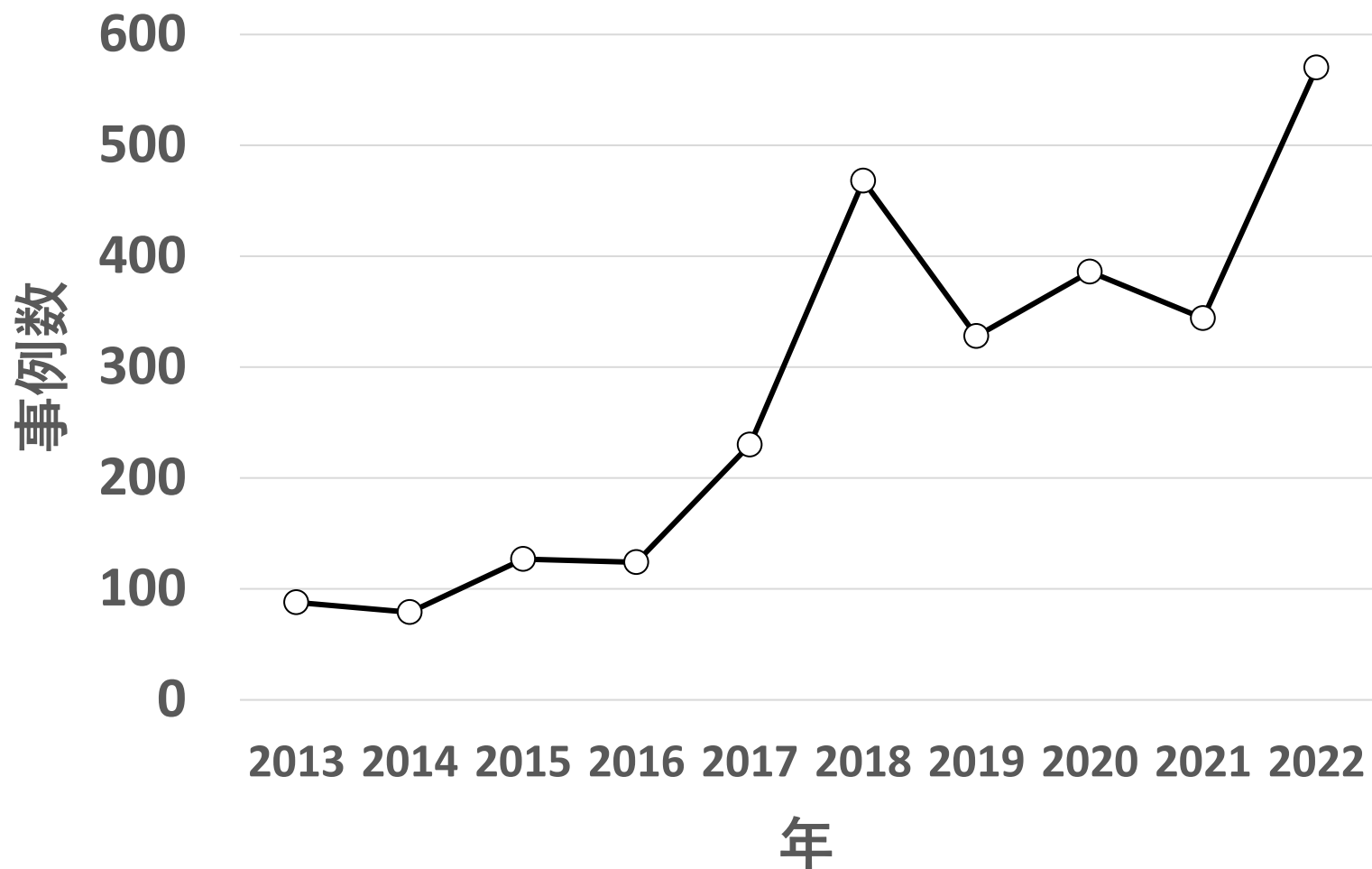
アニサキスの生活環



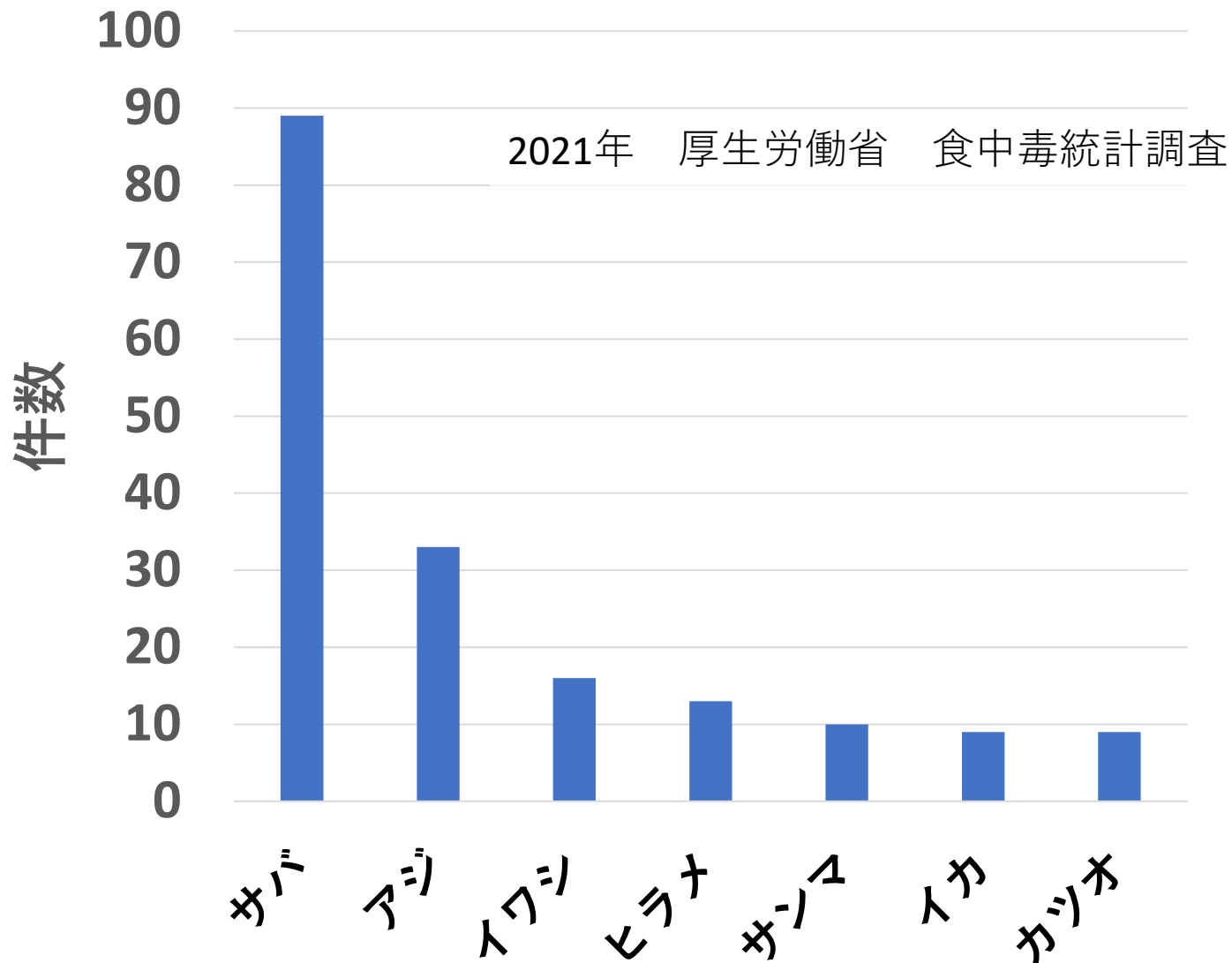
食中毒の原因物質



アニサキス食中毒 事例数の推移



アニサキス食中毒の原因となりうる魚



本研究の目的

1. アニサキス食中毒リスク低減法の有効性の評価

(1) 養殖による食中毒リスク低減効果の評価

(2) 腹身除去による食中毒リスク低減効果の評価

2. 汚染実態調査

(1) アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価

(2) 日本海で漁獲されたサバの汚染実態評価

3. アニサキス食中毒原因食材同定法の確立

(1) 原因食材同定法の確立

本研究の目的

1. アニサキス食中毒リスク低減法の有効性の評価

(1) 養殖による食中毒リスク低減効果の評価

(2) 腹身除去による食中毒リスク低減効果の評価

2. 汚染実態調査

(1) アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価

(2) 日本海で漁獲されたサバの汚染実態評価

3. アニサキス食中毒原因食材同定法の確立

(1) 原因食材同定法の確立

養殖サバの安全性の評価

養殖の評価: 養殖施設のサバにおける寄生状況(丸魚)

養殖施設	調査尾数	陽性尾数	検出虫体数					
			総計		筋肉		内臓	
			As	Ap	As	Ap	As	Ap
A(人工種苗・陸上)	20	0	0	0	0	0	0	0
B(人工種苗・海面)	21	0	0	0	0	0	0	0
C(天然種苗・海面)	20	1	8	0	3	0	5	0
D(天然種苗・海面)	20	11	0	77	0	2	0	75
計	81	12	8	77	3	2	5	75

As, *Anisakis simplex* sensu stricto(アニサキス食中毒の主要病原種)

Ap, *Anisakis pegreffii*(アニサキス食中毒の病因となるリスクを持つ)

海面養殖でも人工種苗から飼育を開始すると、完全なリスク低減効果を認めた(B). 天然種苗の養殖はリスクが残る(C,D).

養殖サバの安全性の評価

養殖の評価: 養殖サバは養殖場で加工され加工品として流通

完全養殖*

18 検体 (東シナ海)

蓄養

75 検体 (東シナ海、日本海)

(* 完全養殖: 人工種苗・陸上養殖・人工飼料 (あるいは冷凍魚))



すべてアニサキス陰性

完全養殖だけでなく、蓄養 (稚魚を漁獲して育てる) でも一定のリスク低減効果を認めた。養殖場での加工時における虫体除去も、恐らくリスク低減に貢献したと思われる。

本研究の目的

1. アニサキス食中毒リスク低減法の有効性の評価

(1) 養殖による食中毒リスク低減効果の評価

(2) 腹身除去による食中毒リスク低減効果の評価

2. 汚染実態調査

(1) アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価

(2) 日本海で漁獲されたサバの汚染実態評価

3. アニサキス食中毒原因食材同定法の確立

(1) 原因食材同定法の確立

腹身除去による食中毒リスク低減効果の評価

背景

鮮魚店等でハラミを除去することが行われている

マサバにおける筋肉部位別の寄生状況(丸魚)

漁獲海域	検出虫体数		
	総計		
	計	背	腹
A (34尾)	487	19 (3.9%)	468 (96%)
B (45尾)	444	17 (3.5%)	427 (96%)

腹身除去でアニサキス食中毒のリスクは激減すると考えられた

本研究の目的

1. アニサキス食中毒リスク低減法の有効性の評価

(1) 養殖による食中毒リスク低減効果の評価

(2) 腹身除去による食中毒リスク低減効果の評価

2. 汚染実態調査

(1) アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価

(2) 日本海で漁獲されたサバの汚染実態評価

3. アニサキス食中毒原因食材同定法の確立

(1) 原因食材同定法の確立

アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価

インピーダンス法(抵抗値等の測定)を用いた検討(丸魚)

過去の報告

アニサキス幼虫

1. 脂肪量が多い冬期漁獲魚の腹部筋肉に多数寄生する.
2. 脂肪量が多い魚に多数の虫体が寄生する.

魚用品質状態判別装置

魚類の**体脂肪率を非破壊的に測定**することが可能な装置



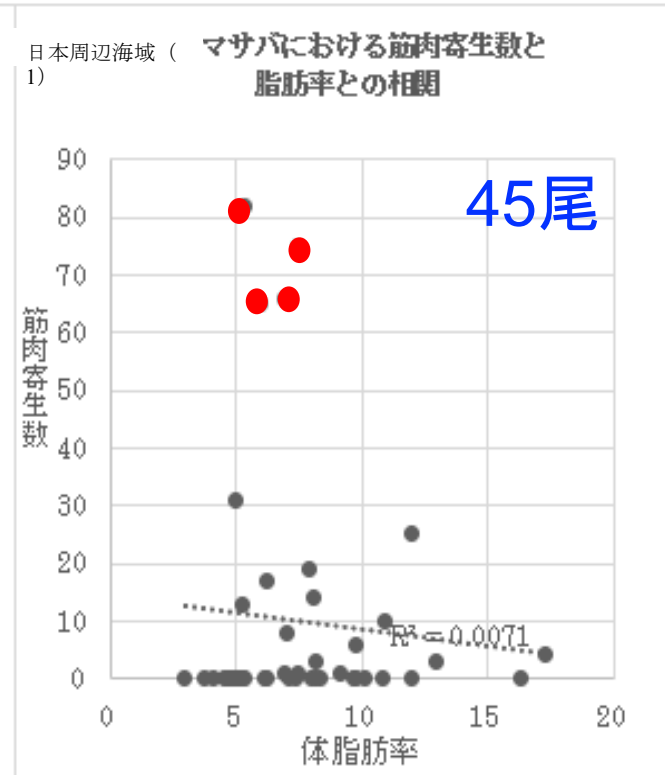
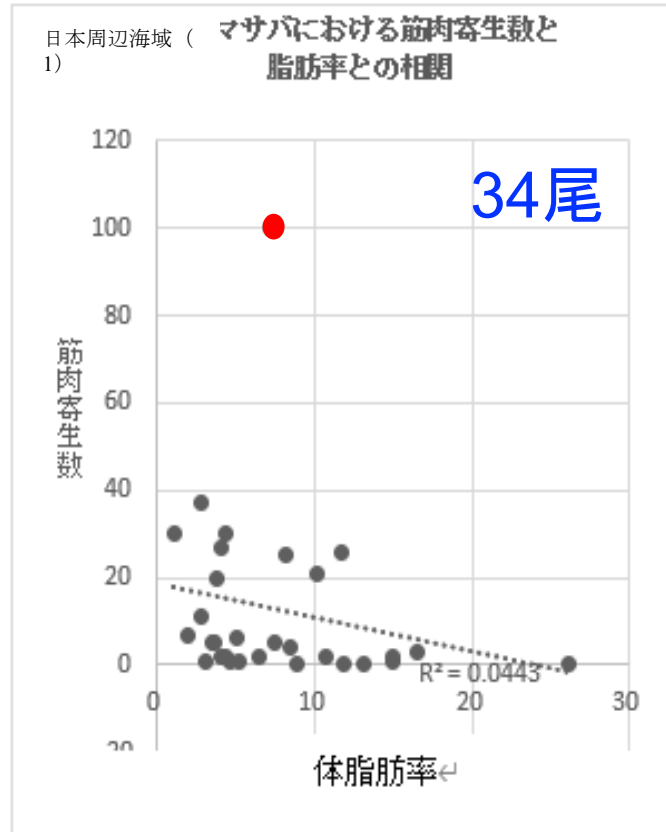
1. 筋肉は細胞の水分量が多く、電気が細胞内を通り易いので、電気抵抗値が低い.
2. 脂肪は細胞の水分量が少なく電気が細胞内を通り難いので、電気抵抗値が高い.
3. この特性を利用し、非破壊的に対象の脂肪量を測定(推定)する

アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価

日本海A海域産マサバ

日本海B海域産マサバ

丸魚

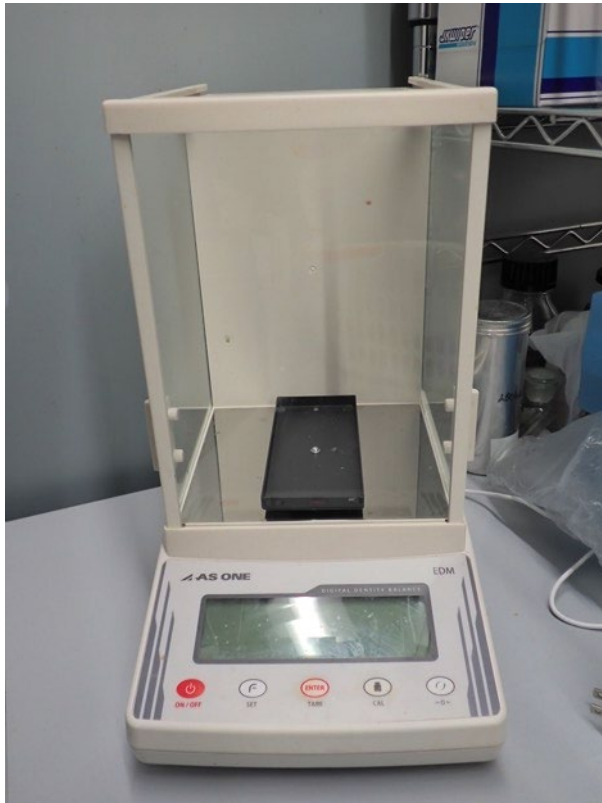


1. 体脂肪率と筋肉からの検出虫体数との間には、明らかな相関関係がなかった.
2. アニサキス幼虫多数を筋肉から検出したマサバでも、体脂肪率が平均より低い値(6%前後)に留まる魚を複数認めた. 原因は不明.

アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価

魚の脂肪量測定法（加工品）

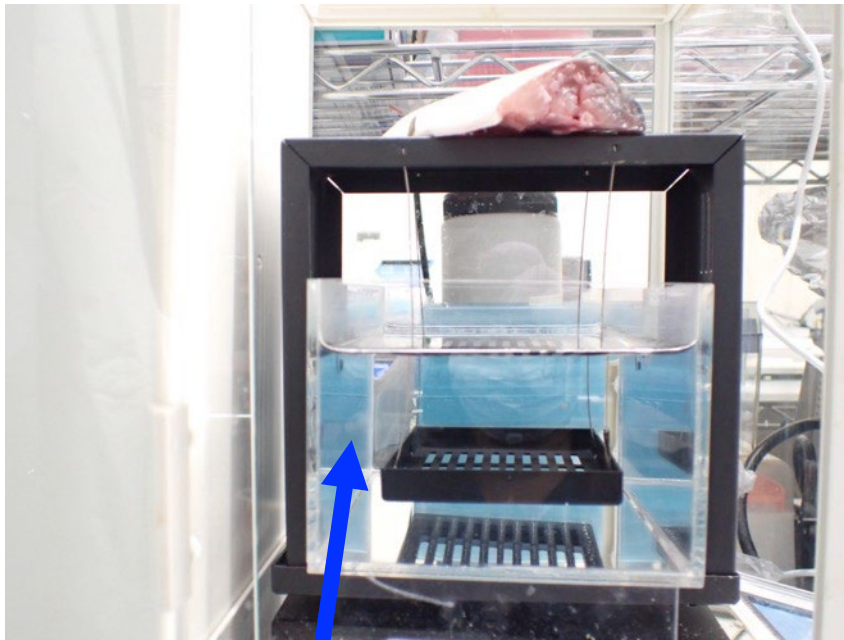
魚肉の比重と脂肪量が負の相関があることが報告されている。
比重計でサバの比重を測定する



アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価

魚の脂肪量測定法（加工品）

魚肉の比重と脂肪量が負の相関があることが報告されている。
比重計でサバの比重を測定する



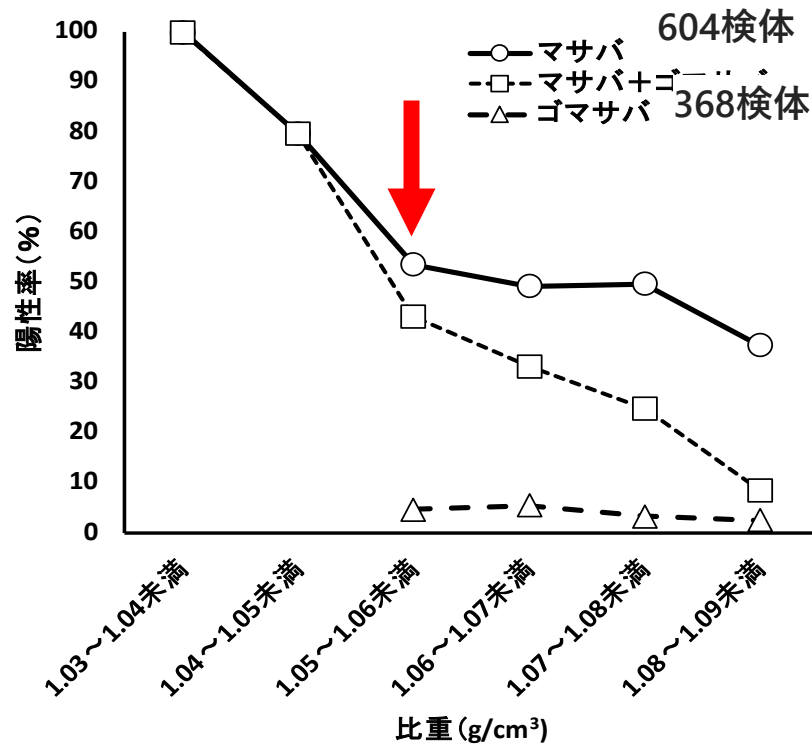
蒸留水



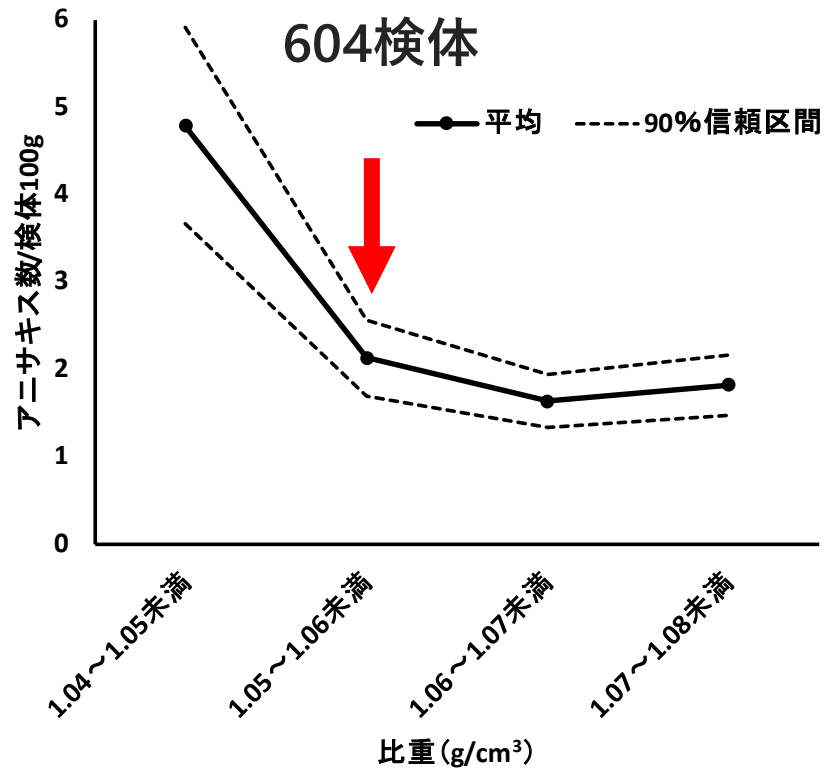
アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価

魚の脂肪量測定（加工品）

筋肉内のアニサキス陽性率



マサバ筋肉内のアニサキス数



比重1.05未満（高脂肪）で陽性率と虫体数が増加する傾向を示した。

本研究の目的

1. アニサキス食中毒リスク低減法の有効性の評価

(1) 養殖による食中毒リスク低減効果の評価

(2) 腹身除去による食中毒リスク低減効果の評価

2. 汚染実態調査

(1) アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価

(2) 日本海で漁獲されたサバの汚染実態評価

3. アニサキス食中毒原因食材同定法の確立

(1) 原因食材同定法の確立

日本海で漁獲されたサバの汚染実態

B. 2017年～2020年

実施された調査の成績
(総説著者のまとめ)

A. simplex s.s. (黒色)
(筋肉寄生)の割合増加
(日本海西部: ★が★に変化)

日本海(対馬暖流系群)

本研究の
背景情報

東シナ海

A. 2006年～2011年

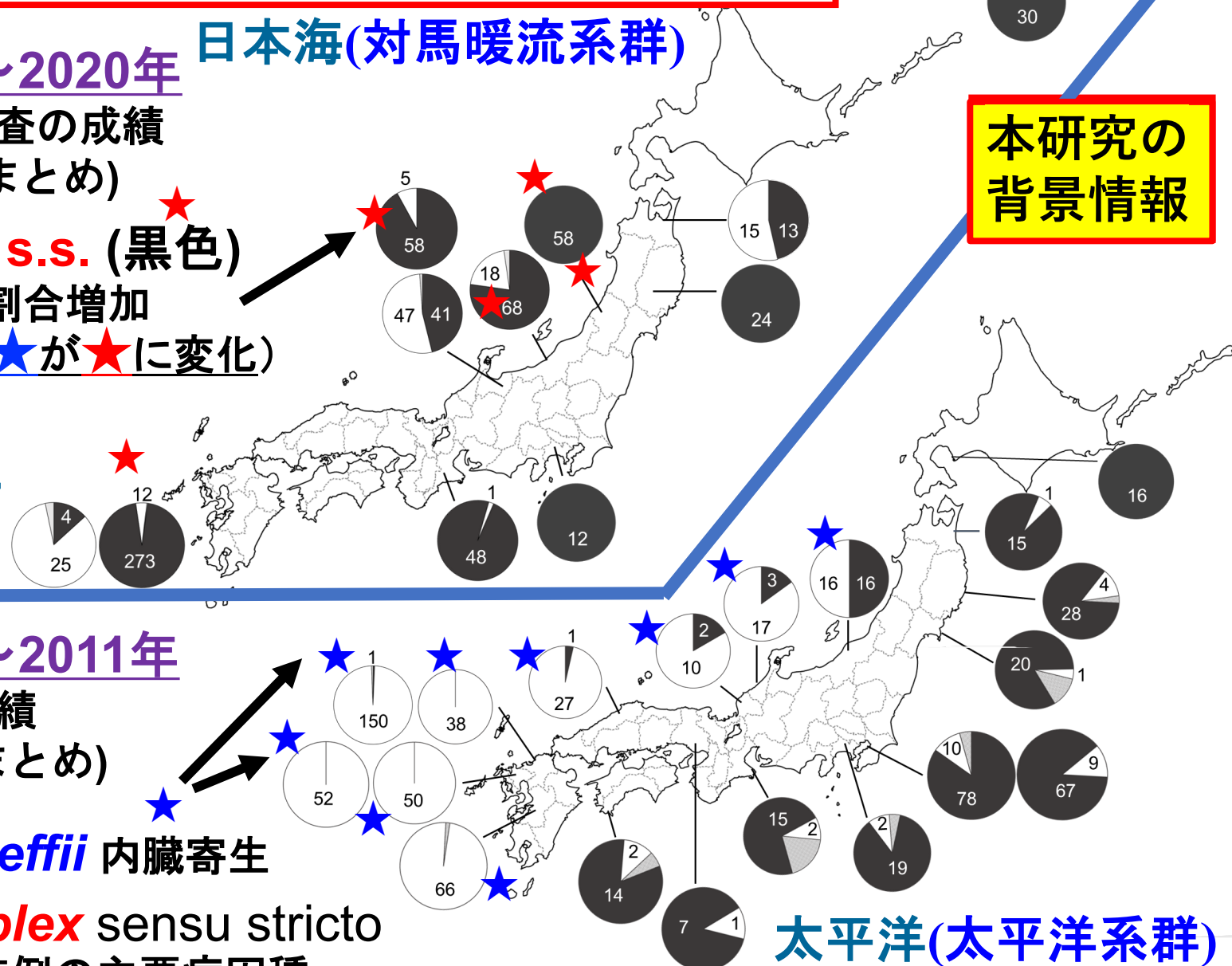
報告された成績
(総説著者のまとめ)

○: **A. pegreffii** 内臓寄生

●: **A. simplex** sensu stricto
筋肉寄生, 症例の主要病因種

太平洋(太平洋系群)

坂西 (梅原) (2022) :水環境学会誌, 45, 265-269



日本海等で漁獲されたサバの汚染実態（丸魚）

漁獲海域	検査尾数			検出虫体数		
	計	陽性	陰性	計	内臓	筋肉
日本海A海域	34	33	1	1,196	709	487
日本海B海域	45	43	2	1,236	792	444
東シナ海	80	78	2	17,152	17,095	57

(1尾の平均寄生数平均 35.2; 27.5; 214.4) (筋肉寄生率 40.7%; 35.2%; 0.3%)

分子同定	内臓			筋肉		
	計	As	Ap等	計	As	Ap等
日本海A.	709	486	223	487	464	23
日本海B.	792	430	362	444	435	9
東シナ海	17,095	107	16,988	57	20	37

(As寄生数/率 486+464=950, 79.4%; 430+435=865, 70.0%; 107+20=127, 0.7%)

日本海等で漁獲されたサバの汚染実態（丸魚）

太平洋	検体数	陽性検体数	陽性率	虫体数	検体100gあたりの虫体数	陽性検体100gあたりの虫体数
2022	126	52	41%	373	1.5	3.8
2023	99	54	55%	300	1.7	3.3

日本海	検体数	陽性検体数	陽性率	虫体数	検体100gあたりの虫体数	陽性検体100gあたりの虫体数
2020	41	12	29%	97	0.8	2.2
2021	89	29	33%	328	1.0	3.2
2022	63	37	59%	492	1.5	2.3
2023	100	56	56%	377	1.4	2.4

今回の調査では、サバ(加工品)の日本海と太平洋で大きな差は見られなくなった

本研究の目的

1. アニサキス食中毒リスク低減法の有効性の評価

(1) 養殖による食中毒リスク低減効果の評価

(2) 腹身除去による食中毒リスク低減効果の評価

2. 汚染実態調査

(1) アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価

(2) 日本海で漁獲されたサバの汚染実態評価

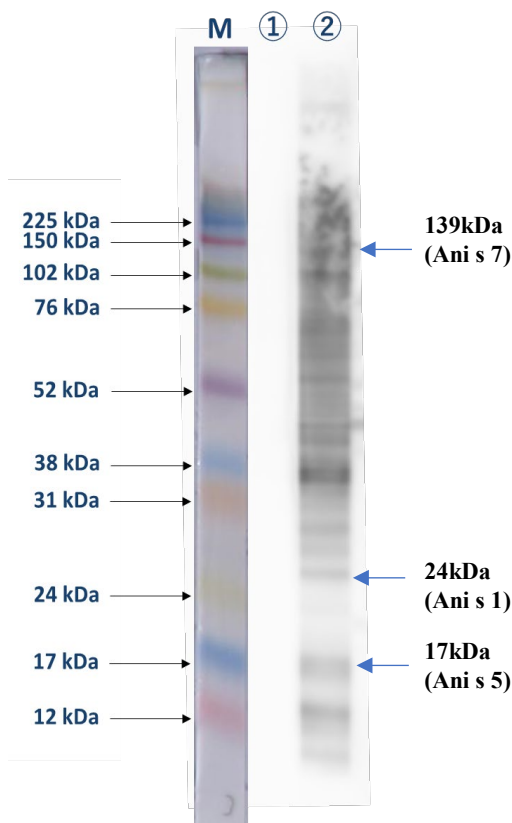
3. アニサキス食中毒原因食材同定法の確立

(1) 原因食材同定法の確立

アニサキス食中毒原因食材同定法の確立

1) アニサキス虫体タンパク質（抽出粗抗原）に対する サンドイッチELISA法の構築

(i) 抗体の作成



電気泳動抗原：アニサキス虫体タンパク質(AWP) (10 μ g/lane)
MW：タンパク質分子量マーカー
ゲル：12%プレキャストゲル (SDS-page用)
第一抗体：①正常ウサギ血清 (2,000倍希釈)
②抗Anisaxis抗体 (anti-anis pAb) (2,000倍希釈)
第二抗体：HRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (2,000倍希釈)
検出試薬：ECL Prime Western Blotting Detection Reagent

(ii) ELISA法の構築及び検量線作成

固相一次抗体：anti-anis Ab (1 μ g/well)

酵素標識二次抗体: HRP-labeled anti-anis Ab
(0.1 μ g/well)

検出試薬: TMB Hyper kit nakalai

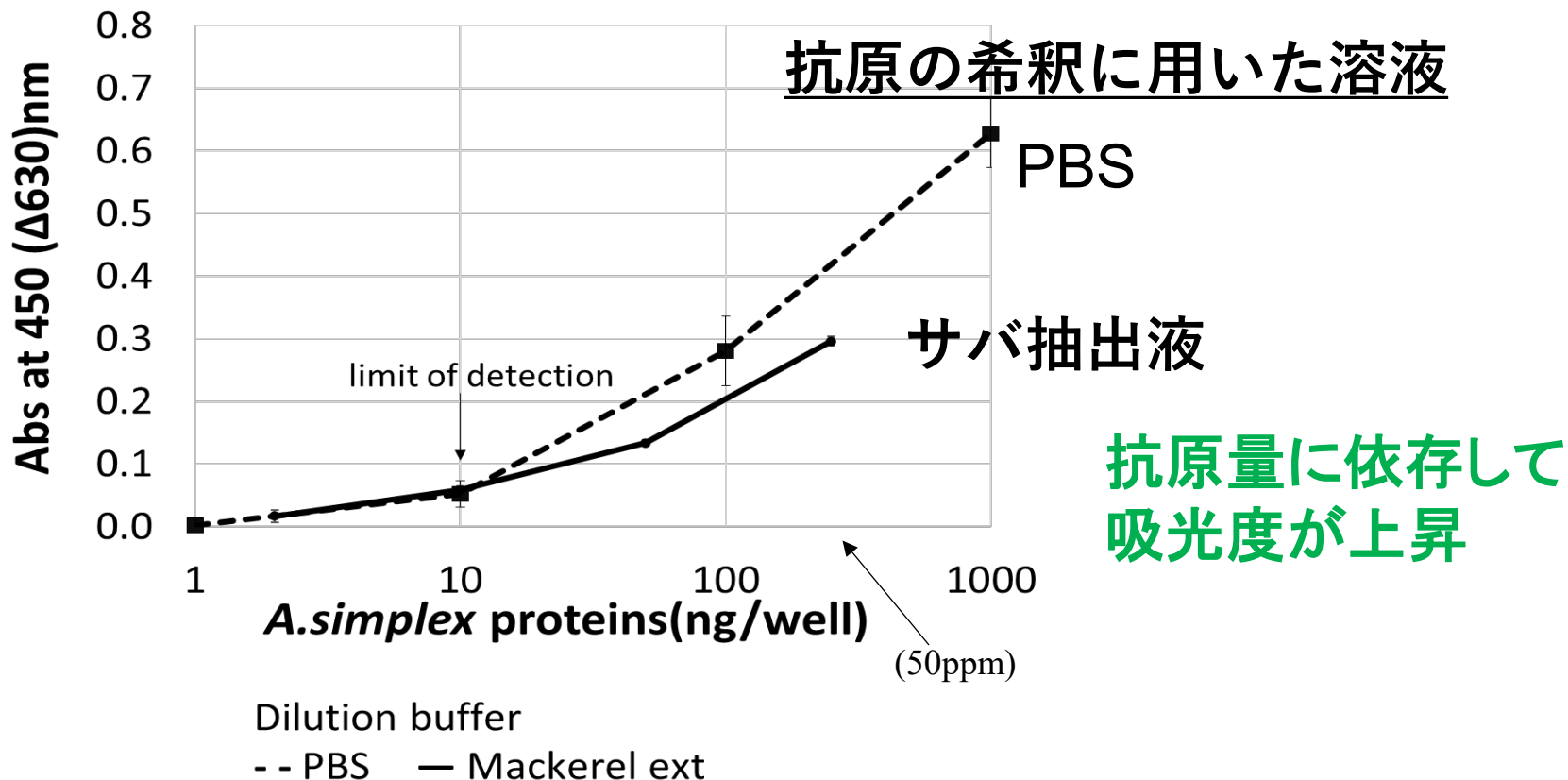
測定サンプル：アニサキス虫体タンパク質(AWP)
2~250ng/well (さば筋肉への添加量に
換算すると0.4 ~50ppm)

**As抽出粗抗原とその抗原を免疫して
得た抗血清の反応**

ウェスタンブロットによるアニサキス
抗体と反応する虫体タンパク質の解析

日本海等で漁獲されたサバの汚染実態（丸魚）

アニサキス虫体タンパク質のサンドイッチELISA法の検量線



アニサキスタンパク質の希釈溶媒をPBS（---）からサバ抽出液（—）に換えても2～250 ng/well (0.4～50ppm)の濃度範囲で検量線の作成を行うことができた。

また、検出限界は2ppm, 定量限界5ppmと判断した。

なお、虫体タンパク質10ppmは、およそ1匹のアニサキス虫体がさば切り身1切れ（約100g）に寄生していた時の濃度に相当するものと思われる。

(iii) 添加回収による真度と精度について

10ppmの虫体タンパク質(AWP)のサバ抽出液への添加回収実験の妥当性評価を行った。

Table 3 The average and SD of 5 spike and recovery tests							
ppm						SD	RSD(%)
Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Average		
10.2	10.5	10.5	9.9	11.7	10.5	0.6	5.69

- ・ 試行回数=5併行を5回 (sample 1~5)
- ・ 真度(%)
99~117
- ・ 室内精度(RSD)(%)
5.69

真度、室内精度ともに良好な値が得られた。

(iv) サバ筋肉中に残存する虫体タンパク質(AWP)の定量

Quantitative results of Anisakis insect proteins remaining in mackerel dorsal and ventral muscles by sandwich ELISA

Sample name	Dorsal	Ventral
220822-1	N.D.	43.3 ± 14.4 ppm
220822-2	N.D.	63.0 ± 5.4 ppm
220830-1	N.D.	21.2 ± 2.8 ppm
220830-2	N.D.	27.1 ± 4.7 ppm
220904	2.287 ± 0.71 ppm	5.67 ± 0.37 ppm
220912	2.963 ± 1.94 ppm	7.67 ± 0.61 ppm
221107	2.963 ± 0.49 ppm	6.67 ± 0.44 ppm
230405-1	N.D.	47.8 ± 11.5 ppm
230405-2	N.D.	5.26 ± 2.12 ppm
230413-1	N.D.	3.44 ± 1.93 ppm
230413-2	N.D.	3.06 ± 0.87 ppm

(n=3)

11個体いずれのサバも背側筋より腹側筋で多くアニサキスタンパク質が検出できる結果となった。検出されたアニサキスタンパク質の量にばらつきは見られるものの、9個体のサバ由来腹側筋ではアニサキスタンパク質が5ppm以上検出され、陽性と判断された。なお、背側筋では、3個体由来の筋肉において、偽陽性の判定となったが、他の8個体はすべて陰性であった。

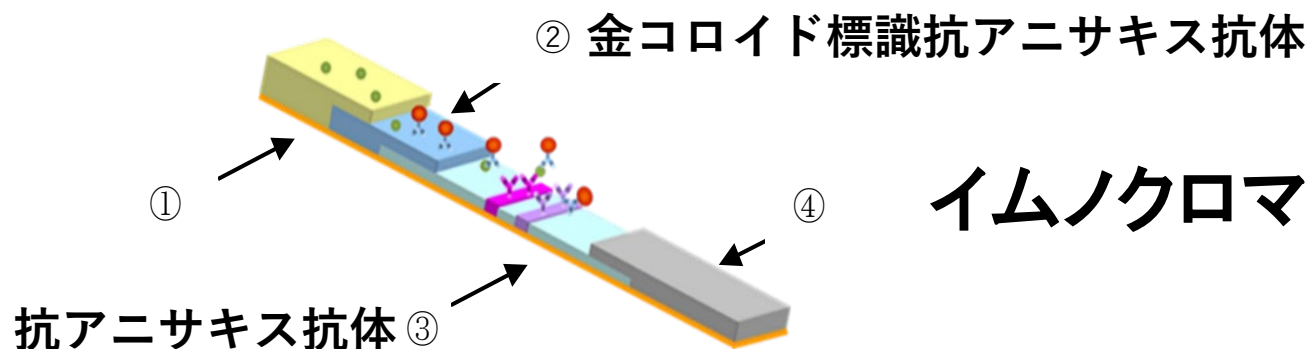
なお、これら個体では、目視でアニサキス虫体を除く際に、腹筋側にのみ虫体の移行が観察されており、腹側筋でアニサキス虫体の断片または虫体から分泌排泄された抗原が残存するものと考えられた。従って、本ELISA法を用いて、実際の食中毒事例での検査保存食等を用いての虫体タンパク質の検出も応用可能と思われる。

日本海等で漁獲されたサバの汚染実態（丸魚）

2) イムノクロマト法の構築

(i) イムノクロマトの調製

抗アニサキス抗体（anti-Anis Ab） $80\mu\text{g}$ を 40nm 粒径の金コロイド 1mL と混合し、標識抗体を調製し、濃度調整後 $4\mu\text{L}$ /テストをガラスファイバーに浸漬しコンジュゲートパット(②)を作製した。次に、ニトロセルロース膜にコントロールラインとなる抗ウサギ抗体（紫色）、及び、テストラインとなる anti-anis Ab(濃桃色)を塗布し固定化した(③)。調製したニトロセルロース膜(③)にコンジュゲートパット(②)、サンプルパット(①)、及び吸収パット(④)をバックングシートに貼り合わせ試作品を作成した（下図）。次いで、 5mm 幅に切断し、更に、イムノクロマト用ケースに組み込んで完成させた。



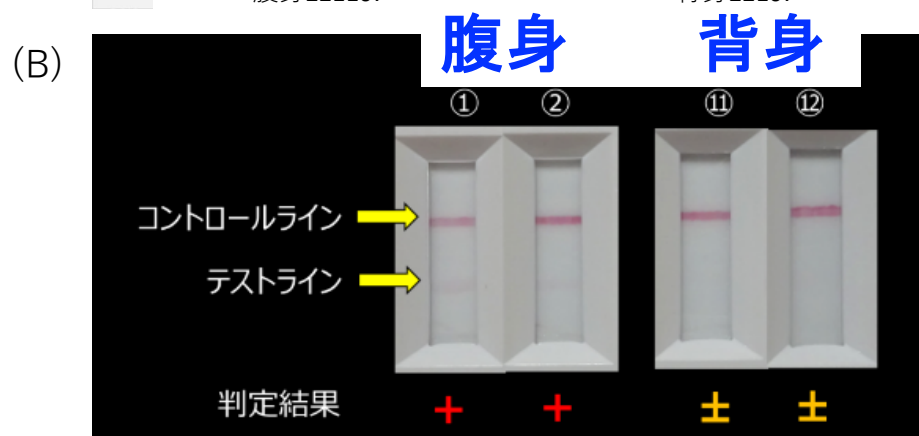
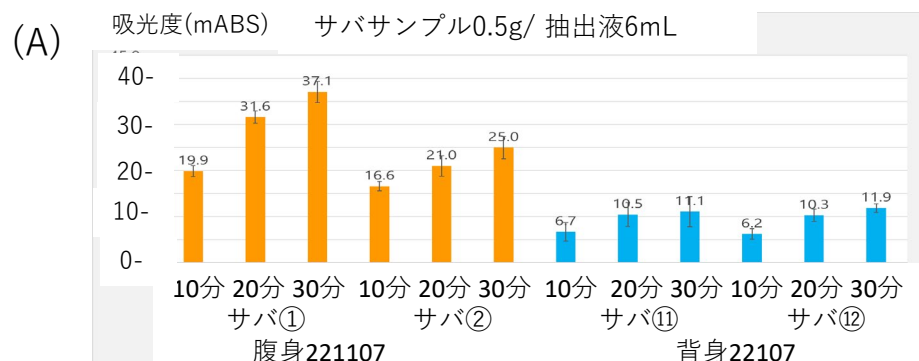
イムノクロマトの構造

(ii) サバ抽出液中(背身・腹身)の AWP の検出限界値の測定

展開開始から10分後では、アニサキス液100ppm、50ppmの検出を確認できた。20分後では、10ppmまで検出を確認できた。30分後では、5ppmまで検出を確認できた。

(iii) サバ腹身、背身中のAWPの測定

展開開始から10分後に腹身と背身で差がでて、30分後の判定では、腹身ではバンドがしっかり確認でき陽性と判断され、背身はバンドが観察されず、陰性と判断された。



サバの腹身、背身のイムノクロマトの発色吸光度計による測定

サバ腹身、背身それぞれ2サンプルについてイムノクロマトリーダを用いて、展開開始10分後、20分後、30分後の吸光度を示す。

サバの腹身、の背身のイムノクロマトの展開画像と判定

腹身ではバンドがしっかり確認でき陽性と判断され、背身はバンドが観察されず、陰性と判断された。

なお、同日に調整したサバ由来の腹身、背身から別に5サンプル選び、イムノクロマトで調べた結果においても、腹身陽性、背身陰性の結果が得られ、5-10ppm AWP検出に用いる感度は有しているイムノクロマトが構築できたと思われる。

魚筋肉中に残存するアニサキスタンパク質を血清学的に検出する方法を確立した。アニサキス食中毒リスク評価に活用できる。