

令和4～5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)	アニサキス食中毒リスク評価に関する調査研究（課題番号：JPCAFSC20222204） （アニサキスに起因する食中毒のリスク低減効果の評価手法に関する研究）
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4年度～令和5年度（2年間）

2 研究目的

アニサキス食中毒に対応するために、飲食店や販売店で様々なリスク低減法が講じられてきた。しかしながら、これらのリスク低減法の有効性についてはあまり検証されていないか、適切な方法で検証されていないものが多い。このようなリスク低減法の内、近年注目されている養殖によるアニサキスの感染防止効果、最も頻繁に行われていると考えられる腹身の除去によるリスク低減効果を科学的な手法を用いて検証する。

魚におけるアニサキス汚染を非破壊的に知る方法は今のところないと考えられる。もし何らかの汚染の指標となるものが存在すれば、それをもとに魚を選別することにより食中毒を低減できる可能性がある。これまでに魚の脂肪がアニサキスの筋肉移行に影響を及ぼす可能性が示唆されている。そこで、魚の脂肪量と筋肉中のアニサキス量との相関性を検証し、魚の脂肪量をアニサキス汚染の指標とすることが出来るか検討を行う。

日本海側のマサバには筋肉移行しにくい*Anisakis pegreffii*が主に寄生しているため、比較的安全であると考えられてきた。しかし、令和元～3年度の食品健康影響評価技術研究（課題番号：1909）では、日本海側のマサバの筋肉から多数の*A. simplex*が検出された。そこで、日本海側のマサバの汚染調査を引き続き行い、日本海側のマサバにおける*A. simplex*の寄生が、一過性のものかどうか検討し安全性を評価する。

アニサキス食中毒では、約60%の食中毒事例で原因食材が不明となっている。このため、食中毒原因食材の正確な把握が困難になっている。そこでアニサキスの抗原を対象とした高感度検出法を開発し、食中毒残品からアニサキス抗原の検出を行うことで、原因食材の同定に使用できるかを検討する。

以上の研究を通じて、アニサキス食中毒のリスク評価に必要な知見を集積し、アニサキス食中毒リスク評価に寄与することを目的とする。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
アニサキス食中毒リスク低減法の有効性の評価	養殖による食中毒リスク低減効果の評価	杉山 広（国立感染症研究所）、大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）
	腹身除去による食中毒リスク低減効果の評価	杉山 広（国立感染症研究所）
汚染実態調査	アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価	大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）、杉山 広（国立感染症研究所）

	日本海で漁獲されたサバの汚染実態調査	大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）、杉山広（国立感染症研究所）
アニサキス食中毒原因 食材同定法の確立	原因食材同定法の確立	手島玲子（岡山理科大学）

4 倫理面への配慮について

本研究ではヒトに関する検体および情報は取り扱わないため該当しない。

II 研究内容及び成果等

1 研究項目：アニサキス食中毒リスク低減法の有効性の評価

(1) 個別課題：養殖による食中毒リスク低減効果の評価 (杉山 広 (国立感染症研究所)、大西貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所))

● 魚個体での調査 (担当：杉山)

【研究内容・方法】

餌が管理される養殖魚には、アニサキス幼虫の寄生は殆どないと考えられていた。しかし最近の調査研究により、この認識が翻された。例えば 2022 年に報告された養殖マサバにおけるアニサキスの寄生実態の調査によれば、人工飼料を与えた魚 (マサバ) でも、天然種苗 (海から採取した稚魚) を出発材料として海面生簀で養殖した場合、魚の内臓や筋肉からアニサキス幼虫が多数検出されたからである。養殖施設は施設由来の養殖魚からアニサキス幼虫が検出された場合の風評被害を恐れ、調査依頼に積極的には協力をされないことが多い。今回、我々の要望に応じて養殖マサバを検査に提供し、養殖の状況を教示可能な施設の協力を得ることが出来たため、当該施設におけるアニサキス幼虫の寄生状況に関する調査結果を以下にまとめた。

【研究成果・考察】

日本周辺海域にある 4 施設が本調査に協力された。検査した養殖マサバの検査尾数と発育状況を産地別に記載すると、施設 A (20 尾、尾叉長 288~328 mm、体重 332.2~498.7 g)、施設 B (21 尾、199~255 mm、101.4~254.6 g)、施設 C (20 尾、323~378 mm、472.2~666.1 g)、施設 D (20 尾、325~375 mm、391.1~679 g) であった。これらの養殖施設から入手した計 81 尾は、内臓と筋肉におけるアニサキス幼虫の寄生の有無を個体別に検査した。筋肉については予め左右の腹身、背身の 6 部位に分けた。これら各部位の筋肉からのアニサキス幼虫の検出にあたっては、まずスパーテルで削り取った筋肉をファスナー付きのビニル袋に入れ、これを 2 mm の厚さにスパーテルや手指で伸ばした。このビニル袋を暗室内に持ち込み、波長が 365 nm の紫外線を当て、アニサキス幼虫が蛍光を発する特性を利用して、効率的で確実な幼虫の検出に努めた。内臓については肉眼で幼虫を検出して、採取した。アニサキス幼虫の型分類は実体顕微鏡下に行ったが、今回得られた幼虫はいずれも I 型であった。そこで I 型幼虫の同胞種レベルでの同定ために、各検出虫体より DNA を調製し、PCR で増幅した *cox2* 遺伝子の部分配列をダイレクトシーケンスした。

その結果、人工種苗 (卵から人工的に孵化させた稚魚) を用いていた 2 施設で養殖されたマサバには、アニサキス幼虫の寄生が全く見られなかった。そのうち 1 施設は掛け流しの陸上養殖であった) 他の 1 施設は海面養殖)。

一方、養殖施設 C は天然種苗 (漁獲した稚魚) を用いた海面養殖と考えられたが、20 尾中の 1 尾 (5%) にアニサキス幼虫の寄生が見られた。得られたアニサキス幼虫は合計 8 個体で、すべてが *A. simplex sensu stricto* (以下 As と略す) と同定された。なお陽性魚 1 尾において、3 虫体が筋肉内 (左腹部) に寄生していた。同じように、天然種苗 (約 200g の幼マサバ) を用いて海面養殖していた施設 D では、20 尾中の 11 尾 (55%) にアニサキス幼虫の寄生が見られた。得られたアニサキス幼虫の合計は 77 個体で、すべてが *Anisakis pegreffii* (以下 Ap と略す) と同定された。この施設では、陽性魚 11 尾中の 1 尾 (9%) において、2 虫体が筋肉内 (右背) に寄生していた (表 1(1)-1)。

表 1. 養殖施設のマサバにおけるアニサキスの寄生状況調査

養殖施設	調査尾数	陽性尾数	検出虫体数													
			総計		筋肉										内臓	
					合計		左腹部		右腹部		左背部		右背部			
			As	Ap	As	Ap	As	Ap	As	Ap	As	Ap	As	Ap	As	Ap
A	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	20	1	8	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	5	0
D	20	11	0	77	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	75
計	81	12	8	77	3	2	3	0	0	0	0	0	0	2	5	75

1)As, *Anisakis simplex* sensu stricto; Ap, *Anisakis pegreffii* (いずれの幼虫も I 型に属す)

● 加工品として流通している養殖サバの調査 (担当：大西)

93 検体を調査した。産地の内訳は、日本海 50 検体、九州 35 検体、北陸 8 検体であった。完全養殖は 18 検体、天然種苗を用いた蓄養が 75 検体であった。令和元年～令和 3 年度食品健康影響評価技術研究「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)」(以下、食品健康影響評価技術研究)の方法で、アニサキス数の調査を行った。その結果、全 93 検体の筋肉部位から、アニサキスは検出されなかった。蓄養は完全養殖と異なり、アニサキスの寄生を完全に防ぐことはできないと考えられる。しかし、天然サバのアニサキス陽性率は 50%を超えることを考慮すると、蓄養でも一定のリスク低減効果を有することが今回の結果から示唆された。

● 考察及び今後の課題

今回の調査では、人工種苗から養殖を始めた場合には、海面養殖であっても、養殖魚にアニサキスの寄生を認めないことが示された。一方で、天然種苗を用いて海面養殖した施設では、アニサキスの寄生が筋肉にも認められた。餌に関する情報が今回の調査では十分に得られなかったが、天然種苗を用いる養殖施設に問題があると言えた。「養殖魚の喫食はアニサキス食中毒の有効な予防手段」と言われてきたが、本調査の結果、現時点では万全とは言えなくなった。しかし、天然サバにおけるアニサキス寄生量を勘案すると、天然種苗を用いた養殖魚でも、今回の調査でアニサキス陰性ではなかったが寄生率は低く、アニサキス食中毒の発生に対して一定の予防効果はあると考えられた。

生鮮魚介類でも切り身・むき身を包装して販売する場合には、食品表示法に則して「養殖」との表示義務がある。しかし養殖魚であってもアニサキス汚染を認めることが、今回の調査で明らかになった。今回の調査を通じて得られたこの問題点について、行政は改善に向けて積極的に対応すべきである、また、消費者に対しても早急に啓発する必要があると考えられた。

(2) 個別課題：腹身除去による食中毒リスク低減効果の評価 (杉山 広 (国立感染症研究所))

魚におけるアニサキス幼虫の寄生部位は内臓 (体腔を含む) と筋肉であるが、その寄生部位は寄生する魚種により嗜好性があるとされる。すなわち、タラ類 (マダラやスケトウダラ) やサケ類 (シロザケ) では他の魚種とは異なり、内臓よりも筋肉に多く寄生することが既に知られている。さらにシロザケでは、筋肉でも特に腹壁の筋肉を好んで寄生し、とりわけ肛門より頭側で、しかも内臓と接触する部位の筋肉に寄生数が非常に多い。従ってシロザケでは、側線より下方の腹部の筋肉 (腹部筋肉) を刺身で喫食しなければ、アニサキス幼虫を生で摂食する危険性は減少し、アニサキス食中毒の発

生も大きく低下すると考えられた。勿論、加熱や冷凍を施さずにシロザケを刺身で喫食することは、喫食部位の如何に拘わらず、食品衛生の観点からは慎むべきである。

一方、アニサキス食中毒の原因魚種としては、タラ類やサケ類よりも、わが国ではサバ類（マサバとゴマサバ）が最も重要である。実際に食中毒統計でも、アニサキス食中毒の原因魚種のうち、半数近くをマサバが占める年が多い。マサバにおいて、筋肉と内臓とにおけるアニサキス幼虫の寄生状況の差異については、かなり詳しく調べられている。しかしシロザケのような筋肉を部位別にして寄生状況を詳しく検討した成績はない。そこで本研究では、マサバの筋肉における部位別のアニサキス寄生状況を検索した。腹部筋肉の除去によりアニサキス食中毒のリスクが低減できるのか、この評価を目的とした。

検査には、日本海A海域で漁獲された34尾のマサバと日本海B海域で漁獲された45尾のマサバを用いた。検査用の魚はまず内臓と筋肉とに分け、筋肉はさらに、側線より上方（背びれ側）を背部筋肉（背身）、側線より下方（腹びれ側）を腹部筋肉（腹身）に分類した。そして内臓は圧平法、筋肉は部位に依らずに消化法により、部位別にアニサキス幼虫を検出した（なお本項では以下、筋肉に寄生する虫体についての成績のみ記述する、内臓由来の検出虫体を含めた成績は後項において報告する）。さらに総ての検出虫体（内臓からの検出虫体も含めて）から個体別にDNAを調製し、リボソームRNA遺伝子のITS2領域を標的としたPCR増幅を行って、その遺伝子配列を調べ、As、Ap、Hybrid genotype（HG）の3種（3系統）に分類し、筋肉の部位別に寄生する虫種が異なるのかを確認した。

【研究成果・考察】

日本海A海域産のマサバ（34尾）の筋肉からは合計487隻のアニサキス幼虫が検出された（表1(2)-1）。部位別に見ると、腹部筋肉が468隻（96.1%）、背部筋肉が19隻（3.9%）であった。一方、日本海B海域産のマサバ（45尾）の筋肉からは合計444隻のアニサキス幼虫が検出され、腹部筋肉が427隻（96.2%）、背部筋肉が17隻（3.8%）であった（表1(2)-2）。これらの結果を合わせて部位別に見ると、腹部筋肉が895隻（96.1%）、背部筋肉が36隻（3.9%）であり、マサバでは背部筋肉に比べ腹部筋肉からの虫体検出が95%以上と圧倒的に多かった。

次にアニサキス食中毒の原因虫種として重要なAsに注目したが、両海域ともに背部筋肉に比べて腹部筋肉からのAsの検出数が圧倒的に多かった。すなわち、日本海A海域では96.3%（464隻中の447隻）が、また日本海B海域では96.6%（435隻中の420隻）が腹部筋肉に寄生した。両海域の合計で見ると96.4%（899隻中の867隻）のAsが腹部筋肉に寄生していた。

さらに季節別の寄生状況を夏季（春夏）および冬季（秋冬）に分けて比較したが、両海域ともに季節に関係なく、腹部筋肉からの検出数が、背部筋肉に比べて、圧倒的に多かった。すなわち日本海A海域は春夏が95.3%（255隻中の243隻）、秋冬が97.0%（232隻中の225隻）、日本海B海域は春夏が96.6%（438隻中の423隻）、秋冬が66.7%（6隻中の4隻）と、季節に関係なく腹部筋肉に多数のアニサキス幼虫が寄生していた。ただ日本海B海域では、冬季におけるアニサキス幼虫の寄生数が極端に少なく（筋肉だけでなく内臓も同様に少ない）、この時期におけるアニサキス幼虫が持つ寄生部位の選択性は正しい評価が困難であった。

以上の結果から、アニサキス幼虫の種類あるいは検出の時期に関係なく、腹部筋肉からの検出虫体数が圧倒的に多いことから、腹部筋肉を刺身として喫食部位から除去することが、アニサキス食中毒の発生予防に極めて効果的と考えられた。ただ注意すべきは、背部筋肉にもアニサキス幼虫の寄生が少数ながら認められることである。従って腹部筋肉の排除のみで、食中毒の発生を完全に抑制できないことも明らかで、この点にも一定の注意が必要である。

表 1(2)-1. 日本海 A 海域で漁獲されたマサバにおける筋肉部位別のアニサキス幼虫寄生状況

検出虫体数 ^{1), 2)}												
季節	総計			As			Ap			HG		
	計	背	腹	計	背	腹	計	背	腹	計	背	腹
春夏	255	12	243	251	12	239	3	0	3	1	0	1
秋冬	232	7	225	213	5	208	18	1	17	1	1	0
合計	487	19	468	464	17	447	21	1	20	2	1	1

¹⁾ As, *Anisakis simplex sensu stricto*; Ap, *Anisakis pegreffii* (いずれの幼虫も I 型に属す)

表 1(2)-2. 日本海 B 海域で漁獲されたマサバにおける筋肉部位別のアニサキス幼虫寄生状況

検出虫体数 ^{1), 2)}												
季節	総計			As			Ap			HG		
	計	背	腹	計	背	腹	計	背	腹	計	背	腹
春夏	438	15	423	435	15	420	0	0	0	3	0	3
秋冬	6	2	4	0	0	0	6	2	4	0	0	0
合計	444	17	427	435	15	420	6	2	4	3	0	3

¹⁾ As, *Anisakis simplex sensu stricto*; Ap, *Anisakis pegreffii* (いずれの幼虫も I 型に属す)

²⁾ 背, 背部筋肉; 腹, 腹部筋肉

【総合考察及び今後の課題】

マサバにおいてもシロサケと同様に、筋肉でも特に腹部筋肉（腹壁の筋肉）を好んで寄生することが明らかとなった。従って、側線より下方の腹部筋肉を刺身で喫食しなければ、アニサキス食中毒の危険性は激減すると考えられた。なおカツオでは、腹部筋肉は刺身としての販売を止め、竜田揚げとして加熱販売している大型販売店（スーパーマーケットの鮮魚部門）がある。腹部筋肉は脂の乗りも良く、加熱商品であっても好評を博していると聞く。このように、食材の廃棄を防ぐ方法も検討しながら、アニサキス幼虫の好寄生部位である腹部筋肉を刺身で提供しない工夫をすれば、アニサキス食中毒の相当数は予防できると思われた。なお、筋肉におけるアニサキス幼虫の寄生状況は、日本海 B 海域産で漁獲された冬期のマサバでは、相当に少なかった。この点は、後項において考察したい。

今回の検討から、他の地域で漁獲されるマサバや他の魚種に関しても、同様に筋肉の部位別（腹部筋肉と背部筋肉）の虫体寄生状況を検索する重要性が考えられた。同様の知見が得られた場合には、腹部筋肉の刺身としての喫食・提供禁止をアニサキス食中毒の有効な予防手段の一つとして、行政から発信する啓発資料で積極的に取り上げて良いと考えられた。

2 研究項目：汚染実態調査

(1) 個別課題：アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量の評価（大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）、杉山 広（国立感染症研究所））

● インピーダンス法を用いた検討（担当：杉山）

アニサキス幼虫は魚体内において脂肪が多い筋肉部位に多く寄生するとの報告や脂肪が多い魚種に多数の虫体が寄生するとの報告がある。そこで魚体における体脂肪率が、アニサキス幼虫の寄生数に及ぼす影響について、マサバを検体に検討した。すなわち、脂肪が多い部位、あるいは脂肪が多い個体を排除することで、アニサキス食中毒のリスクを低減できるか検証することを検討の目的とした。本項での体脂肪率測定にあたり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（Fish analyzerTM、大和製衡株式会社）を使用した。なお本装置は、得られた研究成果の公開を前提に、大和製衡株式会社から貸与され、本研究班の活動に使用する許可を得ている。

電気が生体内を通過する場合、水分量が多い組織、例えば筋肉などでは電気抵抗が低いために電気は細胞内を通り易い。一方、水分量が少ない組織、例えば脂肪などでは電気抵抗が高いため電気は細胞内を通らずに、細胞間を通過するという特性が知られている。さらに電気の周波数が高い場合は前述のように電気は細胞内を通り易いが、逆に周波数を低くすると電気は細胞内を通らずに細胞外を通るようになる。フィッシュアナライザーはこれらの原理を組み合わせ、複数の周波数で電氣的抵抗値（インピーダンス値）を測定することで、対象個体の体脂肪率を高精度に算出する非破壊的測定法として開発された。一方、実験室で脂肪量を求める場合は、対象を破壊してソックスレー抽出法により生化学的に測定するのが一般的である。そこで大和製衡では、マグロ背部を対象とした比較試験を実施した。その結果、フィッシュアナライザーによる体脂肪率とソックスレー抽出法（実測値）で得た値との相関係数が0.95であったと公表している。このようにフィッシュアナライザーによる体脂肪率の測定値は、生化学的な測定値と極めてよく一致することが既に検証されている。

ただしフィッシュアナライザーを用いた測定法は魚体温度の影響を強く受けるという欠点がある。このため今回は、測定の1時間前から魚体を氷冷し、各魚体の全体が確実に2~3℃に達したことを確認した。その後、体脂肪率の測定箇所として指定された背びれの下にプローブを押し当て、低周波と高周波での測定を実施した。そして両者の値（差異）を用いて、製造元が確立したマサバでの換算表を用適用し、体脂肪率を算出した

【研究成果】

検体として、前項で用いた日本海A海域産マサバ34尾と日本海B海域産マサバ45尾を用いた。漁獲場所別の各マサバ個体における体脂肪率とそのマサバ個体の筋肉から検出された虫体数との関係を表示する（図 1 (1)-3および図 1 (1)-4）。体脂肪率と筋肉（背部筋肉と腹部筋肉との合計）からの検出虫体数の相関係数に関しては、解析ソフトに必要な数値を入力して算出させた。その結果、日本海A海域のマサバでは0.0443、日本海B海域のマサバでは0.0071となり、相関関係があるとは言えないことが分かった。特に体脂肪率が低い個体からも多数のアニサキス幼虫が検出されたのは予想外であった。例えば日本海A海域で漁獲されたマサバでは、100隻寄生の個体において体脂肪率が7%に留まった。また日本海B海域で漁獲されたマサバでも82隻、75隻、66隻、65隻と多数のアニサキス幼虫が筋肉から検出されたマサバでも、体脂肪率はそれぞれ5%、7%、7%、6%に留まった（図中に赤点で示す）。

【考察】

マサバ個体における体脂肪率とアニサキス幼虫の寄生数とが相関するのか、マサバを検体にフィッシュアナライザーという非破壊的な測定器を用いて検討した。しかし各マサバ個体の体脂肪率と筋肉からの検出虫体数との間には相関関係がないという結果が得られた。特に、多数のアニサキス幼虫が筋肉から検出されたマサバでも、体脂肪率がいずれも6前後に留まる個体をいくつも認めた。このような想定外の結果が得られた原因は明らかではない。

図 1 (1)-3. 日本海A海域産

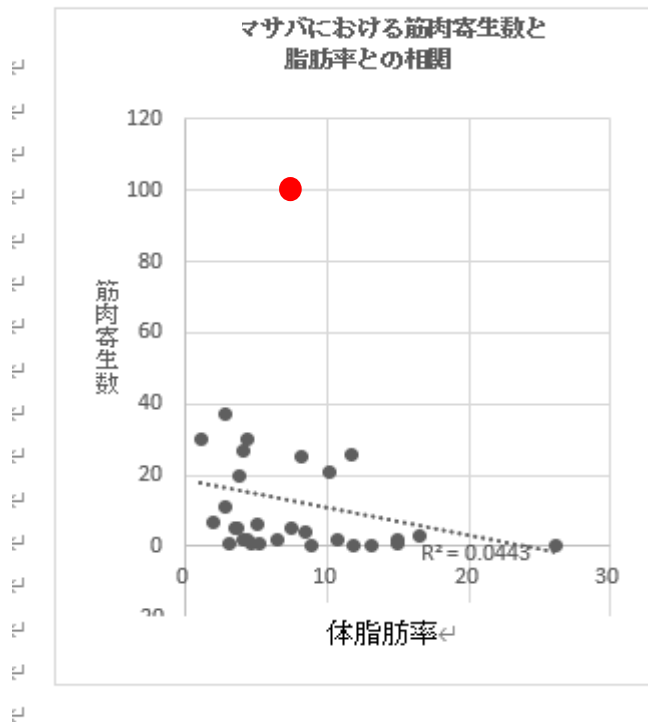
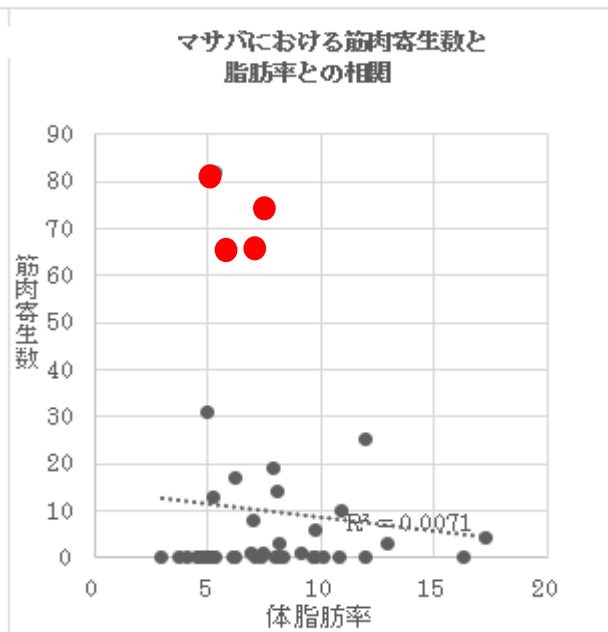


図 1 (1)-4. 日本海B海域産



アニサキス幼虫は魚体内において脂肪が多い筋肉部位に多く寄生するとの報告や脂肪が多い魚種に多数の虫体が寄生するとの報告はある。しかし脂肪率については、測定値を示さずに解剖学的な所見に基づく判定に留まる報告も含まれる。今後はフィッシュアナライザーによる測定に加えて、測定時の温度の影響を受けないソックスレー抽出法による測定も試み、我々の想定 of 正否について検証したいと考えている。特に同一個体の背部筋肉と腹部筋肉を別々の検体として、ソックスレー抽出法により脂肪量を求め、寄生虫体数との関係を調べたいと考えている。前項で明らかにしたように、腹部筋肉におけるアニサキス幼虫の寄生数は背部筋肉より遥かに多いことから、脂肪量（率）に関しても、個体ごとではなく、各個体の部位別の値が実際の感染率と一致するとも考えられる。この点が明らかになれば、フィッシュアナライザーで脂肪率を測定する時の測定場所に関する検討も必要になるかもしれない。フィッシュアナライザーによる非破壊的な脂肪率の測定は、非常に簡便であるので、このような検討も踏まえて当該機 の 特性を引き出し、アニサキス食中毒の予防に貢献できる方策を考えていきたい。

● 比重測定法を用いた検討（担当：大西）

魚の脂肪含量と魚の死後に発生するアニサキスの筋肉移行には、相関があるとの報告があるため、魚の脂肪含量と筋肉中のアニサキス数との関連性を調査した。脂肪含量が多いほど、筋肉の比重が低

くなることから、加工品を用いた本研究では筋肉の比重を脂肪含量の指標として使用した。供試した検体は、すでに加工されて店頭で販売されているマサバ 604 検体、ゴマサバ 368 検体の計 972 検体であった。検体の購入は、神奈川県内の販売店 1 件を毎日無作為に選択し、販売されている異なる産地、ロットのサバを、マサバ、ゴマサバ関係なくすべて購入した。

マサバ、ゴマサバそれぞれの比重は $1.031\sim 1.084\text{ g/cm}^3$ 、 $1.052\sim 1.089\text{ g/cm}^3$ であった。比重とアニサキスの陽性率との関係を見てみると、マサバは、比重 $1.05\sim 1.08\text{ g/cm}^3$ までは、陽性率は 50%前後であるが、比重が 1.05 g/cm^3 未満の検体では、比重の低下に伴って陽性率が上昇した。一方、ゴマサバのアニサキス陽性率は、比重に関わらず約 4%であった（図 1）。

検体数が十分にある $1.04\sim 1.08\text{ g/cm}^3$ で、比重と検体 100g あたりのアニサキス数を比較すると、比重が低下するにつれてアニサキス数が増加する傾向が認められた（図 2）。ゴマサバは陽性率が低く、比重 $1.052\sim 1.089\text{ g/cm}^3$ に集中していたため（図 1）、ゴマサバを除き、マサバだけで比重とアニサキス数を比較したところ、 $1.05\sim 1.07\text{ g/cm}^3$ ではアニサキス数に変化は見られなかったが、 1.05 g/cm^3 未満でアニサキス数が増加した（図 3）。

今回の結果から、比重 1.05 g/cm^3 を境に、アニサキス陽性率およびアニサキス数が増加する傾向が認められたことから、脂肪含量とアニサキスの筋肉内寄生との間に関連性があることが認められた。今回の調査では、比重 1.05 g/cm^3 未満のゴマサバを入手することができなかつたため、今後さらに検討を行いたいと考えている。

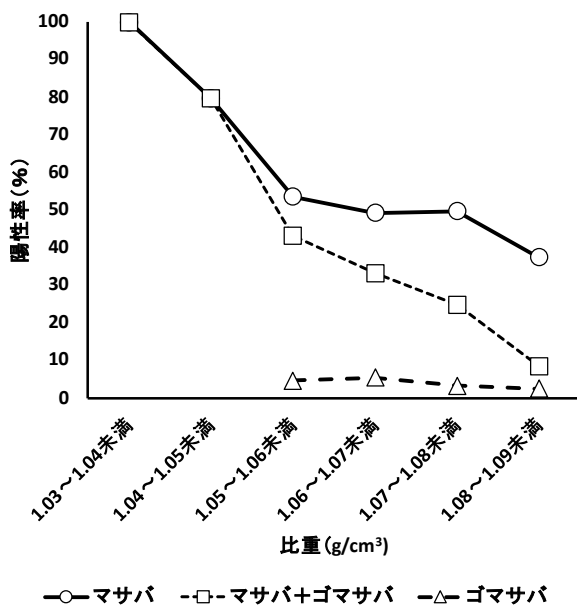


図1 筋肉比重とアニサキス陽性率との関係

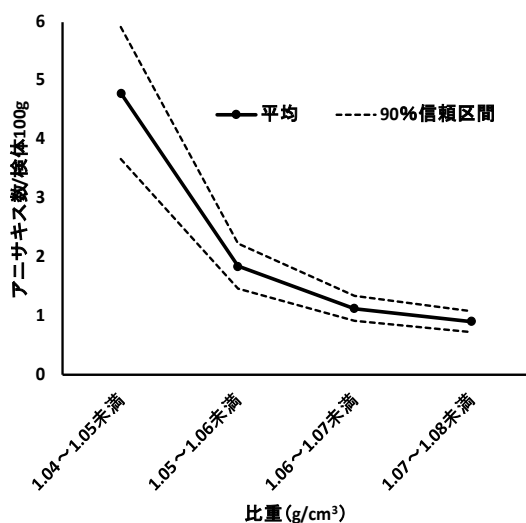


図2 筋肉比重とアニサキス数との関係
(ゴマサバを含む)

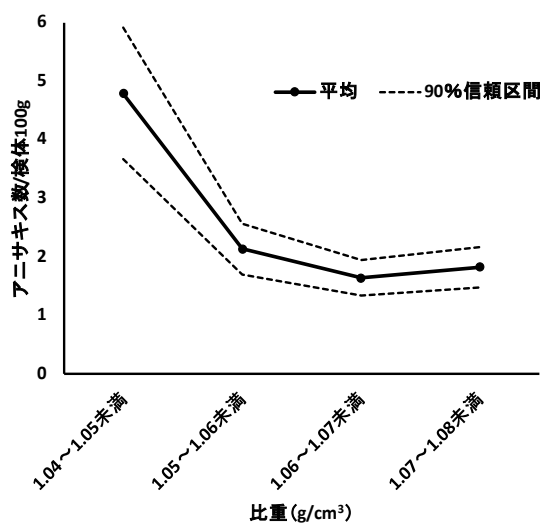


図3 筋肉比重とアニサキス数との関係
(ゴマサバを含まない)

● 総合考察及び今後の課題

今回の結果から、インピーダンス法では測定値とアニサキス寄生量との間に相関は認められなかった。一方、比重測定法を用いた調査では、筋肉比重とアニサキス寄生量との間に直線の相関性は認められなかったが、比重が 1.05 g/cm³ 未満の検体では寄生量が増加する傾向が認められた。インピーダンス法は検体の鮮度などに大きく影響を受けることが知られており、また、筋肉比重は必ずしも脂肪量だけに影響を受けるものではないと考えられる。このような測定法の違いが今回、インピーダンス法と比重測定法で異なる結果になった要因のひとつではないかと考えられた。また魚の死後、アニサキスは内臓から筋肉に移行すると考えられているため、測定を行うタイミングによってもばらつきが生じるのではないかと考えられた。今回の結果から、筋肉比重を重度の寄生の指標として利用できる可能性が示唆されたが、比重の測定は非破壊的に行うことは困難である。今後さらに測定法の改良に取り組む必要があると考えられた。

(2) 個別課題：日本海で漁獲されたサバの汚染実態調査（大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）、杉山 広（国立感染症研究所））

● 魚個体での調査（担当：杉山）

【研究内容・方法】

日本において、人体への主要なアニサキスの感染源の魚種がマサバであることは、食中毒統計からも明らかであり、これは従来から認知されていた。その結果、マサバのアニサキス汚染実態調査（マサバも対象に含めた調査）が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かった。このデータの欠損を補うため、日本周辺海域で漁獲されたマサバに関するアニサキス幼虫の寄生状況調査が、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、東シナ海において漁獲され、地域の主要漁港に水揚げされたマサバを検索材料として寄生状況の季節的変動を含めた調査

が実施された。季節に関して、4～9月を夏季、10月～翌3月を冬季として便宜的に表現した（具体的な検査日は添付資料に記載）。

一連の研究で用いたマサバは、太平洋で漁獲されたもの70尾、日本海では156尾、東シナ海では80尾の合計306尾である。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PCRに用いたユニバーサルプライマーで増幅産物の遺伝子配列を解読し、種同定を確認した。これに加えて、リアルタイムPCRによる虫種判別の系も導入して、迅速な種同定を実施した。このように種同定に関しては、PCR-RFLP法、遺伝子配列の解読、リアルタイムPCR法の3つの方法を適宜組み合わせ、マサバから検出されたアニサキス幼虫の種同定結果を得た。

平成30年・令和元年～令和3年の内閣府食品安全委員会による食品健康影響評価技術研究で得た成果では、東シナ海産マサバ40尾から検出した約1,600隻のアニサキス幼虫に関しては、分子同定を完了して成果を報告した。しかし約15,000隻の虫体に関しは、形態学的にアニサキスType Iであるとの判定に留まり、分子同定は完了していなかった。そこで本報告では、分子同定が行われていなかったものも含めて、東シナ海産のマサバから検出した合計約17,000隻のアニサキス幼虫の同定結果について、季節別の虫体寄生状況も併せて一括報告する。

魚介類に由来するアニサキス幼虫の種同定を行う研究者の間では、特定地域の日本海産のマサバに寄生するアニサキスの虫種が、ApからAs（我が国における主要な人体寄生種）に移行しつつあるとの情報が広がっている。2010年に国際誌で報告された日本近海（全国的）のマサバに寄生するアニサキス幼虫の成績では、日本海や東シナ海で漁獲されるマサバ由来の虫体はほとんどApで、筋肉における寄生は極めて珍しく、もっぱら内臓（体腔を含む）に寄生するとされていた。このため虫体は内臓と共に廃棄されるので、この地域のマサバは、アニサキス食中毒の原因として重要でないと判断されていた。本研究の大きな課題は、2010年以降において、マサバにおけるアニサキス幼虫の寄生態度（特に主要な寄生虫種と魚体内における寄生部位）が変化したのかを検証することである。既に前回の調査において、日本近海においては、3地域のマサバを検索対象としたが、今回は東シナ海産のマサバに関する寄生状況を全検体の解析で明示すると共に、日本海A海域において定置網漁により漁獲されたマサバ34尾を検体として検索した。さらに日本海A海域と東シナ海との地理的中間地点に位置する日本海B海域で漁獲されたマサバ45尾も入手して、アニサキス幼虫の検出と解析に努めた。検出された虫体に関しては、東シナ海産虫体と同様に、リアルタイム-PCRによる虫種判別の系を主に用いて種同定した。この結果を基に、季節別のアニサキス虫体の寄生状況や寄生虫種・マサバ体内におけるアニサキス幼虫の寄生部位に関する解析を行った。興味深い結果が得られており、併せて報告したい。

【研究成果・考察】

[1] 東シナ海

東シナ海で水揚げされた80尾を対象に調査した。得られた虫体は総て分子同定を行った。マサバからの検出虫体数は合計17,152隻、1尾あたりの平均は214.4隻であり（夏季は平均134.4隻、冬季は294.

表 1 (2)-1 東シナ海産のマサバから検出されたアニサキス

季	検査尾数 ²⁾			検出虫体数 ³⁾												
				計(右成績と重複)			内臓					筋肉				
1)	計	陽	陰	小計	内臓	筋肉	計	As	Ap	HG	At	計	As	Ap	HG	At
夏	40	38	2	5,375	5,321	54	5,321	90	5,208	22	1	54	20	32	2	0
冬	40	40	0	11,777	11,744	3	11,774	17	11,730	27	0	3	0	3	0	0
計	80	78	2	17,152	17,095	57	17,095	107	16,938	49	1	57	20	35	2	0

¹⁾ 夏(春および夏), 冬(秋および冬); ²⁾ 陽、陽性; 陰、陰性

³⁾ As, *Anisakis simplex sensu stricto*; Ap, *Anisakis pegreffii*, HG, hybrid genotype; At, *Anisakis typica*

4隻)、他の海域で漁獲されたマサバに比べ、1尾から検出されるアニサキス幼虫数は極めて多かった（しかも冬季は夏季の2倍以上）。ただし検出部位を内臓と筋肉に分けて検出虫体数を調べると、内臓からは平均213.7隻（全体の99.7%）であるのに対し、筋肉からは平均0.7隻（全体の0.3%）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、季節により大きな差異を認めた。すなわち夏季は1尾あたり平均1.4隻（検査したマサバ40尾から54隻）が検出されたが、冬季は平均0.1隻（検査したマサバ40尾から3隻）であった。夏季に筋肉から検出された54隻の種類を見ると、20隻はAsであったが、Apが32隻、残り2隻はHGであった。本研究でApやHGもマサバの筋肉から少数ながら検出されることが示された。アニサキス食中毒の大半はAsを原因種とするが、ApやHGによる事例発生もあり、注意が必要である。なお内臓からの検出虫体（計17,095隻）を分子同定した結果では、Apが最も多く16,938隻（99.1%）、次いでAsが107隻（0.6%）であった。熱帯～亜熱帯の海域に分布する*Anisakis typica*（以下Atと略す）も夏季に内臓から1隻だけ検出され、地球温暖化の影響もあるのかと想像された（以前にも東シナ海で漁獲されたマサバやタチウオからAtは検出されている）

[2] 日本海

日本海A海域で定置網漁により水揚げされたマサバ34尾から1,196隻のアニサキス幼虫が検出された。1尾あたりの検出数は平均35.2隻であった。このうち709隻（59.3%）と過半数は内臓由来であったが、その2分の1以上の487隻（40.7%）が筋肉から検出された。筋肉由来の487隻のうち、464隻（95.3%）がAsで、Apはわずか21隻（4.3%）に留まった。1尾のマサバの筋肉に寄生するAsは、通年で平均13.6隻（夏季は17.9隻、冬季は10.7隻）に上る。なお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18.2隻、冬季は平均11.6隻と、夏季の方がやや多かった。この傾向はAsでも同様であったが、一方で割合的にはごく少数に留まるApは冬季に虫体数が多かった。

表 1 (2)-2 日本海A海域のマサバから検出されたアニサキス

季節	検査尾数			検出虫体数												
				計(右成績と重複)			内臓					筋肉				
	合計	陽性	陰性	小計	内臓	筋肉	小計	As	Ap	HG	At	小計	As	Ap	HG	At
春夏	14	14	0	524	269	255	269	223	45	1	0	255	251	3	1	0
秋冬	20	19	1	672	440	232	440	263	174	3	0	232	213	18	1	0
総計	34	33	1	1196	709	487	709	486	219	4	0	487	464	21	2	0

1) As, *Anisakis simplex* sensu stricto; Ap, *Anisakis pegreffii*, HG, hybrid genotype; At, *Anisakis typica*

日本海A海域より西方に位置し、東シナ海と地理的に中間的な位置にある日本海B海域において漁獲されたマサバについても、45尾について検索した。これら45尾のマサバから、1,236隻のアニサキス幼虫が検出され、1尾あたりにすると、平均27.5隻になった。この1,236隻のうち約3分の2の792隻(64.1%)は内臓由来であったが、残り約3分の1の444隻(35.9%)は筋肉から検出された。筋肉由来の444隻のうち、435隻(98.0%)がAsで、Apはわずか6隻(1.4%)に留まった。1尾のマサバ筋肉から検出されたAsは、通年平均にすると9.7隻だが、夏季では21.8隻に上る。筋肉寄生の虫体は冬季では1尾あたり平均0.2隻であるのに対し、夏季では平均21.9隻と、夏季の方が圧倒的に多かった。この傾向はAsでも同様であったが、ごく少数の虫体が検出されたApは、冬季に検出数が多かった。

表 1 (2)-3. 日本海B海域産マサバから検出されたアニサキス幼虫

季節	検査尾数			検出虫体数												
				計(右成績と重複)			内臓					筋肉				
	合計	陽性	陰性	小計	内臓	筋肉	小計	As	Ap	HG	At	小計	As	Ap	HG	At
春夏	20	20	0	1,040	602	438	602	424	168	10	0	438	435	0	3	0
秋冬	25	23	2	196	190	6	190	6	184	0	0	6	0	6	0	0
総計	45	43	2	1,236	792	444	792	430	352	10	0	444	435	6	3	0

1) As, *Anisakis simplex* sensu stricto; Ap, *Anisakis pegreffii*, HG, hybrid genotype; At, *Anisakis typica*

【考察】

前回(第1期:平成30年・令和元年~令和3年)の調査でも、日本海で漁獲されたマサバ67尾を対象にアニサキス幼虫の寄生状況を調べた。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)。しかし1尾の筋肉から検出される虫体数は平均2.1隻で、Asの筋肉寄生が多い別海域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。今回の日本海A海域および日本海B海域での調査では、筋肉寄生の虫体が全検出虫体の3分の1を優に超えて、さらにその虫種は95%以上がAsであった。わずか2~3年のうちに、漁獲されるマサバのアニサキス食中毒リスクは、別海域で漁獲されるマサバのリスクと変わらなくなった。この点を行政は強く認識し、国民に周知すべきである。

- 加工品として流通しているサバでの調査(担当:大西)

食品健康影響評価技術研究（課題番号：1909）に引き続き、日本海で水揚げされたサバ加工品の汚染状況を調査した。調査方法は、食品健康影響評価技術研究（課題番号：1909）と同じ方法を用いた。今回の調査では、2022年～2023年度にかけて、日本海で水揚げされたマサバ加工品 163 検体を調査した（表 1）。2022年度は陽性率 59%、検体 100g あたりの虫体数は 1.5 隻であった。2023年度は陽性率 56%、検体 100g あたりの虫体数は 1.4 隻であった。検出されたアニサキスの内訳は、As が 865 隻、HG のハイブリッド遺伝子型が 4 隻であった。食品健康影響評価技術研究（課題番号：1909）の調査では、2020年度は陽性率 29%、検体 100g あたり 0.8 隻、2021年度は陽性率 33%、検体 100g あたり 1.0 隻であった（表 1）。日本海で水揚げされたマサバにおける As の汚染が大きく変化している可能性が示唆された。2022年～2023年度に太平洋で水揚げされたサバ加工品は、陽性率が約 53%、検体 100g あたり約 1.6 隻であったことから（表 2）、2022年～2023年度に日本海で水揚げされたサバの汚染は、太平洋で水揚げされたサバ加工品と同程度であることが明らかになった。

表 1 日本海で水揚げされたサバ加工品におけるアニサキス汚染状況

年度	検体数	陽性検体数	虫体数	陽性率（%）	虫体数/検体100g	虫体数/陽性検体100g
2020	41	12	97	29	0.8	2.2
2021	89	29	328	33	1.0	3.2
2022	63	37	492	59	1.5	2.3
2023	100	56	377	56	1.4	2.4

表 2 太平洋で水揚げされたサバ加工品におけるアニサキス汚染状況

年度	検体数	陽性検体数	虫体数	陽性率（%）	虫体数/検体100g	虫体数/陽性検体100g
2022	126	52	373	41	1.5	3.8
2023	99	54	300	55	1.7	3.3

● 総合考察及び今後の課題

今回の結果から、サバのアニサキス汚染が多くなっている現状が明らかになった。マサバの筋肉に As が多数寄生するようになった主な要因として、海水魚の生育環境の変化をあげたい。海水温上昇により、マサバ系群の採餌行動やそれに伴う回遊路の変化が起こることは容易に推定できる。マサバによる中間宿主・待機宿主の採食量が増加すれば、本報告で記述した様に、As や Ap などの寄生状況が変化する可能性も高い。中間宿主のオキアミや終宿主の海産哺乳動物、さらに海中で孵化する前後のアニサキス幼虫に対しても、海水温は直接的な影響を及ぼすと考えられるので、海水温とアニサキス幼虫の寄生状況の変化について、全国的な視点での今後の調査が望まれる。

3 研究項目：アニサキス食中毒原因食材同定法の確立

(1) 個別課題：原因食材同定法の確立（手島玲子（岡山理科大学））

本分担研究では、食品健康影響評価を実施する上で必要となる、アニサキスに起因する食中毒の原因食材同定法として、分泌排泄されたアニサキスタンパク質の残存に着目した測定法の開発を行うことを目的として研究を行った。以下、分担研究内容を1) ELISA法の構築、2) イムノクロマト法の構築、3) ウェスタンブロット法の構築の3項目にわけ、説明を行う。

1) アニサキスタンパク質に対するサンドイッチ ELISA 法の構築

(方法) (i) ELISA法構築及び検量線作成—スーパーでサバ個体を購入後、腹部から虫体を採取し、虫体破碎後タンパク質をPBS緩衝液にて抽出した。抽出液中のタンパク質の分子量は、SDS-PAGEにて確認

を行った。抽出した虫体タンパク質をウサギに免疫後血清を分取し、さらにIgG精製を行い、IgG（抗体）画分を得た。サンドイッチ ELISAの構築としては、96穴プレートを用い、上記精製した抗アニサキス IgG抗体を固相抗体及びHRP酵素標識抗体として用い、基質にはTMB基質を用い、吸光度をプレートリーダーで測定した。検量線作成には、アニサキス抗原をPBS緩衝液とマトリックス（サバ抽出液）で希釈して用いた。抗原濃度は2～250 ng/well, サバ筋肉への添加量に換算すると0.4～50 ppmであった。(ii) 添加回収--10ppm濃度のアニサキス抗原をサバ切り身に加え、破碎処理を行った後にタンパク質溶液を抽出し、添加した抗原の回収率（真度）及び併行精度及び室内精度を求めた。実験は1回の試験は5併行で5回繰り返して行った。(iii) サバ筋肉中のアニサキスタンパク質定量-- スーパーから購入したサバ個体からアニサキス虫体を目視で取り除いた後、腹側及び背側の筋肉を各個体から複数か所以上採取し、筋肉から抗原を抽出し、筋肉に分泌排泄されたアニサキスタンパク質の定量を行った。

（結果）(i) ELISA法構築及び検量線作成 -- ELISA法に用いる抗体について至適条件を求めた結果、固相に用いる一次抗体は1 µg/wellで使用することとし、HRP標識した二次抗体については、1000倍希釈が最適であった。図1にアニサキス抗原をPBS緩衝液で希釈した際の検量線と、アニサキス抗原をサバ抽出液で希釈した際の検量線の比較を示す。横軸に抗原濃度、縦軸に吸光度を示しているが、サバ抽出物で抗原を希釈した方が、PBS緩衝液で希釈した場合よりも検量線の傾きが小さくなったが、2～250 ng/well (0.4～50 ppm) の濃度範囲でいずれの溶液で希釈した場合も、検量線を得ることができた。

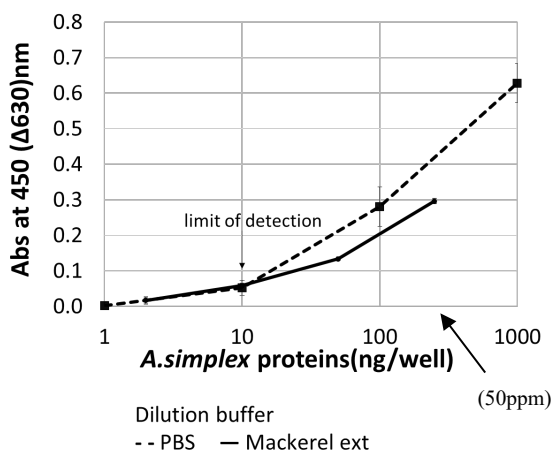


図1 アニサキスタンパク質のサンドイッチELISA法の検量線

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を書くことができた。

(ii) 添加回収による真度と併行精度について - アニサキスタンパク質10ppmのサバ抽出物への添加回収実験を行うに際しては、同時に0.4～50ppmの検量線作成を行い、検量線から添加回収実験に供したサンプル中のアニサキス濃度を求めた。5回行ったうちの1回の実験で得られた検量線を図2に示すが、検量線として、GainData®を用いて、横軸の抗原濃度、縦軸の吸光度のlog-logスケールの4パラメーター（係数）ロジスティック曲線（4-parameter logistic curve; 4PL）を作成した。

曲線のR2は1.0で、4PL曲線にフィットすることが示された。

なお、この4PL曲線は、 $y = d + \frac{a-d}{1+(x/c)^b}$ a=0.0105, b=1.537, c=18.40, d=0.388

で表される。2-50ppmの範囲で、良好なたちあがりが見られることから、検出限界を2ppmとし、定量限界を5ppmとした。次いで、検量線より求めた添加回収実験の結果を示す。5併行で5回行った添加回収のうち、1回のデータを代表値として表 1に示す。真度102%, 併行精度12, 3%と良好な値であった。加えて、5回行った添加回収に対し、各回の回収率をまとめたものを表 2に示すが、10 ppm濃度の添加回

収実験から、真度は、99～117%、室内精度は、5.69% という良好な値が得られた。

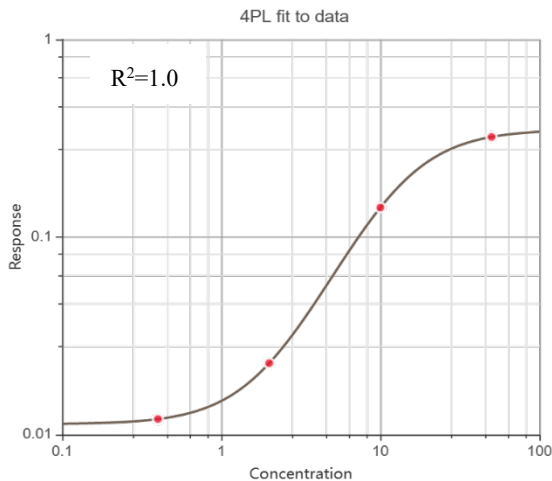


図2 アニサキスタンパク質定量のためのサンドイッチELISA検量線の4PL回帰曲線 (4-parameter logistic c curve)

回帰曲線のR2は1.0で、4PL曲線にフィットすることが示された。なお、この4PL曲線は、 $y = d + \frac{a-d}{1+(x/c)^b}$ (a=0.0105, b=1.537, c=18.40, d=0.388) で表され、2-50ppmで良好な立ち上がりが見られ、検出限界を2ppmとし、定量限界を5ppmとした。

example result of spike and recovery test							SD	RSD(%)
ppm								
Sample 1-1	Sample 1-2	Sample 1-3	Sample 1-4	Sample 1-5	Average			
9.6	10.3	8.4	11.6	11.0	10.2	1.2	12.3	

表1 10ppm アニサキスタンパク質添加回収の5併行試験の一例

真度102%，併行精度(RSD)12,3%と良好な値が得られた。

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

表2 添加回収実験の5回の試験による室内精度の測定

5併行5回行った添加回収に対し、各回の回収率をまとめたものを示すが、真度は、99～117%、室内精度(RSD)は5.69% という良好な値が得られた。

(iii) 背側筋および腹側筋に残存するアニサキスタンパク質の定量

表3に、11個体のサバから採取した背側筋(dorsal)および腹側筋(ventral)を破碎後のPBS抽出液を、サンドイッチELISAで定量した際のアニサキスタンパク質の濃度を示す。いずれのサバも背側筋より腹側筋で多くタンパク質が検出できる結果となった。検出されたタンパク質の量にばらつきは見られるものの、いくつかの腹側筋のサンプルではアニサキスタンパク質が5ppm以上検出されており、分泌排泄されたアニサキスタンパク質が残存している可能性が考えられた。なお、陽性、陰性の判定としては、5ppm以上を陽性、2-5ppmは偽陽性、2ppm未満は陰性と判断した。

(ppm)

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)

表3 11個体のさば由来の背筋部及び腹側筋中のアニサキスタンパク質のサンドイッチELISAによる定量

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。

(結論及び考察)

アニサキスタンパク質に対する抗体を用いて、サンドイッチ ELISA の系を構築し、アニサキスタンパク質 0.4~50ppm で良好な検量線を書かせることができた。この検量線から、検出限界が、10 ng/well (2ppm), 定量限界を 5ppm と判断した(図 1,2)。また、10 ppm 濃度のアニサキスタンパク質のさば抽出物への添加回収実験の妥当性評価の結果から、10 ppm タンパク質濃度の定量が可能であることが示された(表 1,2)。また、アニサキス虫体が確認されたサバ個体からアニサキス虫体を取り除いた後の腹側筋と背側筋についてサンドイッチ ELISA でアニサキスタンパク質の定量を行ったところ、いずれも腹側筋で 5ppm 以上のアニサキスタンパク質が検出されたサンプルがあった(表 3)。なお、目視でアニサキス虫体を除く際に、腹側筋への虫体の移行は観察されたが、背側筋への移行は観察されなかった。このことから、アニサキス虫体を目視で取り除いても分泌排泄された抗原が残存する可能性が示され、本研究で開発したサンドイッチ ELISA の系が分泌排泄されたアニサキスタンパク質の確認に応用できると考えられた。

2) イムノクロマト法の構築

(方法) (i) 標準溶液の調製--標準溶液は、鯖から回収したアニサキス幼虫(検体)

をPBS緩衝液で摩砕し、その抽出液中のタンパク質濃度を測定後、分注し-80℃で保管し使用時に解凍した。(ii) 抗体活性の確認--アニサキス幼虫を免疫抗原に用いて作製したウサギ抗血清を塩析処理後 Hi Trap Protein A HP (Cytiva社製)で精製して2種のポリクローナル抗体(抗アニサキス抗体) Anti 1/pAb及び Anti2/pAbを得た。抗体は、ウェスタン・ブロッティング(WB)で抗原(標準溶液)と結合させて確認し、Anti2/pAbを選択した(図3)。

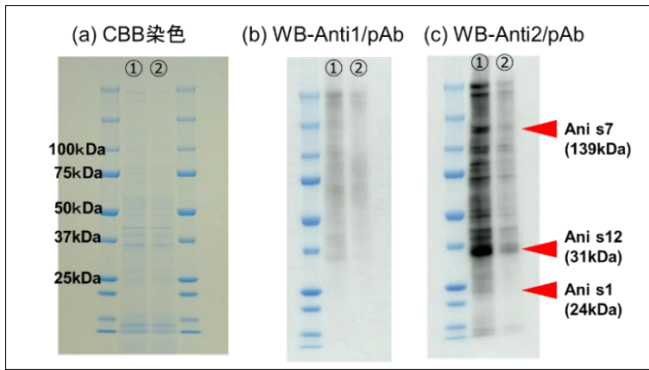
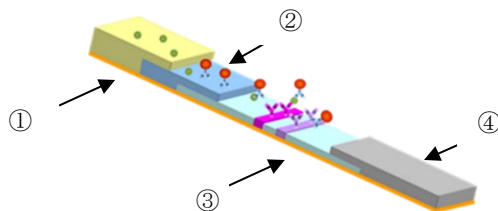


図3. 抗アニサキスタンパク質抗体のウェスタンブロット(WB)による抗原解析

5-20%SDS-PAGEで2種類(①, ②)の標準溶液を泳動した。(a)はCBB染色画像、(b)及び(c)は、PVDF膜転写し、抗体Anti1/pAb またはAnti2/pAbとの反応に続くECL試薬反応後のWB画像である。以後の実験には、(c)のAnti2/pAbを選択した。

(iii) イムノクロマト — 抗アニサキス抗体 (Anti2/pAb) 80 μ gを40nm粒径の金コロイド (BBI社製) 1mLと混合し、静電的な結合により金コロイド標識抗体を調製した。金コロイド標識抗体 (OD530=10 調製・4 μ L/テスト) をグラスファイバー (Merck社製) に浸漬し凍結乾燥を行なうことで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 (Cytiva社製) にコントロールラインとなる抗ウサギ抗体 (Jackson社製 (紫色))、及び、テストラインとなる抗アニサキス抗体 (Anti2/pAb (濃桃色)) を塗布装置 (武蔵エンジニアリング社製) で塗布し一晩乾燥させ固定化した (③)。調製したニトロセルロースメンブレン(③) にコンジュゲートパット(②)、サンプルパット (Cytiva社製) (①)、及び吸収パット (Cytiva社製) (④) をバックングシート (Lohmann社製) に貼り合わせ試作品を作成した (図4)。次いで、シートカッター (富士商工社製) を用いて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。以後の結果は、試作品の結果を示す。

(図4)イムノクロマトの構造



(iv) アニサキス検出限界値の測定法 — 抽出液 (0.1% Tween 20 含有 PBS) 1mL にアニサキス液 (図3 (a)②: サバ寄生アニサキス) を10倍希釈系列で添加し、サンプルパットに100 μ L (1テスト) を滴下し、15分後に目視判定し、10分、20分、30分後に数値化するためにイムノクロマトリーダ (発色吸光度計) で測定した。画像は30分の測定後に撮影した。(v) 魚介サンプルを含むアニサキス検出限界値の測定 — 抽出液6mLにサバ (市販品) 0.3gを添加し、よくほぐし上清液1mLにアニサキス液 (B: サバ寄生アニサキス) を希釈し、100ppm、50ppm、10ppm、5ppmを作製し、サンプルパットに200 μ L (1テスト) を滴下し、15分後に目視判定し、10分、20分、30分後に数値化するためにイムノクロマトリーダで測定した。画像は30分の測定後に撮影した。(vi) サバ腹身、背身中のアニサキスタンパク質の測定: 抽出液6mLにサバ0.3gを添加し、よくほぐし上清液200 μ Lをサンプルパット (1テスト) に滴下し、15分後に目視判定し、10分、20分、30分後に数値化するためにイムノクロマトリーダで測定した。画像は30分の測定後に撮影した。

(結果) (i) アニサキス検出限界値の測定 — 展開開始から10分後では、濃度10 μ g/mL アニサキス液で

検出を確認できた。20分後では、濃度1 μ g/mL、100ng/mL アニサキス液まで検出を確認できた。30分後では、濃度10ng/mL アニサキス液まで検出を確認できた。

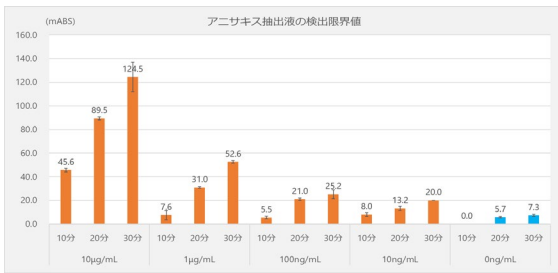


図5-1 イムノクロマトの展開開始10分後、20分後、30分後の測定値

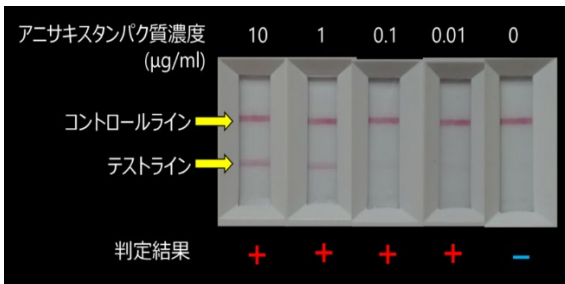


図5-2 イムノクロマト展開画像と判定

展開開始後30分の判定で、アニサキス液10ng/mlの濃度まで検出可能と判断した。

(ii) 魚介サンプルを含むアニサキス検出限界値の測定 -- 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。

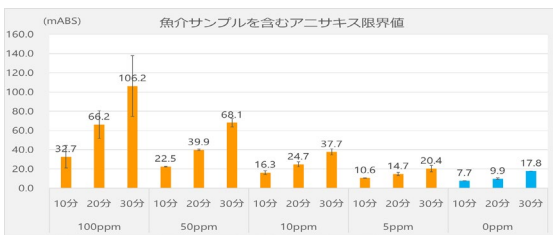


図6-1 イムノクロマトの展開開始10分後、20分後、30分後の測定値

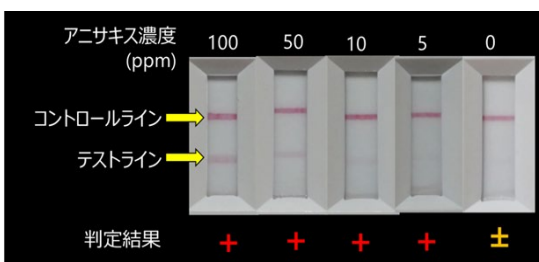


図5-2 イムノクロマト展開画像と判定

展開開始後30分の判定で、アニサキス液5ppmまで検出を確認できた。

(iii) サバ腹身、背身中のアニサキスタンパク質の測定 -- 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。

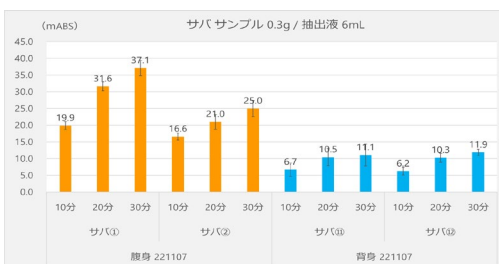


図7-1 サバの腹身、背身のイムノクロマトの展開開始10分後、20分後、30分後の測定値

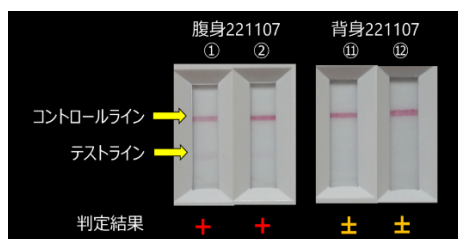


図7-2 サバの腹身、背身のイムノクロマトの展開画像と判定

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、このサバの腹身、背身は、221107のサバから調整したサンプルで1gずつ分注して凍結したもので、ELISAの測定で、腹身が陽性、背身は陰性と測定されたサンプルであるが、同日に調整したサバの由来の腹身、背身から別に5サンプルずつを選び、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、このサバの場合、腹身の部位によるアニサキスタンパク質の濃度差は大きくなく、陽性コントロールとして用いられうると考えられた。

(結論及び考察)

アニサキスタンパク質に対する抗体(Anti2/pAb)を用いて、イムノクロマトの系を構築し、展開後、30分後に10ng/mL (1ng/1テスト) アニサキスタンパク質まで検出を確認できた。次いで、各種濃度のアニサキスタンパク質を添加したサバ抽出物のイムノクロマトでの解析結果から、展開後20分後に10ppmまで、30分後には5ppmまで確認することができ、ELISAと同程度の検出感度をもつことが確認された。サバの腹身、背身中のアニサキスの検出では、合計7サンプルの腹身及び背身のイムノクロマトを行ったが、腹身でのみ陽性の結果が得られた。今後、サンプル数を増やして測定を行う必要があり、偽陽性を避けて特異度をあげるための検討が必要であるが、筋肉内に分泌排泄されたアニサキスタンパク質の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。

3) ウェスタンブロット法の構築

(方法) (i)抗体 - 抗アニサキス抗体(Anti2/pAb)または、抗Ani s7抗体 (Ani s7の内部配列 ($^{435}\text{Met}-^{713}\text{Arg}$) の大腸菌組み換えタンパク質(t-Anis 7)を抗原としてウサギに免疫して作成した抗体(Ani s7-Ab))を用いた。(ii)ウェスタンブロット-12% SDS-PAGE用ゲルの各wellに、0.1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製したアニサキスタンパク質を各wellあたり10 μl 付与後泳動し、PVDF膜に転写後、上記2種の抗体(Anti2/pAb または Ani s7-Ab)を反応させ、各抗体の感度(検出限界)をもとめた。次いで、サバの抽出液に種々の濃度のアニサキスタンパク質を添加したサンプルを調製し、マトリックス存在下での検出限界をもとめた。次いで、アニサキス陽性のサバ復身について、抽出液中のアニサキスタンパク質がWBで検出が可能かどうかの確認を行った。

(結果) (i)図8に示すように、緩衝液で希釈したアニサキスタンパク質と、抗Ani s7抗体(Ani s7-Ab)とのウェスタンブロットの結果から、Ani s7抗体が、139kDaタンパク質とその2量体と考えられる280kDa付近のタンパク質と反応する結果が得られた。また、アニサキス全タンパク質に対する抗体(Anti2/pAb)は、Ani s7と思われる分子量100万を超える高分子量タンパク質から分子量1万程度の低分子量タンパク質まで、広範囲のタンパク質に結合することが確認された。

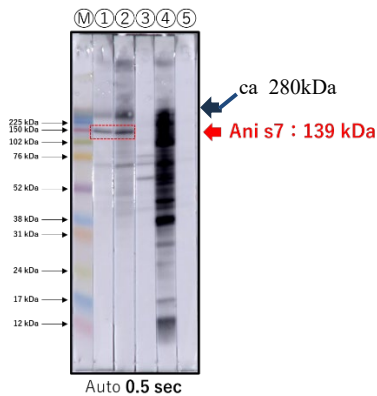


図8 抗Ani s 7抗体及び抗アニサキスタンパク質抗体 (Anti2/pAb)とアニサキスタンパク質との反応のWBによる解析

抗原：アニサキスタンパク質 10 μ g/well

SDS-PAGE gel: 12% precast gel (Bio-Rad)

- 第一抗体: ① Ani s7 -Ab (500 dil)
 ② Ani s7- Ab (100 dil)
 ③ normal rabbit serum (100 dil)
 ④ anti2/pAb (2000 dil)
 ⑤ normal rabbit serum (2000 dil)

第二抗体:HRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (2000 dil)

検出試薬 : ECL Prime Western Blotting Detection Reagent

次いで、アニサキスタンパク質を緩衝液で段階的に希釈して Anti2/pAb と Ani s7-Ab との反応の検出限界を調べたが、Anti2/pAb では、1ng/well、Ani s7-Ab で 10ng/well という結果が得られた。次いで、さば抽出液で希釈して、ウェスタンブロットを行った結果、139kDa 及び、280kDa 付近のバンドが、他のさば抗原に影響をうけにくく、アニサキスタンパク質として検出できることが確認できた。抗体としては、Anti2/pAb 抗体がより鮮明にバンドの確認ができることから、Anti2/pAb 抗体による WB 画像から、139kDa 及び 280kDa 付近のバンドの発光の強度を詳しく解析することとした。その結果を図 9 にしめす。139kDa, 280kDa のバンドと 100ng, 10ng, 1ng の抗原との反応は、用量依存的な減少がみられた。なお、1ng の抗原との反応は、139kDa のバンドでは、マイナスサンプルとの差が微妙であるが、280kDa のバンドでは、マイナスサンプルとの差がみられることから、検出限界は、1ng と考えた。また、この実験で、電気泳動に 1 well にあたり 100ng, 10ng, 1ng の抗原を用いたが、この抗原濃度を、抗原のマトリックス重量あたりに換算すると、200ppm, 20ppm, 2ppm となり、検出限界は、2ppm と考えられた。

(結論と考察)

魚筋肉中に分泌排泄されたアニサキスタンパク質の残存の確認を行う方法としてのウェスタンブロット法の構築を行った。Ani s 7 の抗体が認識する 139kDa, 280kDa のタンパク質に着目して、抗アニサキスタンパク質抗体 (Anti2/pAb) を用いて、マトリックス存在下の 139kDa, 280kDa の検出感度を求めたところ、1 ng/well でマイナスサンプルとの差がえられたことより、検出限界は 1ng と考えられた。この検出限界のタンパク質量は、マトリックスあたりに換算すると 2ppm となるため、検出限界が 2ppm となり、ELISA の検出限界 5ppm に匹敵することから、今回開発した WB 法は、ELISA で陽性となったサンプルの確認試験として十分用いることのできる方法と思われた。なお、実際の食中毒事例での検体に関しても、保健所への医師からの症例報告があった際に、事業者から提出された冷凍された検査用保存食について、本研究で開発した方法でのアニサキスタンパク質の確認が可能と思われる。

研究全体の成果、考察及び結論

本分担研究では、サバ切り身にアニサキス虫体が存在していたかを確認する測定法として、アニサキスタンパク質に対する抗体を用いて 3 種の方法 ((i)ELISA 法、(ii)イムノクロマト法、及び(iii)ウェスタンブロット法) について検討を行った。(i)ELISA 法については、サンイッチ ELISA 法を構築し、サ

バ抽出液をマトリックスとして定量限界 5ppm、検出限界 2ppm の結果を得、10ppm のアニサキスタンパク質の添加回収実験においても真度、併行精度ともに良好であることが確認された。実サンプルへの適用として、アニサキス虫体の検出された 11 個体由来の腹側筋と背側筋についてアニサキスタンパク質の定量を行ったところ、腹側筋 9 検体で、5ppm 以上のアニサキスタンパク質が検出できた。以上から、本研究で開発したサンドイッチ ELISA 法は、サバ筋肉内の 5ppm 以上の分泌排泄されたアニサキスタンパク質の確認に応用できる方法であると考えられた。2) イムノクロマト法では、アニサキスタンパク質抗体 (Anti2/pAb) を用いて、マトリックス存在下においても 5ppm まで検出可能なイムノクロマト法を構築することができた。実サンプルへの応用においても、アニサキス虫体含有すると考えられる 7 検体について陽性と判断され、アニサキス虫体マイナスの検体では陰性と判断されたため、本研究で開発したイムノクロマト法は、ELISA 法の代用として現場での使用の可能な簡便なアニサキスタンパク質検出法と考えられた。(iii) ウェスタンブロット (WB) 法では、アニサキスタンパク質抗体 (Anti2/pAb) を用いて、139kDa、280kDa タンパク質のマトリックスタンパク質存在下での WB での検出限界をもとめたところ、1 ng となった。この検出限界は、マトリックスあたりに換算すると 2ppm となるため、検出限界が 2ppm となり、ELISA の検出限界 5ppm に匹敵することから、今回開発した WB 法は、ELISA で陽性となったサンプルの確認試験として十分用いることのできる方法と思われた。

以上、筋肉内に分泌排泄されたアニサキスタンパク質に対する測定法の開発に関する研究は、ほぼ当初からの計画通りに行われ、サンドイッチ ELISA 法の構築、イムノクロマトの構築、ウェスタンブロット法の 3 種の測定法の構築を行った。サンドイッチ ELISA 法の定量限界は、5ppm と判断され、イムノクロマト、ウェスタンブロットにおいてもほぼ同程度の検出感度が得られた。さばの筋肉を用いる実サンプルを用いた試験においても、3 種の試験法ともに良好な結果が得られた。今後、実サンプル測定に用いる筋肉内の抗原の不均一な分布を考えて、抽出に用いる筋肉量の検討、バックグラウンドの低減化による偽陽性率の低減など再現性 (精度) の向上などの課題はあるが、定量可能な ELISA 法の構築、ELISA 法の予備試験として用いることのできる簡易なイムノクロマト法の構築、ELISA 法の確認試験としても用いることのできる WB 法の構築を行うことができた。

4. 研究全体の成果、考察及び結論

本研究では、食中毒事例が急増しているアニサキス食中毒のリスクを低減させるための研究調査を行った。

まず最初に、養殖サバにおけるアニサキスの寄生状況を調査した。その結果、人工種苗を用いた完全養殖サバの筋肉からは検出されなかった。天然種苗を用いた蓄養では、僅かながらアニサキスが筋肉から検出されたが、天然サバのアニサキス寄生状況と比較すると、寄生量は大きく減少していることから、蓄養でも一定のリスク低減効果を有することを確認できた。ただし、完全養殖と異なり、環境の変化によっては、リスク低減効果が減少する可能性があるため、継続してモニタリングする必要があると考えられた。

次に腹身を除去する事によるアニサキス食中毒のリスク低減効果を検討した。その結果、アニサキスは、特に腹部筋肉 (腹壁の筋肉) を好んで寄生することが明らかとなった。従って、腹身部分を除去すれば、アニサキス食中毒の危険性は激減すると考えられた。

次に、アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量について検討した。その結果、脂肪量と筋肉の比重が反比例することを利用し、サバの筋肉の比重を測定したところ、比重が一定以下の検体ではアニサキス寄生量が増加することが明らかになった。現時点では、筋肉の比重を非破壊的に測定する安価な

方法がないが、測定方法を改良すれば筋肉比重は重度寄生検体の指標として利用できる可能性が示唆された。

次に、アニサキス食中毒が発生した際の原因食材同定法として、筋肉内に分泌排泄されたアニサキスタンパク質に対するELISA法、ウエスタンブロット法、イムノクロマト法の開発を試みた。その結果、高感度な検査法の開発に成功し、アニサキス虫体を除去した魚筋肉から、アニサキスの残存タンパクを検出できた。特に、イムノクロマト法は使用方法が簡易であるため、食中毒が発生した際に食中毒残品からアニサキスの残存タンパクを検出し、原因食材の同定法として有用であると考えられた。

最後に、食品健康影響評価技術研究（課題番号：1909）に引き続き、日本海のサバにおける汚染状況を調査した。その結果、日本海のサバにおけるアニサキス汚染、特にASの汚染が、太平洋側のサバと同程度になるまで進んでいる現状が明らかになった。

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、自治体や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) アニサキス食中毒リスク低減法の有効性の評価	5	養殖および腹身除去によるリスク低減効果を確認することができた。当初の目標を十分に達成することができた。
(2) 汚染実態調査	4	日本海のサバの汚染状況を継続して行い、汚染が進んでいる現状を明らかにすることができた。脂肪量については測定方法の改良が必要であると考えられた。
(3) アニサキス食中毒原因食材同定法の確立	5	アニサキスの残存タンパクを検出できる高感度な検出系、特に簡易なイムノクロマト法を確立することができた。当初の目標を十分に達成することができた。

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	概ね当初の目標を達成することができた。
(2) 研究成果の有用性	5	本研究で得られた成果は、いずれもアニサキス食中毒のリスク低減に有用であると考えられる。
総合コメント 概ね当初の予定通りに研究を進めることができた。また、得られた研究成果はいずれもアニサキス食中毒を考える上で有用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。

(別添1)

研究成果の概要 (和文)

養殖サバにおけるアニサキスの寄生状況を調査したところ、人工種苗を用いた完全養殖サバの筋肉からアニサキスは検出されなかった。天然種苗を用いた蓄養では、僅かながらアニサキスが筋肉から検出されたが、天然サバのアニサキス寄生状況と比較すると、寄生量は大きく減少していることから、蓄養でも一定のリスク低減効果を有することを確認できた。

腹身除去によるアニサキス食中毒のリスク低減効果を検討したところ、アニサキスは、特に腹部筋肉に好んで寄生することが明らかとなった。従って、腹身部分を除去すれば、アニサキス食中毒の危険性は激減すると考えられた。

日本海のサバにおける汚染状況を調査した。その結果、日本海のサバにおけるアニサキス汚染、特に *A. simplex sensu stricto* の汚染が、太平洋側のサバと同程度になるまで進んでいる現状が明らかになった。

アニサキス汚染の指標としての魚脂肪量について検討した。その結果、脂肪量と反比例する筋肉比重が一定以下の検体ではアニサキス寄生量が増加することが明らかになった。

アニサキス食中毒が発生した際の原因食材同定法として、アニサキス虫体を除去した魚筋肉から、分泌排泄されたアニサキスの残存タンパクを検出できる方法を開発した。原因食材の同定法として有用であると考えられた。

以上、本研究で得られた成果は、アニサキス食中毒のリスク評価に大きく貢献するものであると思われる。

(別添2)

研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Study on risk reduction methods of <i>Anisakis</i> Food-borne disease.
Research project number	JPCAFSC20222204
Research period	FY 2022 – 2023
Name of principal research investigator (PI)	Takahiro Ohnishi

Abstract/Summary

The number of food-borne disease caused by *Anisakis* rapidly increases in Japan. In this study, we evaluated the effects of cultivation of mackerel and removal of the belly meat of mackerel on the prevention of *Anisakis* food-borne disease. We also investigated the prevalence of *Anisakis* larvae in mackerel and the relationship between the amount of fat in mackerel meat and the abundance of *Anisakis* larvae. Finally, we established the high-sensitive detection methods of *Anisakis* derived proteins in mackerel meat.

日本ではアニサキスによる食中毒が急増している。本研究では、サバの養殖とサバ腹身の除去がアニサキス食中毒の予防に及ぼす影響を評価した。また、サバにおけるアニサキスの寄生状況および、サバ筋肉の脂肪量とアニサキス寄生量との関係について調査した。最後に、サバ筋肉中のアニサキス由来タンパクを検出する高感度検出法を確立した。

This report provides outcome of the captioned research programme funded by Food Safety Commission Japan (FSCJ). This is not a formal publication of FSCJ and is neither for sale nor for use in conjunction with commercial purpose. All rights are reserved by FSCJ. The view expressed in this report does not imply any opinion on the part of FSCJ.

1. List of papers published on the basis of this research
2. List of presentations based on this research
3. The number and summary of patents and patent applications
4. Others (awards, press releases, software and database construction)