

アニサキス幼虫の食品衛生学的研究I

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	大石, 圭一 岡R[-38]C重美, 平沖, 道治
巻/号	37巻3号
掲載ページ	p. 186-191
発行年月	1971年3月

アニサキス幼虫の食品衛生学的研究—I.

アニサキス幼虫の分離検出法*

大石圭一・岡 重美・平沖道治

(1970年9月5日受理)

Food Hygienic Studies on Anisakis Larva—I.
Numerical Detective Method of the Larvae in the
Muscle and Viscera of Sea-animals

Keiichi OISHI, Shigemi OKA, and Michiharu HIRAOKI**

Anisakiasis in man is caused by the penetration of Anisakis worms into the walls of gastro-intestinal tracts. These Anisakis worms are parasitic in the muscle and viscera of sea-fish. The disease may become prevalent among people who often take these fish as raw steak or through other forms of raw dishes. For prevention against the disease, it is necessary to kill the worms or avoid eating raw fish.

In this investigation, four numerical detective methods of Anisakis larvae were tested from the view point of prevention against the disease. Since it is presumed that Anisakiasis can be prevented only by the avoidance of taking raw fish that carries these parasitic worms seven kinds of sea-animals, i. e. mackerel, jack-mackerel, flatfish, squid, prawn, short-necked clams and surf-clams were used as test animals. The following test methods were applied, i. e., 1) glass pressure method, 2) preservation at fixed temperatures (autolysis including putrefactive decomposition), 3) enzymatic digestion by using some commercial preparations on the market, 4) digestion by bacterial protease secreted for 5 to 6 days at 37°C.

The results investigated are summarized as follows: The worms were easily detected by the glass pressure method in the case of ordinary muscles. When the dark muscle was used, detection of the worms by this method was difficult, it being that the worms were not transparent and not reflective under sun light. For the viscera, especially the digestive tracts, the same difficulty was found by this method. Autolysis including bacterial decay was preferable for the estimation of worms from the viscera. Both enzymatic digestions by commercial preparations on the market and bacterial decomposition were not useful for worm detection in the sample meats used.

さきに大石ら¹⁾はアニサキス幼虫の食品衛生学的研究について、その研究の志向すべきところを述べた。またアニサキス症の病理については RUITENBERG²⁾による詳細な記載がある。これらによれば、アニサキス症の主因はアニサキス幼虫の寄生する魚肉の生食によることを指摘している。わが国における“さしみ”，“すし”，その他による魚介類の生食頻度はきわめて高く、したがって、アニサキス症発症の可能性も少なくない、と考えざるを得ない。

魚介類におけるアニサキス幼虫の寄生分布状況については、かなりの数の報告がなされている³⁻⁸⁾。しか

* 昭和44年11月、日本水産学会北海道支部大会(余市)にて講演発表。

** 北大水産学部食品化学研究室(Laboratory of Seafood Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate)

しこれらの報告においては、虫体検出方法は明確でなかつたり、あるいは検出方法も一方法のみに限定されてきて、いまだ分離・検出方法の比較検討は行なわれていないようである。

本報では、1) ガラス板圧平法^{8,9,10)}、2) 定温放置法(自己消化法)、3) 酵素処理法¹¹⁻¹³⁾、4) プロテアーゼ産生菌による消化法の4法について、アニサキス幼虫の分離・検出法の特徴を比較検討した。

実験方法

供試材料 1969年4月から翌年3月までに函館の魚市場で購入したサバ、アジ、カレイ、スルメイカ、エビ、アサリおよびホッキの筋肉、内臓、あるいは両者を供試した。

ガラス板圧平法 5~20gの筋肉あるいは内臓を2枚のガラス板(各25×25×0.75cm)の中央部にはさみ、両手でほぼ均等な力を加えながら圧平し、透過光線および反射光線によつて、筋肉と虫体の識別が肉眼的に可能かどうかを検討した。なお実施にあたり、あらかじめ分離・飼育していたアニサキス幼虫を試料魚肉に加えて検査を行なつた。

定温放置法(自己消化法) 筋肉5~20g、あるいは1魚体の全内臓(約20g以下)を17×30cmのビニール袋に入れ、これに試料重量に対し3倍量の蒸留水を加え、ゴム輪で閉じたのち37°Cと45°Cとに放置し、消化の程度を肉眼的に12、24、48時間目ごとに観察するとともに、48時間目に16メッシュの大きさの標準篩を通し、篩上の試料の消化残渣が1隻の幼虫より大きいか、小さいかによつて幼虫の検出・分離方法としての適、不適の判定を行なつた。

酵素処理法 使用酵素製剤はつぎの市販品である; ペプシン(1:10,000, BBL)、プロテアーゼ(東京化成)、ビوبرラーゼ SP-4(20,000単位, 長瀬産業)、ビوبرラーゼ F(8,000単位, 長瀬産業)。

17×30cmのビニール袋に魚介肉試料10gを入れ、5倍量のTable 2に示した濃度の酵素液(ペプシンはN/10-HClに、他はpH 7.0のリン酸緩衝液に溶かした)を加え50°Cの恒温器中に1/3, 1, 2, 3, 24時間放置したものを16メッシュの標準篩にかけ、消化・分解の程度を検査した。また、同条件下でアニサキス幼虫の消化および破壊についても調べた。

プロテアーゼ産生菌による処理法 使用菌株は東大応微研より分譲された *Bacillus subtilis* 1033, *B. subtilis* 1207, *B. circulans* 1165, ならびに北大農学部より分与された *B. subtilis* 1035 の4株である。これら各菌株のトリプトケース・ソイ・ブイヨン37°C, 2日培養液を、滅菌シャーレ中の試料魚介肉5~10gにその5倍量の割に注加し、これを37°Cの恒温器中に5~6日間放置したのち、試料筋肉の消化の程度を観察した。なお培養液中に虫体を加え、虫体の消化および破壊程度についても検査を行なつた。

結果と考察

ガラス板圧平法 実験結果をTable 1に示した。これによると試料魚介肉内の寄生アニサキス幼虫の検出に、この方法の応用が可能であることがわかる。

しかし、サバ血合肉は1.5~2.0mmに圧平されても透過光線を通さない。また反射光線によつても虫体と筋肉との識別が困難である。それ故、この方法は血合肉に應用できないことが知られた。

定温放置法 結果をTable 2に示した。筋肉では37°Cよりも45°Cに放置した方が消化の早いことはもちろんであるが、両温度とも48時間以上経過しないと幼虫検出は困難である。とくにアサリとスルメイカの筋肉の場合は消化が困難である。しかし内臓の場合は早いものでは12時間、遅いものでも24時間でほとんど液化する。内臓からアニサキス幼虫を検出するにはこの方法が適当である。

酵素処理法 Table 3にみられるように4種のプロテアーゼは魚介類からのアニサキス幼虫の検出に應用できない。酵素処理中、幼虫体の破壊は認められなかつた。

細菌処理法 Table 4によれば、いずれのプロテアーゼ産生菌の培養液で処理しても、魚介肉は3日目まではほとんど消化は認められなかつた。この方法もアニサキス幼虫検出には應用できないと判断される。また幼虫体はこれらの処理によつても影響されない。

Table 1. Numerical determination of Anisakis larvae by the glass pressure method.

Sea-animals used	Sampled position	Thickness of the sample (mm)		Applicability
		before pressed	after pressed	
Mackerel	Ordinary muscle near the head	12	1.5~2.0	applicable
	Ordinary muscle near the tail	9	1.5~2.0	applicable
	Ordinary muscle from the middle part	15	1.5	applicable
	Dark muscle from the middle part	13~15	1.5~2.0	non
Jack-mackerel	Ordinary muscle near the head	13~15	2.0~5.0	applicable
	Ordinary muscle near the tail	12~13	2.0~5.0	applicable
Flatfish	Ordinary muscle near the head	14~15	2.0~2.5	applicable
	Ordinary muscle near the tail	14	2.0~2.5	applicable
Squid	Body muscle	4~5	3.0~4.0	applicable
Prawn	Whole muscle	12~15	2.0~5.0	applicable
Short-necked clams	Muscle and viscera	12~13	1.0~1.5	applicable

Table 2. Numerical determination of Anisakis larvae by the method kept at definite temperature.

Sea-animals used	Sampled position	The degree of applicability*					
		37°C			45°C		
		12	24	48	12	24	48 (hrs)
Mackerel	Ordinary muscle near the head	-	±	+	-	+	‡
	Ordinary muscle near the tail	-	±	+	-	+	‡
	Viscera		+ ~ ‡		+	‡	
Jack-mackerel	Ordinary muscle near the head	-	±	+	-	±	‡
	Ordinary muscle near the tail	-	±	+	±	±	+
	Viscera	+	‡		+	‡	
Flatfish	Ordinary muscle near the head	±	+	‡	±	+	‡
	Ordinary muscle near the tail	±	+	‡	±	+	‡
	Viscera	+	+		+	+	
Squid	Body muscle	-	-	±	-	-	±
	Viscera	±	+		±	‡	
Prawn	Whole muscle	-	±	+	-	+	+
Short-necked clams	Muscle and viscera	-	-	-	-	-	-

* The degree of applicability was shown by the following marks:

‡ completely † more easily + easily ± obscure - impossible

Table 3. Numerical determination of Anisakis larvae by the enzyme digestion method.

Enzyme used	Sea-animals used	The enzyme concentration (%)	The degree of applicability*				
			1/3	1	2	3	24(hrs)
Pepsin	Mackerel	0.0	-	-	-	-	±
		0.1	-	-	-	-	±
		0.3	-	-	-	-	±
		0.5	-	-	-	-	±
	Squid	0.0	-	-	-	-	-
		0.1	-	-	-	-	±
		0.3	-	-	-	-	±
		0.5	-	-	-	-	±
Protease	Mackerel	0.0	-	-	-	-	±
		0.1	-	-	-	-	±
		0.3	-	-	-	-	±
		0.5	-	-	-	-	±
	Squid	0.0	-	-	-	-	-
		0.1	-	-	-	-	±
		0.3	-	-	-	-	±
		0.5	-	-	-	-	±
Biopraser SP-4	Mackerel	0.00	-	-	-	±	±
		0.05	-	-	-	±	±
		0.1	-	-	-	±	±
		0.2	-	-	-	±	±
	Squid	0.00	-	-	-	-	-
		0.05	-	-	-	-	-
		0.1	-	-	-	-	-
		0.2	-	-	-	-	-
Biopraser F	Mackerel	0.00	-	-	-	±	±
		0.05	-	-	-	±	±
		0.1	-	-	-	±	±
		0.2	-	-	-	±	±
	Squid	0.00	-	-	-	-	-
		0.05	-	-	-	-	±
		0.1	-	-	-	-	-
		0.2	-	-	-	-	-

* The degree of applicability was shown by the following marks:

± obscure, - impossible

まとめ ガラス板圧平法は、魚介筋肉に寄生しているアニサキス幼虫の分離・検出に応用することが可能である。しかし血合肉および結締組織の多い部分には不適當である。

定温放置法は内臓寄生アニサキス幼虫の分離に適するが、筋肉より分離するのは困難である。

酵素処理法、細菌処理法ともに筋肉の分解状態から判断して、アニサキス幼虫の検出に適した方法とはい

Table 4. Numerical determination of Anisakis larvae by the bacterial digestion method.

Sea-animals used	Bacteria used	The degree of applicability*					
		1	2	3	4	5	6 days
Mackerel	Control	-	-	- ~ ±	- ~ ±	- ~ ±	
	<i>B. subtilis</i> 1033	-	-	-	±	±	
	<i>B. subtilis</i> 1035	-	-	-	± ~ +	± ~ +	
	<i>B. circulans</i> 1165	-	-	+	+	+	
	<i>B. subtilis</i> 1207	-	-	+	+	+	
Flatfish	Control	-	- ~ ±	+	±	+	⊕
	<i>B. subtilis</i> 1033	-	-	- ~ ±	+	+	+
	<i>B. subtilis</i> 1035	-	± ~ +	+	⊕	⊕	⊕
	<i>B. circulans</i> 1165	-	- ~ ±	+	⊕	⊕	⊕
	<i>B. subtilis</i> 1207	-	-	- ~ ±	±	±	±
Squid	Control	-	-	-	-	- ~ ±	±
	<i>B. subtilis</i> 1033	-	-	- ~ ±	- ~ ±	- ~ ±	±
	<i>B. subtilis</i> 1035	-	-	- ~ ±	- ~ ±	- ~ ±	±
	<i>B. circulans</i> 1165	-	-	-	-	- ~ ±	±
	<i>B. subtilis</i> 1207	-	-	-	-	- ~ ±	±
Prawn	Control	-	-	- ~ ±	± ~ +	+	⊕
	<i>B. subtilis</i> 1033	-	-	-	- ~ ±	+	⊕
	<i>B. subtilis</i> 1035	-	-	-	-	- ~ ±	+
	<i>B. circulans</i> 1165	-	-	- ~ ±	± ~ +	⊕	⊕
	<i>B. subtilis</i> 1207	-	-	-	- ~ ±	+	⊕
Surf-clams	Control	-	-	-	- ~ ±	±	±
	<i>B. subtilis</i> 1033	-	-	-	- ~ ±	±	±
	<i>B. subtilis</i> 1035	-	-	-	- ~ ±	±	±
	<i>B. circulans</i> 1165	-	-	-	-	±	±
	<i>B. subtilis</i> 1207	-	- ~ ±	- ~ ±	- ~ ±	±	±

* The degree of applicability was shown by the following marks:

⊕ more easily, + easily, ± obscure, - impossible

えない。

一般に筋肉材料にはガラス板圧平法、内臓試料には定温放置法が適当である。

要 約

アニサキス幼虫の分離・検出法として筋肉試料にはガラス板圧平法が、また内臓試料には定温放置法がもつとも適当である。

蛋白分解菌を分与された、北大農学部応用菌学講座、および東大応微研第三研究部に、また原稿を校閲された、当学部坂井 稔教授に深甚の謝意を表す。

文 献

- 1) 大石圭一・岡 重美・城所清一： アニサキス幼虫の食品衛生学序説 p. 113, 函館食品科学研究会,

- 函館, (1969).
- 2) E. J. RUITENBERG: Anisakiasis—Pathogenesis, serodiagnosis and prevention— p. 138, Elinkwijk, Utrecht, (1970).
 - 3) 小林昭夫・小山 力・熊田三由・小宮義孝・大島智夫・影井 昇・石井俊雄・町田昌昭: 寄生虫誌, **15**, 348~349 (1966).
 - 4) 影井 昇・大島智夫・小林昭夫・熊田三由・小山 力・小宮義孝・竹村 暘: 同誌, **16**, 427~435 (1967).
 - 5) 大鶴正満・堀田猛雄・初鹿野高好・小柳武久・白木 公・監物 実: 同誌, **16**, 288 (1967).
 - 6) 加藤孝雄・海沼 勝・伊藤勝男・三浦袈裟人: 食品衛生研究, **18**, 784~797 (1968).
 - 7) 阿倍宗明: パンフレット (水産庁調査研究部), 3~11 (1968).
 - 8) 影井 昇: 日本衛生検査技師会雑誌, **16**, 85~102 (1967).
 - 9) 小柳武久: 寄生虫誌, **16**, 470~493 (1967).
 - 10) 奥村利夫: 大阪市医学雑誌, **16**, 465~499 (1967).
 - 11) J. A. STERN, D. CHAKRAVARTI, J. R. UZMAN, and M. N. HESSELHOLT: Bureau of Comm. Fish., U. S. Fish and Wildlife Service, SSRF 255, INPFC Document, No. 180, 1~4 (1961).
 - 12) 大島智夫・影井 昇・木畑美知江: 寄生虫誌, **15**, 161~167 (1966).
 - 13) 長瀬酵素レポート A-2, p. 16 (1969).