

博士学位論文

サバ類に寄生しているアニサキス亜科線虫 幼虫の特性および殺滅条件の検討

平成 28 年度

(2016 年 9 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
応用生命科学専攻

竹内 萌

目次	
第0章 序論	1
0-1. アニサキスによる食中毒	1
0-1-1. アニサキスによる食中毒	1
0-1-2. アニサキス亜科線虫の生活環および分類	1
0-2. 日本におけるアニサキス	2
0-2-1. 日本におけるアニサキスによる食中毒	2
0-2-2. 日本におけるアニサキス属線虫の分布	3
0-3. アニサキスに対するリスク低減	3
0-4. 青森県におけるサバ	5
0-5. 本研究の目的	6
0-6. 本論文の構成	7
第1章 サバ類に寄生しているアニサキス亜科線虫幼虫の寄生状況および特性	8
1-1. 八戸港で水揚げされたサバへのアニサキス亜科線虫の寄生状況	8
1-1-1. 試験方法	8
1-1-2. アニサキス亜科線虫幼虫の寄生状況	9
1-2. 北海道太平洋沖～三陸海岸沖で漁獲されたサバに寄生しているアニサキス種	9
1-3. アニサキス亜科線虫の生死および起病力(活力)	13
1-3-1. アニサキス亜科線虫の生死判定	13
1-3-2. アニサキス亜科線虫の起病力	14
1-4. サバ内臓の成分組成	15
1-4-1. 臓器別の一般成分組成	16
第2章 DSC を用いたアニサキス亜科線虫幼虫の死亡と凍結の関係の検討	18
2-1. はじめに	18
2-2. 示差走査熱量計(DSC)	18
2-3. 零下までの冷却、個体内凍結の有無がアニサキス L3 に与える影響	19

2-4. NaCl 水溶液中での凍結による影響の検討	24
2-5. モデルゲル中での凍結による影響	26
2-6. 魚肉中での冷却、凍結による影響の検討	29
2-7. 冷却、凍結がアニサキス L3 虫体組織に与える影響	31
2-8. 総合討論	31
2-9. 本章のまとめ	34
 第3章 冷凍による魚体内に存在するアニサキス亜科線虫幼虫の死滅条件	35
3-1. はじめに	35
3-2. フィレーおよびセミドレス中での凍結試験	36
3-2-1. 試験方法	36
3-2-2. 試験結果	37
3-3. ラウンドでの凍結試験	39
3-3-1. -20℃ストッカー中での凍結・保管	39
3-3-2. アルコールブラインを用いた凍結	40
3-3-3. エアブラストを用いた凍結	43
3-4. 本章のまとめ	43
 第4章 化学的方法によるアニサキス L3 の殺滅	46
4-1. はじめに	46
4-2. 溶液濃度・種類の差異がアニサキス L3 に与える影響	46
4-3. 各濃度の塩溶液への浸漬時間の差異による影響の検討	47
4-4. 本章のまとめ	49
 第5章 総括	53
 参考文献	56
 附表	62

序論

0-1. アニサキスによる食中毒

0-1-1. アニサキスによる食中毒

アニサキスは世界に広く分布しており、食品衛生的な観点から古くから問題とされてきた。アニサキスは魚類の内臓もしくは身に寄生しているが、アニサキスが寄生している魚類の筋肉を刺身や酢じめといった未調理状態で摂取することで生存している虫体が人の体内に入り、人の胃や腸管などに穿入し、腹痛、嘔吐などを伴う食中毒(アニサキス症)が引き起こされる。アニサキスに対する対策として、諸外国では公的機関がガイドラインを出しており (EFSA, FDA)、アニサキスによる食中毒予防の観点から、生食用のものはある一定の温度で一定期間冷凍することが義務づけられている。アニサキスは最初にオランダで報告され、1968 年にニシンにおいて -20°C 、24 時間以上冷凍することが義務化され、以後アニサキスによる食中毒の発生件数が減少したといわれている。EFSA(欧州食品安全機関)は *A. simplex* 幼虫の殺虫には、魚体中心部の温度において -20°C で少なくとも 24 時間、 -35°C で少なくとも 15 時間、もしくは -15°C で 96 時間の冷凍が効果的であると報告しており(EFSA,2010)、アメリカの FDA(食品医薬品局)では -35°C 以下に急速凍結し、 -35°C で 15 時間の保管、もしくは -35°C 以下まで凍結し、 -20°C 以下で 24 時間保管、あるいは通常の凍結で、 -20°C 以下で 7 日間以上凍結および冷凍保管することを推奨しているが、同時に大きい魚(例として、6 インチ以上の厚さのもの)には適用できないことが指摘されている(FDA,2011)。

0-1-2. アニサキス亜科線虫の生活環および分類

広義の“アニサキス”はアニサキス亜科に属する線虫のことである。線虫は線形動物門に属する動物グループの総称であるが、その中でも寄生性の線虫(parasitic nematode)である(Maki et al 2012)。アニサキス亜科(Anisakinae)の中にはアニサキス属(*Anisakis*)、テラノーバ属(*Terranova*)、コントラシーカム属(*Contracaecum*)などが存在している。

アニサキス亜科線虫の最終宿主は海洋性の哺乳類であるといわれている。最終宿主の糞便とともにアニサキス亜科線虫の卵が海水中に排卵され、卵の中で第 2 期幼虫(L2)まで成長する。その後孵化し、海中に浮遊した L2 を中間宿主の餌となる小型の甲殻類などが捕食し、その体内に寄生する。L2 が寄生しているものをサバが捕食することでその体内に入り、宿主の内臓あるいは筋肉に移行し、被囊して第 3 期幼虫(L3)に成長する。L3 が寄生している魚類を最終宿主が捕食すると、その胃壁に頭部を穿入させ、2 回の脱皮を伴って成虫まで成長する(Adeel et al 2004 ; Sakanari & Mckerrow 1989 ; Ohishi and Hiraoki 1971)。

0-2. 日本におけるアニサキス

0-2-1. 日本におけるアニサキスによる食中毒

刺身や寿司などの海産魚介類の生食文化が古くからある日本では、諸外国よりも多数のアニサキス症が発生している。2012 年 12 月 28 日の食品衛生法施行規則の一部改正により、日本ではアニサキスが食中毒の原因物質の種別として食中毒事件票に追加され、“アニサキスによる食中毒が疑われる場合、24 時間以内に最寄りの保健所に届け出ること”となっている(NIID 2014)。我が国でのアニサキスによる食中毒の発生件数は、氷温輸送・パーシャルフリージングの普及による未調理・半調理品の流通・消費拡大などにより、近年増加傾向にある(Fig.0-1)(厚生労働省食中毒統計；Murata 2003)。大量消費地である関東地方、特に首都部で発生件数が多い傾向がある。

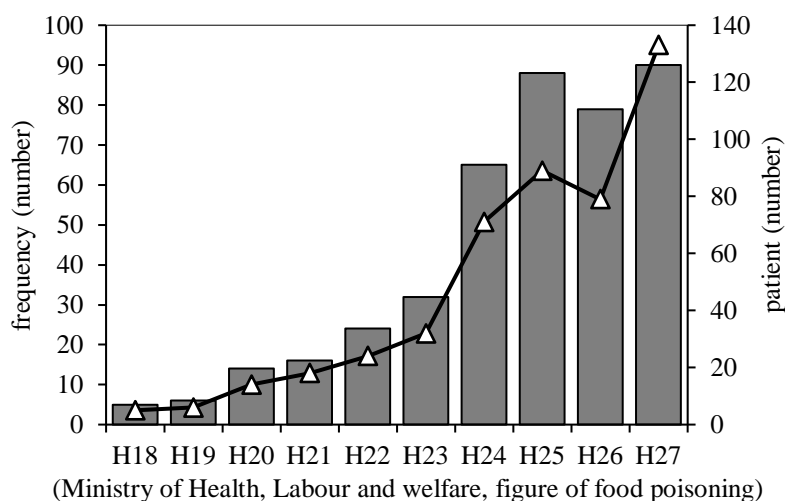


Fig.0-1 Passage of the number of frequency and patient for food poisoning by Anisakid nematode

アニサキスによる食中毒の原因食品にはサバ、イカ、サケなどがあるが、我が国での原因食品はサバが最も多い(厚生労働省食中毒統計, Ohshima 1968)。サバに寄生しているものはほとんどがアニサキス属であるといわれており(Suzuki & Murata 2011)、日本におけるアニサキスによる食中毒は、アニサキス属による報告例がほとんどを占めている。

近年各省庁が寄生虫に関して HP で注意喚起を行っている(厚生労働省、農林水産省、食品安全委員会)。アニサキスに関しては“ -20°C ・24 時間”の冷凍が有効であることが記載されている。しかし、0.3 項で後述するが、その記載だけでは不十分であると考えられる。対象の水産物を冷凍するときの形態(IQF、BQF)によっては、大きさが大きくなることにより該当時間冷却しただけでは幼虫の殺傷に十分な温度まで到達しない可能性があるためである。

0-2-2. 日本におけるアニサキス属線虫の分布

日本で漁獲される魚種に寄生している主なアニサキス亜科線虫 L3 は、次の物が報告されている(Oishi & Hiraoki 1971)。Anisakis I 型幼虫(サバ、カツオ、ニシン、スルメイカなどに寄生)、Anisakis II 型幼虫(カツオなど)、Terranova 幼虫(スケトウダラなど)、Contracaecum 幼虫(ニシン、マアジ、スケトウダラ、マスなど)である。

我が国において、アニサキスによる食中毒の発生原因として最も多いアニサキス属線虫は現在、*A. simplex*、*A. typica*、*A. ziphidarum*、*A. nascettii*、*A. physeteris*、*A. brevispiculata*、*A. paggiae* に分類されており、アニサキス属 L3 は形態学的な特徴により、I 型(*A. simplex*、*A. typica*、*A. ziphidarum*、*A. nascettii* に成長)、II 型(*A. physeteris*、*A. brevispiculata*、*A. paggiae* に成長)に分類されることが多い。また、*A. simplex* は *A. simplex sensu stricto*、*A. pegreffii*、*A. simplex C* の 3 種の姉妹種から成ることが発見されている(Suzuki et al 2011)。また、*A. simplex sensu stricto* と *A. pegreffii* では内臓から筋肉への移行率が異なり、*A. simplex sensu stricto* の方が内臓から筋肉に移行しやすく、アニサキス症の患者から検出される虫体はほぼ *A. simplex sensu stricto* であるといわれている。そのため、*A. simplex* 姉妹種の中でも *A. simplex sensu stricto* の割合が高い海域で漁獲された魚においてよりアニサキスによる食中毒の発生リスクがあると考えられている(Suzuki et al 2011)。

日本において産地の異なるマサバに寄生している *A. simplex* 種の寄生状況が調査されており、青森県から高知での太平洋側では 80%以上が *A. simplex sensu stricto* であるのに対し、日本海で漁獲されたサバでは *A. pegreffii* がほとんどであることが確認されている。また、日本近海で漁獲された水産物へのアニサキスの寄生状況についてこれまでに報告されている。村田らは 1985～2001 年の調査において、青森県で水揚げされたマサバの寄生率は約 97%であったのに対し、“根つきサバ”として知られ、外洋に回遊せず、海産哺乳動物との接触機会が限られている兵庫県産のマサバは約 8%と低かったことを報告している(Murata 2003)。

0-3. アニサキスに対するリスク低減

アニサキス症は、生存しているアニサキス L3 がヒトの消化管に穿入することにより引き起こされるため、アニサキスに対するリスク低減は、幼虫を殺滅もしくは、消化管への穿入能力を失わせることである。殺菌灯の照射や超音波処理は、魚肉に虫体を挟んで行った場合は効果がない(Oishi & Hiraoki 1971)。アニサキスの虫体は熱に弱いいため、アニサキス L3 が寄生している魚体を加熱することは有効である。60℃で処理することで、数秒で死滅させることが可能である(Hochberg & Hamer 2010)。しかし、熱を加えてしまうと

タンパク等の変性が起こり、刺身などの生食用途として適さなくなる。生食用に適用するための非加熱での方策として挙げられるのが冷凍である。

冷凍によるアニサキス L3 に対するリスク低減についてこれまでに国内外で多くの報告がなされてきており、その有効性が確認されている(Deadorff & Throm 1988 ; Gustafson 1953 ; Lanfranchi & Sardella 2010)。

魚体内に寄生しているアニサキスの死滅条件については、過去の報告で魚の中心温度が -15°C 以下になるとアニサキス L3 は生存できないことが示されている(Deadorff & Throm 1988 ; Gustafson 1953)。また、幼虫殺傷にかかる時間は貯蔵温度だけでなくフィレの重さ、厚さと相関することが確認されている(Adams et al 2005)。凍結時の魚体の大きさが大きくなるほど、中心部の温度低下速度は遅くなり、幼虫殺傷に必要な温度まで低下する時間がよりかかる。また、凍結時の使用冷媒により冷却速度が異なり、不凍液(ブライン)を用いた凍結の方が空気中(エアー)を用いた凍結よりも表面熱伝達率が格段に大きいため、凍結が速く終了するといわれている(Watanabe 2009)。実際の魚体に寄生しているアニサキス L3 を死滅させるための条件は、魚体の形態(フィレ、ラウンドなど)、凍結形態(例えば、バラ凍結(Individual quick freezing, IQF)、ブロック凍結(Block quick freezing, BQF))や冷凍機的能力などにより異なり、一概に“何度で何時間処理”という設定は適当でなく、詳細な検討が必要である。

冷凍以外でのアニサキス L3 殺滅方法として、塩や酢漬け、殺虫成分につけるといった化学的方法がある。これまでに様々な検討が行われてきており、食品添加物のうち、厚生労働省から出されている添加基準もしくはそれ以下の濃度で効果があると考えられるものとして、安息香酸ナトリウム、サリチル酸、ソルビン酸カリウム、プロピオン酸カリウムがある (Oishi,2007)。ワサビなどの薬味中にはアニサキスを殺傷しうる成分が含まれているものもあるが、ワサビ、ショウガなどの生の薬味のすりおろしにアニサキス L3 を投入した場合、通常の使用量では濃度が不十分であり、殺傷効果が得られないことが確認されている(Murata 2003)。食酢、醤油などの原液に幼虫を長時間浸漬した場合にはアニサキス幼虫を殺滅することが可能であるが、それらを通常の食品への使用濃度でアニサキス L3 が寄生している魚肉とともに食したとしても効果が期待できない(Oihisi 2007; Iida et al 1987)。マリネ(塩蔵および酢づけ)された魚の場合、アニサキスの致死は塩濃縮により引き起こされると考えられる。飽和食塩水で処理した魚体に、生存しているアニサキス L3 を入れ、最大 24 時間塩蔵した場合、16 時間塩蔵した魚体では生存しているアニサキスが検出されなかったことが報告されている(Lanfranchi & Sardella 2010)。塩蔵の場合、アニサキス虫体の周囲の高塩分濃度により、アニサキス虫体が脱水され、死亡に到ると考えられるが、塩蔵によるアニサキス L3 の死亡原因について、詳細な検討はされてきてい

ない。

0-4. 青森県におけるサバ

サバは青森県八戸市において重要な魚種である。全国でも有数なサバの水揚げ高を誇る青森県八戸港では年間 4～5 千トンのサバが水揚げされており(八戸市水産統計)、八戸市にはサバを加工する業者や提供する飲食店が多く存在する。サバ加工品の一種であるしめ鯖加工製品は八戸市で開発・生産が開始され、生産量は全国約 9 割を占めている(Ishihara 2007)。八戸港はサバが水揚げされる主要港の中でも本州最北に位置し、八戸前沖では秋口の水温が他地域よりも早期に低下するため、八戸前沖で漁獲されるサバは比較的粗脂肪が多いといわれている(Ishihara 2007)。同港で水揚げされたサバの粗脂肪含有率の測定が行われており、食品成分表に記載の値よりも高値で推移していることが確認されている(Takeuchi et.al 2015)。八戸市では同港で水揚げされたサバが“八戸前沖さば”として地域ブランドの素材として着目されており、八戸港に水揚げされるサバの価値や認知度の向上に向けた取り組みが近年盛んにおこなわれてきている。

八戸港では多くのサバの水揚げがあるにも関わらず、水揚げされるサバの 9 割以上がしめ鯖、缶詰といった加工品原料として利用されており、生鮮での流通はほとんどない(農林水産省、水産物流通統計)。その一因として、サバは鮮度低下しやすく、生では長期間保存できないことがある。(Koseki et al 2006; Mochizuki et al 1999)。しかし冷凍することで、サバの死後の鮮度・品質低下を引き起こす生化学的反応を停止させ、長期間保存させることが可能となる。これまでに八戸で水揚げされたサバについて、高品質な冷凍サバを開発するための研究を行ってきた。鮮度が良い(高鮮度)のものをアルコールブラインで急速凍結し、超低温保管し、低温解凍するといった高度冷凍技術で処理することで、生食可能な冷凍サバの供給が可能となることを確認しており(Matsubara et.al 2014)、実用化に向けた検討を行っているところである。

生食に使用できる品質の冷凍サバの製造技術を実用化するに当たり、品質を担保するための規格化は必須である。味や食感、鮮度、外観といった製品の特性に係るものの保持だけでなく、食品衛生的な観点から安全性を担保するための基準、取扱い方法を確立する必要がある。サバの安全性に関わるものとして挙げられるのが、ヒスタミンやアニサキスによる食中毒である。ヒスタミンは魚が本来含有している、アミノ酸の一種であるヒスチジンから、ヒスタミン生成菌が産生するヒスチジン脱炭酸酵素の働きにより生成されるアミンの一種である(Satomi 2010)。ヒスタミンについては、魚の死後速やかに魚を冷却し、また、ヒスタミンは冷凍保管中には生成されないため、速やかに凍結することで、ヒスタミンによる食中毒を防ぐことが可能である。しかし、一方で冷凍によるサバに寄生してい

るアニサキスを殺滅するための条件がはっきりしていない。0.2 項で述べたとおり、北太平洋沖で漁獲されたサバに寄生しているアニサキス属 L3 はより筋肉に移行しやすく食中毒発生リスクの高い種といわれている。そのためサバが主要な水揚げ魚種となっている八戸港において、アニサキス感染を防止するための方策の確立が食品衛生上の観点から急務である。八戸港に水揚げされ流通しているサバのほとんどが遠洋で操業する旋網によるものであるが、その他に、八戸港近海で操業する定置網によっても漁獲されている。しかし、アニサキスの寄生状況について、漁法別には確認されてはいない。また、生食可能な品質の冷凍サバ製品の製造を目指すに当たり、製品に対する安全・安心の観点から、人に危害を与える因子の低減、除去を行うことは必須であり、サバ生食によるアニサキス症発生のリスクを低減するための方策を行う必要がある。

0-5. 本研究の目的

魚の生食文化の世界的な広まり、また、日本におけるアニサキスによる食中毒発生件数の増加から、アニサキスに対する防除方法の確立は急務である。試験を行うに当たり問題となるのが、どのように生死を判断するか、ということである。既報文献の多くにおいて、処理後の虫体を塩化ナトリウム溶液などの液中で一定期間保持した後に刺激を与え、反応をみることで生死を判断している。しかし、文献ごとに虫体の保持温度・期間が一定ではなく、反応の有無の判断基準が曖昧であるため、方法の確立が求められる。そこで、本研究ではアニサキス L3 の生死判断方法の検討を行った。

また、アニサキス虫体自体の耐低温、耐凍性、凍結様式といった、アニサキスと冷凍の関係についてはあまりわかっていない。アニサキス属 L3、テラノーバ属 L3 についてはその凍結への応答が検討されており、周囲の培地が凍結した後、虫体も直ちに凍結することが確認されている (Warton & Aalders 2002 ; Stormo et al 2009)。しかし、これらは培地として少量(≒10 μ L)の塩溶液が加えられたのみである。添加する溶液の濃度・量・水分含量によっては溶液の凍結点が異なり、また、幼虫の周囲にできる氷の量も変わることが予想されるが、これらの影響については検討されていない。アニサキス虫体の冷凍への応答に関しては、また不明確な点が多く残されている。さらに、冷凍以外のアニサキスの化学的殺傷方法として、最も多く使用される方法として塩蔵がある。塩蔵によるアニサキス L3 の殺傷効果は確認されているが、虫体にどのような影響があるのかは明らかにされていない。本研究ではアニサキス L3 を濃度が異なる各種塩溶液に浸漬し、その影響について明らかにすることを目指した。

更に、アニサキスは魚体の凍結により防除することが可能であるが、前述したとおり、魚に寄生しているアニサキスの殺滅条件については魚種や凍結時の手法等により変化する

ることが予想され、各々に設定することが望ましい。

以上のように本研究ではアニサキスの中でも北海道～三陸沖で漁獲されたサバに寄生しているアニサキス属 L3 に着目し、その死亡と冷凍との関係を明らかにすることを目的とした。また、サバに寄生しているアニサキス L3 の殺滅条件の確立を目指し、さらに、冷凍以外の殺傷方法として塩蔵に着目し、各種塩溶液にアニサキス属 L3 を浸漬した時の影響を明らかにすることを目的とした。

0-6. 本論文の構成

本論文は以下の 5 章から構成される。第 1 章では北海道太平洋沖～三陸海岸沖で漁獲されたサバでのアニサキス L3 の寄生状況を調査した。また、アニサキス L3 が寄生している魚体の凍結、アニサキス L3 に対するリスク低減方策を検討するに当たり、生死の判断方法について検討した。

第 2、3 章では冷凍によるアニサキス L3 の死滅への影響を、明らかにすることを目的とした。第 2 章では示差走査熱量計(DSC)を用い、アニサキス L3 死亡への冷却、凍結の影響および、アニサキス L3 の凍結様式について検討した。第 3 章ではアニサキス L3 が寄生しているサバを種々の条件で凍結、冷凍保管し、冷凍による魚体に寄生しているアニサキス L3 の死滅条件についての検討を行った。

第 4 章では冷凍以外の殺滅方法として、アニサキス L3 を化学的手法、とくに塩溶液での処理によるアニサキス L3 への影響の検討を行った。

最終的に第 5 章で本研究の総括を行い、本研究が明らかにした事柄をまとめ、アニサキス L3 と冷凍の関係を明らかにし、今後の展望に繋げた。

第1章 サバ類に寄生しているアニサキス亜科線虫幼虫の寄生状況および特性

サバに寄生しているアニサキス亜科線虫はそのほとんどがアニサキス属(*Anisakis*)の第3期の幼虫(アニサキス属 L3)であるといわれている。アニサキスによる食中毒のリスクを考えるにあたり、アニサキスによる汚染状況を把握しておく必要がある。本章では、青森県八戸港で漁獲されたサバへのアニサキス L3 の寄生状況について調査した結果について述べる。また、アニサキス L3 死滅条件等を考えるにあたってはアニサキス L3 の生死判断基準を確立する必要がある。そこで、アニサキス L3 の生死判断方法についての検討をおこなった。さらに、アニサキス L3 はサバの場合内臓に寄生していることが多いが、アニサキス寄生部位の特性を把握するため、内臓各部位の成分組成の分析を行った。

1-1. 八戸港で水揚げされたサバへのアニサキス亜科線虫の寄生状況

アニサキス亜科線虫の魚体への寄生は、前章で述べたとおり、その餌となる小型甲殻類等によるものである。そのため、餌の給餌状況や漁獲時期等により寄生率が異なる可能性がある。アニサキスの寄生状況は国内外で調査されてきているところであり、アニサキス L3 が寄生している宿主のサイズや漁獲場所がアニサキスの寄生に関係しているという報告がある(Fernandez 2015 ; Karl. et. al, 2011)。八戸港に水揚げされるサバのほとんどは、港から離れた外洋で旋網により漁獲されるものであるが、一部、八戸港近海で、定置網で漁獲されるものも存在する。そこで、漁法別に八戸港に水揚げされたサバへのアニサキスの寄生状況を調査した。

1-1-1. 試験方法

2014 年 6 月、7 月、2015 年 6、7、11 月に青森県八戸市沖で定置網により漁獲されたマサバ(*S. japonicas*)もしくはゴマサバ(*S. austlasicus*)、ならびに 2014 年 6 月に青森県三沢市沖で一本釣りにより漁獲されたものを使用した。定置網、一本釣りで漁獲されたサバは、3%塩水(もしくは海水)に氷を足したもので冷却し、(地独)青森県産業技術センター食品総合研究所まで運搬した。旋網で漁獲されたサバ類は、2015 年 8 月～11 月に大中型旋網漁船で漁獲後に八戸港に水揚げされたものを、冷却なしの状態で運搬した。サバ類の体重を測定後、頭部を除去し、内臓とその他の部分に分離した。また、採取した内臓の重

量を測定し、胃内容物の種類と重量を調査した。

アニサキス亜科線虫虫体はサバ類の内臓もしくは筋肉部位から採取した。内臓については目視による確認によりピンセットで虫体を取り出した。筋肉部位については圧平法により虫体の有無を確認した。サバ類各個体についてアニサキスの寄生数をカウントし、長さ、体重、内臓重量、胃内容物重量との相関を算出した。また、寄生率、平均寄生数、相対寄生数を下記の式により算出した(Takahara 2011)。

Penetration rate (%)

: number of penetrated fish / number of investigated fish \times 100 (Ep.1-1)

Average number of detected L3

: total number of detected L3 / number of penetrated fish (Ep.1-2)

Relative number of detected L3

: total number of detected L3 / number of investigated fish (Ep.1-3)

1-1-2. アニサキス亜科線虫幼虫の寄生状況

本試験で使用したサバの漁獲日、漁獲方法、サバのパラメータ(長さ、体重、内臓重量、胃内容物重量)を附表 1 に、寄生率、サバの各パラメータと寄生数の相関を附表 2 に示した。定置網と旋網において、寄生率に差は見られなかった。使用した全個体での尾叉長もしくは体重との寄生数の関係を Fig.1-1-1 に示す。アニサキス L3 の寄生数が 0~10 隻のサバが多く、尾叉長、体重ともに寄生数との間の相関係数が低かった。

1-2. 北海道太平洋沖～三陸海岸沖で漁獲されたサバに寄生しているアニサキス種

アニサキス亜科線虫は、魚類、イカなどの中間宿主中で膜に覆われた状態(被囊)もしくは覆われていない状態で存在する。被囊している状態のアニサキス亜科線虫幼虫は休止状態のものと考えられている。サバ類から検出したアニサキス L3 は、Fig.1-2-1 のように被囊しているもの、していないものが存在した。被囊していないアニサキス亜科線虫は内臓から検出した際、活発に動いていた。被囊していたものは渦巻き状であり、虫体を覆っている膜を破いて虫体を取り出すと、0.9%NaCl(w/v)溶液中で活発に動きだした。

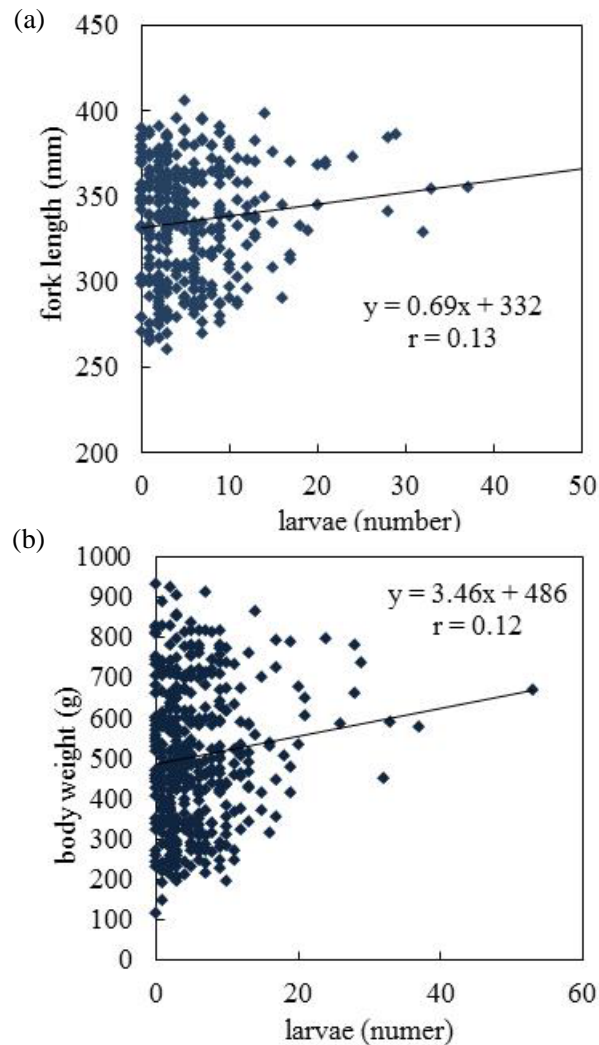


Fig.1-1-1 correlation between number of *Anisakis* L3 and (a) fork length or (b) body weight of Mackerel.

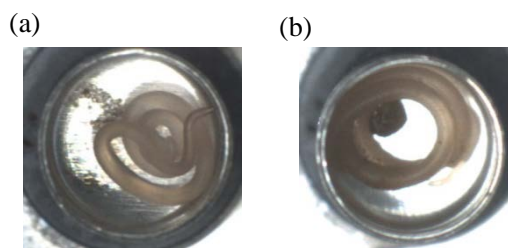


Fig.1-2-1 *Anisakis* L3 collected from viscera of mackerel.
(a)non-capsuled, (b)capsuled

アニサキス亜科線虫の中に属するアニサキス属、テラノーバ属などは、各々において形態学的特徴が異なっており、形態観察により、アニサキス亜科線虫の同定が可能である。アニサキス属は 1-1. 項と同様にサバ内臓からアニサキス虫体を 0.9%NaCl(w/v)水溶液中に取り出し、5℃に保った市販糖添加卵ゲル(雪印メグミルク(株)社製プリン)上(Takahara

2011)もしくは 40%artificial sea water (ASW)(Fuse & Davy 1993a)中で試験に供するまで保管した。検出した虫体を実体顕微鏡(SZX10、OLYMPUS 社)で観察し、既報の形態学的特徴(Koyama 2007 ; Suzuki & Murata 2011 ; Oishi & Hiraoki 1971 ; Sakanari & Mckerrow1989)と比較することにより同定を行った。同じアニサキス亜科に属する線虫であるパシュードテラノーバは盲腸が存在するのに対し、アニサキス属線虫は盲腸が存在せず、シンプルな消化管を有していることが特徴である。また、アニサキス属幼虫は 0.2.1 項で述べたとおり、Anisakis I 型幼虫と II 型幼虫に大別される。Anisakis I 型は体長に比べて胃部が長く、尾部が鈍円形をしており、一つの棘を有しているのに対し、Anisakis II 型の胃部が短く、尾部が先細りの形状をしている。

サバからは 2 種の幼虫が検出された。幼虫①(larva1)は透明であり、頭部(anterior end)および尾部(posterior end)は鈍円形をしていた(Fig.1-2-2)。頭部には穿歯(boring tooth)、尾部には一つの棘(mucron)が見られた。また、胃部は長い円形状をしており、腸部との接合部は斜めであった。この特徴が Anisakis I 型幼虫として報告されている形態的な特徴と類似していたため、Anisakis I 型幼虫であると推定した。一方、幼虫②(larva2)は幼虫①と同様、頭部は鈍円形であり、穿歯がみられたが、体色は褐色がかった色をしており、胃部は幼虫①と比較して短く、腸部との接合部は平らであり、尾部は先細りの形状をしていた(Fig.1-2-3)。これらの特徴から、幼虫②は Anisakis II 型幼虫であると推定した。

さらに、アニサキス属の内腔は Y 字型をしている特徴がある(Koyama 2007)。小南ら(Kominami et.al 2012)の方法に基づきサバから採取したアニサキスの内腔部分の凍結組織切片を作成し、ヘマトキシリン、エオシン染色して観察したところ、Y 字型の内腔が確認された(1-2-4)。

A. simplex (Anisakis I 型幼虫)には *A. simplex sensu stricto*, *A. simplex pegreffii*, *A. simplex C* の 3 種の姉妹種が発見されており、日本近海においては太平洋沿岸では *A. simplex sensu stricto* が、東シナ海から日本海沿岸では *A. simplex pegreffii* が優占種であることが知られている(Suzuki & Murata 2011)。本試験に使用したサバは北海道沿岸から三陸海岸沖の太平洋沿岸で漁獲されたものであるため、分布から判断して幼虫①は *A. simplex sensu stricto* であると推察した。

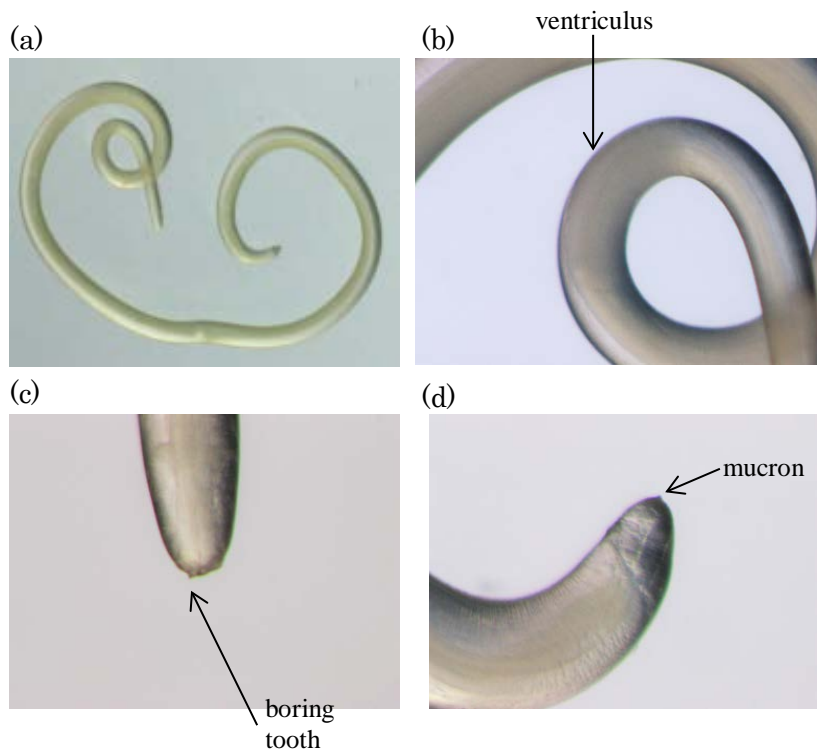


Fig 1-2-2. Example of Anisakidae larva from mackerel (Larva1)
 (a) whole,
 (b) anterior portion,
 (c) anterior end,
 (d) posterior end

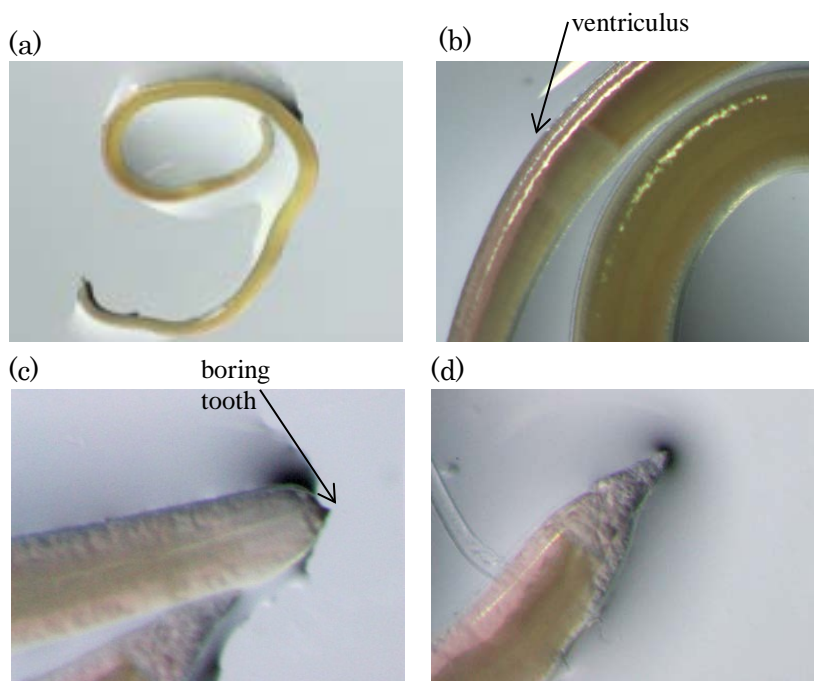


Fig 1-2-3. Example of Anisakidae larva from mackerel (Larva2)
 (a) whole,
 (b) anterior portion,
 (c) anterior end,
 (d) posterior end



Fig 1-2-4. Lumen of Anisakis L3 collected from mackerel.

1-3. アニサキス亜科線虫の生死および起病力(活力)

1-3-1. アニサキス亜科線虫の生死判定

アニサキスのリスク低減方法を模索する際に、どのようにアニサキス亜科線虫の生死を判別するのかにより結果が異なってくる可能性がある。生死判断方法として多く用いられているのが、処理後のアニサキス亜科線虫を 0.9%NaCl 溶液等に浸漬し、常温(例えば 20℃)で数時間放置した後、幼虫に針等で刺激を与え、それに対する反応を見る方法である。アニサキス線虫が死亡した場合、室温で一昼夜経過すれば、自家消化酵素あるいは細菌などの作用により虫体は軟化し、明らかに死亡したと判断される状態になるといわれている(Oishi 2007)。また、*P.decipiens* L3 では、37℃で活発な動きを示すことが報告されている(Storm et al 2009)。サバに多く寄生しているアニサキス属 L3 も同じくアニサキス亜科に属しているため、同様の傾向を示すものと考えられる。サバ内臓から採取し、生存しているアニサキス亜科線虫を 0.9%NaCl(w/v)溶液に浸漬し、35℃恒温機中で 1 晩静置したところ、活発な活動がみられた。一方、凍結などの処理直後にピンセットによる刺激に反応して動いたように見えた虫体であっても、35℃に 1 晩置くと白濁し、明らかに死亡していることが確認された。

生存している幼虫は、メチレンブルーをその体内に取り込むが、死亡したものは取り込まないことが報告されている(A.D.Molina-Garcia & P.D.Sanz 2002)。生存しているアニサキス属 L3、もしくは示差走査熱計(DSC)にて-1℃/min で冷却し、目視において凍結が確認された幼虫について、シャーレ中の 0.1%メチレンブルー - 0.9%NaCl 溶液に浸漬し、35℃で 1 晩時放置したところ、生存している虫体は透明色であるのに対し、処理後のアニサキス L3 は白濁していた(Fig.1-3-1)。

魚体に存在しているアニサキス L3 虫体の検出に、UV が有効であることが知られている(Celano et.al, 2013)。生存しているアニサキス亜科線虫 L3 に UV(312nm)を照射すると蛍光を発色しないが、死亡しているアニサキス亜科線虫 L3 に照射すると蛍光が確認されることが報告されている(A.D.Molina-Garcia & P.D.Sanz, 2002)。これは、細胞内にある自己蛍光物質の一種であるリポフスチンが、線虫の細胞が破壊されることにより細胞外に遊離するためと言われている(CETMAR,2016)。サバ内臓から採取し、生存していたアニサキス L3、もしくは DSC にて冷却、凍結したアニサキス属 L3 に 312nm の UV

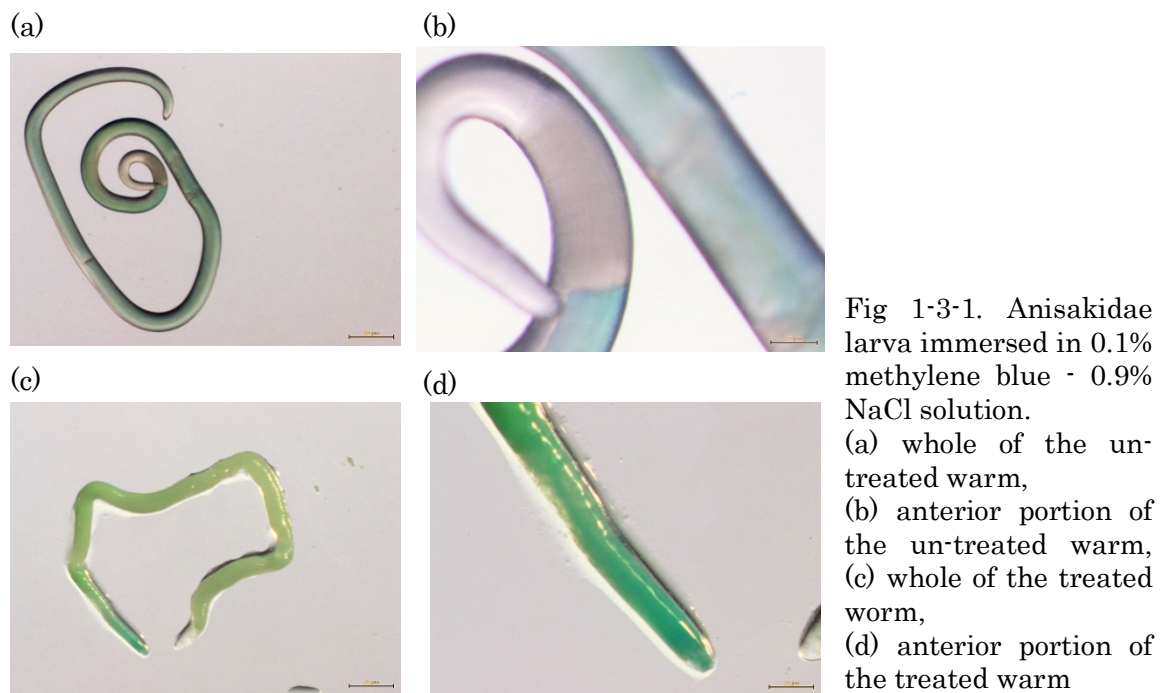


Fig.1-3-2 UV irradiated (312nm) Anisakis L3.
 Left side: Anisakis L3 treated by DSC, Right side: survived

を照射すると、生存していたアニサキス属 L3 は蛍光がみられなかったが、 DSC 処理後のアニサキス L3 には蛍光が確認された(Fig.1-3-2)。

1-3-2. アニサキス亜科線虫の起病力

アニサキス L3 において、食中毒症状の発生要因の一因となるのが、生存しているアニサキス L3 が寄生している魚肉を人が摂取し、虫体が人体に入り、生きたまま腸管まで達したアニサキス L3 が消化管に侵入することによるものである。そのため、アニサキス L3

の起病力は、その虫体がどれほどヒトの消化管に穿入する能力を有しているのかにより表すことができる(Suzuki, 2007)。虫体の起病力の測定方法として、ウサギなどに処理後のアニサキスを経口投与し、その消化管への穿入率を検討する方法がある。しかし、動物を用いた試験では消化管へのアニサキス L3 の穿入数はアニサキス L3 虫体、投与した動物個体によるバラつきが大きく、アニサキス L3 への処理による有意な差を検出するためには、多数の虫体と多数の動物個体が必要となり、実施困難である場合が多い(Oishi 2007)。そこで簡易に *in vitro* でアニサキスの起病力を検討するために考案されたのが、寒天を用いた方法である(寒天侵入試験)(Oishi 1973)。プラスチックチューブ(φ 25mm)に 0.9%NaCl-1%寒天 25ml を作成し、その上に 0.9%NaCl 溶液 10ml を添加した。寒天上にサバ内臓から取り出した、未処理のアニサキス属 L3 虫体を置き、35℃で 2 晩インキュベーション後、寒天の中にアニサキス属 L3 が穿入するかどうか検討した。その結果、寒天柱の中にアニサキス属 L3 が潜入したことが確認された(Fig.1-3-3)。

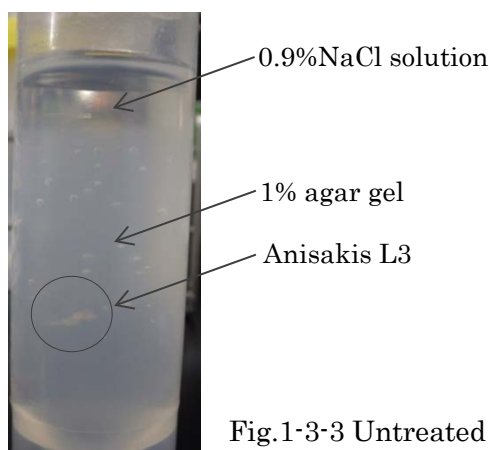


Fig.1-3-3 Untreated Anisakis L3 larva penetrating to 1% agar gel

1-4. サバ内臓の成分組成

サバに寄生しているアニサキス L3 は、そのほとんどが内臓、腸管膜に寄生している。アニサキス L3 は宿主に寄生している際、周囲の宿主組織から栄養を採取していると考えられる。サバに寄生しているアニサキス L3 の存在環境を確認する一助として、サバ内臓の部位ごとの成分組成を分析したので、その結果を述べる。

1-4-1. 臓器別の一般成分組成

2015年11月6日(29尾)、12日(23尾)、17日(28尾)に旋網により漁獲され、八戸港に水揚げされたサバから内臓を採取し、肝臓、幽門水、胃、腸管、内臓脂肪に分けた。胃については胃の内容物を除去した。各部位を23～29尾分まとめてフードプロセッサーでペースト状にし、各部位の一般成分(水分含有率、粗灰分、粗脂肪含有率、粗タンパク質)を常法により測定した。炭水化物は差引により算出した。

サバ内臓の各部位の一般成分組成を、内臓採取日別に Table.1-4-1 に示す。内臓脂肪はその約80%が脂質であり、ほぼ脂質と水分のみで構成されていた。一方、その他の部位に関しては、肝臓が他の臓器と比較して水分含有率が低く、炭水化物割合が多い傾向がみられた。また、肝臓、内臓脂肪以外の部位に関しては、採取日による粗脂肪含有率の差が5%以下とほとんど変化が見られないのに対し、肝臓、内臓脂肪は採取日により10%程度の差がみられた。これは、臓器の中でもサバの栄養状態、生育環境(海水温など)などにより影響を受けやすい部位であるためと考えられる。

Table.1-4-1 General constituents of viscera obtained from mackerel.

(%)	Stomach			Intestine			Pylorus		
	11/6	11/12	11/17	11/6	11/12	11/17	11/6	11/12	11/17
Moisture	69.8	70.3	70.2	71.7	67.2	68.5	60.4	54.6	56.1
Fat	11.3	7.7	8.9	13.9	16.2	14.4	24.2	28.8	27.3
Protein	12.9	16.4	15.9	7.9	14.4	12.9	10.9	13.3	15.5
Carbohydrate	4.1	5.6	3.7	4.4	0.2	2.7	3.3	2.1	tr
Ash	2.0	tr	1.2	2.0	2.0	1.4	1.2	1.3	1.2
Moisture / Fat	6.2	9.1	7.9	5.2	4.1	4.8	2.5	1.9	2.1

(%)	Liver			Visceral fat		
	11/6	11/12	11/17	11/6	11/12	11/17
Moisture	59.9	54.5	34.9	21.7	17.2	13.7
Fat	16.0	28.8	27.4	74.8	81.2	81.7
Protein	11.9	10.7	13.4	1.2	1.3	tr
Carbohydrate	10.6	6.0	23.0	1.8	tr	4.4
Ash	1.6	tr	1.3	0.6	0.3	0.3
Moisture / Fat	3.7	1.9	1.3	0.3	0.2	0.2

第2章 DSC を用いたアニサキス亜科線虫幼虫の死亡と凍結の関係の検討

2-1. はじめに

非加熱で調味なしで魚体中に存在しているアニサキス亜科線虫を殺滅させる方策として用いられるのが冷凍である。アニサキス亜科線虫の凍結と死亡の関係については、アニサキスが寄生している魚体の冷凍後の生存率の検討が種々の魚種で行われてきた (Deadorff & Throm 1988 ; Gustafson 1953 ; Lanfranchi & Sardella 2010)。しかし、アニサキス虫体自体の凍結耐性、凍結様式などについては、あまり明らかにされていない。本章では、示差走査熱量分析を用いて、アニサキス亜科線虫自体と凍結の関係について検討した。

2-2. 示差走査熱量(DSC)

示差走査熱量分析(Differential Scanning Calorimetry, DSC)は熱分析の手法のひとつである。物質が物理的あるいは化学的变化を生ずるときには熱の出入りが伴う。変化の起こらない基準物質とともに試料物質の温度を一定速度で変化させたとき、試料に何も変化が起こらないと、基準物質と試料温度の温度差は一定になるが、試料物質に変化が起こり、熱の出入りが生じると基準物質と試料温度の間の差が変化する。DSC は基準物質と試料物質の間に別にエネルギーを入力できるようにしておき、両者の間の温度を等しくするために必要なエネルギー入力の差を測定している (Shiotubo 1991)。近年 DSC は線虫の凍結挙動を明らかにすることができるものと期待されている。古くは線虫の凍結過程の解析には低温顕微鏡が使用されてきた。同方法は線虫の凍結時の個体内凍結などを観察することが可能であるが、未凍結の水分量などの水の物理状態は明らかにされていなかった (Tanaka et.al 2011)。DSC では、体内での不凍結水分量などの水分の物理的状态を検討することが可能である。

本試験では(株)日立ハイテクサイエンス社製の X-DSC7000 を使用し、アニサキス属 L3 の凍結と死亡の関係について検討した。当該機器は分析システムとして Muse software (for Windows NT)を使用し、冷却ユニット(PS2)、リアルビューシステム(RV-1D)を備えている(Fig.2-2)。DSC 測定にはオープン製の Al 製容器(約 100 μ l)を用い、空の容器をリファレンスに使用した。蒸留水とインジウムで校正し、窒素ガスを 40ml/min で流した。これ

までに行われてきた DSC による線虫の凍結過程の検討では、測定容器は密閉されており、測定中の状態の目視での観察は行われておらず、DSC 信号の挙動で判断されていた (Tanaka et.al 2011; Storm et.al 2009)。しかし、本試験で使用した DSC 装置は顕微カメラを接続することで、測定中の状態が随時観察可能なシステムを装備しており、以前とは異なり DSC 信号の挙動だけでなく、目視による観察を同時に行うことが可能となった。また、以前に使用されていた DSC 測定用の容器の容量は約 $20\mu\text{l}$ と小さく、線虫に溶液や培地などを添加する場合、数滴といった少量のみしか添加することができなかったが、本試験では容量約 $100\mu\text{l}$ のより大きな容器を使用することで、より多量の溶液、培地や魚肉などを添加した試験を行うことが可能となった。

本章では、当装置を用い、始めにアニサキス属 L3 虫体内で凍結が起こる影響について確認した後、0.9%NaCl 溶液、モデルゲル、魚肉中で凍結した影響について検討した。



Fig.2-2 the DSC system used for this study.

2-3. 零下までの冷却、個体内凍結の有無がアニサキス属 L3 に与える影響

凍結は個体の中で起こる個体内凍結と、個体の外で起こる個体外凍結がある。最初に、アニサキス属 L3 の虫体内で凍結が起こること(アニサキス属 L3 の個体内凍結)がアニサキス L3 属の生死に与える影響を、虫体を空気中で冷却、凍結することで検討した。水分を拭き取った虫体 1 隻を測定容器に入れ、 -10°C ($n=8$)、 -15°C ($n=8$)、 -20°C ($n=14$)、 -40°C ($n=10$)まで冷却速度 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却し、凍結の有無と冷却後のアニサキス属 L3 の生死を確認した。生死の判断は、冷却後にただちに室温まで戻した後に 0.9%NaCl 溶液中に移し、

35℃に1晩置いたのち、刺激を与えて反応を見ることで確認した。

個体内の水分の凍結は発熱現象であるため、DSCで冷却時に凍結現象が見られた場合、DSC信号上に発熱を表す上向きのスパイクが出現する物質本来の凍る温度で凍結せずに、そのまま温度が低下していく現象は“過冷却現象(Super cooling)”といわれる。

アニサキス属L3をDSCにて-10℃、-15℃、-20℃まで冷却すると、DSC信号上に変化はみられなかった(Fig.2-3-1)。また、リアルビューを用いて虫体を観察すると、冷却開始時は虫体の動きが確認されるが、温度が低くなるにつれて動きが鈍くなった。しかし、冷却前後の虫体の外観に変化はみられなかった。-10℃、-15℃、-20℃まで冷却後のアニサキス属L3の生死を確認すると、全て生存が確認された。-20℃まで-1℃/minで冷却し、-20℃で60minホールドした場合も同様であった。しかし、-20℃まで冷却したアニサキスL3について1-3-2項に基づき寒天侵入試験を行ったところ、寒天に侵入したものは確認されなかった(n=8)。

一方、-40℃までアニサキス属L3を冷却すると、試料温度は環境温度の低下とともに一定速度で低下したが、過冷却解消により試料温度が上昇したとき、同時にDSC信号(μ W)上にスパイクの立ち上がりが見られ、目視において虫体が白濁して凍結したことが確認された(Fig.2-3-2)。以降、温度上昇とDSC信号の立ち上がりが始めた温度を過冷却解温度(T_{SCP} : Temperature of Super Cooling Point)と定義する。個体内凍結が完了することによるアニサキス幼虫の死亡への影響を検討するため、-0.5℃/min(n=10)もしくは-1℃/min(n=29)にてアニサキス属L3の温度が T_{SCP} よりも1℃低くなる($T_{SCP}-1$)まで冷却後、直ちに室温まで戻して生存を確認した。その結果、全ての個体で死亡が確認された。本試験の結果から、アニサキス属L3は個体内凍結が起こることで死亡することが示唆された。

過冷却の解消は偶発的な臨界半径以上の氷核が形成されることによるものであるが(Watanabe 2009)、冷却速度により過冷却解消温度が異なる可能性がある。そこで、-0.5℃/min(n=25)、-1℃/min(n=22)、-5℃/min(n=10)で冷却し、各冷却速度でのアニサキス属L3の T_{SCP} を算出した(Table.2-3-1)。-0.5℃/min、-1℃/minよりも-5℃/minで有意に T_{SCP} が高くなったが、-0.5℃/min、-1℃/min間には差が見られなかった。急速冷却の方が緩慢冷却よりも虫体からの蒸発による水分減少の程度が少なくなり、より虫体内の水が残存したため、不均質な核生成頻度が上昇した可能性がある。そこで、-1℃/min、-5℃/min

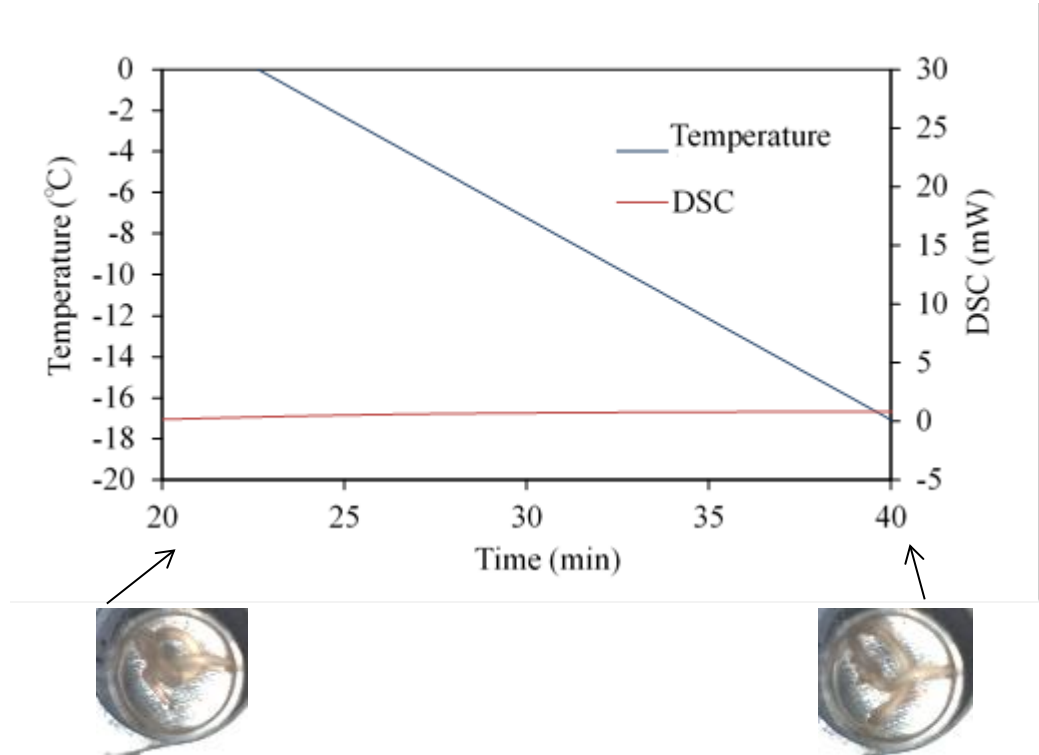


Fig.2-3-1 Differential scanning calorimetry (DSC) trace and temperature trace in *Anisakis* L3 when it was cooled to -20°C.

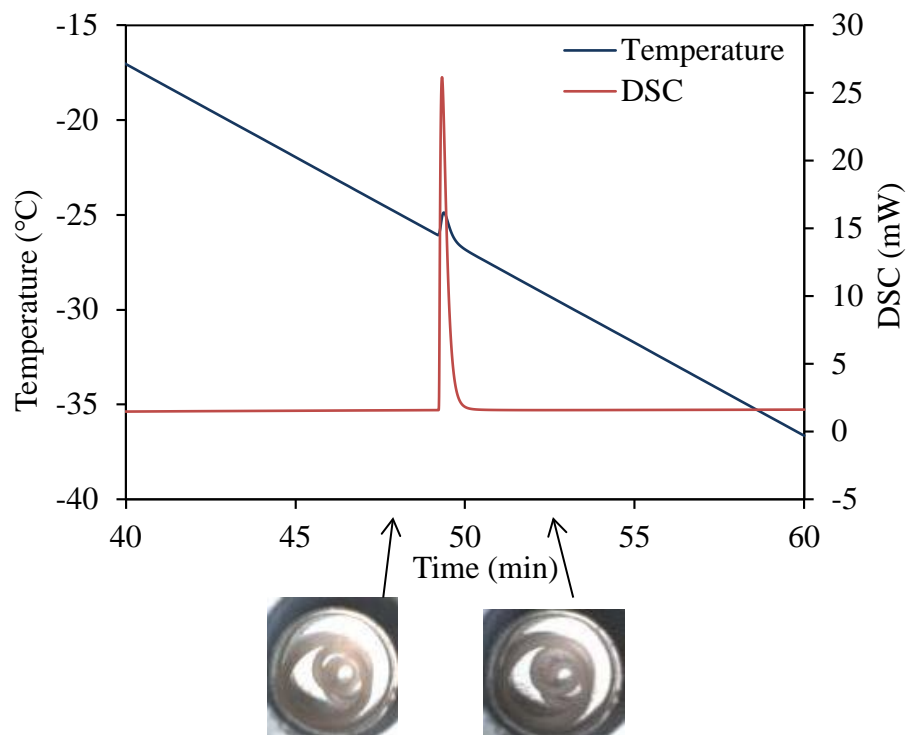


Fig.2-3-2 Differential scanning calorimetry (DSC) trace and temperature trace in *Anisakis* L3 when it was cooled to -40°C.

Table.2-3-1. Weight, T_{SCP} and weight of *Anisakis* L3 larvae at different scan rate.

Scan rate (°C/min)	Weight(mg)	T _{SCP} (°C)
0.5 (n=35)	3.8±1.2	-26.6±4.1 ^a
1 (n=56)	4.8±3.0	-26.0±2.6 ^a
5 (n=15)	4.7±1.1	-18.3±8.7 ^b

Mean ±S.D., Values with a different letter within each column are significantly different (P>0.05)
T_{SCP} is temperature of super cooling point.

で冷却した時の幼虫からの全水分量、水分蒸発量を算出した。算出方法は下記の通りである。DSC 測定後、真空乾燥(VID-21S)後にアニサキス L3 の重量を測定し、下式を基に全水分含量(W_{tot})、冷却による水分蒸発量(W_{ev})を算出した(Ep.2-1、2-2)(n= 5) (Størm et.al, 2009)。全水分量(%)に占める蒸発した水分量(W_{ev} (%water))の割合を比較すると、-5°C/min の方が、水分蒸発量が少なくなることが確認された(Table.2-3-2)。

Total water volume(W_{tot}, mg) : sample weight(mg)－dry weight(mg) …(Ep.2-1)

Water volume of evaporation (W_{ev}, mg)

: sample weight(mg)－weight after DSC measurement(mg) …(Ep.2-2)

Table.2-3-2 Water content of *Anisakis* L3 larvae at different scan rate.

Scan rate (°C/min)	Weight(mg)	W _{tot} (mg)	W _{ev} (mg)	W _{ev} (% water)
1	4.4±0.8	2.6±0.6	1.2±0.7	45.1±23.6 ^a
5	3.8±0.7	2.7±0.5	0.4±0.2	15.9±9.5 ^b

Mean ±S.D., Values with a different letter with in each column are significantly different (P>0.05)

W_{tot} is content of total water

W_{ev} is content of evaporated water

アニサキス属 L3 は中間宿主体内では被囊している状態(シスト状)で発見されることがある(Fig.2-3-3)。そこでアニサキス属 L3 が冷却、凍結される際に囊が保護的役割を果たすかどうか検討した。シスト状の L3 を DSC 中で幼虫の温度が T_{SCP} より 1°C低くなるま

で、 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却し、解凍後の幼虫の生死を検討した。囊がある分幼虫の重量は重くなり、被囊していない幼虫よりも T_{SCP} が高くなった(Tabel.2-3-3)。また、被囊していないものと同様に解凍後全て死亡しており、囊は幼虫の凍結に対してとくに保護的な役割を果たしていないことが確認された。

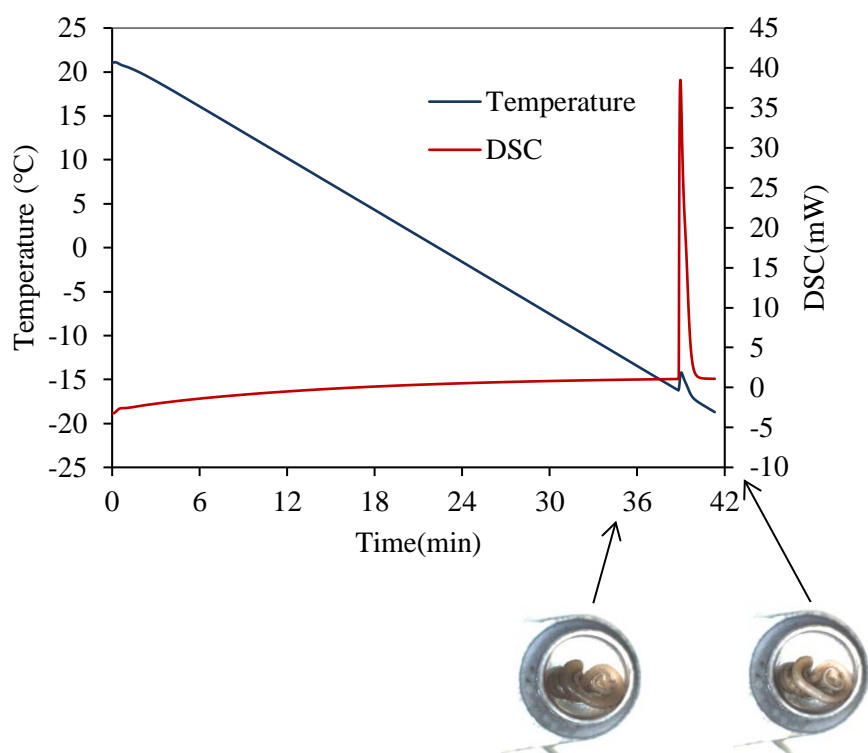


Fig.2-3-3. Differential scanning calorimetry (DSC) trace and temperature trace in cyst of *Anisakis* L3.

Table.2-3-3 Weight, T_{SCP} of cyst or non-cyst of *Anisakis* L3 larvae.

State	Weight(mg)	$T_{\text{SCP}}(^{\circ}\text{C})$
Non-cyst (n=56)	$4.8 \pm 3.0^{\text{a}}$	$-26.0 \pm 2.6^{\text{a}}$
Cyst (n=10)	$7.8 \pm 2.6^{\text{b}}$	$-20.6 \pm 3.3^{\text{b}}$

Mean \pm S.D., Values with a different letter with in each column are significantly different ($P > 0.05$)
 T_{SCP} is temperature of super cooling point.

2-4. NaCl 水溶液中での凍結による影響の検討

アニサキス属 L3 は自然界では宿主の体内に存在するため、2-3 項の条件は本来生息している条件ではない。そこで、0.9%NaCl 水溶液を添加し、周囲に培地を加えたことによる影響について検討した。0.9%NaCl 水溶液を 40 μ l 添加して-1°C/min で冷却し、T_{SCP}を算出すると(n=22)、空気中で冷却したもの(n=43)よりも有意に高くなった(Table.2-4-1)。過冷却溶液中で臨界半径以上の氷核が形成されるとそれを中心として氷結晶が形成する。臨界半径以上の氷核が形成するかどうかは偶然によるものであるが、NaCl 溶液を加えたことで全体の容量と水分子の量が多くなり、臨界半径以上の大きさの氷核が形成される確率が高まったと考えられる。

Table.2-4-1. Weight and T_{SCP} of *Anisakis* L3 larvae not-added and added 0.9 %NaCl solution.

	Weight (mg)	T _{scp} (°C)
Not-add	4.9 \pm 3.3	-25.9 \pm 2.8 ^a
Added	4.4 \pm 0.7	-14.1 \pm 3.1 ^b

Mean \pm S.D., Values with a different letter with in each column are significantly different (P>0.05)

T_{SCP} is super cooling point

0.9%NaCl 溶液のみを 40 μ l DSC にて 1°C/min で-40°Cまで冷却した場合、過冷却解消後に幅が広いピークが立ち上がり、-40°C辺りに溶液が共晶したことによるピークがみられた(Fig.2-4-1a)。0.9%NaCl 水溶液にアニサキス属 L3 を浸漬して DSC に供したところ、溶液のみ冷却した時と同様のトレースが見られ(Fig.2-4-1b)、凍結による発熱スパイクが見られてから溶液が共晶するまで発熱スパイクが観察されなかった。また、冷却中の状態を目視で観察すると、溶液の凍結後直ちに幼虫も凍結した。このことから、アニサキス属 L3 は培地に対する過冷却能力を有しておらず、培地の凍結から逃れる能力を有していないことが示唆された。また、-1°C/min で DSC 信号上の発熱スパイクの終点(目視での確認で凍結の完了が確認された点)まで冷却して生死を判断したところ、生存している個体は確認されなかった(n=22)。これは被囊した幼虫でも同様の結果が得られた。NaCl 溶液が凍結後ただちに幼虫が凍結し、溶液中の幼虫の凍結が完了すると死亡したことから、宿主の組織を凍結

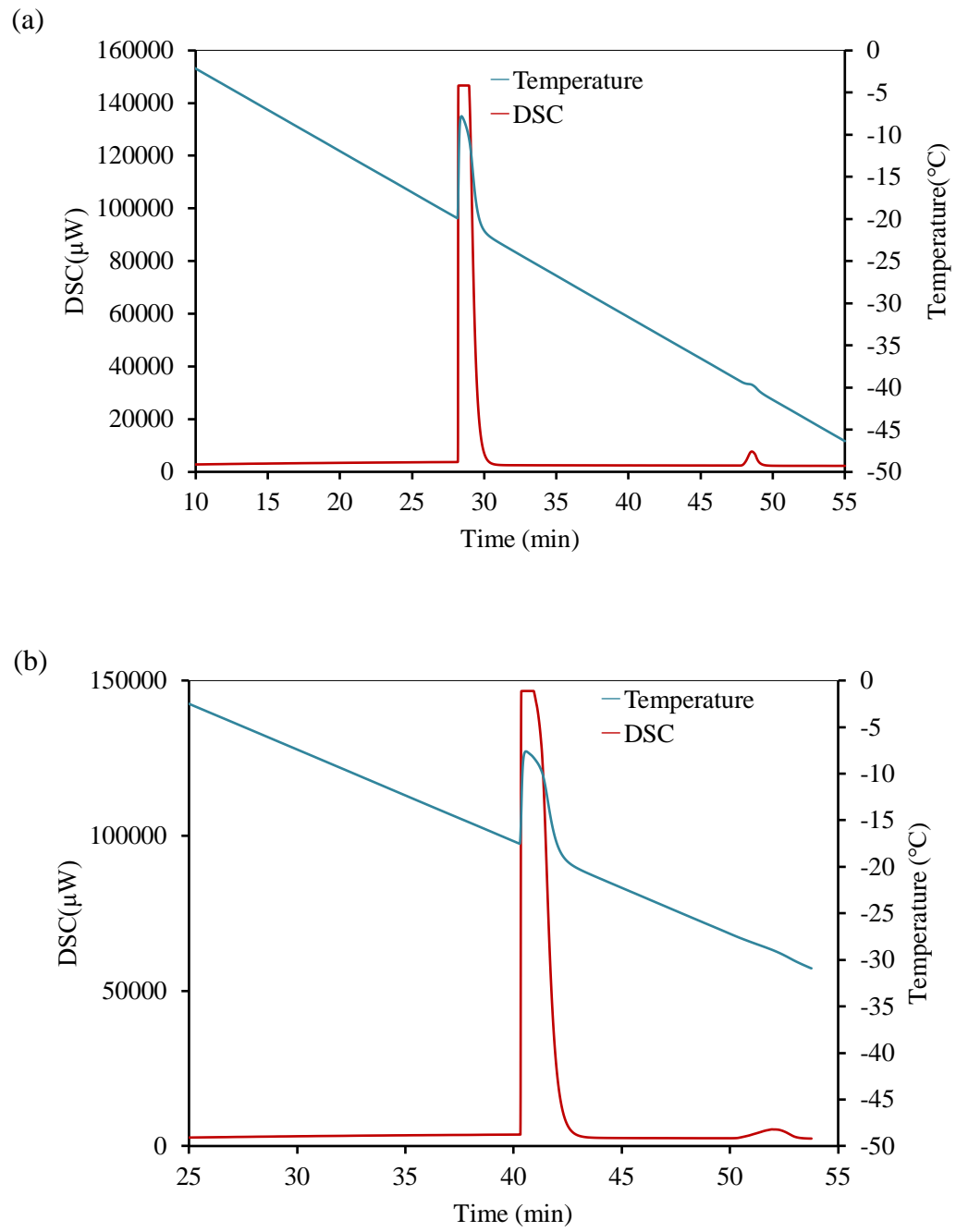


Fig.2-4-1. Differential scanning calorimetry (DSC) trace and temperature trace in *Anisakis* L3 immersed in NaCl solution.

(a)NaCl solution, (b)*Anisakis* L3 larva immersed in NaCl solution

することで、魚体中に存在するアニサキス属 L3 幼虫を死亡させることができることが示唆された。

溶液を添加した際の T_{SCP} に与える冷却速度の影響を検討したところ、0.9%NaCl 溶液 40 μ l に浸漬し、 $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却した時の T_{SCP} は $-17.9 \pm 2.1^{\circ}\text{C}$ ($n=10$) であった。 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ と $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ での有意な差が認められたものの、空气中で冷却した時の差(約 8°C)よりも差が小さくなった。実際の魚中に存在するアニサキス属 L3 は宿主の厚い組織に囲まれているため、魚中のアニサキス幼虫が凍結する温度に冷却速度はあまり影響しないと考えられた。

添加する NaCl 溶液の濃度を変更し(5%、10%)、塩濃度の影響を検討した。塩濃度を変更した場合においても、凍結様式に変化はみられなかった。水溶液を凍結した場合、水溶液の濃度が増加すると凝固点降下がおこり、凍結点が下がる(Watanabe 2009)。塩濃度を変更した場合の T_{SCP} は NaCl 濃度が 5% の場合は $-19.5 \pm 2.8^{\circ}\text{C}$ ($n=3$)、10% の場合は $-21.8 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ($n=3$) であり、NaCl 濃度が高くなるほど凍結点が低くなる傾向が見られた。

5%NaCl 溶液中に浸漬し、凍結させたアニサキス 属 L3 を融解させたとき(Fig.2-4-2a)、X 点で最初に溶液中の氷が融解し、Y 点で虫体が融解した。NaCl 溶液の共晶濃度である 23.3 %溶液中で融解した場合(Fig.2-4-2b)、NaCl 溶液の共晶点である -21°C 付近で溶液が融解したが虫体は凍結状態のまま存在し、アニサキス L3 本来の融点である -1°C 付近で虫体が融解した。凍結時はアニサキス L3 の個体内凍結は周囲の氷形成に誘発されるが、融解時はその可逆的な反応は起こらず、アニサキス、溶液それぞれの融解点付近で融解することが確認された。

2-5. モデルゲル中での凍結による影響

前項では塩溶液を添加し、その影響について検討したが、アニサキス属 L3 が寄生している組織は脂質やタンパク質などの他の成分が存在する。溶液を添加した場合、添加した溶液のそのほとんどが水分であるが、1-4-1 項で記載したとおり、アニサキス属 L3 がよく寄生している内臓の水分含量はより低い。また、組織中の水分は他の成分の存在により均一な状態では存在していない。添加する培地に塩以外に脂質、タンパク質、炭水化物を添加し、組織の組成に類似したモデルゲルを作成し、その中でアニサキス属 L3 を冷却・凍結することによる影響を検討した。

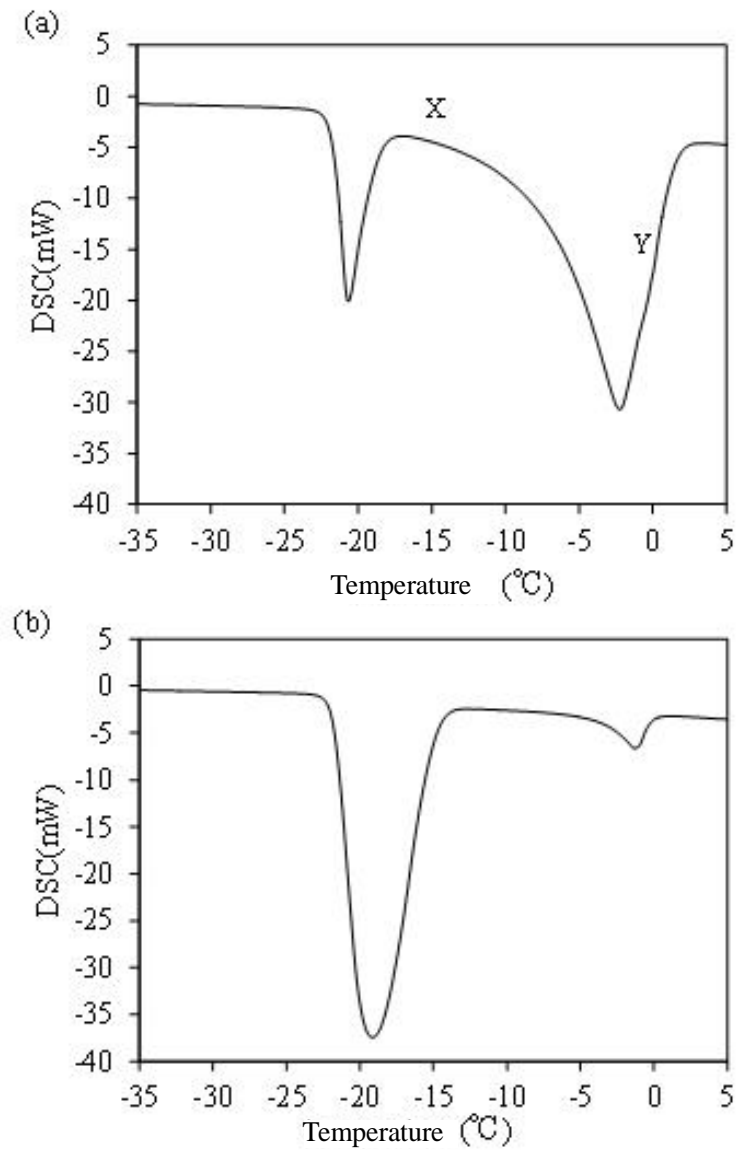


Fig.2-4-2 Differential scanning calorimetry (DSC) trace in *Anisakis* L3 immersed in (a)5% NaCl solution, (b)23.3% NaCl solution.

Table.2-5-1. Composition of the model gel (%)

gel	C1	C2	C3	C4	C5
NaCl	3	3	3	3	0.5
Glucose	-	5	5	5	2
Gelatin	-	-	17	17	1
Lipid	-	-	-	10	80
Moisture	97	92	85	65	16.5

Table2-5-1 で示した組成の溶液もしくはゼラチンゲルを作製し、その中にアニサキス属 L3 を埋没させて DSC パンに入れ、測定に供した。本試験ではタンパク質としてゼラチン(マルハニチロ(株)社製)を使用し、脂質は Bligh-Dyer 法に準じてサバミンチ肉から抽出したものを使用した。また、炭水化物としてグルコースを添加した。DSC は 5℃から-1℃/min で冷却した。また、DSC 信号上に現れた発熱スパイクの面積から、解析プログラムで凍結時の ΔH_c (mJ/mg) を算出した。

Table2-5-1 の C1～C5 の組成中で冷却・凍結したときの DSC 信号を Fig.2-5 に示す。C4 は Table1-4-1 を基に、内臓脂肪以外の組織の各成分の平均値を基に、内臓脂肪以外の組織を想定して作成した。C5 は内臓脂肪を想定して作成した。添加する培地中の水分含量が少なくなるほどスパイクの高さが低くなり、幅が広がる傾向が見られた。T_{SCP}は組成 C1～C4 までで有意な差が見られなかったが、そのほとんどが脂質で構成されている C5 ゲルは他のゲルより有意に高かった。また、凍結エンタルピー ΔH_c (mJ/mg)はゲル中の水分含量が低くなるほど小さくなった(Table 2-5-2)(n=5)。C4 ゲル中で凍結したとき、Fig.2-5 O 点付近まで冷却したものでは生存している L3 幼虫は検出されなかった(n=20)。一方、C5 ゲル中での凍結では Fig.2-5 P 点付近まで冷却したものでは生存が確認されたが(n=5)、Fig.2-5 Q 点付近まで冷却したものでは瀕死状態であった(n=3)。C4 ゲルと C5 ゲルを比較すると、より多くの脂質が含まれている C5 ゲルで T_{scp} が高くなり、より高い温度で凍結が完了したことから、より脂質含有率が高い部位に寄生しているアニサキス属 L3 の方が、より高い温度で凍結が完了することが示唆された。

Table.2-5-2. Super cooling point (T_{SCP}) and freezing enthalpy (ΔH_c) of *Anisakis* L3 in each model gel.

	T _{SCP} (°C)	ΔH_c (mg/mJ)
C1	-16.8±1.9 ^a	-247.9±8.2 ^a
C2	-17.6±2.0 ^a	-230.2±4.2 ^b
C3	-17.8±2.2 ^a	-181.0±11.4 ^c
C4	-17.8±1.6 ^a	-147.3±24.1 ^d
C5	-15.1±1.2 ^b	-52.2±2.3 ^e

Mean ± S.D., Values with the same exponent within each column not significantly different (P>0.05)

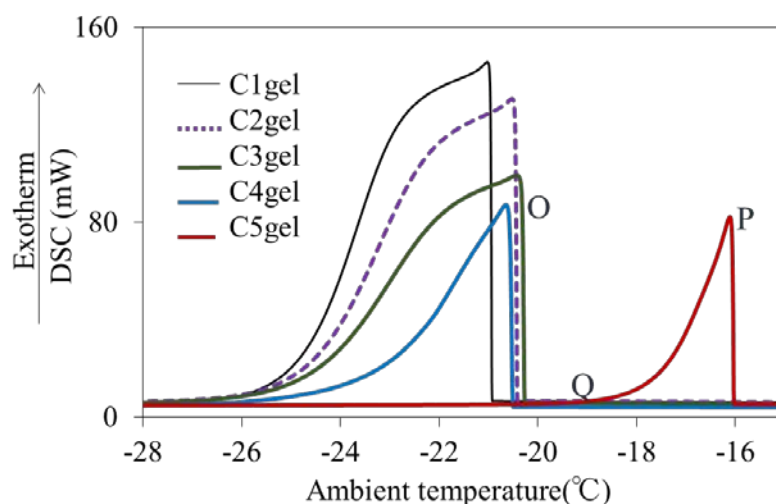


Fig.2-5 Differential scanning calorimetry (DSC) trace in *Anisakis* L3 immersed in the model gel.

2-6. 魚肉中での冷却、凍結による影響の検討

アニサキス L3 による食中毒は、魚肉中に存在する生存しているアニサキス L3 を摂取することで引き起こされるが、アニサキス L3 が寄生している魚肉組織の凍結とアニサキス L3 の凍結、および生死の関係について、ミクロな視点での検討が行われてきてこなかった。そこで、本試験では実際にアニサキス属 L3 をサバミンチ肉中に埋め、DSC 中で冷却、凍結させてその影響を検討した。サバは 2014、2015 年に北海道から三陸海岸沖で旋網により漁獲され、八戸港に水揚げされたサバを使用した。サバの頭部を除去して内臓を採取し、その内臓からアニサキスを採取した。残りの部分を 3 枚におろした後、鰭を除去し、皮に賽の目上の切れ込みを入れて皮付きのままフードプロセッサでペースト状にした。

ペースト化したサバ肉約 60~100mg をサンプルパンにつめ、DSC で T_{SCP} および融点を算出した。DSC のプログラムは $5^{\circ}\text{C} \sim -40^{\circ}\text{C} (-1^{\circ}\text{C}/\text{min}) \sim 10^{\circ}\text{C} (1^{\circ}\text{C}/\text{min})$ に設定した。その結果、 T_{SCP} は $-14.1 \pm 3.3^{\circ}\text{C}$ 、融点は $-1.2 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ であった。ペースト化した肉の粗脂肪をソクステスト((株)アクタック社製)を用いてソックスレー法に準じたジエチルエーテル抽出法により測定したところ、使用した肉の粗脂肪含有率は 7~18% であり、融点と粗脂肪に有意な相関が見られた ($r=0.91$) (Fig.2-6-1)。DSC のサンプルパンに詰めたペースト状のサバ肉中にアニサキス L3 属を埋没させ、 5°C から -40°C まで $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却し、発熱スパイクの終点まで冷却後、直ちに室温まで戻したところ (Fig.2-6-2)、試験に供した全個体で死亡が確認された。アニサキス属 L3 を埋めて冷却した際の T_{SCP} は $-14.6 \pm 2.7^{\circ}\text{C}$ であり ($n=27$)、ペース

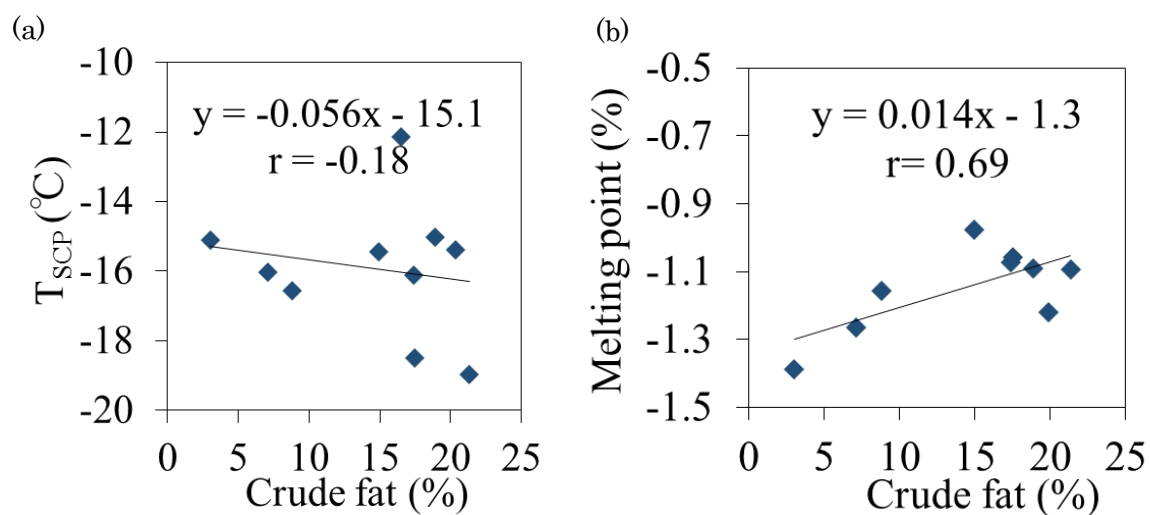


Fig.2-6-1 Relation between crude fat content of meat and (a) T_{SCP} , (b) melting point.

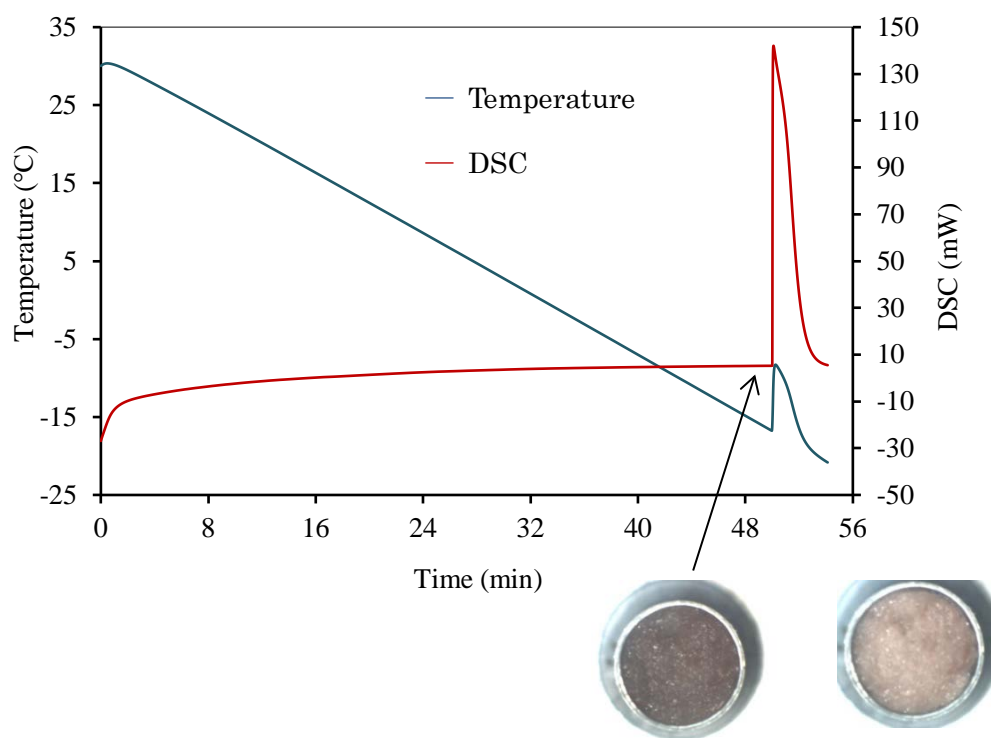


Fig.2-6-2 Differential scanning calorimetry (DSC) trace and temperature trace in *Anisakis* L3 immersed in pasty meat of mackerel.

ト化した肉のみで冷却したものと差は見られなかった。この結果から、アニサキス属 L3 が寄生している周囲の魚肉が完全に凍結すれば、その中に存在するアニサキス属 L3 を殺

滅することができることが確認された。

2-7. 冷却・凍結がアニサキス L3 虫体組織に与える影響

これまでに、アニサキス属 L3 の冷却・凍結による生死および、凍結様式についての検討を行ってきた。アニサキス属 L3 自体を凍結させることによりアニサキス属 L3 を死亡させることが可能であることは確認されたが、アニサキス属 L3 の組織にどのような損傷を与えているのかは不明である。そこで、DSC で冷却後のアニサキス L3 の組織観察を試みた。

アニサキス属 L3 を DSC 中で $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で虫体が凍結するまで冷却し、凍結後に直ちに取り出し、液体窒素に浸漬後、凍結組織切片を作成し、ヘマトキシリン&エオシンで染色後、光学顕微鏡で観察した(Fig.2-7)。未処理と比較して、DSC 処理後のものは腸管と体壁の間の腹腔液が存在している部分(Fig.2-7b 矢印の部分)に空隙が確認され、個体内凍結により腹腔液中の水分が凍結し、損傷が生じたことが確認された。

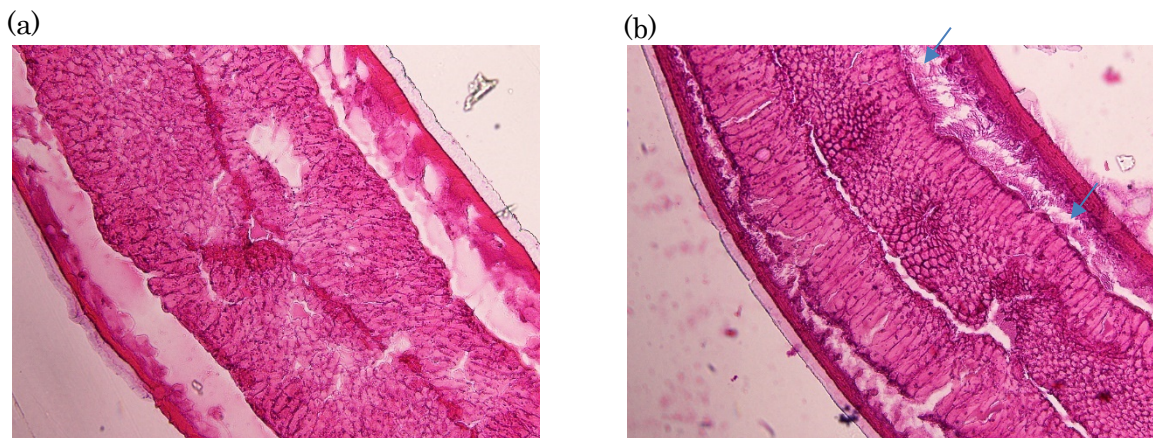


Fig.2-7 Histological section of *Anisakis* L3
(a)non-treated, (b)DSC treated

2-8. 総合討論

アニサキス属 L3 の凍結と死亡の関係については、低温顕微鏡を用いた試験で検証されており(Warton & Aalders 2002)、アニサキス属 L3 は添加した溶液の播種的な凍結により凍結することが報告されている。また、示差走査熱量計(DSC)を用いたテラノーバ属の凍結に関する研究が行われている(Stormo et.al, 2009)。両者とも、アニサキス L3 は添加した

溶液中の水分が凍結すると、虫体も凍結し、アニサキス L3 は播種的な凍結から逃れられないことを報告しているが、その際に添加された溶液は少量($\approx 10 \mu\text{L}$ 程度)である。 $10 \mu\text{L}$ は、虫体が覆われる程度の量である。凍結時の試料およびその中に含有している水分の量が多くなれば、過冷却解消に必要な核発生頻度がより高くなると推測されるので、凍結点が変わることが予測される。また、アニサキス虫体の周囲に存在する溶液などの量が多くなれば、周囲の溶液中に生成された氷のアニサキス虫体への伝播速度も異なることが予測されるが、添加する溶液の容量を増加させた検討は行われていない。さらに、DSC の試験は密閉系で行われており、凍結の有無は DSC の信号のみで判断されている。近年測定技術の発達により、測定時の状態を観察しつつ、DSC 測定することが可能となった。また、より容量の大きい容器を使用することにより、培地の添加量をより増加することが可能となった。

本試験では、八戸港に水揚げされたサバから採取されたアニサキス属 L3 幼虫の凍結耐性について、顕微カメラを接続した DSC を使用して検討した。溶液を添加せずに、アニサキス属 L3 が外気に晒された状態で冷却した時、 $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ で -20°C まで冷却しても、アニサキス属 L3 は凍結しないことを DSC 信号、目視双方で確認した。また、マイナスの温度帯にさらされても未凍結のアニサキス属 L3 は生存可能であった。一方、過冷却が解消し、DSC 信号上に凍結を示す発熱スパイクが立ち上がった時、アニサキスは一瞬で白濁し、死亡していた。この状態のアニサキス属 L3 の組織観察を行い、腹腔液部分に空隙が確認された。このことから、DSC 信号上で発熱スパイクが立ち上がり、過冷却が解消されたとき、体内で個体内凍結が起これ、ひとたび体内に氷結晶が形成されるとアニサキス属 L3 は死亡することが確認された。アニサキス属 L3 には低温耐性はあるが、個体内凍結に対する耐性は有していないようである。また、囊の有無による凍結耐性の違いについては検討されてこなかったが、アニサキス属 L3 が被囊していることは冷凍耐性に影響を与えていないことを明らかにした。

線虫の低温耐性・凍結耐性に関して、これまでに様々な研究が行われてきている。南極陸生性線虫である *P.davidi* は生育至適温度が 25°C であるにも関わらず、細胞内凍結しても生存することができる線虫として知られており、その体内に凍結保護物質としてトレハロースを蓄積することが一因として考えられている(Jagdale & Grewal 2003)。*P.davidi* は脂質

性状にも特徴があることが確認されている。細胞膜に含まれるリン脂質はほとんどがホスファチジルエタノールアミン(PE)もしくはホスファチジルコリン(PC)である。*P.davidi* の体表近傍では PE に比べて PC の割合が高く、モデル生物である *C.elegans* よりも不飽和度が高いこと、また、トリアシルグリセロールはエネルギー源として使用されるが、*C.elegans* の脂肪滴は局所的であるのに対して *P.davidi* の脂肪滴は全身に広がっていること、*P.davidi* の全脂質は低温(0°C)でも液体であることなどが、*P.davidi* の低温耐性に関わっている可能性があることが報告されている(Hayashi et.al.al 2014)。また、低温にさらされることで PC に対する PE の割合が増加する傾向がみられ、膜脂質の構成が低温にさらされることで変化する可能性が示唆されている(Hayashi et.al. al 2012)。低温曝露での膜脂質組成の変化は、線虫以外でも確認されている。アニサキス亜科線虫に関しても、凍結保護物質の蓄積や、膜脂質組成が低温耐性に関与している可能性がある。

実際の魚体内でのアニサキス属 L3 の凍結は周囲の宿主組織の影響を受ける。アニサキス属 L3 を 40 μ L の NaCl 溶液中で凍結したとき、溶液濃度に関わらず溶液中に氷が形成された直後に虫体も凍結し始め、アニサキス L3 属の体壁は周囲の氷形成からバリアする能力を有していないことが確認された。これは、以前に報告されている結果と一致する(Warton et.al.al, 2002)。また、凍結時は L3 の個体内凍結は周囲の氷形成に誘発されるが、融解時はその可逆的な反応は起こらず、溶液が融解してもアニサキス属 L3 はその融点付近まで温度が上昇するまで融解しないで凍結状態で存在することが確認された。

第 1 章でアニサキス L3 が寄生していることが多い内臓の成分組成を臓器ごとに測定した。その組成を基にモデルゲルを作製し、その中にアニサキス属 L3 を埋め、モデルゲル中での凍結による影響を確認した。水分含有量の異なる 5 種の組成の溶液もしくはゲルを作製し、そこに L3 を埋めたところ、内臓脂肪の組成を想定して作成し、他の溶液もしくはゲルよりもかなり水分含量の低い C5 ゲルは他の組成のゲルよりも有意に T_{SCP} が高くなった。また、内臓脂肪以外の部位を想定して作成した C4 ゲルと比較すると、C4 ゲル中での凍結では、発熱スパイクの頂点付近まで冷却した場合、L3 は死亡していたが、C5 ゲルでは生存していた。C5 ゲルはそのほとんどが脂質で形成されている。C5 ゲルでは水分は細かく分散した状態で存在すると考えられる。C5 ゲルの水分は C4 ゲルの約 1/4 であり、それに伴い凍結水分量も少ない。故に、C4ゲルと比べて大きな氷が形成されにくく、ゲル

中の水分が凍結することで誘発されるアニサキス属 L3 の播種的な凍結が起こりにくいのかかもしれない。同じ魚体内に寄生しているアニサキス属 L3 の場合、内臓脂肪内で凍結される方が、他の部位内での凍結よりも、アニサキス属 L3 の周囲の臓器はより高い温度で凍結を終了するが、寄生部位中の水分の凍結によるダメージを受けにくいことが確認された。アニサキス属 L3 が寄生している魚体を凍結した場合、魚体中のアニサキス属 L3 の死亡は寄生部位に影響を受ける可能性がある。

サバ肉の粗脂肪と T_{SCP} の間には相関が確認されなかったが、融点とは相関が確認された。過冷却解消は肉中の脂の量には左右されないようである。サバミンチ肉中にアニサキス属L3 を埋め、冷却、凍結した試験において、DSC 信号上にスパイクが出現していない時点(肉中の水分が凍結していない)段階で測定を停止すると、零下であってもアニサキス属L3 は生存していたが、スパイクの終点、サバミンチ肉中の水分の自由水の凍結が終了するまで冷却するとアニサキス属L3 は死亡していた。アニサキス属L3 は個体内凍結が生じれば死亡することを考えると、この結果から、0.9%NaCl溶液中で凍結したときと同様、アニサキス属 L3 の周囲の筋肉組織が凍結すれば、その中のアニサキス属 L3 は凍結し、死亡することが確認された。宿主である魚体が-1~-2℃といったマイナス温度域にあったとしても、アニサキス属 L3 の周囲の宿主組織が凍結していない(アニサキス L3 が凍結していない)状態であれば、生存可能であることが確認された。

2-9. まとめ

本試験では、DSC を用いてサバから採取したアニサキス属 L3 の凍結と死亡の関係について検討した。その結果、アニサキス属 L3 は個体内凍結が起こると死亡すること、アニサキス属 L3 はその周囲の組織中の水分が凍結すると凍結することを確認した。また、モデルゲルを用いた試験から、内臓脂肪といった脂質含有率が高い部位中に寄生しているアニサキス属 L3 の方が他の臓器よりも高い温度で凍結が完了することを明らかにした。さらに、魚肉中で凍結した時の影響について検討し、アニサキス属 L3 が寄生している筋肉部位が凍結完了すれば、その中にいるアニサキス属L3を死亡させることができることを、ミクロな視点から明らかにした。

第3章 冷凍による魚体内に存在するアニサキス亜科線虫幼虫の死滅条件

3-1. はじめに

魚体に寄生しているアニサキス亜科線虫は冷凍により死滅させることが可能であることは知られており、これまでに諸外国において、魚体を様々な条件で凍結、保管した後の魚体に寄生しているアニサキス亜科線虫の死亡率についての報告がなされてきており、寄生虫の殺滅を目的とした、生食・半調理状態(マリネなど)で食する水産物の冷凍による処理に関しての基準が設けられている。日本では厚生労働省の「食品、添加物の規格基準」において、冷凍食品は -15°C 以下で保管すること、となっている。冷凍食品に関して保管温度については基準があるが、品温(凍結終温度)に関する記述はみられない。また、冷凍食品の内「切り身またはむき身にした鮮魚介類を凍結させたものであって、生食用のものを凍結させた」ものが生食用冷凍魚介類に該当する(厚生労働省)。凍結の有無に関わらず魚体を加工していないもの(ラウンドの状態)については定められていない。さらに、規格基準は微生物防除を観点としており、寄生虫については定められていない。アニサキスへの冷凍による予防方法については、昨今各省庁がHPに情報を記載しているが、“ -20°C で24時間での冷凍が有効”と記載するにとどまっている。冷凍によるアニサキスを防除するための基準設定が求められる。

アニサキスを殺滅させるための“冷凍”条件を検討するに当たり、“冷凍”を2つの段階に便宜上分けて考える。i)凍結、およびii)冷凍保管、である。i)凍結は、品温が凍結点以上にあるものを冷却し、品温を凍結点以下のある温度まで下げ、凍結状態にする段階とする。ii)冷凍保管は、凍結状態にある魚を、零下の所定の温度で一定に品温を保持する段階とする。

i)凍結について、魚の加工状態(ラウンド、フィレー、ドレスなど)、魚体の大きさ、凍結形態(ブロック凍結(BQF)、バラ凍結(IQF))により凍結時の塊の大きさが異なり、凍結効率が異なる。大きくなるほど表面と中心部の温度差ができるため、同じ凍結温度、時間で処理した際の中心部の到達温度が異なる。また、水産物の凍結には様々な手法(例えば エアブラスト、アルコールブライン)を用いた凍結装置がもちいられている。凍結時に選択する凍結方法により冷却速度が異なるため、設定温度が同じであっても、同じ物を同時間処

理した場合での到達温度や凍結率は異なる。ii)冷凍保管について、一般的に使用されている家庭用冷凍庫は-18℃、工業用として使用されている冷凍保管庫は-20℃で設定されていることが多い。冷凍保管することにより、生化学的な反応や微生物の増殖は抑えられるため長期間保管することが可能となるが、冷凍保管中であっても品質の劣化は起こる。冷凍サバを-20℃以上で保管した場合、保管中に K 値(水産物の鮮度指標として用いられる)が徐々に上昇し、また、真空包装せずに保管した場合、脂質の酸化が進行するが、超低温(-60℃)で保管した場合には、K 値は 10 ヶ月間変化せずに保管することが可能であることが確認されている(Matsubara et.al. 2014)。

冷凍すると冷凍による品質劣化が起こるが、刺身、寿司といった生食文化が世界的に広まりつつある今、生食用としての高い品質を確保した上で、寄生虫も殺傷しうる条件の確立が求められる。本試験では、凍結時の形態として、フィレー、セミドレス、ラウンド、凍結方法としてストッカーでの保管、アルコールブライン凍結およびエアブラストで凍結した場合について検討した。

3-2. フィレー・セミドレス状での凍結試験

アニサキス属 L3 をフィレーで挟み込んだもの、もしくは頭部をつけたまま内臓を除去したもの(セミドレス状)の中で凍結、保管し、魚中で凍結した時の幼虫の生死について検討した。

3-2-1. 試験方法

サバは2014年8～9月に、旋網により漁獲され、八戸港に水揚げされたものを使用した。サバの内臓からアニサキス L3 虫体を 0.9%NaCl 溶液中に取り出した。サバの頭部・内臓を除去し、洗浄後、3 枚に卸し、1 尾から 2 枚のフィレーを調製した。内 1 枚の腹部にアニサキス属 L3 を 10 隻のせ、残りのフィレーで挟んだ(-20℃:n=5、-60℃:n=4) (Fig.3-2-1a)。セミドレス状での試行については、頭部を残した状態で内臓のみを除去し、水気を除去した後、腹腔部分にアニサキス属 L3 を 10 隻入れて腹を閉じた(n=2) (Fig.3-2-1b)。フィレー、セミドレス双方とも真空包装した。凍結速度の差異による影響を避けるため、-20℃アルコールブライン中で品温が-20℃になるまで(約 90 分間)凍結し、-20℃(MDF-U339、三洋

電機(株)社製)もしくは-60℃(MDF-594, 三洋電機(株)社製、487L)の冷凍ストッカーで 24 時間保管した。保管後に 0℃に設定した恒温水槽(ヤマト社製 CTW401)中で解凍し、解凍後にアニサキス属 L3 を取り出して 1-3 項と同様に生死を確認した。使用したフィレーの厚さと重さはそれぞれ-20℃で $15 \pm 2\text{mm}$ 、 $136 \pm 23\text{g}$ 、-60℃が $15 \pm 2\text{mm}$ 、 $124 \pm 11\text{g}$ であった。また、粗脂肪は 5~12%であった。セミドレス状での保管に使用したサバの標準体長と内臓を取り除いた後の重量はそれぞれ-20℃で $322 \pm 2\text{mm}$ 、 $425 \pm 79\text{g}$ 、-60℃が $313 \pm 4\text{mm}$ 、 $399 \pm 28\text{g}$ であった。

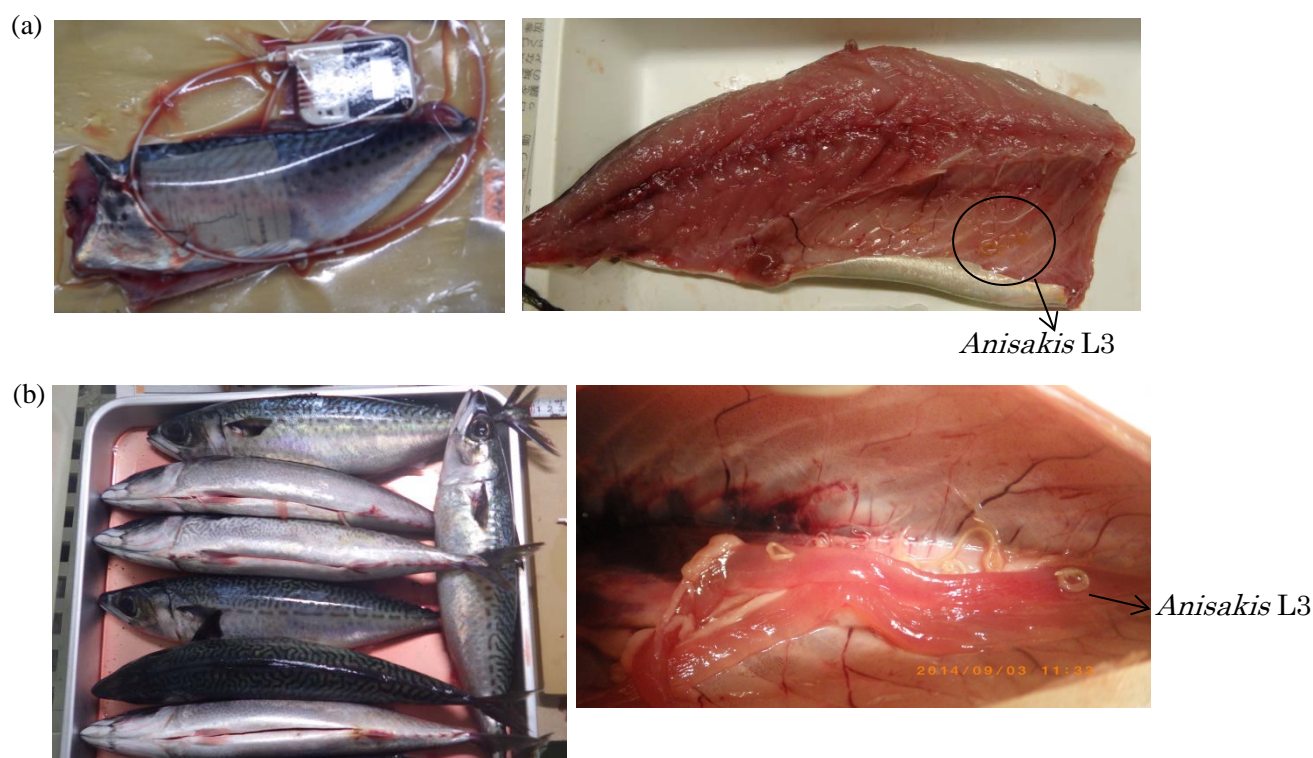


Fig 3-1-1. Form of mackerel used for this study.
(a)Fillet, (b)Semi-dress

3-2-2. 試験結果

-20℃アルコールブラインで凍結し、-20℃もしくは-60℃で 24 時間保管したフィレーもしくはセミドレス中のアニサキス属 L3 について、生存しているものは確認されなかった。温度中心点が凍結終温(-18℃)以下になるまで凍結してから保管した場合、サバの形態、保管温度に関わらず、家庭用、工業的に多く使用されている保管の温度である-20℃で 24 時間保管することで、寄生しているアニサキス属 L3 を死滅させることが可能であることが



Fig.3-2-1 *Anisakis* L3 immersed into the meat of mackerel

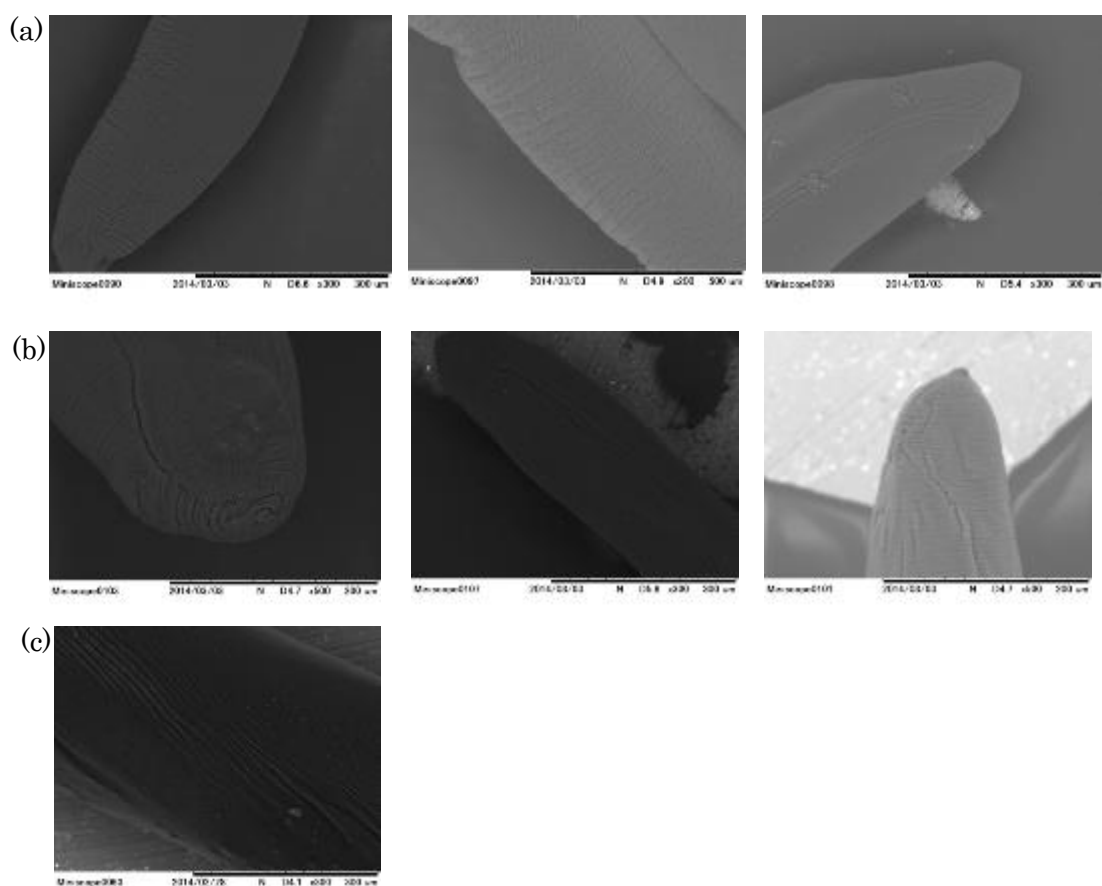


Fig 3-2-2. Electron micrograph of *Anisakis* L3 frozen in fillet.

(a)fillet was stored at -20°C, left; posterior portion of warm, middle; middle of warm, right; anterior portion of warm

(b)fillet was stored at -60°C, left; head of warm, middle; posterior portion of warm, right; anterior portion of warm

(c)non-treated and living warm

示唆された。フィレー中での凍結において、凍結前には身の上にアニサキス属 L3 虫体を置いたが、解凍後に身の中に侵入していたものが見られた(Fig.3-2-1)。アニサキス属 L3 が寄生している魚を冷却し、凍結した場合、凍結処理前に身にアニサキス属 L3 が侵入していなかったとしても、アニサキス L3 が死亡していなければ、凍結処理中に身に侵入す

る可能性が示唆された。

加熱処理もしくは電子レンジで処理した魚体から検出したアニサキス L3 は、キューティクルに損傷を受けることが報告されている(Vidaček et. At. Al. 2009)。フィレー中での凍結において、-20℃もしくは-60℃で 24 時間保管後に回収したアニサキス属 L3 の状態を電子顕微鏡にて観察すると(Fig.3-2-2)、-20℃、-60℃保管ともに、虫体のキューティクルに損傷は見られず、冷凍処理ではアニサキス属 L3 の外観は損傷を受けないことを確認した。

3-3. ラウンドでの凍結試験

3-3-1. -20℃ストッカー中での凍結・保管

未凍結状態の生サバをそのまま 1 尾ごとに包装し（バラ凍結）、ストッカー（保管庫）の中に入れ、凍結および保管した際の、サバに寄生しているアニサキス属 L3 の生存率の推移を検討した。ストッカーの温度は、家庭用および工業用としてよく用いられている -20℃に設定した。

サバ(244～749g)の中心部(ラウンドの状態のサバの体長の 1/2、体幅の 1/2 にあたる部分)に温度センサーを刺し、1 尾ずつ真空包装した後、-20℃に設定したストッカー(MDF-U339, 容量 221L)中で最大 24 時間まで保管した。保管後に止水(水道水)中で解凍し、内臓もしくは身からアニサキス属 L3 を採取した。アニサキス属 L3 の生死は、採取したアニサキス属 L3 を 0.9%NaCl 溶液中に移し、35℃で 1 晩保持した後に、刺激への反応を確認することで行った。サバ 1 尾毎にアニサキスの生存率を、下式を基に算出した(Ep.3-1)。

Survival rate (%)

$$: \text{living larva (number)} / \text{detected larva (number)} \times 100 \quad (\text{Ep.3-1})$$

サバを -20℃に設定したストッカー(実測の庫内温度は約 -18℃)で保管した場合(Fig.3-3-1)、サバ中心部の温度は保管開始約 18 時間後に保管庫の温度に到達していた。サバに寄生していたアニサキス属 L3 の生存率は保管開始 6 時間目まで 100%であったが、18 時間以降では生存しているアニサキス属 L3 は検出されなかった(Fig.3-3-2)。サバ中心部の到達温度とアニサキス属 L3 の生存率との関係について見てみると、保管期間が短く、

サバ中心部の温度が -5°C より高いものでは検出されたアニサキス属 L3 は全て生存していた。一方、中心部の温度が -15°C 以下に到達していたサバから検出されたアニサキス属 L3 については、生存しているものは確認されなかった(Fig.3-3-3)。なお、本試験で使用したサバでは、解凍後に身からアニサキス属 L3 は検出されず、全て内臓から検出された。

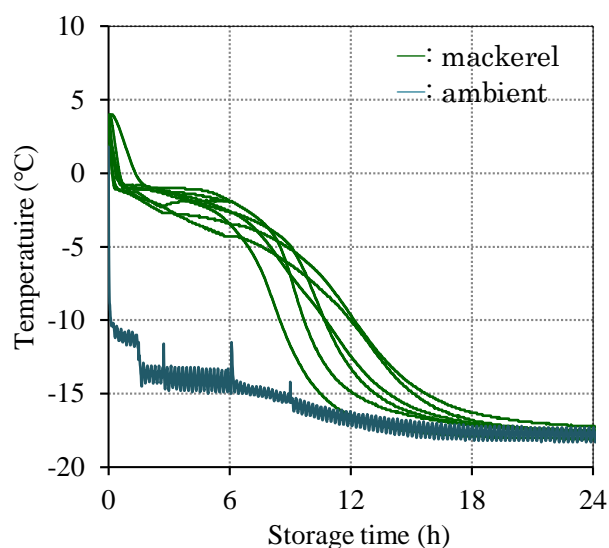


Fig 3-3-1. Passage of temperature during freezing and storage at -20°C .

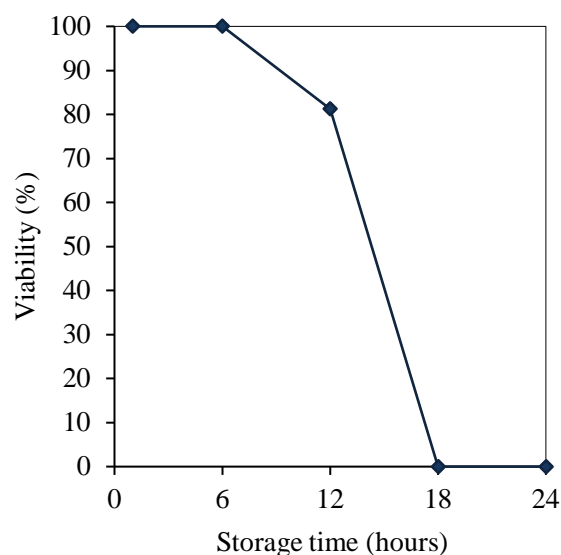


Fig 3-3-2. Passage of viability during freezing and storage at -20°C .

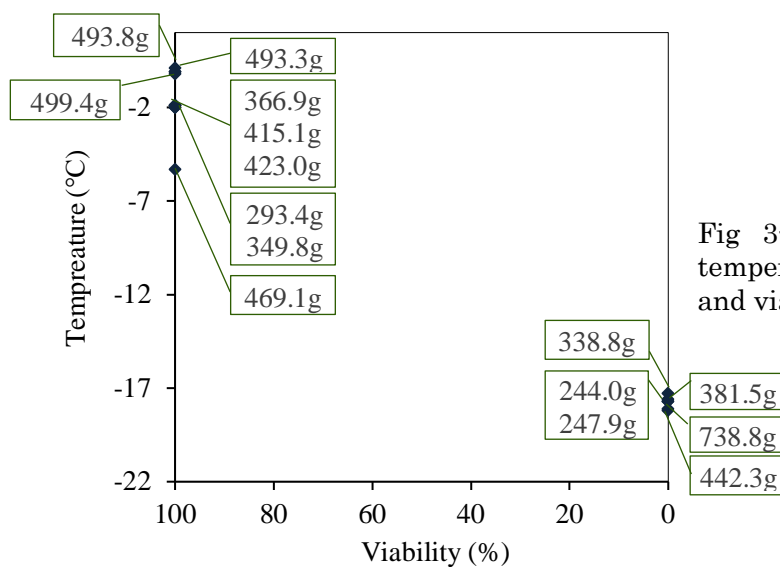


Fig 3-3-3. Relation between achieving temperature of central part of mackerel and viability of *Anisakis* L3.

3-3-2. アルコールブラインを用いた凍結

不凍液を用いたブライン凍結は、魚体の大きさにもよるが、サバであれば 1～2 時間で凍結が可能である。サバの中心部もしくは腹部(内臓がある部分)に温度センサーを刺して



Fig 3-3-4. Alcohol-brine freezing.

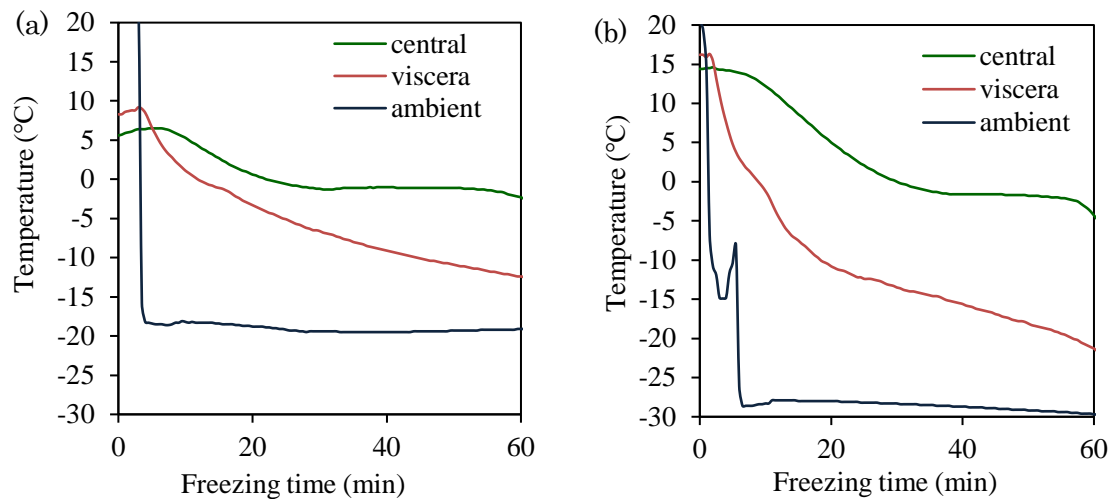


Fig 3-3-5. Passage of temperature during freezing by alcohol-brine.
(a)-20°C, (b)-30°C

真空包装した後、-20°C(350.7~522.2g、n=9)もしくは-30°C(417.1~808.5g、n=19)に設定したアルコールブライン中で1時間凍結した(Fig.3-3-4)。解凍後にアニサキス属 L3 を採取し、生存率を算出した。

-20°C、-30°Cアルコールブラインで凍結した場合、中心部よりもアニサキス属 L3 がよく寄生している内臓部の方が、温度低下が速かった(Fig.3-3-5)。-20°Cもしくは-30°Cアルコールブライン中で1時間凍結すると、-20°C凍結では腹部の到達温度が-6~-17°C、中心部が-1~-17°Cであり、-30°Cでは腹部-10.2~-26.7°C、中心部-6.5~-25.8°Cであった。また、-20°Cで1時間凍結した場合、生存しているアニサキス属 L3 が2隻検出された(検出された60隻の内2隻)。しかし、さらに凍結すると約1.6~2.4時間後に中心部の温度が-14°C~-18°C、腹部の温度-15°C~-18°Cに到達し、生存しているものは確認されなかった。さらに、-30°Cアルコールブラインで1時間凍結した場合、検出されたアニサキス属 L3 は全て死亡していた。

凍結設備の冷却能力が同じで有っても、魚体の大きさがより大きくなれば表面からの伝熱速度が遅くなるため、より中心部の温度低下速度が遅くなることが予測される。アルコールブライン中で1時間凍結した時のサバの腹部・中心部の到達温度と魚体重の相関についてみると、-20℃及び-30℃凍結ともに腹部の到達温度と魚体重に相関がある傾向がみられた (Table 3-3-1)。

中心部と腹部の到達温度について見てみると、-20℃、-30℃凍結時ともに両者間に有意な正の相関が見られた (Fig.3-3-6)。本試験では 3-3-1 項同様、身からはアニサキスは検出されず、内臓のみからアニサキスは検出された。

Table 3-3-1. Correlation between achieving temperature (central part and visceral part) and weight of mackerel

Setting temperature (°C)	Correlation	
	Weight/Central	Weight/Viscera
-20	0.33 (p=0.34)	0.74 (p=0.02)
-30	0.42 (p=0.096)	0.48 (p=0.052)

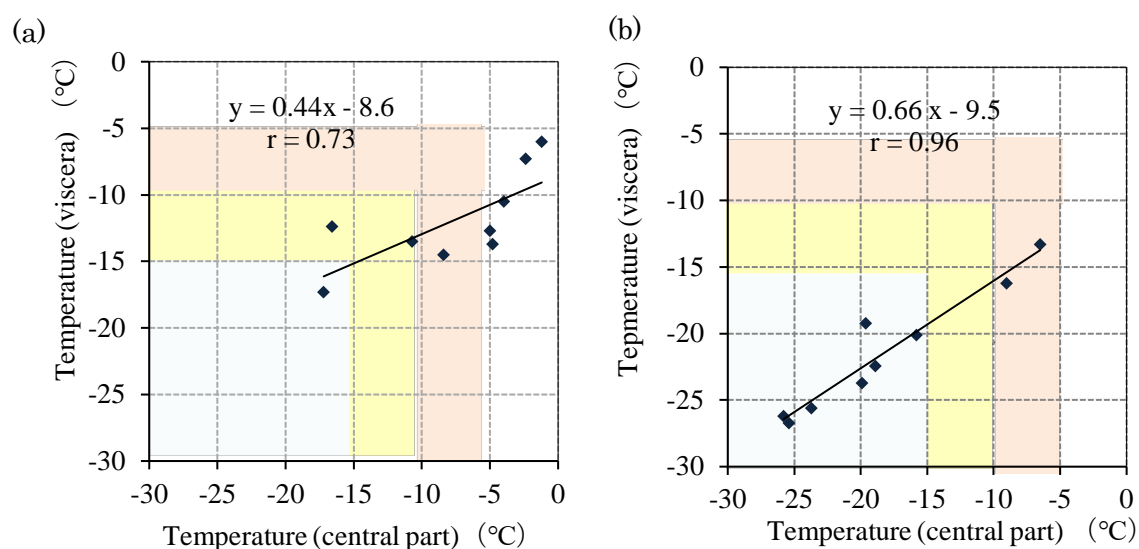


Fig 3-3-6. Correlation between achieving temperature of central part of mackerel and those of visceral part.
(a)-20℃, (b)-30℃

3-3-3. エアブラストを用いた凍結

3-3-2 項と同様にサバを処理し、 -45°C に設定したエアブラスト凍結庫内で凍結し、アニサキス属 L3 を採取、生存率を算出した。アルコールブラインで凍結したときと同様、中心部よりも腹部の方が温度低下が速かった(Fig.3-3-7)。また、腹部、中心部の到達温度と各魚体から検出されたアニサキス属 L3 の生存率の関係を確認すると、生存していた虫体が検出された魚体は、腹部、中心部ともに到達温度が -15°C 以上であった(Fig.3-3-8)。本試験では、生存していたアニサキス属 L3 が検出されたのは、腹部到達温度が -15°C 以上であり、且つ中心部の到達温度が -10°C 以上のサバであった。本試験では身からアニサキスが 1 隻採取され(腹部到達温度 -7.3°C 、中心部到達温度 6.2°C サバ)(Fig.3-3-9)、生存していた。そのアニサキスは被囊していたことから、エアブラストで冷却中に身に侵入したものではないと考えられる。その他のアニサキスは全て内臓から採取された。

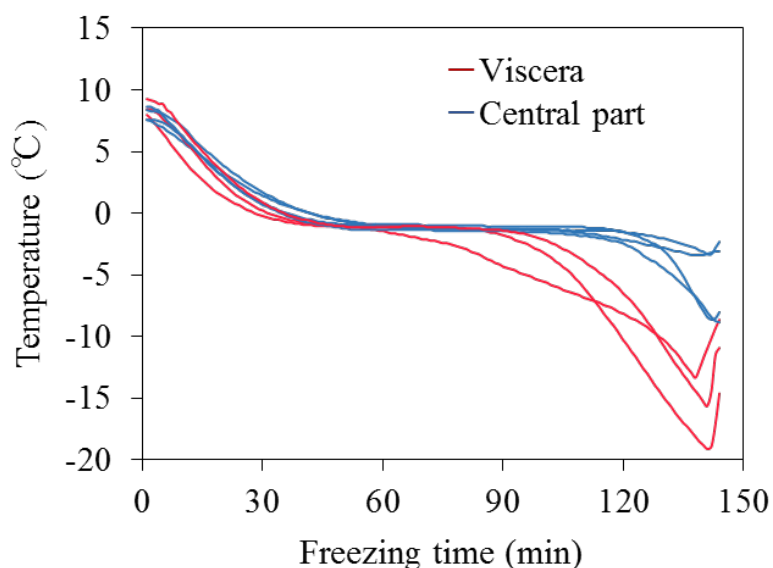


Fig 3-3-7. Passage of temperature during freezing by air-brast freezing.

3-4. 本章のまとめ

本報ではサバを個別凍結(IQF)した場合におけるアニサキス幼虫の殺傷条件について検討した。フィレーもしくはセミドレス状での試験において、 -20°C まで凍結し、 -20°C もしくは -60°C で 24 時間保管した場合、アニサキス属 L3 は全て死亡していた。 -20°C まで温度

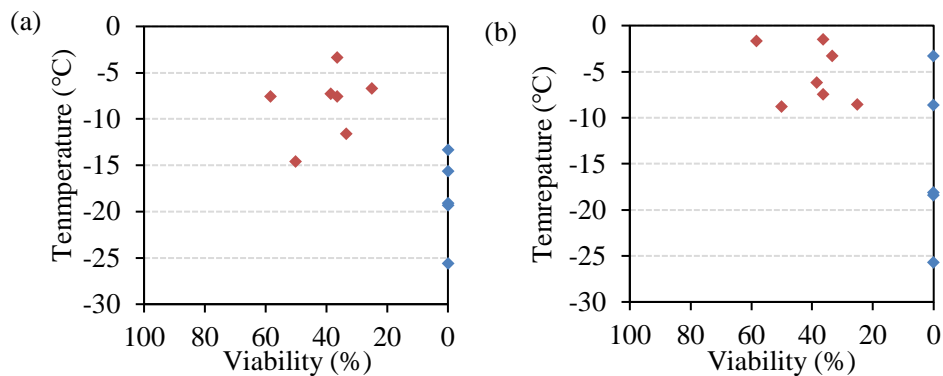


Fig 3-3-8. Correlation between achieving temperature and viability of *Anisakis* L3. (a)viscera , (b)central part, ◆:living larvae was detected, ◆:no-living larvae was

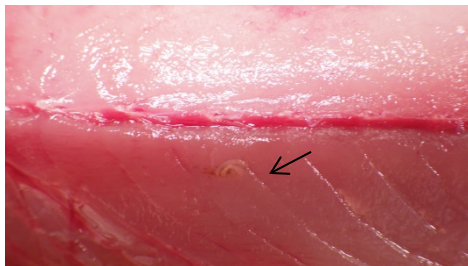


Fig.3-3-9 *Anisakis* L3 immersed into the meat of the mackerel.

を下げ、凍結したものであれば、“-20℃で 24 時間保管” することは、アニサキス L3 の殺滅に有効であることを確認した。

既報の文献において、アニサキス L3 が寄生しているニシンをアルミホイルでラップして-5、-10、-17、-30、-42℃のチャンバー内で保管したところ、-17℃では 24 時間後、-30℃では 90 分で生存しているものが見られず、-17℃～-30℃の家庭用もしくは一般のフリーザーでの 24 時間保管は幼虫を死滅させるのに妥当であることが報告されている (Gustafson 1953)。また、同報において、魚中のアニサキス L3 を殺傷するには中心部の温度が-15℃以下になることが目安であると考えられている。本試験では、-20℃に設定したストッカー中で凍結・保管した場合、今回は身からはアニサキスは採取されなかったが、中心部の温度が-18℃以下に到達したサバからは生存しているアニサキス幼虫は検出されていない。また、-30℃アルコールブラインで 1 時間凍結した場合、ほとんどのサバが腹部および中心部の到達温度が-15℃以下に到達しており、検出したアニサキスは死亡していたことを確認している。これらのことから、サバを個別凍結する場合、サバ中に存在す

るアニサキス L3 を殺滅させるためには、凍結装置の凍結速度や保管温度に関わらず、サバはニシンよりも魚体が大きいものが多いが、サバにおいても中心部の温度を -15°C 以下まで低下させることが必要であることが確認された。さらに、エアブラストで凍結した場合、生存していたアニサキス属L3が検出されたのは、腹部到達温度が -15°C 以上、中心部到達温度が -10°C 以上のサバであった。腹部の温度が -15°C 以下に到達したサバでは、中心部の温度が -10°C 付近であっても(内臓から採取された)アニサキス属L3は死亡していた。魚体内に存在するアニサキスの死滅条件については、“中心部”の到達温度を -15°C に下げるということではなく、“寄生部位(内臓に寄生している場合は腹部)”の温度を -15°C 以下に下げることが重要であることが示唆された。

魚体重と到達温度間に相関が確認されなかったことから、魚体の重さから幼虫の殺傷に必要な凍結時間の推定は難しいが、内臓に寄生しているアニサキス属 L3 の殺傷には、ラウンド状態のサバを個別凍結する場合、 -20°C ストッカーでは約 18 時間、 -30°C アルコールブライン凍結の場合は 1 時間が幼虫殺傷の目安と考えられた。これまでは、魚体に寄生しているアニサキス L3 の殺滅には、(-20°C の場合)最低でも 24 時間必要であるとされていたが、凍結時の形態や選択する凍結方法によっては短時間でアニサキス L3 の殺傷に必要な温度に到達するので、アニサキス L3 を殺滅させるための冷凍処理期間を短縮することが可能となることが示唆された。

第4章 化学的方法によるアニサキス L3 の殺滅

4-1. はじめに

アニサキス亜科線虫の殺滅方法については古くから様々な方法が検討されてきた。殺滅方法は化学的方法と物理的方法がある。化学的方法は、殺虫成分や食品添加物などの化学物質を添加するものである。最も一般的に使用されている幼虫の殺傷方法は、塩蔵と酢じめである (EFSA)。本国ではアニサキスを食塩に浸漬した場合、20%水溶液で 24 時間、10%では 48 時間以内に死滅し、1%水溶液では 175 日間にわたり生存していたことが確認されている (Oishi & Hiraoki 1971)。また、*Agencia Eapanola de Seguridad Alimentaria* (AESAN)によると、2.4%酢酸および 6%NaCl 溶液への浸漬では、*A.simplex* を殺傷するために 35 日間を要する (EFSA)。塩蔵については、アニサキスを殺滅するにそれだけでは不十分であるが、効果があることは確認されているところである。しかし、なぜ幼虫が殺滅されるのかははっきりしていない。

水分は低浸透圧から高浸透圧側に移動するので、虫体自身の浸透圧よりも高い浸透圧の環境にさらされた場合、虫体から水分が抜け、脱水されることが予想される。アニサキス亜科に属する *Pteranova* においては、低浸透圧もしくは高浸透圧溶液に浸漬した際の浸透圧調節について報告されており、虫体は高浸透圧(60%ASW(等圧は 40%))もしくは低浸透圧(15%ASW)に 24 時間浸漬された場合、24 時間の間重量を維持できたことが報告されている (Fuse & Davey, 1993)。アニサキス属についてもアニサキス亜科に属する線虫であるので、程度の差異はあるかもしれないが同様であることが予想される。そこで、アニサキス L3 を種々の濃度の溶液に浸漬し、その影響を検討した。

4-2. 溶液濃度・種類の差異がアニサキス L3 に与える影響

1ml の 1、3、5、10、23.3% NaCl 水溶液が入った 2ml プラスチックチューブにアニサキス属 L3 を 1 隻ずつ浸漬した。20℃の恒温機中で 1、2、3、4、5、24 時間の各時間まで浸漬した後、0.9%NaCl 溶液中に移し、35℃で 1 晩置いた後にアニサキス属 L3 の生死を判断して生存率を算出した(n=9、3 回)。さらに以下の式を基に重量減少率を算出した(Ep.4-1)。なお、 W_0 は浸漬前の重量、 W_1 は浸漬後の重量である。

Negative increment of weight (%) : $(W_0 - W_1) / W_0 \times 100$

…(Ep.4-1)

1%NaCl 水溶液に浸漬したアニサキス属 L3 で死亡したものは見られなかったが、浸漬後に重量が増加しており、膨潤していることが確認された(Fig.4-2-1)。また、3%NaCl 溶液に浸漬した場合においても 24 時間まで死亡したものは確認されなかったが、浸漬後の重量は浸漬前と比較して若干増加していることが確認された。5%NaCl 水溶液に浸漬したものでは浸漬開始 5 時間後まで生存率 90%以上を維持していたが、24 時間後には約 40%まで低下した。10、23.3%水溶液に浸漬したものでは徐々に生存率が低下していき、24 時間後には 10%に浸漬したもので約 10%、23.3%に浸漬したもので約 5%まで低下した。重量減少率に関しては浸漬濃度が高いほど高く推移した。さらに、浸漬後の生存率と重量減少率の関係について確認すると、負の相関関係が確認され、重量減少率が高くなるほど生存率が低くなることが確認された(Fig.4-2-2)。

10%KCl 溶液に浸漬し、24 時間浸漬後の生存率と重量減少率を確認したところ、24 時間浸漬後の生存率は 62.5%(5/8 匹)であり、平均の重量減少率は約 30%であった。10%NaCl 溶液に 24 時間浸漬後の平均の重量減少率(40%)よりも低く、また、生存率も高くなった。

4-3. 各濃度の塩溶液への浸漬時間による影響の検討

前項では、アニサキス属 L3 を浸漬する濃度を一定にし、時間のみを変更したが、本項ではアニサキス属 L3 の浸漬溶質濃度を徐々に上昇させ、その影響を検討した。1ml の NaCl もしくは $Mg(NO_3)_2$ 水溶液にアニサキス属 L3 を浸漬し、各濃度での浸漬時間を変え(Fig.4-3-1)、生存率および重量減少率を比較した。重量減少率の算出方法は Ep.4-1 のとおりである。

NaCl 溶液にて検討した場合、各濃度での浸漬時間が長くなるほど生存率が低くなったが、各区分間で重量減少率に差は見られなかった(n=6、施行 6 回)(Fig.4-3-2a)。アニサキス属 L3 幼虫は急激な濃度変化よりも高浸透圧液に長時間さらされることの方が生存に大きく影響すると思われた。 $Mg(NO_3)_2$ 水溶液で同様の検討を行うと(n=10、施行 1 回)、各濃度での浸漬時間が長い区ほど生存率が低くなり、重量減少率が高くなった(Fig. 4-3-2b)。

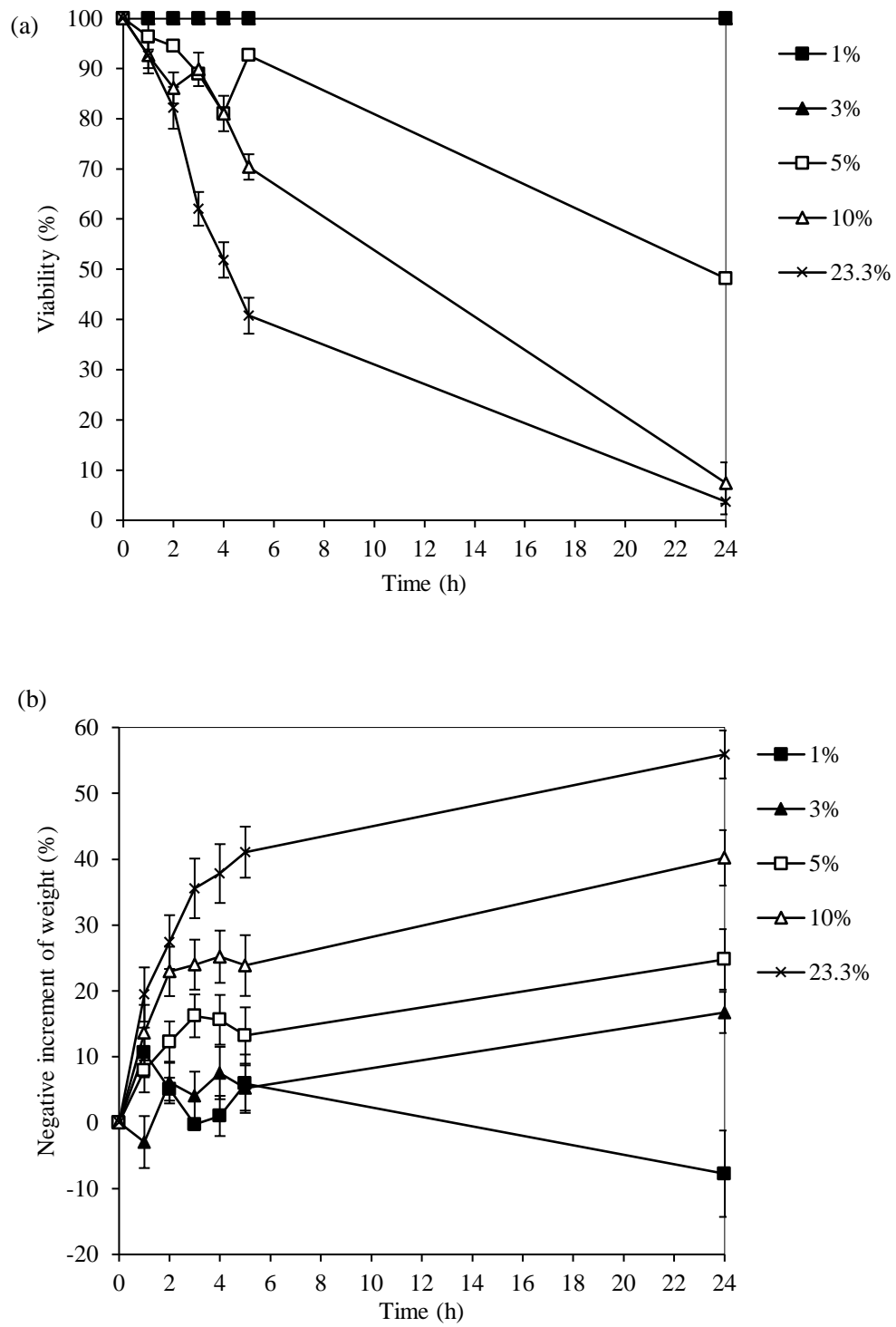


Fig.4-2-1 Viability (a) and negative increment of weight (b) of *Anisakis* L3 in NaCl solution of different concentration. Mean \pm S.E.
 ■ 1%, ▲ 3%, □ 5%, △ 10%, × 23.3%

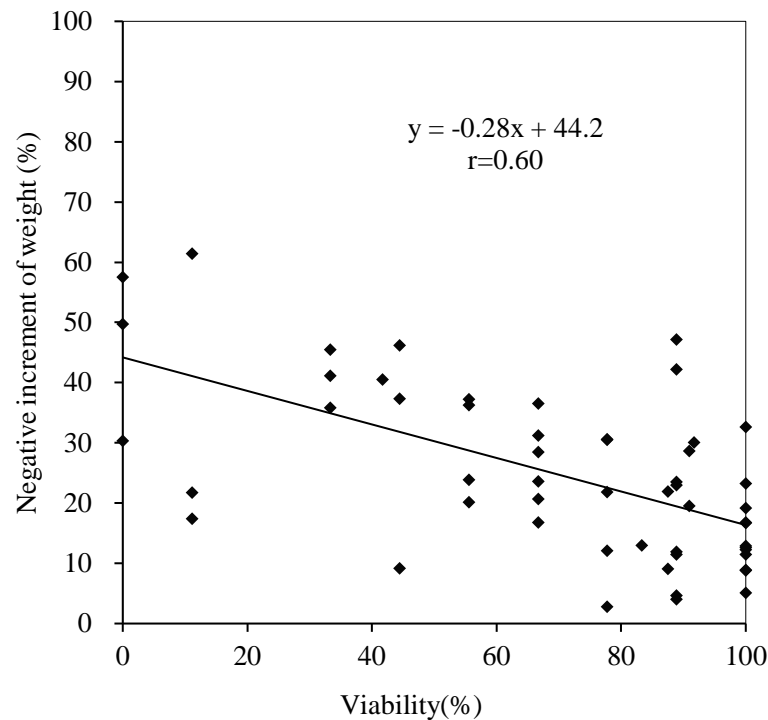


Fig.4-2-2 Correlation between negative increment of weight and viability of *Anisakis* L3 immersion in NaCl solution of different concentration.

4-4. 本章のまとめ

サバから採取したアニサキス属 L3 を濃度の異なる NaCl 溶液に浸漬したところ、浸漬溶液の濃度が高いほど生存率が低下し、重量減少率が高くなることが確認された。塩溶液中での浸漬では、周囲の高浸透圧によりアニサキス属 L3 が脱水し、ゆえに死亡すると考えられた。しかし、10%KCl 溶液への浸漬では、同じ濃度の NaCl 溶液への浸漬へと比較し、脱水率が低くなり、生存率が高くなった。塩の種類によってアニサキス L3 の浸透圧調節に与える影響が異なり、カリウムイオンよりナトリウムイオンのほうがよりアニサキス属 L3 浸透圧調節能を破壊する能力が高いことが示唆された。真核生物の細胞膜には浸透圧調節のためのナトリウムチャネルとカリウムチャネルが存在している。塩の種類による浸透圧調整能の違いは、アニサキス属 L3 の細胞膜に存在する各チャネルの存在比の差異によるものかもしれない。

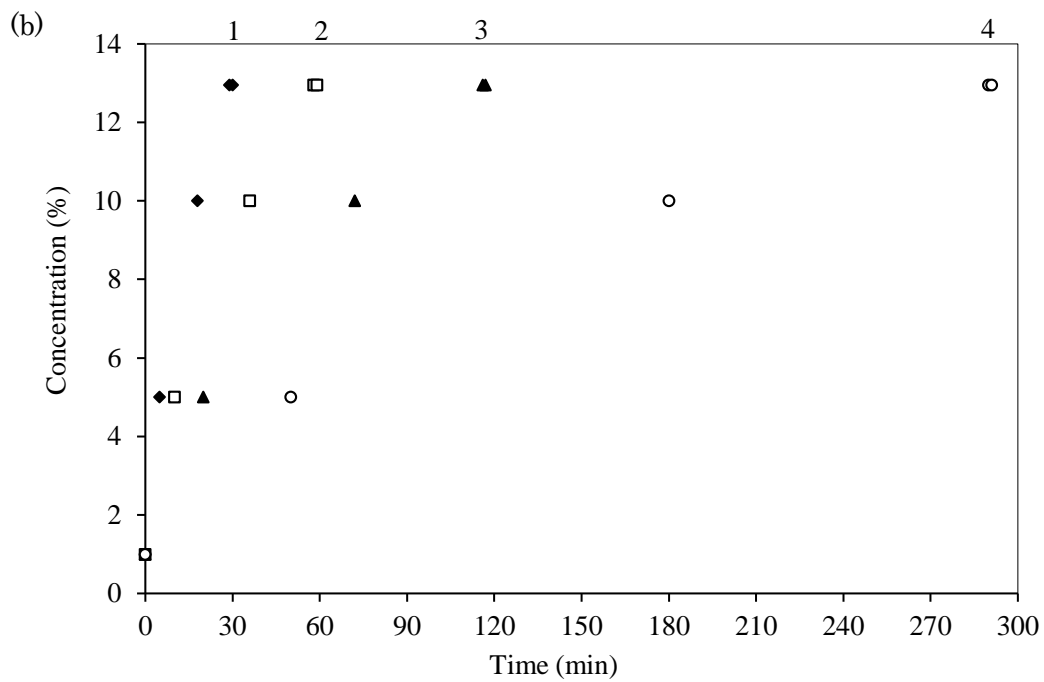
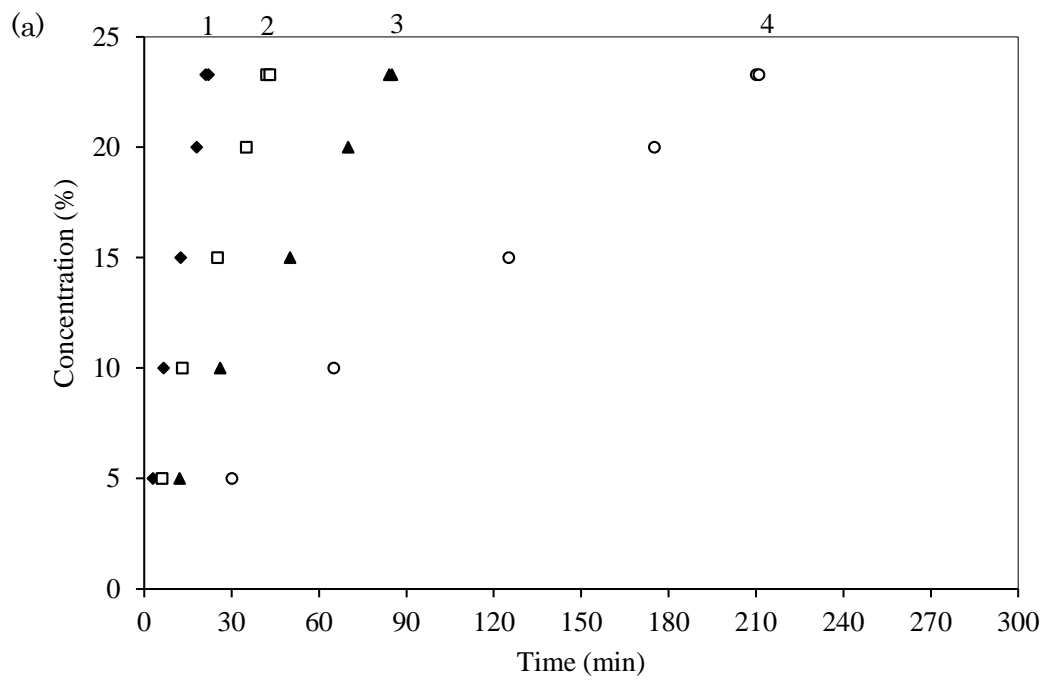


Fig.4-3-1 Immersion time in each concentration of solution.
 (a)for NaCl, (b) for $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

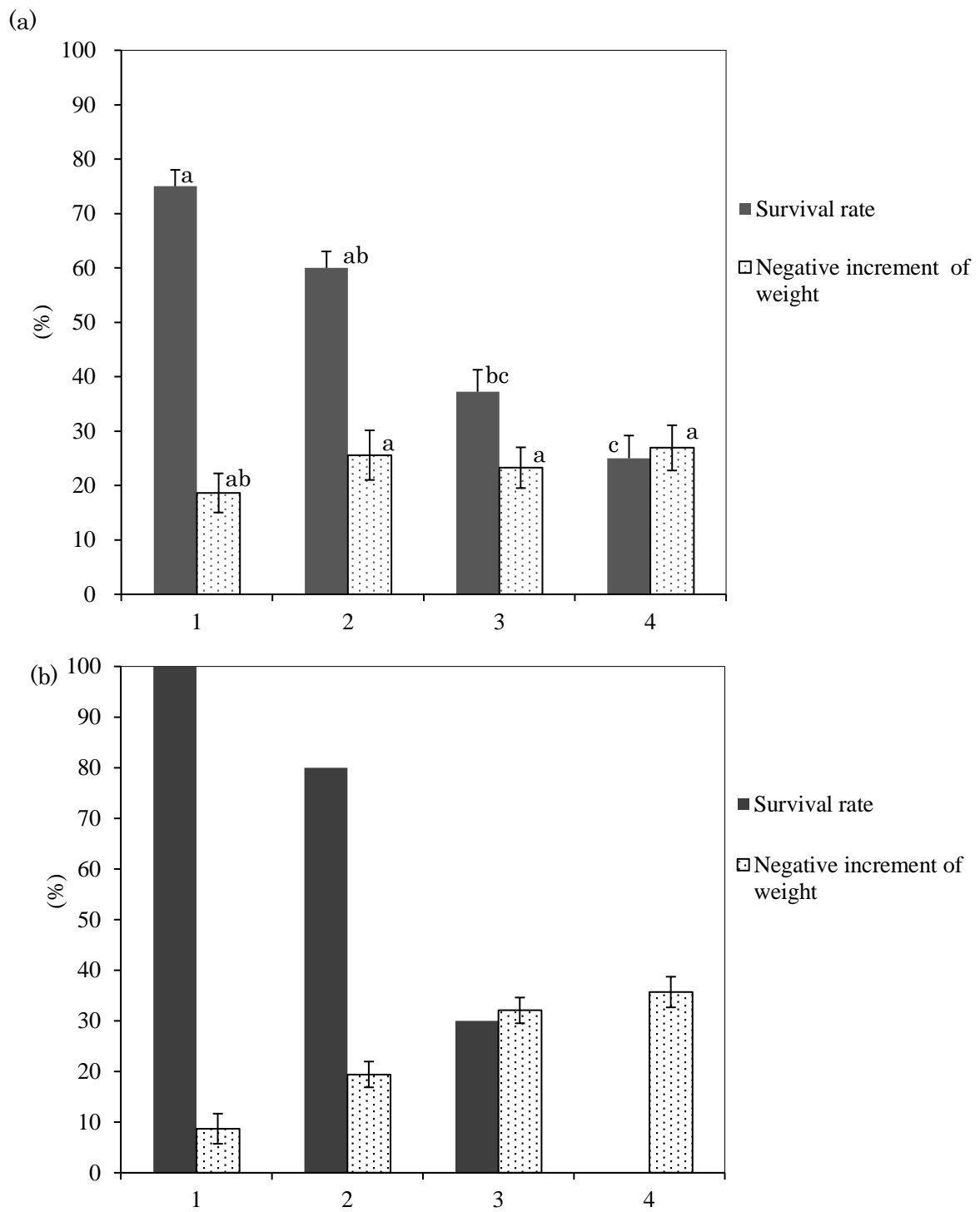


Fig.4-3-2 Survival rate and negative increment of weight of *Anisakis* L3 larvae in (a)NaCl solution or (b) $Mg(NO_3)_2$ which changed concentration. Mean \pm S.E. Values with a different letter within each item are significantly different ($P>0.05$)

10%KCl 溶液に 24 時間浸漬後の生存率は約 60%であった。これを Fig.4-2-2 の式(NaCl 溶液浸漬時の生存率と重量減少率の相関式)にあてはめて計算すると、約 27%になる。実際の 10%KCl 溶液に 24 時間浸漬後の平均の脱水率は約 30%と、計算で算出した値と近くなった。塩の種類により、同じ濃度で同時間浸漬しても脱水率・殺傷能力(生存率)は同じにはならないが、塩の種類が異なってもアニサキス属 L3 虫体から同程度の脱水が起これば(脱水率が同程度になれば)、同程度の殺傷能力が得られることが確認された。

NaCl 溶液の浸漬濃度を徐々に高いものに変えた場合、脱水率に差が見られなかったものの、各濃度での浸漬時間が長くなるほど生存率が低くなった。アニサキス属 L3 は急激な濃度変化よりも、長期間高浸透圧溶液に浸漬されることで、生存率が低下する可能性があることが確認された。

第5章 総括

寄生虫の一種であるアニサキス亜科線虫は多種の水産物に寄生しており、食中毒の原因物質として世界で広く問題となっている。日本では近年アニサキスによる食中毒事件の発生件数が増加しており、アニサキスに対するリスク低減策の確立が急務となっている。刺身や寿司といった水産物の生食文化がある本国では、生食に適用可能な方法が望ましいが、有効な方法として挙げられるのが冷凍である。諸外国では“寄生虫”予防の観点で考え、凍結温度・保存温度・保存期間がそれぞれ設定されている。しかし、本国においては、“-20℃で24時間冷凍”と記載されるにとどまっているのが現状である。冷凍によるアニサキスの死滅条件は凍結時の魚体の大きさ、使用する凍結方法によって異なることが予測されるが、詳細な検討が行われてきていない。さらに、現在様々な凍結方法があるが、方法によっては現在示されている期間よりも短期間の処理でアニサキスを殺滅できる可能性がある。本試験では、魚体中に存在するアニサキスの死滅条件を明らかにすることを目的として試験を行った。また、冷凍とアニサキス L3 の生死の関係を明らかにするため、アニサキス L3 自体の凍結と生死の関係や凍結耐性を検討した。

冷凍以外のアニサキス L3 の殺滅方法に、塩や酢などを使用する化学的方法がある。塩蔵は魚の長期保管に多く使用される方法であり、アニサキス L3 の殺傷に効果があることが確認されている。塩はシメサバといった加工品の調味にも使用される。しかし、塩によるアニサキス L3 の殺滅効果について、その要因等が明らかにされていない。本試験では、塩溶液に浸漬した時の影響を明らかにすることを目的とした。

アニサキスによる食中毒を考えるに当たり、アニサキスによる汚染状況を把握することが重要だが、漁獲時期や漁獲方法などの違いによる詳細な調査が行われてきていなかった。また、魚体の大きさ(魚体重、体長)や、アニサキス L3 が寄生していることが多い内臓の重量と寄生率の関係についてサバでの検討が行われていない。本試験では、アニサキス L3 の寄生状況の調査を行った。また、死滅条件を検討するにあたり、アニサキス L3 の生死判断基準をどのように設定するかが重要となるので、アニサキス L3 の生死判断方法の確立を目指した。日本におけるアニサキスによる食中毒の発生原因食品として最も多いのがサバであるが、本研究では、サバに寄生しているアニサキス属 L3 に着目した。

第1章では、青森県八戸港で水揚げされたサバについて調査を行い、漁法別、水揚げ日別のアニサキス L3 の寄生状況および、魚体の大きさや内臓重量と寄生率との関係を明らかにした。また、アニサキス L3 の生死の判断方法について、以前に報告されている手法の有用性について確認を行った。八戸港に水揚げされたサバは漁獲方法(定置網、旋網)や漁獲時期に関わらず、アニサキス L3 によく汚染されていた。アニサキス L3 はサバなどの魚類にとっては餌由来であるので、摂餌量が多いほどアニサキス L3 の寄生率が高くな

ることが予想されたが、内臓重量や胃内容物重量、種類と寄生率の間に明確な関係性は見られなかった。また、同港で水揚げされたサバに寄生していたアニサキス亜科線虫は、第3期のアニサキス属Ⅰ型もしくはⅡ型幼虫であった。アニサキス L3 の生死の判断方法に関しては、0.9%NaCl 溶液中(35℃)での処理、UV 照射が有用であることを確認した。

第2章では、示差走査熱量計(DSC)を用い、アニサキス属 L3 の凍結と生死の関係について検討した。以前に報告された DSC による線虫やテラノーバ属 L3 の凍結耐性に関する試験は密閉された系で行われており、線虫の凍結は DSC 信号のみで判断されていたが(Stormo et.al, 2009)、本試験で使用した機器は本体に顕微カメラを接続することで、目視による観察を同時に行うことが可能となった。アニサキス属 L3 は-20℃などのマイナス温度帯まで冷却しても凍結しなければ死亡しないが、ひとたび凍結すると、体内に氷結晶が形成されたことによる損傷が起き、死亡していた。本試験では容量の大きい測定容器(約 100 μ l)を使用することにより、既報のもの(数滴)より多量の溶液や、実際の魚肉を添加した試験を行うことが可能となった。アニサキス属 L3 は添加した 40 μ l 0.9%NaCl 溶液中の水分が凍結するとただちに凍結していた。また、サバの内臓の成分組成を想定して作製したモデルゲル中でアニサキス属 L3 を凍結試験から、内臓脂肪といったほとんどが脂質で構成される部位の方が、水分含有率が高く、脂質含有率の低い他の部位より高い温度で凍結が完了し、寄生部位の組成の違いにより受ける影響が異なることが示唆された。さらに、アニサキス L3 の周囲の筋肉組織が凍結終了するとアニサキス属 L3 は死亡することが、実際のサバミンチ肉中にアニサキス属 L3 を埋没させて凍結した試験から示唆された。

第3章では、サバに寄生しているアニサキス属 L3 の死滅条件について検討した。フリーもしくはセミドレス状での凍結および冷凍保管において、-20℃に温度を下げてから-20℃で24時間保管することは、アニサキス属 L3 の殺滅に有効であることを確認した。これまでに様々な魚種でアニサキス L3 の死滅条件の検討が行われてきているが、寄生部位の温度との関係を検討しているものはみられない。ラウンド状態サバの個別凍結の場合、凍結方法、保管温度に関わらず、アニサキス属 L3 の殺滅条件は、“寄生部位を-15℃以下まで低下させる”であることが示唆された。-30℃アルコールブライン凍結では、1時間で内臓に寄生しているアニサキス属 L3 を死滅させることが可能であった。

第4章では、化学的方法として塩に着目し、様々な濃度の NaCl 溶液にアニサキス属 L3 を浸漬し、その影響を確認した。高濃度の塩溶液に浸漬するほどアニサキス属 L3 の重量は減少し、生存率が低くなっていた。また、アニサキス属 L3 は、周囲の塩濃度が急激に高くなるよりも、高濃度の溶液に長時間さらされることによりダメージを受けることが示唆された。

以上、本研究より、アニサキス属 L3 は、低温耐性はあるが凍結耐性はなく、周囲の組

織が凍結し、アニサキス属 L3 自身が凍結すれば死亡することを明らかにした。現在、アニサキス L3 の殺滅のためには、最低でも数十時間の冷凍保管が必要とされているが、ラウンド状態のサバについて、個別凍結での死滅条件について確認し、凍結時に選択する方法によっては、短時間で内臓に寄生しているアニサキス属 L3 を死滅させることが可能であることを示した。アニサキス L3 を殺滅させるために短時間の冷凍処理を行い、魚体を一度アニサキス L3 の殺滅に必要な温度まで低下させれば、冷凍保管期間をおかずに、チルドで流通させるといった流通形態をとることができる可能性があることが示唆された。

サバの加工品のひとつであるシメサバは、塩と酢で調味する。冷凍原料の使用もしくは製造後冷凍される。塩によるアニサキス L3 に対する殺傷効果があるので、塩で処理されたサバは、冷凍による殺滅条件が未処理のものよりマイルドになる可能性がある。本研究では、冷凍と塩の影響について個別に検討したが、組み合わせによる殺滅条件を明らかにすることで、アニサキス L3 の殺滅のための冷凍処理期間を短縮し、より早く提供することが可能となる可能性がある。今後、様々な方法の組み合わせによる条件設定が望まれる。

本研究では寄生虫の中でもサバに寄生しているアニサキス属幼虫に着目した。しかし、アニサキス属はサバのみならず多種の魚に寄生しており、“アニサキス”として食中毒原因物質となるのはテラノーバ属、コントラシーカム属を含む“アニサキス亜科”の線虫である。さらに、水産物の食中毒の原因となりうる寄生虫として、日本ではヒラメに寄生している寄生虫であるクドア・センテンブクタータ、ホタルイカなどに寄生している旋尾線虫、アユやフナなどに寄生している横川吸虫などがおり(食品安全委員会)、寄生虫によっては宿主中に寄生時、冷凍保管中に長期間生存するものがあるといわれている(農林水産省)。今後さらに、寄生虫による食中毒防除のため、アニサキス属以外のアニサキス亜科線虫、および他種の寄生虫にも適用可能な方策を検討が望まれる。

Reference

Adams A. M., Ton M. N., Wekell M. M., Mackenzie A. P. and Dong F. M., 2005. Survival of *Anisakis simplex* in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomia*) during frozen storage. *J. Food Prot.* **68**(7). 1441-1446.

Adeel A. B., Kenneth E. A. and Charles V S., 2004. Infections related to the ingestion of seafood. Part II: parasitic infections and food safety. *Lancet Infect Dis.* **4**. 294-300

G. V. Celano, A. Paparella, A. Fransvea, C. Balzaretto and G. Celano. 2013. Rapid method for detection of Anisakidae larvae in marine fishes, based on UV transillumination. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(4). 392-394.

CETMAR. http://parasite-project.eu/didactic/Workshop_UV-Press_en_web.pdf (2016.7.25)

K.G.Davy, M.Fuse and R.I.sommerville. 1993. Stress-induced failure of osmoregulation in the parasitic nematode *Pseudoterranova decipiens*: indirect evidence for hormonal regulation. *J.exp.biol.* **180**. 263-271.

T. L. Deardorff and R. Throm, 1988. Commercial blast-freezing of third-stage *Anisakis simplex* larvae encapsulated in salmon and rockfish. *J.parasit.*, **74**(4). 600-603.

European Food Safety Authority., 2010. Scientific option on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal.* **8**(4). 1543.

D. Molina-Fernández, D. Malagón, M. Gómez-Mateos, R. Benítez, J. Martín-Sánchez, F. J. Adroher. 2015. Fishing area and fish size as risk factors of *Anisakis* infection in sardines (*Sardina pilchardus*) from Iberian waters, southern Europe. *International journal of food microbiology*. **203**. 27-34.

M.Fuse and K.G.Davy. 1993. Osmoregulation in the parasitic nematode *Pseudoterranova decipiens*. *J.exp.biol*. **175**. 127-142.

P. V. Gustafson. 1953. The effect of freezing on encysted *Anisakis* larvae. *J.parasit.*, **39(6)**. 585-588.

Hayashi M., Katagiri C., D. A. Warton, Amino H., Kita K. and Murase N., 2012. Cold tolerance and lipids composition of the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *Cryobiology and Cryotechnology*. **58(2)**. 185-190.

Hayashi M., Katagiri C., Izumi Y. and Murase N., 2014. Lipids in Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *Cryobiology and Cryotechnology*. **60(2)**. 123-126.

Hiraoki M. and Oka S., 2007. Fish and Anisakis. III Infection to fish. Nippon Suisan Gakkai. pp123.

N. S. Hochberg and D. H. Hamer. 2010. Anisakidosis: Perils of the deep. *Clinical Infectious Diseases*. **51(7)**. 806-812.

Iida Y., Oka S., Daikoku T and Oishi K. 1987. Effect of acetic acid reagent and vinegar on the activity of *Anisakis* larva. *Bulletin of Fisheries Sciences, Hokkaido University*. **38(3)**. 301-310.

Ishihara S. 2007. A study about the construction method of regional brand in Hachinohe city: Trial for creation of the Hachinohe mackerel brand. *Hirosaki Univ.* **4**. 41-59.

G. B. Jagdale and P. S. Grewal, 2003. Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures : trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. *International Journal for Parasitology*. **33**. 145-152.

H. Karl, F. Baumann, U. Ostermeyer, T. Kuhn, S Klimpel. 2011. *Anisakis simplex* (s.s) larvae in wild Alaska salmon : no indication of post-mortem migration from viscera into flesh. *Disease of aquatic organisms*. **94**. 201-209.

Kominani Y., Watanabe M and Suzuki T., 2012. Histological study of extracellular matrix influenced by ice crystal formation in fish tissue – Simultaneous observation of ice crystal morphology and extracellular matrix by applying immunohistochemical staining. *Trans. of the JSRAE*. **29(2)**. 307-315.

Koseki M., Kitakami S., Kato N and Arai K., 2006. Rigor mortis of fish and shellfish and evaluation of freshness of their muscle as K value. *Journal of the School of Marine Science and Technology, Tokai University*. **4(2)**. 31-46.

Koyama. R., 2007. Fish and Anisakis. I Anisakinae. *Nippon Suisan gakkai*. pp9-19.

A. L Lanfranchi and N. H.Sardella. 2010. Anisakids survival after microwaving, freezing, and salting fish from Argentina. *Food Sci technol res*. **16(5)**. 499-504.

Maki J., Sekiya Y., Tanabe K., Hunabashi T., Tamai E., Yuasa H., Kawase M., Sakagami H., 2012. Generic research of provision for penetration, primary and secondary prophylaxis for *Anisakis* which cause society and financial loss. *Matsuyama University*. **24(4-2)**. 521-543.

Matsubara H., Kimura G., Takeuchi M., 2014. Effect of storage temperature and duration on the quality of frozen chub mackerel frozen storage examination on extremely fresh frozen chub mackerel (*Scomber japonicus*) (II). *Report of AITC food research insti.*, **5**. 23-32.

Meguro Parasitology Museum. 2016. <http://www.kiseichu.org/Documents/J7-30-437.pdf> (2016.7.1)

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/foodpoisoning/f_encyclopedia/anisakis.html (2014.6.1)

Food safety commission of Japan. 2014. http://www.fsc.go.jp/sonota/kiseichu_foodpoisoning2.html (2014.6.1)

Ministry of Health, Labour and Welfare. http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunit suite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/04.html (2016.7.1)

Ministry of Health, Labour and Welfare. <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000120970.pdf> (2015.10.1)

Mochizuki S., Ueno Y., Satoh K and Hida N., 1999. Effects of storage temperature on post-mortem changes in the muscle of chub mackerel. *Nippon suisan gakkashi*. **65(3)**. 495-500.

A.D.Molina-García and P.D.Sanz., 2002. *Anisakis simplex* larvae killed by high-hydrostatic pressure processing. *Journal of food protection*. **65**(2). 383-388.

Murata I., 2003. Anisakiasis and the screening of larvicidal compounds from the nature remedies for *Anisakis simplex*. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P. H.*, **54**. 3-10.

NIID 2014. Anisakiasis. <http://www.nih.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/314-anisakis-intro.html> (2014.6.1)

Ohshima T., 1968. *Anisakis* and Anisakiasis. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*. **21**. 95-101.

Oishi K. & Hiraoki. M., 1971. *Anisakis* larvae and preventive method for Anisakiasis. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*. **37**(10). 1020-1030.

Oishi K. and Hiraoki M., 1973. Food hygienic studies on *Anisakis* larvae-IV on the relation between the mortality and the penetration capacity of the larvae into an agar layer. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*. **39**(12). 1345-1348.

Oishi K., 2007. Fish and *Anisakis*. IV Food hygiene. Nippon Suisan Gakkai. pp126-144.

J. A. Sakanari and J. H. Mckerrow, 1989, Anisakiasis. *clinical microbiology review*. **2**(3). 278-284.

Satomi M., 2010. Histamine. *Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi*. **57(8)**. 366.

Shiotubo S., 1991. Apply of thermal analysis for food. (No.1). *Science of cokkery*. **24(1)**. 54-61.

S.K. Stormo, K. PRÆBEL and E.O. Elvevoll. 2009. Cold tolerance in sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) due to heat-shock adaptations. *Pasasitology*. 136. 1317-1324.

Suzuki J. and Murata M., 2011. A review of Anisakiasis and *Anisakis* larvae in Japan : from the prevalence and risk of Anisakis infections to the Identification of *Anisakis* larvae. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P. H.* **62**. 13-24.

Takahara I., 2011. Infection of Anisakinae to Sagittated calamary. *Hokkaido Univ.*

Takeuchi M., Akita K., Terado N., Matsubara H., 2015. Investigation of seasonal change on crude fat, EPA and DHA content in mackerel landed on Hachinohe fishery port and development of application to NIR spectral measurement of them. *Report of AITC food research insti.*, **6**. 77-90.

Tanaka A., Yamamoto H., Hayashi M., Amino H., Kita K. and Murase N., 2011. DSC analysis of freezing process of nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cryobiology and Cryotechnology*, **57(1)**. 91-94.

U.S. Food and Drug Administration ., 2011. Fish and fishery products hazards and controls guidance, fourth edition, chapter 5: parasites. pp92.

S. Vidaček, C. des las Heras, M.T. Solas, A. Mendizábal, A. I. Rodriguez-Mahillo, M. González-Muñoz and M. Tejada. 2009. *Anisakis simplex* allergens remain active after conventional or microwave heating and pepsin treatment of chilled and frozen L3 larvae. *J. Sci. Food Agric.* **89**. 1997-2002.

Watanabe M., 2009. Technology of food refrigeration. 3. Physics of food refrigeration. *Trans of JASRAE*. pp35,37,42.79.

D.A. Wharton and O. Aalders. 2002. The response of *Anisakis* larvae to freezing. *Journal of helminthology*. **76**. 363-368.

extra Table1 Fishing port, means for catching, parameter of mackerel, number of larva

Date	Port	Means	FL ^{※1,2}	BW ^{※1,2}	Viscera ^{※1}	Gastric content ^{※1}	Larva(viscera/meat) ^{※1}
2014.6.3	Ishinomaki	fixed net fishery	320.4±12.4	522.0±51.3	44.3±8.4	4.9±4.7	56(56/0)
2014.6.26	Ishinomaki	fixed net fishery	377.3±8.9	722.6±67.1	93.9±19.0	38.4±19.6	54(51/3)
2014.7.15	Hachinohe	fixed net fishery	370.0±12.7	633.3±47.3	46.0±7.3	-	82(81/1)
2015.6.3	Misawa	pole and line fishing	287.9±36.5 ^{※4}	396.3±36.5 ^{※3}	34.4±12.4	1.0±1.3	85(85/0)
2015.6.16	Hachinohe	fixed net fishery (2:30) ^{※5}	369.3±15.7 ^{※4}	455.3±54.3	35.0±8.8	1.0±1.8	111(108/3)
2015.6.16	Hachinohe	fixed net fishery (6:30) ^{※5}	384.2±35.8 ^{※4}	529.7±126.8	48.4±25.1	1.0±1.8	64(64/0)
2015.6.23	Hachinohe	fixed net fishery	337.9±44.7 ^{※4}	597.4±100.5	47.5±23.9	0.5±0.5	122(115/7)
2015.7.7	Hachinohe	fixed net fishery	249.8±16.6 ^{※4}	208.2±43.7	-	-	8(8/0)
2015.8.6	Hachinohe	round houl netting	312.4±30.9	389.3±123	30.8±11.8	0.2±0.4	71(71/-)
2015.8.31	Hachinohe	round houl netting	321.6±39.6	428.0±191.8	42.63±22.1	4.5±2.8	30(30/-)
2015.9.2	Hachinohe	round houl netting	323.3±28.7	431.6±133.4	28.7±12.0	0.3±0.5	32(32/-)
2015.9.4	Hachinohe	round houl netting	308.9±27.9	383.6±120.7	41.3±12.8	12.6±6.8	43(43/-)
2015.9.14	Hachinohe	round houl netting	337.6±17.4	488.8±97.8	41.8±47.8	1.5±3.3	66(66/-)
2015.9.15	Hachinohe	round houl netting	324.7±29.2	430.3±123.7	32.0±13.6	3.1±5.2	59(59/-)
2015.9.16	Hachinohe	round houl netting	324.4±24.2	506.0±145.2	66.4±28.1	26.7±24.1	45(45/-)
2015.9.24	Hachinohe	round houl netting	321.2±34.7	431.5±155.3	34.5±14.1	3.0±2.7	250(250/-)
2015.9.25	Hachinohe	round houl netting	321.8±29.5	436.6±131.8	43.5±131.8	4.1±4.6	244(244/-)
2015.10.20	Hachinohe	round houl netting	310.1±29.2	386.7±133.0	36.7±9.6	5.7±3.5	167(167/-)
2016.10.27	Hachinohe	fixed net fishery	376.2±14.6	765.4±88.3	55.4±11.6	0.9±4.5	158(158/-)
2015.11.06	Hachinohe	round houl netting	325.6±21.4	419.2±90.2	33.6±10.6	3.7±1.3	211(211/-)
2015.11.12	Hachinohe	fixed net fishery	370.8±83.7	783.8±193.8	70.4±21.3	3.6±4.2	63(63/-)
2015.11.17	Hachinohe	fixed net fishery	355.2±13.3	649.6±98.7	51.9±11.3	0.2±0.3	126(126/-)
2015.11.30	Hachinohe	fixed net fishery	321.7±29.9	400.2±137.1	26.8±12.6	0.6±0.3	147(147/-)

*: p<0.05, **: p<0.01

※1 FL:mm, BW, Viscera, Gastric content:g,

※2 BL:body length, FL:fork length, BW:body weight

※3 body weight of mackerel caught by single-hook fishing is excepted for tail

※4 body length(mm)

※5 time of landing

extra Table2 Rate of parasitism, correlation between rate of parasitism and each parameter of mackerel.

Date	RP ^{※1,2}	ANN ^{※1,2}	RNN ^{※1,2}	Correlation			
				Larva/FL	Larva/BW	Larva/Vicera	Larva/gastric content
2014.6.3	100(8/8)	7.0	7.0	-0.70	0.18	-0.35	0.18
2014.6.26	100(7/7)	7.7	7.7	-0.11	-0.02	-0.63	-0.69
2014.7.15	100(10/10)	8.2	8.2	-0.03	0.27	-0.10	-
2015.6.3	88.2(15/17)	5.7	5.0	0.2 ^{※3}	0.27	0.50 [*]	0.15
2015.6.16	95.4(21/22)	5.3	5.0	-0.04 ^{※3}	-0.20	0.11	0.01
2015.6.16	85.7(12/14)	5.3	4.6	-0.11 ^{※3}	0.24	0.02	0.17
2015.6.23	94.1(16/17)	7.6	7.2	0.22 ^{※3}	0.65 ^{**}	0.57 [*]	-0.25
2015.7.7	75(3/4)	2.7	2.0	-	-	-	-
2015.8.6	95.3(20/21)	3.6	3.4	0.42	0.34	0.29	-0.1
2015.8.31	66.7(8/12)	3.8	2.5	0.30	0.19	0.14	0.21
2015.9.2	83.3(10/12)	3.2	2.7	0.01	-0.06	-0.05	-0.08
2015.9.4	80(16/20)	2.7	2.2	-0.24	-0.28	-0.38	-0.08
2015.9.14	87.0(20/23)	3.3	2.7	0.06	0.02	-0.2	-0.05
2015.9.15	95(19/20)	3.1	3.0	0.50 [*]	0.40	0.27	-0.02
2015.9.16	88.9(8/9)	5.6	5.0	-0.56	-0.12	0.27	0.68 [*]
2015.9.24	100(21/21)	11.9	11.9	0.62 ^{**}	0.62 ^{**}	0.60 ^{**}	0.23
2015.9.25	100(20/20)	12.2	12.2	0.64 ^{**}	0.62 ^{**}	0.73 ^{**}	0.48 [*]
2015.10.20	100(27/27)	6.2	6.2	0.31	0.30	0.23	0.14
2016.10.27	90(27/30)	5.9	5.3	0.2	0.10	0.10	-0.15
2015.11.06	89.7(26/29)	8.1	7.3	-0.04	-0.07	-0.02	-0.11
2015.11.12	87.0(20/23)	3.2	2.7	0.00	-0.07	-0.06	-0.17
2015.11.17	85.7(24/28)	5.3	4.5	0.20	0.19	-0.10	-0.08
2015.11.30	100(21/21)	7.0	7.0	-0.01	0.24	0.15	-0.13

*: p<0.05, **: p<0.01

※1 larva: number, ANN, RNN :larva number/one mackerel, RP: %

※2 RP: rate of parasitism, ANN: average number of nematode, RNN: relative number of nematode

※3 body length

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始懇切なご指導をくださいました、東京海洋大学食品冷凍学研究室の鈴木徹教授、渡辺学教授に心から感謝いたします。また、本論文をまとめるにあたり、貴重なご助言を下さいました、東京海洋大学の岡崎恵美子教授、同萩原智明教授にこの場を借りて深く御礼申し上げます。

本論文は、私が平成 25 年 10 月から平成 28 年 9 月まで(地独)青森県産業技術センター食品総合研究所で行った研究成果をまとめたものであり、その過程で(地独)青森県産業技術センター八戸地域研究所工藤謙一所長、同食品総合研究所松原久企画経営監、同弘前地域研究所高橋匡主任研究員、下北地域県民局地域農林水産部小坂善信部長を始め、様々な方にご指導を賜りました。お世話になりました皆様に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究は文部科学省文部科学省平成 27 年度海洋生態系研究開発拠点機能形成事業補助金東北マリンサイエンス拠点形成事業の一環として実施いたしました。本研究の成果が青森県八戸市のサバ産業の発展の一助になることを願っています。

本研究を遂行する上で多くの助言や補助をいただき、また、研究を行う環境を整えてくださった食品総合研究所職員の皆様に感謝いたします。最後に、絶えず励まし力となってくれた友人、家族に感謝の気持ちを送ります。

平成 28 年 9 月 竹内 萌