アニサキス(Anisakis sp.)幼虫Ⅰ型の食品衛生学的研究: 特に寒天侵入法による感染能力判定

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4625

金沢大学十全医学会雑誌 第84巻 第5・6号 478－489（1975）

アニサキス（*Anisakis* sp.）幼虫Ⅰ型の食品衛生学的研究

――特に寒天侵入法による感染能力判定――

金沢大学医学部医動物学講座（主任：吉村裕之教授）
大石圭一

（昭和50年7月28日受付）

Van Thiel ら[1]がオランダにおいて，11名の急性腹痛を主訴とする患者の外科的手術により小腸病巣部から摘出された幼線虫が，ニシンに寄生するアニサキス（*Anisakis*）幼虫であることが明らかにされて以来，各種の魚介類に寄生する幼線虫の人消化管壁の穿入に基づく好酸球性肉芽腫がアニサキス症（Anisakiasis）として内外の注目をひき，本症の寄生虫学的，臨床病理学的さらに疫学的観点からの研究が広くなされている．鮮魚を生食する食習慣のある我が国では殊にその発症が多く，吉村[2]，大鶴[3]，石倉[4]，大島[5]，岩野ら[6]等多数の臨床例の集計的検討により，ここ数年ですでに500例をこす報告がなされている．1972年鈴木ら[7]及び著者ら[8)~11)]により，アニサキス幼虫とは近縁種ではあるが，形態学的には異なるアニサキス亜科に属するテラノーバ属線虫（*Terranova* sp.）の幼虫による胃アニサキス類似症例の報告がなされ，新しい起病体として注目されてきた．この様な魚介類寄生の幼線虫の問題は我が国のみならずアジア地域，さらにはヨーロッパの特殊な食品嗜好の国々において食品衛生学上極めて重要な問題となっている．

既に著者ら[12]はアニサキス症の食品衛生学的研究としてAnisakinae に属する *Anisakis* Ⅰ型，*Terranova* A型及び *Contracaecum* A型の3種幼線虫の肉眼的識別法を確立して，種々の物理及び化学的（温度，放射線，超音波；各種塩類液，調味料，食品添加物，駆虫剤など）作用に対する抵抗性について明らかにしてきた．然しこれらの外的処置を加えて幼虫の抵抗性を判断する場合，感染能力の有無を知ることが実際的ではあるが，幼虫の動物への感染実験による胃壁穿入の結果（胃壁穿入率）から判定することは，その成績にバラツキが大きく必要な精密度をうるためには種々の不便を免れない．

このような観点から Ruitenberg[13)14)]は胃壁穿入率よりバラツキの少ない寒天を用い，その侵入試験方法を考察し，寒天侵入率とウサギ消化管壁穿入率との比例性から活力表示が可能であることを示した．著者ら[15]は Ruitenberg の原法に2～3の欠点のあることをみとめ改良法を提案した．本論文は改良を加えた寒天侵入試験を適用して *Anisakis* 幼虫Ⅰ型を加熱，低温および超音波により，寒天侵入率を求め，その結果から *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の感染能力の判定に用いられることを明らかにしたものである．以下得られた成績について記述する．

実験材料と方法

供試 *Anisakis* 幼虫Ⅰ型はスケトウダラ（*Theragra chalcogramma*）およびマダラ（*Gadus macrocephalus*）の肝臓より採集した．

Anisakis 幼虫Ⅰ型は被膜で囲まれた嚢包（以下シストという）内に入ったまま肝臓表面の皮膜に付着している．このシストを生理食塩水（0.85%食塩水）中に入れておくと室温で幼虫がシストより自然に脱出するので，脱出したものを集めた．この幼虫の中には，*Anisakis* 幼虫Ⅰ型の他に，*Terranova* 幼虫A型および *Contracaecum* 幼虫A型が混在するので次の方法により分けた．

Terranova 幼虫A型，*Contracaecum* 幼虫A型および *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の混在する幼虫を生理食塩水を入れたシャーレの中に移し，自由に遊泳させておく．*Anisakis* 幼虫Ⅰ型がシャーレ内を運動して一面に拡がった時期を選び，シャーレの縁を軽く叩き，物理的振動を与えた．その瞬間 *Anisakis* 幼虫Ⅰ型は，急激に体を縮め，互にからみ合い，塊状となり容易につまんで取り出せるようになる．この塊状の

Food hygienic studies on *Anisakis* larvae (Type-Ⅰ), with reference to evaluation of infectivity of larvae, using agar layer technique. **Keiichi Oishi,** Department of Medical Zoology, (Director: Prof. H. Yoshimura), School of Medicine, Kanazawa University.

Anisakis 幼虫Ⅰ型を別の生理食塩水の入れてあるシャーレの中に移す．*Anisakis* 幼虫Ⅰ型の塊の中には，若干の *Terranova* 幼虫A型や *Contracaecum* 幼虫A型が含まれることがあるが，シャーレに移された *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の塊は再び運動を始め，溶液中に広く分散する．またこのシャーレを物理的に刺激を与えると再度集合し塊状にさせた後，別の生理食塩水の入っているシャーレに移す．この操作を数回繰返すことにより，*Anisakis* 幼虫Ⅰ型だけを採集することができる．

採集した幼虫は著者による肉眼的識別法[15]に従って確認した．

識別に利用した肉眼的特徴は：1）*Anisakis* 幼虫Ⅰ型はシスト内および生理食塩水中で刺激を与えられた時は平板渦巻状の形になる．一方 *Terranova* 幼虫A型および *Contracaecum* 幼虫A型は伸長した形で渦巻状ではなく，物理的刺激を与えても伸長していて，形状に変りはない．特に *Terranova* 幼虫A型は5℃付近に放置すると刺激を与えなくても縦長のラセン状に渦巻くことがあった．

よく活動する *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の虫体は，白色半透明で，虫体の先端より，約2mm後方に体色と色調を異にした白色矩形状の長さ約1mmの胃が肉眼で観察される．*Contracaecum* 幼虫A型は生時でも胃部の肉眼的観察はできない．*Terranova* 幼虫A型の体色は普通茶褐色であり，試料によっては赤あるいは黄色が目立つこともあって，*Anisakis* 幼虫Ⅰ型や *Contracaecum* 幼虫A型と明らかに区別出来る．生時，*Terranova* 幼虫A型では胃部が *Anisakis* 幼虫Ⅰ型のように白色に見えるが，更に胃部の下一隅が腸盲嚢の陰となり，欠損して観察される．

Anisakis 幼虫Ⅰ型の体長は小山ら[16]によれば28.6±4.4mm，体幅は0.48±0.08mmであって，*Terranova* 幼虫A型の体長の半分にあたる．また *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の体長は *Contracaecum* 幼虫A型のそれより幾分長いものが多くみられるが，体幅は細く他の2種の幼虫に較べより細い．なお *Contracaecum* 幼虫A型は3幼虫の中で最も太い．

生理食塩水中での運動は *Terranova* 幼虫A型が最も力強く，*Contracaecum* 幼虫A型は最も微弱で，*Anisakis* 幼虫Ⅰ型はその中間である．

なお実験には運動の活発でないものを除外し，さらに念のため著者[15]による肉眼的識別に従って確認した虫体の一部を60℃の70%エタノールで固定し，エタノール・グリセリン液，またはラクトフェノール液で透化後，顕微鏡で観察し，小山ら[16]および小山[17]の方法による確認試験を行い，著者の識別法の正当であることを確認した．

寒天侵入試験は次の様にして行なった．

使用寒天は通常細菌培養に用いる粉末寒天（和光純薬）10gを蒸留水に入れ，直火または湯浴上で加熱溶解し，1%の寒天溶液を作製する．これを中試験管(直径16mm，高さ160mm）に7cmの高さになるまで入れ，綿栓を施し，オートクレーブ中で110℃30分間加熱する．その後寒天が冷却固化してから，寒天の表面に直径約1mmのガラス棒で5カ所に穴をあけ，寒天表面に凹凸をつけ，*Anisakis* 幼虫Ⅰ型が寒天層内に侵入し易くする．実験実施の直前に更に固化した寒天層の上方に，深さが3cmになる様に生理食塩水を加え，綿栓をする．実施の状況は図1および図2に示した．即ち実験目的の処理を施した *Anisakis* 幼虫Ⅰ型を1試験管あたり5あるいは10隻，稀には20隻をピンセットです早く寒天上層の生理食塩水中に入れ，直ちに綿栓をする．これを37°±1℃のフ卵器中に置き，3日後に寒天層に侵入した幼虫を観察し，その数を算定した．

原報では寒天上層にニシン血液を入れているが，本法では既述のように生理食塩水を加えた．

1．*Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入能力に及ぼす温度の影響

1）無処理の場合

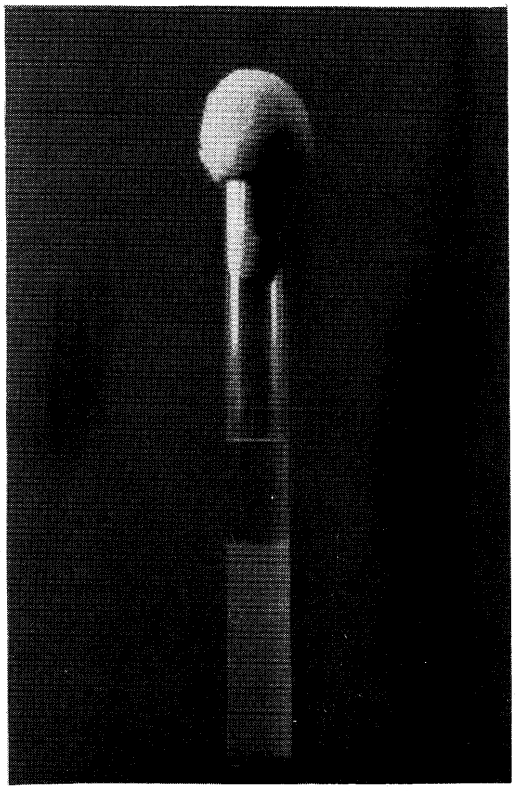
Anisakis 幼虫Ⅰ型に，何ら処理を加えなかった *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入能力を検査した．幼虫採集後から実験までの日数は1，4，6日であり，供試幼虫は1試験管当り10あるいは20隻で計820隻である．供試幼虫は試験管内にあらかじめ入れてある生理食塩水の層のところに入れ，直ちに綿栓をし，37℃のフ卵器内に入れた．そして3日後に取出し幼虫が食塩水層から寒天層に侵入した数を数え，寒天侵入率を求めた．

2）加熱処理の場合

加熱処理実験は5隻を1群とし，温度と処理時間を種々組合せ199群について行った．これらの実験は40℃から60℃までの間の温度で生理食塩水30mlを入れた100ml容ビーカーに幼虫を入れ，これを所定温度の恒温水槽に保った．所定時間処理した幼虫はビーカーより取出し直ちに寒天侵入率測定のための試験管に入れ，37℃のフ卵器内で3日間保ち，寒天層に侵入した幼虫数を数えた．

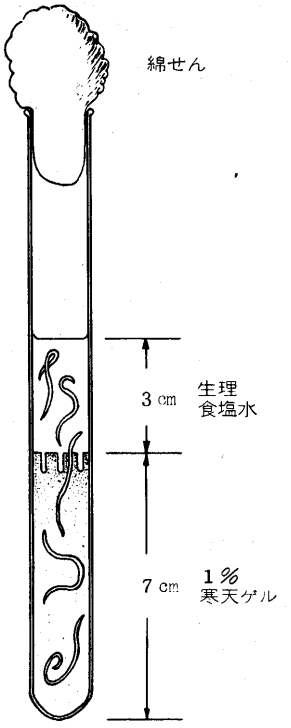
同時に5隻を1群とし10群の幼虫を無処理のまま寒天侵入試験を実施し，寒天層侵入幼虫数を数え対照群とした．

図1 アニサキス幼虫Ⅰ型の寒天侵入試験に用いた試験管



注：下方寒天ゲル内には侵入虫体がみえる

図2 アニサキス幼虫Ⅰ型の寒天侵入試験に用いた試験管および寒天生食水の模式図



3）低温処理の場合

5隻を1群とし温度，時間を組合せた20群について実験を行った．低温処理は脱脂綿片に生理食塩水を吸収させたものを1片ずつ薬包紙上に拡げ，これを－10℃に調節してあるクールニックスエア（CTB－1B）中に保った．予め－10℃にしてある脱脂綿に *Anisakis* 幼虫Ⅰ型5隻ずつをのせ，クールニックスエア中で－10℃に保ち，1，2，3，3.5，4，4.5時間後に5群ずつ取出し，室温の生理食塩水中で融解させ，直ちに寒天侵入率測定用試験管に入れ，前記試験と同様に37℃のフ卵器に3日間保ち，寒天層に侵入した *Anisakis* 幼虫数を数えた．

更に低温処理温度を －3℃，－5℃，－7℃，－10℃，－13℃，－15℃の6種とした実験では前記低温処理実験と同様に幼虫を処理し，寒天侵入試験を行った．しかし本実験では各温度において *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入能力が消失するまでの時間の測定に留めた．

次に凍結しない程度の低温処理してあるもので活発に運動する *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の1群5隻について実験を行った．クールニックスエアを－10℃と－20℃に調節し所定時間処理した実験である．所定時間後室温の生理食塩水中で融解し，これらの幼虫について寒天侵入試験を実施した．

この場合，生理食塩水を入れる代りにグリセリンを予め冷却してあるものに *Anisakis* 幼虫Ⅰ型を入れた場合も食塩水の場合と全く同様に実験した．同時に魚肉片を0℃近くまで冷却したものに *Anisakis* 幼虫Ⅰ型を5隻ずつ入れたものについても－10℃，－20℃でし，所定時間後に取り出し37℃で寒天侵入試験を実施した．

2．*Anisakis* 幼虫Ⅰ型に及ぼす超音波処理の影響

市販の超音波洗浄器（米国 Branson Inst. Co. 製，2型20キロサイクル20ワット）のステンレス製洗浄槽に，0℃，10℃，30℃，50℃の生理食塩水を入れ，各温度につき所定時間，超音波処理を施した．超

音波処理中温度調節のために，冷却あるいは加温生理食塩水を添加した．処理後は直ちに，*Anisakis* 幼虫Ⅰ型を取り出し寒天侵入試験を実施した．

実験成績

1．*Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入能力に及ぼす温度の影響

1）無処理の場合

実験成績を表1に示した．幼虫に何らの処理を行わなかった場合の寒天侵入率は表に示す如く24～91%の範囲であった．幼虫採集後から実験開始までの日数と幼虫の寒天侵入率の関係をみると，時間の経過と共に侵入能力が低下した．すなわち採集後1日では91.0±12.0%の侵入率であるのに対して，4，6日になるにつれ，27.2±21.8%，24.2±15.6%と低下した．

2）加熱処理の場合

実験成績を表2に示した．幼虫の寒天侵入率の失われる時間は40°Cでは540分，以下1°C上昇するごとに50°Cまで420，210，90，44，30，12，8，4，1.5，1分のように短縮された．

更にくわしく，40°Cから50°Cまでの各温度域で，処理時間と幼虫の寒天侵入性をみると，40°～43°Cまでは幼虫の寒天侵入性が失われるのに非常に長い時間が必要であった．40°Cでは9時間，41°Cでは7時間，42°Cでは3時間，43°Cでは1.5時間であった．しかし処理温度が高くなるに従って幼虫の寒天侵入性は短時間で失われる傾向がみられた．すなわち，47°Cでは8分，48°Cでは4分，49°Cでは2分以内であって，更に高温域の56°Cでは数秒でその力を失った．また40°～46°Cの間の温度域では処理時間が短い場合，幼虫の寒天侵入性は強まる傾向が認められた．

3）低温処理の場合

－10°Cで処理した場合，幼虫は処理時間が長くなるにつれて寒天侵入性を失う．これを表3に示した．1時間処理した場合72%の幼虫が寒天侵入能力を保持したが，4.5時間処理すると，完全にその能力を失った．次いで幼虫を各温度（低温）下に置きどの程度の時間で寒天侵入能力を失うかを検討した．その結果は表4に示した．幼虫は－3°Cでは5,460分（91時間）でその侵入性を失うのに対し，－15°Cでは20分でその侵入能力を失った．すなわち，温度が低くなるにつれて急速に侵入能力を失うことが認められた．

また幼虫をグリセリン中と魚肉中に置き，－10°Cと－20°Cの温度下におくと，－10°Cのグリセリン中に置いた幼虫は20分間置いても60.0±16.3%の寒天侵入能力を保持していたが，－20°Cのグリセリン中に20分間置いた幼虫は全く寒天侵入能力を示さなかった．これに反して－10°Cの魚肉中に置いた幼虫は20分間で10.0±11.5%しか侵入能力を示さず，更に－20°Cの魚肉中に20分間置いた場合は全くその侵入能力を示さなかった．この結果から幼虫は低温処理されると，寒天侵入能力を失い，たとえ低温下であっても凍結されない場合は侵入能力を少くとも保持しうることが明らかにされた．

表1　*Anisakis* 幼虫Ⅰ型の37°Cにおける寒天侵入能力

採取後の日数（日）	全供試幼虫数（隻）	侵入虫数（隻）	寒天侵入率（%）
1	100	91	91.0 ± 12.0
4	600	162	27.2 ± 21.8
6	120	29	24.2 ± 15.6

以上の結果を更にわかりやすくするために，処理時間と温度との関係を図式化し図3に示す様な結果をえた．図中の右は幼虫を高温で処理した場合の既述の実験データから得られた直線である．丸記号は無処理の幼虫の寒天侵入力を50%失った時の値であって，直線Bはそれらの点を結んで得られたものであり，C，A線は寒天侵入力の上，下限を示したものである．すなわち温度が高くなるに従って侵入能力を失う時間が小さくなることを示している．図中の左は低温で幼虫を処理した場合を示したものである．この場合は資料が少なく，－10°Cで幼虫を処理した場合を中心に検討したものであるが，低温になるに従って寒天侵入能力を失う時間は短くなる．C，A線はその上，下限を示したものであるが，資料数からその巾が大きくなった．

2．*Anisakis* 幼虫Ⅰ型に及ぼす超音波処理の影響

Anisakis 幼虫Ⅰ型を0°C，10°C，30°C，50°C下において超音波処理を行ったものであるが，今まで述べてきた高温ならびに低温処理を行った場合と同様に，時間が長くなるに従ってその侵入能力を失って行くのが認められた．

すなわち，表5に見られるように0°Cでは5分処理した場合，幼虫は60±40%の侵入率を示したものが処理時間の増加に従い，その侵入率は低下し，30分処理した場合，全く侵入能力を示さなかった．同時に処理温度が上昇するにつれて，幼虫の侵入率は低下し，

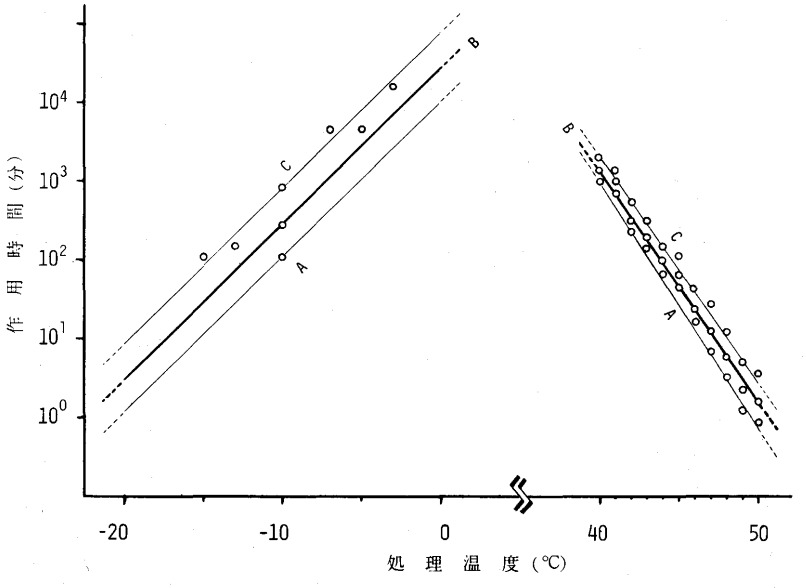
表2 熱処理した *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入率

処理温度(℃)	処理時間(分)	使用幼虫数(隻)	侵入幼虫数(隻)	侵入率(%)	処理温度(℃)	処理時間(分)	使用幼虫数(隻)	侵入幼虫数(隻)	侵入率(%)
40	120	10	6	60		18	15	3	20
	180	10	6	60		20	15	3	20
	300	10	10	100		22	10	2	20
	420	10	2	20		24	10	2	20
	480	10	1	10		26	10	4	40
	540	10	0	0		28	10	1	10
41	300	5	3	60		30	10	0	0
	360	5	2	40	46	5	15	8	53
	420	5	0	0		6	15	7	47
42	120	10	3	30		7	15	11	73
	180	10	2	20		8	15	5	33
	210	10	0	0		9	15	5	33
43	60	10	3	30		10	15	1	6.7
	90	10	0	0		11	15	1	6.7
44	20	10	5	50		12	15	0	0
	22	10	9	90	47	2	10	6	60
	24	10	6	60		3	10	5	50
	26	10	4	40		4	10	4	40
	28	10	6	60		5	10	1	10
	30	10	5	50		6	10	1	10
	32	10	6	60		7	10	1	10
	34	10	3	30		8	10	0	0
	36	10	2	20	48	1	15	2	13
	38	10	1	10		2	15	2	13
	40	10	1	10		3	15	3	60
	42	10	1	10		4	15	0	0
	44	10	0	0	49	0.5	10	5	50
45	1	20	17	85		1	10	3	30
	2	20	14	70		1.5	10	0	0
	3	5	5	100	50	0.5	10	2	20
	4	5	4	80		1	10	0	0
	5	10	10	100	54	0.033	10	2	20
	6	5	3	60		0.067	10	1	10
	7	5	3	60		0.1	10	0	0
	8	5	4	80	55	0.017	10	2	20
	10	10	6	60		0.033	10	0	0
	12	5	4	80	56	0.017	10	2	20
	14	15	5	33		0.033	10	0	0
	16	15	5	33	60	0.017	10	0	0

表3　*Anisakis* 幼虫Ⅰ型を低温処理した場合幼虫の寒天侵入状況
（温度と時間との関係）

温　度 (℃)	時　間	供試虫数 (隻)	侵入虫数 (隻)	侵　入　率 侵 (%)
−10±1（生理食塩水中）	1時間	25	18	72.0± 10.95
	2	25	3	12.0± 10.95
	3	25	1	4.0± 9.54
	4.5	25	0	0
（グリセリン中）	20分	20	12	60.0± 16.3
（魚　肉　中）	20	20	2	10.0± 11.5
−20±1（グリセリン中）	20分	20	0	0
（魚　肉　中）	20	20	0	0

図3　アニサキス幼虫Ⅰ型の寒天侵入性が50%失われる為の低温あるいは高温処理と作用時間との関係



その処理時間が少くても侵入能力を失った．このことは *Anisakis* 幼虫Ⅰ型を高温処理した場合と全く同様な成績であった．

考 察

寒天侵入試験により *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の活性測定を試みたのは，Ruitenberg[13] である．Ruitenberg は試験管中に1％の寒天溶液を入れ，冷却固化後寒天上層にニシンの血液を入れた．Ruitenberg の使用した *Anisakis* 幼虫Ⅰ型はニシンから採取したので，ニシン血液は使用幼虫に対して最適のメジウムとして選ばれたのである．

著者の研究における寒天侵入試験方法は Ruitenberg[13] により実施されたものの変法[15] で試験管中の寒天上層液にニシン血液の代りに生理食塩水を使用した．本実験において使用された *Anisakis* 幼虫Ⅰ型はマダラおよびスケトウダラより採集された．もし Ruitenberg の原報どおり実施するのであれば，マダラあるいはスケトウダラの血液を寒天上層液として使用すべきである．しかしながら今後検査所においての一連の実験を行うには生きているマダラあるいはスケトウダラの入手は困難であって，最も新鮮と思われるものでも，大部分の血液は凝固していて検査に供試できる量を採集しえない．今，仮に血液が入手しえたとしても，寒天侵入試験実施中は37°C の温度に3日間放置するので，その間に使用血液は腐敗し，*Anisakis* 幼虫Ⅰ型の生活維持の最適メジウムとはいいがたい．それ故本実験においては寒天上層液に生理食塩水を使用した．寒天上層液としてニシンあるいはマダラまたはスケトウダラの血液を使用した結果と生理食塩水を使用した結果との比較はまだされていないが，これは今後検討の予定である．

寒天侵入試験は *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の生死判定の為の実験動物感染試験に近い値を得ることが出来る．

表4 低温処理による *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入能力消失時間

処理温度 (℃)	処理時間 (分)
− 3	5,460
− 5	1,200
− 7	900
−10	270
−13	40
−15	20

表5 超音波処理した *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入能力

条件 温度 (℃)	超音波処理時間 (分)	供試幼虫数 (隻)	侵入幼虫数 (隻)	寒天侵入率 (%)
0	5	25	15	60.0 ± 40.0
	10	25	3	12.0 ± 6.0
	20	25	3	12.0 ± 6.0
	30	25	0	0
10	5	25	1	4.0 ± 8.94
	10	25	0	0
30	5	25	3	12.0 ± 11.0
	10	25	0	0
50	5	25	0	0

Anisakis 幼虫Ⅰ型の生死判定により，その活性が知られるわけであるが，なお動物に対する感染力の推定ができる．

Ruitenberg[13]による42羽のウサギを10群に分け1羽当り40隻の *Anisakis* 幼虫Ⅰ型を経口投与し，消化管壁穿入幼虫数を調べたところ40隻のうち消化管穿入幼虫数は次のような結果であった．Ⅰ，13—11—1—9—18; Ⅱ，7—9—6; Ⅲ，5—2—3—7—1—4; Ⅳ，3—8—0—7—3—2; Ⅴ，3—2—1—1; Ⅵ，15—11—7—4—10; Ⅶ，31—29; Ⅷ，15—10—17; Ⅸ，5—1—10—1—1; Ⅹ，4—4—13：この数値をもとにして，各群の間の差を分散分析すると各群の間に差があることが知られた．またこの幼虫侵入数の平均値は7.48であり，その標準偏差は7.03であって，バラツキが非常に多い．

また橋口ら[18]による温度処理した *Anisakis* 幼虫Ⅰ型のダイコクネズミに対する感染能力の調査結果によれば，供試ダイコクネズミ45頭のうち，5頭は対照群で種々の温度条件下で検討した．今この対照をも含めた6群の実験結果を検討すると，それぞれの群の間の差は大きかった．この点については著者による低温の処理の結果を寒天侵入法で試験した結果と比較してみると，−15°C20分の処理では *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入力は全く失われる．また，実験結果を図式化したものから算定すると，50%寒天侵入率となる−15°Cの処理時間は10分である．このことから一定の条件下で寒天侵入試験を行なえば動物感染実験よりはるかに目的を達し得られるのではなかろうか．

Anisakis 幼虫Ⅰ型が人体組織へ侵入するか，しないかによってアニサキス症を誘起するのであるが，この *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の活動性を知ることが発症の確率を知ることになる．この場合方法論的には動物実験によって，その活動性を知り発症の確率を推定し得るのであるが，動物実験の結果からは成績にも変動が高く，一定の推定をするにたる成績を得るのは困難である．このことは Ruitenberg[13] によっても論じられ，著者の前述の考察からもうなづける．今回著者が行った実験，特に著者の方法による幼虫の寒天侵入試験は，実施にあたっても容易で，かつ得られた成績も比較的安定しており，本法により *Anisakis* 幼虫Ⅰ型が人体内に侵入した場合の発症確率を推定し得るものであると考えられる．

1．*Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入能力に及ぼす温度処理の影響

1）無処理の場合

本研究に供試した *Anisakis* 幼虫Ⅰ型は主としてスケトウダラ肝臓の皮膜より採取したのであるが，用いたスケトウダラの漁獲後の来歴，例えば漁獲方法，漁獲後の取扱い，漁獲後の日数あるいは水揚後の処理などが明確になし得ないものが多い．従ってスケトウダラ寄生の *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の鮮度が実験動物胃壁穿入能力に関係があると思われる．それを知るために実施した実験結果では，幼虫の寒天侵入率が91，27，24%となった．このことはスケトウダラ漁獲期あるいは幼虫採取後の日数と関係があり，幼虫採集後実験開始までの日数が1，4，6日と経過するに従って寒天侵入率が次第に低下する事実から，特に漁獲後の取扱いが *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の活力に影響を与えているものと思われる．

2）加熱の場合

表2を見ると処理温度が50°Cを越えると，処理時間が1分以内に寒天侵入能力が失われる．1分以内の *Anisakis* 幼虫Ⅰ型加熱実験では，考察の対象温度を40°から50°Cまでとした．加熱処理時間（分）と寒天侵入率（%）の関係を見ると，生物特有のシグモイド状の致死曲線と一致する曲線が得られた．同様にして寒天侵入率が全く認められなくなる時間も求め，全く同様に処理してC直線を得た．

図3において直線AとCとにより挟れる一帯は *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の加熱による失活が問題となる時間帯であり，A直線より下側あるいは左側では *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入力が保持されている．またC直線の外側つまりC直線より上側および右側では，*Anisakis* 幼虫Ⅰ型はもはや寒天侵入能力を持たない領域である．

著者ら[19][20]による報告では，45°Cにおける *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の致死時間は16〜32分であるが，本実験の寒天侵入能力消失時間より若干長い．また著者[12]による *Anisakis* 幼虫Ⅰ型を45°Cで15分加熱し，寒天侵入能力が半減することを期待し，ウサギへの感染実験を実施したところ，対照が10%のウサギ感染率に対し，15分の加熱群は2%の感染率であり，統計的検討により，感染能力が半減するとの仮定を否定しえないことになった．

本実験の結果を従来の著者[12]の研究と比較すると，*Anisakis* 幼虫Ⅰ型に対する温度の影響は次のようである．既に著者[12]により実施された各温度における生存率の記録から *Anisakis* 幼虫Ⅰ型にとって生活の適温は2°〜5°Cであり，この温度で生理食塩水中で飼育すれば1カ月以上生存する．40°C付近の温度も *Anisakis* 幼虫Ⅰ型にとって好ましい生活温度であるが，50°C以上の温度では極めて短時間に死

滅する．40°から50°Cにおいては温度による *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の致死率にバラツキが多く，従来とも系統的充分な研究は行われていない．

加熱調理方法は食品衛生上魚肉の *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の人体感染防止の最も確実な方法である．魚肉を加熱して魚肉中に寄生している *Anisakis* 幼虫Ⅰ型を熱凝固させ，生活機能を破壊して死滅させると，もはやその幼虫にはアニサキス症起病力はない．もし魚肉の加熱が不充分である時は *Anisakis* 幼虫Ⅰ型は生きているか，あるいは活性を保持しアニサキス症発症の可能性を持つものと考えられる．

食品衛生上今まで問題であった温度は40°Cから50°Cまでの間であり，また加熱時間も数秒から数時間である．この範囲内における温度と時間との組合せが *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の活性にどのような影響を与えているかは長い間未知の領域に属していた．その未知の部分が今回の実験において明かにされた．

得られた実験成績は魚肉の調理加熱の際，加熱不充分のための *Anisakis* 幼虫Ⅰ型感染症に対する食品衛生上の有意義な結果であったと考えられる．

3）低温処理による場合

加熱処理と同様に *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の生活適温よりも低温度で処理すると，幼虫の活性低下が認められる．本実験から寒天侵入能力を失う時間は表4に示したが，これを加熱実験の場合と同様，図2の処理時間-処理温度の座表にプロットした．図3の冷却部のC直線は加熱の場合と同様，表4の各種冷却温度に対する寒天侵入能力を失う時間であり，C線より上方および左側ではもはやその幼虫は寒天侵入能力を持たず，従って動物感染能力も失われた状態と考えられる．

図3から知られるように，加熱域は40°Cより低温域で10^3分（16時間）に，また冷却の場合は0°Cより高い温度域で10^4分（7日）ほどに *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入能力消失時間は延長される．

Anisakis 幼虫Ⅰ型を0°C以下に放置すれば，致死時間が早められ温度が低いほど致死時間が短縮される．このようなことからオランダでは生食するニシンを－20°Cに24時間冷凍することが法律で義務づけられている[13]．既に低温処理した *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の死滅について幾多の研究例，例えば福永ら[21]安間[22]によるものがあり，また低温処理したものをラットに経口投与しその感染能力を調べた山田[23]の研究があるが，低温における *Anisakis* 幼虫Ⅰ型生存の可能性および致死機構を研究した結果は見られない．

本実験においてはグリセリンを添加し，凍結を防止した状態で実験した．その結果松岡ら[24]および稲本[25]が既に *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の実験動物の消化管壁穿入能力の低下は幼虫の神経環の物理的損傷によるものとした結果と同様な結果を得た．

表3に示した結果のうちから生理食塩水中では－10°C4.5時間の処理で *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入能力は失われるが，グリセリン中では－10°C20時間でもその寒天侵入能力は保有される．つまり *Anisakis* 幼虫Ⅰ型は低温処理されてもそれがグリセリン中あるいはグリセリンが添加されて凍結が防止されれば寒天侵入能力を完全に消失することはない．*Anisakis* 幼虫Ⅰ型は今回の実験では魚肉中で凍結されると寒天侵入能力低下することが認められた．

グリセリン添加により *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の活性低下が防止されるのは，メジウムの凍結防止により，*Anisakis* 幼虫Ⅰ型が凍結による物理的圧力を神経環付近に受けて，活性を低下させるのを防止するためとも考えられる．更に，この実験とは別に行った著者の未発表の実験では *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の神経環付近をピンセットで軽く圧迫した群の寒天侵入能力は急激に低下し，同じ幼虫の尾部を切断したものよりは明かに侵入能力の上で差があり，頭部を圧迫したものの方が劣る．これにより尾部の圧迫は頭部ほど鋭敏な効果はないことが知られる．

なお氷結による *Anisakis* 幼虫Ⅰ型能力低下はピンセットによる頭部圧迫によるものと組織学的にどのような類似点あるいは相違点があるかは今後の検討する必要がある．

低温処理による *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の致死または活性減退の機構はまだ不明の点が多いが，寄生虫体内で氷の結晶が生成し，それによって（1）体組織が物理的に破壊（2）氷生成による酵素溶解度の低下（3）組織への酵素運搬の停止（4）低温による直接または物理的効果による二次的な酵素活性のアンバランスなどが考えられる．

2．超音波処理による *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入能力の変化

超音波処理時間と処理温度との関係を表5に示した．*Anisakis* 幼虫Ⅰ型の活性に対しては，処理温度が高くなるにつれて超音波の処理効果が著しくなってくる．例えば0°Cでは30分処理後に幼虫の寒天侵入能力が完全に失われるのであるが，30°Cおよび50°Cでは5分以内に活性が失われる．

それ故，この処理方法によれば室温で実施しても，その効果は著しい．処理の際，処理液に食塩，食酢，酒類あるいは香辛料などを添加することにより，魚肉

中に調味液の滲透をはかりながら，その魚肉中に含まれる *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の活力を減退させることは可能であろう．

著者ら[26]はかって行った実験で，香辛料を添加することによって *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の殺虫力を増加し得る結果を報告しているが，超音波処理時に香辛料を添加すれば，その効力は増加されるものと推定される．また著者[27]により放射能処理が *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の殺虫にあまり有効でないことが知られているが，超音波処理と併用することにより，殺虫の相剰効果が期待される．

超音波処理は設定された温度条件下で，その処理溶液中に殺虫の目的で極めて微量の調味料およびその他の化学物質を加えて実施するのも一考である．これはたとえ微弱であっても種々の活力減退要因を導入し，それら要因の相剰作用による活力減退効果を充分期待できる．

なお超音波処理が *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の活性に与える影響は次の機構によるものと推察できる．(1) 幼虫体組織の局部的加熱 (2) 体組織の物理的破壊などが挙げられる．

3．本研究の食品衛生学的意義

以上本実験において著者らは寒天侵入試験法を用い，*Anisakis* 幼虫Ⅰ型の感染能力の判定を行った．

本法は種々の条件下にある *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の感染能力を，極めて容易に知る方法であることが明らかになった．従って今後さらに魚肉中の *Anisakis* 幼虫Ⅰ型及び近縁の種で，しかも起病性の明らかにされてきている *Terranova* 幼虫A型，*Contracaecum* 幼虫A型などについても各種薬品，調味料添加，あるいはその他の物理化学的処理による各種幼虫の抵抗性について系統的な研究が望まれるとともに，食品衛生学的観点からの実用性をも検討して行きたい．

結　　論

Anisakis 幼虫Ⅰ型の感染能力を判定する方法として，Ruitenberg の寒天侵入法を改良した著者らの寒天侵入試験法を適用し，各種温度条件（恒温，加熱，低温処理）および超音波照射による同幼虫の感染能力を検討し，以下の如き結果が得られた．

1．採集後常温下におかれていた *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入率は幼虫採取後の経過日数に関係しており，採取1日後では91.0±12.0%，4日後では27.2±21.8%，6日後では24.2±15.6%となり，日数の経過と共に侵入率は低下した．

2．加熱処理では40°～44°Cでは感染能力消失には，540分より44分までと長時間を要したが，45°～47°Cでは30分より8分，48°～50°Cでは4～1分で急速に消失がみられた．

3．低温処理による *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の寒天侵入消失に要する時間は0°Cでは5,460分，−15°Cでは20分，その間の各種温度下の侵入率から温度低下と時間の短縮にはほぼ平行した関連がみられた．

4．低温処理で−10°C 1時間で侵入率は76%，2時間で12%，3時間で4%，4.5時間では全く感染能力を失った．

5．無処理の *Anisakis* 幼虫Ⅰ型は−10°C 4.5時間で侵入能力を失うが，グリセリン中では−10°C，20分間でなお60.0±16.3%の侵入率を保ち，−10°C 20分間の魚肉中では10±11.5%の侵入能力を保った．

6．超音波処理では，0°C 5分の処理により侵入率は60.0±40.0%であるのに30°C 5分では12.0±11.0%に低下し，50°C 5分では侵入能力はみられなかった．

7．以上の実験成績から，著者らの寒天侵入試験法が *Anisakis* 幼虫Ⅰ型の感染能力の判定に適用しうることを明らかにし，食品衛生学的観点からの考察を加えた．

終りに御指導御校閲を賜った金大医学部医動物学講座吉村裕之教授，同医学部病理学第二講座太田五六教授に深甚な謝意を表します．

また種々御教示戴いた金大医学部医動物学講座近藤力王至助教授，北大水産学部原田武夫助教授，名寄女子短大鈴木松朗助教授，函館大谷女子短大城所清一助教授に深く御謝申し上げます．

（本研究の一部は昭和47年度および48年度の文部省科学研究費補助金，課題番号756600および856105，また昭和49年度北海道科学研究費補助金によって実施された．）

文　　献

1) **Van Thiel, P. H., Kuipers, F. C. & Roskam, R. T.** : Trop. Geogr. Med., **12**, 97 (1960).

2) **吉村裕之**：日本医事新報，**2204**，10 (1966).

3) **大鶴正満，小柳武久**：日本医事新報，**2167**，26 (1965).

4) **石倉　肇**：北海道医学雑誌，**43**，83 (1968).

5) **Oshima, T.** : Progress of Medical Parasitology in Japan, **4**, 301 (1972).

6) **岩野英明，石倉　肇，早坂　滉**：外科診療，**16**，44 (1974).

7) **Suzuki, H., Ohnuma, H., Karasawa, Y.,**

Ohbayashi, M., Koyama, K., Kumada, M. & Yokogawa, M. : Jap. J. Parasit., **21**, 252 (1972).
8) Kagei, N., Yanagawa, I., Nagano, K. & Oishi, K. : Jap. J. Parasit., **21**, 262 (1972).
9) 大石圭一：化学と生物，**10**，598 (1972).
10) 長野一雄，高木皇輝，柳川一成，大石圭一，影井 昇：胃と腸，**8**，81 (1973).
11) 長野一雄，影井 昇，大石圭一：日本医事新報，**2611**，32 (1974).
12) 大石圭一：魚類とアニサキス（日本水産学会編），126頁，東京，恒星社厚生閣刊，1974.
13) Ruitenberg, E. J. : Anisakiasis, p.138, Utrecht, Elinkwijk, 1970.
14) 大石圭一，影井 昇，岡 重美訳：アニサキス症，食品衛生研究，**21**，385，531，759，863 (1971).
15) Oishi, K. & Hiraoki, M. : Bull. Jap. Soc. Scie. Fisheries, **39**, 1345 (1973).
16) 小山 力，小林昭夫，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，**18**，466 (1969).
17) 小山 力：魚類とアニサキス（日本水産学会編），9頁，東京，恒星社厚生閣，1974.
18) 橘口義久，武井次雄：寄生虫誌，**24**，34 (1975).
19) 大石圭一，原田武夫，鈴木松朗，城所清一，平沖道治：寄生虫誌，**24**，62 (1975).
20) 大石圭一，平沖道治：日水誌，**37**，1020 (1971).
21) 福永正子，平尾芳行：寄生虫誌，**15**，351 (1966).
22) 安間柾雄：寄生虫誌，**14**，639 (1965).
23) 山田源三：大阪市立大学医学雑誌，**20**，1 (1971).
24) 松岡義雄，臼谷直純：寄生虫誌，**15**，351 (1966).
25) 稲本孝夫：大阪市大医学雑誌，**21**，25 (1972).
26) 大石圭一，森 一雄，西浦康雄：日水誌，**40**，1241 (1974).
27) 大石圭一，岡 重美，平沖道治：日水誌，**38**，133 (1972).

Abstract

In order to evaluate the activity or infectivity of *Anisakis* larvae (Type-I), the penetration capacities of larvae treated by heating, refrigerating and ultrasonic irradiation were examined by means of the agar layer technique (Oishi & Hiraoka, 1974).

The results obtained were summerized as follows;

1) The penetration capacities of untreated *Anisakis* larvae were found to be 91.0±12.0% at 24 hours, 27.2±21.8% on 4 days and 24.2±15.6% on 6 days after collecting larvae from fish bodies.
2) The penetration abilities of larvae disappeared at 40～44°C in 540 to 44 minutes, at 45～47°C in 30 to 8 minutes and 48～50°C in 4 to one minute respectively.
3) The larvae kept at −3°C for 5,460 minutes, −5°C for 1,200 minutes, −10°C for 270 minutes and −15°C for 20 minutes penetrated into the agar layer.
4) The penetration capacities of larvae at −10°C for one, 2, 3 and 4.5 hours were 72%, 12%, 4% and 0% respectively.
5) Glycerin in a low temperature apparently diminished the killing effect for larvae. The penetration capasities of larvae incubated in glycerin at −10°C for 20 hours was around 60%. On the other hand, the penetration ability of larvae harbored in muscles decreased to around 10% at −10°C for 20 hours.
6) Although no penetration of larvae treated with ultrasonic at 50°C for 5 minutes was found, penetration capacities were recognized as around 60% at 0°C or 12% at 30°C for 5 minutes.

7) In the present paper it was shown that the author's agar layer technique might be possibly useful and excellent to evaluate activity or infectivity of *Anisakis* larvae treated under various physico-chemical conditions such as high or low temperature, ultrasonic or radioactive treatments and other chemicals as condiments. In the present study using the agar layer method, the discussion on the penetration or infectivity of *Anisakis* larvae to human body was made from the viewpoint of food hygiene.