

<令和4年度助成>

食中毒リスク軽減に寄与するアニサキス検出法の開発

瀧澤 文雄

(福井県立大学 海洋生物資源学部)

背景および目的

アニサキス症は、アニサキス幼虫が寄生した魚介類の生食を原因とし、激しい腹痛、嘔吐、悪心やアレルギー症状を引き起こす食中毒である¹⁾。日本では、2013年からアニサキス症が食中毒統計上の独立カテゴリーとして扱われ、年間300～400件が報告されている。しかし、医療保険請求に基づく推計では、年間20,000件近いアニサキス症関連受診があるとされ、日本の主要な食中毒原因の一つとなっている²⁾。

日本近海の魚介類には、太平洋側の魚に多く寄生する *Anisakis simplex sensu stricto* (s.s.) と日本海側の魚に寄生する *A. pegreffii* の2種類のアニサキスが主に寄生している。そのうち、*A. simplex* s.s. は魚の筋肉に移行しやすく、食中毒被害の大部分を占めている。しかし近年、地球温暖化に伴う海水温および水生生物の数や生息域の変化に伴い、*A. simplex* s.s. がこれまで認められていなかった地域においても検出され始め、アニサキス種の分布が変化しつつあることが示唆されている³⁾。また、アニサキスは主に魚の腹腔内臓器に寄生し、魚の死後に内臓周囲の筋肉に移行し始めるため、新鮮なうちに魚の内臓を除去することがアニサキス食中毒の予防策の一つである。しかし近年、漁獲直後に凍結したカツオなどの魚類の筋肉中にもアニサキスが寄生していることが報告されている^{4,5)}。

本研究では、日本近海で検出されるアニサキスの種同定を迅速かつ多サンプルを解析できるように、高精度かつ迅速な高分解能融解 (high-resolution melting; HRM) 解析を微生物などの種同定に利用

されている Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域に適用し、*A. simplex* s.s. および *A. pegreffii* を識別できるアッセイを構築した。また、国内におけるアニサキス症の主な原因魚種であるマサバを対象とし、内臓だけでなく可食部である筋肉への寄生実態を把握することが、リスク評価と対策立案に不可欠である。そこで、活マサバを麻酔後、即時に解剖することで、死後移行の影響を受けていない寄生状況を評価し、地域差を含む組織分布と同胞種構成を詳細に調査した。

結果および考察

HRM 法による *Anisakis simplex* 同胞種の鑑別法開発

アニサキス食中毒の原因種である *A. simplex* s.s. と *A. pegreffii* に *A. berlandi* を含めた3種類は、遺伝的に異なるが形態が酷似している *A. simplex* 同胞種として知られている¹⁾。そのため、これらの種の鑑別は遺伝子情報を用いた手法が主となっている。本研究では、*A. simplex* 同胞種を迅速かつ高効率に識別するため、rDNA ITS 領域を標的とした高分解能融解 (high-resolution melting; HRM) 解析による種判別法を構築した (図1)。まず、*A. simplex* s.s.、*A. pegreffii*、*A. berlandi* 間で塩基配列の違いが集中する ITS の一部 (約76 bp) を選択し、この領域を特異的に増幅するプライマー対を設計した。各同胞種の ITS 断片をクローニングしたプラスミドを用いて HRM を実施し、融解曲線プロファイルの違いから3種とハイブリッドが互いに識別可能であることを確認した。この HRM 系を研究室で保存されている *A. simplex*

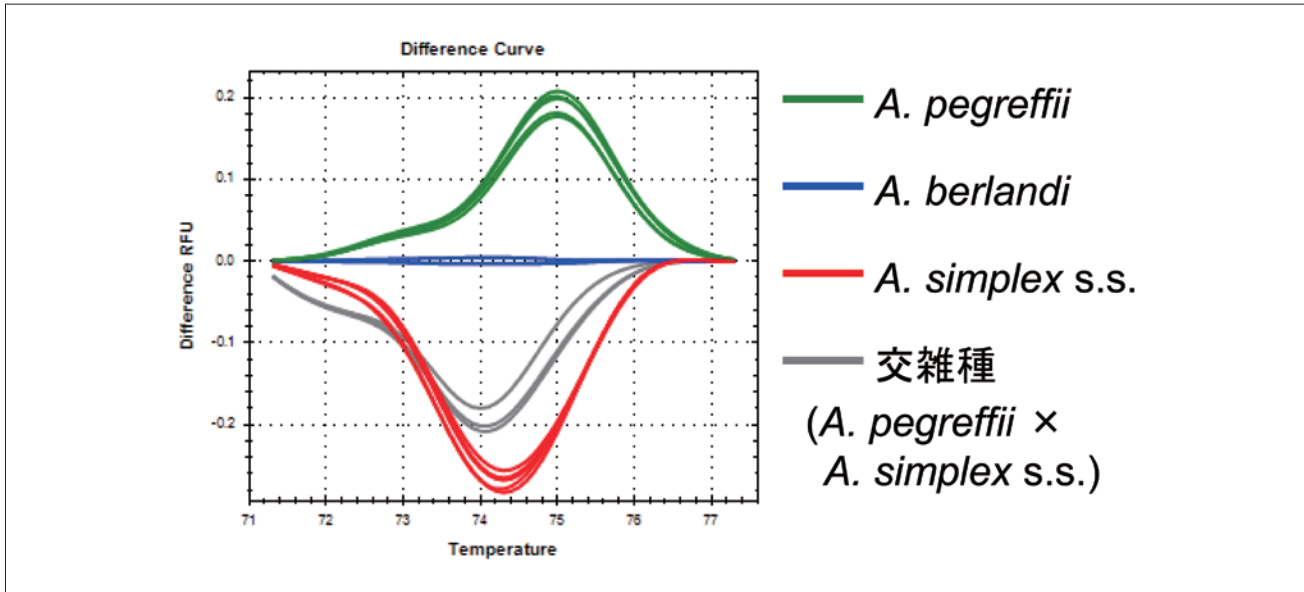


図1 High-Resolution Melting (HRM) 解析によるアニサキス同法種の同定
本法により形態が類似している *A. simplex* 同胞種3種と *A. pegreffii* と *A. simplex s.s.* の交雑種を鑑別可能である。

s.s.、*A. pegreffii* および *A. simplex s.s.* × *A. pegreffii* ハイブリッド種に由来する gDNA に適用した結果、高い再現性でこれら3種を判別することができた。本 HRM 法は従来の PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法に比べ、制限酵素処理や電気泳動といった後処理が不要であり、リアルタイム PCR 装置上で増幅と同時に融解曲線を取得する「クローズドチューブ型」の遺伝子型解析が可能である。これにより、コンタミネーションリスクの低減と作業時間の大幅な短縮が達成され、多数の幼虫を扱う日常的な監視・調査に適したプラットフォームとなった。一方で、リアルタイム PCR 装置を必要とする点や、*A. berlandi* を含むハイブリッド個体の評価が今後の課題として残る。しかし、本研究で構築した HRM 系は、*A. simplex* 同胞種の3種と代表的なハイブリッドをひとまとめに識別できるという点で、コスト・速度・スループットのバランスに優れた手法と言える。活マサバにおける生体内筋肉寄生の証拠と組み合わせることで、「どの同胞種が筋肉寄生とヒト症例に結びつきやすいか」を定量的に評価できるようになり、今後のアニサキス症リスク評価や産地別の監視体制の高度化に大きく貢献すると考えられる。

活マサバにおけるアニサキス幼虫の寄生状況

本研究では、岩手・静岡・長崎・福井の4地域のマサバを対象にアニサキス幼虫の寄生状況を比較した。生きた状態で漁獲されたマサバに対して麻酔による安楽死を実施し、アニサキスの死後移行の影響を排除した条件下で内臓と筋肉を分けてサンプリングした。アニサキスの寄生状況は地域によって寄生率・感染強度・組織分布に大きな違いが認められ、宿主環境や寄生種構成の地域特性が寄生パターンに強く反映されていた。まず、寄生率と寄生強度について、太平洋側の岩手では寄生率 93.8% (45/48 匹)、平均寄生数 20.0 と高い感染状況が確認された。静岡でも寄生率 80% (8/10 匹)、平均寄生数 36.0 と高く、感染強度が地域で大きく変動する傾向が見られた。一方、東シナ海に面する長崎ではすべての個体が寄生しており、平均寄生数は 75.2 と本研究で最も高かった。福井 (日本海側) では寄生率 87.8%、平均寄生数 11.5 と中程度で、地域によって感染圧が異なることが示唆された。次に、内臓・筋肉における分布 (表1) を見ると、いずれの地域でも幼虫の大部分は内臓に存在したが、筋肉への寄生もどの地域でも確認され (図2)、その割合には大きな地域差が認められた。太平洋側の岩手・静岡では筋肉寄生率がそれぞれ 87.5%、40% と高く、内臓と筋肉

表1 活マサバにおけるアニサキス幼虫の寄生状況

地域 (採集日)	魚数 (平均体重)	内臓		筋肉		内臓：筋肉の 寄生数比 (%)
		有病率 (%)	平均寄生強度 (範囲)	有病率 (%)	平均寄生強度 (範囲)	
岩手 (2021年6月)	48 (410g)	87.5	11.4 (1~50)	87.5	10.0 (1~48)	53.1 : 46.9
長崎 (2022年11月)	9 (448g)	100.0	74.7 (4~291)	22.2	2.5 (1~4)	99.3 : 0.7
静岡 (2023年7月)	10 (432g)	80.0	18.4 (2~66)	40.0	35.3 (1~97)	51.0 : 49.0
福井 (2025年5月)	41 (578g)	78.0	9.6 (1~80)	51.2	5.0 (1~34)	74.3 : 25.7



図2 安楽死直後のサバ筋肉内に認められたアニサキス幼虫
 生きたマサバを麻酔・安楽死させた直後に腹側筋肉を切り出し、紫外線照射下で撮影した。
 腹腔側の筋肉内に、白色の渦巻き状構造としてアニサキス幼虫が観察される。

の寄生割合がほぼ半々となるケースも見られた。これは、これらの地域で寄生するアニサキス幼虫が生体内で筋肉へ侵入する能力を持つことを示している。一方、長崎では内臓99.3%・筋肉0.7%と圧倒的に内臓寄生に偏り、筋肉寄生は非常に稀であったことから、寄生している幼虫の種類や宿主の生理的特性が筋肉侵入性に大きく影響していると考えられる。福井では内臓74.3%・筋肉25.7%と中間的な値を示し、地域固有の寄生種構成を反映した分布となった。

いずれの地域でも筋肉寄生は腹側筋肉に集中し、背側筋肉での寄生は極めて少ないという共通パターンが認められた。このことは、幼虫が腹腔から筋肉へ侵入する経路が生体構造上制限されていることを示し、生体内での移行過程を反映した現象と考えら

れる。本研究はすべて活魚を即時解剖しているため、この腹側優位の分布は死後移行による人工的な偏りではなく、生体内移行の証拠である。

総合すると、活マサバにおけるアニサキス幼虫の寄生状況は、海域ごとの感染圧、宿主行動、そして寄生する幼虫の生物学的特性により大きく左右されることが示された。特に太平洋側では筋肉寄生の割合が高く、食品衛生上のリスクが相対的に大きい。一方、長崎のように内臓寄生に強く偏る地域では、筋肉寄生のリスクは低いものの、全体の感染強度は極めて高い。これらの知見は、地域特性を踏まえたアニサキス症リスク評価や、水産物の衛生管理（迅速な内臓除去、産地表示を活用したリスクコミュニケーション）に重要な科学的根拠を提供するものである。

アニサキス同胞種の分子同定

本研究では、ITS 領域を標的とした HRM 解析により、活マサバに寄生するアニサキス幼虫の同胞種構成を地域別に評価した (表 2)。その結果、福井を除く調査地域の筋肉から検出された幼虫は、例外なく *A. simplex* s.s. によって占められており、福井においても 89.4% が *A. simplex* s.s. であった。一方、内臓では地域差が大きく、岩手・静岡では *A. simplex* s.s. が 98% 以上を占めたのに対し、長崎では *A. pegreffii* が 96% を占めていた。福井では、*A. simplex* s.s. (約 59%) と *A. pegreffii* (約 35%) が混在し、少数のこれら 2 種のハイブリッド種も検出された。

注目すべき点は、筋肉組織では *A. simplex* s.s. が主に検出され、*A. pegreffii* はほぼ存在しなかったことである。このことは、他の報告にもあるように、生体内で筋肉に侵入できる能力が種によって大きく異なることを示している。特に長崎では内臓に多数の *A. pegreffii* が寄生していたにもかかわらず筋肉からは一例も検出されず、*A. pegreffii* の筋肉侵入能は極めて低いと考えられる。逆に、*A. simplex* s.s. は太平洋側のみならず日本海側の福井でも筋肉で高頻度に検出され、生体内での組織侵入性が高いことが裏付けられた。以上から、宿主筋肉における寄生リスクは単なる感染強度ではなく、どの同胞種が寄生しているかに強く依存することが明らかとなった。

総括

本研究では、日本近海産マサバを対象に、HRM 解析によるアニサキス同胞種迅速同定系を構築し、活魚を用いた調査により *A. simplex* s.s. が死後移行前から筋肉、特に腹側筋に生体内寄生し得ることを示した。筋肉寄生はほぼ *A. simplex* s.s. に限られ、内臓寄生強度と強い相関を示したことから、アニサキス症リスク評価において「種の違い」と「生体内筋肉寄生」を考慮する必要性が明らかとなった。これらの知見は、①漁獲後の迅速な内臓除去、②低温を維持したコールドチェーン管理、③刺身・たたき等への利用時における腹側筋の選択的除去、といった具体的な衛生対策の科学的根拠を与えるものである。今後、地域別の同胞種構成と筋肉寄生リスクを継続的にモニタリングし、その情報を行政・業界・消費者間で共有する仕組みを整備することで、表示・流通基準や指導マニュアルの高度化につなげ、アニサキス食中毒の一層の低減が期待される。本研究成果は *Fisheries Science* に原著論文として受理された⁶⁾。

謝辞

本研究の遂行および論文出版にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に、ここに深く感謝の意を表します。

表 2 アニサキス同胞種の地域別構成割合

地域	部位	解析数	<i>A. simplex</i> s.s.	<i>A. pegreffii</i>	Hybrid*
岩手	内臓	71	98.6%	1.4%	0.0%
	筋肉	92	100.0%	0.0%	0.0%
長崎	内臓	672	2.7%	96.1%	1.2%
	筋肉	5	100.0%	0.0%	0.0%
静岡	内臓	147	98.0%	2.0%	0.0%
	筋肉	141	100.0%	0.0%	0.0%
福井	内臓	294	58.8%	35.4%	5.8%
	筋肉	94	89.4%	4.3%	6.4%

* *A. simplex* s.s. と *A. pegreffii* の Hybrid の割合。 *A. berlandi* は検出されなかった。

参考文献

- 1) Suzuki, J., Murata, R., & Kodo, Y. (2021). Current status of anisakiasis and *Anisakis* larvae in Tokyo, Japan. *Food Safety*, 9(4), 89-100.
- 2) Sugiyama, H., Shiroyama, M., Yamamoto, I., Ishikawa, T., & Morishima, Y. (2022). Anisakiasis annual incidence and causative species, Japan, 2018–2019. *Emerging infectious diseases*, 28(10), 2105.
- 3) Gomes, T. L., Quiazon, K. M. A., Kotake, M., Itoh, N., & Yoshinaga, T. (2020). *Anisakis* spp. in fishery products from Japanese waters: Updated insights on host prevalence and human infection risk factors. *Parasitology International*, 78, 102137.
- 4) Murata, R., Suzuki, J., Kodo, Y., Kobayashi, K., Sadamasu, K., Takano, T., Iwaki, T., Waki, T., & Ogawa, K. (2021). Probable association between *Anisakis* infection in the muscle of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) and human anisakiasis in Tokyo, Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108930.
- 5) Cipriani, P., Giuliatti, L., Bao, M., Palomba, M., Mattiucci, S., & Levsen, A. (2024). *Post-mortem* tissue migration of *Anisakis simplex* (s.s.) larvae (Nematoda: Anisakidae) in three commercially harvested fish species from the Northeast Atlantic: The role of storage time and temperature. *Food Control*, 157, 110162.
- 6) Takizawa, F., Ito, F., Ose, C., Kakita, K., Nakazono, G., Iguchi, R., Miyawaki, E., Kamimura, R., Shimizu, D., Maeda, T., Matsui, H., Suzaki, H., Zenimoto, K., Ido, A., Kuroyanagi, M., Hosoi, M., Matsukawa, M., Yohiura, Y., Hamaguchi, M., Ohtani, M., Miyadai, T., & Suetake, H. (2026). *Anisakis* larvae in live-caught chub mackerel from Japan: tissue-specific distribution and sibling species identification. *Fisheries Science*. in press.

Development of *Anisakis* Detection and Identification Methods for Mitigating Anisakiasis Risk

Fumio TAKIZAWA

Faculty of Marine Science and Technology, Fukui Prefectural University

Anisakis simplex complex is a major causative agent of human anisakiasis. Recent reports have suggested shifts in the regional distribution of *Anisakis* species in Japanese water and documented muscle infections in several fish hosts. However, for chub mackerel (*Scomber japonicus*), which is the most frequent vehicle of anisakiasis in Japan, detailed information on tissue localization and sibling-species composition in live fish remains limited.

In this study, live-caught chub mackerel from four Japanese regions were anesthetized and dissected immediately to evaluate *Anisakis* infections without the confounding effects of postmortem migration. We established a high-resolution melting (HRM) assay targeting the ITS region, which enabled the rapid, high-throughput genotyping of *A. simplex* sensu stricto (s.s.), *A. pegreffii*, *A. berlandi*, and *A. simplex* s.s. × *A. pegreffii* hybrids. Infection levels and tissue distribution varied markedly among regions. Along the Pacific coast (Iwate and Shizuoka), *A. simplex* s.s. dominated both viscera and muscle, muscle larvae showed a consistent ventral bias, and visceral and muscle burdens were positively associated. In Fukui (Sea of Japan), overall prevalence was high and viscera harbored a mixture of sibling species, whereas muscle infections were almost entirely attributable to *A. simplex* s.s. In contrast, in Nagasaki (East China Sea), *A. pegreffii* was overwhelmingly prevalent in viscera, while only *A. simplex* s.s. was recovered from muscle.

These findings provide direct evidence that *A. simplex* s.s. can colonize the muscles of live mackerel and demonstrate that muscle infection risk depends not only on infection intensity, but also on sibling-species composition. The HRM-based approach offers a practical tool for routine surveillance and supports region-specific risk management strategies, including timely evisceration and appropriate cold-chain control.