

マイクロ波加熱を利用したブリ属魚類筋肉中の アニサキス幼虫の検出法

赤井紀子・長野泰三

A Simple Technique for Recovering *Anisakis* sp. Larva in the Flesh Musculature of Yellowtail Genus Fish by Microwave Heating

Noriko AKAI, Taizou NAGANO

This paper demonstrates the efficiency of a simple technique on recovery of *Anisakis* sp. larva in the flesh musculature of yellowtail genus fish. The highest efficiency was obtained via the following procedure: the initial heating of a 60g portion of the specimen with a microwave oven at 900W for 40s and subsequent hand massage followed by visual inspection of the resulting fragments containing the larvae under short-wave ultraviolet light. The process of microwave heating also increased the intensity of fluorescence of the larvae irradiated with ultraviolet light resulted in the easy recovery. The simple technique would be applicable for examination of market-sized fish in mariculture.

キーワード：アニサキス幼虫，ブリ属魚類の筋肉，マイクロ波加熱

2004年秋季以降に中国から養殖用中間種苗として輸入されたカンパチ大型魚にアニサキス *Anisakis* sp. 幼虫の大量寄生が確認された*。寄生部位は主に内臓であったが、筋肉での寄生が見られた事例も報告された。アニサキス幼虫は加熱又は冷凍処理（-20℃，24時間）で死亡するが、カンパチ等生食する魚種においては内臓だけでなく筋肉についてもアニサキス幼虫の検査を求められる場合があることから、出荷前に養殖カンパチの筋肉におけるアニサキス幼虫の寄生の有無を調査する必要がある。我が国の食品衛生検査指針¹⁾に示されている魚介類筋肉のアニサキス検査法に直接観察，ガラス板を用いた圧平法，人工消化液によるアニサキス幼虫の検出分離法およびキャンドリング法がある。さらに，より迅速な検査法としてフードプロセッサーによる筋肉の破碎と紫外線照射による破碎懸濁物の観察を組み合わせた検査法（フードプロセッサー法¹⁾が米国FDAで採用されている。しかし，この検査法は生の筋肉を水とともにフードプロセッサーで破碎するため，作製される懸濁液の濁りが激しく，懸濁物を虫体の観察に供する前に洗浄する工程が必要となる。また，検査の作業工程が多くなると検査精度が低下する恐れも考えられる。カンパチ等養殖魚類の検査では大量の大型魚の筋肉が検査対象に想定されることから，フードプロセッサー法よりも簡便で効率に魚肉を破碎できる方法を取り入れた検査法の開発が望

まれる。一般に食品の加熱や解凍を目的に普及している電子レンジには，魚肉を迅速に加熱してその筋肉繊維を容易にもろくする機能がある。著者らはこの機能に注目し，筋肉をフードプロセッサーで破碎する代わりに，まず電子レンジを用いたマイクロ波加熱によってもろくしたのち，手で揉みほぐして破碎し，破砕片を紫外線照射下で観察する検査法（以下，マイクロ波加熱法）を考案した。本研究では，魚の筋肉とアニサキス幼虫を対象に加熱時間を変えたマイクロ波加熱実験を行い，加熱に伴う筋肉繊維のほぐれやすさ，アニサキス虫体の形態およびもろさ，並びに紫外線照射下での虫体の発色の変化を確認し，本法を養殖魚筋肉中のアニサキス幼虫検査に応用できるかどうかを検討した。

材料および方法

供試魚

香川県下で養殖されていたヒラマサ *Seriola lalandi* 11尾（平均体重3.40kg,平均尾叉長61.6cm）を香川県水産試験場の海上小割に搬入後，蓄養して使用した。なお，畜養期間中の水温は10.3-17.1℃であった。実験にはアニサキスの移行率が高いとされている腹腔部筋肉を約60gずつ切り取って用いた。この筋肉試料は冷蔵庫（4℃）に保存後，2時間以内に実験に供試した。

*良永知義（2005）：平成17年度日本魚病学会大会プログラムおよび講演要旨，日本魚病学会，39p.

供試アニサキス

ブリ属魚類から採集した *Anisakis* sp. I 型幼虫を使用し、それらの包囊を取り除いたのち、直ちに海産魚の生理的塩類溶液（以下、生理的塩類溶液）中（室温）に保存後実験に供試した。

マイクロ波加熱実験

筋肉およびアニサキス幼虫の加熱には、電子レンジ（RE-SD20H, SHARP）を使用し、加熱出力は900 Wとした。アニサキス幼虫の観察には紫外線照射装置（NLMS-20E, UVP）を使用し、紫外線の波長は365nmとした。

加熱に伴う筋肉繊維のほぐれやすさを確認する実験では、筋肉試料を耐熱ガラス皿（外径25cm, PYREX）の中央に皮面を下にして載せ、20, 25, 30, 35, 40および45秒間加熱したのち、手で揉みほぐした。ほぐれやすさの程度は、ほぐれない、ややほぐれるおよび十分ほぐれる、の3段階で評価した。なお、この評価の基準を客観的に示すため、筋肉試料の頭側部、中央部および尾側部からそれぞれ試験片（1.5×1.5×1.5cm）を採取し、常法に従ってレオメーター（RE33005, 山電）により円筒形プランジャー（直径12mm）を用いた破断強度試験を行い破断応力（N/m²）を求めた。また、加熱直後に筋肉試料の中心温度を測定した。さらに、冷蔵庫（4℃）に2時間内または5日間、冷凍庫（-25℃）に1ヶ月間それぞれ保存した筋肉試料を用いてFDAの方法¹⁾に従い、フードプロセッサーによる破碎を行って比較した。

加熱に伴うアニサキス虫体の形態およびもろさの変化を確認する実験では、メスで切り目を入れた筋肉試料にアニサキス幼虫8匹を埋め込み、前述と同様に35, 40, 45, 50, 55および60秒間加熱した。加熱終了後、ピンセットを用いて筋肉試料中から5匹の幼虫を取り出し、生理的塩類溶液中（室温）に収容したのち、肉眼で形態の変化を観察した。さらに、これらの虫体のもろさの程度を引張試験によって測定した。す

なわち、加熱したアニサキス幼虫の一端を15mmのダブルクリップ（DB-4-BK, SANKEI KIKOM）で挟み、そのダブルクリップに鎖状に列ねたゼムクリップ小（クリ-3-1, KOKUYO）を接続した。虫体の他端を手で持ち、接地した位置からゆっくりと垂直方向に持ち上げ、虫体がちぎれた時に空中にあったダブルクリップおよびゼムクリップの合計重量を計測し、引張強度（g/匹）として表した。なお、ダブルクリップの金属部との直接的接触による虫体の損傷を防止するため、ダブルクリップの接触面にキムワイブを貼り付けた。一方、残った3匹のアニサキス幼虫を含む筋肉試料は十分に手で揉みほぐしたのち、ガラスシャーレ（直径15cm, Fine）に入れ、蒸留水100mLを加えて紫外線照射装置で虫体の形態変化を肉眼観察した。なお、加熱直後に筋肉試料の中心温度を測定した。対照として、筋肉試料60gの含水量に合わせた生理的塩類溶液30mLとアニサキス幼虫5匹を50mL容のガラスビーカーに入れたのち、食品包装用ラップフィルムで覆い、筋肉試料と同様の方法で20, 30, 35, 40および60秒間加熱後、引張試験を行った。なお、加熱直後にビーカー内の生理的塩類溶液の温度を測定した。

加熱に伴う紫外線照射下でのアニサキス虫体の発色の変化は、前述の実験で所定時間加熱して死亡した個体と加熱していない生きた個体とを紫外線照射装置を用いて発色させ、それらの色調を肉眼観察して調べた。

結果および考察

電子レンジを用いて所定時間加熱した筋肉試料の中心温度、強度およびほぐれやすさをTable 1に示す。加熱時間20および25秒では中心温度が62℃以下であり、筋肉を手で揉みほぐすことが不可能であったが、30秒以上の加熱で中心温度は82℃以上となり、不十分ながらも揉みほぐすことが可能となった。さらに、加熱時間40秒以上では十分に揉みほぐすことが可能で

表1 電子レンジを用いて所定時間加熱した筋肉試料の中心温度、強度及びほぐれやすさ

Table 1 Changes in temperature, strength and brittleness of the fish musculature heated with a microwave oven at different times.

Heating time (s)	Characteristic of the musculature		
	Temperature (°C)	Break stress (N/m ²)	Brittleness*
0	3.8	14.9×10 ⁴ <	-
20	56	7.16×10 ⁴	-
25	62	6.31×10 ⁴	-
30	82	3.09×10 ⁴	+
35	85	3.39×10 ⁴	+
40	89	1.19×10 ⁴	++
45	90	1.46×10 ⁴	++

*- : not fragmented, + : partly fragmented, ++ : sufficiently fragmented

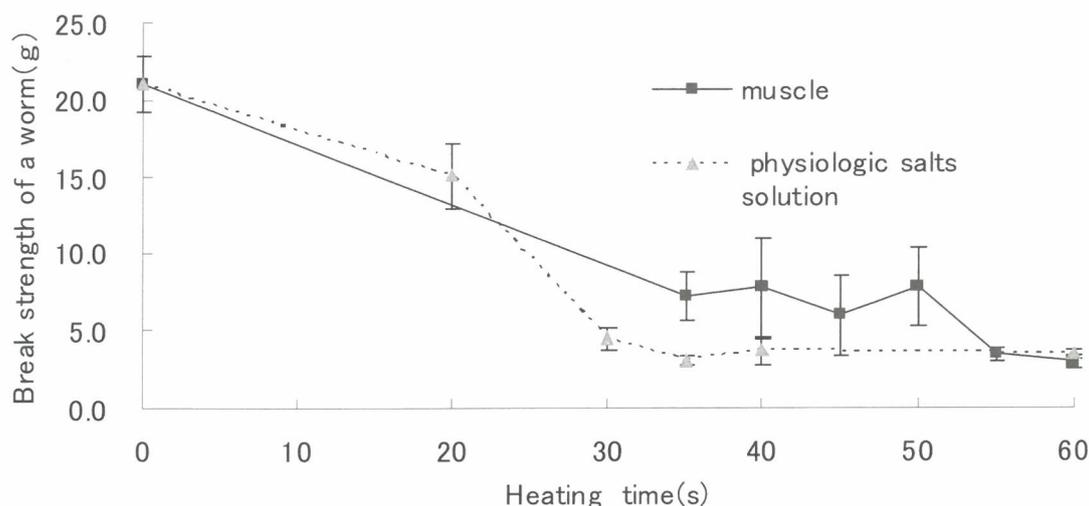


図1 加熱したアニサキス幼虫の引張強度の変化

Fig. 1 Changes in tensile strength of *Anisakis* sp. larvae in the fish musculature and physiological saline heated with a microwave oven at different times. Mean values are plotted with the standard error.

あった。これらのことから、養殖魚類を対象としたマイクロ波加熱法の検査精度を高めるためには、60 g程度の筋肉を少なくとも40秒間、加熱する必要があると判断される。なお、容易に揉みほぐすことができる筋肉の破断応力は $3.0 \times 10^4 \text{N/m}^2$ 以下であると思われる。一方、比較のために行ったフードプロセッサーによる破碎では、 4°C および -25°C のいずれの温度で保存した筋肉も十分に破碎できなかった。この結果は、マイクロ波加熱法の筋肉破碎効率が優れていることを示していると思われるが、人工消化液による検出分離法等のフードプロセッサー法以外の通常法と比較検討することは必要であろう。

アニサキス幼虫の引張試験の結果をFig. 1に示す。加熱前の生きたアニサキス幼虫は21.0 g/匹の引張強度があった。生理的塩類溶液中で加熱後の引張強度は加熱時間20秒で15.1 g/匹、30秒で4.5 g/匹、35~60秒で3.1~3.7 g/匹となり、30秒までは加熱時間の増加とともに急激に低下するが、それ以上の加熱時間ではほぼ同じ値を示す傾向が認められた。このことから、生理的塩類溶液中におけるアニサキス虫体のもろさは、35秒間の加熱でほぼ安定するものと考えられる。これに対して筋肉中で加熱したアニサキス幼虫の引張強度は35秒間の加熱で急激に低下したものの7.2 g/匹に留まり、その後も50秒まで大きな変化は認められず、6.0~7.9 g/匹の範囲で推移したが、55秒の加熱後に生理的塩類溶液中での値と同程度の3.4 g/匹となり、60秒の加熱後も2.9 g/匹であった。加熱後の生理的塩類溶液の温度は、同じ時間加熱した筋肉の温度と同じであった。これらのことから、虫体のもろさの変化には温度以外に虫体を取り囲んでいた筋肉に由来する何らかの要因が影響していた可能性が推察される。

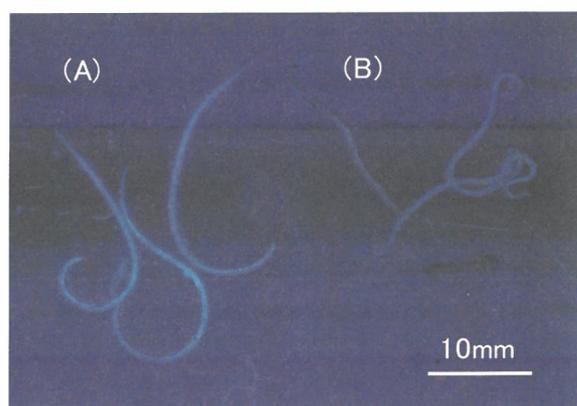


図2 加熱前後のアニサキス幼虫の紫外線照射による発光強度の違い

Fig. 2 Photograph of *Anisakis* sp. larvae fluorescing a brilliant bluish-white under a short-wave ultraviolet light. The intensity of fluorescence of the dead larvae (A) after the heating is greater than that of the live larvae (B) before the heating. The dead larvae exhibit a slightly expanded trunk. Scale bar is 10mm.

35~60秒間の加熱後に引張試験に供したアニサキス幼虫は、肉眼的な外傷や断裂は全く確認されず、加熱前に比べて体がやや伸長あるいは膨化している傾向が認められた (Fig. 2)。さらに、筋肉とともに手で揉みほぐしたのちにも損傷する個体は認められず、紫外線照射装置を使用して全ての虫体が検出できた。したがって、60秒以内の加熱で生じた虫体の形態およびもろさの変化は、マイクロ波加熱法によるアニサキス検査には影響しないと判断される。紫外線照射装置を使用した観察では、加熱したアニサキス幼虫は加熱前に比べて青白い蛍光色の発光強度が強くなり、観察しや

すくなることが確認された (Fig. 2)。同様な現象は、冷凍したアニサキス幼虫でも認められることが報告されている²⁾。また、加熱によりタンパク質変性が起こるため、筋肉片を水とともに観察用のガラスシャーレに入れた時に発生する濁りが最小限に抑えられ、水面に浮上した油滴を取り除くために上層の水を1回程度入れ替えることで問題なく観察できた。

以上のことから、著者らが考案したマイクロ波加熱法は養殖魚類筋肉中のアニサキス幼虫の簡便・効率的な検査法として応用できる可能性が高いと思われる。今後は、アニサキス幼虫の寄生が確認されている他の魚種に対しても、マイクロ波加熱法の有効性を順次検討すべきであろう。

最後に、本研究を行うにあたり、有益な助言をくださった三重大学助教授の一色正博士に感謝の意を表します。

要 約

大型の養殖魚類筋肉中のアニサキス幼虫を効率よく検出できる方法の開発を試みた。筋肉をまず電子レンジを用いたマイクロ波加熱によってもろくしたのち、手で揉みほぐして破碎し、紫外線照射下で観察する方法を検討した結果、本法はアニサキス虫体を損傷させることなく、迅速に筋肉を破碎できることが確認された。また、加熱後の虫体は加熱前よりも紫外線下での発色強度が増強し、観察が容易であった。したがって、本法は養殖魚類筋肉中のアニサキス検査法として応用できると思われる。

文 献

- 1) 川中正憲, 杉山広 (2004) : 寄生蠕虫類, 「食品衛生検査指針〔微生物編〕, 厚生労働省監修, 社団法人 日本食品衛生協会, 東京」, pp.536-563
- 2) Pippy, J. H. (1970) : Journal fisheries research board of Canada. Vol.27, pp.963-965