ノート

[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health
 衛生 生 化 学
 38 (4) 361-365 (1992)]

—Notes—

アニサキス寄生カタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) の脂肪酸組成について

佐二木順子,^a 高橋勝弘,^a 林 幸夫,^b 安藤由記男,^c
 金田真理子,^d 浜崎智仁^d
 千葉県衛生研究所,^a 千葉県勝浦保健所,^b 千葉県佐倉保健所,^c
 富山医科薬科大学^d

Fatty Acid Composition in Anchovy (*Engraulin japonicus*) Infected with *Anisakis Simplex*

JUNKO SAJIKI,^a KATSUHIRO TAKAHASHI,^a YUKIO HAYASHI,^b YUKIO ANDO,^c
 MARIKO KANEDA^d and TOMOHITO HAMAZAKI^d

Chiba Prefectural Institute of Public Health,^a 666-2 Nitona-cho, Chiba 260, Japan, Katsuura Health Center,^b 1224 Izumi, Katsuura 299-52, Japan, Sakura Health Center,^c 28 Miyakouji, Sakura 285, Japan and 1st Department of Internal Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University,^d 2630 Sugitani, Toyama 930-01, Japan

(Received December 20, 1991)

To investigate whether any toxic lipophilic substances were contained in the anchovy (*Engraulis japonicus*) infected with *Anisakis simplex* or not, correlations among mouse lethal toxicity in the lipophilic fraction, the crude lipid content from the whole body or viscera of the anchovy and the prevalence of *Anisakis* infection were examined, but no significant correlation was found in the present survey data.

However, the anchovy having *Anisakis simplex* showed a significantly higher level ($p < 0.01$) of free fatty acids in viscera, in particular, C16: 0, C16: 1 ($n-7$), C18: 0, C18: 3 ($n-3$), C20: 3 ($n-6$), C20: 4 ($n-6$), C20: 5 ($n-3$), compared with that free of *Anisakis*. Total polyunsaturated fatty acid in phospholipid and triglyceride tended to decrease in the anchovy viscera having *Anisakis simplex* compared with those without parasites.

It is possible to postulate that an increase of free fatty acids in the anchovy with parasites may be related to the outbreak of human allergic symptoms accompanied by eating raw anchovy.

Keywords — anchovy; *Anisakis simplex*; mouse lethal toxicity; fatty acid composition; polyunsaturated fatty acid; allergic symptoms

はじめに

近年、新鮮魚類の生食傾向の増加に伴いそれらに寄生する線虫類（とりわけアニサキス, *Anisakis simplex*, 幼虫）の人体に及ぼす影響について関心が高まっている。食品衛生上問題となるのは、これら

線虫類の幼虫が多種の魚に寄生していることである。¹⁾ カタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) へのアニサキス寄生に関する報告は少ないが、鈴木ら²⁾ は千葉県の太平洋沿岸のカタクチイワシから3種類のアニサキス科幼虫を同定している。林ら³⁾ は、カタクチイワシ生食により患者が多数発症した原因は易熱

性の生物又は物質で、さらに虫体長 20 mm 未満のアニサキス幼虫の寄生が原因である可能性を報告している。アニサキス自体の生物学的病原性は明らかであるが、多発アニサキス症が発症する機序については不明な点が多い。

著者らはカタクチイワシの脂溶性画分にマウス腹腔内注射で致死作用があることを認め、その原因物質は魚体に豊富に含まれている多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) によること、⁴⁾ その酸化物はさらに強い作用をもつこと⁵⁾ を報告した。一般に、PUFA は生体内で種々の酵素系により強い生理活性をもつ酸化物に代謝され、^{6,7)} 多くの物は熱や pH に対し不安定であることが知られている。⁸⁾

本研究は、アニサキス寄生によって、カタクチイワシ内に患者発症の原因となる物質が産生されていないかを調べることを目的としたもので、アニサキスの寄生の有無で魚体の脂肪酸組成にどのような差異が生じているかを検討した。

材料並びに実験方法

カタクチイワシは 1988 年から 1990 年に房総沖で漁獲された鮮魚を用いた。マウスは体重 16–20 g の dd-Y 系雄 (船橋農場 kk) を用いた。ガスクロマトグラフィに使用した内部標準物質は NuCheck Prep. Elysian, MN より購入した。

1) アニサキス寄生率 漁獲後、冷蔵保存下で運び込まれたカタクチイワシの一部を用い、林らの報告した圧平法³⁾ により幼虫の検出を行った。アニサキス寄生率は寄生魚体数の被検査総魚体数に対する割合 (%) で表示した。

2) カタクチイワシの粗脂肪量並びに脂溶性分画のマウス致死試験 アニサキス寄生率の測定に用いた残りの魚を用い、丸ごと処理の場合ランダムに選んだ十数尾 (100 g) を、内臓の場合数十尾のえらを除いたもの (80 g) をホモジナイズし、アセトン、エーテルで既報⁴⁾ に従い脂溶性分画の抽出を行った。抽出液の一部は粗脂肪の定量に用いた。粗脂肪量は 120°C、1 時間加熱を行い前後の重量差から湿重量に対する割合 (%) として算出した。残りの抽出液についてはエーテルを窒素気流中で完全に蒸発した後、1% tween を含んだ生理食塩水で 1 ml あたり魚湿重量 4 g の濃度になるようサンプルを調製した。マウス致死効果は腹腔内注射により 24 時間後の死亡数から既報⁴⁾ に従って測定した。

3) 脂肪酸濃度測定のための検体作成 アニサ

キスが寄生魚の死後体外に遊走する性質を利用しアニサキスの寄生有無を調べた。1990 年 2 月 28 日に水揚げされた新鮮カタクチイワシ 109 尾を 1 個体ずつ少量の生理食塩水とともにポリ袋に入れ、低温 (5°C) 下で 24 時間放置し、幼虫の体外への遊走があったものをアニサキス寄生魚、なかったものを非寄生魚とした。寄生有無の鑑別後、脂肪酸測定まで検体を -70°C に保存した。

4) 脂肪酸濃度の測定 内臓並びに魚肉に各脂質画分 (リン脂質; PL, 中性脂質; TG, 遊離脂肪酸; FFA) の内部標準物質として 1, 2-dipentadecanoylphosphatidylcholine, tripentadecanoylglycerol, free pentadecanoic acid を添加後、Folch らの方法⁹⁾ により脂質を抽出した。脂質抽出溶媒には抗酸化剤としてブチルヒドロキソトルエン (BHT) を 0.001% 添加した。一定量の抽出脂質をシリカゲルプレート (0.25 mm Silica Gel 60, Merck 社) に添付し、展開溶媒として石油エーテル-ジエチルエーテル-酢酸 (80:20:1) を用い薄層クロマトグラフィーで脂質の分画を行った。プレートから PL, TG, FFA の各分画をかきとり、6% の H₂SO₄ 並びに 0.001% の BHT を含むメタノールを加え、70°C で 45 分間反応させることによりメチル化を行った。脂肪酸メチルエステルの分析は、GC-14 A ガスクロマトグラフ (島津製作所) を用いた。測定条件は、カラム; SP-2330 キャピラリーカラム (0.32 mm i.d. × 30 m, Supelco 社), 測定温度; 注入部位温度 (250°C) カラム温度 (10 分間 160°C その後 1 分間あたり 4°C ずつ 200°C まで昇温), 検出器; FID, キャリヤーガス; ヘリウム (0.56 kg/cm²) であった。

測定は一尾ずつ行い、その平均値 ± SD で表に示した。平均値の差の検定は *t* 検定によった。

結 果

1) 新鮮なカタクチイワシのアニサキス幼虫寄生率とマウス致死毒性、粗脂肪量について

1988 年から 1990 年までに漁獲され実験に用いた新鮮なカタクチイワシのアニサキス寄生率、マウス致死毒性、粗脂肪量を Table I に示した。マウス致死毒性については、丸ごと処理の場合 15 検体中 4 検体に 0.25 MU/g の毒性が、内臓の場合 8 検体中 6 検体に 0.25 MU/g から 0.5 MU/g の毒性値が得られた。粗脂肪量は、丸ごと処理の場合、1.0% から 5.9%、内臓の場合 1.6% から 6.7% であった。アニサキス寄生率は、年間を通じて低かった (最高

TABLE I. Mouse Lethal Toxicity and Total Crude Lipid in Whole Body or Viscera, and Percent Prevalence of *Anisakis* Infection in *Engraulis japonicus* Caught at Pacific Ocean near Chiba Prefecture from 1988 to 1990

Data of catch	Prevalence of <i>Anisakis</i> (%)	Mouse lethal toxicity (MU/g)	Total crude lipid (%)
Whole body			
May 18, 1988	8.0	ND	1.5
24	0	0.25	5.9
29	0	0.25	2.2
June 6	1.1	0.25	1.0
21	0	ND	1.2
July 15	0	0.25	1.2
19	0	ND	2.0
24	0	ND	2.1
Aug. 18	1.7	ND	1.1
23	4.0	ND	1.8
Jan. 18, 1989	1.0	ND	2.6
19	2.0	ND	1.7
26	0	ND	1.9
Feb. 20	0	ND	1.6
27	2.0	ND	3.1
Viscera			
July 15, 1988	0	0.25	1.6
Jan. 19, 1989	2.0	0.25	5.8
Feb. 20	0	ND	2.4
27	2.0	0.25	5.3
28	3.0	0.5	4.2
Feb. 8, 1990	0	ND	4.0
28	7.3	0.25	3.4
Apr. 3	0.6	0.25	6.7

ND: not detectable

8.0%). 得られたデータから内臓におけるアニサキス寄生率とマウス毒性値、粗脂肪量との間の相関を検定したが、相関は認められなかった。

本実験はアニサキス寄生と、PUFAの毒性指標となるマウス致死⁴⁾との相関をみるために行ったが、年間を通してアニサキス寄生率が低かったため、相関性を認めるまでには至らなかった。

2) アニサキス寄生の有無によるカタクチイワシの各脂質中の脂肪酸濃度

アニサキス寄生有無別の検体（それぞれ肉部3検体、内臓4検体について）における脂肪酸量をPL, FFA, TGについて調べた結果をTable II, IIIに示した。内臓については、寄生虫ありの検体で総脂肪酸量に有意レベル ($p < 0.01$) の増加が認められた。

その増加は、飽和酸、モノエン酸、ポリエン酸ともに有意レベル ($p < 0.05$) であった。なかでも有意 ($p < 0.05$) な増加が認められた脂肪酸は 16:0, 16:1 ($n-7$), 18:0, 18:3 ($n-3$), 20:3 ($n-6$), 20:4 ($n-6$), 20:5 ($n-3$) であった。一方、検体間にはばらつきが大きかったため有意差は認められなかったが、PL, TGともにアニサキス寄生の検体で脂肪酸量は減少傾向にあった。PL中の18:0のみに有意なレベル ($p < 0.05$) での減少が認められた。肉部については、寄生虫有無の検体間に有意差は認められなかったが、PL, FFA, TG分画ともに脂肪酸量はアニサキス寄生の検体の方が寄生なしの検体に比べ多かった。なお、遊離脂肪酸量は寄生虫の有無にかかわらず肉部に比べ内臓が11-12倍と著しく高かった。

考 察

生のカタクチイワシを食した人々から多発したアニサキス症患者の症状は、腹痛、吐き気、嘔吐、発疹を主訴とし著しい呼吸困難やショック状の重篤なものも含まれ、アレルギー症状が主体であった。³⁾ これらの症状はアニサキス症の個人の患者に見られるものであるが、短い日時に多数が発症したことに特徴がある。

著者らはアニサキス自体の病原性以外に、魚に易熱性の起因物質がないかを検索してきたが、本報でアニサキス有無による脂肪酸組成の差異を調べた結果、アニサキス寄生のカタクチイワシの内臓中の遊離脂肪酸含量が寄生の無いものに比べ有意に高いことを見いだした。

脂肪酸組成の差のみではアレルギー症状の強いアニサキス症の原因を説明することはできないが、近年、不飽和脂肪酸の代謝産物をアレルギー起因物質と関連づける研究が多く示されている。特に、C20のアラキドン酸(AA)は哺乳動物をはじめとする生体内で酵素の関与によりプロスタグランディン(PG)をはじめ種々の酸化物を生じ、炎症組織で重要な役割を果たしていることがよく知られている。¹⁰⁻¹¹⁾ また、アナフィラキシー反応時に放出されるslow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A)はAAの生体内酸化物であるロイコトリエン混合物(LT-C, D, E)であることが判明し注目されている。¹²⁾

今回、寄生魚の内臓中で増加した遊離脂肪酸、なかでもポリエン酸の含量が最も高く、アニサキス寄生イワシの寄生なしのものに対するポリエン酸含量

TABLE II. Fatty Acid Concentrations in Various Lipid of Anchovy Viscera with and without Parasite

Fatty acids	With parasite (n=4)			Without parasite (n=4)		
	PL	FFA	TG	PL	FFA	TG
14:0	0.66 (0.03)	1.95 (0.45)	6.82 (1.14)	0.61 (0.10)	1.63 (0.12)	7.57 (3.60)
16:0	2.63 (0.29)	8.32 (0.40) ^{a)}	16.35 (5.11)	2.79 (0.24)	6.79 (1.23)	14.79 (6.51)
16:1 (n-7)	0.35 (0.13)	3.40 (0.62) ^{a)}	9.11 (3.43)	0.29 (0.05)	2.22 (0.24)	4.85 (2.57)
18:0	0.82 (0.17) ^{a)}	3.06 (0.40) ^{a)}	3.86 (1.44)	1.10 (0.14)	2.21 (0.46)	3.17 (0.98)
18:1 (n-7)	0.45 (0.17)	3.39 (2.07)	7.78 (6.94)	0.46 (0.10)	2.49 (1.32)	6.84 (6.16)
18:1 (n-9)	0.36 (0.09)	2.45 (1.02)	3.75 (0.82)	0.39 (0.07)	1.63 (0.73)	2.94 (1.19)
18:2 (n-6)	0.04 (0.01)	0.46 (0.06)	0.58 (0.17)	0.05 (0.02)	0.43 (0.05)	1.07 (0.82)
18:3 (n-3)	0.01 (0.01)	0.11 (0.02) ^{a)}	0.10 (0.07)	0.01 (0.01)	0.08 (0.02)	0.16 (0.10)
18:4 (n-3)	0.04 (0.01)	0.96 (0.24)	0.82 (0.38)	0.05 (0.02)	0.77 (0.17)	1.30 (0.84)
20:1 (n-9)	0.07 (0.04)	0.42 (0.22)	1.35 (0.41)	0.10 (0.06)	0.94 (0.82)	4.95 (4.98)
20:3 (n-6)	0.01 (0.01)	0.11 (0.03) ^{a)}	0.08 (0.04)	0.01 (0.01)	0.06 (0.02)	0.15 (0.11)
20:4 (n-6)	0.13 (0.04)	1.27 (0.12) ^{a)}	0.71 (0.24)	0.15 (0.04)	0.81 (0.27)	0.80 (0.32)
20:5 (n-3)	0.50 (0.10)	7.82 (1.08) ^{a)}	5.18 (2.14)	0.57 (0.15)	5.24 (1.35)	7.02 (3.78)
22:0	0.06 (0.01)	0.08 (0.06)	0.19 (0.04)	0.06 (0.02)	0.12 (0.06)	0.30 (0.11)
22:1 (n-9)	0.12 (0.08)	0.57 (0.57)	2.31 (1.25)	0.19 (0.15)	0.62 (0.46)	3.84 (3.16)
22:5 (n-3)	0.11 (0.04)	0.71 (0.11)	0.51 (0.11)	0.16 (0.06)	0.52 (0.22)	0.75 (0.30)
22:6 (n-3)	1.65 (0.84)	5.63 (1.63)	3.36 (0.92)	2.26 (0.75)	4.20 (1.85)	6.28 (3.21)
24:1 (n-9)	0.49 (0.18)	0.17 (0.13)	0.87 (0.41)	0.49 (0.24)	0.16 (0.03)	0.89 (0.11)
Saturated	4.16 (0.42)	13.41 (1.10) ^{a)}	27.20 (7.64)	4.57 (0.24)	10.75 (1.73)	25.82 (11.18)
Monoene	1.85 (0.15)	10.34 (0.97) ^{a)}	25.17 (8.24)	1.92 (0.25)	8.06 (1.60)	24.30 (16.33)
Polyene	2.48 (0.95)	17.06 (2.74) ^{a)}	11.32 (3.28)	3.26 (0.95)	12.11 (3.55)	17.54 (9.44)
Total	8.49 (1.23)	40.84 (4.07) ^{b)}	60.79 (18.86)	9.74 (0.64)	30.94 (3.34)	67.66 (36.66)

μmol/g wet wt.±(SD).

a) $p < 0.05$ b) $p < 0.01$

PL: phospholipid, FFA: free fatty acid, TG: triglyceride.

の比は1.4倍と、飽和脂肪酸の1.2倍に比べ高かった。とりわけEPA並びにAAの濃度が寄生虫なしの検体に比べ有意に高かった事実はアニサキス寄生魚を摂取した場合、遊離型のEPA, AAが多く取り込まれる可能性を示している。

抗原としてのアニサキスと同時にアレルギーのメディエーター源でもあるAAを生体内に多く取り込んだ場合、アレルギー反応が相乗的に増強される可能性もあるのではないかと考えられる。

ま と め

カタクチイワシへのアニサキス寄生率と、マウス致死作用との関連性並びにアニサキス寄生の有無とイワシ脂肪酸含量の差異を調べた。カタクチイワシへのアニサキス寄生率とイワシの脂溶性画分のマウ

ス致死作用との間には有意な相関は認められなかった。アニサキス寄生カタクチイワシの内臓中の遊離脂肪酸は寄生なしのものに比べ有意なレベル($p < 0.01$)で高値を示した。とくにパルミチン酸、パルミトール酸、ステアリン酸、リノレン酸、エイコサトリエン酸、AA、EPAの増加が明らかであった($p < 0.05$)。一方、アニサキス寄生イワシ内臓のリン脂質、中性脂質中の脂肪酸含量は少なかった。もしアニサキス寄生によりカタクチイワシ内に産生された物質が多発アニサキス症と関連があるとすれば、FFA量の増加が問題となる。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、貴重な御助言をいただいた当研究所の田中寛所長並びに千葉県水産試験場の平本紀久雄室長に謝意を表します。

TABLE III. Fatty Acid Concentrations in Various Lipid of Anchovy Flesh with and without Parasite

Fatty acids	With parasite (n=3)			Without parasite (n=3)		
	PL	FFA	TG	PL	FFA	TG
14:0	0.13 (0.05)	0.15 (0.03)	5.28 (3.04)	0.14 (0.05)	0.12 (0.04)	3.95 (0.88)
16:0	3.26 (1.72)	1.73 (0.29)	15.09 (9.74)	2.77 (0.83)	1.45 (0.49)	9.93 (2.73)
16:1 (n-7)	0.18 (0.08)	0.17 (0.07)	6.63 (5.79)	0.15 (0.06)	0.09 (0.08)	4.01 (1.44)
18:0	0.60 (0.16)	0.17 (0.01)	3.20 (1.93)	0.57 (0.04)	0.15 (0.03)	2.27 (0.61)
18:1 (n-7)	0.46 (0.19)	0.18 (0.10)	7.14 (9.54)	0.35 (0.09)	0.10 (0.02)	2.17 (1.65)
18:1 (n-9)	0.41 (0.15)	0.20 (0.11)	5.23 (3.40)	0.40 (0.10)	0.15 (0.07)	3.33 (1.79)
18:2 (n-6)	0.07 (0.02)	0.02 (0.02)	0.64 (0.31)	0.07 (0.01)	0.01 (0.01)	0.34 (0.09)
18:3 (n-3)	0.01 (0.01)	ND	0.12 (0.10)	ND	ND	0.07 (0.02)
18:4 (n-3)	0.03 (0.01)	0.02 (0.02)	0.71 (0.36)	0.03 (0.02)	0.02 (0.02)	0.65 (0.42)
20:1 (n-9)	0.05 (0.02)	0.02 (0.02)	1.16 (0.19)	0.06 (0.05)	0.02 (0.03)	1.04 (0.91)
20:3 (n-6)	0.01 (0.01)	ND	0.13 (0.11)	0.01 (0.02)	ND	0.05 (0.05)
20:4 (n-6)	0.23 (0.10)	0.05 (0.03)	0.88 (0.38)	0.18 (0.07)	0.04 (0.02)	0.56 (0.22)
20:5 (n-3)	0.70 (0.33)	0.35 (0.17)	5.62 (3.05)	1.00 (0.56)	0.29 (0.17)	4.12 (2.35)
22:0	0.01 (0.01)	ND	0.10 (0.09)	ND	ND	0.08 (0.08)
22:1 (n-9)	0.02 (0.02)	0.03 (0.02)	1.18 (0.64)	0.04 (0.04)	0.02 (0.03)	1.73 (1.50)
22:5 (n-3)	0.15 (0.10)	0.01 (0.01)	0.48 (0.19)	0.11 (0.04)	0.02 (0.02)	0.31 (0.16)
22:6 (n-3)	6.78 (5.01)	0.27 (0.23)	4.41 (3.09)	5.65 (3.09)	0.28 (0.27)	3.22 (2.15)
24:1 (n-9)	0.12 (0.05)	0.01 (0.01)	0.84 (0.63)	0.08 (0.02)	0.01 (0.01)	0.53 (0.24)
Saturated	4.01 (1.92)	2.04 (0.33)	23.88 (14.97)	3.47 (0.91)	1.72 (0.55)	16.23 (4.19)
Monoene	1.24 (0.41)	0.62 (0.19)	22.81 (14.62)	1.08 (0.18)	0.40 (0.17)	11.97 (0.62)
Polyene	7.97 (4.90)	0.73 (0.37)	13.19 (5.23)	7.08 (3.72)	0.67 (0.43)	9.33 (5.23)
Total	13.21 (6.85)	3.39 (0.60)	59.88 (33.72)	11.63 (4.17)	2.78 (1.12)	37.54 (6.71)

μmol/g wet wt. ± (SD).

ND: not detected.

PL: phospholipid, FFA: free fatty acid, TG: triglyceride.

引用文献

- 1) N. Kagei, *Bull. Inst. Publ. Health*, **19**, 76 (1970).
- 2) 鈴木達也, 平本紀久雄, 水産海洋学会講演要旨集, 東京, 1990 年, p.65.
- 3) 林 幸夫, 安藤由記男, 第 50 回日本公衆衛生学会講演要旨集, 盛岡, 1991 年, p.830.
- 4) J. Sajiki, K. Takahashi, *Lipids*, "submitted."
- 5) 佐二木順子, 高橋勝弘, 浜崎智仁, 衛生化学, **38**, 57 (1992).
- 6) 鹿取 信, 山本尚三, 佐藤和雄, 阿部圭志編, "プロスタグランディン最近の研究の進歩," 講談社サイエンティフィック, 1987, pp.58—71.
- 7) E.M. Hill, D.L. Holland, K.H. Gibson, E. Clayton, A. Oldfield, *Proc. R. Soc. London.*, **B234**, 455 (1988).
- 8) 山本尚三, 鹿取信編, 現代化学増刊, **6**, 3 (1986).
- 9) J. Folch, M. Lees, G.H. Sloanestanley, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- 10) M. Johnson, F. Carey, R.M. McMillan, *Essays in Biochemistry* (Edited by P.N. Campbell, and R. D. Marshall, R.D.) Vol. 19, pp.40—141, Academic Press, London (1983).
- 11) A.W. Ford-Hutchinson, Leukotrienes as potential mediators of inflammation. In *Advances in Inflammation Research* (Edited by Otterness I., Wong, S.) Vol. 7, pp.29—35, Raven Press, New York (1984).
- 12) B. Samuelsson, *Science*, **220**, 568 (1983).