

パルスパワーによる魚肉中
アニサキス幼虫の不活性化と
その有用性の検討

2024 年 3 月

熊本大学大学院自然科学教育部

鬼塚 千波里

目次

第1章 序論

1.1	アニサキスによる食中毒	1
1.2	アニサキスの分類および生活環	2
1.3	アニサキス幼虫の生体構造	3
1.4	アニサキス食中毒の一般的な予防方法	3
1.5	パルスパワー技術	4
1.6	本研究の目的	5
1.7	本論文の構成	6

第2章 パルスパワーによるアニサキスの不活性化及び評価方法

2.1	アニサキスの採取および同胞種同定	7
2.2	アニサキス入りフィレーの作製法	7
2.3	アニサキスの不活性化及びその評価方法	8

第3章 アニサキス不活性化に関する電気パラメータの検討

3.1	魚肉の導電率測定	11
3.2	φ40 cm 平行平板電極を用いた実験	12
3.2.1	実験装置	12
3.2.2	導電率依存性	14
3.2.3	印加回数依存性	15
3.3	φ20 cm 平行平板電極を用いた実験	16
3.3.1	実験装置	16
3.3.2	導電率依存性	18
3.3.3	コンデンサ容量依存性	19
3.3.4	充電電圧依存性	20
3.3.5	1パルスのエネルギー依存性	21
3.3.6	電極間距離依存性	24
3.4	本章のまとめ	25

第4章 魚肉の形態によるアニサキス不活性化への影響

4.1 緒言	26
4.2 フィレー内位置依存性	26
4.3 ラウンド魚内位置依存性	28
4.4 鮭肉及び天然で魚肉に潜っていたアニサキスの不活性化	30
4.5 本章のまとめ	33

第5章 パルス処理した魚肉の品質評価

5.1 緒言	34
5.2 官能評価	34
5.3 破断試験による食感評価	35
5.4 色の評価	37
5.5 本章のまとめ	38

第6章 アニサキス殺虫装置の開発

6.1 開発方針	40
6.1.1 処理対象	40
6.1.2 温度上昇の抑制	40
6.1.3 安全対策	41
6.1.4 品質工学	41
6.2 開発機	41
6.2.1 処理槽の仕様決定	41
6.2.2 パルス電源の仕様決定	44
6.2.3 処理工程	47
6.2.4 最終仕様	48
6.2.5 殺虫試験及び処理した魚肉の安全性確認	49
6.3 本章のまとめ	50

第7章 総括

謝辞

参考文献

第1章 序論

1.1 アニサキスによる食中毒

アニサキスは魚介類の内臓に寄生する寄生虫であり、世界に広く分布している。魚介類を刺身等の非加熱状態で摂取し、生存しているアニサキスが人体に入ると、アニサキスが人の胃や腸管に穿入し、腹痛や嘔吐を引き起こす。これはアニサキス食中毒（アニサキス症）と呼ばれ、世界中で報告されている（Lim *et al.*, 2015; Shamsi and Butcher, 2011）。アニサキス症は感染部位により胃アニサキス症と腸アニサキス症に分類され、内視鏡で虫体を見つけて鉗子で虫体を摘出することが最も有効な治療である。

刺身や寿司など魚介類の生食文化が根付いている日本では、諸外国に比べてアニサキス食中毒の発生件数が非常に多く、古くから問題となっている。発生状況を的確に把握することを目的に、2012年に食品衛生法施行規則が一部改正され、アニサキスが食中毒の病因物質の種別として食中毒事件票に新たに追加された。アニサキスによる食中毒が疑われる患者を診断した医師は、24時間以内に最寄りの保健所に届け出ることが必要となり、厚生労働省の食中毒統計資料によると、アニサキス食中毒の報告件数は年々増加傾向にある（図1-1）。令和4年病因物質別食中毒発生状況では、日本で発生した食中毒事件数のうち約60%がアニサキスによるものであり、566件（患者数578人）報告されている（図1-2）。しかし実際の患者数は、報告されているよりも多いと考えられており、2018-2019の年間発生件数は約20,000件にも及ぶと推測されている（Sugiyama *et al.*, 2022）。

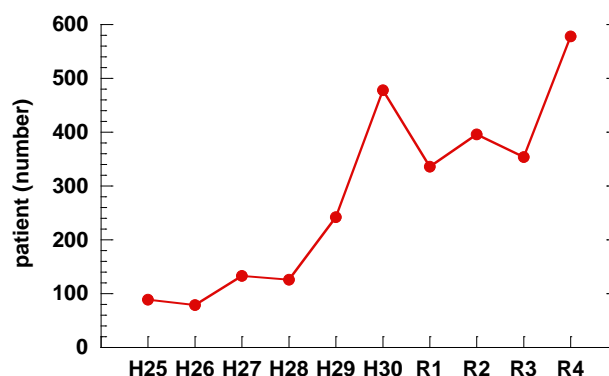


図1-1 アニサキス食中毒患者数推移
(厚生労働省食中毒統計資料より作成)

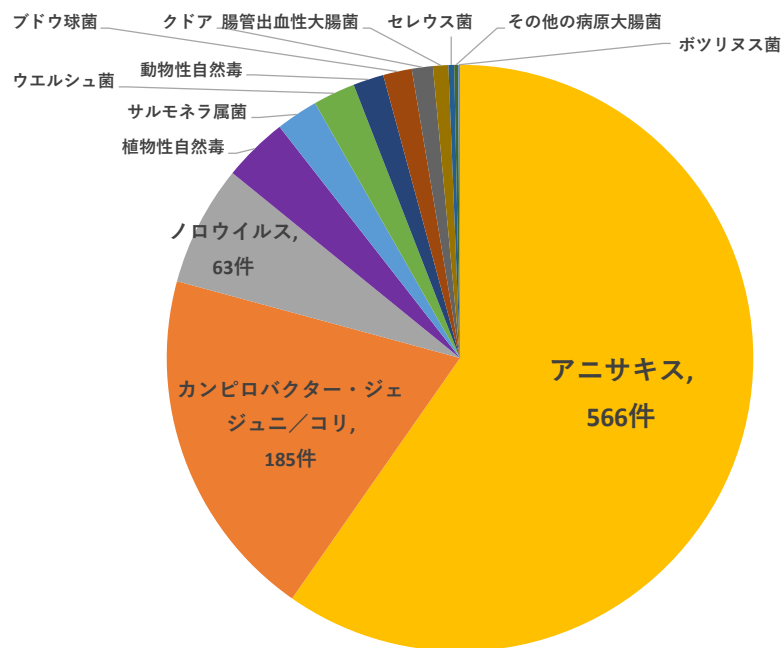


図 1-2 令和 4 年病因物質別食中毒発生状況
(厚生労働省食中毒統計資料より作成)

1.2 アニサキスの分類及び生活環

アニサキスは、線形動物門に属するアニサキス亜科幼虫の総称であり、クジラやイルカなどの海棲哺乳類を終宿主とする寄生性の線虫である。アニサキス亜科にはアニサキス (*Anisakis*) 属、シュードテラノーバ (*Pseudoterranova*) 属、コントラシーカム (*Contracaecum*) 属などが含まれる。日本においては *Anisakis simplex* によるアニサキス食中毒が多く報告されており (Sugiyama *et al.*, 2022)、*Anisakis simplex* はさらに *A. simplex sensu stricto*, *A. pegreffii*, *A. simplex* C の同胞種に分類される (鈴木・村田, 2011)。

A. simplex の卵は終宿主である海産哺乳類の糞便とともに海水中に放出される。卵の中で発育・脱皮して第 3 期幼虫となった後孵化し、オキアミなどの小型甲殻類に捕食される。これが魚介類に捕食されると腹腔内で被嚢し、終宿主に捕食されるのを待つことになる。終宿主に捕食されれば、その体内で成虫となる。魚介類の中では第 3 期幼虫にとどまるため、魚介類は待機宿主である。ヒトがこれらの第 3 期幼虫が存在する魚介類を生食した場合、アニサキス食中毒を引き起こす。しかしヒトの体内で成虫になることはなく、ほとんどは第 3 期幼虫のままとどまる (EFSA, 2010; 日本食品衛生協会, 2013)。

1.3 アニサキス幼虫の生体構造

A. simplex 幼虫は長さ 1~3cm 程度で、頭部に穿孔歯 boring tooth、尾端に尾突起 mucron を有す。体壁は、角皮 cuticle、角皮下層 hypodermis、および筋肉層から構成される。角皮は縞状構造を有する非細胞性構造物（クチクラ）であり、クチクラの主成分はキチン（多糖類）とタンパク質、炭酸カルシウムで構成されている（堤, 2001; 村田, 2003）。筋肉層には筋細胞が並んでいる。消化管は食道、腺胃、腸で構成され、循環器系および呼吸器系はない。また、排泄細胞であるレネット細胞をもつ（堤, 2001）。また、かご状神経系を有し、頭部に神経環をもつ（小泉, 2016）。

1.4 アニサキス食中毒の一般的な予防方法

アニサキス食中毒は、生存しているアニサキスがヒトの消化管に穿入することによって起こるため、アニサキスを死滅させ、ヒトへの感染能力を失わせることで予防することができる。アニサキスは熱に弱く、60℃で 1 分、70℃以上では瞬時に死滅する（日本食品衛生協会, 2013）。しかし、加熱してしまうとタンパク質の熱変性が起き、刺身などの生食用としては適さなくなる。そのため非加熱でアニサキスを死滅させるために、様々な検討が行われてきた。化学的方法としては、塩漬け、酢漬け、その他化学物質による処理が検討されたが、アニサキスを死滅させるような濃度では魚肉に官能的影響を与え、刺身として生食するには適さない。物理的方法としては、冷凍、高圧処理、X 線照射、燻製等が検討された（EFSA, 2010）。高圧処理は 207MPa 以上でアニサキスを死滅させることはできたが、魚身が変性して白化するため、刺身にはできない（Dong *et al.*, 2003）。また、X 線照射や燻製ではアニサキスを死滅させることはできなかった（Seo *et al.*, 2006）。魚肉を刺身等で生食する場合、アニサキスを死滅させるための現実的な方法は冷凍のみであり、これはアニサキス食中毒の予防法として現在多くの国で推奨されている。

アニサキスを死滅させるために、十分な冷凍期間が必要であることが分かっている（Wharton *et al.* 2002）。European Food Safety Authority (EFSA) はアニサキスを死滅させるために -20℃で 24 時間、もしくは -35℃で 15 時間、もしくは -15℃で 96 時間の冷凍が効果的だと述べており、生食用の魚介類は一定の冷凍処理を義務付けている（EFSA, 2010）。アメリカの FDA（米国食品医薬品局）も水産加工業者向けのガイダンスで冷凍及び保管工程を示している（FDA, 2022）。日本においても、厚生労働省は -20℃で 24 時間以上冷凍することを推奨している。

しかし、冷凍すると魚肉の質の低下を引き起こす (Leygonie *et al.*, 2012; Nakazawa and Okazaki, 2020)。冷凍により細胞内に形成された氷結晶が細胞膜を損傷し、解凍時にドリップが流出し、身質は軟化する。また、冷凍保管中にメトミオグロビンができることにより、血合肉が茶色く変色する。ドリップや変色は魚の鮮度感を損なわせ、商品価値を下げることになる。特に、アジ・サバ・イワシ等の青魚は解凍後の変色が顕著であり、商品価値を著しく下げる。

アニサキスは肉眼で見える大きさであるため（体長 1~3cm 程度）、手動で除去することも考えられる。アニサキスは蛍光物質を持っており、365nm 付近の波長を当てると蛍光を発する性質があることから、これを利用してブラックライトを当てながらピンセット等でアニサキスを除去する方法もある。しかしこの波長は魚肉を透過しないため魚肉に潜っているアニサキスは発見できず、100%の除去は不可能である。

1.5 パルスパワー技術

パルスパワーとは蓄えた電気エネルギーを短い時間で取り出すことで得られる瞬間的に大きな電力であり、その応用先は多岐に渡る。生物分野・食品分野への応用としてはパルス電界 (Pulsed Electric Field : PEF) による殺菌、酵素の不活性化、食品加工（抽出・乾燥等の容易化、肉質改善等）が知られており、商業利用されているものとしては、フライドポテトの品質改良や液体食品の低温殺菌が知られている (Arshad *et al.*, 2020; Huang and Wang, 2009)。PEF による殺菌原理は、電界が細胞膜にかかることによる細胞膜破壊であるとされており、PEF による殺菌は細菌の大きさに依存することが分かっている (Zimmermann, 1986)。一方、PEF・パルスパワーにより多細胞生物を不活性化させた例はそれほど多くなく、線虫や動物プランクトン、ウミグモの不活性化等が報告されている (谷野他, 2014; Wang and Namihira, 2019; Wang *et al.*, 2011)。

アニサキスはヒトに感染するものとしては比較的大きな寄生虫である。ヒトの病原体となる寄生虫は主に食品や水を通してヒトに感染し、さまざまな症状を引き起こすが、細菌やウイルスに比べて研究が進んでいない。これは、寄生虫の生活環が複雑でありさまざまなステージが存在することや活性評価法が確立されていないことが要因として大きい。PEF・パルスパワーに関しても、動物性寄生虫の不活性化に関する研究例は非常に少ない (Martínez *et al.*, 2023)。PEF を用いて溶液中 (PBS や生理食塩水中) の寄生虫の不活性化を試みた研究としては、ジルジニア *Giardia muris* のシスト、クリプトスポリジウム *Cryptosporidium parvum* のオーシスト、ネグレリア *Naegleria lovaniensis* のトロホゾイト、ブタ回虫 *Ascaris*

suum の卵、*Caenorhabditis elegans* の卵、エキノコックス *Echinococcus granulosus* の原頭節に関する研究がある (Dryzer *et al.*, 2019; Haas and Aturaliye, 1999a; Haas and Aturaliye, 1999b; Niven *et al.*, 2020; Niven *et al.*, 2018; Vernhes *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017)。一方、食品中に存在する寄生虫を不活性化した例は、現在のところ本研究と Abad *et al.* の 2 例のみであり、これらはいずれも魚肉中のアニサキスを不活性化させたものである (Abad *et al.*, 2023; Martínez *et al.*, 2023; Onitsuka *et al.*, 2022)

Onitsuka *et al.* (2022) はパルスパワーによりアニサキスを不活性化できることを明らかにし、導電率及び印加回数の依存性を調べた (本論文第 2、3 章)。また、パルス処理した魚肉の品質を評価した (本論文第 5 章)。Abad *et al.* (2023) は電界強度、比エネルギー (本論文中では「総注入エネルギー密度」としている) およびパルス幅に注目し、応答曲面法 (RSM) を用いてアニサキスの生存率を数式化した。これを解析し、アニサキスの不活性化効果は電界強度と比エネルギーに大きく依存すること、パルス幅は低い電界強度の時のみ決定的な影響を与えることを明らかにした。Onitsuka *et al.* (2024) は注入エネルギー密度に注目し、アニサキスを効率よく不活性化するための電気パラメータの検討およびアニサキスの魚肉中位置が不活性化へ与える影響について調べた (本論文第 3、4 章)。さらに、Onitsuka *et al.* (2023) は、実際に水産加工工場で使用するための、パルスパワーによるアニサキス殺虫装置のプロトタイプ機を製作した (本論文第 6 章)。

1.6 本研究の目的

アニサキス食中毒を予防するための一般的な方法である冷凍は、魚肉の品質の低下を引き起こす。刺身や寿司などの魚肉の生食文化が浸透しており刺身の品質を非常に重視する日本では、冷凍処理せずに生で食べたいというニーズが非常に高く、できるだけ魚肉の品質を低下させずにアニサキスを死滅させる方法が求められている。

本研究では、パルスパワーを用いて魚肉 (マアジ) 中のアニサキスを不活性化させることができたため、その有用性を調べることを目的とした。アニサキスの生死を確実に判断する方法がなく、アニサキスに物理的刺激を与え動きの有無で活性を評価したため、本研究では「殺虫」ではなく「不活性化」という言葉を用いることとする。

具体的には、不活性化効率の向上のため、パルスの各電気パラメータを変化させ、アニサキスの不活性化に与える影響を調べた。また、実用化する上では魚肉中に存在するすべてのアニサキスを確実に不活性化する必要があり、魚肉の形状および組織組成は不均一であるため、魚肉中でのアニサキス位置の影響も調べた。さらに、パルス処理した魚肉の商品価値

を調べるため、魚肉の品質評価を行った。この技術を用いたアニサキス殺虫装置のプロトタイプ機を製作するプロジェクトが組織され、実際に装置が完成した。本論文第6章ではこの装置の開発過程について述べる。

1.7 本論文の構成

- 第1章では、序論として本研究の背景について述べた。
- 第2章では、全章共通の実験手法及びアニサキス活性評価法について述べる。
- 第3章では、 $\phi 40\text{cm}$ 及び $\phi 20\text{cm}$ の平行平板電極を用い、アニサキス不活性化に関する各パルスパラメータの検討について述べる。
- 第4章では、フィレー及びラウンド魚中のアニサキスの位置が不活性化に与える影響について述べる。また、他魚種（鮭）を用いた実験結果を述べる。
- 第5章では、パルス処理した魚肉の官能評価、破断試験、色差計による測定を行い、その品質評価について述べる。
- 第6章では、パルスパワーによるアニサキス殺虫装置のプロトタイプ機の開発過程及び完成した装置の性能について述べる。
- 第7章では、本論文の総括を述べる。

第2章 パルスパワーによるアニサキスの 不活性化及び評価方法

2.1 アニサキスの採取および同胞種同定

実験に用いるアニサキスは長崎沖で水揚げされたマサバ *Scomber japonicus* の内臓から採取し、採取後は生理食塩水 (0.9%NaCl) 中にて4℃で保管した。実験に使用したアニサキスは、PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)法によって同胞種を同定した (Umehara *et al.*, 2007)。まず、アニサキスのゲノム DNA を E.Z.N.A. Tissue DNA kit (Omega bio-tek)を用いて抽出した。これをテンプレートとし、フォーワードプライマー (5'- GATGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT -3') とリバースプライマー (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3')を用いて PCR を行い、Internal Transcribed Spacer (ITS)領域を増幅した。PCR 産物は制限酵素 *Hinf*I (Takara Bio Inc.) で処理した。これを2.5%のアガロースゲルで電気泳動し、DNA の切断パターンを調べた。マサバの内臓から採取し実験に用いたアニサキスのうち 32 個体を調べ、すべての検体でバンドが約 330 bp、約 280 bp、約 220 bp の位置に見られたことから、実験に用いたアニサキスは *A. pegreffii* であることが分かった。

2.2 アニサキス入りフィレの作製法

アニサキスを入れる魚肉は、マアジ *Trachurus japonicus* (主に長崎沖で漁獲されたもの) のフィレを用いた。漁獲ロットによってマアジのサイズや脂質量、水分量などの成分が異なり、これがフィレの電気パラメータに影響すると考えられるため、同じ項の実験では同じ漁獲ロットのマアジを使用した。実験に使用したマアジフィレのサイズは、長さ約 90 ~130 mm、幅 40~50 mm、厚さ約 7~11 mm、重さ約 15~35 g であった。

アニサキス入りフィレを作製するため、マアジフィレに切れ込みを入れてアニサキスを挿入し、アニサキスがない部分の肉をトランスグルタミナーゼ (アクティバ、味の素) で接着し、アニサキスを魚肉内部に閉じ込めた。第3章ではアニサキスはフィレの中央付近に仕込み (図 2-1)、第4章では実験の目的に応じて種々の場所に仕込んだ (詳細は第4章で述べる)。

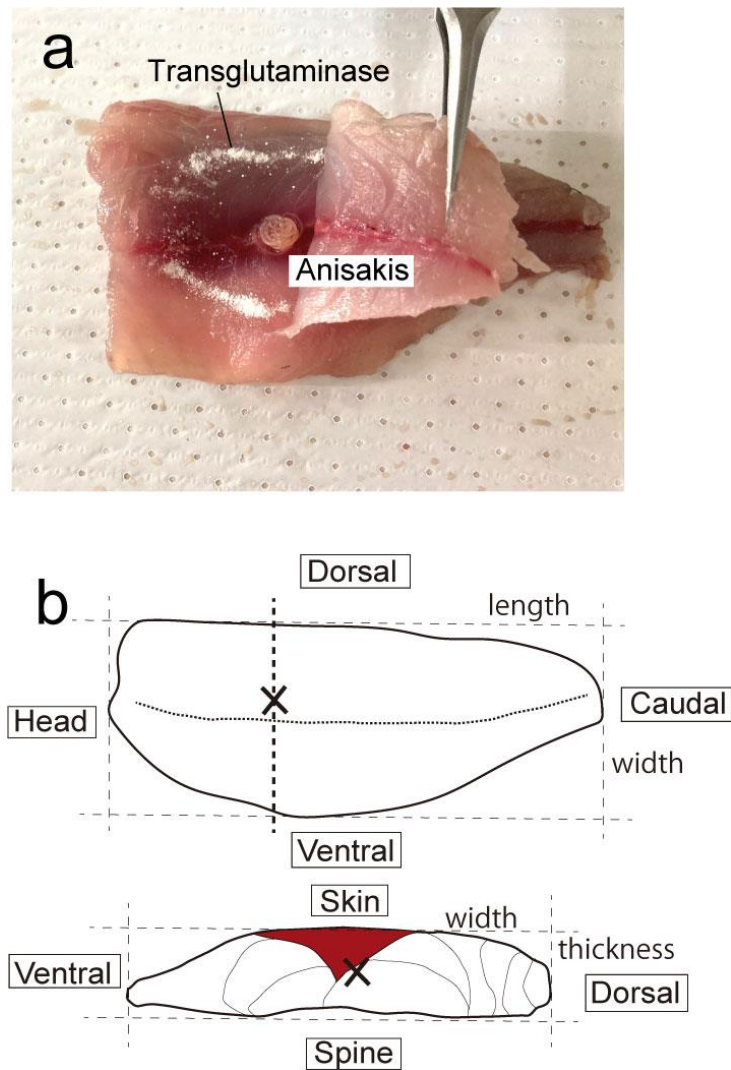


図 2-1 アニサキス入りフィレの作製、
 (a) 切れ込みを入れたフィレとアニサキス、
 (b) フィレ内のアニサキスの位置（中央に仕込む場合） (Onitsuka *et al.*, 2022)

2.3 アニサキスの不活性化及び評価方法

本研究ではコンデンサバンク回路及び平行平板電極を用いてパルスパワーをアニサキス入りフィレに印加した。コンデンサバンク回路の回路図を図 2-2 に示す。実験装置及び印加条件の詳細は次章以降で述べる。

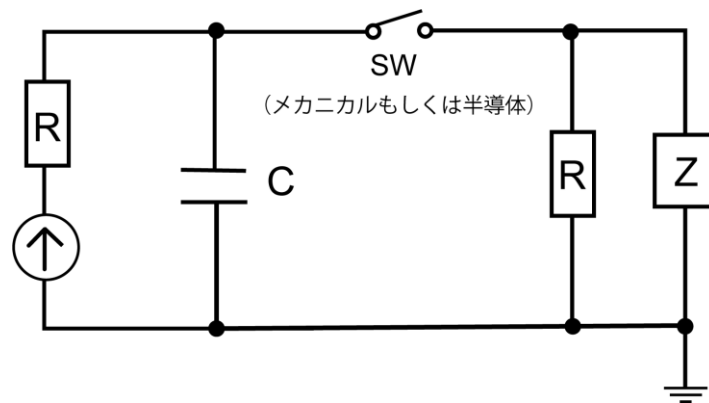


図 2-2 コンデンサバンク回路

寄生虫の生存の一般的な判断基準は自発的な運動である（日本食品衛生協会, 2015）。アニサキスの活性評価は、アニサキスを 37℃に温めた生理食塩水中に入れてピンセットで刺激を与え、動きがなかったものを「不動」（＝不活性化）とした。パルス処理直後は生きていても気絶状態で動かないものが多く、正確な判定ができないことから、パルス処理後 24 時間後、48 時間後に評価を行い、不動率（全数に対する「不動」の割合）を算出した。

アニサキス入りフィレーへパルスを繰り返し印加することにより、フィレー内部のアニサキスを不活性化できることが確認された。アニサキスはパルス処理後フィレーから取り出し、評価時まで生理食塩水に入れて 4℃で保管した。未処理のアニサキス（コントロール）もパルス処理したアニサキスと同じ方法で保管し、評価時に生存していることを確認した。既報文献のほとんどは生理食塩水中でアニサキスを保管しており本研究も同じ溶液中で保管したが、保管溶液成分のアニサキスへの影響も今後検討する必要がある。

パルス処理した直後はアニサキスの外観に明らかな変化は見られないが、不活性化したアニサキスの多くは時間が経つと膨化・白濁し、死亡していることが確認された（図 2-3）。

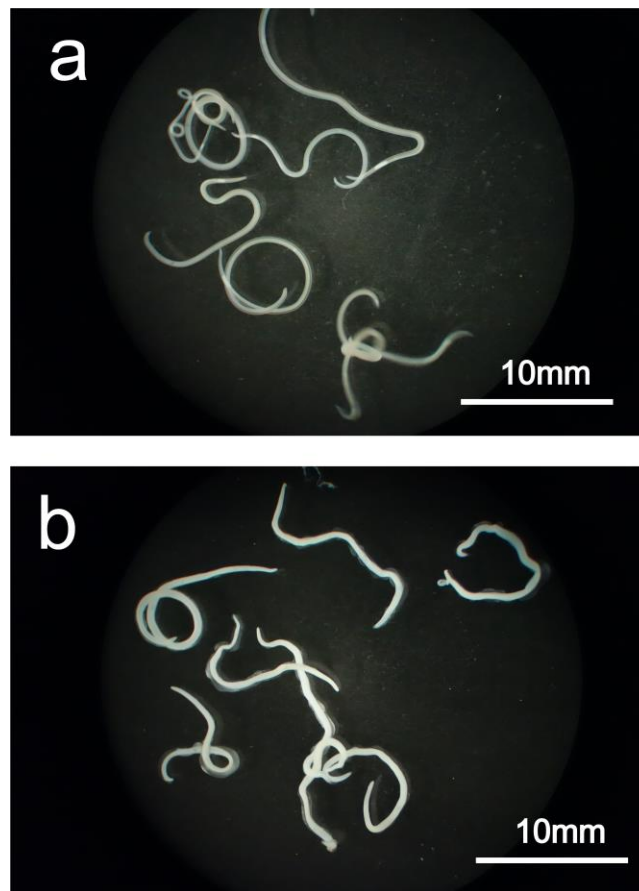


図 2-3 アニサキスの実体顕微鏡写真

(a) 未処理のアニサキス、(b) パルス処理後 24 時間後のアニサキス (Onitsuka *et al.*, 2022)

第3章 アニサキス不活性化に関する 電気パラメータの検討

3.1 魚肉の導電率測定

マアジフィレー内のアニサキスを不活性化するにあたり、マアジフィレーの電気的特性である導電率を測定した。信号発生器（ファンクションジェネレータ）の電圧を信号増幅器（高速バイポーラアンプ）で増幅し、平行平板電極に挟んだフィレーに電圧を印加し、オシロスコープで電圧と電流の波形を測定した。周波数を $1 \sim 10^4$ kHz まで変化させ、読み取った電圧値と電流値から導電率を求めた。どの周波数においても位相差がなく、抵抗成分のみであると考えられた。フィレーの導電率は個体や測定部位により数 mS/cm 程度のばらつきがあった。8 検体の平均を図 3-1 に示す（エラーバーは標準誤差）。周波数が高くなるほど導電率は高くなり、これは一般的に知られている生体組織の特性と一致している（和氣他, 2021）。コンデンサバンク回路によるパルス電流の周波数成分は約 100 kHz であり、この周波数におけるアジフィレーの導電率は平均で約 8 mS/cm であった。

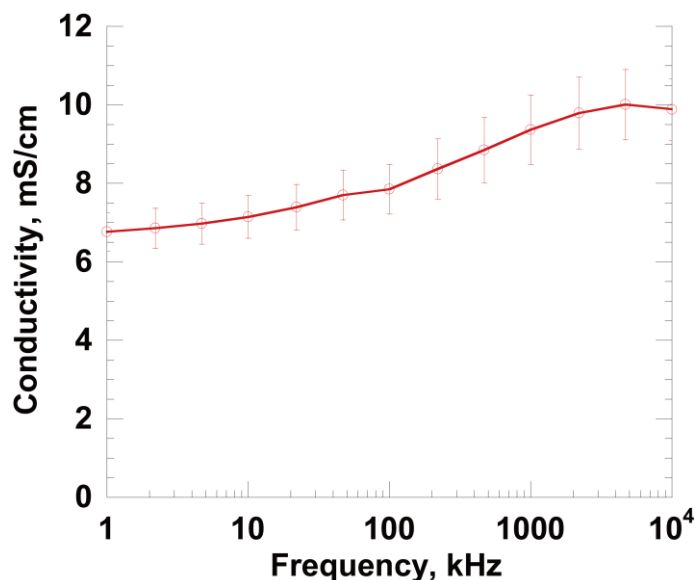


図 3-1 マアジフィレーの導電率 (Onitsuka *et al.*, 2023)

3.2 ϕ 40cm 平行平板電極を用いた実験

3.2.1 実験装置

一度に 3~7 kg 程度のアジフィレーを処理することを想定し、直径 40 cm、電極間距離 11 cm のステンレス製平行平板電極を使用して実験を行った（電極間体積 13.8 L）。この実験装置は、第 6 章の装置開発を視野に入れた実験機となっている。パルスパワー電源として、コンデンサ容量 40 μ F もしくは 80 μ F のコンデンサバンク回路を充電電圧 15 kV にて動作させた。フィレーは温度が上がると品質が落ちてしまうため、バッファ塩水を利用して温度上昇を抑える構造とした。図 3-2 a のように、180 L のバッファ塩水で満たしたプラスチック製円筒タンク内へ電極を沈め、電極間にフィレーを入れたメッシュかごを設置し、パルス電流を流した。下部電極に空けた穴からポンプによって電極間に水流が噴出し、電極間の温度上昇した水と電極外の冷たいバッファ塩水が入れ替わることでフィレーが冷却するようにした。実験装置の写真を図 3-2 b に示す。初期塩水温度は 5~6°C とした。

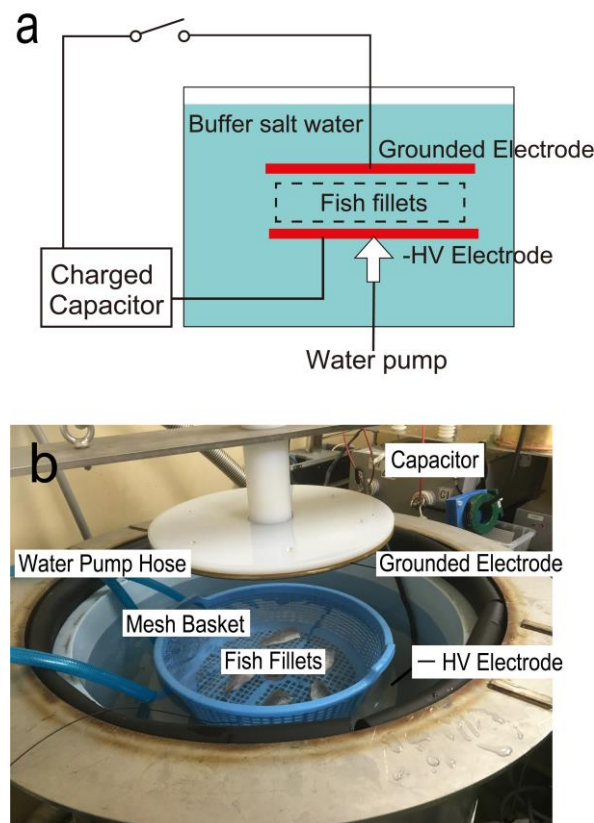


図 3-2 ϕ 40cm 電極実験装置、
(a) 実験装置の模式図、(b) 実験装置処理槽の写真 (Onitsuka *et al.*, 2022)

パルス印加時の典型的な電圧・電流及び電力・エネルギー波形を図 3-3 に示す。これらは、コンデンサ容量 80 μF 、充電電圧 15 kV、バッファ塩水導電率 5 mS/cm の条件における波形である。電圧、電流、電力のピーク値は、それぞれ 15 kV、6 kA、100 MW であり、電流ピーク 10 %以上の時間幅は約 380 μs であった。エネルギー転送効率は約 78 %であった。

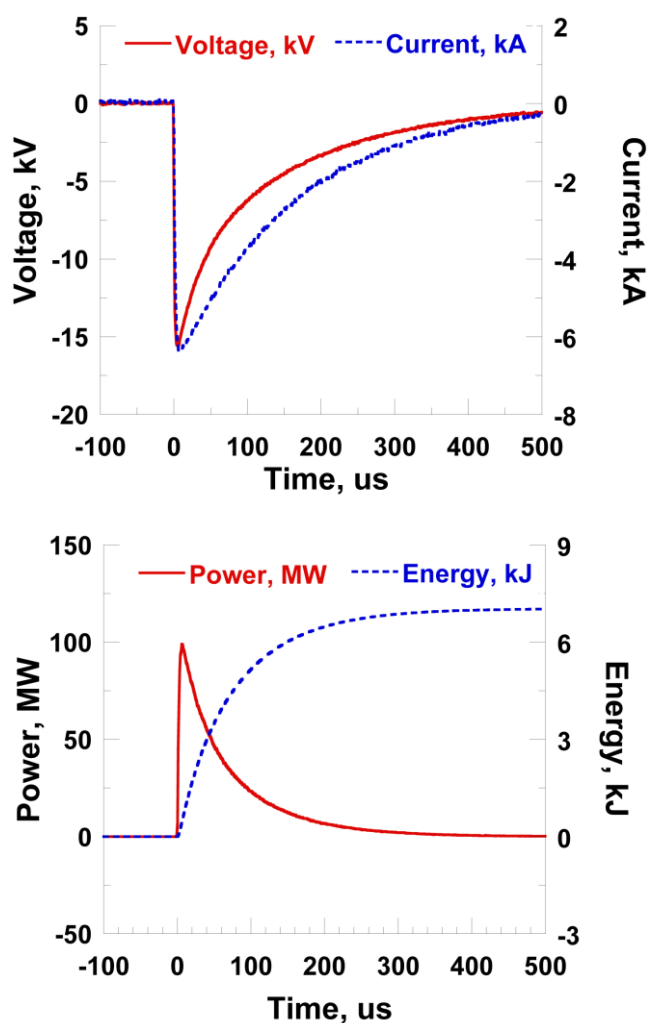


図 3-3 電流電圧波形及び電力エネルギー波形
(コンデンサ容量 80 μF 、充電電圧 15 kV、塩水導電率 5 mS/cm) (Onitsuka *et al.*, 2022)

ここで、本研究で用いたパルスパワーの電流について考える。塩水で満たされた平行平板電極間に高電圧パルスを印加した場合、電界が電極間に形成される。この時、電極間塩水の等価回路は抵抗成分 R と容量成分 C の並列回路で表すことができる。したがって、時定数

τ は、次の式で表される (Wang and Namihira, 2019)。

$$\tau = RC = \frac{1}{\sigma} \frac{d}{s} \varepsilon \frac{s}{d} = \frac{\varepsilon}{\sigma}$$

σ および ε は、液体の導電率および誘電率を表す。誘電率は、「 $\varepsilon = \varepsilon_0 \varepsilon_r$ 」と表され、水の比誘電率「 ε_r 」は約 86 (6 °C時)、真空の誘電率「 ε_0 」は 8.854 pF/m である。本研究のほとんどの実験は塩水導電率 5 mS/cm で行った。 σ が 5 mS/cm の場合、 τ は約 1.5 ns となる。本研究で用いたパルスは、少なくとも数 μ s の電圧立ち上がり時間を持ち (図 3-3 および図 3-10 の電流電圧波形参照)、これは τ よりも非常に長いため、電極間を流れる電流は主に伝導電流であり、変位電流ではないことがわかる。

3.2.2 導電率依存性

フィレー1枚にアニサキスを10隻入れたアニサキス入りフィレーを作製した。このアニサキス入りフィレー5枚とマアジフィレー5.5 kg (フィレー約250枚)を電極間に入れてパルスを印加した (1実験にアニサキスは計50隻使用)。バッファ塩水は食塩を水に溶かし、導電率を0.2 (水道水)、2.0、5.0、8.5、11.5 mS/cm に調整してコンデンサ容量 40 μ F、印加周波数 1 Hz にてそれぞれ500回のパルスを印加した。

塩水導電率とアニサキスの不動率の関係を図 3-4 に示す。パルス印加後、24 時間経過時においては、5.0 及び 8.0 mS/cm のバッファ塩水導電率時に、48 時間経過時においては、バッファ塩水導電率 5.0 mS/cm 時に最も不動率が高くなった。

電極間を流れる電流について考察する。簡易的には塩水とフィレーは並列接続された抵抗と考えることができる。塩水の導電率が高い場合には電極間全体の電流は大きくなるが、その導電率がフィレーよりも高すぎると電流は塩水に一方的に偏ることになり、フィレーに流れる電流の割合が小さくなる。塩水の導電率がフィレーより低い場合は塩水よりもフィレーに電流が流れやすくなるが、塩水の抵抗が大きいために流れる電流が小さくなる。結果として今回の条件においては、塩水導電率 5 mS/cm の時にフィレーに最も電流が流れたと考えられる。

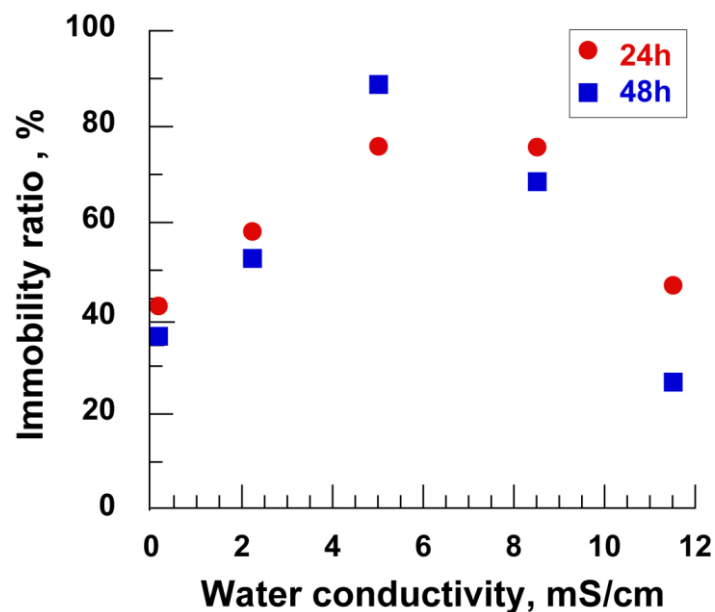


図 3-4 バッファ塩水導電率と不動率（ ϕ 40 cm 平行平板電極）（Onitsuka *et al.*, 2022 より改変）

3.2.3 印加回数依存性

フィレー1枚にアニサキスを10隻入れたアニサキス入りフィレーを作製した。このアニサキス入りフィレー5枚とマアジフィレー5.5kg（フィレー約250枚）を電極間に入れてパルス印加した（1実験にアニサキスは計50隻使用）。導電率は5 mS/cmに固定し、コンデンサ容量80 μ F、印加周波数1 Hzで100、200、300、400、500回のパルス印加した。パルス印加回数とアニサキスの不動率の関係を図 3-5 に示す。印加回数が多くなるほど不動率は高くなり、500回にて24時間後、48時間後ともに100%に達した。このことから、アニサキスへのダメージは、回数に応じて蓄積していき、それが致死的なレベルに達することで死亡すると考えられた。

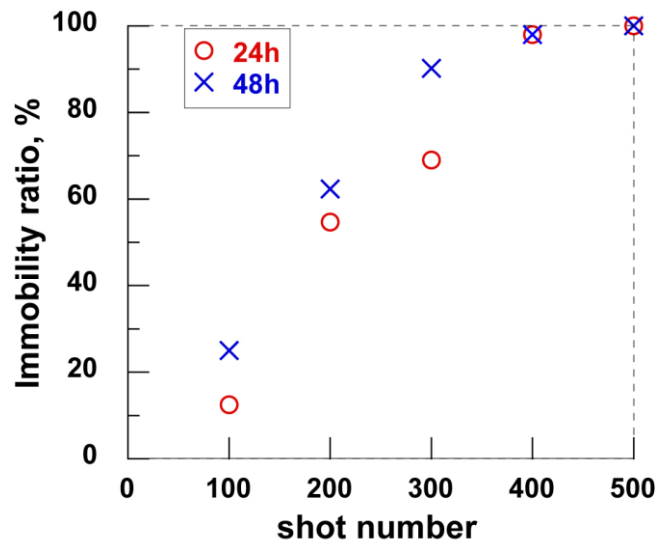


図 3-5 印加回数と不動率 (Onitsuka *et al.*, 2022 より改変)

3.3 ϕ 20cm 平行平板電極を用いた実験

3.3.1 実験装置

前節 3.2 では ϕ 40 cm 平行平板電極を用い、電極間の塩水導電率がアニサキスの不活性化効率に影響すること、印加回数が増えるほどアニサキスの不動率が上がることが明らかとなった。アニサキスの不活性化効率を上げるため、より基礎的な研究として各種電気パラメータ及び注入エネルギーに着目して実験を行った。前節の ϕ 40 cm 平行平板電極では電極間距離を 11 cm とし、フィレーを電極間で攪拌しながらパルスを印加したが、本節では電極面積及び電極間距離を小さくし(後述)、フィレーは静止状態で実験を行った。

実験装置の模式図およびリアクタの写真を図 3-6 に示す。パルス電源は前節と同様、コンデンサバンク回路を使用した。静電容量は実験によって 0.4~2.4 μ F とし、最大充電電圧は 30 kV、動作周波数は 0.5 Hz とした(実験条件の詳細は各項で述べる)。回路は高電圧リレー (E60-DT-80、Ross Engineering Corporation)、コンデンサ (型番 31392、Maxwell technologies)、充電電源 (152A-40kV-NEG、TDK-Lambda Corporation) を用いて構成した。電圧プローブ (EP-50K、Nissin Pulse Electronics)、電流プローブ (Current Monitor Model 101、Pearson Electronics、とオシロスコープ (Teledyne LeCroy HDO8108、Testwall) を用いて電圧波形と電流波形を測定した(波形の一例は図 3-10 に示す)。電極は直径 20 cm の円形ステンレス平行平板を用い、上部電極に負の高電圧パルスを印加した。電極はアクリル円筒中に設置し、「3.3.6 電極間距離依存」の実験以外は電極間距離を 20 mm とした(電

極間体積 628 cc)。電極間は導電率を調整した塩水で満たし、その中にアニサキス入りフィレーを入れてパルスを印加した。電極及びアクリル円筒は氷水に漬け、冷やしながらパルスを印加した。電極間塩水の初期温度は 2～4℃であり、パルス印加後の塩水温度は 2～7℃であった。

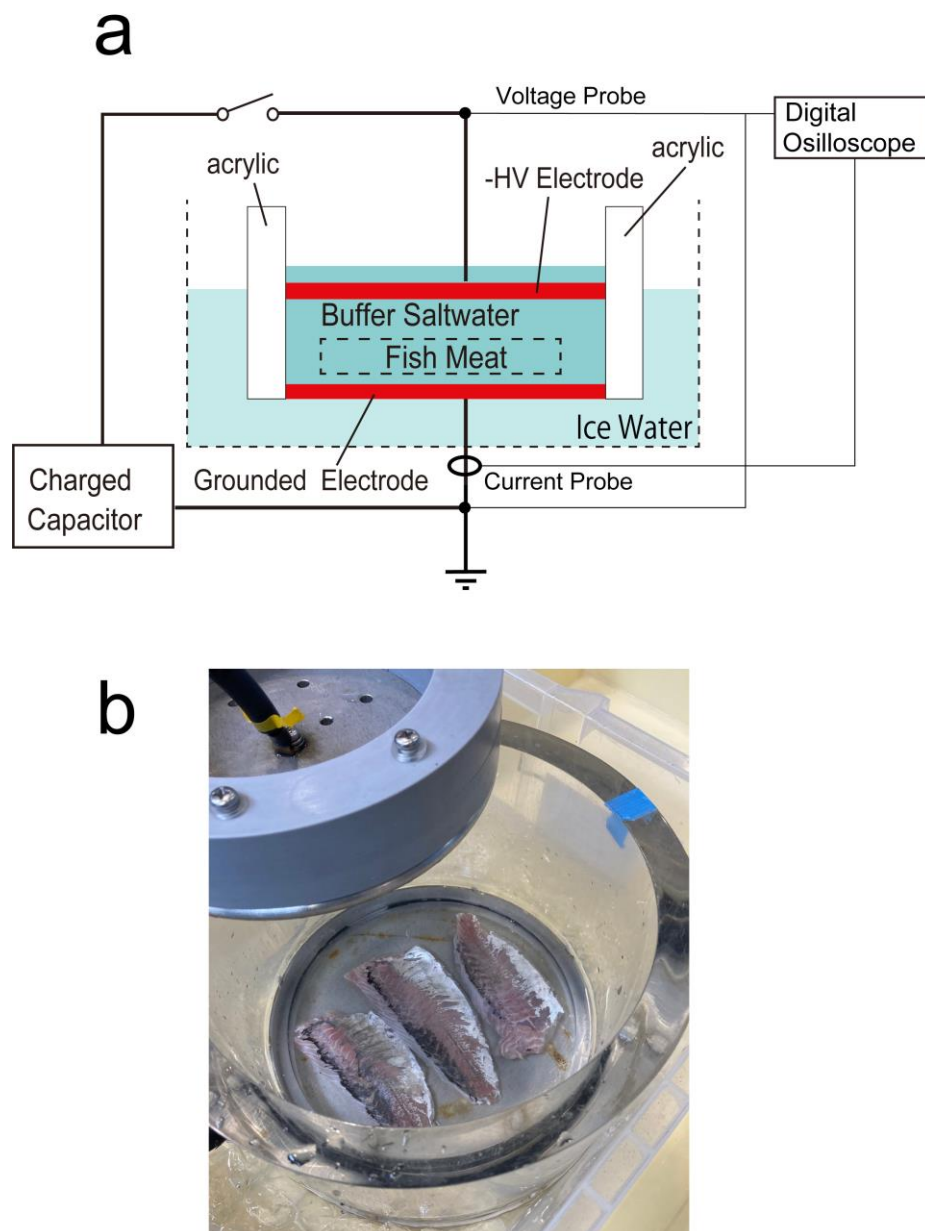


図 3-6 ϕ 20cm 電極実験装置、(a) 実験装置の模式図、(b) リアクタの写真 (Onitsuka *et al.*, 2024)

本実験において、「注入エネルギー密度」及び「総注入エネルギー密度」は以下の式で定義した。C はコンデンサ容量 [F] であり、V は充電電圧 [V] である。

$$\text{注入エネルギー密度 [J/cc/pulse]} = \frac{CV^2}{2 \times (\text{電極間体積 [cc]})}$$

総注入エネルギー密度 [J/cc] = 注入エネルギー密度 [J/cc/pulse] × 印加回数

本節の実験では、1 実験につきアニサキスを 10 隻入れたアニサキス入りフィレーを 3 枚使用し（アニサキス計 30 隻）、フィレーによるばらつきを見るため、フィレー毎に不動率を計算して平均値及び標準誤差を求めた（n=3）。以降のグラフ中のエラーバーは標準誤差を示す。

なお、本節の実験の目的は、一つのパラメータを変化させた場合のアニサキス不動率への影響を調べることであり、その違いが見れるような総注入エネルギー密度で実験を行った。そのため同じ項内では総注入エネルギー密度は固定しているが、その値は項によって異なる。

3.3.2 導電率依存性

塩水導電率の不動率への影響を見るため、3 通りのパルス条件（コンデンサ容量と充電電圧の組み合わせ）において、塩水導電率を変化させて不動率を比較した。1 つ目の条件は、コンデンサ 2.4 μF, 充電電圧 30 kV (1.7 J/cc/pulse, 総注入エネルギー密度 8.6 J/cc) で、塩水導電率を 2, 5, 8, 11, 14, 17 mS/cm に変化させた。2 つ目の条件は、コンデンサ容量 2.4 μF, 充電電圧 20 kV (0.76 J/cc/pulse, 総注入エネルギー密度 3.8 J/cc) で塩水導電率を 3, 5, 7, 9, 11, 13 mS/cm に変化させた。3 つ目の条件は、コンデンサ容量 1.6 μF, 充電電圧 30 kV (1.15 J/cc/pulse, 総注入エネルギー密度 5.7 J/cc) で塩水導電率を 3, 5, 7, 9, 11, 13 mS/cm に変化させた。すべての条件において印加回数は 5 回とした。塩水導電率と不動率の関係を図 3-7 に示す。グラフでは 48 時間後のデータのみ示しているが、24 時間後も同じような傾向であった。塩水導電率を変化させた場合、5～13 mS/cm あたりで最も不活性化効果が高かった。

前節の φ 40 cm 電極を用いた導電率依存性試験（「3.2.2 導電率依存性」参照）の時と比較して明瞭なピークは見られなかった。この理由として、本実験は同じ程度の不動率に達するまでに少ない印加回数しか要しなかったことから、塩水導電率の影響が顕著に現れなかったと考えられる。

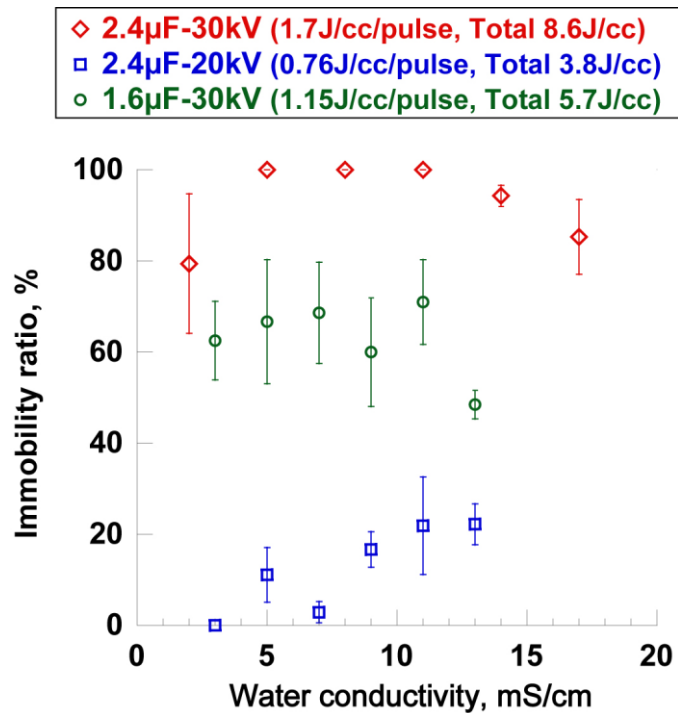


図 3-7 塩水導電率と不動率（ ϕ 40cm 平行平板電極）（Onitsuka *et al.*, 2024）

3.3.3 コンデンサ容量依存性

充電電圧は 30 kV、塩水導電率は 5 mS/cm に固定した。コンデンサ容量を 0.4, 0.8, 1.6, 2.4 μ F と変化させ、総注入エネルギー密度が 10.4 J/cc になるように印加回数を設定した。すなわち、0.4 μ F では 36 回、0.8 μ F では 18 回、1.6 μ F では 9 回、2.4 μ F では 6 回印加した。

結果を図 3-8 に示す。総注入エネルギー密度が同じであっても、コンデンサ容量が大きくなるほど不活性化効果が高くなり、1.6 μ F 以上で不動率 100 %に達した。

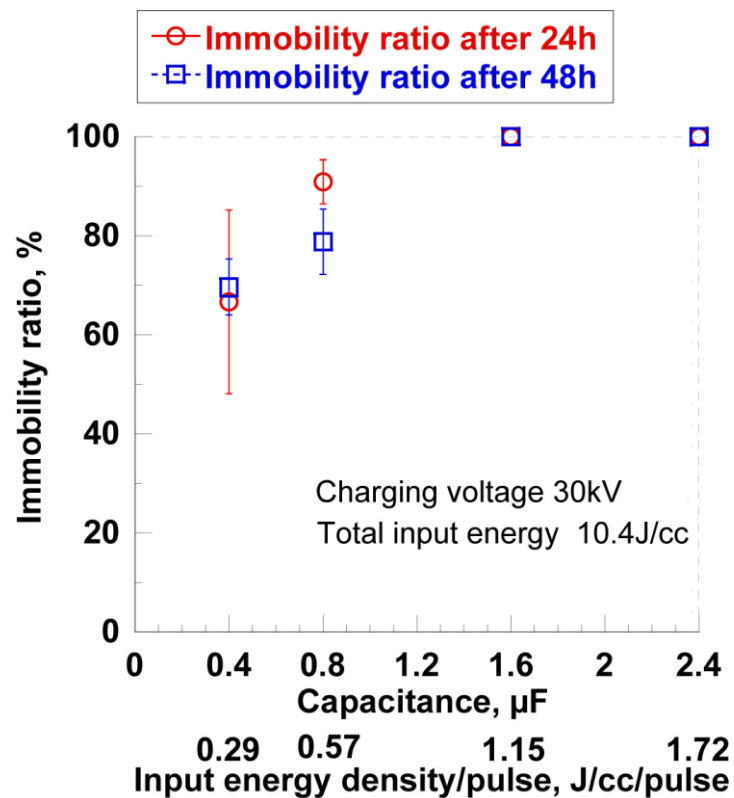


図 3-8 コンデンサ容量と不動率 (Onitsuka *et al.*, 2024 より改変)

3.3.4 充電電圧依存性

コンデンサ容量は $0.8 \mu\text{F}$ 、塩水導電率は 5 mS/cm に固定した。充電電圧を 10, 15, 20, 25, 30kV と変化させ、総注入エネルギー密度が 23.0 J/cc になるように印加回数を設定した。すなわち、10kV では 360 回、15kV では 180 回、20kV では 90 回、25kV では 58 回、40kV では 40 回印加した。

結果を図 3-9 に示す。総注入エネルギー密度が同じであっても、充電電圧が高くなるほど不動率は高くなった。

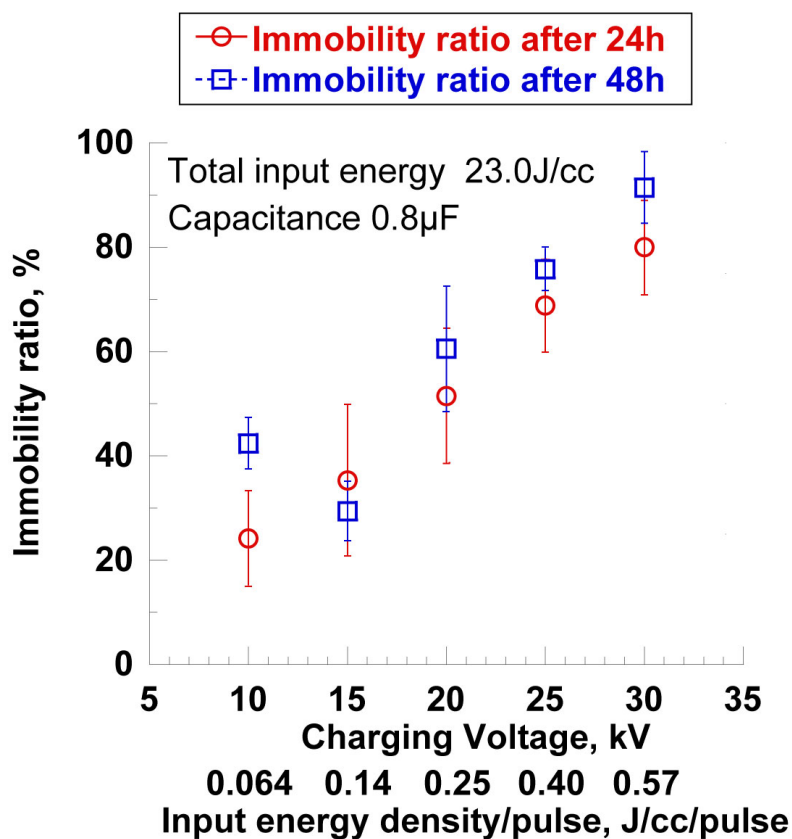


図 3-9 充電電圧と不動率 (Onitsuka *et al.*, 2024 より改変)

3.3.3 及び 3.3.4 の実験より、総注入エネルギーが同じ場合、1 パルスのエネルギーが大きいほど不活性化効果が高いと考えられる。パルスの印加回数が大きくなるほど不動率が高くなることは「3.2.3 印加回数依存性」で明らかになっており、アニサキスへのダメージは蓄積し、それが致死的なレベルに達することで死亡すると考えられた。1 パルスの注入エネルギー密度が小さいとアニサキスに与えるダメージが小さくなると考えられ、総注入エネルギー密度が同じ(印加回数により調整)であっても、1 パルスのエネルギー密度が小さい場合の累積ダメージは、1 パルスのエネルギー密度が大きい場合の累積ダメージに及ばず、不活性化効率が下がると考えられる。

3.3.5 1 パルスのエネルギー依存性

3.3.3 及び 3.3.4 の実験より 1 パルスのエネルギーがアニサキスの不活性化効率に影響していると考えられた。1 パルスのエネルギーが同じ場合、コンデンサ容量と充電電圧のどちらが高い方が効果的であるかを調べるため、1 パルスのエネルギーが同じになるように

($CV^2/2=360\text{ J/pulse}$) コンデンサ容量と充電電圧を変化させ、不動率を比較した。条件は、1 つ目の条件はコンデンサ容量 $0.8\text{ }\mu\text{F}$ で充電電圧 30 kV 、2 つ目の条件はコンデンサ容量 $1.6\text{ }\mu\text{F}$ で充電電圧 21.2 kV 、3 つ目の条件はコンデンサ容量 $2.4\text{ }\mu\text{F}$ で充電電圧 17.3 kV とした。塩水導電率は 5 mS/cm に固定し、印加回数は 15 回とした。

不動率の結果及び各条件の電圧電流波形を図 3-10 に示す。1 パルスのエネルギーが同じであれば、コンデンサ容量と充電電圧のどちらが大きくても不動率に明らかな違いは見られなかった。さらに詳細に不動率を比較するため、フィレー毎の不動率をプロットしたグラフを図 3-11 に示す。フィレーによる不動率のばらつきは大きいですが、他の依存性試験の相関と比較すると、この 3 条件における殺虫効果に大きな違いはないと言える。電流波形を見ると、電流ピーク値及びピークの 10 % のパルス幅はそれぞれ、 $0.8\text{ }\mu\text{F}$ - 30 kV の条件では 7.5 kA 及び $3.5\text{ }\mu\text{s}$, $1.6\text{ }\mu\text{F}$ - 21.2 kV の条件では 6.2 kA 及び $5.5\text{ }\mu\text{s}$, $2.4\text{ }\mu\text{F}$ - 17.3 kV の条件では 5.0 kA 及び $7.7\text{ }\mu\text{s}$ であった。異なる電流ピーク値及び電流幅の 3 条件で不動率が同程度であったことから、電流ピーク値と電流幅の両方がアニサキスの不活性化に影響していると考えられる。本実験のパルス条件の範囲ではこのような結果になったが、今後さらに広い範囲のパルス条件で検討する必要があると考える。

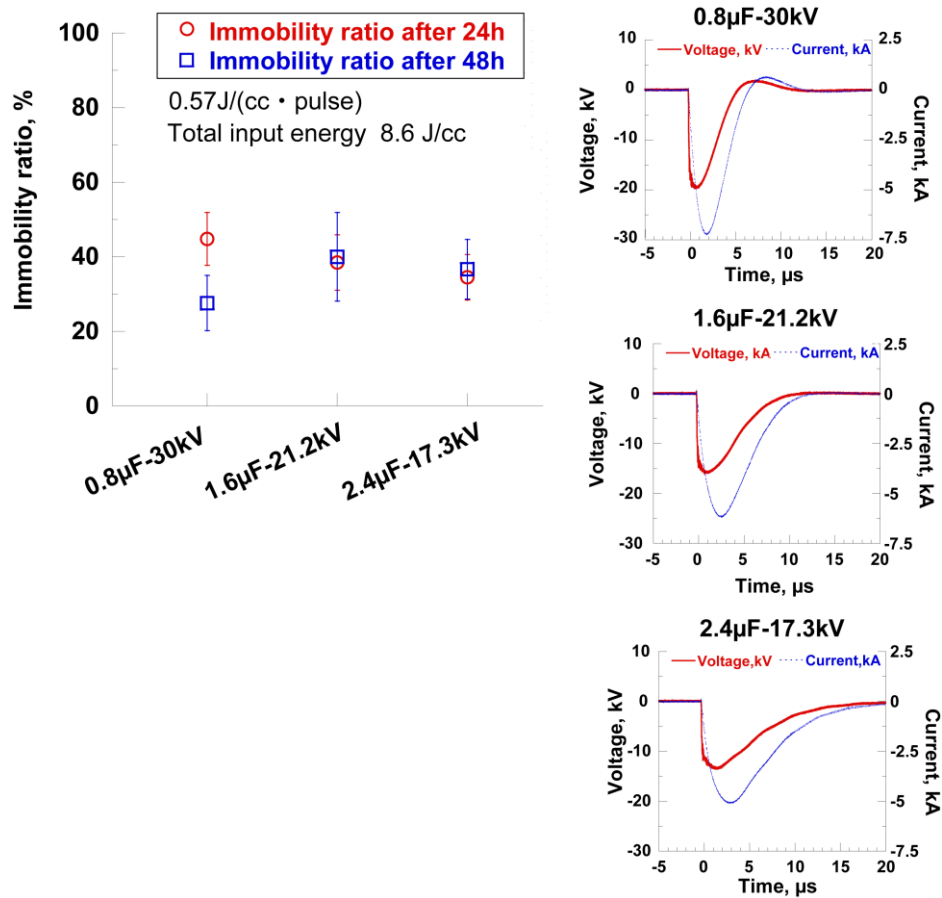


図 3-10 1 パルスのエネルギーを同じにした条件における
不動率及び各条件の電圧電流波形 (Onitsuka *et al.*, 2024)

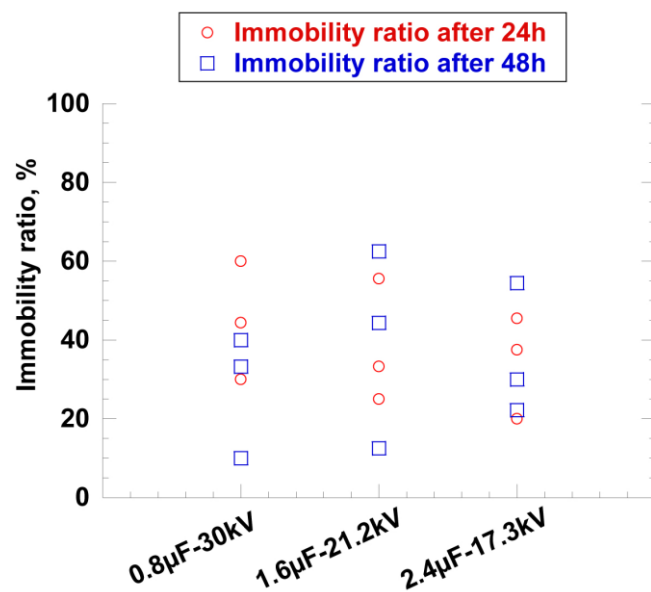


図 3-11 1 パルスのエネルギーを同じにした条件におけるフィレー毎の不動率

3.3.6 電極間距離依存性

コンデンサ容量は 1.6 μF 、充電電圧は 30 kV、塩水導電率は 5 mS/cm に固定し、電極間距離を 20, 30, 40, 60, 80 mm と変化させた。総注入エネルギー密度が 13.8 J/cc になるように印加回数を設定した。すなわち、電極間距離 20 mm では 12 回 (628 cc, 1.1 J/cc/pulse)、30 mm では 18 回 (942 cc, 0.76 J/cc/pulse)、40 mm では 24 回 (1256 cc, 0.57 J/cc/pulse)、60 mm では 36 回 (1884 cc, 0.38 J/cc/pulse)、80 mm では 48 回 (2512 cc, 0.29 J/cc/pulse) 印加した。

結果を図 3-11 に示す。総注入エネルギー密度が同じでも、電極間距離が大きくなるほど不動率は低下した。これは、電極間距離が大きくなるほど 1 パルスの注入エネルギー密度が下がり、さらに、電界強度が小さくなることや電極間の抵抗が大きくなり、電極間を流れる電流のピーク値が小さくなることが影響していると考えられる。

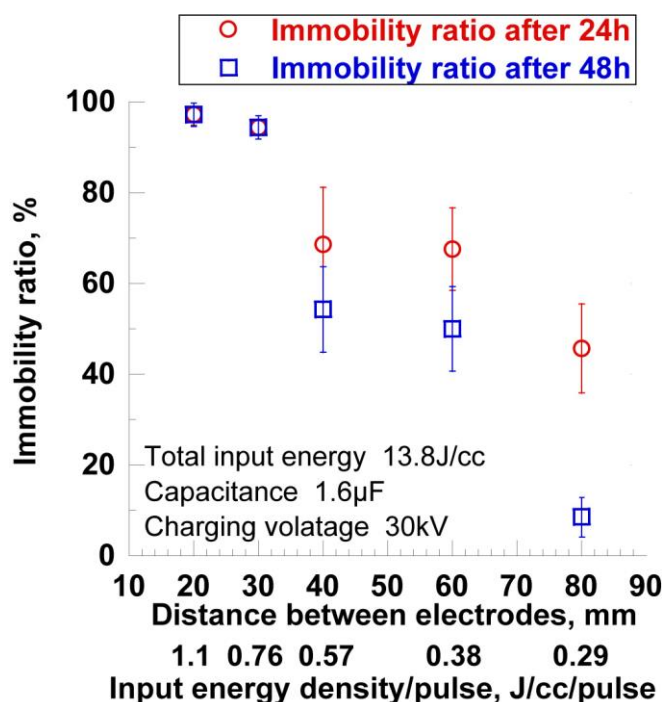


図 3-12 電極間距離と不動率 (Onitsuka *et al.*, 2024 より改変)

3.4 本章のまとめ

本章ではアニサキスの不活性化に関連する各種電気パラメータについて検討した。アニサキスの不動率は総注入エネルギー密度が大きくなるほど高くなり、電極間の塩水導電率がフィレー（すなわちアニサキス）に流れる電流量に大きく影響することが分かった。コンデンサ容量や充電電圧を変化させた実験から、総注入エネルギー密度が同じであっても、1パルスの注入エネルギー密度が大きいほど不活性化効果が高いことが分かった。

第2節の $\phi 40$ cm の平行平板電極を用いた実験では、総入力エネルギー密度が 326 J/cc で、100 % の不動率であった (80 μ F-15 kV, 印加 500 回)。Abad *et al.* (2023) の論文では、方形波パルスジェネレーター (EPULSUS-PM-10, Energy Pulse Systems) と 4cm \times 4cm 平行平板電極 (電極間距離 3cm) を用い、出力電圧 1~3 kV/cm、パルス幅 3~50 μ s、比エネルギー (総注入エネルギー密度) 3~50 J/g の範囲で検討され、電界強度 3 kV/cm、パルス幅 30 μ s、比エネルギー 50 J/cc の条件下で 95 % 程度の不動率が報告されている。本章第3節の $\phi 20$ cm 平行平板電極では、条件により約 10 J/cc でも 100 % の不動率となった。実験装置や魚肉の種類、アニサキスの質等の条件が異なるため直接比較はできないが、1パルスのエネルギー密度を高くするなど実験条件を最適化することで、比較的小さいエネルギーでアニサキスを不活性化させることができると考えられる。

さらに効率的に不活性化するため、エネルギーに関連するパラメータ (出力電圧、電流、電力、パルス幅等) のうち、どのパラメータとアニサキス不動率に相関が高いかを知ることが重要である。Abad *et al.* (2023) はアニサキスの不活性化効率 は電界強度と比エネルギーに大きく依存すること、パルス幅は低い電界強度の時のみ決定的な影響を与えると述べている。本研究では魚肉およびアニサキスのロット差・個体差もあり相関が強いパラメータを結論付けることはできなかったが、現在別で研究を進めているアニサキス単体への印加等の、より基礎的な研究でこれらが明らかになることを期待する。

アニサキス不活性化のメカニズムについては、生体に通電したときに様々な作用を起こすことは古くから知られており、その作用はジュール熱の発生、神経・筋・感覚器への刺激、細胞・イオンなど微細構造への直接作用に大別される (斎藤, 1988)。第4章で述べるように魚肉にはほとんど影響を与えずアニサキスを不活性化していることから、熱的作用ではなく、神経やその他の組織に不可逆的な損傷を与えることでアニサキスが死に至っていると考えられるが、現時点では死因は不明であり、死に至るメカニズムの解明も今後の課題である。

第4章 魚肉の形態による アニサキス不活性化への影響

4.1 緒言

第3章ではアニサキスの不活性化に関連する各種電気パラメータについて検討した。本研究の目的は魚肉中のアニサキスを不活性化させることであり、魚肉は生体組織であるため、形状や組織組成が不均一である。そこで、本章ではアニサキスのフィレー内での位置がアニサキスの不活性化にどう影響するかを調べた。また、フィレーではなくラウンド魚（丸魚）のまま処理したいというニーズが高いため、ラウンド魚内のアニサキスの不活性化試験を行った。さらに、本研究ではアニサキスを入れる魚肉としてマアジを使用しているが、マアジ以外の肉でもアニサキスを不活性化が可能であることを確認するため、鮭を使用して実験を行った。

実験装置は3.3で使用したのと同じ $\phi 20$ cm 平行平板電極を用いた。電極間距離や印加条件の詳細は各節で述べる。

4.2 フィレー内位置依存性

魚のフィレーは部位によって厚みが異なり、一般的に腹側が薄く、背側が厚くなっている。魚肉と塩水の導電率が異なる場合、身の厚い部分と薄い部分があると電流の分布に影響すると考えられる。そこで厚みの影響を調べるため、マアジフィレーの① 背側（厚さ約 10.5 mm）、② 腹側（厚さ約 5 mm）、③ 尾側（厚さ約 7mm）の3か所にアニサキスを埋め込み（図4-1）、不動率を比較した。アニサキスは1か所につき10～12隻埋め込み、回収できたものを評価した。印加条件は、コンデンサ容量 0.8 μ F、充電電圧 30 kV、塩水導電率 5 mS/cm、電極間距離 20 mm、印加回数 12 回（総注入エネルギー密度 6.9 J/cc）とした。

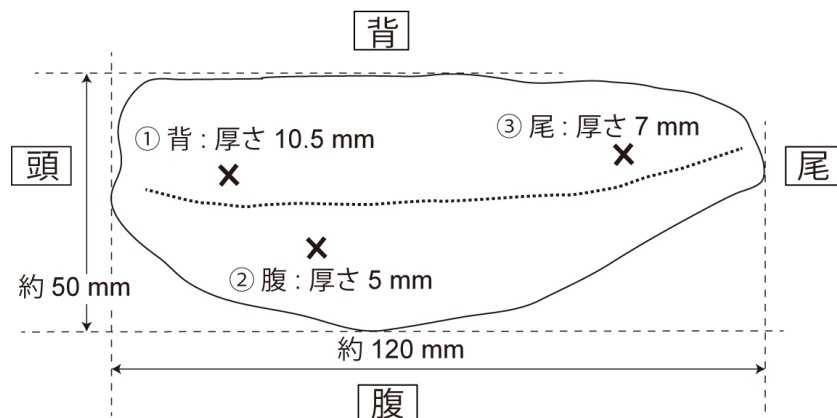


図 4-1 フィレー内のアニサキスの位置(Onitsuka *et al.*, 2024 より改変)

結果を表 4-1 に示す。不動率は背側、尾側、腹側の順で高く、これはフィレーの厚みの順と同じであった。アジ肉の導電率は 3.1 で述べたように約 8 mS/cm であり、この条件においては、身が厚い部分に多くの電流が流れたと考えられた。

表 4-1 フィレーの背側、腹側、尾側に埋め込んだアニサキスの不動率

アニサキスの位置	総注入エネルギー 密度 (J/cc)	不動率 (%)	
		24 時間後	48 時間後
① 背側	6.9	56.7	70.0
② 腹側		6.1	15.2
③ 尾側		33.3	39.4

一般的に、フィレーの腹側は背側に比べて脂質量が多く（小林他, 1973）、そのため腹側の魚肉の導電率の方が低いことが知られている（長谷川・小林, 2010）。上記表 4-1 の結果がフィレーの厚みだけの影響なのかを調べるため、別のフィレーから切り取った腹部分の肉を検体フィレーの腹部分にトランスグルタミナーゼで貼り付け、背と腹の厚さを同じにしたフィレーを作製した（図 4-2）。このフィレーの背側と腹側にアニサキスを入れて不動率を比較した。コンデンサ容量、充電電圧、塩水導電率は上記と同じであり、12 回及び 18 回印加した。

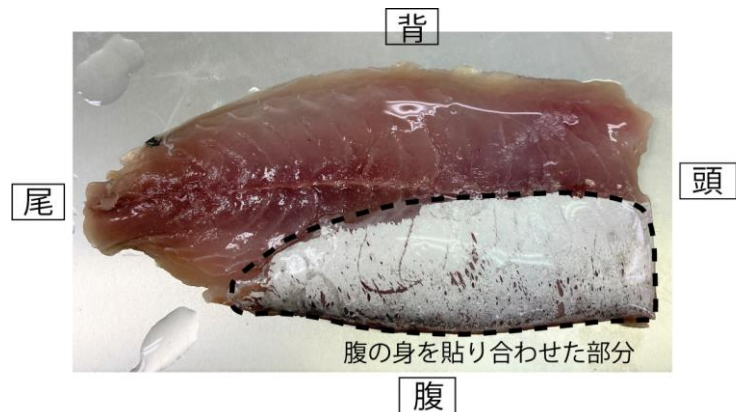


図 4-2 腹を貼り合わせて背側と腹側の厚みを同じにしたフィレー (Onitsuka *et al.*, 2024 より改変)

結果を表 4-2 に示す。48 時間後のデータのみ示すが、24 時間後も同じ傾向であった。厚みを揃えたにも関わらず、腹側の不動率が背側よりも低くなった。腹側の脂質が多いため腹側の導電率が低く、腹側に電流が流れにくかったためであると考えられる。

以上の結果より、フィレーの形状および脂質量がアニサキスの不活性化効率に影響を与えることが確認された。

表 4-2 背側と腹側の厚みを同じにしたフィレー中のアニサキス不動率 (48 時間後)

アニサキスの位置	12 回		18 回	
	総注入エネルギー密度 (J/cc)	不動率 (%)	総注入エネルギー密度 (J/cc)	不動率 (%)
① 背側	6.9	31.0	10.3	42.9
② 腹側		7.1		27.6

4.3 ラウンド魚内位置依存性

ラウンド魚 (丸魚) はフィレーよりもさらに複雑な形をしており、腹腔内には様々な組織で構成される種々の内臓を持つ。そのため、パルスを印加したときにアニサキスが死ににくい場所が存在すると予測した。特に魚の鰾は空気 (絶縁体) を含んでいることから、電流が流れずアニサキスの不活性化が困難であると考えた。そこで、マアジのラウンド魚の背側、尾側、及び鰾にアニサキスを入れ、不動率を比較した。鰾に関しては、魚の側面から穴を空

けて鰾にアニサキスを入れた（解剖した写真を図 4-3 に示す）。穴はトランスグルタミナーゼで塞ぎ、鰾には空気が入った状態で印加した。電極間距離は 50 mm とし、コンデンサ容量 2.4 μ F、充電電圧 30 kV、塩水導電率は 5 mS/cm の条件で印加した。印加回数は 50、100、200 回とし、実験には 1 匹のラウンド魚を使用した。

不動率の結果を表 4-3 に示す。48 時間後のデータのみ示すが、24 時間後も同じ傾向であった。背側と尾側のアニサキス不動率は印加回数 50 回でも 100 % に達したが、鰾のアニサキス不動率は低く 28.6 % であった。魚肉は比較的高い導電率であり電流が流れやすいが、鰾は絶縁体である空気を含むため電流が流れにくく、結果このような差が生じたと考えられる。しかし 200 回印加することにより、背側、腹側、鰾すべての箇所でも不動率 100 % に達したことから、総注入エネルギー密度を大きくすれば鰾のアニサキスの不活性化も可能であることが分かった。



図 4-3 鰾中のアニサキス

表 4-3 ラウンド魚内のアニサキス不動率（48 時間後）

アニサキスの位置	50 回 (総注入エネルギー密度 34.4 J/cc)		100 回 (総注入エネルギー密度 68.8 J/cc)		200 回 (総注入エネルギー密度 137.6 J/cc)	
	不動判定のアニサ		不動判定のアニサ		不動判定のアニサ	
	48 時間後不		48 時間後不		48 時間後不	
	キス数 (回収した数)	動率 (%)	キス数 (回収した数)	動率 (%)	キス数 (回収した数)	動率 (%)
① 背側	7 (7)	100.0	10 (10)	100.0	12 (12)	100.0
② 尾側	10 (10)	100.0	10 (10)	100.0	11 (11)	100.0
③ 鰭	2 (6)	33.3	11 (12)	91.7	10 (10)	100.0

4.4 鮭肉及び天然で魚肉に潜っていたアニサキスの不活性化

マアジ以外の魚肉中のアニサキスも不活性化できることを確認するため、北海道産の鮭（シロザケ：*Oncorhynchus keta*）肉を使用した実験を行った。鮭は多くの *A. simplex sensu stricto* が寄生していることが知られているため（Inoue *et al*, 2000）、この魚種を使用した。まず、フィレーを約 80 mm 幅にカットした鮭切り身（厚さは最も厚いところで約 20 mm）の背側の肉と腹側の肉に切れ込みを入れ、マサバから採取したアニサキスを入れてトランスグルタミナーゼで肉を接着し、 ϕ 20 cm 電極、電極間距離 30 mm、コンデンサ容量 2.4 μ F、充電電圧 30 kV、印加周波数 0.67 Hz、塩水導電率 5 mS/cm の条件で印加した（図 4-4）。背側の肉に光ファイバー温度計（FL-2000, Anritsu Meter Co., Ltd.）を挿し込み、魚肉が 20°C になるまで印加した。印加回数は 64 回、総注入エネルギー密度が 73.1 J/cc であった。アニサキス不動率の結果を表 4-4 に示す。魚肉の温度上昇幅は約 15°C で、アニサキスの不動率は 100% であった。初期温度を 5°C 以下にしていれば 15°C 温度上昇しても室温程度であり、この程度の温度上昇は魚肉の品質にそれほど影響がない温度であると考ええる。マアジと同様に鮭の中にいるアニサキスも不活性化できることが確認された。

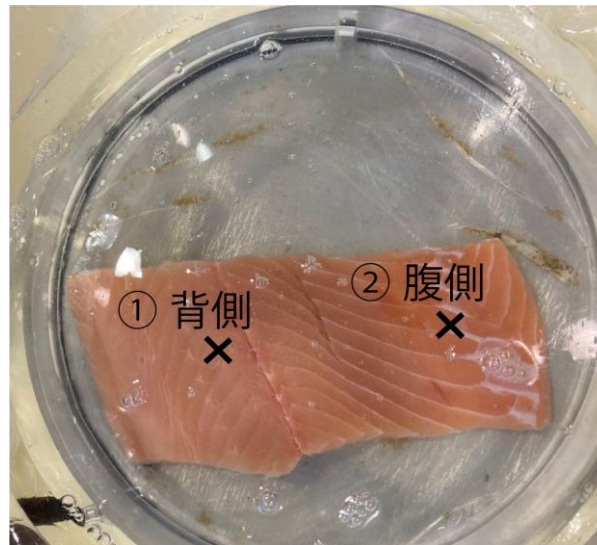


図 4-4 ①背側及び②腹側にアニサキスを入れた鮭切り身を下部電極に置いたところ

表 4-4 鮭切り身中のアニサキス不動率

印加回数	総注入エネルギー密度(J/cc)	魚肉の初期温度(°C)	魚肉の最終温度(°C)	ΔT	アニサキスの位置	24 時間後		48 時間後	
						不動判定	不動率	不動判定	不動率
						のアニサ	キス数 (回	のアニサ	キス数 (回
						キス数 (回	収した数))	キス数 (回	収した数))
64	73.1	4.9	20	15.1	① 背側	9 (9)	100.0	9 (9)	100.0
					② 腹側	10 (10)	100.0	10 (10)	100.0

次に、内臓を除去した鮭を背骨ごと約 100 mm 幅にカットしたぶつ切り鮭を実験に使用した。厚さは一番厚いところが約 70 mm であった。電極間距離は 80 mm とし、コンデンサ容量 2.4 μ F、充電電圧 30 kV、印加周波数 0.67 Hz、塩水導電率 5 mS/cm の条件で印加した。2 検体 (A, B) それぞれの背側及び腹側にアニサキスを仕込み (図 4-5)、1 実験に 1 検体使用して 2 回実験を行った。検体 A については、パルス処理後、肉を掘ると天然で潜っていたアニサキスを取り出すことができた。このアニサキスはすべて腹側の肉から摘出された。天然で潜っていたアニサキスも人工的に仕込んだアニサキスと同じ方法で評価した。この天然で潜っていたアニサキスは、後に PCR-RFLP 法により *A. simplex* sensu stricto であると同定された。パルスは魚肉が 20°C に達するまで印加した。検体 A は 84 回印加し (総注入エネルギー密度 36.1 J/cc)、検体 B は 99 回印加した (総注入エネルギー密度

42.6J/cc)。アニサキス不動率の結果を表 4-5 に示す。総注入エネルギー密度 36.1 J/cc 及び 42.6 J/cc において、温度は 10.8℃上昇し、24 時間後の平均不動率は 59.6%であった。人工的に埋めたアニサキスと同様に天然で魚肉に潜っていたアニサキスも不活性化されたことから、本研究で用いている人工的にアニサキスを魚肉に入れる手法は、天然で潜っているアニサキスを模擬する方法として適切であると考えられた。

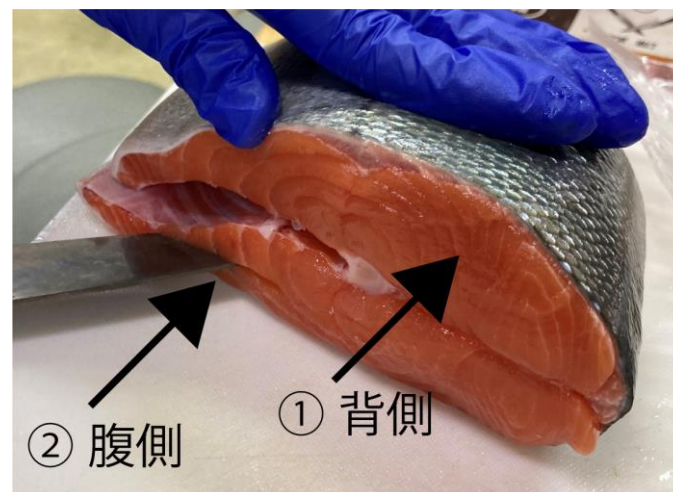


図 4-5 ぶつ切り鮭の①背側及び②腹側

表 4-5 ぶつ切り鮭中のアニサキスの不動率

検 体	印加回 数	総 注 入 エ ネ ル ギ ー 密 度(J/cc)	魚肉の初 期 温 度 (℃)	魚 肉 の 最 終 温 度 (℃)	ΔT	ア ニ サ キ ス の位置	24 時間後		48 時間後	
							不動判定のア ニ サ キ ス 数 (回収した数)	不 動 率 (%)	不動判定の ア ニ サ キ ス 数 (回収し た数)	不動率 (%)
A	84	36.1	9.2	20	10.8	① 背側	2 (10)	20.0	4 (10)	40.0
						② 腹側	6 (12)	50.0	6 (12)	50.0
						天然アニサ キス	9 (10)	90.0	9 (10)	90.0
B	99	42.6	9.2	20	10.8	① 背側	9 (9)	100.0	7 (9)	77.8
						② 腹側	5 (11)	45.5	3 (11)	27.3

4.5 本章のまとめ

本章では、マアジのフィレーおよびラウンド魚を使用した実験で、アニサキスの魚肉中の位置がアニサキスの不活性化効率に影響を与えることが明らかとなった。魚肉の厚みや部位による組織組成が影響しており、装置開発の際にはこれらの点を考慮に入れる必要がある。また、鮭を使った実験でもアニサキスの不活性化が確認され、このパルスパワーによるアニサキス不活性化は、多くの魚種に適用可能であると考えられる。実験には人工的に魚肉にアニサキスを入れているが、天然で潜っていたアニサキスも同様に不活性化できることが確認された。天然で潜っていたアニサキスは *A. simplex* sensu stricto であり、*A. pegreffii*, *A. simplex* sensu stricto のどちらの種類のアニサキス幼虫も不活性化できることが明らかとなった。

第5章 パルス処理した魚肉の品質評価

5.1 緒言

第1章で述べたように、魚を刺身として生食する場合、アニサキス食中毒を予防するための現実的な方法は現在のところ冷凍のみである。しかし冷凍すると品質が低下するため、品質を落とさずにアニサキス食中毒リスクをなくす方法として本研究のパルスパワーによる殺虫法が期待される。これまでに述べたようにパルスパワーによりアニサキスを不活性化できることが明らかになったが、冷凍に代わる殺虫法として普及するためには、冷凍処理よりも品質の劣化が少ないことが求められる。そのため本章では、パルス処理した魚肉フィレーの品質を評価し、冷凍処理したものと比較することを目的とした。具体的には、官能評価、破断試験による食感評価、色差計による色の評価を行った。本章で評価したパルス処理済みフィレーは、第3章2節の $\phi 40$ cm 平行平板電極の実験装置を用い、すべて充電電圧15 kVで処理した。本研究では、アニサキスがほぼ100%不活性化すると思われる回数を印加して評価した。なお、一般的に水産工場で包装された生食用魚介製品は加工後1~3日後に食されることが多いため、パルス処理後、これに合わせて保管期間を設けた後評価した。条件の詳細は各節に記載する。

5.2 官能評価

食品の美味しさは味覚・嗅覚・触覚・視覚により複合的に認識される。これら进行评估するため、官能評価を実施した。評価に用いたフィレーのパルス印加条件は、1回のフィレー処理量3 kg、コンデンサ容量80 μ F、印加周波数2.5 Hz、バッファ塩水導電率5 mS/cm、印加回数450回である。初期塩水温度は6°Cとした。この条件におけるアニサキスの不動率は100%であり、パルス処理後の魚肉温度は約20°C、バッファ塩水の温度は約11°Cであった。官能評価の方法は岡崎他(2009)の方法を参考に、未処理フィレーをコントロールとし、パルス処理したフィレーを7段階評点法(+3:非常に良い、+2:やや良い、+1:わずかに良い、0:同等、-1:わずかに悪い、-2:やや悪い、-3:非常に悪い)で評価した。コントロールはパルス処理品と同じ時間同じ塩水に漬けたものを用いた。評価項目は外観(血合肉の色、普通肉の色)、におい、食感(みずみずしさ、弾力)、味(魚臭さ、うまみ)、総合評価とした。食感に関しては、アジの刺身において一般的に好まれる、身がしっかりしており弾力があるものを「良い」と定義した。評価は(株)ジャパンシーフーズの社員8名

で行った。未処理のフィレー及びパルス処理したフィレーは真空包装して 5℃の冷蔵庫で保管し、1 日後及び 3 日後に開封して評価した。なお、本実験の官能評価は未処理品（コントロール）と比較することが必要であり、解凍品は冷凍期間が必要となるため同ロットのものと比較できないことから、評価は未処理品とパルス品の比較のみ行った。

官能評価の結果を図 5-1 に示す。パルス処理後 1 日及び 3 日経過のフィレーとも、未処理品にはやや劣るものの、いずれの項目においてもその平均値は 0（未処理品と同等）から -1（未処理品よりわずかに悪い）の間であり、生食用刺身としての品質を十分に保っていると考えられた。

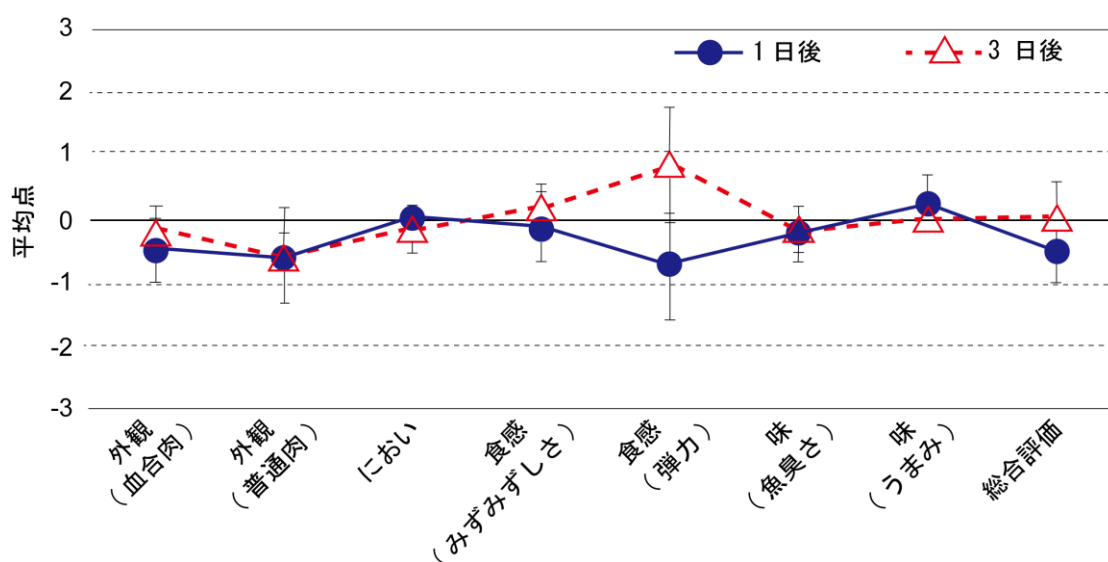


図 5-1 パルス処理フィレーの官能評価結果 (Onitsuka *et al.*, 2022 より改変)
(エラーバーは標準偏差を示す (n=8))

5.3 破断試験による食感評価

小型卓上試験機 (EZ Test, 島津製作所) を使用し、フィレーの破断試験を行った。すべて同ロットのマアジを用い、未処理品、パルス処理品、解凍品を各 9 枚測定した。パルス処理品は、1 回のフィレー処理量 3 kg、コンデンサ容量 80 μ F、印加周波数 2.5 Hz、バッファ塩水導電率 5 mS/cm、印加回数 450 回で処理したフィレーを評価した。初期塩水温度は 6℃とした。未処理のフィレー及びパルス処理したフィレーは真空包装し、5℃の冷蔵庫で 2 日間保管した後に測定した。解凍フィレーに関しては、真空包装したフィレーを急速冷凍後 -20℃で 1 か月間保管し、解凍後すぐに測定した。

破断試験の治具は、前歯での咀嚼を想定した幅 10 mm、厚み 1.5 mm の金属板を使用し、フィレーの皮側から 10 mm/min の速さでフィレーを押した。荷重の測定波形から破断試験力及び弾性率を読み取った。図 5-2a のようにフィレー1 枚につき 2 箇所測定した。典型的な測定波形を図 5-2 b に示す。破断試験力は破断点（治具がフィレーを突き刺し、試験力が一度低下する前の最大点）の試験力とし、弾性率は破断点までの最大の傾きとした。

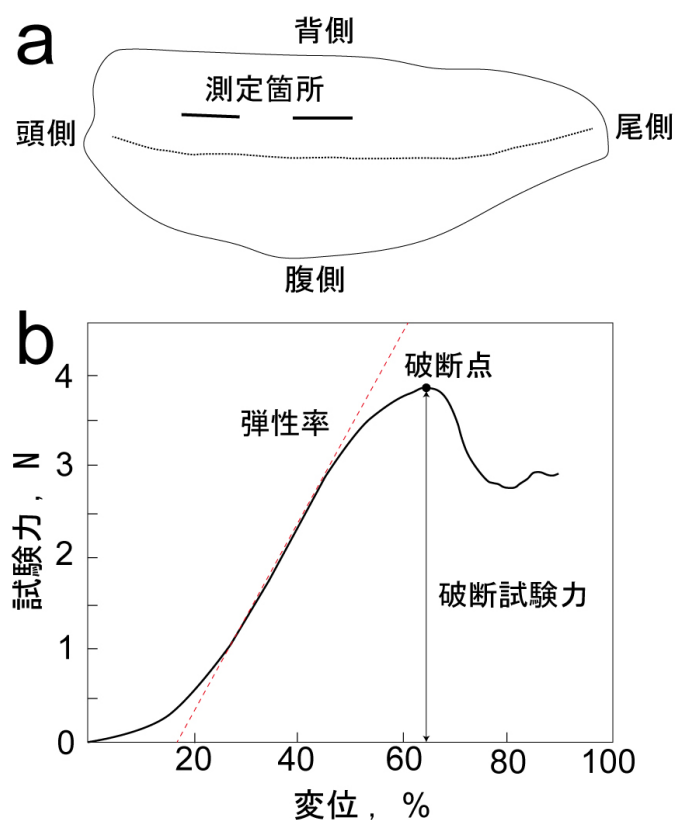


図 5-2 フィレーの破断試験、(a)フィレー測定箇所、
(b) 典型的な測定波形と測定パラメータ (Onitsuka *et al.*, 2022 より改変)

未処理品、パルス品、解凍品の弾性率と破断試験力の測定結果を表 5-1 に示す。解凍品は未処理品に比べて弾性率と破断試験力が有意に低くなったが、パルス処理品は未処理品と有意差はなく、同等の食感を保っていると考えられた。

表 5-1 未処理品、パルス処理品、解凍品の破断試験の測定結果 (n=9)

	未処理品	パルス処理品		解凍品	
	平均値 ± SD	平均値 ± SD	t-test	平均値 ± SD	t-test
弾性率 [N/mm ²]	10.79 ± 2.08	10.26 ± 1.51	n.s.	6.98 ± 1.18	* *
破断試験力 [N]	3.04 ± 0.54	3.15 ± 0.46	n.s.	2.61 ± 0.41	*
n.s. : 非有意 * : $p < 0.05$ * * : $p < 0.01$					

5.4 色の評価

未処理品、パルス処理品、解凍品の明度及び色度 ($L^*a^*b^*$ 値) を分光式色差計 (SA5500, 日本電色工業) にて測定した。フィレーはすべて同じ漁獲ロットのものをを用いた。パルス処理品は、コンデンサ容量 80 μ F、印加周波数 2.5 Hz、塩水導電率 5 mS/cm で 400 回印加したものを使用した。未処理品とパルス処理品は真空包装して 5°C の冷蔵庫で保管し、1 日後に測定した。解凍品は真空包装後急速冷凍し、-20°C で 3 日間保管したものを解凍して測定した。図 5-3 に示すように、普通肉 (A) と血合肉 (B) の 2 箇所を測定した。B に関しては、表面の銀色の部分を削ぎ、血合肉を露出させて測定した。すべての測定は、開封してから 5°C で 4 時間経過後に行った。それぞれ 10 フィレー測定した。未処理品、パルス処理品、解凍品の間で有意差があるかを確かめるため、それぞれ 2 標本 t-検定を行った。

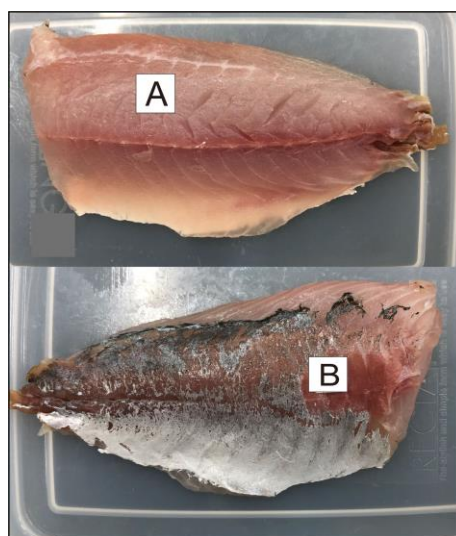


図 5-3 色差計の測定箇所 (A : 普通肉、B : 血合肉) (Onitsuka *et al.*, 2022)

測定結果を図 5-4 に示す。L*a*b*表色系は、あらゆる分野で物体の色を表すのに使用されている表色系であり、国際照明委員会（CIE）で規格化されている。L*a*b*表色系では、明度を L*、色相と彩度を示す色度を a*、b* で表す。L*値は数値が大きいほど白色に近く、数値が小さいほど黒色に近いことを示す。a*値は数値が大きいほど赤色、小さいほど緑色、b*値は数値が大きいほど黄色、小さいほど青色であることを示す。

普通肉については、パルス処理品と解凍品は未処理品よりも L*値が高く、すなわち白いことが分かる。a*値は未処理品、パルス処理品、解凍品の順で減少しており、解凍品が最も赤みがないと言える。血合肉に関しては、L*値は未処理品とパルス品には有意差がなく、解凍品は L*値が有意に低くなった。パルス処理品は解凍品に比べて有意に a*値が高く、パルス処理品の方が赤いと言える。b*値に関しては、普通肉、血合肉ともに未処理品、パルス処理品、解凍品の間で有意差がなかった。

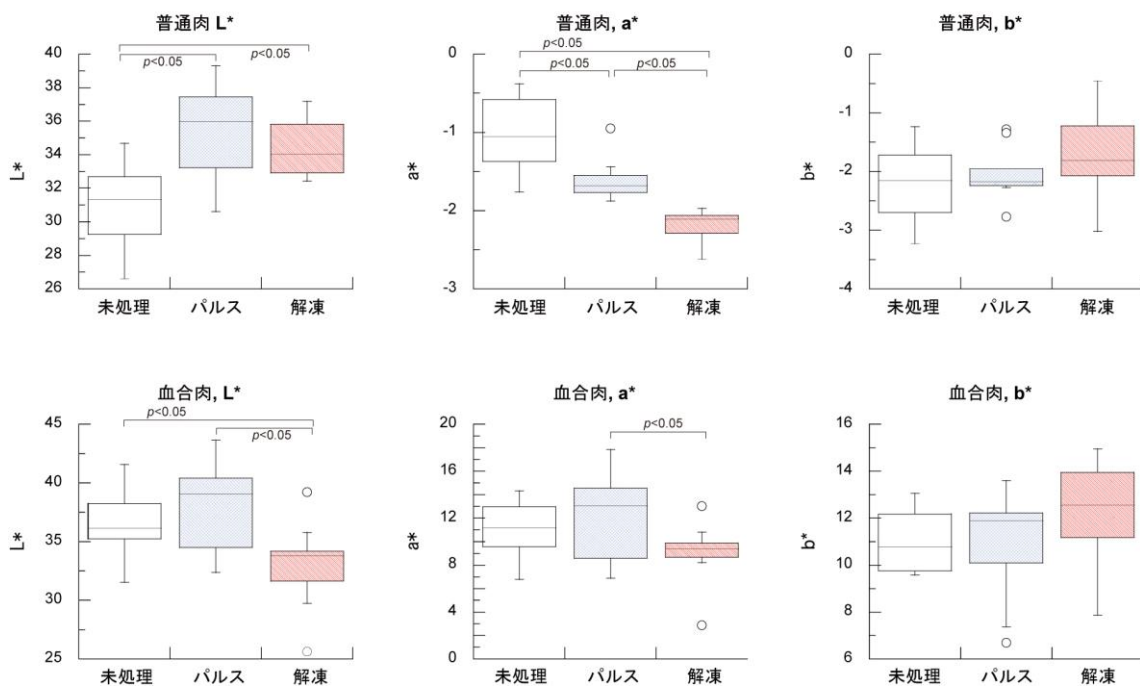


図 5-4 未処理品、パルス処理品、解凍品の色差計測定結果 (n=10) (Onitsuka *et al.*, 2022 より改変)

5.5 本章のまとめ

官能評価の結果より、パルス処理したマアジ魚肉は、刺身としての品質を十分保っている

ことが確認された。破断試験の結果より、解凍品は未処理品に比べて破断試験力及び弾性率が有意に低くなったにも関わらず、パルス処理品は未処理品とほぼ同じ数値となり、解凍品よりもパルス処理品の方が未処理品に近い食感を保っていると考えられた。色差計の測定結果より、特に血合肉においてパルス処理品は解凍品よりも未処理品に近い色を保っていると考えられた。血合肉の色は刺身の鮮度感に大きく影響する。解凍品に比べて赤みがあるパルス処理品は、刺身としての商品価値が高いと考えられる。以上の結果より、パルスパワーによる不活性化は冷凍に比べて品質の劣化が少なく、冷凍の代わりとなるアニサキス殺虫法として期待できる。

第 6 章 アニサキス殺虫装置の開発

6.1 開発方針

第 2、3、4 章で述べた通り、パルスパワーによってアニサキスが不活性化できることが明らかとなり、第 5 章で述べた通り、パルスパワーによって処理した魚肉は冷凍したものよりも品質の劣化が少ないことが明らかとなった。この技術を用いて実際に水産加工工場で使用するアニサキス殺虫装置のプロトタイプ機を開発した。この装置開発は、経済産業省の戦略的基盤技術高度化支援事業（サポイン事業）の支援を受け、ジャパンシーフーズ、熊本大学、福岡県工業技術センター、パルテック電子株式会社で組織されたプロジェクトの一環として行ったものである。

この装置開発の殺虫条件は、第 3 章 2 節の $\phi 40$ cm 平行平板電極を用いた実験結果を基にしている。

6.1.1 処理対象

このアニサキス殺虫装置プロトタイプ機は、株式会社ジャパンシーフーズの生食用マアジフィレーを製造する工場を使用することを想定して開発した。マアジの魚体のうち可食部分は 35 % であり、ラウンド魚にパルスを印加すると非可食部分にもエネルギーを注入することになりエネルギーの無駄が生じる。そのため本装置はフィレー状態のマアジを処理する仕様にした。工場で使用しているカゴに入れる量 3～7 kg を一度に処理することを想定した。

6.1.2 温度上昇の抑制

パルスパワーは、非常に大きいピーク電力を生み出すが電流は瞬間的にしか流れず、パルスとパルスの間を冷却期間とすることができるため温度の上昇を抑えることができる。それでも少なからずジュール熱により電極間の塩水及び魚肉の温度は上昇する。魚肉の温度が上昇すると品質の劣化を引き起こすため、できるだけ低温に保ったままアニサキスを殺虫することが重要である。そのため第 3 章 2 節の実験装置と同様、バッファ塩水中に電極を設置し、電極間の温度上昇した塩水を電極外の冷たい塩水と入れ替えることで電極間の温度を低く保つ構造にした。パルス印加後のフィレー温度が 20℃を超えないことを目標にし

た。

「食品、添加物等の規格基準（厚生省告示第 370 号）」では、「電流を直接食品に通ずる装置を有する器具の電極は、鉄、アルミニウム、白金及びチタン以外の金属を使用してはならない」と規定されている。この装置は塩水を用いるため、錆びにくさと価格を考慮し、電極素材はチタンとした。電極は直径 40 cm のチタン製円形平行平板電極、電極間距離は 11 cm としを用い、電極間体積は 13.8 L、バッファ塩水量は 180 L とした。電極間にはフィレーを入れた樹脂製メッシュかごを置き、かご越しにパルス電流が流れることとなる。

6.1.3 安全対策

この装置は水産加工工場の水気の多い場所に設置することになり、高電圧を用いるため、作業者の安全性を最優先で考える必要がある。印加中に高電圧になる部分が露出しないよう、装置はバッチ式（閉じた空間の中で印加）で開発し、作業者が触れる可能性がある部分はすべてアース電位とした。

6.1.4 品質工学

この装置は主にフィレー処理槽（以下、「処理槽」）とパルス電源で構成され、パルス電源はコンデンサバンク回路を用いた。処理槽及びパルス電源の仕様を決定するため、品質工学に基づくパラメータ設計を行った。様々なノイズ条件下での製品機能のばらつきを最小化することを目的とし、10 因子（上部電極極性、コンデンサ容量、初期塩水温度、塩水導電率、フィレー重量、充電電圧、印加周波数、ポンプ流量、フィレーサイズ、ポンプ噴出口数）から 2 水準を選択して L_{12} 実験に割り当てた。この L_{12} 実験では、12 回の実験により各因子の最適水準を統計的に効率よく決定できる。このパラメータ設計のプロセス詳細については、関連論文(小笠原他, 2023; 小笠原他, 2024)で出版されており、本論文では概要のみ述べる。

6.2 開発機

6.2.1 処理槽の仕様決定

処理槽の模式図及び写真を図 6-1 に示す。印加中は高電圧部分が露出しないよう、処理槽に蓋をした状態で印加する構造とした。処理槽内に下部電極を設置し、上部電極は処理槽の蓋に取り付け、蓋とともに下りてくるようにした。蓋の上下はクレーンで行う。処理槽の一

番内側は樹脂製の円形タンクであり、その外側を金属製の円筒の板（アース電位）で囲い、その表面をさらに樹脂で覆った。

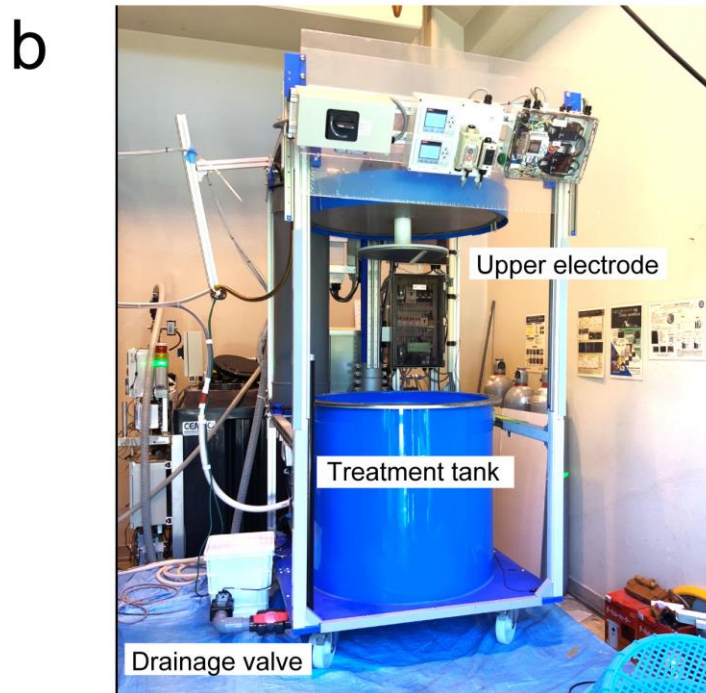
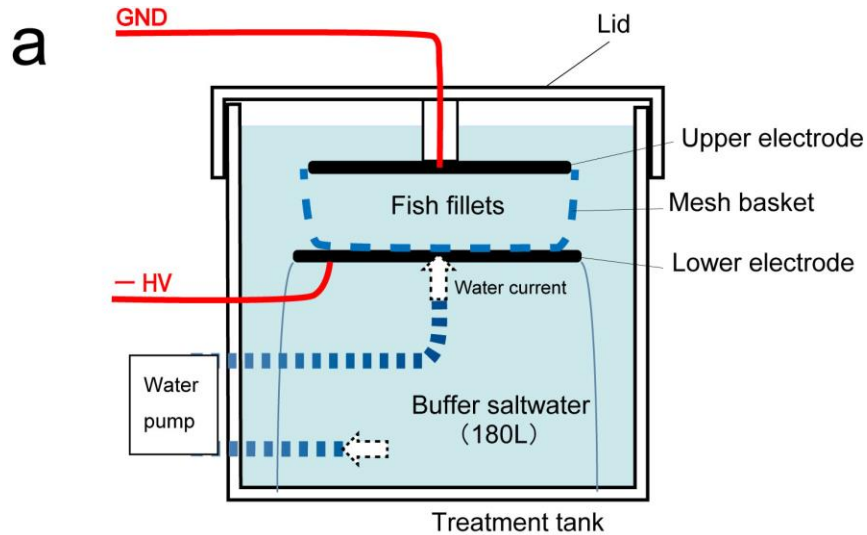


図 6-1 アニサキス殺虫プロトタイプ機処理槽、
(a) 処理槽模式図、(b) 処理槽写真 (Onitsuka *et al.*, 2023)

第 3 章「3.2.2 導電率依存性」で述べたように、 $\phi 40$ cm 平行平板電極、電極間距離 11 cm の条件では、塩水導電率が 5 mS/cm 程度の時が最も効果的に殺虫できることが分かっている。

る(Onitsuka *et al.*, 2022)。この結果より塩水導電率は非常に重要なパラメータであり正確にその導電率を調整する必要があったが、5 mS/cm は食塩濃度が 0.3 %程度であり、このような低い濃度の塩水を生成する装置は市販品に存在しなかった。そのため、設定した導電率の塩水を±5 %の精度で生成できる塩水生成装置を製作した。この装置は2つのタンクがあり、1つのタンクに飽和食塩水を作っておき、もう1つのタンクに約4°Cのチラー水が流入し、導電率計で測定しながらチラー水のタンクに少しずつ飽和食塩水を混ぜて導電率を合わせる装置である(図 6-2)。この装置で生成した塩水は処理槽に送られ、バフファ塩水として使用する。処理槽のタンク内側にはフロートスイッチを取り付けており、これで水位の制御を行っている。パルス印加が終わると処理槽内のバフファ塩水は一部排水され、新しい冷塩水が入ってくることで処理槽内の塩水温度を低く保つ。排水量はあらかじめ設定しておき、すべて自動で行われる。



図 6-2 高精度塩水生成装置(Onitsuka *et al.*, 2023)

第3章2節の実験装置と同様、フィレーの温度上昇を抑えるため、電極間の塩水が電極外の冷たい塩水と入れ替わるよう、下部電極にポンプの噴出口を設置し、ポンプで電極間にバフファ塩水を送りながら印加する構造とした。フィレーが電極間で偏っているとフィレーと塩水の導電率の違いにより電流の経路が固定されてしまう。フィレーをばらばらに動か

し均一に電流を流すため、ポンプで水流をつくり、フィレーを攪拌しながら印加することとした。フィレーをうまく攪拌するため、電極の真ん中に直上に噴き出す噴出孔と、その周囲3か所に円形に斜め45度上に噴き出す噴出孔を設置することで回転水流を作り、フィレーが入ったメッシュかごを回転させて中のフィレーを動かす構造とした（図 6-3）。ポンプの流量は1台あたり72 L/minであり、これを4台設置しているため電極間の塩水は約2.9秒毎に電極外の塩水と入れ替わることになる（ $13.8 \div (72 \times 4)$ [L/min]）。1回のフィレー処フィレー処理量が多いと攪拌がうまくいかず、フィレーが集まっているところが煮えてしまうことが多かったため、1回のフィレー処理量は3 kgとした。

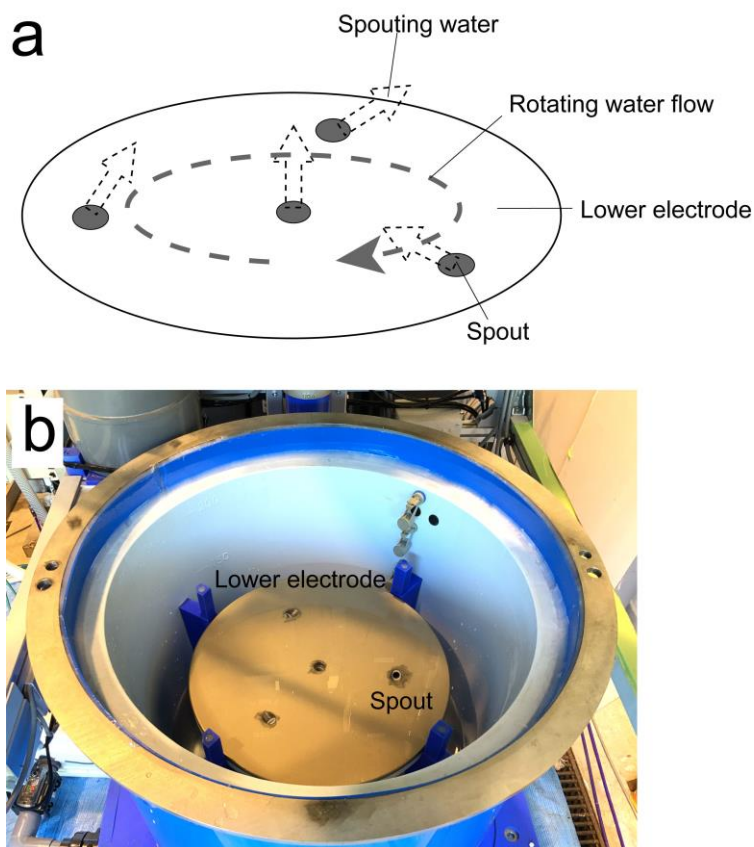


図 6-3 下部電極に設置されたポンプ噴出孔、
(a) 回転水流の模式図、(b) 処理槽の下部電極の写真 (Onitsuka *et al.*, 2023)

6.2.2 パルス電源の仕様決定

充電電圧に関して、空気の絶縁破壊強度は 30 kV/cm であり、高電圧になる電線や電極な

どの金属部分の電界集中係数を考慮し、パルス電源から電極までの高電位となる金属表面の電界強度を 30 kV/cm 以下とするため電圧上限を 15 kV とした。

品質工学の手法を用いて L_{12} 直交表の実験を行い、パルス印加回数の増加に比例してアニサキスの不動率が増加するように、上部電極極性、コンデンサ容量、初期塩水温度、塩水導電率、フィレー重量、充電電圧、印加周波数、ポンプ流量、フィレーサイズ、ポンプ噴出口数を最適化した(小笠原他, 2023; 小笠原他, 2024)。これにより導出された、殺虫感度が最大となる条件(「殺虫感度最大条件」、上部電極極性：正、コンデンサ容量：80 μ F、初期塩水温度：6°C、塩水導電率：5 mS/cm、フィレー重量：4 kg、充電電圧 15 kV、印加周波数：0.5 Hz、ポンプ流量：150 L/min、フィレーサイズ：小、ポンプ噴出口数：1 本)で処理したときのアニサキス不動率の結果を図 6-4 に示す。

不動率は印加回数に依存しており、100%の不動率にするためには 300 回以上の印加が必要であることが分かる。製作するプロトタイプ機の充電電圧とコンデンサ容量はこの殺虫感度最大条件より 15 kV および 80 μ F とした。

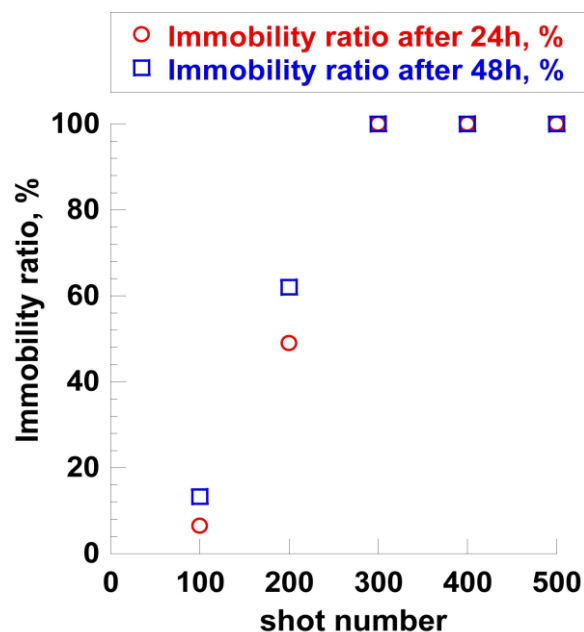


図 6-4 殺虫感度最大条件におけるパルス印加回数と不動率(Onitsuka *et al.*, 2023)

パルス電源の主要パラメータは充電電圧とコンデンサ容量、印加周波数であり、充電電圧とコンデンサ容量は前述のように決定した。印加周波数に関しては、殺虫効率への影響は小

さいが、装置の処理能力に影響する。印加周波数が小さい場合、規定回数印加するまでに時間がかかり、時間あたりの処理量が落ちてしまう。また、印加周波数が小さい方が印加と印加の間にフィレーが冷却して温度上昇は抑えられるが、処理に時間がかかるためフィレーが塩水に浸かっている時間が長くなりフィレーが浸透圧によりダメージを受ける。処理量を考慮すると1バッチの処理時間が短い方が良いが、周波数を上げると装置コストが高くなる。今回のプロトタイプ機はコストを考慮し、2.4 Hz で印加する仕様とした。

電極間体積 13.8 L (約 13.8 kg) に塩水と 3 kg のフィレーが入っており、フィレー成分の約 75 % は水である。すなわち、電極間の物質のほとんどは水であり、水の比熱は $4.2 \text{ kJ}/(\text{kg} \cdot \text{K})$ である。これより計算すると、1 パルスによる電極間の塩水の温度上昇は約 0.12°C ($7 \text{ kJ}/13.8 \text{ kg}/4.2 \text{ kJ}/(\text{kg} \cdot \text{K})$) である。連続循環により電極間の塩水は冷たいバッファ塩水に置換され、その結果、処理直後のフィレーの温度は 20°C 以下に保たれている (印加回数 500 回の時)。

スイッチはメンテナンス性および寿命を考慮し、半導体スイッチを採用した。確実に既定の処理を行ったことを担保するため電圧値と電流値のログを採り、規定の電流の範囲で規定回数印加するプログラムを組み込んだ。規定した電圧・電流の範囲から外れた値が設定した数に達した場合、「異常」として処理を停止する。パルス電源の写真を図 6-5 に示す。



図 6-5 アニサキス殺虫装置プロトタイプ機のパルス電源

6.2.3 処理工程

プロトタイプ機の殺虫処理工程は以下の通りである。

1. 作業者がフィレーをメッシュかごに入れて下部電極に置く。
2. 作業者が操作盤のスタートボタンを押す。
3. 安全扉が下りる。
4. 冷塩水生成装置より塩水が給水され、満水になる。
5. 上部電極が下りる。
6. パルスが印加される。
7. 上部電極及び安全扉が上がり、処理槽内の塩水が規定量排水される。

安全対策として以下の工夫を行った。

- ・装置の表面はすべてアース電位としているが、念のため印加中に作業者が処理槽に触ることがないように、処理槽前面に安全扉を設置した（図 6-6）。
- ・フィレーの入ったかごを処理槽へ投入する際、フィレーとフィレーの間に溜まっていた空気が電極間で滞留すると異常放電を引き起こすため、かごを入れた後に弱くポンプを回してフィレー間に溜まっていた空気を逃がした後に上部電極が下りてくる順番とした。
- ・処理槽が塩水で満水になり、蓋が下り、安全扉が閉まっていることを確認してからパルスの印加を行うようにプログラムした。
- ・処理の最初に低い電圧（1kV）でパルスを印加し、その電流値から塩水の導電率が適正な範囲であることを確認してから本処理（15 kV）を実行することとした。
- ・印加中は給水及び排水は行わないが、パルスの印加中は処理槽内の塩水につながる部分がすべて高電位となるため、給排水管を工夫することで外部と塩水の絶縁をとった。具体的には、給水時は上から塩水を落として処理槽に水を入れ、排水弁の先も塩水を階下に落として塩水がつかないようにした。



図 6-6 処理槽の安全扉

6.2.4 最終仕様

工場に設置された装置の全体写真を図 6-7 に示す。パルス電源は湿気から守るため、専用の部屋の中に設置している。最終的に決定した仕様及び処理条件を表 1 に示す。排水、給水および蓋の昇降を含む 1 バッチの処理時間は約 7 分である。

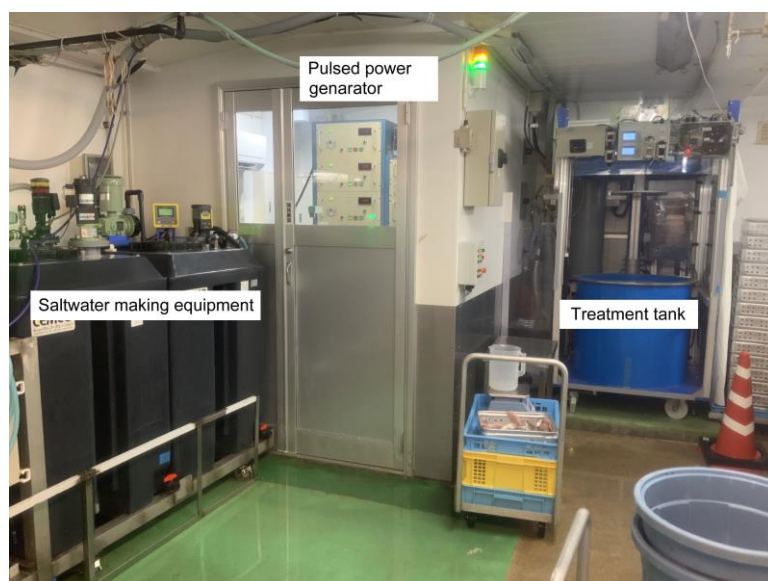


図 6-7 工場に設置されたアニサキス殺虫装置プロトタイプ機

表 6-1 アニサキス殺虫プロトタイプ機の最終仕様

上部電極極性	正
コンデンサ容量	80 μ F
初期塩水温度	6°C
塩水導電率	5 mS/cm
フィレー重量	3 kg
充電電圧	15 kV
印加周波数	2.4 Hz
ポンプ流量	72 L/min
ポンプ噴出孔数	4
印加回数	500

6.2.5 殺虫試験及び処理した魚肉の安全性確認

「2.2 アニサキス入りフィレーの作製法」で述べた方法で人工的にアニサキスを入れたフィレーを作製し、殺虫試験を行った。フィレーは漁獲ロットが異なればサイズや身質が異なり、また魚の個体差もある。どのようなフィレーでもアニサキスを殺虫できることを確認するため、試験は異なる漁獲ロットで複数枚のフィレーを用い、複数回試験を行った。本項では、パルス処理後 24 時間後、48 時間の 2 回活性評価を行い、どちらとも不動であったものを「死亡」と定義した。処理は 1 バッチに 500 回印加することとした。フィレー 1 枚につきアニサキスを 10 隻入れて 1 回の処理に 5 枚投入して処理した試験を 12 回（10 アニサキス/フィレー×5 フィレー×12 回=600 隻）、1 枚のフィレーにアニサキスを 1 隻ずつ入れて 200 枚のフィレーを一度に処理した試験を 2 回（1 アニサキス/フィレー×200 枚×2 回=400 隻）行い、結果 1000 隻すべてが死亡と判定された。これより、本装置の殺虫性能は 99.9 %以上ということになる。これまでに合計約 10 t のパルス処理したアジフィレーを市場へ出荷し、これまでにアニサキスのクレームは挙がっていない。

本装置は塩水中の電極間に電流を流すため、電極材料のイオンが溶出する可能性がある。これを検証するため、塩水に 5,000 回（通常処理の 10 倍）パルスを印加した後、ICP 発光分光分析装置を用いて塩水中のチタン含有量を測定した。その結果、濃度は検出限界以下（1ppb 以下）であった。

また、パルス処理したアジフィレーの食品としての安全性を確認するため、パルス処理直後のフィレーと、パルス処理後 5°C で 4 日間保存したフィレーについて、微生物検査とヒス

タミン検査を行った。いずれも未処理のフィレーと同様、一般生菌数は 300 個/g 以下、大腸菌群数は陰性 (10 個/g 以下)、ヒスタミン値は 2.5 ppm 以下であった。このことから、パルス処理によって微生物やヒスタミン値のリスクが高まることはないことが確認された。

6.3 本章のまとめ

本研究にて作製したアニサキス殺虫装置プロトタイプ機は、現在株式会社ジャパンシーフーズの工場に設置されている。性能評価では 1000 隻すべてのアニサキスを殺虫することが確認された (殺虫率 99.9 %以上)。この装置で処理したアジフィレーは一部顧客に試験販売しており、品質面、安全面で非常に高い評価を得ている。プレスリリース後、日本では多くのメディア (テレビ、ラジオ、新聞、雑誌等) で取り上げられ、非常に注目されている。この装置が普及すればアニサキス食中毒リスクが低減し、生食文化を守ることができると考える。世界においても、冷凍することなく魚を安全に生で食べられるようになり、魚食文化が広まっていく可能性がある。

しかしながら、このプロトタイプ機の処理量は工場においては不十分であり、より少ないエネルギーで大量処理できる装置の開発が求められる。

第7章 総括

アニサキス食中毒は世界で問題となっており、特に魚の生食文化が根付いている日本においては大きな課題である。アニサキス食中毒をなくすという目的であれば、生食用のすべての魚介類を冷凍処理すればよいが、特に冷凍耐性のない魚種（青魚等）は冷凍処理により品質の劣化が顕著にみられる。すべての刺身が解凍品になれば、日本の刺身文化・寿司文化を衰退させることになる。

本研究で、冷凍に代わるアニサキス殺虫方法としてパルスパワーによる電氣的殺虫が有用である可能性を明らかにした。パルスパワーによる殺虫は冷凍に比べて魚肉の品質の劣化が少なく、品質を保ったままアニサキスリスクを低減させることができる。

本研究は実用化を見据えて、アニサキス単体への印加ではなく、すべてのアニサキスは魚肉に入れた状態で印加し不活性化させた。魚肉は第4章4節の実験以外はすべてマアジを使用した。

第1章では、本研究の背景と目的について述べた。アニサキス食中毒と一般的な予防方法及びその課題、本研究と関連するパルスパワーの研究例について記述した。

第2章では、アニサキスの活性評価方法について述べ、パルスパワーによってアニサキスが不活性化できることを明らかにした。

第3章では、 $\phi 40$ cm 平行平板電極を用いた実験を行い、第6章のアニサキス殺虫装置開発の知見とした。不活性化効率の向上のため、 $\phi 20$ cm 平行平板電極を用い、パルスの各種パラメータについて詳細に検討した。その結果、1パルスの注入エネルギー密度が不活性化効率に影響することが明らかとなった。

第4章ではフィレー内でのアニサキスの位置が不活性化に与える影響を調べ、魚肉の厚さと身質が影響していることを明らかにした。ラウンド魚の処理も実施し、内臓の構造上、電流が流れにくい位置があることが明らかとなった。また、マアジ以外の魚種にも適用可能であることを確認し、さらに、天然で潜っていたアニサキスの不活性化も確認した。

第5章では、パルス処理した魚肉の品質を官能評価、破断試験、色差計により評価した。

官能評価では、パルス処理した魚肉が、未処理の魚肉と比べて遜色ない品質を保っていることを確認した。破断試験及び色差計による測定により、パルス処理した魚肉は、冷凍処理した魚肉よりも未処理の魚肉に近い品質を保っていると考えられた。

第 6 章では、アニサキス殺虫装置のプロトタイプ機の開発過程について述べた。この装置は現在株式会社ジャパンシーフーズの工場に設置され、一部の顧客に試験販売を行っている。この装置で処理した製品はその品質において高い評価を得ている。

実際にアニサキス殺虫装置のプロトタイプ機を製作し稼働させていることは、非常に大きな成果である。しかし開発したプロトタイプ機は処理量の面で課題が残っており、今後さらに大量処理する装置を製作するには装置コストが問題となる。装置コストを下げるため、アニサキス殺虫のさらなる効率化が今後の研究の課題である。また、工場で大量処理する装置とは別に、各量販店・飲食店の店舗に設置する小型殺虫装置の需要も高く、その開発も求められている。

パルスパワーによるアニサキス殺虫に関する研究は、第 1 章で述べたように現在のところ 2 つの研究グループの結果が報告されているのみである。アニサキスは多細胞生物であり、パルスパワーによって不活性化されるメカニズムは今のところ不明である。今後さらに研究が進み、この技術の信頼性が増し、この技術が普及することにより、世界中で安心安全で品質の良い生の魚介類が食べられるようになることを期待する。

謝辞

本研究を行うにあたり、丁寧にご指導下さった熊本大学の浪平先生、王先生に心から感謝申し上げます。また、アニサキスに関する貴重なご助言を下さいました国立感染研の杉山先生、九州大学の小島先生に感謝申し上げます。さらに、会社に在籍しながら博士課程への入学を認め応援してくださった株式会社ジャパンシーフーズ井上社長、いつも一緒に実験を行っている中村君に感謝いたします。

本論文の内容の多くは、経済産業省戦略的基盤技術高度化支援事業（サポイン事業）の補助を受け、アニサキス殺虫装置開発プロジェクトの一環として取り組んだものです。実験の際は、熊本大学技術部の松田さん、技術職員の田中さん、故・勝尾さん、河野さん、木山さんに大変お世話になりました。実験に協力してくれた卒業生の福岡君、松本君、岡田君、山田君、学生の石橋君、吉川君、ありがとうございました。装置開発に関しては、装置を製作していただいたパルテック電子株式会社の根来会長、根来社長、メイクラフトの上妻さんに大変お世話になりました。魚肉の品質評価や理化学検査に関しては、福岡県工業技術センターの黒田さん、片山さんにお世話になりました。サポイン事業ではふくおか IST の鐘ヶ江さん、山口さん、南さん、上田さんにお世話になりました。

社会人博士のためあまり研究室の学生との交流はありませんでしたが、博士後期課程卒業生の龍君、アメリカでの国際会議と一緒に参加した江口君、恵良君、緒方君、小柳君、平川君にはお世話になりました。

だいぶ年月が経ってしまいましたが、学部・修士時代、ご指導下さった九州大学の松山先生、山口先生、竹田先生にも感謝申し上げます。

本論文はここに氏名を記した方以外にも、挙げればきりがなほ多くの方の協力があり完成することができました。改めて感謝申し上げます。最後に、いつも支えてくれる家族に感謝いたします。

参考文献

- Abad, V., Alejandro, M., Hernández-Fernández, E., Raso, J., Cebrián, G., Álvarez-Lanzarote, I., 2003. Evaluation of pulsed electric fields (PEF) parameters in the inactivation of anisakis larvae in saline solution and hake meat. *Foods* 12, 264.
- Arshad, R. N., Abdul-Malek, Z., Munir, A., Buntat, Z., Ahmad, M. H., Jusoh, Y. M. M., Bekhit, A. E., Roobab, U., Manzoor, M. F., Aadil, R. M., 2020. Electrical systems for pulsed electric field applications in food industry: An engineering perspective. *Trends in food science & technology* 104, 1-13
- Dong, F. M., Cook, A. R., Herwig, R. P., 2003. High pressure treatment of finfish to inactivate *Anisakis simplex*. *Journal of Food Protection* 66 (10), 1924-1926
- Dryzer, M. H., Niven, C., Wolter, S. D., Arena, C. B., Ngaboyamahina, E., Parker, C. B., Stoner, B. R., 2019. Electroporation of nematode eggs for parasite deactivation. *Journal of water, sanitation and hygiene for development* 9 (1), 49-55
- EFSA, 2010. Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products, *EFSA Journal* 8(4): 1543
- FDA, 2022. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance
- Haas, C. N., & Aturaliye, D., 1999a. Semi-quantitative characterization of electroporation-assisted disinfection processes for inactivation of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Journal of Applied Microbiology* 86 (6), 899-905
- Haas, C. N., & Aturaliye, D. N., 1999b. Kinetics of electroporation-assisted chlorination of *Giardia muris*. *Water Research* 33 (8), 1761-1766
- 長谷川淳, 小林正三, 2010. 魚肉における導電率と脂質含量の関係. 千葉県水産総合研究センター研究報告 No.5, 25-30
- Huang, K., Wang J., 2009. Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods

- pasteurization process: A review. *Journal of Food Engineering* 95, 227-239
- Inoue, K., Oshima, S., Hirata, T., Kimura, I., 2000. Possibility of anisakid larvae infection in farmed salmon. *Fisheries Science* 66, 1049-1052
- 小泉修, 2016. 神経系の起源と進化：散財神経系よりの考察. *比較生理生化学* 33(3), 116-124
- 小林雅美, 福島潤子, 野口駿, 1973. 魚の部分による脂肪の脂肪酸組成の変動. *家政学雑誌* 24 (7), 511-515
- Leygonie, C., Britz, T. J., Hoffman, L.C., 2012. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. *Meat Science* 91, 93-98
- Lim, H., Jung, B. K., Cho, J., Yooyen, T., Shin, E. H., Chai, J. Y., 2015. Molecular diagnosis of cause of anisakiasis in humans, South Korea. *Emerging Infectious Diseases* 2 (2), 342-344
- Martínez, J. M., Abad, V., Quílez, J., Raso, J., Cebrián, G., Álvarez-Lanzarote, I., 2023. Pulsed electric fields (PEF) applications in the inactivation of parasites in food. *Trends in Food Science & Technology* 138, 470-479
- 村田以和夫, 2003. アニサキス症と天然物由来の有効化学物質の検索. *東京都健康安全研究センター研究年報* 54, 3-10
- Nakazawa, N., Okazaki, E., 2020. Recent research on factors influencing the quality of frozen seafood. *Fisheries Science* 86, 231-244
- Niven, C., Parker, C. B., Wolter, S. D., Dryzer, M. H., Arena, C. B., Stoner, B. R., Ngaboyamahina, E., 2020. Deactivation of *Ascaris suum* eggs using electroporation and sequential inactivation with chemical disinfection. *Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development* 10 (3), 558-568
- Niven, C., Wolter, S., Ngaboyamahina, E., 2018. Electroporation of *Ascaris suum* eggs. *Gates Open Res* 2 (53), 53
- 岡崎恵美子, 臼井一茂, 木宮隆, 山下由美子, 大村裕治, 2009. マグロ及び数種のブリ類魚肉のテクスチャー測定について. *水産技術* 1 (2), 1-12
- 小笠原明彦、鬼塚千波里、王斗艶、松田樹也、田中律夫、井上陽一、中村謙吾、根来健爾、

- 根来尚康、浪平隆男、河田直樹、福島祥夫, 2023. パルスパワーによるアニサキス殺虫性能の評価方法の研究 (第 1 報) - 殺虫特性と水温上昇特性のパルスパワー入力依存性 -. 品質工学, 31 (4), 26-32
- 小笠原明彦、鬼塚千波里、王斗艶、松田樹也、田中律夫、井上陽一、中村謙吾、根来健爾、根来尚康、浪平隆男、河田直樹、福島祥夫, 2024. パルスパワーによるアニサキス殺虫性能の評価方法の研究 (第 2 報) - パルスパワー・システムの理想機能の検討 -. 品質工学, 32 (1), 9-15
- Onitsuka, C., Nakamura, K., Wang, D., Matsuda, M., Tanaka, R., Inoue, Y., Kuroda, R., Noda, T., Negoro, K., Negoro, T., Namihira, T., 2022. Inactivation of anisakis larva using pulsed power technology and quality evaluation of horse mackerel meat treated with pulsed power. *Fisheries Science* 88, 337-344
- Onitsuka, C., Nakamura, K., Wang, D., Matsuda, M., Ogasawara, A., Tanaka, R., Inoue, Y., Kouduma M., Noda, T., Negoro, K., Negoro, T., Namihira, T., 2023. Design of prototype device for killing anisakid larvae using pulsed power technology. *Int. J. Plasma Environ. Sci. Technol.* 17, e03001
- Onitsuka, C., Nakamura, K., Wang, D., Matsuda, M., Tanaka, R., Inoue, Y., Namihira, T., 2024. Dependence of anisakid larva inactivation by pulsed power on various parameters. *Journal of Food Engineering* 360, 111715
- 斎藤正男, 1988. 電磁界の生体への影響. *テレビジョン学会誌* 42 (9), 945-950
- Seo, M., Kho, B. M., Guk, S. M., Lee, S. H., Chai, J. Y., 2006. Radioresistance of anisakis simplex third-stage larvae and the possible role of superoxide dismutase. *J Parasitol* 92, 416-418
- Shamsi, A., Butcher, A., 2011. First report of human anisakidosis in Australia. *The medical journal of Australia* 194 (4), 199-200
- Sugiyama, H., Shiroyama, M., Yamamoto, I., Ishikawa, T., Morishima, 2022. Y. Anisakiasis annual incidence and causative species, Japan, 2018-2019. *Emerging Infectious Diseases* 28 (10), 2105-2108

- 鈴木淳, 村田理恵, 2011. わが国におけるアニサキス症とアニサキス属幼線虫. 東京都健康安全研究センター研究年報第 62 号, 13-24
- 日本食品衛生協会, 2013. 食中毒予防必携第 3 版
- 日本食品衛生協会, 2015. 食品衛生検査指針 微生物編
- 谷野孝徳, 岡田拓也, 大嶋孝之, 2014. 高電圧パルス電界処理による線虫 *Caenorhabditis elegans* の不活性化. 静電気学会誌 38 (1), 46-51
- 堤寛, 2001. 感染症病理アトラス V 蠕虫感染症, 59 アニサキス症, 線虫総論, 233-235
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A., 2007. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitology International*. 56, 211-215
- Vernhes, M. C., Benichou, A., Pernin, P., Cabanes, P. A., Teissie, J., 2002. Elimination of free-living amoebae in fresh water with pulsed electric fields. *Water Research* 36 (14), 3429-3438
- 和氣加奈子, 佐々木健介, 清水悠斗, 2021. 生体組織の電気定数特性とその測定技術. 電気学会誌 141 (3), 159-162
- Wang, D., Namihira, T., 2019. Application for marine industries using pulsed power technology. *International Journal of Plasma Environmental Science & Technology* 12 (2), 49-54
- Wang, D., Hirayama, K., Takamura, N., Goto, T., Namihira, T., Akiyama H., 2011. Studies of Electrical Killing on *Nymphonella tapetis* Using Pulsed Power Technology. 30th ICPIG, August 28th-September 2nd.
- Wharton, D.A., Aalders, O., 2002. The response of *Anisakis* larvae to freezing. *Journal of Helminthology* 76, 363-368
- Zhang, L., Teng, Z. S., Li, H. Z., Zhang, Q., Wu, S. S., 2012. Effect of destroying high pulsed electric field to *Ascaris suum* eggs. *Advanced Materials Research* 433, 7338-7344
- Zhang, R., Aji, T., Shao, Y., Jiang, T., Yang, L., Lv, W., Chen, Y., Chen, X., Wen, H., 2017. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) disrupts the structure and metabolism of human *Echinococcus granulosus* protoscolex in vitro with a dose effect. *Parasitol. Res.* 116, 1345-1351

Zimmermann U., 1986. Electrical Breakdown, Electroporation and Electrofusion. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol, 105, 176-256