

アニサキス検査マニュアル

第1版 (2020-11-16)

はじめに

本「アニサキス検査マニュアル」は、地方衛生研究所においてアニサキス症患者から抽出されたアニサキス虫体、およびその原因と推定された魚介類から検出された虫体の虫種同定を目的に作成されました。近年、アニサキスを原因とする食中毒（アニサキス食中毒）がマスコミ等で取り上げられる機会が増え、一般にもよく知られる存在となってきました。アニサキスは腸管出血性大腸菌やノロウイルスのようにヒトからヒトへの感染経路はなく、食品からヒトに感染する食中毒です。アニサキスを原因とする胃腸炎はレセプトデータを基にした推定値で年間 7000 例に達すると報告されていますが、食品衛生法に基づく食中毒報告数はその 10%にも達してない状況です。また、全国のアニサキス食中毒報告数は自治体により差が大きく、アニサキス食中毒の発生状況調査、特に原因となった魚介類の特定やその魚介類におけるアニサキスの寄生状況などの情報は十分とは言えません。このような背景のもと、本邦では初めてとっていいアニサキスに特化した、この「アニサキス検査マニュアル」が国内におけるアニサキス食中毒の発生状況の把握とその防止の一助になれば幸いです。

地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部長

吉村 和久

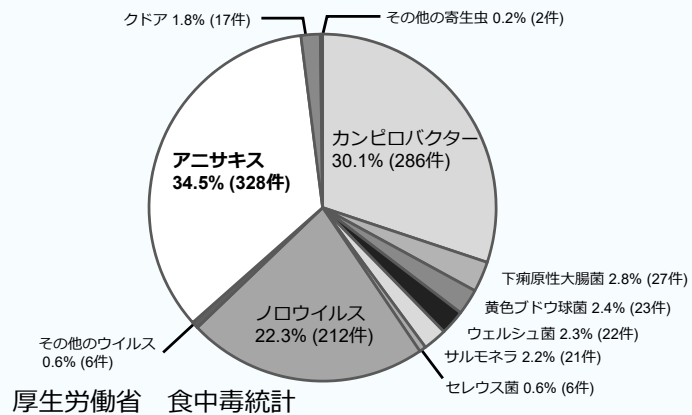
アニサキスによる食中毒の発生状況

アニサキスは、1999年の食品衛生法の改正により食中毒起因物質に指定された。さらに2013年には、食中毒事件票の病因物質・種別欄にアニサキスやクドアなど寄生虫に関する項目が独立し、アニサキスを原因とする食中毒(アニサキス食中毒)が食中毒統計において個別に集計されるようになった。その結果、アニサキス食中毒の発生状況や原因食品が明らかになってきただけでなく、徐々にアニサキス食中毒の報告数も増加し、2018年は前年の2倍以上の469件に達している。

全国のアニサキス食中毒件数と発症者数の年次推移

年	事件数	発症者数
2013	88	89
2014	79	79
2015	127	133
2016	124	126
2017	230	242
2018	469	479
2019	330	338

全国の細菌・ウイルス・寄生虫による食中毒件数(2019年)



アニサキス属線虫の種類

幼虫の形態による分類	虫体の大きさ	アニサキスの種類 (Anisakis)
アニサキスⅠ型	27～37 mm	<i>A. simplex sensu stricto</i>
		<i>A. pegreffii</i>
		<i>A. berlandi</i>
		<i>A. typica</i>
		<i>A. nascettii</i>
アニサキスⅡ型	22～35 mm	<i>A. ziphidarum</i>
		<i>A. physeteris</i>
アニサキスⅢ型	27～35 mm	<i>A. brevispiculata</i>
アニサキスⅣ型	14～23 mm	<i>A. paggiae</i>

9種類

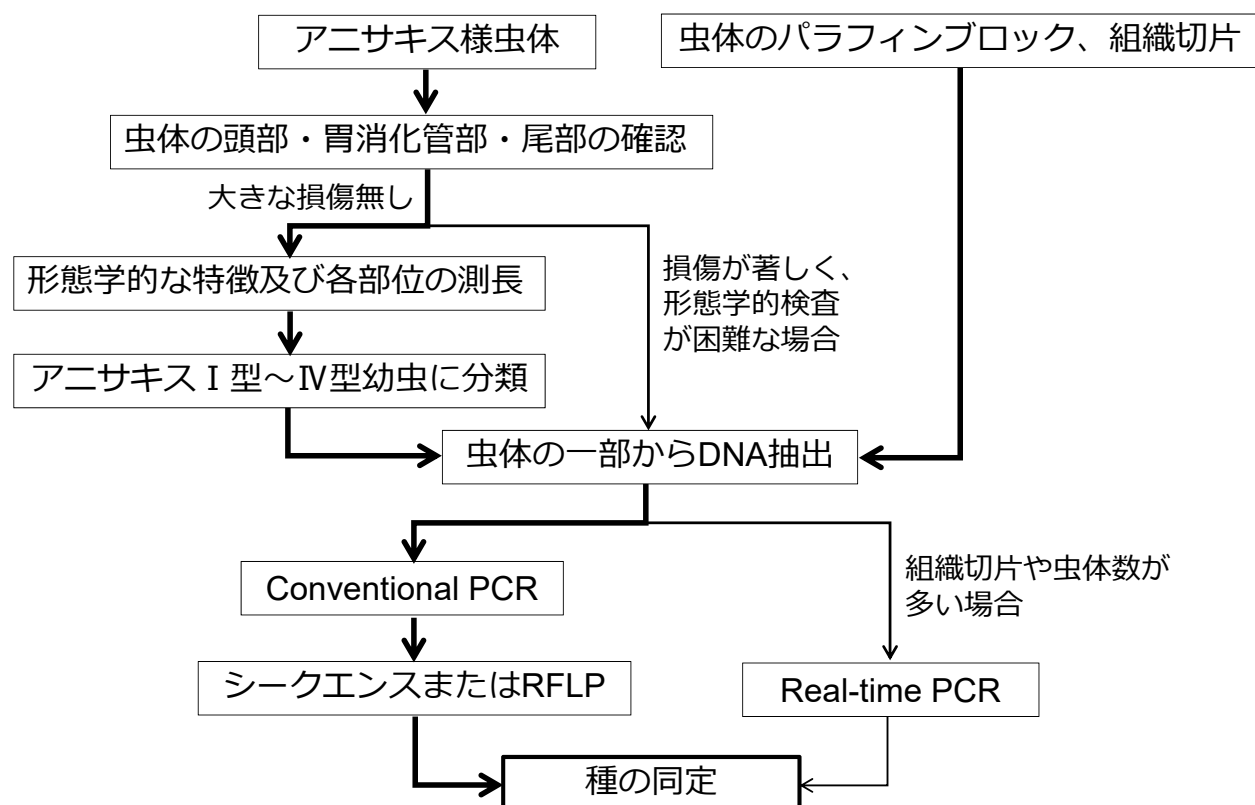
アニサキス症の原因寄生虫種

東京都内 (2011-2018)

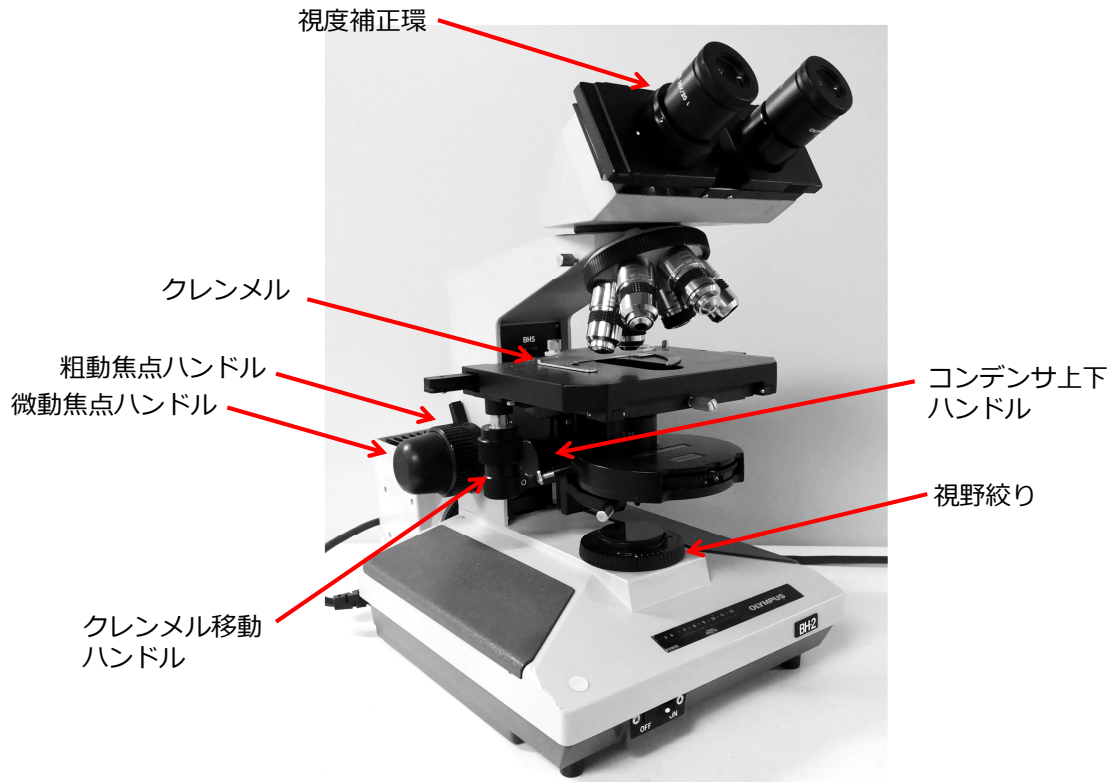
種類	検出率
<i>Anisakis simplex sensu stricto</i>	94.0 %
<i>Anisakis pegreffii</i>	4.4 %
<i>Pseudoterranova</i> sp.	1.6 %

これまでに国内で*A. physeteris*および*A. typica*を原因とするアニサキス症が数例報告されている。

アニサキスの検査フロー



顕微鏡について



顕微鏡の準備

- ・近年の生物顕微鏡には、PCとセットで画像解析ソフトがあり、それを使用する場合には、接眼マイクロメーターは必要ない。
- ・当センターにおける寄生虫の顕微鏡検査では、対物レンズに、2.5倍、5倍、10倍、20倍、40倍、100倍の5種類と10倍の接眼レンズを使用している。
⇒ アニサキスの場合には、主に5倍、10倍の対物レンズを使用。
- ・接眼レンズは比較的安価に購入可能なので、当センターでは、「5mm 10等分、10mm 10等分、なし」の3種類を準備しておき、観察対象によって使い分けている。10mm 10等分を10倍接眼レンズ、10倍対物レンズで観察した場合、1マスが100 μ mとなる。

顕微鏡の調整

- ・ステージと対物レンズの距離を十分にとり、虫体を乗せたプレパラートをステージにセットする。
- ・アニサキスのような大きな観察対象に限らず、必ず低倍率の対物レンズで粗動焦点ハンドルを操作し、対物レンズをプレパラートに近づけ、プレパラートと対物レンズの距離をゆっくり離してピントを合わせる。ピントの微調整には微動焦点ハンドルを用いる。
- ・視度調節（視度補正環）と眼幅調整、視力の左右差を補正する。この段階で、さらに微動焦点ハンドルでピント調整を行う。
- ・コンデンサー位置と開口絞りにより、虫体の特徴が見やすいように調整する。（通常はコンデンサーは上限位置で使用）
形態的な検査には、開口絞りによる調整が重要。
- ・接眼ミクロメーターの入れてある接眼レンズでアニサキスの形態学的な特徴部位を計測する。

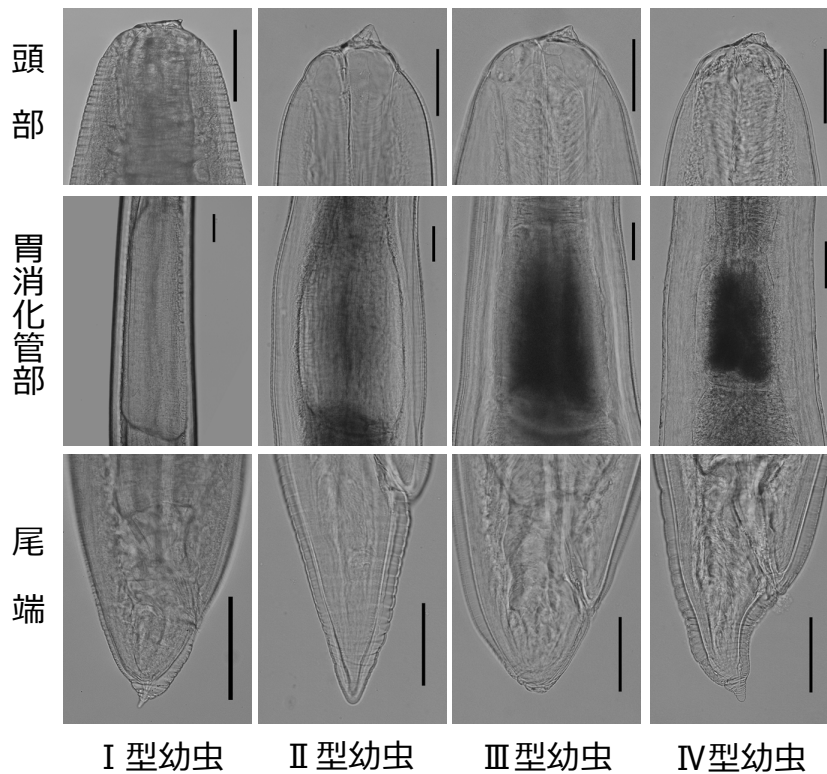
形態学的検査

- ・虫体への付着物や被囊している場合にはきれいに取り除く。
- ・加温(70℃~80℃)した0.4%食塩水でアニサキスを死滅させる。
(運動性がなければこの工程を省く)
- ・ゲータ液で虫体の透徹処理を行い、顕微鏡下で胃の形状、尾突起等の形態を確認する。また、体長、体幅、食道長、胃長、尾長の測長を行う。
- ・虫体を蒸留水で洗浄してゲータ液を除去し、DNA抽出まで70%エタノールで保存する。
- ・体長/体幅、体長/食道長、体長/胃長、体長/尾長を算出する。

ゲータ液	・アラビアゴム（粉末）	4 g
	・蒸留水	10 mL
	・抱水クロラール	30 g
	・酢酸	3 mL（最後に加えること）

スターラーで攪拌しながら溶解した後、褐色瓶に移して遮光保存する。

アニサキス属第3期幼虫の形態学的な分類



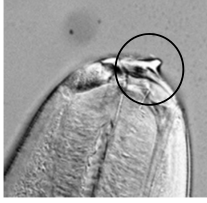
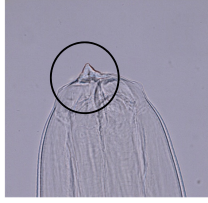
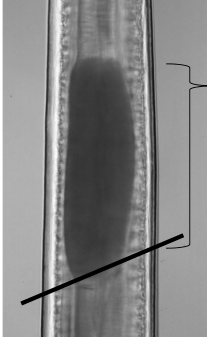
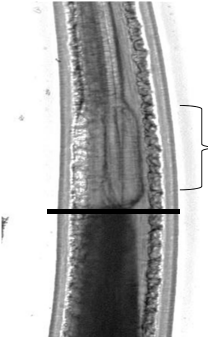
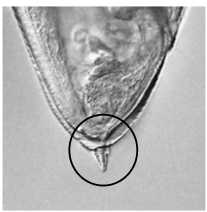

スケール: 100 μm

アニサキス I 型からIV型幼虫の計測値

幼虫の形態	I 型幼虫 (検査個体数: 8)		II 型幼虫 (検査個体数: 90)		III 型幼虫 (検査個体数: 6)		IV 型幼虫 (検査個体数: 27)	
	計測値	(平均 ± SD)	計測値	(平均 ± SD)	計測値	(平均 ± SD)	計測値	(平均 ± SD)
体長 (mm)	26.50–36.50	(31.19 ± 3.13)	22.00–34.50	(29.14 ± 2.29)	27.00–35.00	(32.17 ± 3.13)	14.00–23.00	(18.22 ± 2.28)
体幅 (mm)	0.42–0.54	(0.46 ± 0.04)	0.51–0.75	(0.65 ± 0.05)	0.75–0.95	(0.86 ± 0.09)	0.40–0.60	(0.50 ± 0.05)
食道長 (mm)	2.15–2.70	(2.32 ± 0.21)	1.70–2.40	(2.11 ± 0.17)	1.70–2.35	(1.96 ± 0.27)	1.25–1.85	(1.46 ± 0.19)
胃長 (mm)	1.30–1.05	(1.18 ± 0.08)	0.50–0.72	(0.59 ± 0.06)	0.45–0.56	(0.51 ± 0.05)	0.22–0.40	(0.31 ± 0.04)
尾長 (mm)	0.08–0.13	(0.10 ± 0.02)	0.16–0.38	(0.26 ± 0.05)	0.11–0.15	(0.12 ± 0.01)	0.07–0.17	(0.11 ± 0.03)
体長 / 体幅	63.0–72.1	(67.6 ± 3.2)	37.7–50.8	(45.2 ± 3.0)	28.4–46.7	(38.0 ± 6.4)	30.0–46.0	(36.6 ± 4.2)
体長 / 食道長	11.2–15.9	(13.5 ± 1.5)	11.1–17.4	(13.9 ± 1.2)	11.5–20.6	(16.8 ± 3.3)	10.3–15.0	(12.6 ± 1.6)
体長 / 胃長	23.0–29.5	(26.4 ± 2.3)	39.0–62.0	(49.7 ± 4.9)	49.1–77.8	(63.7 ± 9.5)	46.8–81.8	(59.7 ± 8.5)
体長 / 尾長	241.7–388.2	(319.0 ± 56.2)	84.0–171.0	(115.0 ± 23.1)	206.7–291.7	(261.2 ± 33.4)	124.1–242.9	(170.9 ± 35.5)

アニサキス I 型幼虫は、虫体全長に対して胃長が大きいことが重要な形態学的鑑別点となる。

主なアニサキス属幼線虫のチェックポイント

	アニサキスI型	アニサキスII型
頭部	 <p>穿歯が小さく、傾いている</p>	 <p>穿歯が I 型幼虫より大きく、ほぼ垂直</p>
胃消化管部	 <p>胃が他のアニサキス属幼線虫より長い サバ、サケ、カツオなどの腹腔から検出されるものは、胃長が約 1 mm</p> <p>胃と腸の接合部が斜め</p>	 <p>I 型幼虫と比較して胃が短い</p> <p>胃と腸の接合部がほぼ水平</p>
尾部	 <p>尾端が鈍円で、尾突起が確認できる</p>	 <p>尾突起なし</p>

DNA抽出（ホルマリン未固定の虫体）

- 虫体を 3 分割し、頭部、尾部は70%エタノール中に保管する。中間部をDNA抽出用の試料とし、下記のいずれかの方法でDNAの抽出を行う。

1) キットによる抽出（推奨）

- 虫体中間部を2.0 mLマイクロチューブ（フック付き）に入れ、はさみで細かく切断する。
- QIAamp DNA Mini Kit等を用いてDNA抽出を行う。抽出法は各取説に従う。

2) アルカリ熱抽出（Real-time PCR用の簡易法）

- 虫体中間部の一部（3mm程度）を0.5 mLマイクロチューブに入れる。
- チューブに 50 mM NaOH 20 μ L を入れ、99 $^{\circ}$ C で30分間加熱する。加熱後、80 mM Tris-HCl 40 μ L を加え中和し、DNA templateとする。

DNA抽出 (ホルマリン固定、組織切片等の虫体)

- ホルマリン固定虫体は、蒸留水または70%エタノール中に半日以上浸す。
(ホルマリン固定の時間が長いものほど、長時間70%エタノール等に浸すこと)
- 虫体中間部をエッペンチューブ内で細かく切断後、QIAamp DNA Mini Kit等により、DNAを抽出する。
抽出法は取説に従う。
(アルカリ熱抽出法は用いないこと)
- 虫体の組織切片は、少なくとも3切片は使用し、DEXPAT (タカラバイオ) 等でDNA抽出を行う。
抽出したDNAは、その半量または全量を使用する。

DNA抽出 (パラフィンブロックの虫体)

- 虫体周辺のパラフィンを外科用メス等で簡単に取り除き、虫体を加温し、虫体周囲のパラフィンを融解させる。
- 取出した虫体をキシレンに約半日入れ、脱パラを行う。
- 新しいキシレンに虫体を約30分間浸ける。
- 無水エタノールに虫体を移し、2～3時間浸けた後、新しい無水エタノールに虫体を2～3時間浸け、さらに1回同様の作業を行う。
- 脱パラした虫体の一部を市販のQIAamp DNA Mini Kit等を用いてDNAを抽出する。
(虫体の残りは、70%エタノールに保管する)

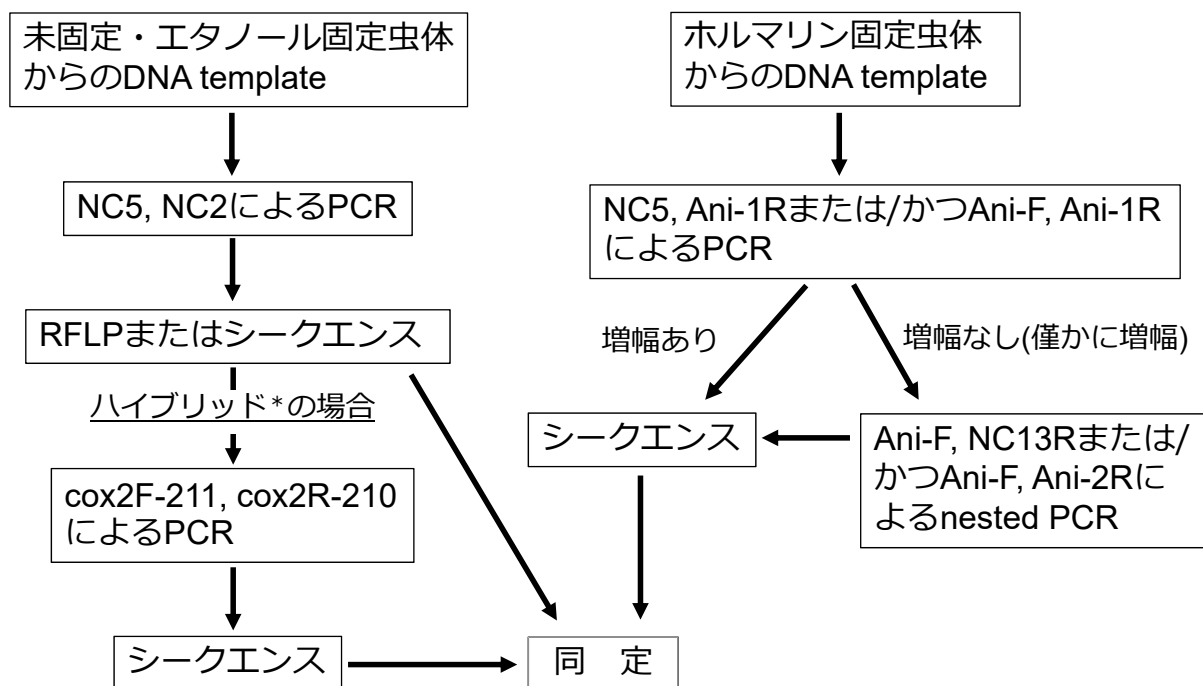
Conventional PCR

No.	プライマー名	配列 (5' to 3')	ターゲット	文献
1	NC5 *	(forward) GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT	ITS region	Zhu et al., 1998
2	NC2	(reverse) TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT	"	"
3	Ani-F **	(forward) CGTCTACGCCGATCTAGCTT	"	Suzuki et al., 2010
4	Ani-1R	(reverse) AGCTGGCTGCGTTCTTCAT	"	"
5	Ani-2R	(reverse) ATCCACCGCCAAGATTTGTA	"	"
6	NC13R	(reverse) GCTGCGTTCTTCATCGATC	"	Zhu et al., 1998改
7	cox2F-211	(forward) TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT	mtDNA cox2	Nadler et al., 2000
8	cox2R-210	(reverse) CACCAACTCTTAAAATTATC	"	"

* : アニサキスの塩基配列を基にしたNC5と文献は1塩基異なる

** : Ani-Fは*A. brevispiculata*の配列と1塩基異なる

Conventional PCR



* : ITS1の5'末端から280および296番目の塩基が*A. simplex s. str.*と*A. pegreffii*の両方の配列を有するもの (次図の矢印部)

Conventional PCR

NC5

A. simplex s. str. **GTAGGTGAACCTGCCGAAGGATCATT**ATCGAGGGAATCCTCAAAAGGAACGAAAAAGTCTCCCAACGTGCATACCTTCCATTTGCATGTTGT [90]
A. pegreffii
A. berlandi

A. simplex s. str. TGTGAGCCACATGGAACCTCGTACACACGTGGTGGCAGCCGTCTGCTGTGCTTTTTTAGGCAGACAATGGCTTACGAGTGGCCGTGTGC [180]
A. pegreffii
A. berlandi

Ani-F

A. simplex s. str. TTGTTGAACAACGGTGACCAATTTGG**CGTCTACGCCGTATCTAGCTT**CTGCCTGGACCGTCAGTTGGCATGAAAGATGCGGAGAAAAGTTC [270]
A. pegreffii
A. berlandi

A. simplex s. str. CTTTGTGGTCTAATCATCATTGATGAGCAG**T**AGCTTAAGGCAGAG**T**GAGCAGACTTAATGAGCCACGCTAGGTGGCCGCCAAAA [360]
A. pegreffii
A. berlandi C

Ani-2R

A. simplex s. str. CCCAAAACACAACCGGTCTATTTGACATTGTTATTTTCATTGTATGTGTTGAAAATG**TACAAATCTTGGCGGTGGAT**CACTCGGTTCTGTGG [450]
A. pegreffii
A. berlandi

NC13R Ani-1R

A. simplex s. str. **ATCGATGAAGAACCGCAGCCAGCT**GCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTCGAACGCACATTGCGCTATCGGG [540]
A. pegreffii
A. berlandi

A. simplex s. str. TTCATCCCGATGGCAGCTGGCTGAGGGTGAATACGGTGAAGTGTCTTACAGGTTTTCTGGACTGTGAAGCATTGCGCAAGCAAT [630]
A. pegreffii
A. berlandi C

A. simplex s. str. TGCTGTTGTTGTTGGTGATTCTATCATGGACAATATGACGAGCGGTTCTTCTGCTTAGTGATGACAAAAGAAGACGTCAACACCGAATC [720]
A. pegreffii
A. berlandi C

A. simplex s. str. TACTATACTACTAATACTAGTATATAGGTGAGGTGCTTTTGGTGGTCACAAAAGTGACAAGTATGCCATTTTCATAGGGGCAACAACCAGC [810]
A. pegreffii
A. berlandi

A. simplex s. str. ATACGTGATAAGTTGGCTGGTTGATGAAACGGCAACGGAATGACGGACGCTATGTGATCAAAAATGATACTATTTGACCTCAGCTCAGT [900]
A. pegreffii
A. berlandi

NC2

A. simplex s. str. CGTGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATAATTA**AGCCGAGGAAAAGAACTAA** [953]
A. pegreffii
A. berlandi

Conventional PCR

PCR反応液

	Final conc.	Volume/1 tube
10 × PCR Buffer		5 μL
dNTP Mixture (2.5 mM)	0.2 μM	4 μL
Primer forward (10 μM)	0.4 μM	2 μL
Primer reverse (10 μM)	0.4 μM	2 μL
Taq polymerase	1 U/50 μL	0.2 μL
Template DNA		1 μL*
DW		Up to 50 μL

*: DNA templateは、未固定またはエタノール固定の場合の使用量
ホルマリン固定虫体のFirst PCRの場合には、DNA templateを5~10 μLとしPCRを実施

Conventional PCR

PCR反応条件

【ITS regions】（各プライマーによるPCR共通）

Step 1	: 95 °C	5 分	}	Step 2~4を30~35回反復
Step 2	: 95 °C	40 秒		
Step 3	: 60 °C	40 秒		
Step 4	: 72 °C	60 秒		
Step 5	: 72 °C	5 分		
Step 6	: 4 °C	∞		

【mtDNA cox2】

Step 1	: 95 °C	3 分	}	Step 2~4を35回反復
Step 2	: 95 °C	30 秒		
Step 3	: 46 °C	60 秒		
Step 4	: 72 °C	90 秒		
Step 5	: 72 °C	10 分		
Step 6	: 4 °C	∞		

RFLP

NC5とNC2によるPCR増幅産物が得られた場合にのみ実施

- ・ 0.5 mLのマイクロチューブ2本に、*Hinf* Iおよび*Hha* Iを1 μLずつ入れ、付属の10×Buffer 2 μL、PCR増幅産物 2~5 μLを加え、DWで全量20 μLに調整する。（タカラバイオの制限酵素の場合）
- ・ 37°Cで2時間インキュベート（水浴やヒートブロックを使用）
- ・ 電気泳動を行い、PCR増幅産物の切断パターンにより種を決定する。

制限酵素：特定の2本鎖DNAの塩基配列を認識し切断する酵素

例) *Hha* I



網掛け部分の配列を認識し、右のように切断する

RFLP

NC5とNC2によるPCR増幅産物を用いたRFLP

Hinf I

分類	虫種	制限酵素断片長(bp)			増幅産物長
Type I	<i>A. simplex sensu stricto</i>	237	615		953
	<i>A. pegreffii</i>	237	284	331	953
	<i>A. berlandi</i>	237	615		953
	<i>A. typica</i>	328	594		956
	<i>A. zythodarum</i>	273	292	332	931
	<i>A. nascettii</i>	275	285	335	929
Type II	<i>A. physeteris</i>	241	265	360	900
Type III	<i>A. brevispiculata</i>	866			900
Type IV	<i>A. paggiae</i>	886			920

制限酵素断片長は理論値

RFLP

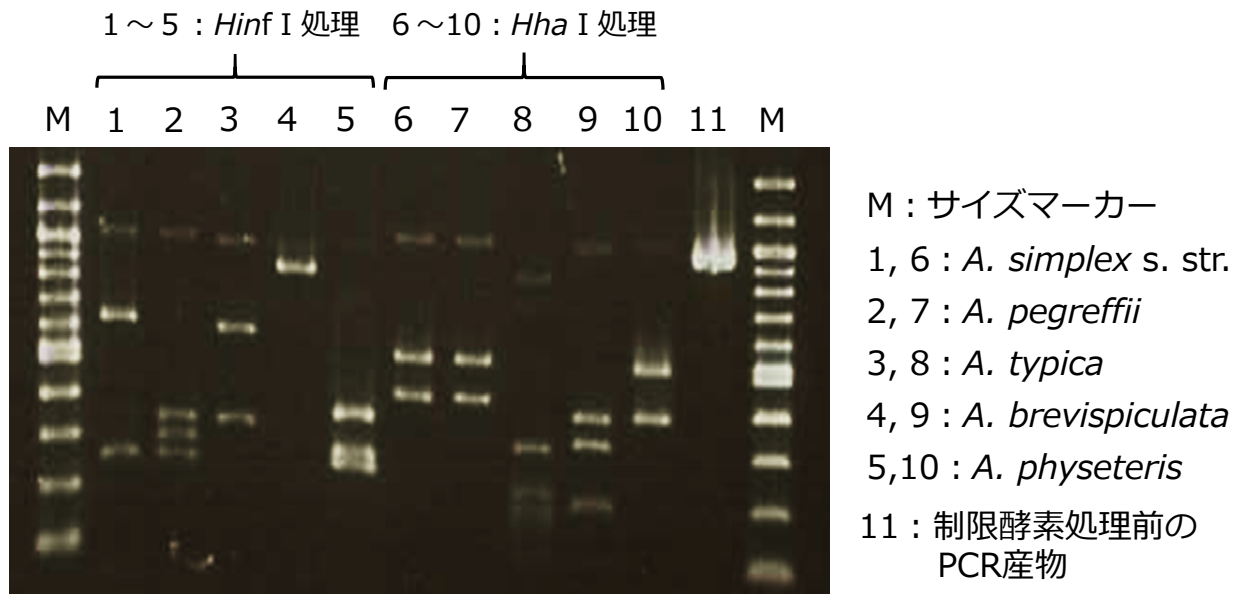
NC5とNC2によるPCR増幅産物を用いたRFLP

Hha I

分類	虫種	制限酵素断片長(bp)					増幅産物長
Type I	<i>A. simplex sensu stricto</i>	421	532			953	
	<i>A. pegreffii</i>	421	532			953	
	<i>A. berlandi</i>	142	279	532		953	
	<i>A. typica</i>	103	153	180	212	308	956
	<i>A. zythodarum</i>	413	518			931	
	<i>A. nascettii</i>	137	269	523		929	
Type II	<i>A. physeteris</i>	387	513			900	
Type III	<i>A. brevispiculata</i>	191	324	385		900	
Type IV	<i>A. paggiae</i>	407	513			920	

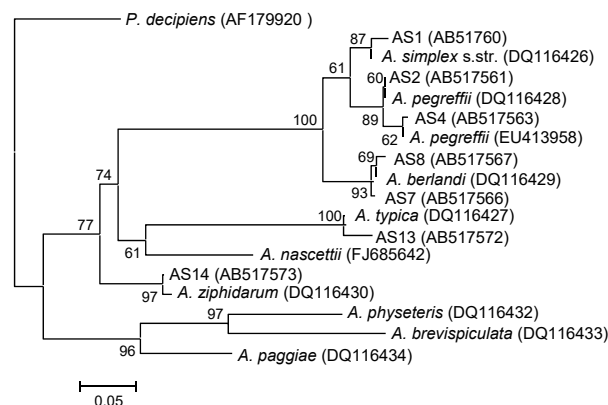
制限酵素断片長は理論値

RFLP



シーケンス解析

- Conventional PCRで得られたPCR増幅産物をキットで精製後、BigDye v3.1等によりサイクルシーケンス反応を行う。
- カラム等で精製後、シーケンス解析を行う。
- シーケンス結果のBlast解析を行う。MEGA等の解析ソフトにアニサキス9種のデータがある場合は、解析ソフトにデータを取り込み系統樹解析を行う。
- mtDNA *cox2*遺伝子の場合には、系統樹解析は必須となる。



mtDNA *cox2*の塩基配列に基づくアニサキス属線虫の系統樹

Pseudoterranova decipiens: outgroup, (): GenBank accession number
 AS1 - AS14: 当センターにおけるアニサキス検体

Real-time PCR

– 目的 –

ホルマリン固定された臨床由来虫体(組織切片も含む)でConventional PCRによりPCR増幅産物が十分得られない場合の遺伝子検査、多数のアニサキスの効率的な遺伝子検査を目的としている。

– 種同定の範囲 –

A. simplex s. str., *A. pegreffii*, *A. berlandi* の同定



臨床由来の虫体および日本近海の魚介類に寄生するアニサキスの遺伝子同定には、3種の鑑別が重要

Real-time PCR

リアルタイムPCR反応液

	Final conc.	1tube	
TaqMan Universal Master Mix		25 μ L	
Forward primer (10 μ M)	900 nM	4.5 μ L	
Reverse primer (10 μ M)	900 nM	4.5 μ L	
Probe 1 (10.1 μ Mの場合*)	200 nM	0.98 μ L	* : Probe濃度は購入毎に異なる
Probe 2 (10.1 μ Mの場合*)	200 nM	0.98 μ L	Probe2は必要に応じて
Template		1 – 2** μ L	** : ホルマリン固定虫体
DW		Up to 50 μ L	や切片では5 μ L

反応条件

50 $^{\circ}$ C	2 分	1 cycle
95 $^{\circ}$ C	10 分	1 cycle
95 $^{\circ}$ C	15 秒	35 cycles
60 $^{\circ}$ C	60 秒	

使用機器 : Applied Biosystems 7900HT
Fast Real Time PCR System

Real-time PCR

No.	プライマー名		配列 (5' to 3')	Target	Position	Accession no.
1	T1SPB-F	(forward)	TTTTGGCTGCTAATCATCATTGA	ITS1	275-297	AY826723
2	T1SPB-R	(reverse)	CCACCTAGCGTGGCTCATTA	ITS1	330-350	AY826723
3	T1SPB-P	(probe)	(FAM)-CAGCTTAAGGCAGAGTCG-(MGB)	ITS1	304-321	AY826720
4	T1SPB-SB	(probe)	(VIC)-TAGCTTAAGGCAGAGTTG-(MGB)	ITS1	305-322	AY826723
5	T1B-F	(forward)	GTGTTGTTGGTGATTCTATCATGGA	ITS2	636-660	AY826722
6	T1B-R	(reverse)	CGGTGTTGACGTCTTCTTTTATCAT	ITS2	663-678	AY826722
7	T1B-B	(probe)	(VIC)-ATATGACGCGCGGTTTC-(MGB)	ITS2	690-714	AY826722

Real-time PCR

1 検体につき2つのreal-time PCRを実施する。

- 1) [T1SPB]: プライマー・プローブ (1~4) のセット (マルチプレックスreal-time PCR)
- 2) [T1B]: プライマー・プローブ (5~7) のセット

	As	Ap	Ab	As/Ap	Az	At	An	
[T1SPB]	(+) VIC	(+) FAM	(+) VIC	(+) VIC	(+) FAM	(-)	(-)	(-)
[T1B]	(-)	(-)	(+) VIC	(-)	(-)	(-)	(-)	

As: *Anisakis simplex* sensu stricto, Ap: *A. pegreffii*, Ab: *A. berlandi*
 As/Ap: hybridization between Ap and As, Az: *A. ziphidarum*, At: *A. typica*, An: *A. nascettii*

臨床由来虫体の92~95%が*A. simplex* s. str.、3~5%が*A. pegreffii*であることから、臨床検体のほとんどが上記のプライマーセットで同定可能

Real-time PCR（注意事項）

Real-time PCRに使用するプライマー・プローブセットは、使用する機器において下記のような非特異の増幅が確認されている。

- 1) Applied Biosystems 12Kでは、虫種がAbの場合には、[TISPB]でVIC、FAM共に増幅が確認されることがある。
- 2) Applied Biosystems 7900HTおよび12Kの両方で、虫種がApの場合には、[TISPB]でVIC、FAMともに増幅が稀に確認される。

(Applied Biosystemsの7900HTと12Kのみの検討)

参考文献

形態に関して

- 1) Shiraki, T.: Larval nematodes of family Anisakidae (Nematoda) in the northern sea of Japan: as a causative agent of eosinophilic phlegmone or granuloma in the human gastro-intestinal tract. *Acta Med. Biol.* 22, 57–98, 1974.
- 2) Murata, R., Suzuki, J., Sadamasu, K., Kai, A.: Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. *Parasitol. Int.* 60, 193–198, 2011.
- 3) 鈴木 淳, 村田理恵: わが国におけるアニサキス症とアニサキス属幼線虫, 東京健安研七年报, 62, 13-24, 2011.

Conventional PCRに関して

- 4) Suzuki, J., Murata, R., Hosaka, M., Araki, J.: Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 88–93, 2010.

RFLPに関して

- 5) D'Amelio S, Mathiopoulos KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SC, Picanco M, et al. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Parasitol.*, 30, 223–226, 2000.

Real-time PCRに関して

- 6) Murata R., Suzuki J., Kodo Y., Kobayashi K., Sadamasu K., Takano T., Iwaki T., Waki T., Ogawa K.: Probable association between *Anisakis* infection in the muscle of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) and human anisakiasis in Tokyo, Japan, *Int. J. Food Microbiol.*, 337, 108930, 2021.

アニサキス検査マニュアル

地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成グループ編

【執筆者一覧】

東京都健康安全研究センター 微生物部

鈴木 淳・村田 理恵・神門 幸大・貞升 健志

【監修】

国立医薬品食品衛生研究所

衛生微生物部第四室：大西 貴弘

東京都健康安全研究センター

所長：吉村 和久（地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部会長）

本マニュアルに関するご質問・ご意見がございましたら、下記の代表執筆者にお問い合わせください。

東京都健康安全研究センター・微生物部

鈴木 淳

住所：東京都新宿区百人町3-24-1

電話：03-3363-3231（代表）