

アニサキスは宿主の中で何をしているのか？*

菅谷 智司**・***・滝沢 侑子***・力石 嘉人****・*****

(2019年11月20日受付, 2019年12月28日受理)

Abstract

The parasitic nematode *Anisakis* is one of major parasites frequently found in fish, squid, and marine mammals including dolphins and whales, and causes severe abdominal pain if human eats infected fish or squid. However, little knowledge is available in what the parasites are doing in the host fish species and how they can survive and remain infective in their unique life cycles. In the present study, to enhance our knowledge on the parasite, we investigated trophic level (TL) and potential diet resources ($\delta^{15}\text{N}_{\text{Resource}}$) based on stable nitrogen isotopic composition ($\delta^{15}\text{N}$) of glutamic acid and phenylalanine in *Anisakis* larvae and their host fish *Pleurogrammus azonus*. The TL of *Anisakis* larvae (2.6-2.9) is considerably smaller than that of muscle in the host fish (3.6). Moreover, the $\delta^{15}\text{N}_{\text{Resource}}$ values largely vary among individual *Anisakis* larvae specimens (2.4‰-4.7‰), and several specimens are clearly smaller than the value of muscle in the host fish (4.3‰). These results reveal that *Anisakis* larvae have never fed on the host fish tissues/organs even though they are found in the fish, and suggest that *Anisakis* larvae can survive as a dormant phase, remain infective, and be accumulated in the paratenic host fish for the effective infection to the definitive hosts.

1. はじめに

日本人は古くから水産物との関わりが強く、海産物を生食するという独特な食文化を持つ。近年ではこの日本の食文化が海外からも注目されるようになり、寿司や刺身といった料理が日本食の中でもとりわけ人気である。しかし、人にとって海産物を生食することは寄生虫の摂取という大きなリスクをはらむ。実際に「アニサキスによる食中毒（アニサキス症）」は、テレビや新聞などでも頻繁に報道されているように、水産業界や食品業

界を悩ます深刻な問題となっている。アニサキス (*Anisakis* sp.) は魚介類に寄生する線虫の一種であり、アニサキス症は人が魚介類を生食した際に、そこに寄生していたアニサキスが人間の胃壁や腸壁にかみつ়くことによって引き起こされる（例えば、Audicana *et al.*, 2002, Ivanović *et al.*, 2017）。アニサキスは、幼生期はオキアミ等の動物プランクトン・甲殻類の幼生や魚を中間宿主として成長し、その後、海棲哺乳類を終宿主として成虫になり、有性生殖をおこなう（例えば、Nagasawa, 2013, Ivanović *et al.*, 2017, Fig. 1）。宿主間の移動は食

*What is the parasitic nematode *Anisakis* doing in host fish?

**北海道大学水産学部 〒041-8611 函館市港町3丁目1-1

Satoshi Sugaya: Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1, Minato-cho, Hakodate, 041-8611, Japan

***北海道大学低温科学研究所 〒060-0819 札幌市北区北19条西8丁目

Yuko Takizawa and Yoshito Chikaraishi: Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, N19W8, Kita-ku, Sapporo, 060-0819, Japan

****国立研究開発法人海洋研究開発機構 〒237-0061 横須賀市夏島町2-15

Yoshito Chikaraishi: Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, 2-15 Natushima-cho, Yokosuka, 237-0061, Japan

Corresponding Author: ychikaraishi@lowtem.hokudai.ac.jp (力石嘉人)

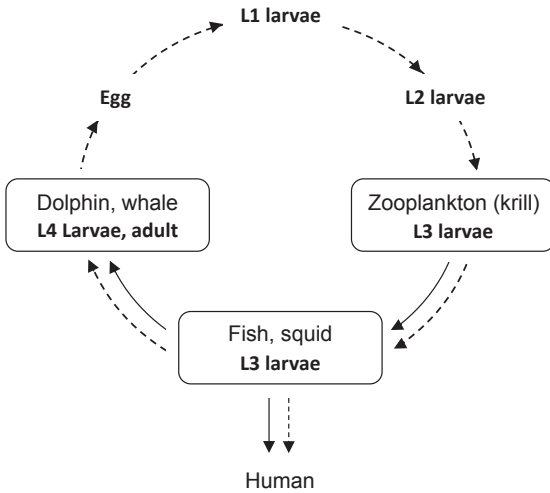


Fig. 1. The life cycle of *Anisakis* (dash line). Larval stage (L) is represented as L1, L2, L3, and L4. Solid line represents grazing process from diets to consumers (after Nagasawa, 2013).

物連鎖を介しておこなわれるため、アニサキスの寄生サイクルや、エネルギーや栄養素の獲得等は、捕食-被食関係に完全に依存すると考えられている。しかしながら、実際にアニサキスが、魚介類の中で何を食べて（何を栄養として）生きているのか、どのように寄生サイクルを成立させているのか、そして、アニサキスにとって魚介類に寄生することがどのような意味を持つのか、宿主である魚介類にはどのような影響があるのか、などを評価した研究はほとんどおこなわれていない。

捕食-被食関係における、物質やエネルギーの移動・蓄積・消費を考えるうえで、生態学分野では（1）生態系ピラミッド（food web pyramid）における栄養段階（trophic level）と、（2）食物連鎖（food chain）における一次生産者の安定同位体比が用いられてきた。栄養段階とは「食物連鎖でつながった生態系の階層」のことであり、一般的にはFig. 2に示す「生態系ピラミッド」で説明される。光合成により有機物を作り出す植物や植物プランクトンは、一次生産者とよばれ、一次生産者が作り出した有機物は、一次消費者、二次消費者、三次消費者というように捕食を通して多段的に利用されてゆく。この一次生産者、一次消費者、二次消費者、三次消費者をそれぞれ順に1, 2, 3, 4としたものが栄養段階である。このように、生態系に属する生物は全て栄養段階という

共通の指標で単純化して表すことができ、栄養段階の高い生物が低い生物を捕食するごとに数字が1ずつ上昇する。また、ある生物（捕食者）が、栄養段階2と3の餌を7:3の割合で捕食した場合には、捕食者の栄養段階は $(2 \times 0.7 + 3 \times 0.3) + 1 = 3.3$ となり、整数以外の数字もとりうる。このように生物の栄養段階は、その生物の生態系ピラミッドの位置を示し、また、その生物が「平均として何を食べていたか」を知るための重要な指標になる。従って、この栄養段階という概念を用いると、例えば「アニサキスが、宿主のみを食べて生きている（すなわち、宿主由来の栄養に100%依存して生活している）場合、その栄養段階は『宿主の栄養段階+1.0』になる」というように、アニサキスと宿主の関係性を理解することが可能になる。

近年では、栄養段階を高精度に解析する有機地球化学的な手段として「アミノ酸の安定窒素同位体比（ $\delta^{15}\text{N}$ 値、単位‰）を用いた栄養段階解析法」が注目されている（例えば、Chikaraishi *et al.*, 2009, 力石ら, 2011, Ohkouchi *et al.*, 2017, Fig. 3）。これは、捕食者が、餌（被食者）から得たアミノ酸を分解する際に、グルタミン酸で8.0‰、フェニルアラニンで0.4‰の同位体分別（ ^{15}N の濃縮）が観測されること（Chikaraishi *et al.*, 2007）、そして、鳥類や海棲哺乳類、特殊な条件で飼育された生物を除いた多くの生物の間で、これらの ^{15}N の濃縮が普遍的に観測される事実に基づいている（Chikaraishi *et al.*, 2014; Steffan *et al.*, 2015; McMahon and McCarthy, 2016）。

一方で、食物連鎖（food chain）の基部に存在

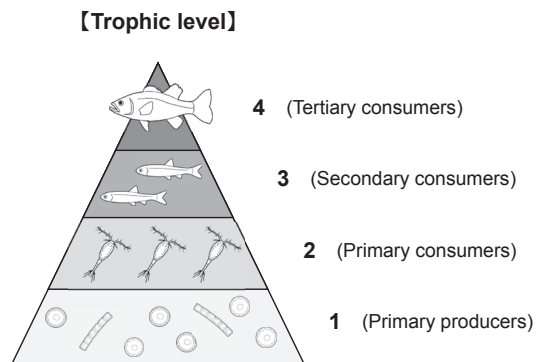


Fig. 2. Food web pyramid and trophic level.

する「一次生産者の平均の同位体比」を評価するために、捕食者のアミノ酸の安定窒素同位体比と栄養段階から、同位体分別の効果を差し引くことで見積られた「 $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッソス}}$ 値」が用いられている。この値は、理論上はどのアミノ酸からも算出できるが、一般的には、捕食における同位体分別が小さく、かつ栄養段階毎の同位体分別の大きさが比較的安定しているフェニルアラニンの同位体比を用いることが多い（例えば、Vokshoori and McCarthy, 2014）。この「フェニルアラニンから算出された $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッソス}}$ 値」を、アニサキスと宿主間で比較することにより、アニサキスの栄養・エネルギー源の寄与度（混合比）を評価できる（たとえば、アニサキスが、宿主に100%依存している場合は、両者の $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッソス}}$ 値は一致し、宿主以外の生物も食べて生きている場合は、アニサキスの $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッソス}}$ 値は、宿主とその別の生物との間の寄与率を反映した値となる）と期待される。

これらの背景から、本研究では、寄生虫であるアニサキスと、その中間宿主である魚（ホッケ、英名：Okhotsk atka mackerel, 学名：Pleurogrammus azonus）を対象として、アミノ酸の安定窒素同位体比（ $\delta^{15}\text{N}$ 値）を測定し、栄養段階、および、一次生産者の窒素安定同位体比（ $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッソス}}$ 値）を調

べた。そして得られた結果に基づいて、アニサキスは宿主の中で何をしているのか？という疑問に対する考察と、その意義に関する議論をおこなった。

2. 試料と実験

2-1. 対象生物の選定と試料採取

アニサキスの宿主となり得る生物は多種多様であるが、本研究では一魚体中に複数のアニサキスが発見される確率が高く、かつ捕獲が容易な宿主として、ホッケを選定した。2018年4月28日に幌武意漁港（北海道、積丹半島東部）にてサビキ釣りによって採取した（全長約35cmの成魚）。ホッケを解剖したところ、アニサキスの寄生は合計5つの部位（筋肉、肝臓、幽門垂、腸管（前部）、腸管（後部））で確認された。いずれの部位においても、アニサキスは渦巻き状になって寄生しており（Fig. 4）、アニサキスを取り除いた肝臓には、渦巻き状の跡が残されていた。アニサキスは内臓の外壁側に寄生しており、内壁側への寄生は確認できなかった。

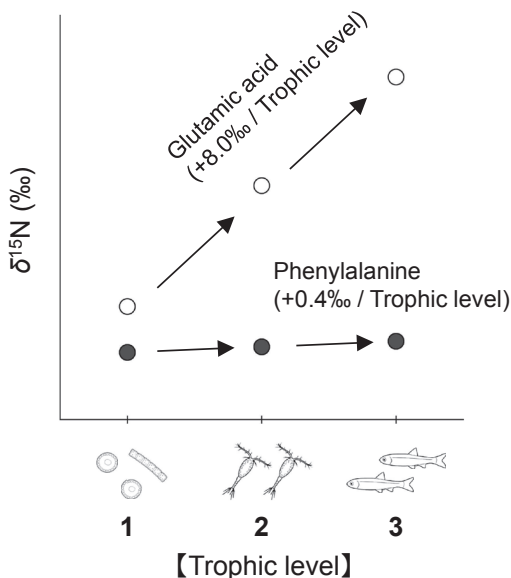


Fig. 3. Trophic level and $\delta^{15}\text{N}$ values of amino acids (glutamic acid and phenylalanine) for aquatic organisms (after Chikaraishi *et al.*, 2009).

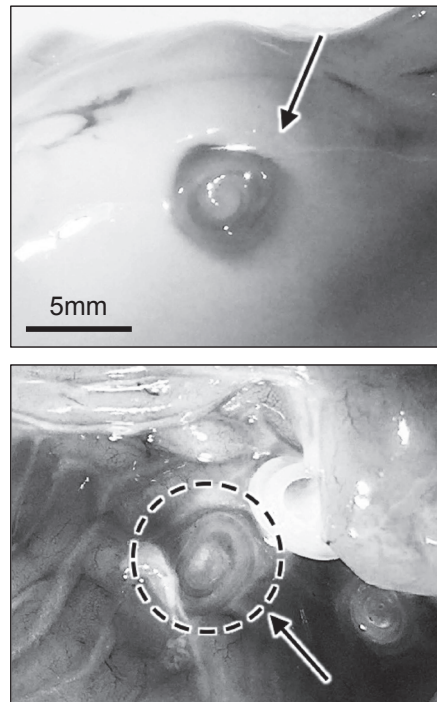


Fig. 4. Photos of *Anisakis* larvae in the host fish *Pleurogrammus azonus*.

2-2. アミノ酸の安定窒素同位体比の測定

寄生が確認された5つの部位と、各部位から分取されたアニサキスとをペア試料とした。これらの試料は、それぞれ凍結乾燥したのち、寄生部位は粉末化し、約1.0mgを分析に用いた。アニサキスは体サイズが小さい（長さ20～30mm、幅0.5～1.0mm）ため、粉末化せず、1個体をそのまま分析に用いた。アミノ酸の安定窒素同位体比を測定するために、Chikaraishi *et al.* (2009)に記載されている前処理を実施した。まず、乾燥試料を1.0mLのリアクティブバイアルに測り取り、0.3mLの12M塩酸を加えた。100℃で12時間加水分解した後、濾液を*n*-ヘキサン/ジクロロメタン (3/2, v/v) で3回洗浄し、試料中の脂質成分を除去した。その後、共沸させるためにメタノール約0.5mLを加え、窒素ガスを吹き付けることで、試料に含まれているアミノ酸を乾固した。乾固した試料に、塩化チオニル/イソプロパノール (1/4, v/v) を0.3mL加え、アミノ酸をイソプロピル化 (100℃で2時間) した。窒素ガスを吹き付け余剰の反応試薬を除去した後、塩化ピバロニル/ジクロロメタン (1/4, v/v) を0.3mL加え、アミノ酸-イソプロピルエステルをピバロニル化 (100℃で2時間) した。窒素ガスを吹き付け余剰の反応試薬を除去した後、蒸留水約0.2mLを加え、ピバロニル-アミノ酸-イソプロピルエステル誘導体を、*n*-ヘキサン/ジクロロメタン (3/2, v/v) 0.3mLで、3回抽出し、安定窒素同位体比分析用の試料とした。

アミノ酸の安定同位体比の測定は、ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計 (GC-IRMS, Agilent社製7890B GCをThermo scientific社製Delta V IRMSに接続した機器、<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/isophysiol/products/cn6/pg233.html>) で行った。導入法は温度プログラム気化法 (PTV, Gerstel社製CIS4注入口を使用) を用い、50℃で0.2分間保持し、350℃まで600℃/分で昇温した後、350℃で10分間保持した。GCの分析カラムは、Agilent社製J&W HP Ultra-2 (50m長、0.32mm径、0.52 μm膜厚) を使用し、40℃で4分間保持し、90℃まで10℃/分で昇温し、90℃から220℃まで5℃/分で昇温した後、220℃で10分間保持した。キャリアーガスの流速は、1.4ml/分の定流速 (constant flow) モードを使用した。GC-IRMSの燃焼炉の温度を

950℃、還元炉の温度を550℃に設定した。グルタミン酸、およびフェニルアラニンの安定窒素同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$ 値) の計算は、インディアナ大学および昭光サイエンスの国際リファレンス (佐藤ら, 2014) を用いて校正した。試料は、それぞれ3回測定し、平均値を得た。3回測定の標準偏差 (1σ) は、0.6‰以内であった。

2-3. 同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$ 値) の表記

安定窒素同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$ 値, 単位‰) は、以下の式 (1) で定義される (例えば, Fry, 2006, Hofs, 2009)。

$$\delta^{15}\text{N} = \left[\left(\frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{14}\text{N}} \right)_{\text{測定対象}} / \left(\frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{14}\text{N}} \right)_{\text{国際標準物質}} \right] - 1 \times 1000 \quad \dots \text{式(1)}$$

これは、測定対象に含まれる質量数15の窒素同位体 (^{15}N) と質量数14の窒素同位体 (^{14}N) の存在量比 ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) が、国際標準物質 (大気窒素, Air) の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ に対して、千分率 (‰) でどの程度異なっているのかを示す。測定対象の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ が、国際標準物質の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ と同じであれば、 $\delta^{15}\text{N}$ 値は0となり、 ^{15}N が多く含まれていれば、プラスの値、反対に ^{15}N が少なく含まれていれば、マイナスの値になる。

2-4. 栄養段階の計算

捕食者が同位体的に均一の餌を食べた場合、捕食者の持つグルタミン酸、フェニルアラニンの $\delta^{15}\text{N}$ 値は、それぞれ、

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{グルタミン酸, 捕食者}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{グルタミン酸, 餌}} + 8.0 \quad \dots \text{式(2)}$$

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン, 捕食者}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン, 餌}} + 0.4 \quad \dots \text{式(3)}$$

となる (Chikaraishi *et al.*, 2009, Fig. 3)。測定で得られたグルタミン酸とフェニルアラニンの $\delta^{15}\text{N}$ 値から、式 (4) を用いて、栄養段階を計算した。

$$\text{栄養段階} = \left[\left(\delta^{15}\text{N}_{\text{グルタミン酸}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}} - 3.4 \right) / 7.6 \right] + 1 \quad \dots \text{式(4)}$$

2-5. 食物連鎖の一次生産者の同位体比の計算

測定で得られた $\delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}}$ 値と式 (4) で求めた栄養段階から、式 (5) を用いて、食物連鎖

の基部の一次生産者のフェニルアラニンの同位体比 ($\delta^{15}\text{N}_{\text{リッソス}}$ 値) を見積もった。

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{リッソス}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}} - 0.4 \times (\text{栄養段階} - 1) \quad \dots \text{式}(5)$$

3. 結果と考察

3-1. アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値と栄養段階

ホッケの $\delta^{15}\text{N}_{\text{グルタミン酸}}$ 値は、筋肉、肝臓、幽門垂、腸管前部、腸管後部でそれぞれ、28.3‰、26.0‰、23.1‰、21.3‰、25.0‰であり、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}}$ 値は、それぞれ、5.3‰、4.0‰、2.9‰、3.1‰、5.2‰であった (Fig. 5, Table 1)。これらの $\delta^{15}\text{N}$ 値から、計算されたホッケの組織別の栄養段階は、筋肉、肝臓、幽門垂、腸管前部、腸管後部でそれぞれ、3.6、3.4、3.2、2.9、3.2であった (Fig. 5, Table 1)。5つの寄生箇所のうち、筋肉以外の内臓 (肝臓、幽門垂、腸管前部・後部) の栄養段階には大きなばらつきがあった (2.9~3.4)。これは、内臓には、ホッケが捕食した餌そのものや餌の分解物などの魚に代謝される前のアミノ酸が含まれているためと考えられる。さらに、この栄養段階のばらつきは、ホッケの各部位の $\delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}}$ 値に多様性 (2.9‰~3.6‰) があることとも一致する。

すなわち、ホッケは複数の海域で餌を得ており、ホッケの筋肉の $\delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}}$ 値が、その平均値を示す一方で、内臓の $\delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}}$ 値は、採取する直前に食べていた餌や、その餌の分解物などのアミノ酸の影響を強く受けていると考えられる。以上の理由から、本研究では、筋肉の値 ($\delta^{15}\text{N}_{\text{グルタミン酸}}$ 値 = 28.3‰、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}}$ 値 = 5.3‰、栄養段階 = 3.6) を、ホッケ本体を代表するアミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値、栄養段階として採用した。ホッケの餌は、ヨコエビなどの甲殻類やオキアミ、幼魚等と考えられているため (例えば、島崎・久新, 1982)、この栄養段階 = 3.6という結果は、ホッケの栄養段階として妥当な値であると考えられる。

アニサキスの $\delta^{15}\text{N}_{\text{グルタミン酸}}$ 値は、筋肉、肝臓、幽門垂、腸管前部、腸管後部のそれぞれの寄生部位で異なり、それぞれ、22.8‰、19.7‰、19.3‰、21.0‰、22.0‰であり、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}}$ 値は、それぞれ、4.9‰、3.8‰、3.1‰、5.3‰、4.9‰であった (Fig. 5, Table 1)。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{グルタミン酸}}$ 値と $\delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}}$ 値から、計算されたアニサキスの栄養段階は、2.6~2.9であり、宿主であるホッケの栄養段階 (3.6) よりも約0.7~1.0低い値であった (Fig. 5, Table 1)。本論文の「はじめに」でも述べたように、当初は「アニサキスが、宿主のみを食べて生きて

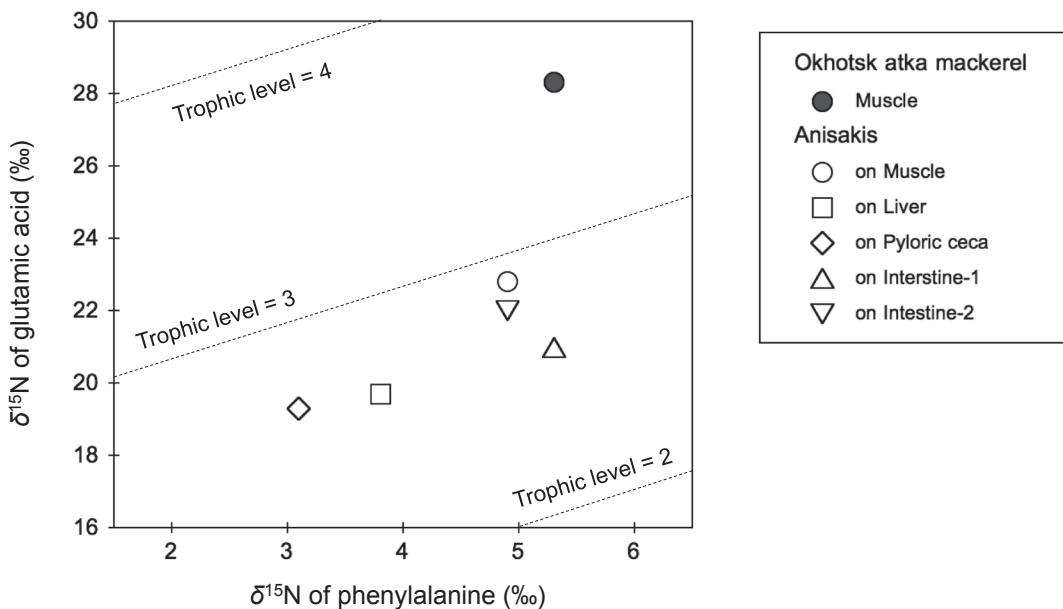


Fig. 5. Cross-plot of $\delta^{15}\text{N}$ values between glutamic acid and phenylalanine for *Anisakis* larvae (open symbol) and the host fish *Pleurogrammus azonus* (filled symbol).

Table 1. Nitrogen isotopic composition ($\delta^{15}\text{N}$) of glutamic acid and phenylalanine, trophic level and the isotopic composition of potential diet resource ($\delta^{15}\text{N}_{\text{Resource}}$) for a okhotsk atke marckerel and anisakis found on the fish organs

Sample	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		Trophic level ^a	$\delta^{15}\text{N}_{\text{Resource}}$ (‰) ^b
	Glutamic acid	Phenylalanine		
Okhotsk atke mackerel				
Muscle	28.3	5.3	3.6	4.3
Liver	26.0	4.0	3.4	3.0
Pyloric ceca	23.1	2.9	3.2	2.0
Intestine-1 (First half)	21.3	3.1	2.9	2.3
Intestine-2 (Latter half)	25.0	5.2	3.2	4.3
Anisakis				
on muscle	22.8	4.9	2.9	4.1
on liver	19.7	3.8	2.6	3.2
on pyloric ceca	19.3	3.1	2.7	2.4
on intestine-1	21.0	5.3	2.6	4.7
on intestine-2	22.0	4.9	2.8	4.2

^a Trophic level = $(\delta^{15}\text{N}_{\text{Glutamic acid}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phenylalanine}} - 3.4) / 7.6 + 1$, which is described as eq. (4) in text.

^b $\delta^{15}\text{N}_{\text{Resource}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{Phenylalanine}} - 0.4 (\text{Trophic level} - 1)$, which is described as eq. (5) in text.

いる（宿主由来の栄養に100%依存して生活している）場合、その栄養段階は『宿主の栄養段階+1.0』になる」と考えていたが、本研究の結果は、「アニサキスは宿主（ホッケ）を捕食している」という考えを、明確に否定する結果であった。

3-2. アニサキスの $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッソース}}$ 値

式 (5) によって算出されたアニサキスの $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッソース}}$ 値は2.4‰~4.7‰であり、ホッケの筋肉の $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッソース}}$ 値 (4.3‰) と比較すると、最大で1.9‰の差が観察された。この結果は、ホッケの体内にいたアニサキスは、同位体比情報（例えば、無機栄養塩の安定窒素同位体比）が異なる多様な海域で、ホッケに取り込まれていたことを示す。また、ホッケの筋肉の $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッソース}}$ 値は、アニサキスの $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッソース}}$ 値の範囲内にあり (Table 1), この結果は、現宿主であるホッケと、前宿主（ホッケにとっての餌生物、すなわちオキアミなど）の生息海域が、概ね一致している（ホッケの餌生物に、アニサキスが寄生していた）ことを示唆する。

3-3. アニサキスはホッケの体内で何をしているのか？

寄生は、生物間相互作用の1つであり、一般的には、ある生物（寄生者）が他の生物（宿主）から栄養や何らかの利益を一方的かつ持続的に得て

いる状態であると言われている。また、宿主へ寄生する形態として、①宿主の獲得した餌（栄養源）を奪う「盗み寄生 (kleptoparasitism)」, もしくは、②宿主を捕食している「捕食寄生 (predationparasitism)」のどちらかで説明されることが多い。一方で、③宿主に対して①や②のような栄養の摂取を伴わない、何か別の目的（例えば、移動の手段、住みかの確保、最終宿主への感染までの待機）で寄生していることも考えられる。これらの仮説①~③について、予想される魚（宿主）とアニサキスのアミノ酸の窒素同位体比の関係を、Fig. 6 に示す。①の「盗み寄生」であった場合には、魚とアニサキスで餌（栄養源）が共通であるため、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{グルタミン酸}}$ 値と $\delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}}$ 値、及び栄養段階は、魚とアニサキスとの間でほぼ一致すると考えられる (Fig. 6 Case 1)。②の「捕食寄生」であった場合には、アニサキスは宿主の魚を捕食することで栄養を得ているため、アニサキスの $\delta^{15}\text{N}_{\text{グルタミン酸}}$ 値と $\delta^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}}$ 値は、魚が持つ値と比べて、それぞれ8.0‰, 0.4‰ずつ上昇し、栄養段階としては約1段階分高くなると考えられる (Fig. 6 Case 2)。一方で、③「別の目的」があった場合には、アミノ酸の安定窒素同位体比および栄養段階は①とも②とも異なる傾向を持つと考えられる (Fig. 6 Case 3)。本研究で得たアミノ酸の安定窒素同位体比分析の結果は、アニサキスがホッケに

対して、①の「盗み寄生」でも②の「捕食寄生」でもなく、③の「何か別の目的」を持って寄生していることを強く示した (Fig. 5, Table 1)。

それでは、アニサキスはホッケの体内で何をしているのだろうか？栄養段階のみに着目すると、アニサキスがホッケに捕食されているようにも見えるが、アニサキスはホッケの内臓の外壁側から見つかるため (Fig. 4)、ホッケがアニサキスを捕食している、もしくは、アニサキスの作ったタンパク質 (アミノ酸) を獲得していることは考えにくい。また、圧痕の存在は、アニサキスがホッケの体内で長期間に渡り活動していないことを示唆しており、アニサキスが「栄養の摂取」を主な目的とした寄生 (盗み寄生・捕食寄生) を行っていない、という同位体比分析の結果と整合的である。これらの結果から考えられる、アニサキスが魚に寄生する有力な仮説として、我々は「アニサキスにとってホッケは『待機宿主』であり、アニサキスはホッケの体内で休眠している、すなわち、盗み寄生でも、捕食寄生でもない『待機寄生』と定義できるような寄生である」と考えている。休眠は、エネルギー代謝を生命が維持できる限界にまで抑えている状態である。この場合アニサキスは、ホッケに寄生して以降、アミノ酸をエネルギー源として分解する必要が無い (従って、安定同位体比も変化しない) ため、ホッケの前宿主に寄生していた時の情報を保持している可能性が高い。本研究で得られたホッケの栄養段階 (3.6) から推定されるホッケの餌の栄養段階は2.6前後 (植物プランクトンや動物プランクトンを食べている雑食者) であり、この値は、アニサキスの前宿主がオキアミなどの動物プランクトンや甲殻類の幼生である (Fig. 1) という知見と整合的である。また、本研究で得られたアニサキスの栄養段階 (2.6~2.9) は、アニサキスが前宿主 (オキアミ等、栄養段階2.6前後) において、宿主の獲得した餌 (栄養源) を奪う①「盗み寄生」を行っていたためであると考えると、うまく説明することができるだろう。

3-4. 回遊性魚類を待機宿主にする生態学的な意義

「はじめに」で述べたように、アニサキスは、

幼生期にオキアミや魚を中間宿主として成長し、成体は海棲哺乳類を終宿主として、有性生殖を行うと考えられてきた (例えば, Nagasawa, 2013)。しかし、本研究の結果からすると「ホッケの体内において、アニサキスは成長せずに休眠している」と考えられ、アニサキスにとってホッケは、「待機宿主」であると考えるのが相応しいだろう (Fig. 6 Case 3)。ホッケは長距離を回遊する回遊性魚類であり、様々な地域の甲殻類を捕食していくため、異なる地域の多様な遺伝子を持ったアニサキスがホッケの体内に集められることになる。ホッケを待機宿主として利用することは、感染機会の拡大という目的に対して有効な選択であり、さらに終宿主内での有性生殖における遺伝的多様性の保持につながる。このように、アニサキスは、自身の寄生サイクルに待機宿主としてホッケなどの回遊性魚類を取り入れることで、終宿主への移動手段と遺伝的多様性を確保していると考えられる。

一方で、アニサキスが盗み寄生や捕食寄生による栄養の摂取を行わないことには、どのような理由があるのだろうか。本研究の結果からは、アニサキスが宿主から栄養を摂取していない (もしくは、アニサキスの同位体比を変化させない程度のごく少量しか奪わない) ことが明らかである。従って、アニサキスは、自身が成長することよりも宿主の成長・代謝を妨げないことを目的としている

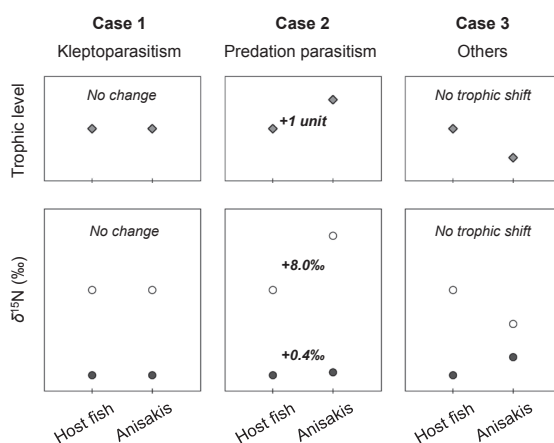


Fig. 6. Three hypothesis for the relationship on the $\delta^{15}\text{N}$ values of glutamic acids (open circle) and phenylalanine (filled circle) and trophic level (filled diamond) between *Anisakis* larvae and host fish.

可能性が高いと考えられる。アニサキスが宿主内で盗み寄生や捕食寄生により栄養を多量に摂取してしまうと、宿主が本来摂取できる栄養が不足することになり、それは、宿主の代謝・成長率を低下させる可能性が高い。そして、栄養が不十分な宿主は遊泳するためのエネルギーを十分に補えなくなり、待機宿主にとっての「移手段」としての機能を十分に果たせなくなってしまうと考えられる。まして、今回のホッケのように多数のアニサキスを取り込む魚類では、体内の寄生生物の全てが宿主から多量の栄養を摂取してしまうと、その影響は絶大であり、魚が小さい場合は宿主が生命の危機にさらされる危険性さえあると考えられる。すなわち、アニサキスが宿主から栄養を多量に奪ってしまうとそれが待機宿主の移動効率を低下させることにつながり、結果としてアニサキスの寄生サイクルがうまく機能しなくなる可能性がある。

さらに魚の場合、一般的に、体サイズと死亡率との間に負の相関関係が存在する（例えば、Jørgensen and Holt, 2013）。アニサキスが宿主の魚の成長を妨げてしまうことは、終宿主へたどり着く前に何らかの要因（最終宿主以外に捕食される可能性も含む）で、宿主ごと死亡する確率を高めてしまうことになる。また、アニサキスが宿主として利用する回遊性魚類や海棲哺乳類は、それぞれ異なるリズム（phenology）で活動するため、回遊性魚類と海棲哺乳類とが、捕食-被食関係で結ばれるタイミングは、一年のなかでも一定の時期に限られていると推測され、アニサキスの寄生サイクルもこのタイミングに合わせて行われると考えることができる。すなわち、アニサキスの寄生により、待機宿主の代謝・成長効率が低下してしまうと、有性生殖の時期までに終宿主への到達できないリスクが著しく高くなると予想され、アニサキスはこれを避けるために、宿主から栄養を奪うことで成長するのではなく、宿主にエネルギー的な損失を極力与えない「休眠」という戦略をとることで終宿主への移動を最優先していると考えられる。

4. まとめ

本研究では、魚介類の寄生虫として有名なアニサキスと、その宿主であるホッケを対象として、アミノ酸の安定窒素同位体比（ $\delta^{15}\text{N}$ 値）を測定し、栄養段階と、一次生産者の窒素安定同位体比（ $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッス}}$ 値）を調べた。その結果、アニサキスの栄養段階は2.6~2.9であり、ホッケの栄養段階（3.6）よりも、0.7~1.0低いことがわかった。また、アニサキスの $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッス}}$ 値は、2.4%~4.7%の範囲にあり、アニサキスとホッケ筋肉の $\delta^{15}\text{N}_{\text{リッス}}$ 値（4.3%）と比較すると最大で1.9%の差があることがわかった。以上の結果から、アニサキスによるホッケへの寄生は

1. 宿主が獲得した餌（栄養源）を奪う「盗み寄生」ではない
2. 宿主を捕食している「捕食寄生」ではない
3. 宿主からの栄養の摂取を伴わずに休眠している「待機寄生」と定義できるような寄生であると考えられた。この待機寄生は、宿主から栄養を摂取せず、宿主にエネルギー的な損失を極力与えないことで、最終宿主への感染機会の拡大と、終宿主内での有性生殖における遺伝的多様性を最大化するための戦略であると考えられる。

このように、本研究では、アニサキスとホッケのアミノ酸の安定窒素同位体比を比較することで、アニサキスの「アニサキスは宿主の中で何をしているのか？」という疑問に対する答えと、その意義に関する新しい説明を提案することができた。また、アミノ酸の安定同位体比の解析が、従来多くの研究で使われてきた「食物連鎖における生物の栄養段階解析」への利用に加えて、寄生や共生を伴う生物の生活史や栄養動態、生存戦略など、従来の生物学的アプローチからは限界があった課題に対して、新しい展開をもたらす高い可能性を示すことができた。

5. 今後の展開

本研究によって、アニサキスという寄生虫が待機宿主としてホッケを利用する可能性が提案された。このような寄生形態は、ホッケに近い栄養段階（3.6前後）を持つ他の魚類（待機宿主）の体内においても同様に発見される可能性が高い。宿

主体内での成長を伴わない『待機寄生』と定義できるような「寄生」が存在することを証明するためには、前宿主である「オキアミや甲殻類」から「ホッケに寄生している個体と同サイズのアニサキス」を発見することが求められる。しかし、現時点で、オキアミや甲殻類に対するアニサキスの寄生は発見例が非常に少なく、また、そのようなサイズのアニサキスの報告はされていない。今後、アニサキスの前宿主（感染源）を特定するためには、ホッケを含む待機宿主候補の生物を対象とした食性解析と、そこに寄生するアニサキスの同位体比分析を併せて行う必要があるだろう。また、海洋における無機栄養塩（硝酸イオンやアンモニウムイオン）の $\delta^{15}\text{N}$ 値の空間分布や、その季節変動が明らかになれば、アニサキスやその宿主が、どの海域に生息しているのかを知ることでもできるであろう。

このように、今まで可視化することが難しかった「寄生生物の生態」を、アミノ酸の安定窒素同位体比の分析によって数値化し、議論および評価可能であることが確認された。今後は、アニサキスと宿主との間の寄生関係のみならず、陸水域を含む多様な生物を対象に、物質やエネルギーの効率的な移動や利用、宿主と寄生者それぞれの役割、生物進化の様子を明らかにするための研究が進展していくと期待され、すでにいくつかの研究が行われはじめている（Takahashi *et al.*, 2012, Takizawa *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2018; Shih *et al.*, 2019）。現在、地球生物圏では、多くの生物が、他種および同種間で寄生・共生関係を持ちながら生きている。また「微生物による葉緑体やミトコンドリアの獲得、細胞内共生」といった一部の寄生・共生関係は、生物進化にとって重要な契機を与えてきたと言われている（例えば、Delwiche, 1999, 瀧下ら, 2013）。例えば、現在のシアノバクテリアと植物プランクトンの栄養段階は、ともに1（一次生産者）である。しかし、太古の海で、シアノバクテリアが真核生物により捕食されていた時、または、細胞内共生をしていた時に、シアノバクテリアと真核生物の栄養段階は、はたして、それぞれ、1と2であったのだろうか？それとも、細胞内共生を始めた時に、両者とも1になるのだろうか？このような疑問につ

いて、寄生・共生の関係にある生物のアミノ酸の安定窒素同位体比分析が、ひとつの答えを出す可能性がある。

謝 辞

本稿の内容は、シリコン工業会（Silicon Industry Association of Japan）からの寄付金で実施した教育・研究成果の一部を取りまとめたものである。国立研究開発法人海洋研究開発機構・生物地球化学プログラム（JAMSTEC）の小川奈々子博士と、北海道大学・理学部の沢田健准教授には、査読を通して、本稿の質を高めるうえで、ポジティブかつ極めて的確なアドバイスを頂きました。学部の学生が研究活動を行うにあたり、北海道大学の低温科学研究所と水産学部には、様々な便宜を頂きました。本研究を進めるにあたり、低温科学研究所の同位体物質循環分野（Iso-PEG group）のメンバー（Bohyung Choi博士、Rong Fan博士、Daochao Xing博士後期課程学生）には、様々なアドバイスを、友田理恵分野秘書にはたくさんのサポートをいただきました。記して厚く感謝致します。

引用文献

- Audicana M. T., Ansotegui I.J., de Corres L. F. and Kennedy M.W. (2002) *Anisakis simplex*: dangerous — dead and alive? *Trends Parasitol.* 18, 20-25.
- Chikaraishi Y., Kashiyama Y., Ogawa N.O., Kitazato H. and Ohkouchi N. (2007) Metabolic control of nitrogen isotope composition of amino acids in macroalgae and gastropods: implications for aquatic food web studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 342, 85-90
- Chikaraishi Y., Ogawa N.O., Kashiyama Y., Takano Y., Suga H., Tomitani A., Miyashita H., Kitazato H. and Ohkouchi N. (2009) Determination of aquatic food web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnol. Oceanogr.: Meth.* 7, 740-750.
- 方石嘉人・高野淑識・小川奈々子・佐々木瑤子・土屋正史・大河内直彦（2011）アミノ酸の窒素同位体比を用いた生物の栄養段階の解析：陸上

- 環境を含めた生物生態系の解明に向けて. *Res. Org. Geochem.* 27 3-11.
- Chikaraishi Y., Steffan S.A., Ogawa N.O., Ishikawa F.I., Sasaki Y., Tsuchiya M. and Ohkouchi N. (2014) High-resolution food webs based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Ecol. Evol.* 4, 2423-2449.
- Choi B., Takizawa Y. and Chikaraishi Y. (2018) Compression of trophic discrimination in $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ within amino acids for herbivorous gastropods. *Res. Org. Geochem* 34, 29-35.
- Delwiche C.F. (1999) Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. *Ame. Natura.* 154, S164-S177.
- Fry B. (2006) *Stable Isotope Ecology*, Springer
- Hofs J. (2009) *Stable Isotope Geochemistry*, 6th Edition, Springer.
- Ivanović J., Baltić M.Ž., Bošković M., Kilibarada N., Dokmanović M., Marković R., Janjić J. and Baltić B. (2017) Anisakis allergy in human. *Trends Food Sci. Technol.* 59, 25-29.
- Jørgensen C. and Holt R.E. (2013) Natural mortality: Its ecology, how it shapes fish life histories, and why it may be increased by fishing. *J. Sea Res.* 75, 8-18.
- McMahon K.W. and McCarthy M.D. (2016) Embracing variability in amino acid $\delta^{15}\text{N}$ fractionation: mechanisms, implications, and applications for trophic ecology. *Ecosphere* 7, e01511.
- Nagasawa K. (2013) The life cycle of *Anisakis simplex*: A review. In *Intestinal Anisakiasis in Japan* (eds: Ishikura H. and Kikuchi K.) pp.31-40.
- Ohkouchi N., Chikaraishi Y., Close H.G., Fry B., Larsen T., Madigan D.J., McCarthy M.D., McMahon K.W., Nagata T., Naito Y.I., Ogawa N.O., Popp B.N., Steffan S.A., Takano Y., Tayasu I., Wyatt A.S.J., Yamaguchi Y.T. and Yokoyama Y. (2017) Advances in the application of amino acid nitrogen isotopic analysis in ecological and biogeochemical studies. *Org. Geochem.*, 113, 150-174.
- 佐藤理恵・川西英彦・Arndt Schimmelmann・鈴木彌生子・力石嘉人 (2014) 窒素安定同位体比測定のためのアミノ酸標準物質の開発. *分析化学* 63, 390-403.
- Shih J.L., Selph K.E., Wall C.B., Wallsgrove N.J., Lesser M.P. and Popp. B.N. (2019) Trophic ecology of the tropical pacific sponge *Mycale grandis* inferred from amino acid compound-specific isotopic analyses. *Microb. Ecol.* in press.
- 島崎健二・久新健一郎 (1982) オホーツク海に出現するホッケ幼魚群. *北大水産業報* 33, 229-239.
- Steffan S.A., Chikaraishi Y., Currie C.R., Horn H., Gaines-Day H.R., Pauli J.N., Zalapa J.E. and N. Ohkouchi (2015) Microbes are trophic analogs of animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 15119-15124.
- Takahashi Y., Sasaki Y., Chikaraishi Y., Tsuchiya M., Watanabe H., Ashida T., Maruyama T. and Fujikura K. (2012) Does the symbiotic scale-worm feed on the host mussel in deep-sea vent fields? *Res. Org. Geochem.* 28, 23-26.
- 瀧下清貴・矢吹彬憲・力石嘉人・大河内直彦 (2013) 酸素の無い環境に生息する真核生物の細胞膜および食作用にまつわるエトセトラ. *細胞工学* 32, 1286-1288.
- Takizawa Y., Dharampal P.S. Steffan A.S. Takano Y., Naohiko O. and Chikaraishi Y. (2017). Intra-trophic isotopic discrimination of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ for amino acids in autotrophs: implication for nitrogen dynamics in ecological studies. *Ecol. Evol.* 7, 2916-2924.
- Vokhshoori N.L. and McCarthy M.D. (2014) Compound-specific $\delta^{15}\text{N}$ amino acid measurements in littoral mussels in the California upwelling ecosystem: a new approach to generating baseline $\delta^{15}\text{N}$ isoscapes for coastal ecosystems. *PLoS ONE* 9, e98087.