

## 【研究報告】

異物混入時期特定のための基礎研究  
—チャバネゴキブリ筋組織の経過時間に伴う変化—

Histological change of cockroach muscle cells with time elapsing after death:

A basic study for specifying time of insect contamination

小泉智子\*、矢矧束穂\*\*、長島孝行\*\*\*

Tomoko KOIZUMI\*, Tsukaho YAHAGI\*\* and Takayuki NAGASHIMA\*\*\*

【要約】昆虫の組織切片を作成して、死後の時間経過に伴う細胞の変化を組織学的な手法で観察した。その結果、昆虫の筋肉組織は、死亡した時点から、かなり短時間で変化が生じることが認められた。また、加熱やエタノール浸漬などの異なる条件の下で供試した場合も同様に変化が認められたが、その変化の仕方には、相違が見られた。従来法のカタラーゼ反応を利用した方法と比較すると、本研究で行った昆虫の細胞の変化を組織学的に観察する方法の方が、製造物に混入した時期の特定をより詳細に推定できるものと考えられた。

キーワード：異物混入，チャバネゴキブリ，筋組織，経時的変化

## 1. はじめに

食品等の製造物への混入異物のうち、昆虫類が占める割合はかなり高く<sup>1) 2)</sup>、当センターへの混入種の同定、侵入経路、侵入時期の特定依頼も数多く寄せられている<sup>3)</sup>。昆虫類の混入の要因を検討する上で、重要視されるのは侵入経路、侵入場所、侵入時期などを特定することであり、これまでにカタラーゼ活性試験<sup>4)</sup>や、円偏光二色性(CD)法<sup>5)</sup>など様々な方法の利用および検討が行われてきた。特に、カタラーゼ活性を利用した判定方法については、様々な検討が行われている<sup>6) 7) 8)</sup>。しかし、昆虫種やその体のサイズ、非加熱であっても試薬に浸漬されていた条件の違いによって活性の反応が異なってくる<sup>9)</sup>ことが知られている。さらに、カビや微生物の発生する条件があれば、一度失活した虫体からも再び活性がみられること、低pHやエタノール浸漬条件下では、加熱の有無に関係なく失活することなどの問題点が指摘されている<sup>6) 7)</sup>。

本実験では、これまでに様々な検討が行われてきた加熱またはエタノール浸漬などの異なる条件下において、死後の時間経過に伴う細胞の変化を観察し、マイクロトームを用いた組織学的な方法で観察することによって、害虫由来の異物混入時期特定手段の一つとしての応用の可能性を検討した。

## 2. 材料と方法

## 2.1 供試動物

チャバネゴキブリ *Blattella germanica* は製造物への混入率も高く、多量の個体の確保が容易であるため供試した。ここでは、(財)日本環境衛生センターにおいて累代飼育している渡田コロニーの雄成虫を用いた。

## 2.2 試験方法

## 2.2.1 昆虫死後の細胞および組織の経時的変化

虫体全体を供試した場合、個体間の死亡時間に差異が出る<sup>10)</sup>ことが懸念されるため、虫体生体から後脚腿節部を切り離した時点<sup>11)</sup>を死亡時とみなして用いた。ジエチルエーテルで麻酔した供試虫の後脚腿節を解剖用鉗で切断した。切断したサンプルはすべて、室温約25℃、湿度0~30%RHに保た

\* (財) 日本環境衛生センター東日本支局  
環境生物部

Dept. of Environmental Biology, East Branch, Jesc

\*\* (財) 神奈川科学技術アカデミー

Kanagawa Academy of Science and Technology

\*\*\* 東京農業大学農学部農学科昆虫機能開発研究室  
Tokyo University of Agriculture, Laboratory of  
Insect Technology

れている室内のシャーレ上に開放した状態で置き、切断した直後のものを対照として、以降、15、30および60分経過時点で、2.0%paraformaldehyde+2.5%glutaraldehydeに投入して一次固定した。その後0.1M Cacodylate Bufferで数回洗浄後、1.0%のOsO<sub>4</sub>に投入して二次固定した。固定は、間欠吸引法を用い、その後エタノールで段階的に50%から100%まで脱水し、QY-1に置換後、Epon812に包埋した。包埋したサンプルは、ウルトラミクロトーム (Reichert OmU3) で、筋線維を横断するようにして、0.75 μmの切片を作製した。切片をAzur-B溶液で染色後、光学顕微鏡 (OLYMPUS AX-70TRF) にて観察を行い、コントロールの横断面と比較した。

### 2.2.2 異なる条件下における細胞および組織の変化

1) および2) の条件における細胞および組織の変化を光学顕微鏡で観察した。

- 1) 加熱: 100℃の水に5, 10, 20, 30分間浸漬
- 2) エタノールに浸漬: 25%, 50%, 80%, 100%エタノールに24時間浸漬 (室温約25℃)

虫体全体をそれぞれの条件に浸漬すると、虫体が表面に浮いてしまい、設定した条件にさらされていない部分が出てしまうことがある。これによって、条件にさらされた時間に差異が生じる可能性があるため、供試虫の処理は試験1と同様として組織切片を作成した後、コントロールと比較した。

それぞれの処理終了後、試験1と同様の方法で固定した後、Epon812に包埋し、切片を作製して光学顕微鏡で観察し、コントロールの横断面と比較した。

### 2.2.3 カタラーゼ活性を用いた方法との比較

2.2.2と同様の条件下においた供試虫後脚腿節1本を3.0%過酸化水素水10mLに入れ、時間経過に伴う発泡の有無を観察した。判定は、目視にて行い、発泡が見られた場合には+、見られなかった場合には-として記録した。その後、同条件で処理した2.2の細胞や組織の切片と比較した。

## 3.1 昆虫死後の細胞および組織の経時的変化

切断直後 (コントロール) のチャバネゴキブリ後脚腿節の横断切片では、腱を挟んで次の節を動かすための2種類の筋肉 (levator muscle, depresser muscle) が観察された (図1-a)。これらの筋肉はいずれも外骨格のクチクラ層に密着し、その内部を満たしていた。筋線維は多数の fibril (筋原繊維) で構成されており、筋線維鞘付辺には核が観察された。また、筋線維内部には筋形質が観察された (図2-a)。

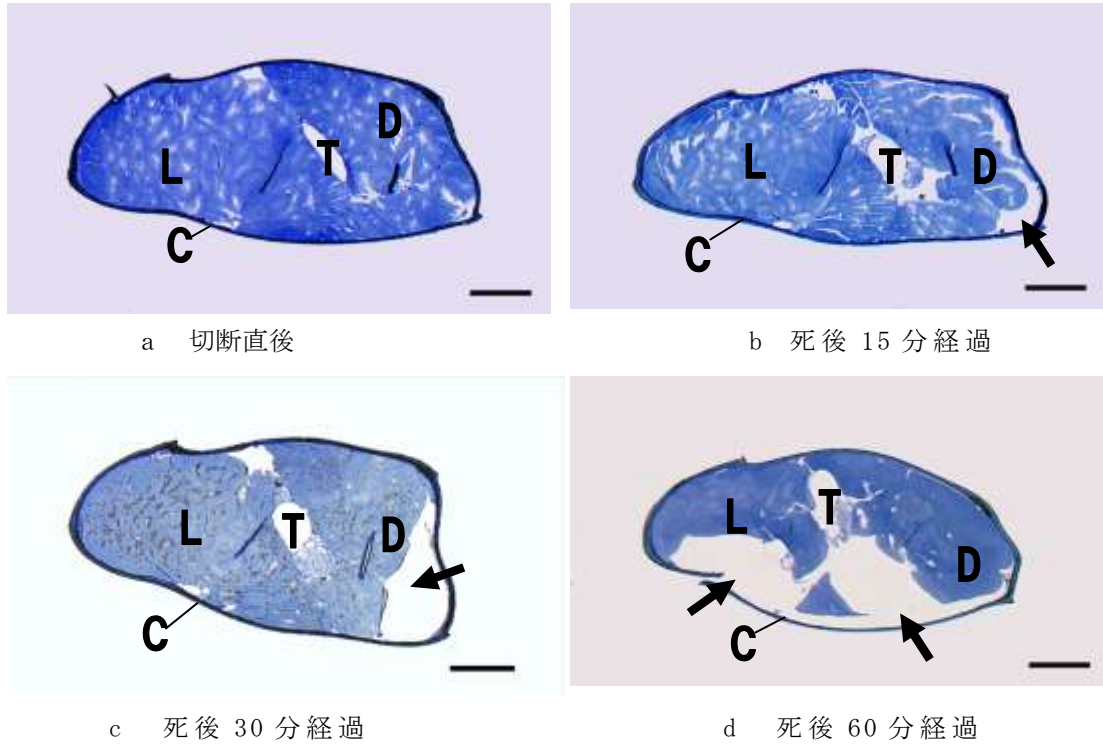
後脚切断後15分経過時点では、それぞれの筋肉の収縮が始まり、筋線維間に間隙が生じ始め、一部は外骨格のクチクラ層より剥離していた (図1-b)。しかし、筋線維の fibril および筋線維鞘付近の核はこの時点でまだ観察することができた (図2-b)。

後脚切断後30分経過時点では、筋肉の収縮はさらに進み、筋線維鞘間の間隙がさらに広がった (図1-c)。また、筋線維付近では明瞭に観察できる核の数が減少し、筋形質はさらに縮小した (図2-c)。

後脚切断後60分経過時点では、筋線維はさらに収縮して外骨格の一方に偏り、筋線維においても核、fibril がほとんど観察されなくなり、筋形質が縮小していた (図1-d, 2-d)。

以上のことから、昆虫の組織は切断後、かなり短時間で筋肉組織に形態的变化が表れることが明らかになった。特に筋形質では、15分後にはすでに縮小が始まっており、核やfibrilにおいては切断後15分後には顕著な変化は見られなかったが、30分後には変化が生じ始め、60分経過後にはほとんど認められなくなる事が明らかになった。

## 3. 結果と考察



a 切断直後

b 死後 15 分経過

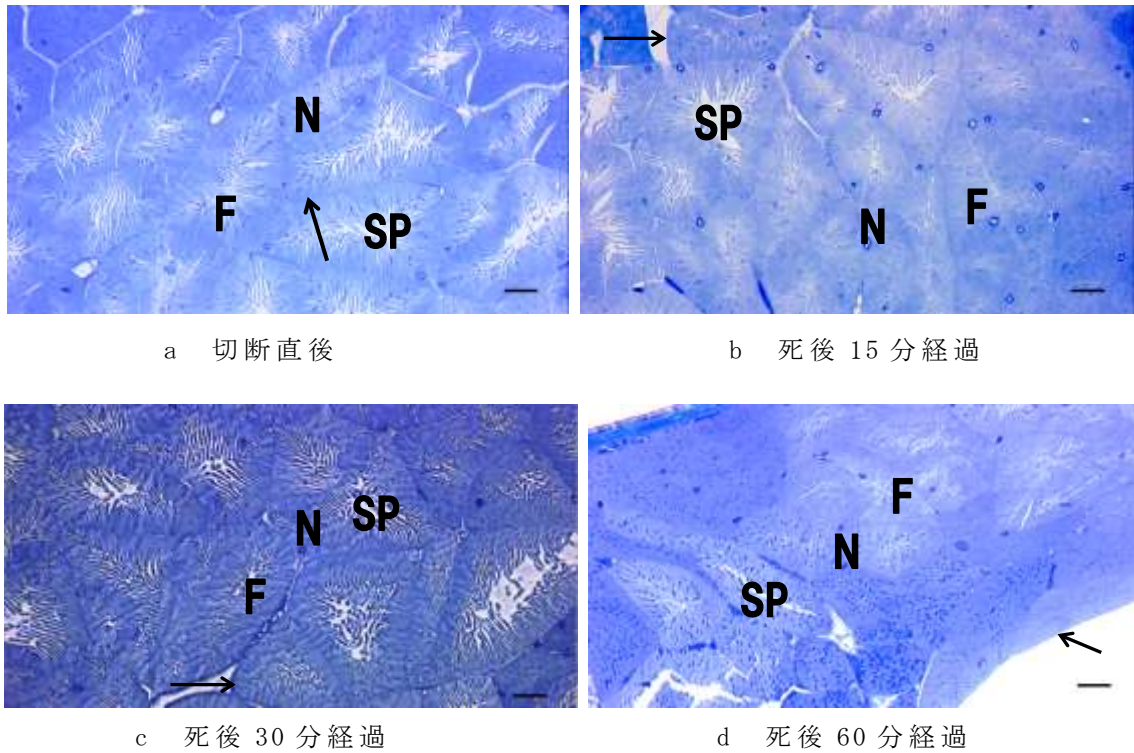
c 死後 30 分経過

d 死後 60 分経過

図 1 昆虫死後の筋細胞・組織の経時的変化 scale=100 μ m

L : levator muscle D : depressor muscle

T : tendon(腱) C : cuticula(外骨格) → : 間隙



a 切断直後

b 死後 15 分経過

c 死後 30 分経過

d 死後 60 分経過

図 2 昆虫死後の筋細胞・組織の経時的変化 2 scale=10 μ m

N : nucleus(核) SP : 筋形質 F : fibril(筋線維) → : sarcolemma(筋線維鞘)

### 3.2異なる条件下における細胞および組織の変化

#### 3.2.1 加熱

100℃の水に5分間浸漬した場合、筋線維は収縮して筋線維鞘に間隙が生じ、外骨格のクチクラ層より全体的に剥離した(図3-a)。また、核は不明瞭ながら観察できたが、fibrilおよび筋形質は全く観察することができなかった。また、腱の位置も大きく変化した(図4-a)。加熱によって筋肉組織に生じた変化は、試験1で生じた変化と比較すると、筋形質およびfibrilの著しい収縮が見られた。

100℃の水で10分間加熱すると、5分間加熱した場合と同様に筋線維が収縮して筋線維鞘に間隙が生じた(図3-b)。核はかなり不明瞭となり、観察できる数は少なくなり、fibrilおよび筋形質は観察されなかった(図4-b)。20分および30分加熱した場合も、5および10分間加熱した場合と同様に、筋線維が収縮し、外骨格から剥離していた(図3-c, d)。また、核が不明瞭ながらも観察できたのは加熱後20分までであった(図4-c)。

以上のことから、100℃の水で加熱した場合には、筋線維の収縮により、外骨格から全体的に剥離し、筋線維鞘間に間隙が見られた。また、核は加熱時間に伴って明瞭に観察されなくなり、筋形質およびfibrilは全く確認できなくなるものと考えられた。

すなわち、核以外は加熱時間の長短による変化はほとんど無かったことから、高温で加熱された場合

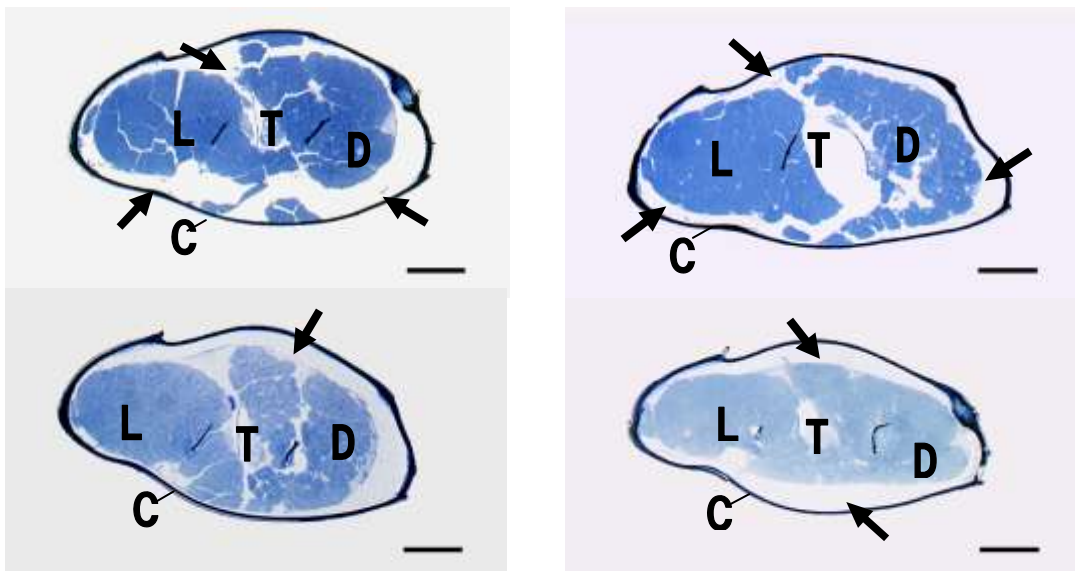
は、その時間が短時間であっても、細胞に著しい変化が表れるものと考えられた。また、試験1では、筋肉全体が外骨格に付着するように収縮したのに対し、加熱した場合には、筋線維鞘それぞれが収縮して、外骨格から中心に固まるような状態になることが明らかになった。

#### 3.2.2 エタノール浸漬

各濃度のエタノールに24時間浸漬した場合も、試験1, 2と同様に筋線維鞘の収縮が観察され、筋線維鞘間に間隙が生じ、全体的に外骨格から剥離していた(図5)。

25%, 50%, 80%エタノールに24時間浸漬した場合は加熱した場合と異なり、核、筋形質およびfibrilを観察することができた(図6)。しかし、筋線維の場合は、浸漬したエタノールの濃度が上がるにつれて収縮が進み、100%エタノールの場合、他の濃度に浸漬した場合と比べると、収縮がかなり激しかった。このような収縮は、エタノールの脱水作用によるもので、それに伴って筋線維鞘間に間隙が生じたものと考えられた。

以上のことから、エタノールに浸漬した場合も、試験1および試験2-1)と同様に筋線維の収縮が観察されたが、その収縮の仕方には違いがあることがわかった。



c 100℃熱湯に20分間浸漬

d 100℃熱湯に30分間浸漬

図3 加熱条件下での筋細胞・組織の変化 scale=100 μm

L: levator muscle D: depressor muscle T: tendon (腱)

C: cuticula (外骨格) →: 間隙

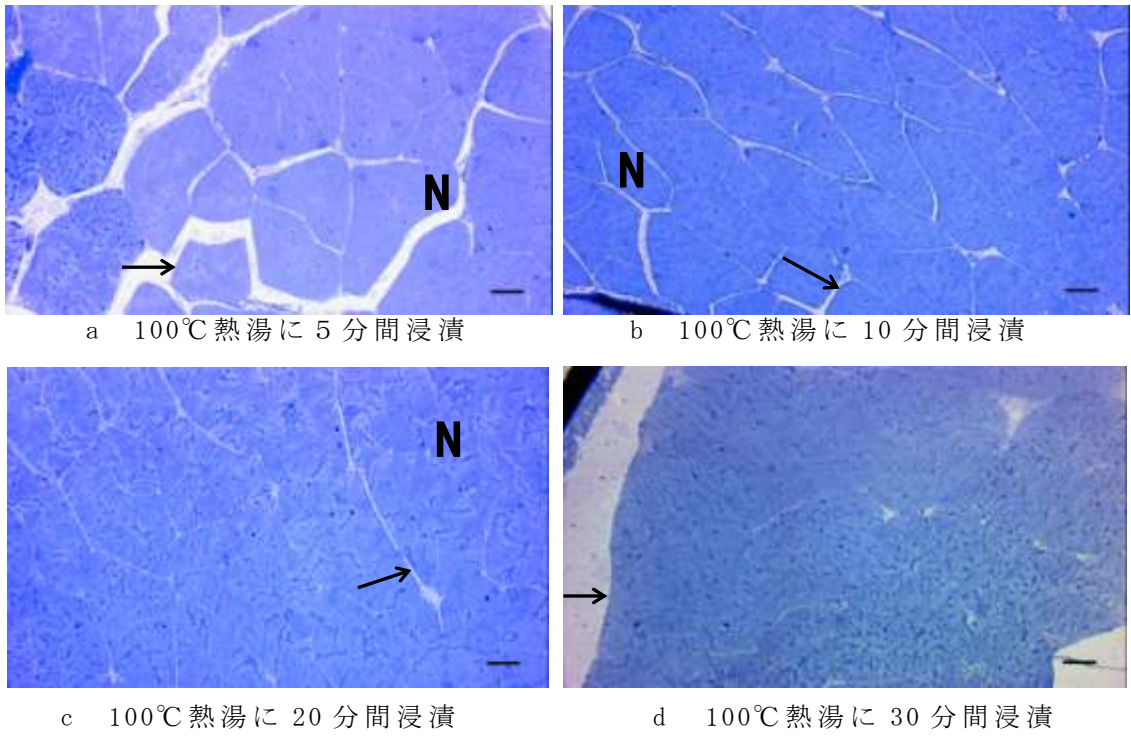


図4 加熱条件下での筋細胞・組織の変化 scale=10 $\mu$ m

N: nucleus(核) →: sarcolemma(筋線維鞘)

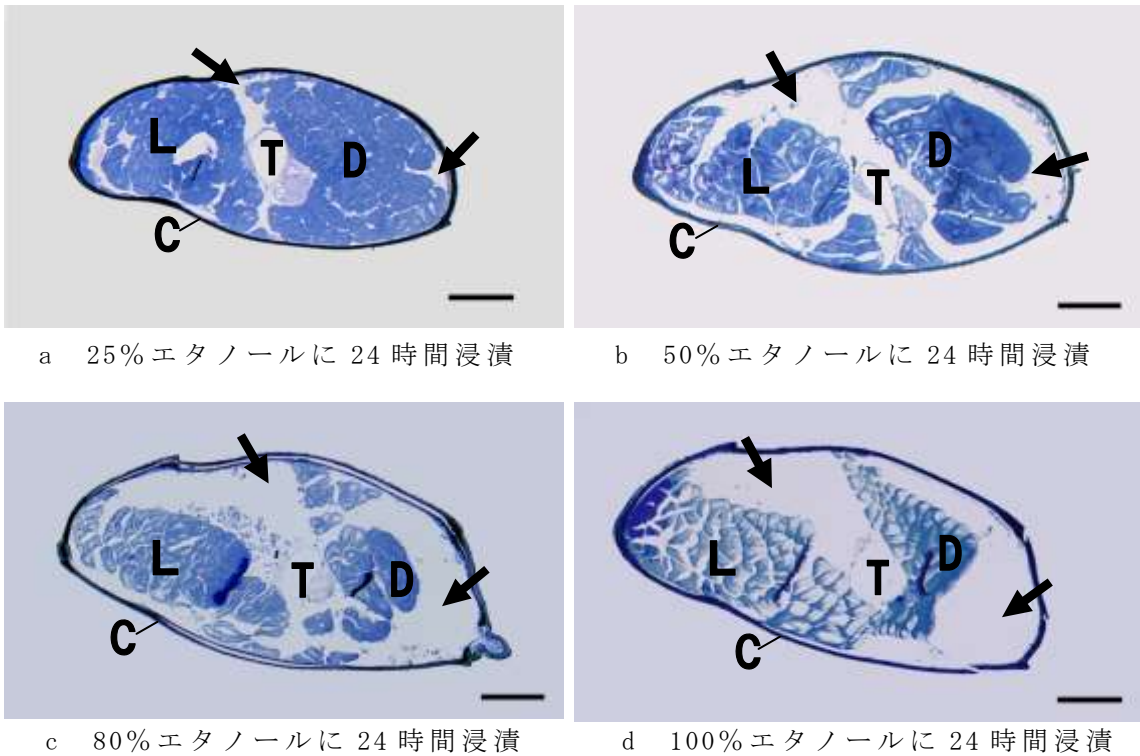


図5 エタノール浸漬条件下での筋細胞・組織の変化

L: levator muscle D: depresser muscle →: 間隙  
T: tendon(腱) C: cuticula(外骨格) scale=100 $\mu$ m

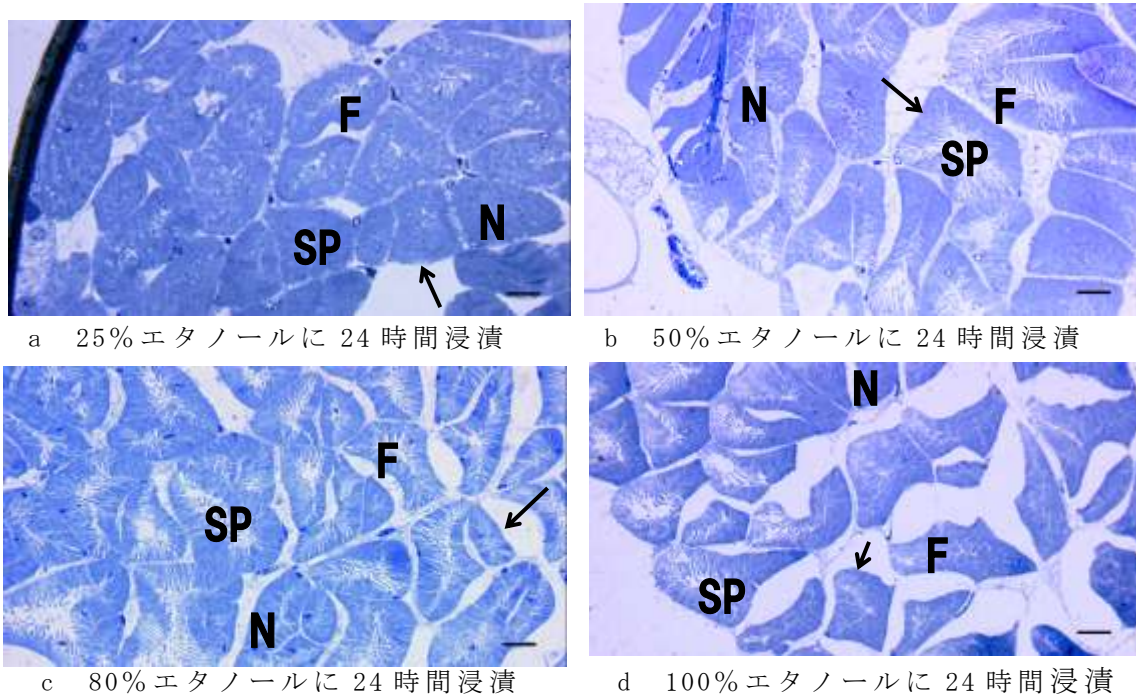


図 6 エタノール浸漬条件下での筋細胞・組織の変化 scale=10 μ m

N : nucleus (核) SP : sarcoplasm (筋形質)  
 F : fibril (筋線維) → : sarcolemma (筋線維鞘)

3.3 カタラーゼ反応との比較

3.2 と同じ条件に供試したサンプルについて、カタラーゼ活性を調べた結果を、表 1 に示した。すなわち、加熱処理をしたものの反応は全てマイナス(-)で、加熱時間の長短による変化は認められなかった。

また、エタノールに浸漬した場合でも反応は全てプラス (+) で、供した条件の違いによる差は認められなかった。

表-1 各条件下におけるカタラーゼ反応結果

条件	反復	各観察時間経過に伴う反応			
		3	10	20	30 (分)
加熱100℃ 5分	I	-	-	-	-
	II	-	-	-	-
	III	-	-	-	-
加熱100℃ 10分	I	-	-	-	-
	II	-	-	-	-
	III	-	-	-	-
加熱100℃ 20分	I	-	-	-	-
	II	-	-	-	-
	III	-	-	-	-
加熱100℃ 30分	I	-	-	-	-
	II	-	-	-	-
	III	-	-	-	-
エタノール25% 24H浸漬	I	+	+	+	+
	II	+	+	+	+
	III	+	+	+	+
エタノール50% 25H浸漬	I	+	+	+	+
	II	+	+	+	+
	III	+	+	+	+
エタノール80% 26H浸漬	I	+	+	+	+
	II	+	+	+	+
	III	+	+	+	+
エタノール100% 27H浸漬	I	+	+	+	+
	II	+	+	+	+
	III	+	+	+	+
無処理	I	+	+	+	+
	II	+	+	+	+
	III	+	+	+	+

- : カタラーゼ反応なし    + : カタラーゼ反応あり

3.2.2 で述べたように筋肉細胞の変化をミクロトーム法で観察した場合には、それぞれの反応時間および条件によって、変化がみられたのに対して、カタラーゼ反応では、加熱またはエタノール浸漬における反応は各々一律の、マイナス（-）ないしプラス（+）であり反応時間や濃度条件によつての差違は認められなかった。

すなわち、従来法では判別することができなかった加熱の有無やエタノール浸漬などの様々な条件の違いにおいても、ここで行った組織学的な観察では、差違を見出すことができた。

このことから、現在最も多くの検討が行われているカタラーゼ活性を利用した判定方法において指摘されているネガティブな諸問題を解決する有効な方法と考えられた。

なお、今回の実験では、供試虫の後脚腿節のみを試料として限られた条件で供しており、昆虫種や個体差、供試部位、虫体全体を供試する場合などの違いによつても、変化のパターンが異なることが予想される。また、異物混入においては、今回実施した加熱やアルコールへの浸漬以外にも様々な条件が考えられるので、冷蔵、冷凍、酸や糖への浸漬などの条件についても検討する必要があると考えられた。

また、今回試験 1 では、死後 60 分後までしか観察を行っておらず、異物混入の相談では、混入してからクレームが発生するまでの期間が長期に渡ることもあるので、死後長期間経過した細胞がどのように変化していくかも明らかにしておく必要がある。異物混入発覚時の侵入経路の特定には迅速性が強く求められる。本方法は細胞や組織の詳細な情報が多数得られる反面、その手順は複雑で観察までに少なくとも 1 週間程度の時間を要する上に、特殊な技術や機器も必要である。したがって、比較的短時間で観察を行うことができる凍結切片法による検討も必要と考えられた。また、ここでの供試条件では、従来法に比べて組織学的な観察の方が、より明確な差違を見出すことができた。したがって、本方法で従来法を補完して、総合的な判定を行うなど、さらに信頼度の高い方法の確立が必要と考えられた。

## 5. 謝辞

本研究は、当センター研究奨励金制度（平成 16 年度）の助成を受けて実施されたものである。ここに関連各位に謝意を表します。

## 引用文献

- 1) 大柿好春 (1984) : 食品・薬品の混入異物対策. 「食品・薬品の混入異物対策」(緒方一喜・光楽昭雄編), 9-10, 思潮社, 東京
- 2) 小曾根恵子, 金山彰宏 (2002) : 横浜市における食品の異物混入—昆虫類を中心に— (1993~2001 年度). ペストロジー, 17 (2) : 87 - 92
- 3) 武藤敦彦 (2006) : 第 6 回害虫由来異物混入対策講習会テキスト, 5-16. 財団法人日本環境衛生センター, 神奈川
- 4) 沼本敬直, 望月敬夫, 鈴木敏孝, 溝口善則, 大沢貞夫 (1978) : 不良食品 (昆虫, 毛髪等) の原因追求に対するカタラーゼ試験の応用について. 食品衛生研究, 28 : 50-53
- 5) 石橋美幸, 堀妃佐子, 諏訪芳秀, 佐脇徹也, 増田正裕, 岩田修二, 峯孝則 (2002) : 昆虫の被加熱履歴鑑定技術の開発. 日本食品化学学会誌, 9 (1) : 30 - 34
- 6) 望月香織, 渡部泰弘, 辻 英明 (2000) : 昆虫死体のカタラーゼ活性簡易チェック法の基礎検討. ペストロジー学会誌, 15 : 86 - 89
- 7) 望月香織, 辻 英明 (2001) : 昆虫死体のカタラーゼ活性簡易チェック法の基礎検討—その 2—. ペストロジー学会誌, 16 : 41-45
- 8) 田中伸久, 山口安宣 (2003) : 各種溶液が昆虫カタラーゼ活性に及ぼす影響. ペストロジー学会誌, 18 : 109-111

## Summary

As an attempt for specifying the time of insect contamination, the histological changes of cockroach muscle cell and tissue with time elapsing after death were investigated. Effects of various treatments such as hot water and alcohol soaking were also examined. By a light microscope, slight but clear histological changes were observed in the muscle cells and tissue even within 15 minutes after death. Especially, muscle fibers shrunk, and nuclei and sarcoplasm were gradually difficult to detect within 60 minutes after death. Hot water and alcohol soaking treatments also brought about prominent histological changes,

which were significantly different from the non-treated control. These results suggest that histological examination of invaded insects may be one effective procedure to estimate the time of insect contamination. Furthermore, comparison with conventional catalase reaction was carried out.