

アニサキス亜科 L3 幼虫の生存に与える凍結の影響

地方独立行政法人
青森県産業技術センター食品総合研究所

竹内 萌 松原 久

地方独立行政法人
青森県産業技術センター弘前地域研究所

高橋 匡

地方独立行政法人
青森県産業技術センター食品総合研究所

小坂 善信

地方独立行政法人
青森県産業技術センター弘前地域研究所

工藤 謙一

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科食品生産科学部門

渡辺 学

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科食品生産科学部門

鈴木 徹

日本冷凍空調学会論文集 Vol.32 No.2 別刷

公益社団法人 日本冷凍空調学会



アニサキス亜科 L3 幼虫の生存に与える凍結の影響

竹内 萌* 松原 久* 高橋 匡** 小坂 善信*
工藤 謙一** 渡辺 学*** 鈴木 徹***

* 地方独立行政法人青森県産業技術センター食品総合研究所 (031-0831 青森県八戸市築港街 2-10)

** 地方独立行政法人青森県産業技術センター弘前地域研究所(036-8363 青森県弘前市大字袋町 80)

*** 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科食品生産科学部門 (108-8477 東京都港区港南 4-5-7)

要約

アニサキス亜科線虫 L3 幼虫の生存に与える凍結および脱水の影響を検討した。冷却速度 1°C/min に設定して DSC(示差走査熱量計)中で-20°Cまで冷却すると、死亡および凍結しているものはなかったが、幼虫の温度を過冷却解凍点より 1°C低いところまで冷却すると生存しているものはなかった。故に L3 幼虫はその体内でひとたび氷核が形成されると死亡することが示唆された。L3 幼虫は周囲の培地が凍結後、それ自体も直ちに凍結した。

10%および 23.3%の NaCl 溶液に浸漬すると、浸漬 24 時間後に生存率が 10%以下まで低下した。

マサバのフィレーンではさみこんだ状態もしくはセミドレスの腹腔内に放置した L3 は、-20°Cで 90 分凍結後に-20°Cもしくは-60°Cで保管すると、保管 24 時間後に生存しているものは見られなかった。

キーワード: 凍結、熱分析、過冷却、凍結濃縮、アニサキス

1. 緒言

青森県八戸港で水揚げされたサバは粗脂肪が比較的多く、いわゆる脂の乗ったサバであるといわれており、同サバのブランド化の取組みが行われている¹⁾。

脂の乗ったサバは生食されることがあるが、サバには寄生虫としてアニサキス亜科線虫の 3 段階目(L3)の幼虫が寄生しており、L3 幼虫は生もしくは未調理の魚を食することでヒトに寄生する。アニサキス亜科線虫が体内に入ることにより腹痛、嘔吐等の食中毒(アニサキス症)を引き起こし、日本ではアニサキス症の発生件数が増加傾向にある^{2,3)}。近年チルド流通技術の発達によりアニサキス亜科線虫に曝露されている水産物の冷蔵での流通が増えている。またそのような要因もあって生での消費が拡大しており、発生件数増加の一因となっている。

アニサキス症のリスクの低減方法として冷凍が挙げられる²⁻⁷⁾。L3 幼虫に対する凍結の効果について様々な報告がなされており、適切な温度、時間で凍結することで十分な安全性を与えることが可能である。

近年、冷凍および解凍技術の進歩により生に近い色調、肉質、味で提供できるようになり、安全面からも冷凍での供給の拡大が期待される。当所では解凍後も生と変わらないような品質の冷凍サバを開発する取り組みを行ってきた⁸⁾。前述の通り冷凍はアニサキス亜科線虫幼虫に対する感染予防に有効であることが知られているが、幼虫の生存と冷凍の関係についてはいまだ不明な点が多い。また、魚中の幼虫を死滅するための条件については魚体の大きさや凍結・保管時の形態により異なることが予想されるが、詳細な検討はされてこなかった。今回はアニサキス亜科線虫 L3 幼虫の生存に対する凍結の影響および凍結による L3 幼虫死亡の原因を検討した。また、フィレーン中での凍結を行い、生存率の推移を検討した。

2. 方法

アニサキス亜科(*Anisakinae*)L3 幼虫は、マサバ(*S. japonicas*)、ゴマサバ(*S. austlasicus*)から採取した。サバは北海道から三陸沖で漁獲されたものを使用した。それぞれから内臓を取り出し、

†Fax:+81-178-33-0321 megumi_takeuchi@aomori-itc.or.jp

0.9% NaCl (w/v)で洗浄した後に、ピンセットで幼虫を採取した。取り出した幼虫は5℃に保った市販糖添加卵ゲル(雪印メグミルク(株)社製プリン)上⁹⁾もしくはM. Fuse¹⁰⁾らの40%artificial sea water (ASW)中で試験に供するまで保管した。

2.1 冷却, 凍結による L3 幼虫の生存への影響

L3 を-40℃まで-1℃/min で冷却した時の凍結の有無および生死を検討するため, 表面の水分を柔らかい紙で吸い取った L3 幼虫を示差走査熱量計(DSC) (X-DSC7000, (株)日立ハイテクサイエンス社製)に供した。測定にはオープン of Al 容器を用い, リファレンスには空の容器を使用した。窒素ガスを 40 mL/min で流し, 蒸留水とインジウムで校正した。

凍結の有無が幼虫の生存に与える影響を検討するため, DSC 内で-10 (n=8), -15 (n=8), -20 (n=14), -40℃ (n=10)まで-1℃/min で冷却した。試料温度は環境温度の低下とともに一定速度で低下したが, 過冷却解消による温度上昇がみられた場合, 同時に DSC 信号(μ W)に凍結による発熱の結果としてスパイクの立ち上がりが見られた(Fig. 1)。この温度上昇と DSC 信号の立ち上がり開始温度を過冷却解消点(SCP: Super cooling point)とした。

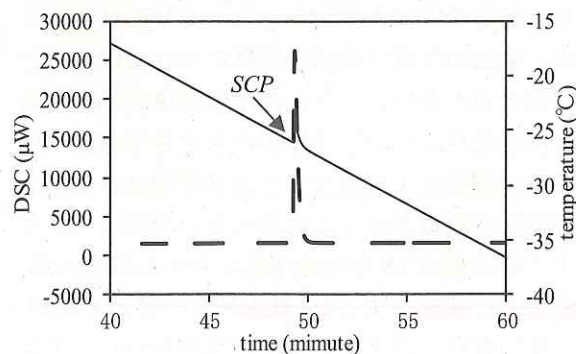


Fig. 1 Differential scanning calorimetry (DSC) trace and temperature trace in *Anisakis* L3.

— Temperature(°C), ---- DSC(μ W)

また, 測定中の L3 を随時撮影して目視においても幼虫の凍結を確認した。測定後ただちに室温まで戻して 0.9%NaCl(w/v)中に移し, ピンセットで刺激して動きの有無を確認した。さら

に 0.9%NaCl に浸漬し, 35℃で 1 晩放置し, 再びピンセットで刺激して動きの有無を確認した。さらに, -0.5, -1, -5℃/min で-40℃まで冷却し, 各冷却速度での SCP を算出した。生存していた虫の数を全体の試料虫体数で除して生存率(S, %)を算出した。

L3 幼虫が腸管粘膜に穿入することによる罹病力を検討するためにモデルとして寒天穿入試験を行った¹¹⁾。φ25 mm のチューブに 1%寒天 25 mL 入れ, 0.9% NaCl 10 mL を添加した。そこに L3 を入れて 35℃でインキュベーション後, 寒天に穿入した L3 の数をカウントした。

2.2 NaCl 溶液中における凍結による SCP への影響

L3 幼虫は実際には魚等の宿主の組織に囲まれているため, 前述のように単体で凍結することはない。そこで 0.9%NaCl 溶液中で凍結してその影響を検討した。

DSC パンに L3 (n=22)と 40 μ L の 0.9%NaCl を入れ, DSC で-50℃まで-1℃/min で冷却した際の SCP を調べ, 溶液がないものと比較した。

2.3 脱水による L3 幼虫生存への影響

凍結の際には, 幼虫個体周辺の培地等の凍結濃縮により浸透圧が変化し, 脱水が起こる。しかし, 周辺の凍結濃縮による幼虫の脱水の影響についてはほとんどわかっていない。そこで, 脱水による幼虫生存への影響を検討した。本研究では NaCl 溶液濃度が幼虫生存へ与える影響を検討するため, 1 mL の 1, 5, 10, 23.3%NaCl 溶液に幼虫を 1 匹ずつ浸漬した。20℃において 1, 2, 3, 4, 5, 24 時間の各時間まで浸漬後, 2.1 項と同様に生死判断を行い, 生存率の推移を検討した(n=9, 試行 3 回)。さらに以下の式を基に脱水率(d)を計算した。なお, W_0 は浸漬前の重量, W_1 は浸漬後の重量である。

$$d [\%] = [W_0 - W_1] / W_0 \times 100 \quad (1)$$

2.4 魚中での凍結

L3 をフィレーではさみこんだもの(フィレー中)もしくはサバをセミドレス状にしたもの(セミドレス中)で凍結し, 魚中で凍結したときの幼

虫の生存について検討した。フィレー中での凍結については、マサバからフィレー(後に重量サイズを示す)を調整した。内臓からアニサキス L3 を取り出し、1枚のフィレーの内臓部に L3 を 10 匹のせ、残りのフィレーでサンドイッチした(試行 5 回)。セミドレス中については頭をつけたままの状態のサバから内臓を取り出して水気を拭き取った後、腹腔部分に L3 を 10 匹入れて腹を閉じた(試行 2 回)。フィレー中、セミドレス中双方とも真空包装した。凍結速度の違いによる影響を避けるため、 -20°C エタノールブライン(攪拌)中で中心温度が -20°C になるまで(90 分間)凍結し、 -20°C もしくは -60°C の冷凍ストッカー(MDF-U339, MDF-594, 三洋電機(株)社製)で保管した。保管後 0°C の恒温水槽(ヤマト社製 CTW401)中で解凍し、解凍後に L3 を取り出して 2.1 項と同様に生死を確認した。使用したフィレーの厚さと重さはそれぞれ -20°C で 15 ± 2 mm, 136 ± 23 g, -60°C が 15 ± 2 mm, 124 ± 11 g であった。また、粗脂肪は 5~12%であった。セミドレス状の保管に使用したサバの標準体長と内臓を取り除いた後の重量はそれぞれ -20°C で 322 ± 2 mm, 425 ± 79 g, -60°C が 313 ± 4 mm, 399 ± 28 g であった。

3. 結果と考察

サバではアニサキス属 L3 の寄生が多いが¹²⁾、アニサキス属幼虫には I 型(*A. simplex*)と II 型(*A. physeteris*)がある。アニサキス亜科の線虫は頭部にある穿歯により腸管に穿入し、属によって胃部の形状や腸盲のの有無などが異なる。アニサキス属の線虫には腸盲のうが無く、胃部は鈍円形である。また、*A. simplex* には尾部に小棘があるが *A. physeteris* には無い⁴⁾。観察した形態的特徴(Fig. 2)から判断し、以前から報告されている *Anisakis simplex* と考えられた。

近年、*A. simplex* は *A. simplex sensu stricto*, *A. simplex pegreffii*, *A. simplex C* の 3 種の姉妹種から成ることが発見され、太平洋沿岸は *A. simplex sensu stricto* が、東シナ海から日本海沿岸では *A. simplex pegreffii* が優占種であることが知られている¹²⁾。本試験では姉妹種の識別を行っていないが、線虫を取り出したサバは北海道から三

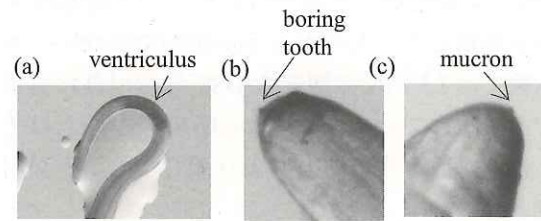


Fig.2 *Anisakis* L3 larvae used for this study
(a) anterior portion of the worm, (b) anterior end,
(c) posterior end

陸沖の太平洋沿岸で漁獲されたものであるので分布から判断して *A. simplex sensu stricto* がほとんどであると推察される。

3.1 L3 への冷却、凍結の影響

DSC において L3 を -40°C まで冷却したところ、過冷却現象が見られた。 $-10 \sim -30^{\circ}\text{C}$ の間で過冷却が解消され、透明だった L3 は白濁して凍結した。

最終到達温度 -20°C 以上では発熱ピークは見られず、目視でも凍結が確認されなかった。これらの条件で冷却された個体は解凍後全個体で生存が確認され、3 日放置しても全個体が生存していた。しかし、罹病力を確認するための寒天穿入試験の結果、穿入したものはなかった。なお、無処理の L3 は寒天に穿入することを確認している。このことから罹病するために必要な臓器に穿入する能力は失われた可能性がある。

一方、 -40°C までの冷却では全個体で凍結が見られ、解凍後には試験に供した全個体の死亡が確認された。アニサキス亜科線虫の 1 つであるテラノーバ属 L3 を単体で DSC にて $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却し、SCP よりも 0.5°C 低い温度で 1 分置いた場合は 80% が死亡していたことが報告されている⁶⁾。本試験では凍結が完了してから -40°C に至るまで 11 ± 5 min. を要しており、凍結が完了してからある程度の時間が経過したことで全個体が死に至った可能性がある。本研究では個体内凍結が完了することによる幼虫の生存への影響を検討するため、 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($n=10$) および $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($n=29$) にて幼虫の温度が SCP よりも 1°C 低くなるまで冷却し、生存を確認した。その結果、全ての個体で死亡が確認された。前述の

報告⁶⁾では密閉した系で行われていて個体内凍結が完結していたのかどうか定かではない。本試験ではL3内での凍結をDSC信号以外に目視でも確認している。本試験の結果から、L3はそれ自体が凍結することにより死亡することが示唆された。

-0.5 (n=25), -1 (n=22)および-5°C/min (n=10)でL3を冷却したときのSCPをTable 1に示す。-0.5, -1°C/minよりも-5°C/minで有意にSCPが高かったが、-0.5, -1°C/min間に差は見られなかった。急速冷却の方が緩慢冷却よりも虫体からの蒸発による水分減少の程度が少なくなり、より虫体内の水が残存したため、不均質な核生成頻度が上昇した可能性がある。また、試料内の密度の揺らぎが大きくなると過冷却が解消しやすいといわれているが¹⁴⁾、急速冷却の方が試料内の温度差と密度変動が大きくなるためSCPが高くなったと考えられる。本試験では空気中での冷却であり、L3が本来生息している条件ではないが、上記の通りL3幼虫が凍結すると死亡することを考えると、幼虫が死滅する温度としては-30°Cが目安になると考えられる。

Table 1 Weight and SCP of *Anisakis* L3 larvae at different scan rate.

Scan rate (°C/min)	Weight (mg)	SCP(°C)
-0.5	3.7±1.3 ^a	-26.2±4.8 ^a
-1	5.1±4.4 ^a	-26.8±1.8 ^a
-5	5.1±1.0 ^a	-13.8±7.0 ^b

Mean ± S.D., Values with a different letter within each column are significantly different (P>0.05)

SCP : Super Cooling Point

3.2 L3 幼虫の SCP に及ぼす浸漬溶液の影響

幼虫をNaCl溶液とともにDSCで凍結して凍結点を検討したところ、0.9%NaClを加えたもの(n=22)では溶液を加えないもの(n=43)より高くなった(Table 2)。過冷却溶液中で臨界半径以上の氷核が形成されるとそれを中心として氷結晶が形成する¹⁴⁾。臨界半径以上の氷核が形成するかどうかは偶然によるものだが、NaCl溶液を加えたことで全体の容量と水分子の量が多くなり、臨界半径以上の大きさの氷核が形成される確率

Table 2 Weight and SCP of *Anisakis* L3 larvae not-added and added 0.9% NaCl solution.

	Weight (mg)	SCP(°C)
not-added 0.9% NaCl	4.9±3.3 ^a	-25.9±2.8 ^a
added 0.9% NaCl	4.4±0.7 ^a	-14.1±3.1 ^b

Mean ± S.D., Values with a different letter within each column are significantly different (P>0.05)

SCP : Super Cooling Point

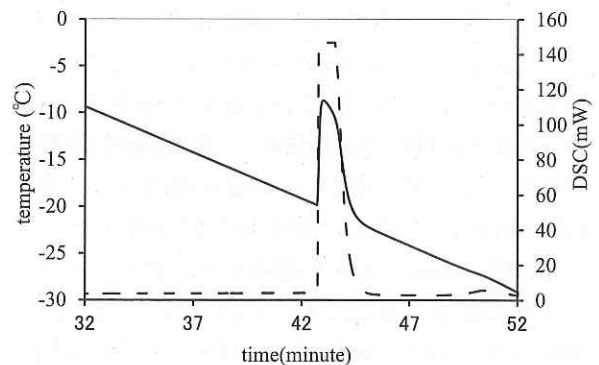


Fig.3 Differential scanning calorimetry (DSC) trace and temperature trace in *Anisakis* L3 immersed in NaCl solution.

— Temperature(°C), --- DSC(μW)

が高まったと考えられる。

過冷却解消後にDSC信号上に幅が広いスパイクが立ち上がり、その後溶液が共晶するまで発熱スパイクは見られなかった(Fig. 3)。また、冷却中の状態を目視で観察すると、溶液の凍結完了後直ちに幼虫も凍結した。このことから、L3は培地に対する過冷却能力を有しておらず、培地の凍結から逃れる能力を有していないことが示唆された。また、-1°C/minでDSC信号上の発熱スパイクの終点(目視での確認で凍結の完了が確認された点)まで冷却して生死を判断したところ、生存している個体は確認できなかった(n=22)。溶液が凍結後ただちに幼虫が凍結し、溶液中の幼虫の凍結が完了すると死亡したことから、宿主の組織を凍結することで、魚中に存在するアニサキス幼虫を死亡させることが出来るということが示唆された。

溶液を添加した際の凍結速度の影響を検討したところ、-5°C/minで冷却した際のSCPは-17.9±2.1°C(n=10)であった。-5°C/minと-1°C/minで

有意な差は認められたものの、単体で凍結したときよりも差は小さくなった。実際の魚中に存在するアニサキス幼虫は宿主の厚い組織に囲まれているため、魚中のアニサキス幼虫が凍結する温度に冷却速度はあまり影響しないと考えられる。

3.3 脱水によるL3生存への影響

同じ個体について1, 5, 10 および 23.3%のNaCl溶液に24時間まで浸漬し、1時間ごとに重量の測定およびピンセットで刺激を与えて動きを確認したところ、10, 23.3%に浸漬したものでは浸漬2~3時間後にピンセットの刺激で反応しなくなった。これまでの凍結の影響を検討した試験において、冷却して室温に戻した直後に刺激を与えても反応しなかったものが、35℃で保管した後に刺激に反応するようになったことがあった。刺激に反応しなかったものは、高張液中で刺激を与えたために反応が鈍っていた可能性がある。また、テラノーバ幼虫の浸透圧調節に関する既報¹⁵⁾では、重量測定による結果への影響が示唆されている。そこで重量測定によるストレスを排除して各浸漬時間での生存率を明確にするために、L3を各時間まで浸漬して生存率を検討した。

1%から23.3%のNaCl溶液に浸漬したときの生存率および脱水率の推移をFig. 4に示す。1%に浸漬したものでは死亡したものがみられなかったが、24時間浸漬したもので重量の増加がみられ、膨潤吸水していた。5%に浸漬したものでは浸漬開始5時間後まで生存率90%以上を維持していたが、24時間後には約40%まで低下した。10, 23.3%では徐々に生存率が低下し、24時間後には10%以下まで低下した。脱水率に関しては浸漬濃度が高いほど脱水率は高く推移した。NaCl溶液中で凍結した場合には、凍結濃縮が進行して幼虫の脱水が進行すると、幼虫の生存率を漸減させることが可能であることが示唆された。

3.4 フィレー中での生存率の変化

フィレー中で凍結保管した際のフィレーの品温をFig. 5に示す。約90分で約-20℃に到達した。フィレー中、セミドレス中双方において、各保管温度ともに24時間保管後に生存してい

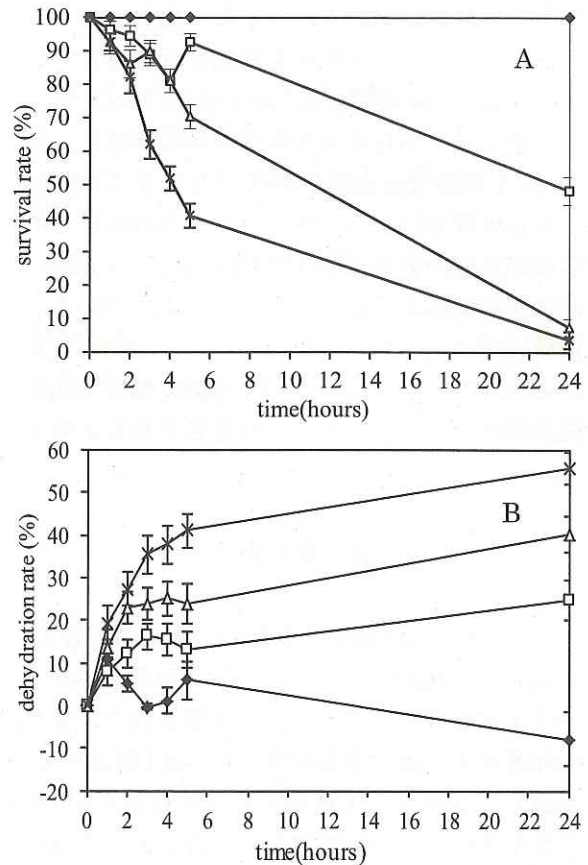


Fig.4 Survival rate (A) and dehydration rate (B) of *Anisakis* L3 larvae in NaCl solution of different concentration. Mean \pm S.E.

◆ 1%, □ 5%, △ 10%, × 23.3%

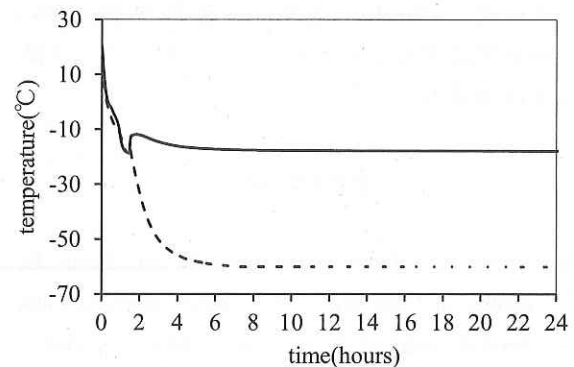


Fig.5 Changes in temperature of fillet

— -20°C, --- -60°C

るものは確認できなかった。解凍後取り出した直後に刺激を与えて反応を確認すると微弱に動いたものが確認されたが、その個体はNaCl水溶液中で35℃保管した後に白濁し、全く刺激

に対する反応が確認されなくなった。

魚中のアニサキス幼虫を死滅させる目安として“-20℃で24時間以上”といわれている²⁾。本試験の結果からその有用性が示唆された。しかし、本試験では品温が-20℃になるまで凍結してから保管を行なったが、ブロック凍結などの容量が大きい物では24時間保管後に中心部の品温が外気温まで達していない可能性がある。保管時間だけでなく、中心部の温度が-20℃以下になるような保管温度、保管時間を製品時間ごとに調べるのが重要であると考えられる。

4. まとめ

アニサキス L3 幼虫の生存への凍結の影響を *in vitro* にて検討したところ、幼虫はその凍結が完了すれば死亡することが示唆された。また、飽和濃度まで凍結濃縮が進んだ NaCl 溶液中に浸漬して24時間以上経過すれば生存率が1桁まで低下することが示唆された。さらに、フィレーもしくはセミドレス状の魚体に付着させた凍結試験では、-20、-60℃で24時間保管後に生存しているものは見られなかった。

謝辞

本研究は平成26年度海洋生態系研究開発拠点機能形成事業補助金東北マリンサイエンス拠点形成事業の一環として行った。

References

- 1) Yuetsu, K., Takao, S. and Hisashi, M., Crude fat content in Chub mackerel (*Scomber japonicus*) and Spotted mackerel (*Scomber australasicus*) landed at Hachinohe Port, *Report of Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center Food Research Institute*, 2012, 3, pp 1-8. (in Japanese)
- 2) <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/> (May, 2014).
- 3) <http://www.nih.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/> (April, 2014).
- 4) Keiichi, O. and Michiharu, H., Anisakis Larvae and preventive method for Anisakiasis, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1971, 37(10), pp 1020-1030. (in Japanese)
- 5) Thomas, L.D. and Richard, T., Commercial blast-freezing of third stage *Anisakis simplex* larvae encapsulated in salmon and rockfish, *The Journal of Parasitology*, 1988, 74(4), pp 600-603.
- 6) S. K. Stormo, K. Prebel and E. O. Elvevoll, Cold tolerance in sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) due to heat-shock adaptations, *Parasitology*, 2009, 136, pp 1317-1324.
- 7) D. A. Wharton and O. Aalders, The response of *Anisakis* larvae to freezing, *Journal of Helminthology*, 2002, 76, pp363-368.
- 8) Gou, K., Ryou S. and Hisashi, M., Frozen storage examination of High freshness frozen Chub mackerel (*Scomber japonicas*), *Report of Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center Food Research Institute*, 2013, 4, pp 13-17. (in Japanese)
- 9) E., Takahara, infection of larvae of *Anisakidodae* to *Sagittated calamary*, Hokkaido. Univ., 2011. (in Japanese)
- 10) M. Fuse, K. G. Davey and R. I. Sommerville, Osmoregulation in the parasitic nematode *Pseudoterranova decipiens*, *The Journal of experimental biology*, 1993, 175, pp 127-142.
- 11) Keiichi, O. and Michiharu, H., Food hygienic studies on *Anisakis* larvae -iv on the relation between the mortality and the penetration capacity of the larvae into an agar layer, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1973, 39(12), pp 1345-1348.
- 12) Minghao, S., Azusa, U., Yasushi, K. and Akihiko U., Helminthological survey of fish purchased at a super-market, *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, 2004, 57, pp 805-808. (in Japanese)
- 13) Jun, Z., Rie, M., Mitsugu, H. and Jun, A., Risk factor for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicas* and anisakid nematodes, *International journal of Food Microbiology*, 2010, 137, pp88-93.
- 14) JSRAE, "Food Refrigeration Technology", 2009, JSRAE, Tokyo, pp 36. (in Japanese)
- 15) K. G. Davey, R. I. Sommerville and M. Fuse,

Stress-induced failure of osmoregulation in the parasitic nematode *Pseudoterranova decipiens* : indirect evidence for hormonal regulation, *The Journal of experimental biology*, 1993, **180**, pp 263-271.

Influence of Freezing on the survival of third stage *Anisakis* Larvae

Megumi TAKEUCHI* Hisashi MATSUBARA* Tadashi TAKAHASHI**
Yoshinobu KOSAKA* Ken-ichi KUDOH** Manabu WATANABE*** Toru SUZUKI***

*Food Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center
(2-10 Chikkougai, Hachinohe, Aomori, 031-0831)

**Hirosaki Industrial Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center
(80 Hukuromachi, Hirosaki, Aomori, 036-8363)

***Tokyo University of Marine Science and Technology (4-5-7 Kounan Minato-ku, Tokyo, 108-8477)

Summary

We investigated the influence of freezing and dehydration on the survival of third stage *Anisakis* larvae. None of larvae died and froze, when they were frozen to -20°C and defrosted in the DSC. However, all the larvae frozen to temperature lower than the SCP by 1°C were dead. Therefore, larvae might die once ice nucleation in larvae happened.

SCP of L3 larvae without solution was higher than that of L3 larvae immersed in 0.9% NaCl solution. L3 larvae froze immediately after freezing of medium and L3 larvae died when it was thawed immediately after freezing was completed. The results suggested that the freezing in host tissue kill the L3 larvae.

Survival rate dropped down to less than 10%, 24 hours after L3 larvae was immersed in 10 or 23.3% NaCl solution.

In fillet sandwich type or dress type test, no larvae could survive after 24h when they were frozen at -20°C and stored at -20°C or -60°C .

Keywords: Freezing, Thermal analysis, Supercooling, Freeze concentration, *Anisakis*