

厚生労働科学研究補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生微生物および試験法に関する研究

平成25年度

分担研究報告書

HPLCによる*Bacillus cereus*の嘔吐毒素(セレウリド)

**検出法の試行**

大阪市立大学大学院

西川 禎一



厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究」

平成25年度分担研究報告書

HPLCによる*Bacillus cereus*の嘔吐毒素(セレウリド)検出法の試行

分担研究者	西川禎一	大阪市立大学大学院生活科学研究科
研究協力者	浅野桃子	大阪市立大学大学院
	古澤直人	大阪市立大学大学院
	池田高紀	帝塚山学院大学
	切畑光統	大阪府立大学大学院
	奈賀俊人	東洋食品工業短期大学

研究要旨：高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は比較的安価で汎用性が高く広く普及している理化学分析装置である。食品中でセレウスが産生した嘔吐毒素セレウリドを、HPLCを用いて検出する可能性について検討した。研究協力者である大阪府立大学切畑教授が合成に成功した合成セレウリドと市販の精製セレウリド、それぞれを標準品として利用した。精製セレウリドも合成セレウリドもHPLCでシャープなUV吸収を示す物質を含んでおり、当初はこれらをセレウリドと考えて測定方法の確立を目指した。しかしながら、LC/MSを用いた確認の結果、UV検出器と反応するこれらの物質はセレウリドではないことが判明した。また、HEp-2細胞の空胞変性試験によって両試料を測定すると、精製セレウリドの力価は合成セレウリドの1/400しかなかった。以上の結果から、HPLC-UV測定系でセレウリドを計測することは不可能と判断した。しかしながら、市販無菌包装米飯や炒飯にセレウスを接種して培養しセレウリドを産生させた試料をHPLCで測定したところ、精製セレウリドや合成セレウリド試料に含まれたUV吸収する物質と類似のピークが、セレウリドが検出されるのと同時期に出現することが判明した。セレウリド自体の定量ではないが、セレウリドの代替指標としてHPLC測定の対象とするべきか見極めるために今少し検討を継

続ける価値があると考える。

## A. 研究目的

*Bacillus cereus* (以下セレウス) は、グラム陽性通性嫌気性の芽胞形成桿菌で、べん毛を持ち運動性を有する。土壌や河川などの自然環境<sup>1)</sup>から、食品、飼料、家畜の腸管内に至るまで広く分布し、健康者の糞便からも検出されることがある。農作物から頻りに検出される腐敗菌として古くから知られているが、健康被害を引き起こすこともあり、食中毒や、気管支炎、髄膜炎、敗血症などの起因菌となることもある。

発育可能温度は 5 から 50 、至適温度は、28 から 35 である。発育可能 pH は 4.4 から 9.3 であり、栄養体は酸性条件に弱い。耐熱性の芽胞は、100 、30 分の加熱でも完全に死滅しない。加熱中に生き残った芽胞が、冷却後の食品内で発芽増殖し食中毒を引き起こすことがある。わが国では 1983 年から食中毒菌として統計が取られている<sup>2)</sup>。

セレウス食中毒は下痢型と嘔吐型の 2 つのタイプがあり、前者はエンテロトキシン、後者は cereulide (セレウリド) という毒素により発症する<sup>3-6)</sup>。下痢型食中毒は、食品に付着したエンテロトキシン産生性セレウスが腸管内で増殖し、エンテロトキシンを産生することで発症する生体内毒素型食中毒である。一方、嘔吐型の食中毒は、催吐性セレウスが食品内で産生したセレウリドを摂取することで発症

する食品内毒素型食中毒である。

セレウリドは、セレウリド合成酵素 (CRS) と呼ばれる非リボソームペプチド合成酵素 (Nonribosomal peptide synthetase) によって生合成される、分子量 1、165 の環状デプシペプチドである。産生至適温度は 25 から 30 であり、126 、90 分の加熱や pH2 または pH12 の強酸・強塩基およびトリプシンなどのタンパク分解酵素にも耐性を示す<sup>7)</sup>。催吐性セレウスによる食中毒の原因食は、焼き飯、ピラフ、パスタ、麺類、豆腐、弁当などの作り置きのもので多く、とくに米飯の関与が多い。潜伏期間は 30 分から 6 時間で、悪心、嘔吐で発症する。

米飯を主食とするわが国のセレウス食中毒は嘔吐型が圧倒的に多く、平成 20 年大阪府において、離乳食を食べた幼児が催吐性セレウス食中毒による国内初の死亡例となったように、致命的にもなりうる食中毒菌である<sup>8)</sup>。しかしながら、自然界では催吐性セレウスが検出されることはほとんどなく、常在セレウスとの鑑別測定が重要であり、迅速、簡便かつ正確性に優れた催吐性セレウスおよびセレウリドの検出方法が求められている。

催吐性セレウスの検出法として、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法は迅速鋭敏な手法として、近年微生物検査領域で汎用されており、PCR 法を用いたセレウスの定性的な検出法も報告されている<sup>9)</sup>。現在では、PCR 増幅産物をリアルタイム

ムでモニタリング、解析するリアルタイム PCR 法によるセレウス検出法も報告されている<sup>11-14)</sup>。リアルタイム PCR 法は、従来法のようなアガロースゲル電気泳動が不要で迅速性と定量性にも優れている。しかし、食品中のセレウリド産生菌の定量には好適だが、嘔吐毒素であるセレウリド自体を検出することはできない。

セレウリド検出には、HEp-2 細胞空胞変性試験が一般的であるが、熟練した技術が必要であり、結果を得るためには 4 日ほど要するため、簡便かつ迅速な検出法が望まれている。近年、高速液体クロマトグラフィー/質量分析計 (LC/MS) や高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) による高感度かつ定量性の高い検出法が報告されているが<sup>15-17)</sup>、機器が極めて高価である。

そこでセレウリドの検出法として HPLC の利用を検討した。HPLC の主な利点は検出にかかる時間が通常数分～数十分と短く、導入済みの検査機関が多く汎用性の高い機器である。また LC-MS に比べて比較的安価であり、メンテナンスの手間も少ないことがあげられる。HPLC を用いたセレウリド検出は、Agata ら<sup>18)</sup>、古瀬ら<sup>19)</sup>による報告があるが、その抽出方法や検出条件の詳細な記述はなかった。

本研究は迅速かつ簡便なセレウリド検出法として HPLC の適用の可否について再度検討することを目的とした。

## B. 材料および方法

### 1. 使用菌株

リアルタイム定量 PCR 法確立のための実験に、臨床分離した催吐性セレウス 03-137-1、BC1(+)、06-81-16-1、335-11、以上 4 株と、セレウリド非産生セレウス 09-112-7、BC1 (-)、08-151-3、08-151-4、S0932F-1、09-59-1、09-80-9、09-75-22、以上 8 株、総計 12 株を供試した。

米飯中における催吐性セレウスの菌数、芽胞数、セレウリド量の経時的变化について調べるための実験に、催吐性セレウス 03-137-1 株を供試した。

セレウリド検出のための新規バイオアッセイ法の検討に、セレウリド産生菌株として催吐性セレウス BC1 (+) 株を用いた。指標菌として、セレウリド非産生セレウス 09-112-7、08-151-3、08-151-4、S0932F-1、09-59-1、09-80-9、09-75-22、以上 7 株、バリノマイシン感受性菌である *Enterococcus hirae*、*Enterobacter cloacae*、*Micorococcus luteus*、*Candida albicans*、以上 4 株、セレウス類縁菌である *Geobacillus stearothermophilus*、*Geobacillus thermoglucosidasius*、*Bacillus sporothermodurans*、*Bacillus coagulans*、納豆菌標準株 MI、TA、NA、市販納豆より分離した納豆菌 OK、NI、以上 9 株、バリノマイシン非感受性菌である *Escherichia coli* DH5、以上 1 株、総計 21 株を供試した。

### 2. 培地・試薬類

・BRAIN HEART INFUSION BROTH (BHI ブイヨン): BRAIN HEART INFUSION (OXOID) 37

g を 1 l の蒸留水に溶解し、中試験管に 10 ml ずつ分注し、オートクレーブ滅菌 (121 °C、15 分) した。

・トリプトソーヤ寒天培地 (TSA): トリプトソーヤ寒天培地 (日水製薬) 40 g を 1 l の蒸留水に溶解しオートクレーブ滅菌した後、シャーレに 20 ml ずつ分注して寒天平板とした。

・BHI 培地 (BHI): BHI ブイオンを三角フラスコに 10 ml 分注し、オートクレーブ滅菌した。

・EMEM: イーグル MEM 培地 (日水製薬) 4.7 g を Milli Q 水 500 ml に溶解し、Phenol red solution (SIGMA-ALDRICH Inc) を 500 µl 加えてオートクレーブ滅菌した。これに、炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業) の 7.5% (w/v) 水溶液 10 ml と、L-グルタミン (ICN Biomedicals Inc) の 5% (w/v) 水溶液 3 ml を、各々フィルター滅菌した後に加えた。細胞培養用には非働化 (56 °C、30 分加温) した FETAL BOVINE SERUM; FBS (JRH BIOSCIENCES A CSL Company) 50 ml を加え、10% FBS EMEM とした。空胞化試験には FBS 濃度を 1% に調整し、ゲンタマイシン硫酸塩 (和光純薬工業) を 50 µg/ml となるように添加した EMEM を使用した。

・トリプシン: 0.5% (w/v) トリプシン-5.3 mmol/l EDTA・4Na 溶液 (フェノールレッド不含) (×10) (和光純薬工業) を PBS で

10 倍希釈した。

・10%ギムザ染色液: ギムザ液 (和光純薬工業) を純水で 10 倍希釈した。

・精製セレウリド溶液: 精製セレウリド (バイオコントロール研究所、1 mg 当量/ml) を 70%メタノールで 100、50、5 ppm に調製しスタンダードとして用いた。

・合成セレウリド: 大阪府立大学の切畑教授から提供された。70%メタノールを加え、1 mg/ml に調製、さらに 100、50、5 ppm に希釈してスタンダードとして用いた。

・バリノマイシン溶液: バリノマイシン (和光純薬工業) 10 mg を 75%メタノール 10 ml に溶解した。

・PBS: 塩化ナトリウム (和光純薬工業) 40 g、リン酸水素二ナトリウム・12 水 (和光純薬工業) 14.5 g、塩化カリウム (半井化学薬品) 1 g、リン酸二水素カリウム (和光純薬工業) 1 g を 500 ml の蒸留水に溶解し、オートクレーブ滅菌したものを 10 × PBS とし、使用する際はこれを蒸留水で 10 倍希釈し、オートクレーブ滅菌して用いた。

・HPLC 用溶媒: ・高速液体クロマトグラフ用アセトニトリル (和光純薬工業) 高速液体クロマトグラフ用メタノール (和光純薬工業) 高速液体クロマトグラフ用蒸留水 (和光純薬工業) 高速液体ク

ロマトグラフ用リン酸(和光純薬工業)を用いた。

・市販無菌包装米飯(米飯):サトウのごはん 宮城県産ひとめぼれ(佐藤食品工業、愛媛、日本)を購入した。

・炒飯(冷凍):ローソンセレクトローソンセレクト 炒飯(冷凍)(テーブルマーク)を購入し実験に供した。

### 3. 実験機材

・HPLC カラム:Inertsil® ODS-4 (4.6 x 250 mm、5 μm)(ジーエルサイエンス、東京、日本)および InertSustain C18 (4.6 x 150mm、5 μm)(ジーエルサイエンス)を使用した。

・LC/MS カラム:Zorbax Eclipse XDB-C18(2.1\*50 mm、3.5 μm)(アジレント・テクノロジー)を使用した。

・抽出カラム:Inertsep SI(ジーエルサイエンス)を100%メタノール300 μl、50%メタノール300 μlで順次洗浄した後、使用した。HLB 3 cc(Oasis)の場合は100%メタノール3 ml、50%メタノール3 mlで順次洗浄した後、使用した。

・限外濾過膜:Centrifugal Filter Unit 3 Kおよび10 K(Millipore、Billerica、MA)を使用する移動層500 μlで洗浄後、使用した。

・高速液体クロマトグラフィー(HPLC)システム:CO-810 Colum oven(東ソー、大阪、日本) PU-980/D-980-50 degasser(ジャスコインタナショナル、東京、日本) SPD-M10AVP diode array detector(DAD)(島津製作所、京都、日本)を使用した。合成セレウリド溶液の測定に使用したHPLCの基本条件は表1に示した。

・液体クロマトグラム質量分析計(LC-MS):LCにはProminence 20AD equipped with Photo Diode Array Detector(島津)を、MSとしてmicroTOF-Q2(Bruker)を共同研究者の奈賀俊人博士の監督下で東洋食品工業短期大学において使用させていただいた。

### 4. 実験方法

・抽出カラムの検討(HLB):

既知の量の精製セレウリドを洗浄済みの固相抽出カラムに添加した。

50%メタノール3 ml、70%メタノール3 mlで順次洗浄し、100%メタノール3 mlで抽出した。

抽出したものをエバポレータで乾固し、50%メタノール1 mlに溶解させた。このうち10 μlをHPLCサンプルとした。

・抽出カラムの検討(Monospin SI):

既知量の精製セレウリド100 μlを洗浄済みの固相抽出カラムに添加した。

50%メタノール300 μlを添加して遠心分離(3,000 rpm、1分)にて洗浄した。

90%メタノール300 μlを添加して遠

心分離(3,000 rpm、1分)にて抽出した。

このうち10 µlをHPLCサンプルとした。

抽出カラムの検討 (Monospin C18)

既知量の精製セレウリド100 µlを洗浄済みの固相抽出カラムに添加した。

50%メタノール300 µlを添加して遠心分離(10,000 rpm、5分)にて洗浄した。

90%メタノール300 µlを添加して遠心分離(10,000 rpm、5分)にて抽出した。

このうち10 µlをHPLCサンプルとした。

・Centrifugal Filter Unit3 K、10 K(限外ろ過膜): 既知量の精製セレウリドを洗浄済みの限外ろ過膜に添加し、遠心分離(3,000 rpm、1分)した。

・HPLC用サンプル調製:

米飯に等量の水を加え、均一になるようブレンダーで攪拌した。

攪拌後、0.4 gを1.5 mlチューブに量り取り、10 µlの精製セレウリドを添加した。

精製セレウリド添加サンプルにメタノールを0.8 ml加え、ハンディタイプのホモジナイザーでよく攪拌した。

遠心分離(13,000 rpm、5分)後、上清を共栓付試験管に回収した。これを2回繰り返した。

集めた上清をエバポレータで乾固さ

せ、メタノール250 µlに溶解後、水250 µlを加えよく攪拌し、全量を500 µlとし、これをMonospin SIに添加して遠心分離(3,000 rpm、1分)した。

50%メタノール300 µlを添加して遠心分離(3,000 rpm、1分)にて洗浄した。

90%メタノール300 µlを添加して遠心分離(3,000 rpm、1分)にて抽出した。

これを限外濾過膜に添加し、遠心分離(3,000 rpm、1分)した。

これをエバポレータで乾固し、50%メタノール500 mlに溶解させた。このうち10 µlをHPLCサンプルとした。したがって添加サンプルの最終セレウリド濃度は20 ppmである。

・市販無菌包装米飯および炒飯への催吐性セレウスの接種、培養およびセレウリド測定用サンプルの調整:

セレウス03-137-1株をBHI液体培地に接種し30、12時間培養した。

前培養した菌液を106希釈したもの(1.9 cfu/g)を、米飯接種用菌液とした。

安全キャビネット内にて米飯の包装をはがし、接種用菌液5 mlを米飯上に均一に散布した。冷凍炒飯についても同様に接種した。

散布後、再びふたをシールし、30分で保存した。培養から0、12、24、48、72時間後にサンプリングし、実験に供した。

セレウス接種米飯に当量の水を加え、均一になるようブレンダーで攪拌した。

これを5 g量り取り、1-2倍量のメタノールを加え、ハンディタイプのホモ



ジナイザーでよく攪拌した。

遠心分離 (13,000 rpm、5 分) 後、上清を共栓付試験管に回収した。

これを 2 回繰り返した。

集めた上清をエバポレータで乾固させ、メタノール 250  $\mu$ l に溶解後、水 250  $\mu$ l を加えよく攪拌し、全量を 500  $\mu$ l とした。

これを洗浄済みの固相抽出カラム (HLB) に添加し、50%メタノール 3 ml、70%メタノール 3 ml で順次洗浄し、100%メタノール 3 ml で抽出した。

抽出したものをエバポレータで乾固し、50%メタノール 1 ml に溶解させた。このうち 10  $\mu$ l を HPLC サンプルとした。

・細胞培養・継代：HEp-2 細胞を 10 % FBS EMEM または DMEM で 25 cm<sup>2</sup> のフラスコにフルシートになるまで培養した。フルシート後は PBS で洗浄し、トリプシン処理した後 3 倍に希釈して継代した。

・HEp-2 細胞空胞変性試験：PBS を用いて、セレウス培養上清の 2 倍段階希釈系列を 96 ウェルのタイタープレートに作った。トリプシン処理したフルシートの HEp-2 細胞を空胞化試験用 EMEM 10 ml で懸濁し、各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ加え、CO<sub>2</sub> インキュベータで 48 時間培養した。その後上清を除き、細胞をメタノール固定後、10 %ギムザ液で細胞を染色し、位相差顕微鏡で空胞を観察した。

・空胞変性試験によるセレウリド量の算

出：10 ppm の合成セレウリドは 210~11 希釈された際に HEp-2 細胞に空胞変性を生じさせた。この時のセレウリドの細胞培養液中での濃度は 210 希釈で 9.8 ng/ml、211 希釈では 4.9 ng/ml となる。これらの結果から、空胞変性の見られた最終希釈倍率に 5 ng/ml を乗じたものを抽出サンプルの濃度とした。この方法は他の文献<sup>[16]</sup>でも採用されている。HPLC と空胞試験用に調整したサンプルの濃縮率は 5 倍であるため、これで除して算出した。

・菌数測定：スパイラルプレーター (IUL instrument) の D mode を用いて、スパイラルプレーティング法により Colony forming unit (CFU) として菌数を測定した。

## C . 結果

1 . バイオコントロール社の精製セレウリドが HPLC で示すピークを指標としたセレウリド検出の試み

バイオコントロール社の精製セレウリドを HPLC 分析した結果、Agata et al. の報告と同様の明確なピークを得ることができた (図 1)。よってこのピークをセレウリドと仮定し検討を継続した。

限外濾過膜の分子量では 10 K が、抽出時のアセトニトリル濃度は 80-90% が最も回収率が高い結果となった。なお限外濾過膜 3K の抽出時アセトニトリル濃度 90% においては先のピークが検出できなかった (表 2)。限外濾過膜に着目すると、3K

では回収率が 71.4%、10K では 84.7%となり、10K の方が回収率は高かった。同様に抽出時に使用したアセトニトリル濃度に着目すると、アセトニトリル濃度 80%における回収率が 92.7%と最も高かった。この結果に基づき、その後の実験においては限外濾過膜 10K と抽出時のアセトニトリル濃度を 80%とした。

限外濾過膜 10K と抽出時アセトニトリル濃度 80%を使用し、米飯へのセレウリド添加回収実験を行った。クロマトグラフは図 2 に示した。精製セレウリドのピークは米飯由来の妨害ピークと分離していた。この時の HPLC 条件を表 3 に示した。米飯からの精製セレウリド回収率は 80.2%であった(表 4)。空胞変性試験においては精製セレウリド (10 ppm) が 28 の希釈倍率で空胞化が観察された一方で、添加サンプル (最終セレウリド濃度 20 ppm) では 29 の希釈倍率で空胞化が観察された。したがって、空胞変性試験では回収率は 100%であった。

次に、セレウスを接種培養した米飯からの検出を検討した。生菌数は 24 時間の時点では対数増殖途中だが、48 時間では定常期に達しており、72 時間においても定常期を維持していた(表 5)。24 時間までの米飯サンプルにおいては HPLC 法、空胞変性試験共にセレウリドを検出できなかったが、48 時間、72 時間培養サンプルからはセレウリドの検出が見られた(表 5)。また培養 48 時間目から 72 時間までは経時的にセレウリド量が増加した。この時、セレウリドのピークは米飯や菌に

よる妨害ピークと分離していた(図 3)。

しかしながら、HPLC の検出値と空胞変性試験から算出される値との結果に大きな差が生じており、HPLC におけるセレウリド測定値 (48 時間 : 29.5  $\mu\text{g/g}$ 、72 時間 : 257  $\mu\text{g/g}$ ) は空胞変性におけるセレウリド測定値 (48 時間 : 0.39  $\mu\text{g/g}$ 、72 時間 : 1.56  $\mu\text{g/g}$ ) より 100 倍程度大きな値となった。

## 2. 合成セレウリドが HPLC で示すピークを指標としたセレウリド検出の試み

バイオコントロール社の精製セレウリドを標準としたときの測定値に矛盾が生じたことから、合成セレウリドと精製セレウリドを同じ HPLC 条件で比較したところ、精製セレウリドで見られたピークが合成セレウリドでは検出できなかった(図 4)。合成セレウリドが示すピークは精製セレウリドのピークより保持時間が短いことが判明した。したがってスタンダードと見なしていた精製セレウリドのピークはセレウリドとは別の物質である可能性が示された。

精製セレウリドにおける誤認経験に基づき、合成セレウリドが HPLC で示した鋭いピークがセレウリドによるものかどうかを検証するため、東洋食品工業短期大学の LC-MS で測定を行った。測定に使用した LC の条件は表 6 に示した。なお測定時のグラジエントプログラムは以下のとおりである : 0-2 min (20% B)、10 min (80% B)、15 min (95% B)、18 min (95% B)、18.01 min (20% B)、22 min (20%

B) (図 5)。米飯の測定に使用したのと同じ条件で合成セレウリドを調べたのが図 6 で、この時のセレウリドのリテンションタイムは 15.58 分であった。分子量とマススペクトル(図 7)からセレウリドと同定されたピークにおいては UV 吸収がほとんどみられず、ベースラインのノイズに隠れる大きさであった。

セレウリド本体を HPLC-UV 検出系で測定できる濃度を推定するために、セレウリドと構造のよく似たバリノマイシンを東洋食品工業短期大学の LC-MS で測定した。測定に使用したバリノマイシンは 380 ppm であり、UV 検出器でピークを確認することが出来た(図 8)。バリノマイシンは検出波長 226 nm に比べ、214 nm の方が吸収は大きく、ピーク形状も鋭角であった(図 9)。このピークのマススペクトル(図 10)はバリノマイシン特異的であった。380 ppm のバリノマイシンは UV で検出できたが、供試可能な濃度の合成セレウリドでは UV 吸収によるピークの確認は不可能であった。

上述のように合成セレウリド溶液にはセレウリドとは別の物質による巨大なピークが確認されたが(図 4-6)、このピークはセレウス接種米飯サンプルでも僅かながら確認できた(図 11)。このピークがどのような物質であるかマスキロマトグラムによって確認したが、UV 吸収は見られるもののトータルイオンクロマトグラムにおいては検出できなかった(図 12)。検出する分子量を 100 毎に区切って再検出を行ったが、同様にマスキロマトグラ

ムによるピークは確認できなかった(図 13)。本ピークがセレウリドによるものではないことは明白だが、セレウリドの代替指標として使用できないか検討した。

### 3. セレウス接種米飯および炒飯からのセレウリド検出の試み

合成セレウリドが空胞変性を起こす希釈倍率から算出した有効濃度は 5 ng/ml であり、これをもとにバイオコントロール社の精製セレウリド (1 mg/ml) を用いて空胞変性試験を行ったところ、空胞変性が観察できる最終希釈倍率が 29 であったことから、同製品に含まれていたセレウリド量は 2.5 µg/ml と判断された。すなわち、表示濃度に比べて実際の力価は極めて低かった。同社が販売を中止したこともあり以後の実験は合成セレウリドによった。

セレウス接種米飯や炒飯中のセレウリド量を空胞変性試験と LC-MS 法で比較したところ近似した値が得られた(表 7、8)。炒飯においても、米飯同様にセレウスの対数増殖期の末期とみられる 48 時間目からセレウリドが検出されている。しかし炒飯では米飯に比べて菌数の増加量・速度共に増しており、72 時間培養サンプルにおけるセレウリド量は米飯より高かった。HPLC 測定によるセレウリド指標ピークはセレウリドが検出される接種後 48 時間目から検出されたが、そのピーク面積から換算される値とセレウリド量に相関はなかった。

#### D. 考察

市販の精製セレウリドおよび合成セレウリドを標準品として HPLC-UV 系での検出測定を目指したが、結果的には果たせなかった。不成功に終わった理由は、これらの試薬それぞれが示した一つのピークをセレウリドと誤認したことにあるが、その経緯を以下にまとめる。

まず精製セレウリドをスタンダードとして前処理カラムの選択と HPLC 条件の決定を行った。サンプルの前処理段階におけるセレウリドの流出は限外濾過膜 10 K と抽出時アセトニトリル 80%の組み合わせが最も少なく、鋭いピークを示したので、これを抽出処理条件にした。この方法は溶液を添加して遠心分離するだけであり、他の方法と比較しても簡易な操作でセレウリドの検出ができると判断した。

セレウリドは分子量 1152 であるため<sup>15)</sup>、当初は限外濾過膜 3 K、10 K 共に通過すると考えられた。しかし、限外濾過膜の分子量による比較をすると 3 K に比べ 10 K のほうが高い回収率であることがわかった。この時点で対象としているピークがセレウリドではない可能性に気付くべきだったかもしれないが、これはセレウリドの疎水性が強い<sup>20)</sup>ために、セレウリド同士、あるいは他の物質と結合することにより、分子量が 3,000 を超えたためと考えた。

抽出時のアセトニトリル濃度は 80%と 90%が高く、100%で回収率が下がる結果となった。疎水性物質は有機溶媒の濃度が

増すほど溶出しやすくなるが、セレウリドはアミノ酸とデプシ酸が繋がった環状ペプチドであり、[-Val-D-O-Leu-D-Ala-O-Val-]3 で表すことができる<sup>18)</sup>。この環状構造によりセレウリドは環の内側が親水性となり、カリウムイオンをトラップするイオノフォアとして作用する<sup>21, 22)</sup>。セレウリドが完全な疎水性物質ではないことが、80%、90%のアセトニトリル濃度で最も効率的に抽出できた理由と推察した。

無菌パックライスをを用いた精製セレウリドの添加回収実験では、先の結果でセレウリドの回収率が最も高い分子量 10 K の限外濾過膜と抽出時アセトニトリル濃度 80%を選択して行った。カラムには逆相カラムである ODS-4 を用いた。移動層のアセトニトリル濃度は 30%とした。40%以上であると米飯由来の妨害ピークと重なり、アセトニトリル濃度が低いとピークの形状が崩れることを考慮し、この濃度としていた。

研究が進む過程で共同研究者の切畑らがセレウリドの合成に成功し、これを試料とする機会を得た。しかしながら、合成セレウリドと精製セレウリドの HPLC クロマトグラムを比較すると、精製セレウリドをスタンダードとして設定したピークが合成セレウリドのクロマトグラムにおいては検出されなかった。ここに至り精製セレウリドを分析した際の最も高いピークがセレウリドではない可能性が明らかになった。同時期に精製セレウリドの販売が停止されたこともあり、合成セレウリドを標準品として検討することにし

た。

精製セレウリドでの失敗を元に、まず合成セレウリドがHPLCのスタンダードとして使用できるか調べた。セレウリド発見者であるAgataらの論文でもUV検出器(210 nm)による検出を行っており<sup>18)</sup>、古瀬ら<sup>19)</sup>もHPLCによる検出を報告していたので参考にしていたのだが、セレウリドのUV吸収は構造の類似したバリノマイシンと比べても低く、100ppmのセレウリドのUV吸収ピークはベースラインのノイズ範囲に収まっており、ピークとして検出することはできなかった。同濃度のセレウリドとバリノマイシンをLC-MSにより測定した場合、セレウリドのピーク面積がバリノマイシンより10.3%高くなるという報告があるが<sup>17)</sup>、LC-MSにおける感度はほぼ同程度と推察される。一方で同濃度のセレウリドとバリノマイシンをHPLCで測定した場合、ピーク面積比が0.18程度であるという報告がなされている<sup>23)</sup>。すなわち、今回測定した380 ppmのバリノマイシンのピークに比べ、同濃度のセレウリドのピーク高は1/5弱程度の高さになると考えられる。

高濃度の合成セレウリド溶液をスタンダードにすることでUV吸収のピークが観察できる可能性はあるが、スタンダードに大量の合成セレウリドを用いることは現実的ではない。実際にセレウス食中毒事件の起こった食品中セレウリド量は、0.02~1.28  $\mu\text{g/g}$ であったと報告されている<sup>24)</sup>。また、食品安全委員会の報告によると、セレウリドの最小発症量は1  $\mu$

g/ヒトとされている。食品200gを摂取した場合を考えると、食品重量あたり5 ng/gで発症する可能性がある。したがってHPLCの検出感度の低さはセレウリド検出法として致命的である。UV吸収によりこれを検出しようとするれば抽出時の濃縮率を上げる必要があるが、濃縮率を上げた場合セレウリドだけでなく食品由来の他の物質も同じく濃縮されるため、妨害ピークが大きくなる可能性がある。また、濃縮するために必要なサンプル量も多くなるためHPLCによるセレウリドのUV検出は困難と判断した。

発想を変えて、セレウリド自身ではなくセレウリド産生に同期して生じるUV吸収性の代替物質をHPLCにより測定することでセレウリド汚染の指標とできないか検討した。合成セレウリドや精製セレウリド試料に含まれていてセレウリド本体と誤認してしまっていたUV吸収ピークは、セレウスを接種して培養した米飯試料においても観察できたことから、代替指標となる可能性を期待した。すなわちセレウリドにはUV吸収がみられないが、前駆体あるいは類縁体にUV吸収能があり、検出器にピークとして現れている可能性も考えられる。

合成セレウリド試料に含まれるUV検出ピークがどのような物質であるかを調べるためにマスクロマトグラムを確認したが、ポジティブ、ネガティブイオン共にピークは検出できなかった。ゆえにこの物質は非常にイオン化しにくい物質であると考えられる。また、HPLCとは異なり、

通常 LC-MS の流速は 0.2 ml 程度と遅い。同一条件で検討するために HPLC における検出条件と揃えたが、その影響で 1 ml の流速ではイオン化が間に合わなかった可能性がある。実際にイオンスプレーにおいては噴霧しきれなかった移動層が漏れだしており、イオン化しにくい物質であることと相まって、マスクロマトグラムでピークが検出できなかった可能性もある。

米飯と炒飯を比較すると、炒飯の方がセレウス菌の増殖速度、定常期の菌量、セレウリド産生量共に増加した。食品成分によってセレウリドの産生量は変化することが知られている。肉や卵に比べ米飯の方がセレウリド産生量は増加する。一種類の市販食品を用いたため単純に結論を述べることはできないが、今回の結果からは米飯だけでなく他の食材がある方がセレウリド産生量は増加することが分かった。特に炒飯は、酢やケチャップ等の pH を低下させて菌の増殖を抑えるような材料が入っていない事も増殖しやすい理由であろう。セレウリドは、セレウスの対数増殖期末期から生産が始まる事が知られている<sup>15)</sup>。本研究の結果においても定常期であると考えられる 48 時間培養サンプルから 72 時間培養サンプルにかけて HPLC、空胞変性試験の両試験においてセレウリドの検出が確認できた。これは既知の見解と一致しており、またセレウリドは検出され始めた 48 時間から 72 時間までに増加する事が判明した。

空胞変性試験は 2 倍段階希釈によって

測定するため、1/2~2 倍の差は想定範囲内であり、LC-MS による測定値と空胞変性試験による値は近似していたと判断する。空胞変性試験は細胞培養液中のセレウリド濃度が 2 ng/ml あれば検出できる高感度な検出法だが、定量性に乏しい。一方で LC-MS は定量性に富むが、機器の購入や維持が高額であるという欠点がある。今回 HPLC (UV 検出器) ではセレウリドを検出できないことが明らかとなったが、検出器をコロナ荷電化粒子検出器 (CAD) にすれば測定できるかもしれない。CAD はカラムからの溶出液を噴霧し、微粒子になった成分にコロナ放電によって電荷を持たせ、電気的に検出する検出器である。UV 吸収のない成分を検出することに優れている。MS よりも廉価でメンテナンスの容易な検出器を検討してみる余地は今後もまだ残っている。

食品衛生法に定められた仕出し弁当の一般生菌数規格は  $1.0 \times 10^5$  cfu/g であり、実際に起こった食中毒事例においても調理後 24 時間以内で食中毒が起きている<sup>25)</sup>ことから、実際の食品におけるセレウス菌量は今回接種した菌量 ( $1.6 \times 10^2$  cfu/ml) より更に多いと考えられる。

## 文献

- 1) Sasahara T, S Hayashi, Y Morisawa, T Sakihama, A Yoshimura, Y Hirai: Bacillus cereus bacteremia outbreak due to contaminated

- hospital linens . Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011, 30: 219-26 .
- 2) Shinagawa K: [Foodborne disease outbreaks reported in Japan, 1952-2009--outbreaks of microbial foodborne disease] . Shokuhin Eiseigaku Zasshi 2010, 51: 274-8 .
- 3) Turnbull PC, JM Kramer, K Jorgensen, RJ Gilbert, J Melling: Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus* . Am J Clin Nutr 1979, 32: 219-28 .
- 4) Standish AJ, UH Stroehrer, JC Paton: The pneumococcal two-component signal transduction system RR/HK06 regulates CbpA and PspA by two distinct mechanisms . J Bacteriol 2007, 189: 5591-600 .
- 5) Lamy MC, M Zouine, J Fert, M Vergassola, E Couve, E Pellegrini, P Glaser, F Kunst, T Msadek, P Trieu-Cuot, et al: CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence . Mol Microbiol 2004, 54: 1250-68 .
- 6) Ehling-Schulz M, M Fricker, S Scherer: *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness . Mol Nutr Food Res 2004, 48: 479-87 .
- 7) Shinagawa K, H Konuma, H Sekita, S Sugii: Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEP-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus* . FEMS Microbiol Lett 1995, 130: 87-90 .
- 8) Dierick K, E Van Coillie, I Swiecicka, G Meyfroidt, H Devlieger, A Meulemans, G Hoedemaekers, L Fourie, M Heyndrickx, J Mahillon: Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning . J Clin Microbiol 2005, 43: 4277-9 .
- 9) Ehling-Schulz M, M Fricker, S Scherer: Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay . FEMS Microbiol Lett 2004, 232: 189-95 .
- 10) Ehling-Schulz M, MH Guinebretiere, A Monthan, O Berge, M Fricker, B Svensson: Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus* . FEMS Microbiol Lett 2006, 260: 232-40 .
- 11) Priha O, K Hallamaa, M Saarela, L Raaska: Detection of *Bacillus cereus* group bacteria from cardboard and paper with real-time PCR . J Ind Microbiol Biotechnol 2004, 31: 161-9 .
- 12) Martínez-Blanch J, G Sánchez, E Garay, R Aznar: Evaluation of a

- real-time PCR assay for the detection and quantification of *Bacillus cereus* group spores in food. *J Food Prot* . 2010, 73: 1480-5 .
- 13) Fricker M, U Messelhauser, U Busch, S Scherer, M Ehling-Schulz: Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73: 1892-8 .
- 14) Lucking G, MK Dommel, S Scherer, A Fouet, M Ehling-Schulz: Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. *Microbiology* 2009, 155: 922-31 .
- 15) Haggblom MM, C Apetroaie, MA Andersson, MS Salkinoja-Salonen : Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Appl Environ Microbiol* 2002 68: 2479-83 .
- 16) 川村久美子、平間佑美、安形則雄、伊藤秀郎、太田美智男： High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry を用いた *Bacillus cereus* セレウリド(嘔吐毒)検出法の検討、*日本臨床微生物学雑誌* 2005、15: 68-76 .
- 17) Biesta-Peters EG, MW Reij, RH Blaauw, PH In 't Veld, A Rajkovic, M Ehling-Schulz, T Abee : Quantification of the emetic toxin cereulide in food products by liquid chromatography-mass spectrometry using synthetic cereulide as a standard. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76: 7466-72 .
- 18) Agata N, M Mori, M Ohta, S Suwan, I Ohtani, M Isobe: A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEP-2 cells. *FEMS Microbiol Lett* . 1994、121: 31-4 .
- 19) 古瀬昭夫、牛嶋正、鶴田元子、又吉由紀子、大塚博史：セレウス菌による集団食中毒。 *小児感染免疫* . 2004、16: 151-5 .
- 20) Rajkovic A, M Uyttendaele, A Vermeulen, M Andjelkovic, I Fitz-James, P Veld, et al . Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide . *Lett Appl Microbiol* . 2008, 46: 536-41 .
- 21) Tempelaars M, S Rodrigues, T Abee . Comparative analysis of antimicrobial activities of valinomycin and cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin. *Appl Environ Microbiol* . 2011, 77: 2755-62 .
- 22) Mikkola R, N Saris, P Grigoriev, M Andersson, M Salkinoja-Salonen . Ionophoretic properties and



mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*. *Eur J Biochem*. 1999, 263: 112-7.

23) 南谷 臣昭、野田 万希子、原 信行、菅原 吉規\*、白木 康一、中村 昌司、永井 宏幸、小林 香夫、大塚 公人。LC-MS/MS による生団子中のセレウリドの定量とその留意点について。岐阜県保健環境研究所報。2011、19: 24-30。

24) Agata N, M Ohta, M Mori.

Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Curr Microbiol*. 1996, 33: 67-9.

25) 皆元 みゆき。熊本市におけるセレウス菌食中毒に対する行政の対応（緊急事態発生時の医療機関等への都道府県の支援態勢について--全国知事会主催講演会の概要）。都道府県展望。全国知事会；2004、548: 60-3。

表 1 合成セレウリド試料を対象とした際の HPLC 条件

カラム	Inertsil® ODS-4 (4 . 6x250mm)
移動相	40% アセトニトリル+0.1%りん酸
カラム温度	55
流速	1.0 ml/min
サンプル量	10 µl

表 2 限外濾過膜と抽出アセトニトリル濃度の検討

分子量	アセトニトリル 濃度(%)	回収率 (%)
3 K	100	73.9
	90	-
	80	89.2
	70	66.4
10 K	100	74.9
	90	90.6
	80	96.3
	70	77.2

表 3 精製セレウリド試料を対象とした際の HPLC 条件

カラム	Inertsil® ODS-4 (4.6x250mm)
移動相	30%アセトニトリル+ 0.1%りん酸
カラム温度	55
流速	1.0 ml/min
検出波長	214 nm
サンプル量	10 µl

表 4 米飯を用いた添加回収実験

精製セレウリド 添加濃度 (ppm)	精製セレウリド 回収濃度 (ppm)	回収率 (%)
20	16.0	80.2

表 5 セレウス接種培養米飯サンプルにおけるセレウリド測定値

時間	生菌数(cfu/g)	セレウリド量 (µg/g)	
		HPLC	空胞変性
0h	1.9	-	-
12h	$2.29 \times 10^5$	-	-
24h	$3.08 \times 10^6$	-	-
48h	$4.45 \times 10^7$	$29.5 \pm 3.7$	0.39
72h	$7.78 \times 10^7$	$257 \pm 33$	1.56

- : 検出限界 (0.5 µg/g) 以下

表 6 測定時の LC-MS 条件

---

カラム	Zorbax Eclipse XDB-C18(2.1*50 mm)
移動相	A : 蒸留水 + 0.1% ギ酸. B : 100% メタノール + 0.1% ギ酸
カラム温度	55
流速	1.0 ml/min
サンプル量	10 $\mu$ l

---

MS 条件

---

MS レンジ	50-3000 m/z
測定モード	ESI ポジティブモード
キャピラリー電圧	-4500V
N <sub>2</sub> ガス流速	10 L/min
N <sub>2</sub> ガス温度	200

---

表 7 セレウス接種米飯における経時の変化

時間	生菌数 (cfu/ml)	セレウリド量 (ng/g)		Rt=7.8
		空胞変性	LC-MS	HPLC
0 h	1.9	- <sup>1</sup>	ND	ND <sup>2</sup>
12 h	2.3×10 <sup>5</sup>	-	ND	ND
24 h	3.1×10 <sup>6</sup>	-	ND	ND
48 h	4.5×10 <sup>7</sup>	1.6	ND	550
72 h	7.8×10 <sup>7</sup>	6.4	20	1010

1: 検出せず

2: 検出限界以下 HPLC: <0.5 µg/ml、LC-MS: <5 ng/ml

表 8 セレウス接種炒飯における経時の変化

時間	生菌数 (cfu/ml)	セレウリド量 (ng/g)		Rt=7.8
		空胞変性	LC-MS	HPLC
0 h	0.1×10	- <sup>1</sup>	ND	ND <sup>2</sup>
12 h	1.6×10 <sup>6</sup>	-	ND	ND
24 h	7.4×10 <sup>8</sup>	-	ND	ND
48 h	1.8×10 <sup>9</sup>	1.6	ND	800
72 h	1.8×10 <sup>9</sup>	25.6	27	1300

1: 検出せず

2: 検出限界以下 HPLC: <0.5 µg/ml、LC-MS: <5 ng/ml

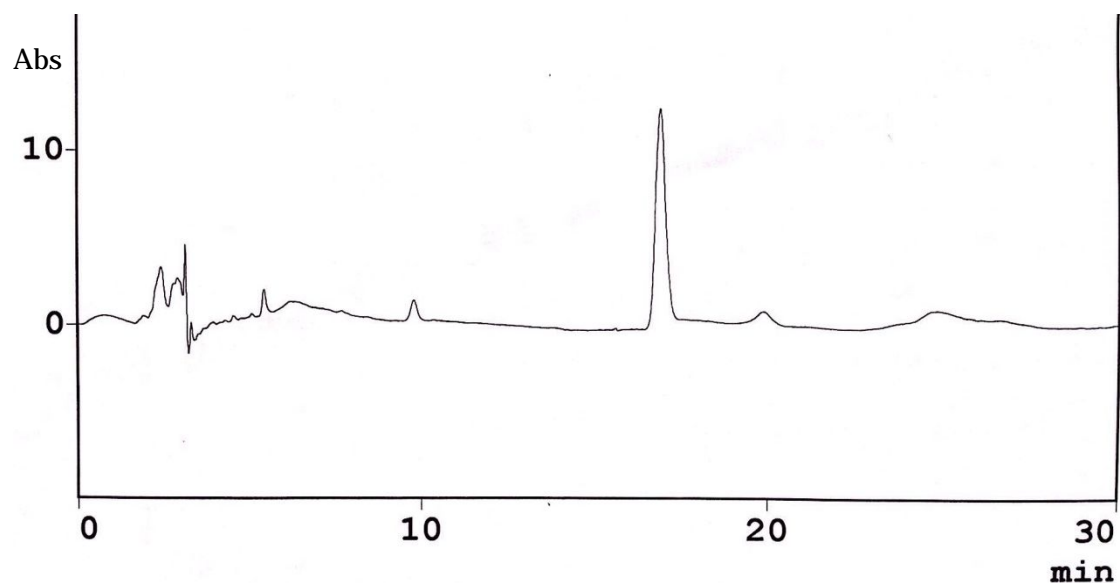


図 1 精製セレウリドのクロマトグラム

精製セレウリド (100ppm) のクロマトグラム.移動層は 40%アセトニトリル+0.1%リン酸を使用した。

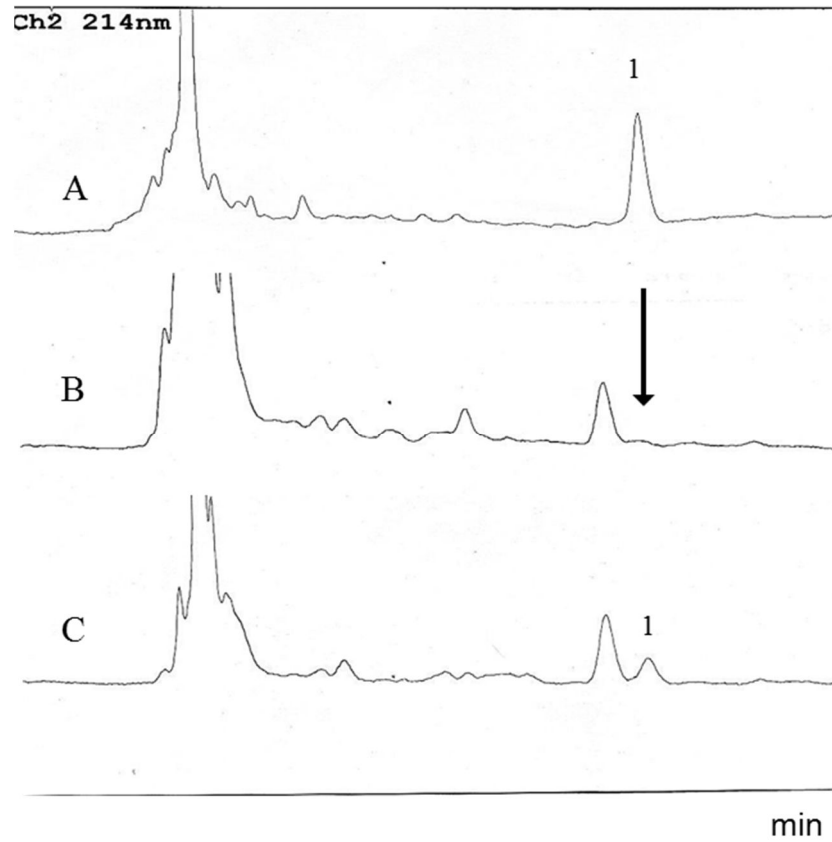


図 2 米飯における精製セレウリド添加回収実験の HPLC クロマトグラフ

A：精製セレウリド (100ppm) 、B：無添加米飯抽出サンプル、C：精製セレウリド添加米飯抽出サンプル

1 はセレウリドのピーク、矢印は精製セレウリドのリテンションタイム ( $R_t=11.4$ ) を示す。

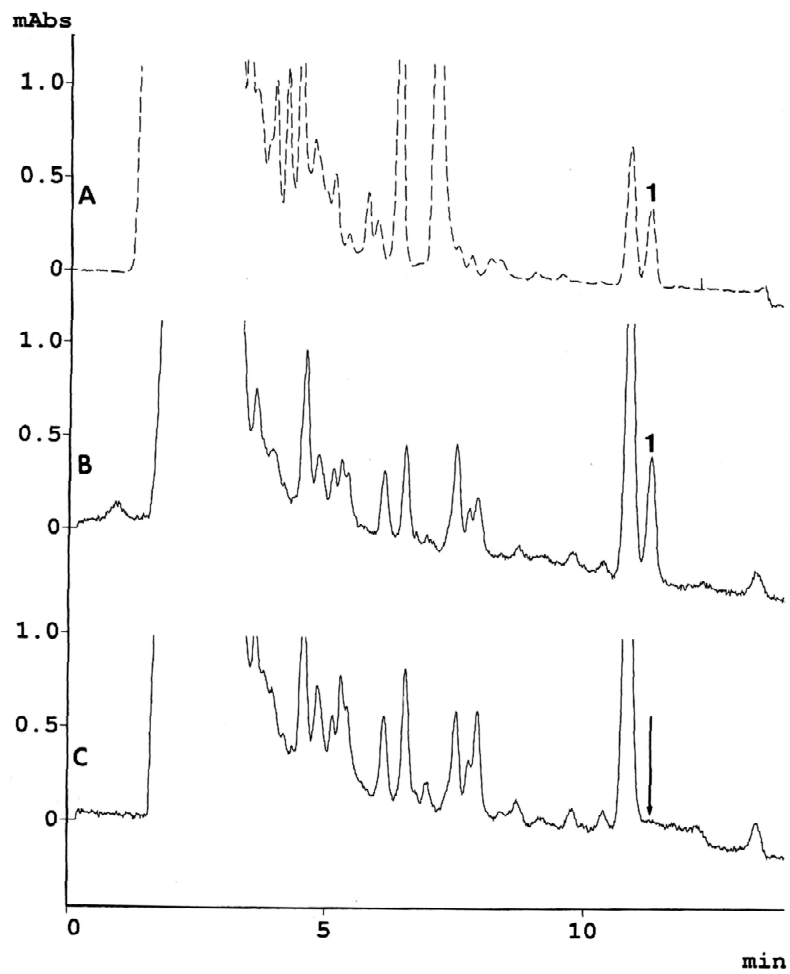


図 3 セレウス接種米飯のクロマトグラム

A : セレウス接種後 48 時間培養サンプル、B : 精製セレウリド添加米飯サンプル、C : 無添加米飯抽出サンプル。1 は精製セレウリドのピーク ( $R_t=11.4$  min) を、矢印は精製セレウリドのリテンションタイムを示す。



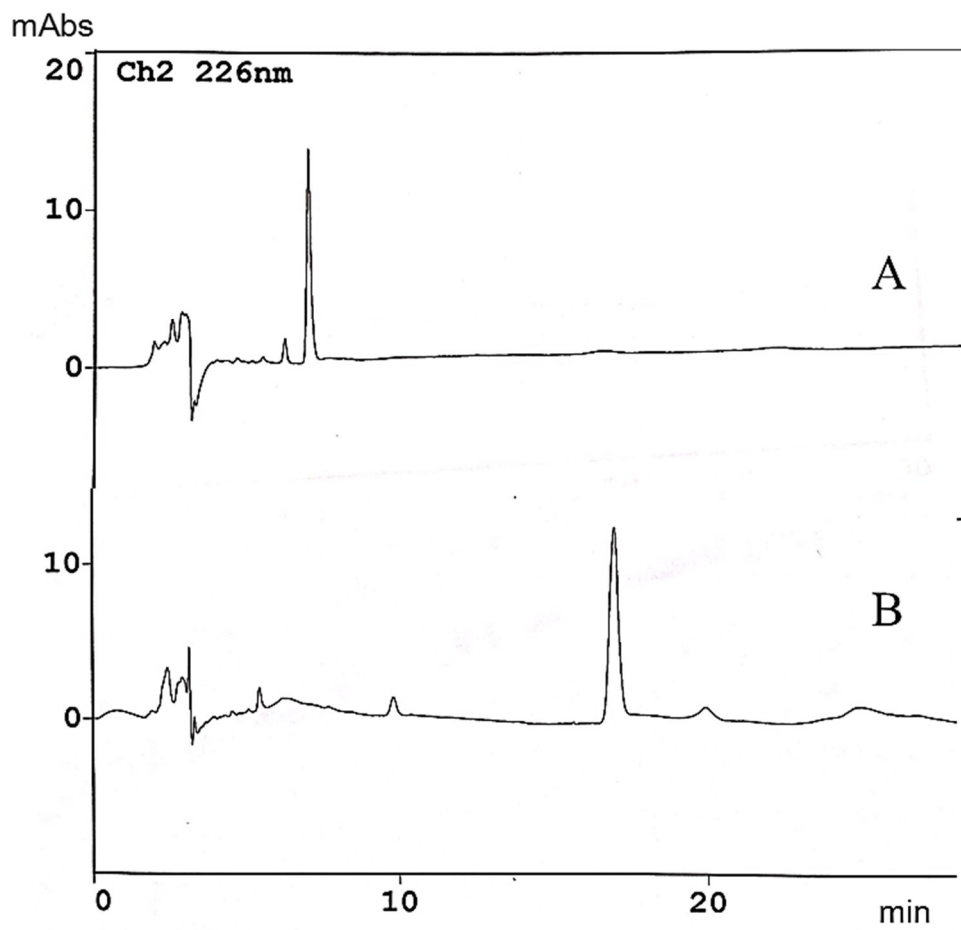


図 4 合成セレウリドと精製セレウリドのクロマトグラム  
A : 合成セレウリド (100 ppm)、B : 精製セレウリド (100 ppm)、移動層は 40%アセトニトリル+0.1%リン酸

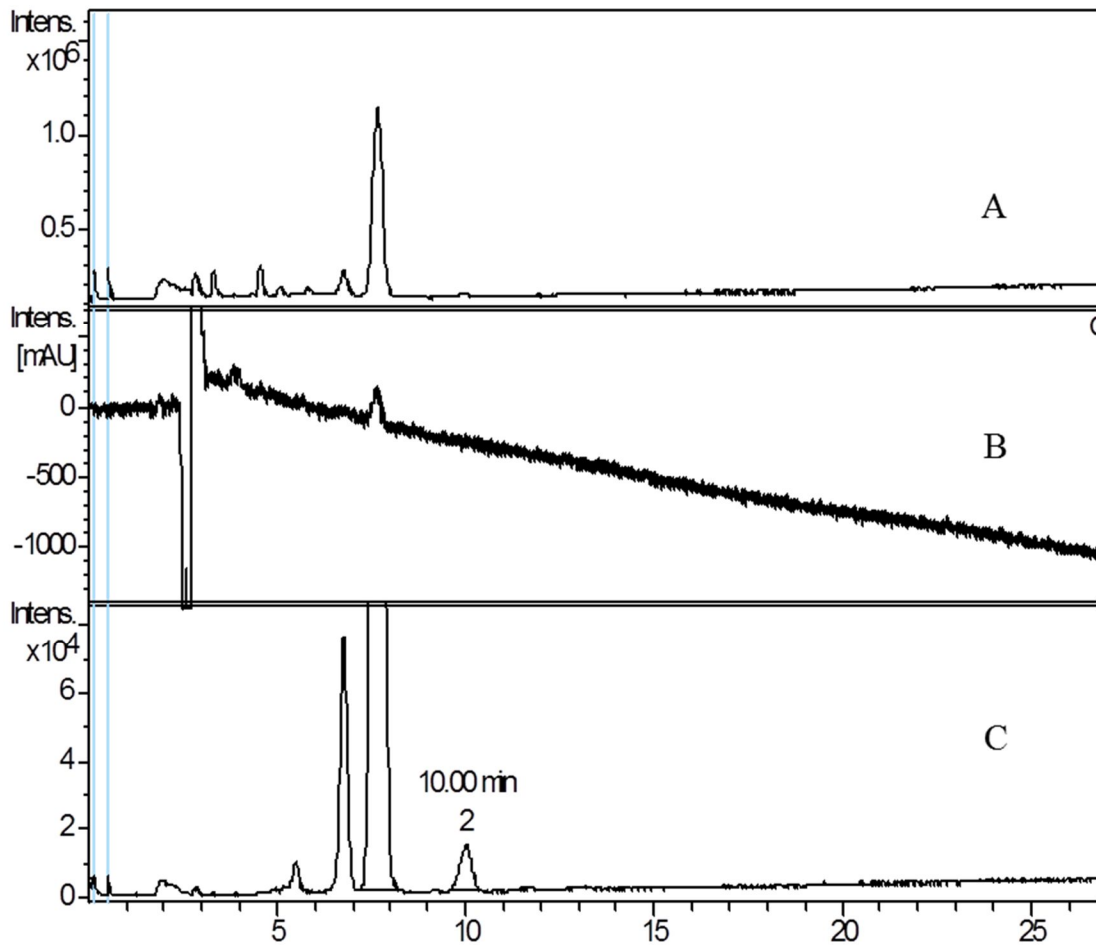


図 5 合成セレウリド (120 ppm) の LC-MS クロマトグラム  
 A : トータルイオンクロマトグラム (TIC)、B : UV 吸収 (190-400 nm) クロマトグラム、  
 C : 分子量 1150-1220 のクロマトグラム、2 : セレウリドのピーク (Rt = 10.0) を示す。移動層は 90%アセトニトリル (A 83.3%、 B 16.7%) +0.1%ギ酸

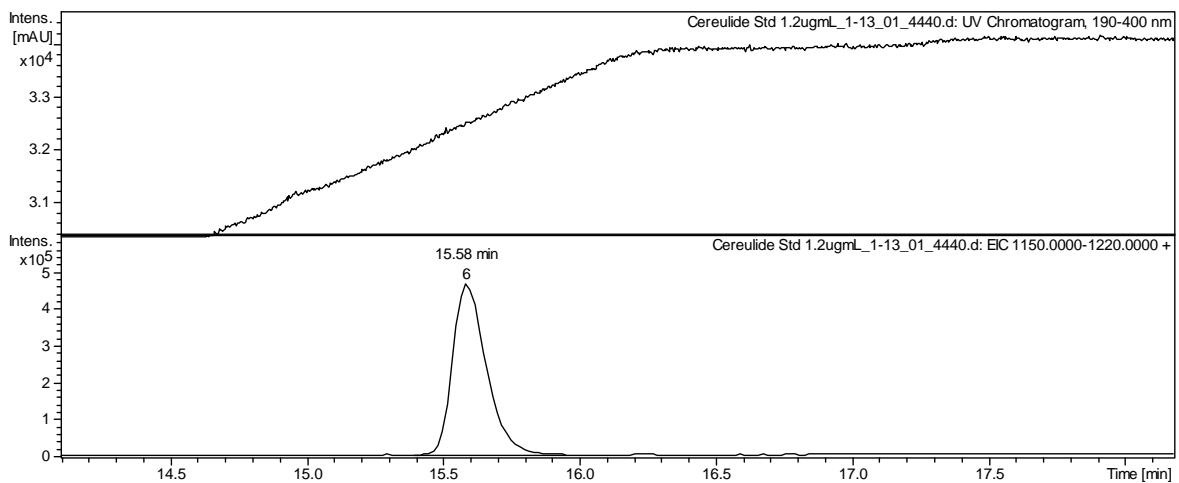


図 6 合成セレウリドの UV クロマトグラム (上) と LC-MS の結果 (下)  
 リテンションタイムは 15.58 min であった。

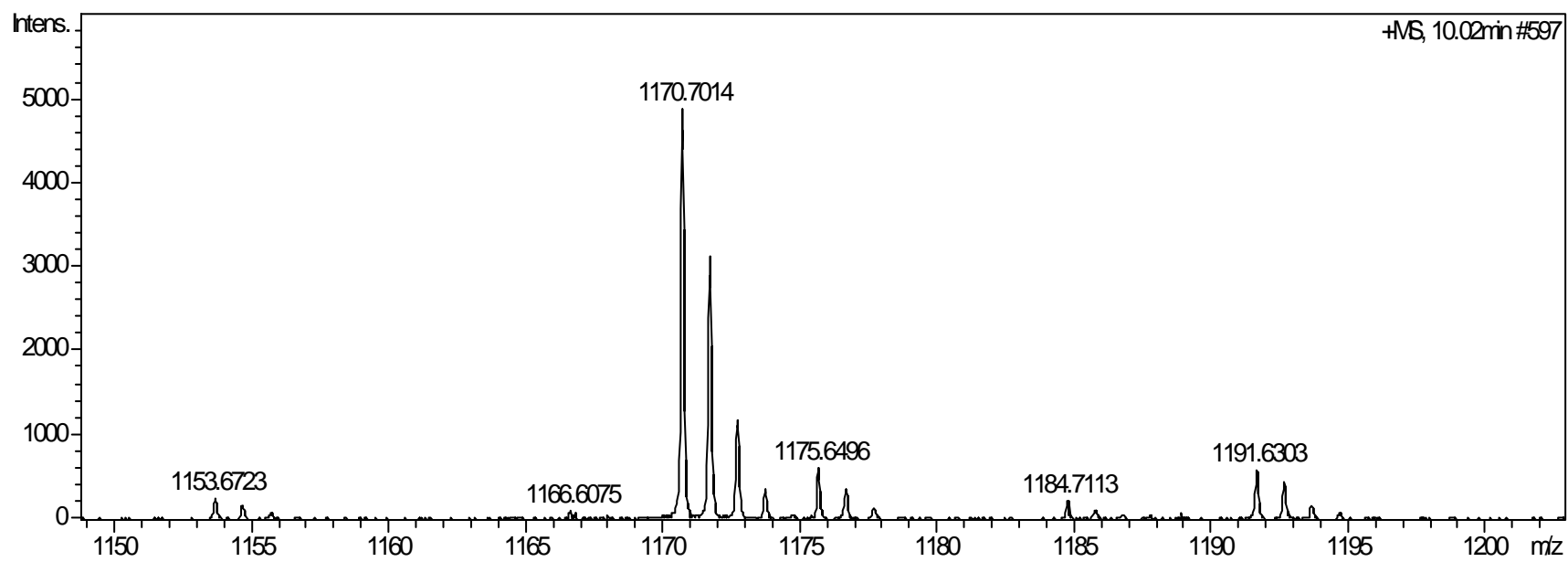


図 7 合成セレウリドに含まれた UV 吸収ピークのマススペクトル

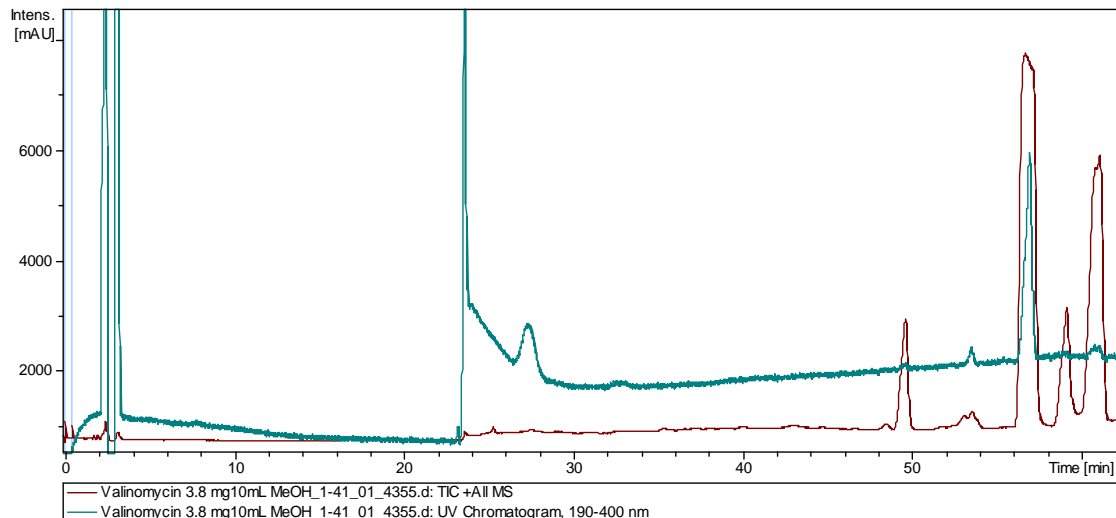


図 8 バリノマイシンのクロマトグラム

青線はUVクロマトグラム、茶線はトータルイオンクロマトグラムを示す。移動層のグラジエント条件は以下のとおりである。バリノマイシンのリテンションタイムは56.74分であった。

[0-20 min (0%B)、 25 min (55%B)、 65 min (95%B)、 70 min (95%B)、 70.01 min (0%B)、 75 min (0%B)]

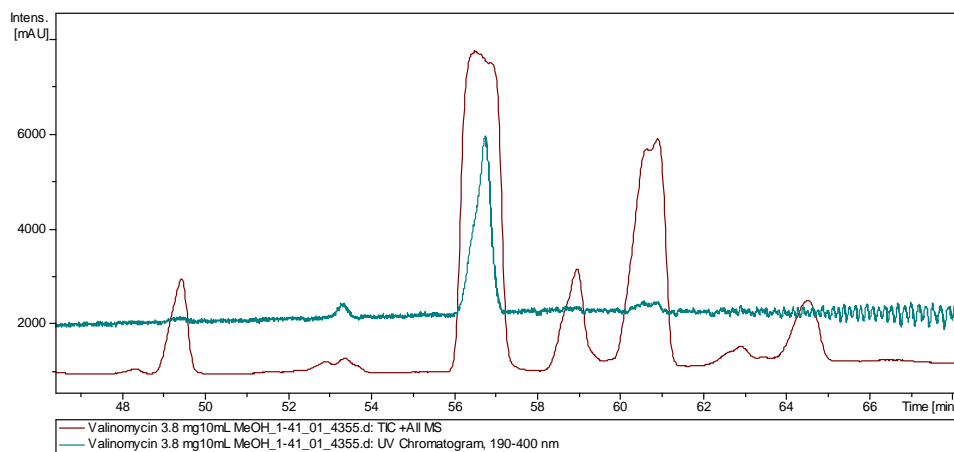


図8-1 バリノマイシンのピーク付近の拡大図

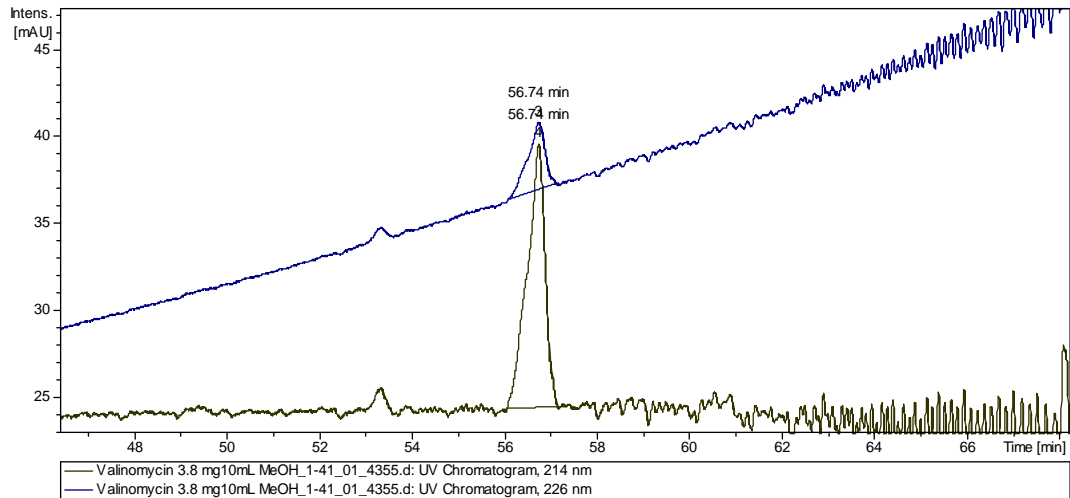


図 9 検出波長の違いによるバリノマイシン UV クロマトグラム  
青線が検出波長226 nm、黄線が214 nmを示す。

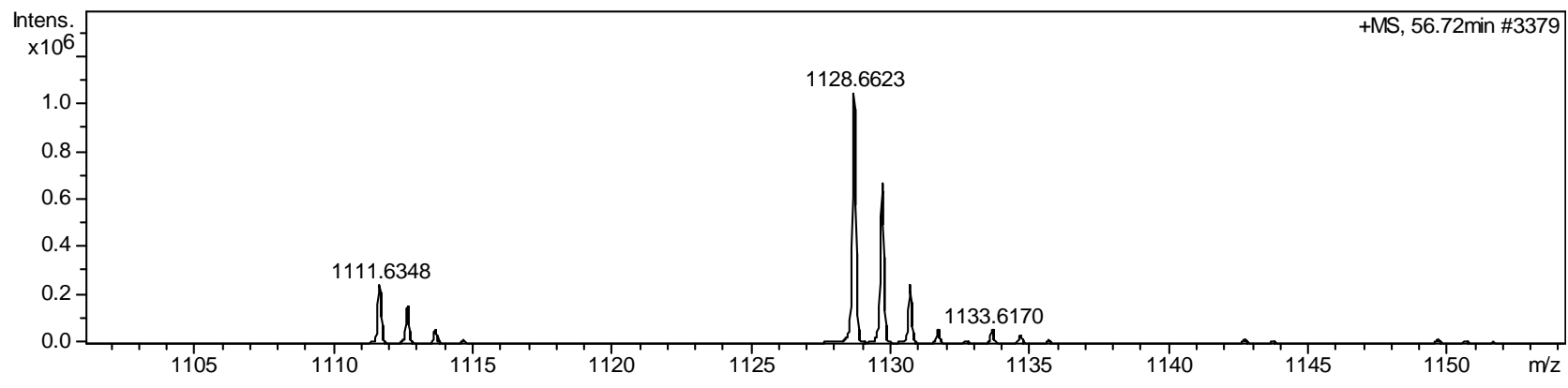


図 10 バリノマイシン試料に含まれた UV 吸収ピークのマスペクトル

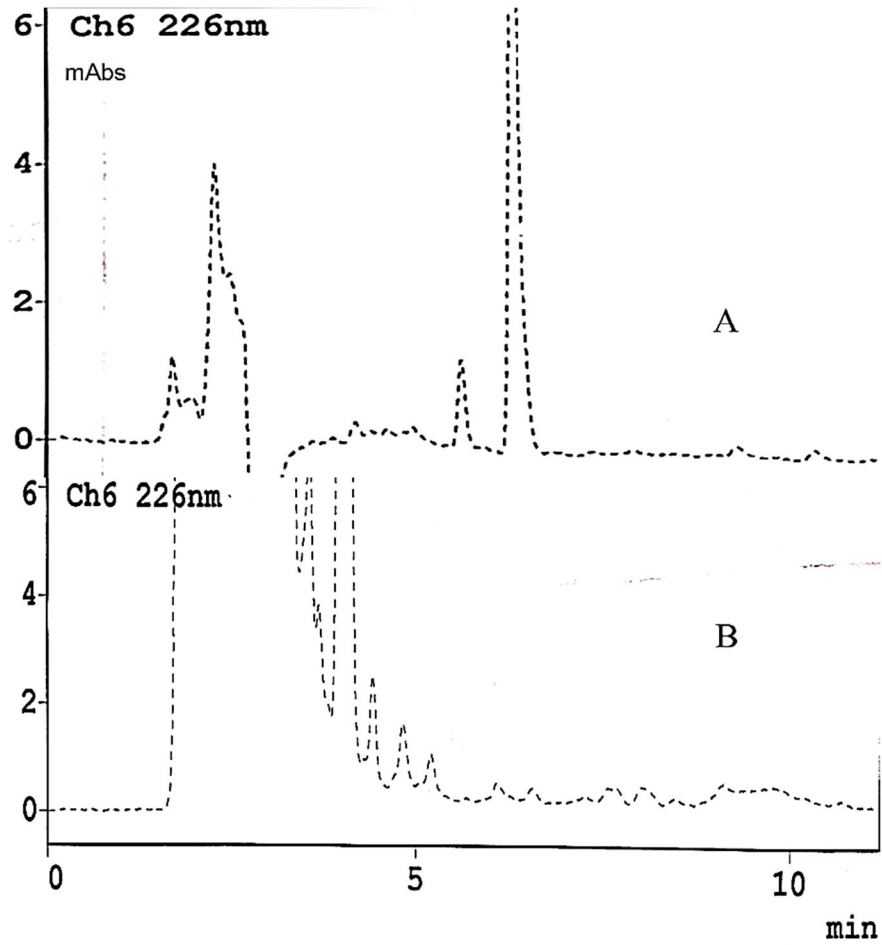


図 1 合成セレウリドに見られるピークが培養サンプル中にも存在する  
 A：合成セレウリド (100 ppm)、B：セレウス摂取米飯 48 時間培養サンプルのクロマトグラム。合成セレウリドに見られる巨大なピークと同じリテンションタイムに小さなピークが確認できる。

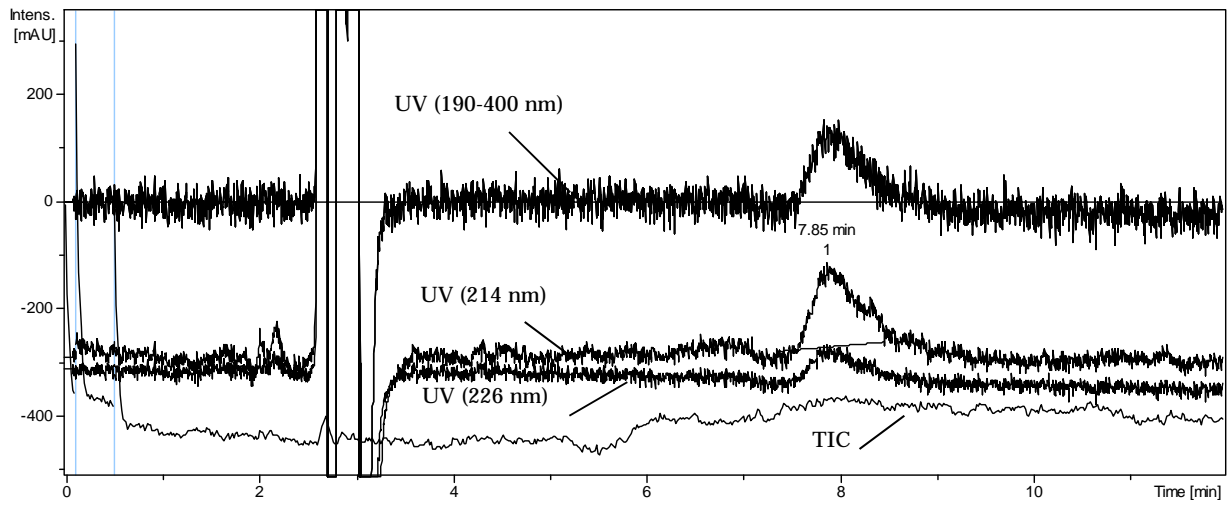


図 2 合成セレウリドに見られるピークのクロマトグラム

移動層は 40%アセトニトリル+0.1%ギ酸。トータルイオンクロマトグラム (TIC) によるピークの検出は見られないが、UV クロマトグラムにおけるピーク ( $R_t=7.85$ ) が確認できる。



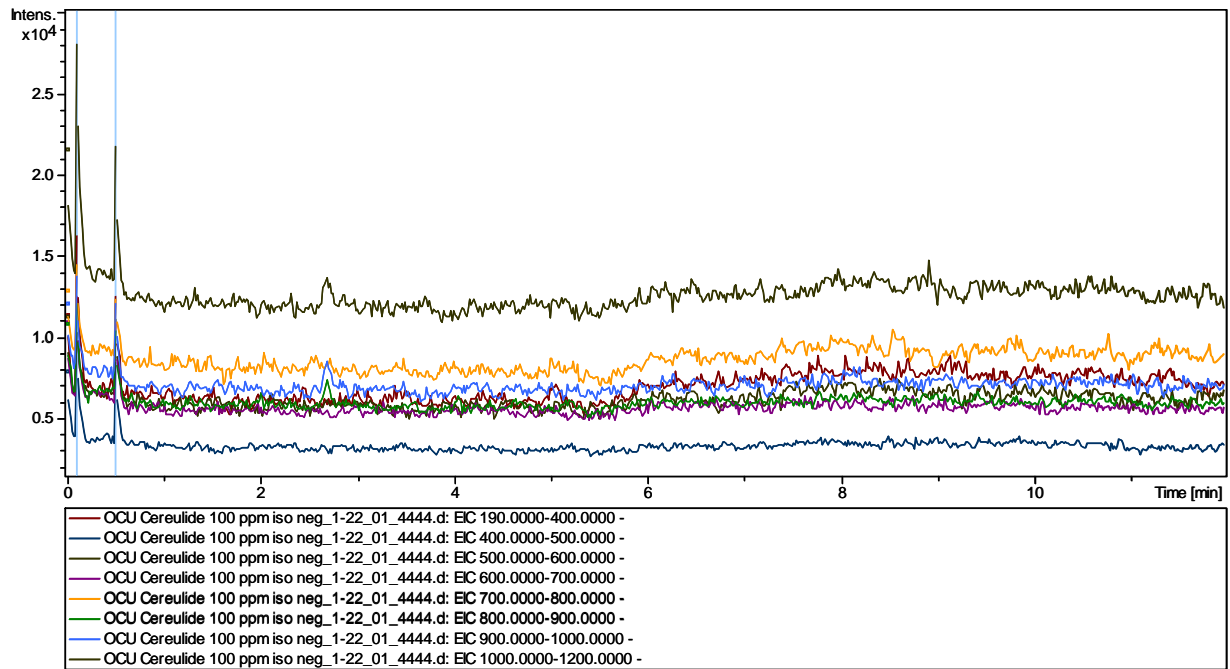


図 3 Rt=7.8 のピークにおけるマスクロマトグラム  
 分子量 400 から 100 刻みでマスクロマトグラムを確認したが、どの分子量においてもピークは確認できなかった。