

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23 - 25年度
分担研究報告書

セレウス菌セレウリドの検出方法に関する研究

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23 - 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
	田中 仁	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:リアルタイムPCR法による食品中のセレウスの検出および定量を試みた。セレウス総数については16S rRNA遺伝子を、催吐性セレウスについてはCRS遺伝子を検出することにより定量した。市販無菌包装米飯に1.9 cfu/gのセレウスを接種し、30℃で静置すると、接種12時間後には105 cfu/gに、48時間後には107 cfu/gに達し芽胞も104 cfu/g検出された。この間、リアルタイムPCR法によって得られた測定値は培養法による生菌数と相関を持って推移し、リアルタイム定量PCR法の有用性が実証された。芽胞が検出されるのと同時にセレウリドが0.3 µg/g検出され、72時間後には1.6 µg/gに達した。さらに、セレウリドの有無を簡便かつ迅速に測定するために、細菌を用いた新規バイオアッセイ法の開発を試みた。セレウリドに対する感受性スクリーニングを行い、セレウス類縁菌の*B. sporothermodurans*を指標菌として検討を進めた。HEp-2細胞の空胞変性試験に代わるバイオアッセイになりうると期待できる。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。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測定の対象とすべきか見極めるために今少し検討を継続する価値があると考えた。

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¹⁾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。

発育可能温度は 5 から 50 、至適温度は、28 から 35 である。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²⁾。

セレウス菌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³⁻⁶⁾。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、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⁷⁾。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が

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⁸⁾。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。

催吐性セレウス菌の検出法として、現在ではリアルタイム PCR 法によるセレウス検出法が報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。本法は、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。

食品中のセレウリド産生菌の定量にはリアルタイム PCR 法は好適だが、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。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。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変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、15分) 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。

・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。

・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。

・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。

3. 方法

リアルタイム定量 PCR 法：セレウス総数は 16S rRNA により検出を行い、催吐性セレウスの検出はセレウリド合成酵素 (CRS) 遺伝子により検出を行った (表 1)。

PCR 反応液は SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いた。

また、予備試験として 16S rRNA の PCR 反応液の検討を行った。すなわち、DNA サンプルを含む PCR 反応液に 5%ジメチルスルホキシド (DMSO)、8%DMSO、8%グリセロール、5%DMSO+5%グリセロール、8%ホルムアミドをそれぞれ加え、PCR 反応後の融解曲線を比較することに

より最適な反応液組成を検討した。その結果、16S rRNA の PCR 反応液には 5%DMSO を添加することとした。

16S rRNA 検出用 PCR 反応液 (1 反応あたり) の組成は以下のとおりである。

SYBR Premix Ex Taq (2×) 10 μl、16S rRNA_SYBR_Forward Primer (15μM)

0.4μl、16S rRNA_SYBR_Reverse Primer (15μM) 0.4 μl、ROX Reference Dye (50×) 0.4 μl、DMSO 1.0 μl、PCR 用滅菌水 6.8 μl、テンプレート 1.0 μl。

CRS 遺伝子検出用 PCR 反応液 (1 反応あたり) の組成は、SYBR Premix Ex Taq (2×) 10 μl、crs_SYBR_Forward Primer (15μM) 0.4 μl、crs_SYBR_Reverse Primer (15μM) 0.4 μl、ROX Reference Dye (50×) 0.4 μl、PCR 用滅菌水 7.8 μl、テンプレート 1.0 μl からなる。

上記の試薬を混合し、96 ウェルプレートに 19 μl ずつ分注した。各ウェルに 1.0 μl DNA 溶液を添加し、シールし、コンプレッションマットを置き、遠心機で軽く遠心した。計測は ABI 7000 Real-time PCR System による PCR 反応ならびに蛍光検出により行った。PCR 反応は、初期変性 95 1 分、1 サイクル、PCR 反応 95 5 秒、66 31 秒、40 サイクルとし、融解曲線解析は 95 15 秒、60 1 分、95 15 秒、1 サイクルで行った。

・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 μ l に溶解後、水 250 μ l を加えよく攪拌し、全量を 500 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 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 μ l に溶解後、水 250 μ l を加えよく攪拌し、全量を 500 μ 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 μ 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 cm² 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 μ l ずつ加え、CO₂ 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、空胞変性が見られた最終希釈倍率に 5ng/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^[16]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 . 16S rRNA ・ CRS 遺伝子の検量線

セレウリド産生性の 03-137-1 株では、いずれの濃度においても 16S rRNA、CRS 遺伝子が検出された。両遺伝子において検量線の決定定数 R^2 は 0.99 以上となった。増幅効率は $E=10^{(-1/slope)}-1$ より求められ、両遺伝子においてほぼ 100 %であった。

セレウリド非産生株 09-112-7 では、いずれの濃度においても、16S rRNA が検出されたが CRS 遺伝子は検出されなかった。09-112-7 株の 16S rRNA も検量線の決定定

数 R^2 は 0.99 以上であり、増幅効率はほぼ 100 %であった。

2 . セレウス総数と催吐性セレウス検出の特異性

セレウス 12 株すべてにおいて、16S rRNA が検出された。また CRS 遺伝子は 12 株中 6 株が陽性となり、*Bacillus cereus* PCR detection kit (タカラバイオ)を用いた通常の PCR と同じ結果となった。

03-137-1 株と 09-112-7 株の混合 DNA サンプルにおいて、16S rRNA プライマーによる測定値は 03-137-1 株と 09-112-7 株を合計したセレウス総数の値を示していた。CRS 遺伝子は、CRS 遺伝子保有菌株である 03-137-1 株の菌数と相関を持って推移していた。

3 . 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。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。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。

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。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。

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。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。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、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。このピークがどのような物質であるかマスク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。検出する分子量を 100 毎に区切って再検出を行ったが、同様にマスクロマトグラムによるピークは確認できなかった。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。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

DNA 抽出試薬の選定と PCR 至適条件の検討の結果、リアルタイム PCR 法により米飯中のセレウス総菌数と催吐性セレウスを定量的に鑑別測定することが可能になった。

PCR 条件を至適化することで、03-137-1 株では 16S rRNA および CRS 遺伝子が検出され、09-112-7 株では 16S rRNA のみが検出され、検出限界は 10^2 cfu/g 以上であった。両遺伝子において決定係数 0.9 以

上、増幅効率ほぼ 100%の直線的な検量線を得ることができた。

セレウス 12 株を用いてリアルタイム PCR を行い、反応系の特異性について検討した。その結果、16S rRNA についてはセレウス 12 株すべてが陽性でありすべてのセレウスを検出することができ、陰性対照で用いた大腸菌は陰性であった。CRS 遺伝子についてはセレウス 12 株中 6 株が陽性であった。この結果は、*Bacillus cereus* PCR detection kit を用いたコンベンショナルな PCR 法で検出した結果と一致しており、セレウス CRS 遺伝子保有株を特異的に検出できることが示された。

CRS 遺伝子陰性のセレウス 09-112-7 株と陽性の 03-137-1 株から抽出した DNA を混合し、PCR 反応に影響しないか検討した。その結果、平板培養法にて算出した生菌数と、CRS 遺伝子用プライマーを用いて定量した CRS 遺伝子保有株の菌数ならびに 16S rRNA 用プライマーで定量した 2 つの菌株の総数には、高い相関性が認められた。

新たなセレウリド検出法として、セレウリド感受性を示す菌株を用いたバイオアッセイ法の開発を検討した。セレウリド感受性を示す菌株の探索では、いくつかの感受性株を発見した。その中で *B. sporothermodurans* は培養上清試料と精製セレウリドのいずれに対しても感受性であり、この菌株を指標菌としてさらに検討を進めた。

B. sporothermodurans を培養する TSA 重層培地に KCl を添加することによって、

精製セレウリドの抗菌活性が増加することを見出した。これは培地中にカリウムを添加することで、セレウリドのカリウムイオノホアとしての作用が発揮され菌の増殖を阻止したと考えられる。

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。

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。

発想を変えて、セレウリド自体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。

E . 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 .

