Bacillus cereus 食中毒と検査

Food poisoning and testing for Bacillus cereus

女子栄養大学　衛生学教室　教授　**上田　成子**

Professor Shigeko Ueda, Ph. D.

Kagawa Nutrition University Laboratry of Hygiene

1. はじめに

*Bacillus cereus*は環境細菌の一つであり、土壌、空気および河川水等の自然環境、そして農産物、水産物および畜産物などの食料、飼料等に広く分布する好気性の芽胞形成桿菌である。環境に広く分布している本菌は食品への汚染の機会が多く、食料・食材・調理加工食品の衛生的な取扱いがなされなかった場合、腐敗・変敗をもたらし、また食中毒をもたらすことがあり、食品衛生上重要視される[1-2]。さらに汚染された輸液ラインからの血液感染や種々の日和見感染（気管支炎、髄膜炎、敗血症、眼球炎、）をもたらすことが知られている[3-4]。

*B. cereus*食中毒は、臨床症状によって嘔吐型と下痢型の二つに分けられる。*B. cereus*による最初の食中毒事例は、1955年にHaugeによって報告された下痢型食中毒である[5]。この事例はノルウェーの病院と老人ホームで喫食前日に調理され、その後24時間以上室温に放置されていたバニラソースを原因食品とするものであり、患者数は総計600名に達した。その後1971年に、イギリスにおいて中華料理店で米飯または焼飯を原因食品とする嘔吐型食中毒の発生が報告されている[6]。わが国では岡山県の小学校で学童354名がカナダ産の脱脂粉乳によって下痢、腹痛等を主徴とする食中毒発生事例が1960年に初めて報告され、その後本菌食中毒事例が多々報告されるようになった。これに伴い、わが国では1982年より行政的に*B. cereus*が食中毒細菌として扱われるようになった。

2. 食中毒の疫学的現状[7-10]

*B. cereus*による食中毒は、しばしば世界各国で発生する食中毒細菌である。各国の全食中毒発生事例数に対する本菌発生件数の占める割合は、米国では1～2%（2003～2008年）である。また、EUに所属するベルギー、フランス、オランダ、ドイツ、スペインは全EU食中毒発生事例の5～68%と高く、英国、スコットランド、デンマーク、ポーランド、スロバキア等では1～2%と発生率（2007～2009）は低い。

わが国においては、欧米諸国と比較して本菌食中毒発生事例は必ずしも多くない。1978～2011年の34年間の本菌による食中毒事例は422件みられ、その患者数は11,172人であり、1件あたりの患者数は平均26人である。本菌食中毒発生頻度は、全食中毒事例の0.3～2.3%となっている。また、月別発生状況は他の細菌性食中毒と同様に、ほぼ86%が6月～10月の間に発生している。原因施設は、飲食店がほぼ58%と最も多く、次いで家庭、事業所、学校、仕出し屋、食品製造所の順になっている。

原因食品をみると、穀類およびその加工品（焼飯類、米飯類、麺類等）が最も多く（61%）、次いで複合調理食品（弁当類等、調理パン）である。その他に、魚介類およびその加工品、肉類・卵類・野菜類およびその加工品、菓子類が原因食品となった事例もみられている。これらの原因食品のうちわが国においては、特に焼飯類（チャーハン、ピラフを含む）が重要視される。欧米、その他の国では、野菜サラダ、肉料理、魚料理、土鍋料理、あるいはスパゲティや米飯の調理・加工食品のような澱粉性食品、チーズや粉乳を加えたバニラ・スライス等が

原因食品としてあげられ、日本とは様相が異なっている。

また、1978年～2008年までの全国食中毒事件録からみると、*B. cereus* 食中毒の発生要因として食品の取扱いの欠陥、厨房内の衛生管理の欠陥、調理のなかでも、調理食品の長時間室温放置や前日調理食品の使用等によるものが、記載された発生要因数のうちほぼ52%と最も多い。また、厨房内の衛生管理の欠陥によるものが23%あり、主に調理場の汚染が原因とされている。調理従業員の問題については7%であったが、これらは手指の汚染と保菌者によるものである。

また、1978～2011年の34年間における*B. cereus*の1事件当たり患者数が250人以上の大規模発生件数は11事例みられている。これら本菌集団発生事例の原因食品は米飯を含む弁当関連の複合調理食品が大半を占めている。原因施設は飲食店、仕出し屋、乳処理業、学校、保育所および事業所である。本菌食中毒発生要因は食料・調理食品の取扱いの衛生的対応の不備や施設内における調理器具の消毒の不備などである。集団発生はヒトへの危害、経済的・社会的危害は散発事例に比して大きなものになる。従って、厨房等のより一層の衛生管理の徹底が望まれる。

3. 微生物的特性

1）病原因子と食中毒発症機構[11-14]

B. cereus は、溶血毒（cereolysin）、フォスフォリパーゼ、嘔吐毒、下痢原性毒素等の菌体外毒素を産生することが知られている（表1）。

表1 *B. cereus* の産生毒素

	分子量（kDa）		
1. 下痢原性毒素			
ヘモリジンBL	B: 38	L_1: 39	L_2: 43
非ヘモリチック	44	34	105
Thompsoon et al.	43	40	38
Kramer & Gilbert	50		
Shinagawa et al.	45		
2. 嘔吐原性毒素		1.2	
3. 溶血毒			
セレオリジン		56	
ヘモリジンBL			
Sphingomyelinase		34	
ヘモリジンⅡ		30	
4. フォスファリパーゼC			
Phosphatidylinositol hydrolase		34	
Sphingomyelinase			
Phosphatidylcholine hydrolase			

(1) 嘔吐毒

わが国に頻繁にみられる嘔吐型食中毒の発症には嘔吐毒が関与し、食物内毒素と考えられている。本毒素はセレウリド（cereulide）と命名され、アミノ酸とオキシ酸からなる環状のデプシペプチドでありD- o-Leu-D-Ala-L-o-Val-L-Valの化学式を示す。本毒素は疎水性で分子量が1153.38で、分子式は$C_{57}H_{96}O_{18}N_6$であり、抗原性がない。それに、121℃、90分でも失活せず強い耐熱性を示し、pH2、11の強酸性・アルカリ性でも失活せず、ペプシン、タイロシンに対しても失活しない。このように嘔吐毒は物理・化学的要因に対して安定である（表2）。トガリネズミ科のスンクス（Sunkus murinus）に対するED50（50%催吐量）は経口投与で12.9μg/kg、腹腔内投与で9.8μg/kgである。また、ヒトに対するセレウリドの最小発症量は約1μg程度と推定されている（表3）。嘔吐毒の催吐活性はセロトニン5受容体のアンタゴニストや迷走神経遮断に起因するものと考えられている。

表2 *B. cereus* の下痢原性毒素と嘔吐原性毒素の物理化学的性状

	対象	下痢原性毒素	嘔吐原性毒素
	物質	蛋白質	環状ペプチド
	分子量	38000～46000（SDS PAGE） 50000～57000（G 100）	1153.38
	等電点	5.1～6.1	
安	熱	56℃, 5分（－）	121℃, 90分（＋）
	pH	5～10	2～11
定	Trypsin	（－）	（＋）
	Pepsin	（－）	（＋）
性	EDTA	（＋）	ND*
	β-glucuronidase	（＋）	ND
	alkylation	（＋）	ND
	抗原性	（＋）	（－）

＊データなし

表3 *B. cereus* の下痢原性毒素と嘔吐原性毒素の動物および細胞培養での発症毒素量

対象	下痢原性毒素	嘔吐原性毒素
サル経口投与	下痢（0.5～3.5h）	嘔吐（0.5～5.0h）
スンクス経口投与	（－）	12.9μg/kg
スンクス腹腔内投与	（－）	9.8μg/kg
ウサギ結紮腸管ループ試験	150～300μg	（－）
マウス結紮腸管ループ試験	12μg	ND*
ウサギ血管透過性亢進試験	0.05～1.25μg	（－）
マウス血管透過性亢進試験	0.2μg	ND
乳飲みマウスの液体貯留	（＋）	ND
マウス致死毒	120～300μg	ND
サイトトキシン活性（HFS,CHO,INT-407）	0.1～0.5μg	ND

＊データなし

嘔吐型食中毒の臨床症状は30分～6時間の潜伏期後に悪心と嘔吐がおこるのが特徴であり、また時々、腹部の痙攣や下痢がみられ、症状の持続時間は一般に

24時間以内である（表4）。

表4 *B. cereus* 食中毒の疾病特徴

	嘔吐型	下痢型
感染菌量	10^5～10^8/g	10^5～10^8/g
毒素産生場所	食品（食物内毒素）	小腸（生体内毒素）
毒素物質	環状ペプチド	たんぱく質
潜伏期間	0.5～5時間	8～16時間 （たまに24時間以上）
疾病期間	6～24時間	12～24時間 （たまに数日）
症状	吐気，嘔吐，不快 （たまに下痢）	腹痛，水溶性下痢 吐気
原因食品	いため料理米飯 パスタ， ペーストリヌードル	食肉製品，スープ野菜， プディング， ミルク・ミルク製品

(2) 下痢毒

下痢型食中毒の発症に関与している毒素は下痢原性毒素（下痢毒）、ウサギ腸管ループ液体貯留因子、血管透過性亢進因子、腸管壊死毒、皮膚壊死毒、マウス致死因子等とされている。下痢毒は部分精製され、その分子量は嘔吐毒と比較してかなり大きく、38,000～46,000の蛋白質と推定されている。本毒素は加熱、トリプシン、プロナーゼなどの酵素や胃酸などにより失活する（表2）。

本型食中毒時の感染菌量は一般に10^7～10^8以上とされている。*B. cereus* が産生する下痢毒はウエルシュ菌のそれとは異なり、食品と共に摂取された本菌が強力な酸性環境の胃を通過し、小腸内に定着・増殖し下痢毒を産生することにより発症すると考えられている。このことから、下痢毒は生体内毒素とされている（表4）。

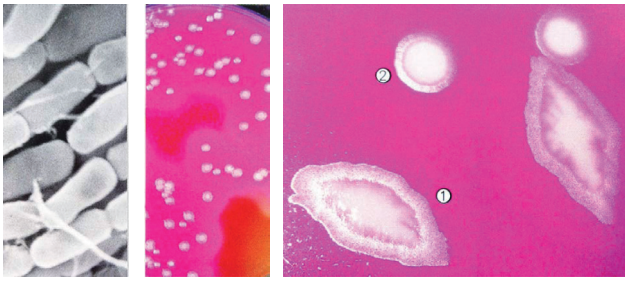
下痢型食中毒の症状は、6～15時間の潜伏期後に水様性の下痢、腹部の痙攣および腹痛が起る。悪心は下痢にともなっておこるが、嘔吐はめったにみられない。症状はほとんどの例において24時間程度持続する。

2) 検査法

セレウス菌食中毒診断のための検査材料は、推定原因食品、患者の糞便・嘔吐物および原因施設から採取した調理食品の原材料や調理食品、調理器具・機器・設備のふき取り材料などである。

(1) 細菌学的特徴

B. cereus は、Bacillaceae 科の *Bacillus* 属に属するグラム陽性の大型（栄養細胞：1.0～1.2×3.5μm）の芽胞形成桿菌である（図1）。芽胞は胞子嚢を膨出させず、菌体の中央あるいはやや中央に存在し、周毛性の鞭毛を有している。



電子顕微鏡写真　NGKG培地上のコロニー　NGKG培地上の①下痢型菌株（でんぷん分解＋）と②嘔吐型菌株（でんぷん分解－）
＊振とう　6時間培養菌の塗抹培養所見

図1 *B. cereus* の電子顕微鏡写真，NGKG培地上コロニー

本菌は *B. thuringiensis*、*B. mycoides* および *B. anthracis* と遺伝学的に近縁関係にある。これら4菌種の生化学的性状を表5に示した。*B. mycoides* は寒天平板上で根毛状の成育を示し、非運動性であり、平板培地上で他の近縁菌とは容易に区別できる。また、人畜共通感染症として有名な炭疽の病原菌である *B. anthracis* は莢膜を有し、ペニシリンを含む培地では成育できないことから他の近縁菌との区別は可能である。さらに、生物農薬製剤（BT菌製剤）に使用されている *B. thuringiensis* による食中毒事例の報告はみられないが、*B. cereus* と近縁関係にあり、

表5 *B. cereus* および遺伝学的近縁関係菌の生化学性状

生化学的性状	*B. cereus*	*B. thuringiensis*	*B. mycoides*	*B. anthracis*
卵黄反応	+	a	a	+
根様状集落	−	−	+	−
莢膜	−	−	−	+
非染顆粒の形成	+	+	+	−
クリスタル・トキシン	−	+	−	−
カタラーゼ反応	+	+	+	+
嫌気条件下での発育	+	+	+	+
pH5.7での発育	+	+	+	+
溶血能：ヒト	+	+	+	−
インドール反応	−	−	−	−
ゼラチンの液化能	+	+	+	+
カゼインの分解能	+	+	+	+
チロシンの分解能	+	+	a	−
フェニールアラニンの脱アミノ作用	−	−	−	−
リゾチーム中での発育	+	+	+	+
7%NaClでの発育能	a	+	a	+
リトマスミルクの還元	+	+	+	+
でんぷんの加水分解能	a	+	+	+
クエン酸塩利用能	a	+	a	b
硝酸塩還元能	+	+	+	+
VP反応	+	a	+	+
尿素分解能	+	+	+	+
運動性	a	a	−	−
糖分解能				
グルコース	+	+	+	+
アラビノース，キシロース，マンニット	−	−	−	−
栄養細胞（μm）・長さ	3～5			
幅	1.0～1.2			
芽胞細胞（μm）・形	楕円形			
位置	中央			
病原性	食中毒・日和見感染	鱗翅目，双翅目，鞘翅目の昆虫に殺虫作用・日和見感染		ヒト，動物に対する感染症

B. cereus 各種性状

●栄養細胞
発育温度域：10～48℃　至適発育温度32℃
発育pH域　：4.9～9.3　至適発育pH域7.0
Aw域　：0.912～0.95
熱抵抗性　D_{100} ℃値　1.2～8.0分

●毒素の熱抵抗性
嘔吐毒：121℃，90分
下痢毒：56℃，5分

●芽胞細胞の発芽
発芽温度域：1～59℃
発芽pH域　：4.35～9.30
Aw域　：0.993以上

●芽胞細胞の熱抵抗性 D_{95} ℃値
でんぷん分解菌：4.1～7.0分
でんぷん非分解菌：6.3～25分

＋：85～100%の菌株が陽性　a:50～84%　b：15～49%　－：0～14%

B. cereus 食中毒と関係のある下痢毒を産生することが知られている[15]。*B. thuringiensis* は *B. cereus* と生化学性状および寒天平板上での成育状況は全く同一であり、これらの区別は顕微鏡的に殺虫性の結晶タンパク（crystal toxin: parasporal body）を形成するか否かによって判定されている（図2）。また、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology（2009 年）では *B. pseudomycocides*、*B. weihenstephanensis* が *B. cereus* と遺伝学的に近縁関係にあるとして追加記載されている。

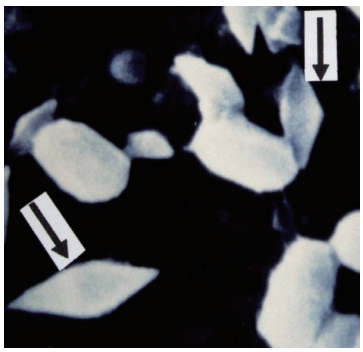


図2 *B. thuringiensis* のクリスタルトキシン

一方、*Bacillus* 属のうち *B. cereus* 以外の *B. subtilis*、*B. licheniformis*、*B. pumilus*、*B. sphaericus* および *B. brevis* による食中毒も北欧、豪州および米国で報告されており、日本でも *B. subtilis* による食中毒が2事例報告されている。これら菌種についても食品衛生上注意する必要がある[16]。

(2) 検査法

B. cereus の生化学性状については表5に示してあり、その検査法については図3に示した。

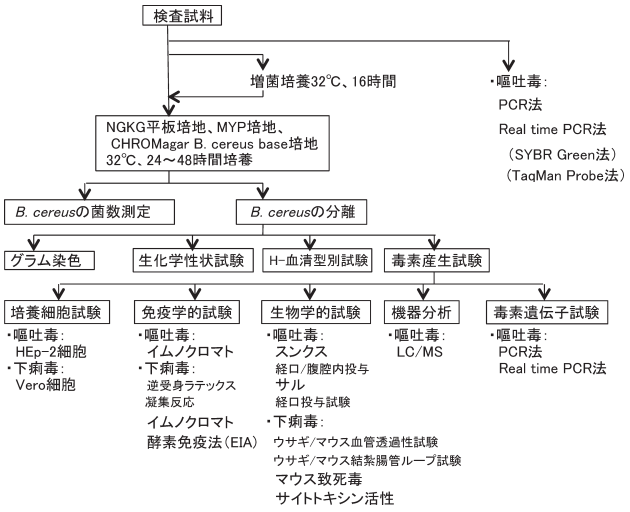


図3 *Bacillus cereus* の分離・同定

本菌は普通寒天培地上で好気的に培養すると、通常、ワックス状の粗慥で湿潤な灰色から暗灰色の集落を形成する。本菌がマンニットを発酵せず、強いレシチナーゼ活性（卵黄反応）を示すことを利用して、分離に際しては卵黄を加えたNGKG寒天やMYP[17]寒天平板が使用されている（図1）。これらの培地上ではレシチナーゼ反応を示し、マンニットを分解しない大型集落を示す。*B. cereus* はブドウ糖加普通寒天培地に培養すると対数増殖期の菌体内に空胞（非染顆粒: unstained granules）を形成する（図4）。

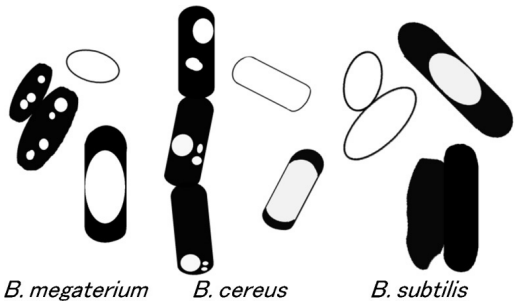


図4 *B. cereus* の非染顆粒

また、本菌は周毛性の鞭毛を有し、この鞭毛（H）抗原によりいくつかの血清型に分類されている。Taylor & Gilbertは食中毒由来株を中心としてH抗原の解析を行ない、26の血清型を分類している[12]。これまでの諸報告を整理すると、食中毒由来株のほとんどはTaylor & Gilbertの1～26型に該当することが明らかにされている。また、わが国における1978～1998年の21年間の全国食中毒事件録の記載によると262件の本菌食中毒事例のうち85件が血清型別されており、1型菌が食中毒発生例の90%弱に関係していることが示されている。また、Gilbertらは、嘔吐型事例には1、3、15、19および26型が関係したと報告している。

本菌が産生する毒素のうち下痢毒については、現在、主に免疫学的方法が使用されており、このほかに結紮腸管ループ試験、血管透過性亢進試験などの生物学的試験法も利用できる。免疫学的手法としては逆受身ラテックス凝集反応に基づくセレウス菌エンテロトキシン検出キットが使用されている。嘔吐毒に関してはHEp-2細胞（ヒト喉頭癌由来）の空胞化変性の有無による形態変化によって測定されている[18]。また、LC/MS（Liquid chromatography/mass spectrometry: 液体クロマトグラフィー／質量）分析法[19]による検出も可能である。さら

に、嘔吐毒合成酵素を対象としたイムノクロマト法[20]により定性的な嘔吐毒産生菌の検出も可能であり、LC/MSによる定量実験の前提実験に利用すると労力や経済性などを低減させることができ、迅速性からも有効な手法と考えられる。

(3)培地の評価と培養後の鑑別ポイント

①*B. cereus* 選択培地

B. cereus の選択培地の有効性評価を行うために、NGKG培地、MYP培地(A社)、MYP培地(B社)、BACILLUS CEREUS AGAR BASE(PEMBA)、CHROMagar B. cereus(CHROMagar)の5種の市販選択平板培地を用い、対照平板培地としてTryptosoy寒天培地(TSA)とBHI寒天培地を用いた。図5に各培地の培養所見・培地構成・培養条件・集落を示した。

②試験に用いた*B. cereus* 菌株と交差試験に用いた菌株

B. cereus 菌株は研究室保存の食中毒由来菌株:No.13の嘔吐型株とNo.48の下痢型株である。各種選択培地での*B. cereus* のコロニー特異性を検討するため、グラム陰性菌である*E. coli* O157:H7(VT1&VT2:EHEC)を含む12種の大腸菌、*S.* Enteritidis、*S.* Typhimurium、*V. parahaemolyticus*、*C. jejuni*、*Y. enterocolitica*、グラム陽性菌の*L. monocytogenis*、*S. aureus*(毒素型A、B、C、D、E、H、TSST-1、MRSA)、*B. cereus* を含む7菌株の*Bacillus* 属菌、*Clostridium* 属の*C. botulinum*、*C. perfringens* 2菌株の、総計39菌株を用いた。*B. cereus* 選択培地の交差試験の結果を表6に示した。*B. cereus* 選択培地上で*S.* Enteritidis、*L. monocytogenes*、*S. aureus*(毒素型A、B、C、TSST-1)、*B. cereus* は発育したが、*B. cereus* のみが典型的コロニーを示し、5種の市販選択培地は*B. cereus* に対する特異性が高いことが明らかであった。

表6 各種腸管病原菌の生育の有無

	Species	Serovar/Toxigenecity/Origin	NGKG		MYP(A社)		MYP(B社)		PEMBA		CHROMagar	
			生育	コロニー[1]	生育	コロニー[1]	生育	コロニー[1]	生育	コロニー[1]	生育	コロニー[1]
1	*E. coli*	O127:H21(EPEC)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
2	*E. coli*	O124:HNM(EIEC)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
3	*E. coli*	O157:H7(V1&V2)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
4	*E. coli*	O157:H7(V1&V2)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
5	*E. coli*	O157:H7(V2)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
6	*E. coli*	O157:H7(non VT)ATCC43888	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
7	*E. coli*	O111:HNM(VT1&VT2)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
8	*E. coli*	O26:H(−)(VT1)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
9	*E. coli*	ST and LT producer (ETEC)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
10	*E. coli*	type Ⅰ	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
11	*E. coli*	V 517	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
12	*E. coli*	IFO3301	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
13	*K. aerogenes*	from food	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
14	*C. freundii*	from food	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
15	*S.* Enteritidis	from patient	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
16	*S.* Typhimurium	from patient	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
17	*V. aginolyticus*	from fish	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
18	*V. parahemolyticus*	from fish	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
19	*C. jejuni*		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
20	*Y. enterocolitica*		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
21	*A. hydrophila*	from water	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
22	*L. monocytogenes*		−	−	+	−	+	−	+	−	−	−
23	*S. aureus*	Enterotoxin A producer	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−
24	*S. aureus*	Enterotoxin B producer	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−
25	*S. aureus*	Enterotoxin C producer	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−
26	*S. aureus*	Enterotoxin D producer	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
27	*S. aureus*	Enterotoxin E producer	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
28	*S. aureus*	Enterotoxin H producer	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
29	*S. aureus*	TSST−1	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−
30	*S. aureus*	Methicillin resistant strain	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
31	*B. cereus*	Emetic toxin producer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	*B. cereus*	Diarrheal toxin producer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	*B. cereus*	IFO13484	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	*B. subtilis*	PCI219	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
35	*B. licheniformis*	ATCC14580	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
36	*B. licheniformis*		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
37	*B. pumilus*	from air	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
38	*C. botulinum*	A type toxin producer	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
39	*C. perfringens*	Hobbs type 13	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

1)*B. cereus*の典型的なコロニーが発育したもの

③5種の市販選択培地における*B. cereus* の回収実験

選択培地での*B. cereus* の検出感度を検討するため、5種の市販選択培地における*B. cereus* の回収実験を行っ

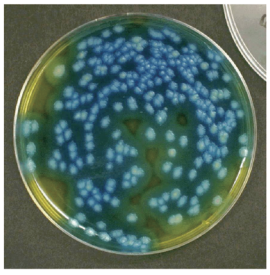
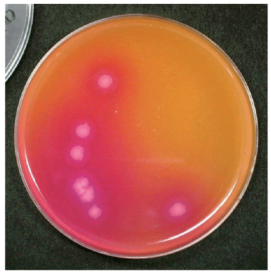
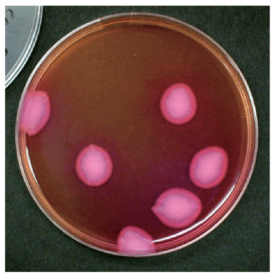
培地名	CHROMagar	PEMBA寒天培地	NGKG培地	MYP寒天培地
培養所見				
培地構成	【基礎培地】 クロモアガーバチルスセレウス基礎培地 【添加試薬】 付属サプリメント	【基礎培地】 バチルスセレウス選択寒天基礎培地 【添加試薬】 ポリミキシンBサプリメント 卵黄乳液	【基礎培地】 NGKG寒天基礎培地 【添加試薬】 卵黄乳液	【基礎培地】 セレウス菌選択寒天培地 【添加試薬】 卵黄乳液
培養条件	30℃, 24時間	35℃, 24時間	30℃, 18～24時間	32℃, 18～40時間
集落	*Bacillus cereus* →青色の集落に白色のハローを形成 その他の*Bacillus*属 →青色, 無色の集落, もしくは発育抑制 グラム陰性金 →発育抑制 カビ・酵母 →発育抑制	*Bacillus cereus* → ピーコックブルーの集落, 卵黄反応陽性 *Bacillus subtilis* → 麦色の集落 *Escherichia coli* → 発育抑制	*Bacillus cereus* → 白色集落, 周囲は濁った赤色, 卵黄反応陽性 その他の微生物 → 抑制もしくは微小コロニー	*Bacillus cereus* → ピンク～紫色, 卵黄反応陽性 その他 → 発育抑制もしくは区別可能な集落
備考	酵素基質, ハローの形成により他菌種とのスクリーニングが容易	卵黄反応, マンニット非分解性, 培地のアルカリ化（集落と周辺が青色)によりスクリーニングをする。	卵黄反応, 培地のアルカリ化(集落周辺が濁った赤色)によりスクリーニングをする。	卵黄反応, マンニット非分解性によりスクリーニングする。

図5 選択培地上での*B. cereus* の培養所見・培地構成・培養条件・集落について

た結果、5種選択培地はそれぞれ嘔吐型菌、下痢型菌ともに感度よくコロニーを形成し、また培地間に差はみられなかった（表7）。

表7 各種分離培地における*B. cereus*の回収率

評価培地	嘔吐型*B. cereus* 回収率(%)			毒素型*B. cereus* 回収率(%)		
	M±SD[1]	評価培地／TSA	評価培地／BHI	M±SD	評価培地／TSA	評価培地／BHI
NGKG	370±26.8 (7.2)[2]	124.1	108.9	263±23.8 (9.0)	106.8	112.3
MYP（A社）	333±29.9 (9.0)	111.6	97.9	234±18.6 (7.9)	95.4	100.3
MYP（B社）	343±37.2 (10.9)	115.0	100.9	228±18.0 (7.9)	92.6	97.3
PEMBA	363±31.8 (8.8)	121.6	106.7	224±32.7 (13.4)	99.3	104.4
CHROMagar	354±35.5 (10.0)	118.8	104.2	254±25.5 (10.0)	103.3	108.6
TSA	298±18.1 (6.1)	100.0	87.8	246±25.3 (10.3)	100.0	105.1
BHI	340±19.0 (5.6)	114.0	100.0	234±29.6 (12.6)	95.1	100.0

32℃, 16時間培養
1)平均値±標準偏差, 2)変動係数

④*B. cereus*検出のために用いた土壌・食品

*B. cereus*検出のために、土壌試料4種（水田、畑、グラウンド、花壇）、野菜7種（ほうれん草、サニーレタス、パセリ、みょうが、万能ねぎ、ジャガイモ、切干大根）、乾燥食品その他4種（とろろ昆布、スキムミルク、酒粕、握り飯）を用いた。

添加回収実験として*B. cereus*が検出されなかった生魚生肉5種（鯵、鱈、牛肉、豚肉、鶏肉）、乳製品2種（牛乳、チーズ）、複合調理食品その他6種（チャーハン、焼き飯、ピラフ、スパゲッティ、調理パン、シーフードミックス）の合計13種食材を用いて実験を行った結果、5種の市販選択培地間での有意差は見られず、検出感度に差が認められなかった（表8）。以上の結果から、5種の市販選択培地は問題なく*B. cereus*を検出できることが明らかであった。また、特に、CHROMagar B. cereus 上での培養所見は明確な色彩と集落を示し*B. cereus*の判定が容易であった。

(4)嘔吐毒遺伝子検査の方法

嘔吐毒を産生する*B. cereus*検出のための遺伝子検査法はPCR法やReal time PCR法で行うことができる。なお、Fricker等のPrimerは嘔吐毒合成酵素遺伝子を標的とし、各種腸管病原菌や*Bacillus*属間でも特異性が高く、また、食品、水、糞便中からの直接検出に対しても特異性の高い有効なPrimerである。

①PCR法

PrimerセットにはCACGCCGAAAGTGATTATACCAAとCACGATAAAACCACTG-AGATAGTGを用い、増幅産物の分子量は176bpである。増幅条件はDenaturation：94℃、1分 / Annealing：55℃、1分 / Polymerization：72℃、1分の35回繰り返すと良い。

また、PCR法キットも市販されているが、菌株によって嘔吐毒合成遺伝子を保有していても嘔吐毒を産生しない株もみられることから注意が必要であり、さらに*B. cereus*による食中毒を、直接明らかにするものでない。

②Real time PCR法

何らかの方法で酵素反応により蛍光が発するようにする。これには、いくつかの方法がある。主な方法として、イ

表8 食材への嘔吐型*B. cereus*菌の添加回収試験成績

	アジ		タラ		シーフードミックス		チャーハン		焼き飯		ピラフ		スパゲッティ	
	B. cereus M±SD[3]	一般生菌数[1] 菌数[2]	*B. cereus* M±SD	一般生菌数 菌数	*B. cereus* M±SD	一般生菌数 菌数	*B. cereus* M±SD	一般生菌数 菌数	*B. cereus* M±SD	一般生菌数 菌数	*B. cereus* M±SD	一般生菌数 菌数	*B. cereus* M±SD	一般生菌数 菌数
NGKG	2.8±0.3 (8.9)[4]	4.1	3.0±0.2 (5.1)	5.6	3.0±0.1 (3.9)	4.2	2.9±0.1 (4.0)	2.7	2.9±0.3 (9.1)	2.6	2.7±0.1 (4.3)	2.6	2.9±0.1 (4.0)	2.4
MYP（A社）	2.3±0.5 (22.6)	4.3	3.0±0.4 (13.7)	5.7	2.7±0.2 (7.6)	3.5	2.6±0.1 (4.4)	2.7	2.6±0.36 (10.2)	2.5	2.7±0.2 (7.4)	2.6	2.5±0.5 (18.2)	2.4
MYP（B社）	2.9±0.2 (5.2)	4.3	2.8±0.1 (2.1)	5.7	2.7±0.1 (3.7)	4.3	2.9±0.2 (6.0)	2.8	2.9±0.1 (3.4)	2.9	2.7±0.2 (7.6)	2.6	2.7±0.2 (7.6)	2.5
PEMBA	2.9±0.2 (6.0)	4.3	2.7±0.2 (5.6)	5.7	2.8±0.1 (2.1)	4.2	2.7±0.0 (0.0)	2.7	2.9±0.1 (3.4)	2.7	2.9±0.1 (3.4)	2.7	2.8±0.1 (2.1)	2.5
CHROMagar	3.1±0.2 (4.9)	4.2	2.7±0.1 (2.2)	5.7	3.0±0.1 (3.3)	4.2	3.1±0.1 (1.9)	2.8	2.8±0.2 (7.1)	2.7	2.8±0.3 (8.9)	2.6	2.7±0.3 (12.1)	2.6

	調理パン		牛肉		豚肉		鶏肉		牛乳		チーズ	
	B. cereus M±SD	一般生菌数 菌数	*B. cereus* M±SD	一般生菌数 菌数	*B. cereus* M±SD	一般生菌数 菌数	*B. cereus* M±SD	一般生菌数 菌数	*B. cereus* M±SD	一般生菌数 菌数	*B. cereus* M±SD	一般生菌数 菌数
NGKG	3.2±0.1 (3.1)	2.7	2.5±0.5 (18.2)	5.1	2.4±0.1 (4.9)	5.7	2.6±0.5 (19.2)	4.6	2.9±0.2 (6.0)	2.6	2.7±0.1 (4.2)	2.3
MYP（A社）	2.7±0.1 (2.1)	2.8	2.6±0.3 (11.6)	5.1	2.3±0.3 (13.0)	5.7	2.8±0.2 (5.5)	4.7	2.9±0.2 (6.0)	2.6	2.7±0.2 (6.4)	2.6
MYP（B社）	2.9±0.1 (4.0)	2.8	2.8±0.1 (2.0)	5.0	2.3±0.3 (11.1)	5.2	2.6±0.3 (9.8)	4.5	2.8±0.1 (2.1)	2.5	2.5±0.4 (16.9)	2.6
PEMBA	3.0±0.2 (5.1)	2.9	2.5±0.2 (6.9)	5.0	2.6±0.1 (2.2)	5.6	2.6±0.3 (11.5)	4.7	2.6±0.5 (19.2)	2.6	2.4±0.4 (17.1)	2.6
CHROMagar	2.8±0.1 (3.6)	2.9	2.6±0.3 (11.5)	4.8	2.6±0.3 (10.2)	5.7	2.8±0.3 (8.9)	4.7	2.5±0.5 (18.3)	2.5	2.8±0.0 (0.0)	2.5

食材由来の*B. cereus* は検出されなかった
1)普通寒天培地を用いた混釈平板法, 2)log表示, 3)平均値±標準偏差, 4)変動係数

ンターカレート法とTaqManプローブ法があるが、これ以外にモレキュラービーコン法、ハイブリプローブ法などがある。

i. インターカレート法

PCR反応の際に合成された二本鎖DNAに結合し蛍光を発するSYBR Green Iなどの蛍光色素を取り込ませ（インターカレート）、PCR反応に応じた蛍光を検出する。Primerセットは次のようである：

ces-SYBR-FCACGCCGAAAGTGATTATACC

ces-SYBR-RCACGATAAAACCACTGAGATAGTG

増幅条件は95℃、10分（amplitaq gold activation hot start）と95℃、15秒、60℃、1分を40回繰り返す。さらに95℃、15秒 / 60℃、60秒 / 95℃、15秒（Melting curve）操作する。

ii. TaqManプローブ法

2つのPCR Primerに囲まれた増幅配列とハイブリダイズできる第3のオリゴヌクレオチドプローブを準備する。この第3のプローブの5'、3' 両末端におのおの別の蛍光色素を結合させておく。PCR反応に伴い、TaqDNAポリメラーゼが持つ5'、3'エキソヌクレアーゼ活性により第3のプローブは分解し、Fluorescence resonance energy transfer効果がなくなり出てきた蛍光を検出する。

TaqManプローブ法のPrimerセットは次のようである：

ces_TaqMan_for CGCCGAAAGTGATTATACCAA

ces_TaqMan_rev TATGCCCCG-TTCTCAAA-CTG

ces_TaqMan_probe FAM-GGGAAAATA-ACGAGAAATGCA-MGB

増幅条件は50℃、2分（UNG activation）と95℃、10分（amplitaq gold activation hot start）、さらに95℃、15秒 / 60℃、60秒を40回繰り返す。Real time PCR法の機器はApplied Biosystems Step one systemを用いると良い。なお、TaqManプローブ法についての実験方法を下記に示した。なお、TaqManプローブ法およびReal time PCR法の嘔吐方（陽性）と下痢型（陰性）の増幅結果を図6に示した。

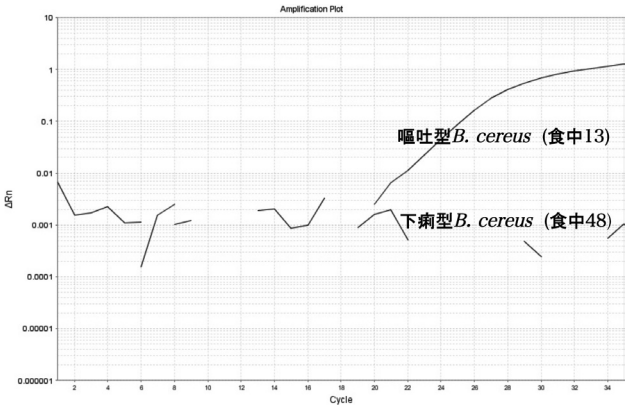


図6 TaqManプローブ法・Real Time PCRによる*B. cereus*嘔吐型（陽性）と下痢型（陰性）の増幅

＊TaqManプローブ法を用いたReal time PCR法

1. Template DNAを作成する。

分離平板上の1コロニーを90μlのTE Buffer（Tris-HCl, 1mM EDTA）に加え、95℃で5分間加熱する。芽胞形成菌は20分間、加熱する。加熱後、遠心分離（10,000rpm、3分間）し、その上清を鋳型DNAとしてReal time PCRに用いる。

2. 試験検体分の試薬を下記の容量で1.5ml容チューブにまとめて調整する。

	1サンプル
D.W.	7μl
2x TaqMan® Gene Expression Master Mix	10μl
20xTaqMan® probe and F,R primer premix	1μl
Total	18μl

3. 各ウェルに18μlずつに分注する。
4. 各ウェルにTemplate DNAを2μlずつ分注する。
5. ウェルの側壁に液が付着していない、ウェルの底に気泡がないことを確認し、プレートにフィルムを密着させる。
6. StepOne real-time PCR systemにセットする。
7. ターゲット遺伝子名、サンプル名等を入力する
8. PCRサイクルコンディションを入力する。
   ①UNG activation：50℃ for 2 min.
   ②AmpliTaq Gold activation（hot start）：95℃ for 10 min.
   ③Cycling Condition：95℃ for 15 sec. / 64℃ for 60 sec. / 35 cycle
9. 機器のスタート

(5) 下痢毒遺伝子の検査

下痢毒を産生する遺伝子によるPCR法のPrimerについては多くの報告があるが、特異的Primerは明らかでない。また、多種由来の菌株のうち下痢毒産生*B. cereus*は90%以上の菌株にみられ、下痢毒を産生するからと

いって、食中毒原因菌と決定づけることは出来ない。食中毒発症に関与する菌株は、その毒素産生活性が2μg/ml以上の菌株が対象となる。

4. 予防

*B. cereus*は環境細菌であり、一般に食品からは$10〜10^3$/g 程度の菌数が検出され、下痢毒あるいは嘔吐毒を産生する菌株がしばしば認められる。*B. cereus*による下痢型食中毒菌は健康人では$10^7〜10^8$/g以上の摂取菌量がなければ感染しない。また、嘔吐型食中毒に関しても同様の菌量がなくしては食品中で発症毒素量を形成することは不可能である。このことから一般食品で通常みられる程度の本菌量では感染は成立しない。しかし、本菌は耐熱性芽胞を形成することから、焼飯類のように加熱調理食品であっても、保存・取扱いに欠陥があると発芽・増殖し、それによって発症菌量に達するようになる。それ故に加熱食品といえども調理後なるべく速く喫食させる必要があり、またすぐに喫食しない場合には、低温保存等（10℃以下）の適切で衛生的な取扱いを配慮する必要がある。本食中毒患者は経過が良好であり、ほとんど一両日中に回復する。このことから治療についてはあまり重要視されていない。

おわりに

*B. cereus*は環境細菌の一つであり、広く環境に分布する。食中毒の原因となる本菌は下痢毒や嘔吐毒を産生する。特に下痢毒産性菌は環境中からしばしば検出される。このことから、毒素産生・活性量の把握が重要となる。

また、食品の安全性評価のためには本菌の菌数測定と、分離菌の血清型や毒素（嘔吐毒・下痢毒）産生能を測定しておく必要があり、これは汚染源の追究や汚染防止対策を立てる上で重要である。一方、嘔吐毒検出試験法に関して培養細胞や機器分析によるLC/MS検定に関しては、前者には技術を必要とし、後者は機器が高価であり、両者とも一般的でない。このことから嘔吐毒の検出のためにさらに正確・簡便・迅速な検出法の開発が望まれる。

参考文献

1）Schoeni, J.L.; Wong, A.C. J. Food Prot. 2005, 68(3), 636-648.

2）上田成子. “セレウス菌”. HACCP衛生管理計画の作成と実践　改定データー編. 熊谷進 編集代表. 中央法規出版, 2003, p.122.

3）Kotiranta, A.; Lounatmaa, K.; Haapasalo, M. Microbes and Infection. 2000, 2, 1　89-198.

4）Berner, R.; Heinen, F.; Pelz, K.; van Velthoven, V.; Sauer, M.; Korinthenberg R. Neuropediatrics. 1997, 28, 333-334.

5）Hauge, S. J.Appl.Bacteriol. 1955, 18, 591-595.

6）Mossel, D.A.; Koopman, M.J.; Jongerius, E. Appl.Microbiol. 1967, 15, 650-653.

7）“Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks --- United States, 2008”. Morbidity and Mortality Weekly Report. http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6035a3.htm?s_cid=mm6035a3_w

8）European Food Safety Authority. EFSA Journal. 2011, 9(3), 2090.

9）厚生省環境衛生局食品衛生課編. 全国食中毒事件録（昭和53-平成10年度版）, 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課編. 全国食中毒事件録（平成11-21年度版）. 日本食品衛生協会, (1980-2012).

10）財団法人厚生統計協会編. 国民衛生の動向. (2010-2012年).

11）Shinagawa, Y.; Ueno, Y.; Hu, D.; Ueda, S.; Sugi, S. Vet.Med. Sci. 1996, 58, 1027-1029.

12）Kramer, J.M.; Gilbert, R.J. “Bacillus cereus and other Bacillus species”. Foodborne Bacterial Pathogens. ed. Doyle, M.P. New York, Marcel Dekker Inc., 1989, 21-27.

13）Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington D.C., ASM Press, 1997, 768p.

14）Isobe,M.; Ishikawa, T.; Suwan, S.; Agata, N.; Ohta, M. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1995, 5, 2855-2858.

15）上田成子. 食衛誌. 1996, 37(3), J145-J154.

16）Granum, P.E.; Baird-Parker, T.C. “Bacillus species”. The Miclobiological Safety and Quality of food. Lund, B.M.; Baird-Parker, T.C.; Gould, G.W.(eds). Gaithersburg, Aspen Publishers, 2000, 1029–1039.

17）de Vasconcellos, F.J.M.; Rabinovitch, L. J. Food Prot. 1995, 58(3), 235-238.

18）Hughes, S.; Bartholomew,B.; Hardy, J.C.; Kramer, J.M. FEMS Microbiol.Lett. 1988, 52, 7-11.

19）Ueda, S.; Kuwabara, Y. Biocontrol Science. 2011, 16(1), 41-45.

20）Ueda, S.; Nakajima, H.; Iwase, M.; Shinagawa, K.; Kuwabara, Y. Biocontrol Science. 2012, 17(4), 191-195.