

27. セレウス菌食中毒におけるセレウリド分析方法の

確立及びセレウリド産生条件の確認

○長尾 舞、清水 悠弥、森村 実加、安藤 尚子（奈良県保健研究センター）
桐山 秀樹（旧所属：奈良県保健研究センター、現所属：奈良県広域水道企業団）

【研究目的】

セレウス菌食中毒はセレウス菌(*Bacillus cereus*)によって起こる食中毒で、厚生労働省発表の食中毒統計によると、過去10年間の事件総数は47件、患者総数は727人であった。事件数は例年一桁台で推移しているが、患者数は数百人に上る年もあり、一件で多数の患者が発生する事件もある。奈良県では、平成27年に焼きめしが原因と推定されるセレウス菌食中毒が発生している。

セレウス菌食中毒は嘔吐型と下痢型に大別され、わが国で発生する食中毒の大半が嘔吐型である。嘔吐型の食中毒は、セレウス菌に汚染された食品中で産生された嘔吐を引き起こす毒素セレウリド（以下「CER」という）の摂取によって起こる。CERは、熱や酸・アルカリ、消化酵素にも安定な毒素であり、また、セレウス菌は耐熱性の芽胞を形成するため、加熱調理された食品でも室温で放置すれば、この菌の発芽増殖を招く。

原因食品としては、穀類及びその加工品（米飯、麺類等）が大部分を占めており、食中毒の発生時期は、気温が高くなる初夏～秋頃に起こりやすい。

本研究では、LC-MS/MSを用いたCERの迅速な分析法を確立し、検査方法の拡充を図るとともに、米飯等にセレウス菌液を添加し、CERの産生条件を確認することで、食中毒の予防に向けた取り組みに資することを目的とする。

【研究の必要性】

セレウス菌食中毒は毎年発生しており、本県では分離培養による陽性判定に3日以上を要する。LC-MS/MSによるCERの早期検出は、原因菌の特定を支援する手段として有効である。また、CERの産生条件を明らかにすることは、食品の取扱いや保存方法に関する具体的な予防策の提案にもつながる。

【研究計画】

1. LC-MS/MSを用いたCERの分析方法の確立

移動相の溶媒組成、グラジエント条件、流速等のLC条件を検討・決定する。次に、CER標準液を用いて、イオン化条件及び測定イオンの選定等、MS測定条件を最適化する。決定した条件で検量線を作成し、直線性を確認する。

2. 米飯等を用いた前処理方法の検討

試料の前処理は食品衛生検査指針を参考に、抽出溶媒はメタノールを用いる。ブランク試料に CER 標準液を添加し、試料採取量及び溶媒量を変更して最適な抽出条件を検討する。試料抽出液の精製にはポリマー系精製カートリッジの Oasis HLB を使い、濃度比率を変えたメタノール・水混液に標準液を溶解し、Oasis HLB に負荷して保持及び溶出の挙動を確認する。前処理条件決定後、ブランク試料を用いてマトリックス効果の検証を行う。

3. CER 分析法の妥当性確認

厚生労働省発出 平成 27 年 3 月 6 日付け食安基発 0306 第 3 号及び食安監発 0306 第 1 号「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」の別紙 1「妥当性確認の方法」に基づき、米飯を用いて本分析法の妥当性を確認する。

4. CER 産生菌を用いた米飯等での CER 産生試験の実施

当センターで過去に分離された嘔吐型食中毒由来 *B.cereus* (CER 合成酵素遺伝子陽性) 菌液を検体に添加し、保存温度及び保存時間を変えて CER 濃度及び菌数を測定する。さらに、pH、水分活性も併せて測定し、CER 産生に影響を及ぼす原因について検討する。

【実施内容・結果】

1. LC-MS/MSを用いた CER の分析方法の確立

装置は、当センターで保有する Waters 社製の液体クロマトグラフ ACQUITY UPLC H-Class システム及び質量分析計 Xevo TQ-S micro を使用した。LC 条件は他府県の文献を参考に検討し、表 1 のとおり決定した。また、MS 測定条件の最適化には、富士フイルム和光純薬(株)製の食品分析用 CER 標準液を用い、イオン化条件及び測定イオンを検討し、表 2 のとおり決定した。

本条件で 0.25～10 ng/mL の範囲で検量線を作成したところ、 $R^2=0.999$ 以上の直線性が得られた。

表1 LC 条件		表2 MS/MS 測定条件						
Column	ACQUITY UPLC BEH C18 2.1 mm×100 mm 粒子径 1.7 μm	Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (V)		
Mobile Phase	A)5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B)5 mM 酢酸アンモニウム メタノール溶液	Cereulide (C ₅₇ H ₉₆ N ₆ O ₁₈)	1170.97	172.31	34	80		
Gradient (B%)	80(0 分)→80(2 分)→100(10 分) →100(13 分)→20(13.1 分) →20(17)→80(17.1 分)→80(20 分)			357.45	34	66		
				314.40	34	72		
				186.29	34	80		
				200.28	34	76		
Column Temp.	50℃	Ion Mode		ESI(+)				
Flow Rate	0.4 mL/min	Source Temp.		150℃				
Injection Volume	5 μL	Capillary Voltage		1.6 kV				
		Desolvation Temp.		400℃				
		Cone Gas Flow		50 L/hr				
		Desolvation Gas Flow		800 L/hr				

2. 米飯等を用いた前処理方法の検討

2. 米飯等を用いた前処理方法の検討

CER を Oasis HLB に保持・溶出させるための最適なメタノール濃度を検討した。負荷試験では、CER 標準液を 50、60、70、80% のメタノール溶液に溶解し Oasis HLB に負荷し、溶出試験では 95% 及び 100% メタノールを用いて CER 回収率を比較した。その結果、Oasis HLB に負荷時は 60%、溶出時は 100% メタノールに決定した。また、試料採取量及び抽出

時のメタノール添加量を検討するため、パックご飯、そうめん、即席麺及びレトルトカレーの4種類の食品を用いて添加回収試験を実施した。CERの添加濃度は、一度の食事対象試料を200 g摂取したと仮定した場合の人における最小発症量1 µgに相当する5 µg/kgとし、試料1 gにメタノール10 mL、5 gにメタノール20 mLを添加して回収率を比較した。その結果、全ての食品で回収率は70～120%を満たし、1 g採取時の方が若干良好な結果となった。これより、試料採取量は1 g、メタノール添加量10 mLとし、前処理フローを図1のとおり決定した。

決定した方法で米飯を前処理し、得られた試験溶液を用いて標準液を希釈後、マトリックス検量線を作成した。各濃度でマトリックス効果（マトリックス存在下の標準溶液面積値／溶媒標準溶液面積値）を算出した結果、いずれも80%～120%の範囲内に収まり、マトリックスの影響は軽微であることが確認された。これにより、定量には溶媒標準による絶対検量線法を採用した。

3. CER 分析法の妥当性確認

決定した分析法について、米飯を用いて妥当性を確認した。まず、CERを含まない米飯から得られたクロマトグラムと5 ng/mL CER標準液のクロマトグラムを比較した結果、CERのピーク付近に定量を妨害するピークはなく、選択性は満たしていた。次に、米飯に5 µg/kgとなるようにCER標準液を添加し、3名の分析者による1濃度2併行の添加回収試験を2日間にわたり実施した。その結果、真度は104.6%、併行精度は2.7%、室内精度は3.0%であり、決定したCER分析法は妥当性の目標値である真度70%～120%、併行精度15%以下、室内精度20%以下を満たす良好な結果が得られた。

4. CER 産生菌を用いた米飯等での CER 産生試験の実施

対象食品は、購入したパックご飯、柿の葉寿司、冷凍焼き飯、冷凍焼きそば、直前に調理したそうめん、米飯とした。あらかじめ水分活性とpHを測定し、セレウス菌の至適pHとされるpH4.9～9.3域外の食品については除外した。水分活性は全ての食品で0.98以上であり、pHはパックご飯、柿の葉寿司で至適pH域外であったため除外し、試験品をそうめん、米飯、冷凍焼き飯及び冷凍焼きそばに決定した。供試菌株は、食中毒事例由来セレウス菌を普通寒天培地に接種し、35℃で24時間培養したものを用いた。試験品に供試菌株を約100 CFU/gとなるよう接種し、25℃、30℃及び35℃の条件で、接種直後、12、18、24、36、42、48、60、66及び72時間培養した。

培養後の試験品をスパーテルでよく混合して試料とし、CER測定用と菌数測定用に分取した。CERの測定は、試料を滅菌後、上記で確立した方法で行い、菌数の測定は通知法を

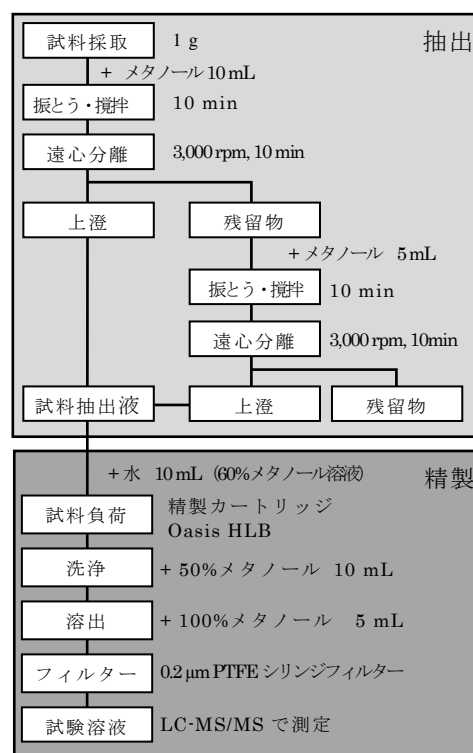


図1 前処理フロー

参考に行った。すなわち、試料にペプトン加生理食塩水を加え 10 倍乳剤を作製しストマッケー処理を行った。適宜段階希釈し、100 μL を NGKG 寒天培地に塗布し、35℃で 18～24 時間好気培養後、菌数を計測した。本試験の結果、冷凍焼きそばでは全ての温度及び経過時間で培地上にコロニーは確認できず、CER 濃度も定量下限値未満であった。冷凍焼きそばの pH は 5.3 と至適 pH 域の範囲内ではあったが、他の食品より酸性寄りであったため、増菌しなかったと考えられる。そうめん、米飯、焼き飯の 3 種の食品については、CER 濃度とセレウス菌数の経時変化を図 2 及び表 3 に示す。対象試料を 200 g 摂取した場合の最小発症量に相当する CER 濃度 5 $\mu\text{g/kg}$ に達する時間は、そうめんでは 25℃で 18 時間以内、30℃、35℃で 12 時間以内、米飯では 25℃で 24 時間以内、30℃、35℃で 18 時間以内、焼き飯では 25℃で 24 時間以内、30℃、35℃で 18 時間以内であった。30℃、35℃では 25℃より早く最小発症量に達したが、CER 濃度はそうめん、米飯では 25℃で高濃度を示した。最も CER 濃度が高くなったのは、そうめんの 25℃、66 時間後で、次に焼き飯の 30℃、66 時間後であった。

3 種の食品について、CER 濃度は概ね 48 時間後までは増加していたが、その後そうめんでは 25℃で 66 時間以降、30℃で 60 時間以降に、米飯では 30℃で 48 時間以降に、焼き飯では 25℃、30℃で 66 時間以降に、35℃で 42 時間以降に減少に転じた。セレウス菌数が静止期に達した時間は、そうめんでは 12～18 時間、米飯で 18～24 時間、焼き飯で 12～36 時間で、そうめん、焼き飯では菌数も 60 時間以降に減少傾向を示していた。

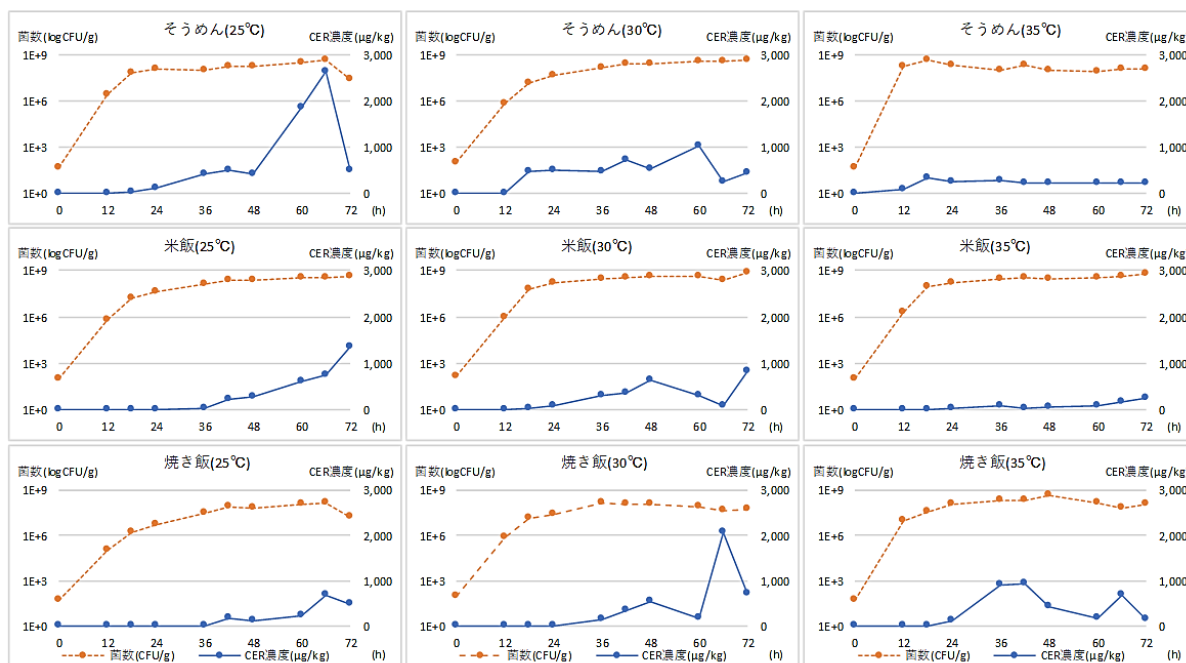


図 2 CER 濃度とセレウス菌数の経時変化

奈賀らの研究では、セレウス菌は 35℃での培養で、12 時間まで対数的に菌数が増加した後、定常期を経て徐々に減少するとともに、定常期から死滅期 (32～70 時間) にかけて CER も減少する旨が報告されている。また、培養液中で CER は加水分解によるエステル開裂で分解し、CER の減少に伴い分解物であるテトラデプシペプチドの増加が確認された

と報告されている。本試験で見られた CER の減少傾向についても、CER が分解された可能性が示唆される。

表 3 CER 濃度とセレウス菌数の経時変化

そうめんにおける CER 濃度及びセレウス菌数							米飯における CER 濃度及びセレウス菌数						
培養時間 (h)	培養温度 25℃		培養温度 30℃		培養温度 35℃		培養時間 (h)	培養温度 25℃		培養温度 30℃		培養温度 35℃	
	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [cfu/g]	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [cfu/g]	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [cfu/g]		CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [cfu/g]	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [cfu/g]	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [cfu/g]
0	0.0	5.0×10 ⁵	0.0	5.0×10 ⁵	0.0	5.0×10 ⁵	0	0.0	1.0×10 ²	0.0	1.5×10 ²	0.0	5.0×10 ⁵
12	0.0	2.5×10 ⁶	5.3	1.5×10 ⁸	88.2	1.5×10 ⁸	12	0.8	6.0×10 ⁵	1.9	9.4×10 ⁵	2.1	2.0×10 ⁶
18	27.9	6.5×10 ⁷	475.0	3.0×10 ⁸	328.7	4.0×10 ⁸	18	4.3	1.5×10 ⁷	30.5	6.0×10 ⁷	11.2	9.5×10 ⁷
24	124.9	1.1×10 ⁸	489.7	4.0×10 ⁸	248.4	2.0×10 ⁸	24	8.2	4.6×10 ⁷	95.4	1.5×10 ⁸	21.4	1.6×10 ⁸
36	409.0	1.0×10 ⁸	482.8	1.0×10 ⁸	283.8	1.0×10 ⁸	36	26.8	1.3×10 ⁸	301.2	2.8×10 ⁸	76.1	2.8×10 ⁸
42	508.9	1.5×10 ⁸	729.7	2.5×10 ⁸	230.4	2.0×10 ⁸	42	213.0	2.6×10 ⁸	363.4	3.7×10 ⁸	30.5	3.3×10 ⁸
48	416.3	1.6×10 ⁸	539.6	2.2×10 ⁸	235.6	1.0×10 ⁸	48	283.9	2.6×10 ⁸	631.5	4.4×10 ⁸	50.1	2.9×10 ⁸
60	1849.5	2.7×10 ⁸	1014.2	1.5×10 ⁷	226.4	8.0×10 ⁷	60	620.6	3.3×10 ⁸	304.4	4.0×10 ⁸	73.5	3.6×10 ⁸
66	2636.8	4.0×10 ⁸	261.1	3.0×10 ⁷	233.0	1.1×10 ⁸	66	734.2	3.4×10 ⁸	92.2	2.2×10 ⁸	168.2	4.2×10 ⁸
72	491.2	2.5×10 ⁷	457.0	1.4×10 ⁸	234.6	1.1×10 ⁸	72	1350.5	4.3×10 ⁸	817.0	6.8×10 ⁸	249.2	6.6×10 ⁸

焼き飯における CER 濃度及びセレウス菌数						
培養時間 (h)	培養温度 25℃		培養温度 30℃		培養温度 35℃	
	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [cfu/g]	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [cfu/g]	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [cfu/g]
0	0.0	5.0×10 ⁵	0.0	1.0×10 ²	0.0	5.0×10 ⁵
12	0.0	1.0×10 ⁵	1.3	8.0×10 ⁵	4.4	8.8×10 ⁶
18	0.8	1.5×10 ⁶	6.0	1.3×10 ⁷	10.0	3.7×10 ⁷
24	12.9	5.0×10 ⁶	13.7	2.5×10 ⁷	128.5	1.1×10 ⁸
36	8.6	3.0×10 ⁷	160.6	1.4×10 ⁸	927.0	2.0×10 ⁸
42	170.9	7.5×10 ⁷	358.8	1.2×10 ⁸	954.0	2.1×10 ⁸
48	137.6	7.0×10 ⁷	537.5	1.1×10 ⁸	431.3	4.9×10 ⁸
60	239.5	1.2×10 ⁸	193.1	8.5×10 ⁷	188.0	1.5×10 ⁸
66	696.1	1.4×10 ⁸	2063.0	4.5×10 ⁷	681.6	6.5×10 ⁷
72	478.0	1.7×10 ⁷	726.2	4.9×10 ⁷	158.4	1.1×10 ⁸

【考察と今後の課題】

CER 濃度の減少については、試験品の測定数を増やしデータを蓄積するとともに、セレウス菌が産生するとされる酵素による CER の分解について、今後確認する予定である。

【参考文献】

- 1) 山下 清佳, 他: 鹿児島県環境保健センター所報, 21, 78-83(2020)
- 2) 上田 成子: セレウス菌, 食中毒予防必携第 3 版, 日本食品衛生協会, 115-125(2013)
- 3) 食品衛生検査指針 微生物編 改訂第 2 版, 363-383(2018)
- 4) 奈賀 俊人: Bacillus cereus が産生する嘔吐型毒素に関する生物有機化学的研究(2020)

【経費使途明細】

使 途	金 額
① 固相抽出カラム Oasis HLB	143,830 円
② 培地 (卵黄乳液)	16,720 円
③ 実験器具 (ホットスターラー)	37,290 円
実験器具 (卓上振とう器)	98,802 円
実験器具 (透明バイアル・蓋)	3,378 円
実験器具 (PP 手付きカップ)	88 円
(利子)	-108 円
合 計	300,000 円
同生命厚生事業団助成金	300,000 円