

食水系感染症病原体の検査法 - 15

セレウス菌

う え だ し げ こ
上 田 成 子
Shigeko UEDA

I. 病原体

1. 病原体

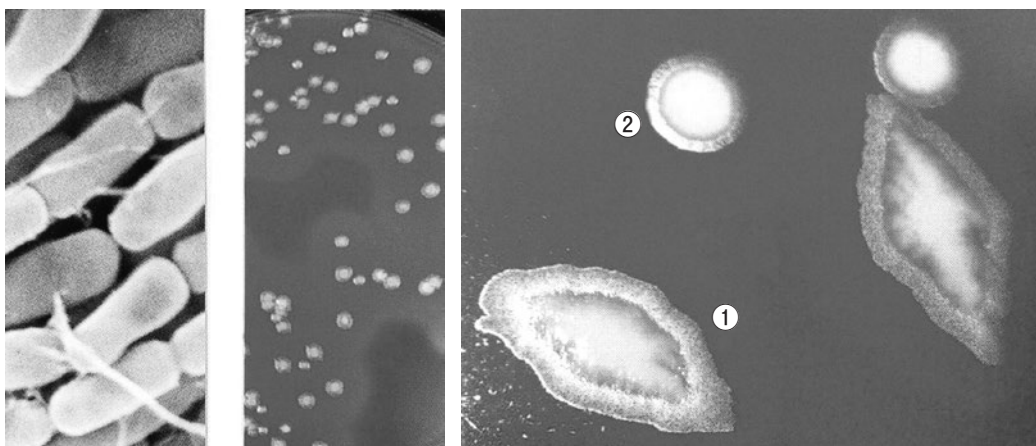
Bacillus cereus は、食中毒細菌として知られており^{1,2)}、Bacillaceae 科の *Bacillus* 属に属するグラム陽性の大型（栄養細胞：1.0～1.2×3.5μm）の芽胞形成桿菌（写真 1）であり、周毛性の鞭毛を有し、芽胞は菌体の中央あるいはやや中央に存在している。本菌は *B.thuringiensis*、*B.mycooides* および *B.anthraxis* と遺伝学的に近縁関係にある。これらのうち、*B.thuringiensis* は、*B.cereus* と類似しており、*B.cereus* 食中毒と関係のある下痢毒を産生し³⁾、*B.cereus* と生化学性状および寒天平板上での育成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る。また、Bergey's

Manual of Systematic Bacteriology (2009 年) では *B.pseudomycooides*、*B.weihenstephanensis* が *B.cereus* と遺伝学的に近縁関係にあるとして追加されている。

2. 疫学

B.cereus 食中毒は臨床症状により嘔吐型と下痢型に分けられる。本菌食中毒の最初の食中毒事例は、1955 年に Hauge⁴⁾ によって報告されたバニラソースを原因食品とする下痢型食中毒である。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⁵⁾ が報告された。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り、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。

B.cereus による食中毒は、しばしば世界各国で発



電子顕微鏡写真

NGKG 培地上
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-）写真 1 *B.cereus* の電子顕微鏡写真, NGKG 培地上コロニー (上田成子作製)

生する食中毒細菌である。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。1978～2016年の39年間の本菌による食中毒事例は453件みられ、1件あたりの患者数は平均24人で、その発生頻度は0.2～2.3%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。原因施設は全発生事例のうち飲食店がほぼ58%と最も多く、次いで家庭、事業所、仕出し屋の順になっている。

原因食品をみると、主なものは穀類およびその加工品（焼飯類、米飯類、麺類等）であり、次いで複合調理食品（弁当類等、その他）である。わが国では、特に焼飯類（チャーハン、焼き飯）が重要視されるが、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食品、チーズや粉乳を加えたバナナ・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。*B.cereus* 食中毒の発生要因は、全国食中毒事件録（1982～2012年）からみると、調理食品の長時間室温放置や前日調理食品の使用、食品の取り扱いの不衛生等によるものが、記載された発生要因のうちほぼ40%と最も多い。また、厨房内の衛生管理の欠陥によるものが21%あり、主に調理場の汚染が原因とされている。

3. 臨床症状

B.cereus 食中毒は臨床症状によって下痢型と嘔吐型食中毒がある（表1）。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（セレウリド（Cereulide））が関与し、食物内毒素と考えられている。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、

表1 *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

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。

一方、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。

II. 検査法

1. 検査法の流れ

B.cereus の生化学性状については表2に示してあり、その検査法については図1に示した。

本菌は普通寒天培地上で好氣的に培養すると、通常、ワックス状の粗澁^{そざう}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醗酵せず、強いレシチナーゼ活性（卵黄反応）を示すことを利用して、分離にさいしては卵黄を加えたNGKG寒天やMYP[®]寒天平板が使用されている（写真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）を形成する。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。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。

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（デンカ生研）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⁷⁾。また、LC/MS（Liquid chromatography/mass spectrometry：液体クロマトグラフィー／質量）分析法⁸⁾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⁹⁾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

表2 *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	<i>B.cereus</i>	<i>B.thuringiensis</i>	<i>B.mycoides</i>	<i>B.anthraxis</i>
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 幅		3~5 1.0~1.2		
芽胞細胞 (μm)・形 位置		楕円形 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
<i>B.cereus</i> 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} °C値 1.2~8.0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		
● 毒素の熱抵抗性 嘔吐毒：121℃, 90分 下痢毒：56℃, 5分		● 芽胞細胞の熱抵抗性 D_{95} °C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%				

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。さらに、嘔吐毒測定のための LC/MS 機器はタンデム四重極型質量分析計で実施すると従来の LC/MS 機器と比較すると、その感度は ng から pg/ μI と鋭敏に検出できる。さらに、嘔吐毒合成酵素を対象としたイムノクロマト法(メルク)、下痢毒合成酵素を対象としたイムノクロマトにより、定性的測定ができ、また、核酸クロマト(カイノス)により定性的な嘔吐毒の検出が可能となった。

2. 分離用培地¹⁰⁾

B.cereus の選択培地として NGKG 培地(日水)、

MYP 培地 (MERCK)、MYP 培地 (OXOID)、BACIL-LUSCEREUS AGAR BASE (PEMBA) (OXOID)、CHROMagar *B.cereus* base (KANTOU) 等があり、いずれも遜色なかったが、著者の経験によると特に CHROM agar *B.cereus* base (KANTOU) 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。

3. 遺伝子検出法

i) 嘔吐毒遺伝子検査の方法¹¹⁾

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

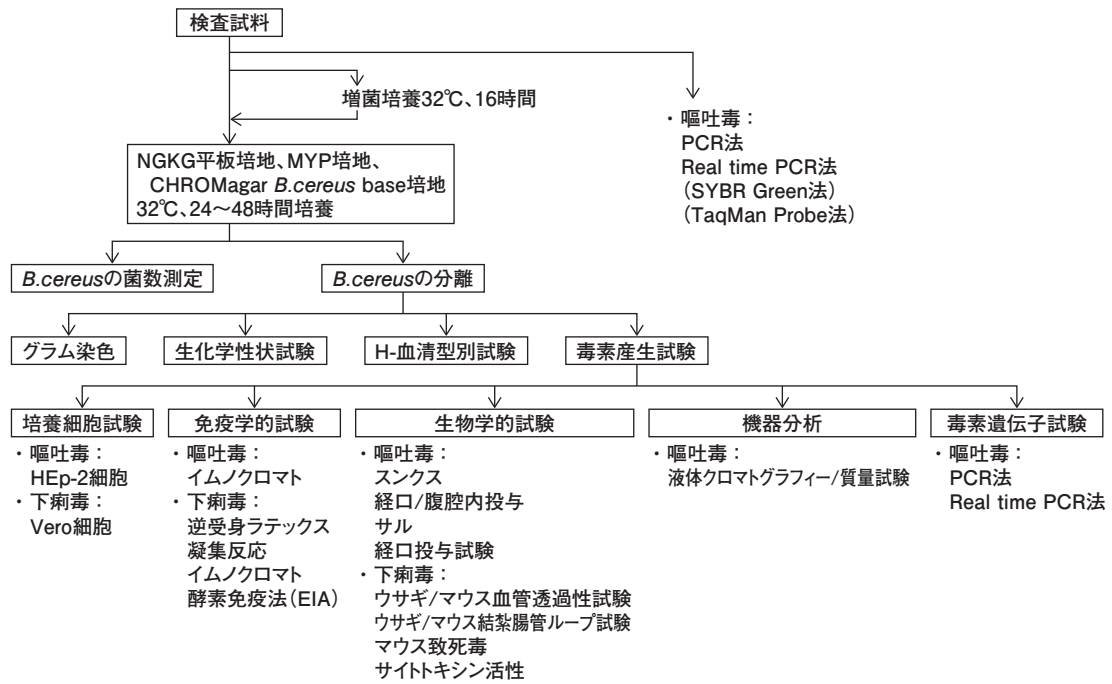


図1 *B. cereus* の分離・同定

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。

① PCR 法

Primer セットには CACGCCGAAAGTGATTATACCAA と CACGATAAAACCATG-AGATAGT を用い、増幅産物の分子量は 176 bp 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 (*Bacillus cereus* PCR Kit : タカラバイオ) 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はない。

② Real time PCR 法

主な方法として、イ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-FCACGCCGAAAGTGATTATACCA
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'両末端に各々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-ACGAGA
AATGCA-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。

ii) 下痢毒遺伝子の検査

下痢毒を産生する遺伝子によるPCR法のプライマー (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 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の菌株が対象となる。

4. 簡易・迅速診断法としてのイムノクロマト法¹²⁾

イムノクロマト法は、検体中の抗原が金コロイド標識特異抗体と結合してシート上を移動し、シート上部に固相化された抗体に捕捉されて、金コロイド由来の赤色の線が現れることにより抗原の検出ができる。また、青色のラテックスで標識した抗体を利用したイムノクロマト法のキットもある。これらの方法は操作が簡便で、個人により結果・判定が異なることが少なく、特別な機器も必要としないので、熟練した技術者のいない規模の小さい検査室にも適している。通常、選択増菌培養を行ってから使用するので、そのキットに最適な選択増菌培養培地を使用して適切な培養条件で培養し、検出に必要な菌数レベルまで増菌させることが重要である。そのためには、イムノクロマトのキットと最適化された選択増菌培地がセットで開発、販売されているものを使用することが勧められる。

B.cereus の嘔吐毒産生能のイムノクロマトキットはシングルパス[®] エメティックトキシンマーカー (メルク)、下痢毒産生能はデュオパス・セレウス・エンテロトキシン (メルク) で毒素産生能の定性試験ができる。この手法は労力、経済性には良い手法と考えられる。なお、下痢毒は90%の菌株が下痢毒を産生することから、本菌のリスクの有無は定量的手法である逆受身ラテックス凝集反応に依存すればよい。また、イムノクロマトキットは食品からの直接検出は食品によって偽造のバンドが出現することが

あるので、この点においても注意を要する。また、嘔吐毒産生キットは核酸クロマトであるスウィフトジーン・セレウリド産生セレウス・カイノス (カイノス) がある。

文 献

- 1) Jean I, Schoeni and Amy C. Lee Wong. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J. Food Prot.*, 2005 ; 68 : 636-648.
- 2) 上田成子: セレウス菌、(熊谷進編代表) HACCP衛生管理計画の作成と実践 改定データ編、中央法規出版; 2003. 122.
- 3) 上田成子. 微生物農薬としての *Bacillus thuringiensis* と食料及び土壌におけるその存在. 食衛誌, 1996 ; 37 : J145-J154.
- 4) Hauge S. Food poisoning caused by aerobic spore forming bacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 1995 ; 18 : 591-595.
- 5) Mossel DAA. MJ koopman. E Jongerius Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl. Microbiol.* 1967 ; 15 : 650-653.
- 6) Fernando Jose Meira De vasconcellos and Leon Rabinovitch. A new formula for an alternative culture medium, without antibiotics, for isolation and presumptive quantification of *Bacillus cereus* in food. *J. Food Protection.* 1995 ; 58 : 235-238.
- 7) Hughes, S., Bartholomew. B., Hardy, J.C and Kramer. J.M. Potential application of a HEp-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic syndrome food poisoning. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1988 ; 52 : 7-11.
- 8) Shigeko Ueda, Hajime Nakajima, Miki Iwase, Kunihiro Shinagawa, and Yoshihiro Kuwabara.: LC-MS analysis of the emetic toxin cereulide produced by *Bacillus cereus*. *Biocontrol Science*, 2012 ; 17(4): 191-195.
- 9) Shigeko Ueda and Yoshihiro Kuwabara.: Rapid Identification of emetic *Bacillus cereus* by Immunochromatography. *Biocontrol Science*. 2011 ; 16(1): 41-45.
- 10) 上田成子: *Bacillus cereus* 食中毒と検査、THE CHEMICAL TIMES 2013 No.2(通巻228号); 2013. 11-18.
- 11) Shigeko Ueda, Manami Yamaguchi and Miki Iwase: detection of emetic *Bacillus cereus* by Real-Time PCR in foods. *Biocontrol Science*, 2013 ; 18(4): 227-232.
- 12) Shigeko Ueda, Manami Yamaguchi, Kayako Eguchi and Miki Iwase.: Identification of cereulide-producing *Bacillus cereus* by nucleic acid chromatography and reverse transcription Real-time PCR. *Biocontrol Science*, 2016 ; 21(1): 45-50.