

## 歴史

*Bacillus cereus* は1887年に最初に分離され、記録された(Frankland and Frankland)。この菌が食中毒を引き起こすという確実な証拠は Hauge(1950, 1955)の発表による。彼は4件の事例を記載し、すべてがバニラソースを含むものであった。この事例とその後20年以上にわたるその他の事例から、この食中毒は媒体となる食品の摂食 8~16 時間後に起こる水様性の下痢が特徴であるといえる。これらの食中毒については Goepfert ら(1972), Kramer and Gilbert(1989)の総説にまとめられている。

1971年、調理米を摂食して1~5時間後に吐き気と嘔吐を特徴とする食中毒が報告された( PHLS, 1972)。この報告は当初懐疑的にみられたが、その後 *B. cereus* のある種の菌株は‘スタフィロコッカス様’の疾患を引き起こすことが出来るという研究が発表された。現在では、*B. cereus* のこの型の食中毒は Hauge によって最初に記載されたときよりはずっと一般的にみられる( Johnson, ) 1984)。

*B. subtilis*, *B. licheniformis* を含むその他の *Bacillus* 種も食中毒と関連しているが、これらの菌種が食中毒起因菌であるとする明確な証拠に欠けていることから、本章では *B. subtilis*, *B. licheniformis* については言及しない。これらについての情報はいくつかの総説にみられる( Gilbert ら、1981 ; Kramer ら 1982 ; Kramer and Gilbert, 1989 ; Shinagawa, 1990 )。

## 分類

bacilli の分類は Smitu ら(1946, 1952)の古典的な報告がなされるまでは混乱していた。彼らは芽胞と芽胞囊の形態にもとづいて3種のグループに分類した。( *B. cereus* を含む )グループ は芽胞囊が芽胞によって膨出していないものと定義した。グループ内の下位分類は細胞の直径にもとづいてなされる。( *B. cereus* を含む )大型細胞種の細胞の直径は 0.9  $\mu\text{m}$  以上である。グループ に属するその他の大型細胞種としては *B. megaterium*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, および *B. thuringiensis* がある。鑑別法を A表と以下に示す。

## 症状

*B. cereus* の食中毒はこの細菌が増殖し、毒素が形成されている食品を摂取した後に発症する。毒素中毒には2種の型がある。第1の型は大量の細胞または毒素を摂取した8-24 時間後に起こる下痢が特徴である。主症状は下痢で、これは通常激しいものでは

なく、24 時間以内に完全に回復するのが特徴である。食品摂取後 1~2 日後の糞便を検査すると *B.cereus* の大量な菌数が見られる。この細菌は回復後速やかに体内には見られなくなる。

毒素中毒の第 2 の型は、毒素を摂取後短時間（1~6 時間）に起こる嘔吐を特徴とする。これも疾患は比較的軽く、12~24 時間以内に回復する。どちらの型も普通の健常人にとっては生命にかかわるものとは考えられていない。

## 病原性

*B.cereus* の多くの菌株は、様々な細胞外代謝産物を作り出す。これには毒素または毒性因子が含まれるが、これらは動物モデルにおける特性や疾病との疫学的関連に基づいて同定されている。これらの代謝産物は主に指数関数的殖期に産生される。これらの代謝産物には下痢型エンテロトキシン (Spira and Goepfert, 1975; Turnbull 他, 1979; Thompson 他, 1984; Kramer and Gilbert, 1989)、嘔吐型因子 (Melling and Capel, 1978; Turnbull 他, 1979; Kramer and Gilbert, 1989)、一次溶血毒 (溶血毒) (Turnbul 他, 1979)、二次溶血毒 (溶血毒) (Kramer and Gilbert, 1989)、ホスホリパーゼ C (Kramer and Gilbert, 1989)、および Ezepechuk and Fluer (1973; Gorina 他, 1975) が記したエンテロトキシンが含まれる。*B.cereus* の主要な毒性代謝産物は、Kramer と Gilbert の総説 (1989) に述べられている。

疾病の 2 つの型は主として 2 つの明らかに異なる系統、すなわち下痢原生毒素と嘔吐性毒素により生じる。下痢原生因子 (Thompson 他, 1984; Kramer and Gilbert, 1989) は、分子量約 3 万 8000~4 万 6000、pI 5.1~5.6 の蛋白質である。この毒素は活発に増殖する細胞により産生され、トリプシンおよびプロナーゼにより、または 56 °C で 30 分間加熱することにより不活性化される。この毒素は抗原性があり、兎の皮膚には脈管透過変性を、またテンジクネズミ (モルモット) には皮膚壊死の障害を引き起こす (Glatz 他, 1974)。脈管透過性 (VP) 試験は回腸結さつ係蹄における液性誘導活性と関連があり、下痢原生活性のために分離したものを調べる液性誘導活性試験よりも実際には実行しやすい。青みを帯びた部分と壊死部分の解釈が VP アッセイ上の主要な問題である (Thompson 他, 1984)。この毒素はペロ細胞に対しても毒性を示し、ペロ細胞に対するその毒性効果と、結さつ回腸係蹄による陽性結果との間には高度な関連性が認められている (Thompson 他, 1984)。この毒素はアデニル酸シクラーゼ環状 AMP システムにおいて活性化することが証明されている。

*B.cereus* の下痢原生型病原性のメカニズムは十分に解明されていない。Spira と Goepfert の研究 (1972) により、回腸に直接注入した *B.cereus* 株は下痢を誘発せず、液体の蓄積は回腸の係蹄内部にある細菌の数の増加と関係しており、一方でこの実験モデルでは陰性だった菌株の細胞数は減少したことが明らかになった。しかしながら、回

腸系蹄に注入する前に培養液のなかで増殖した回腸系蹄陽性菌株は、生体内で増殖した後何らかの反応を示すことはなかった。このことから以下の結論が導き出された。即ち、細菌数の増加は液体蓄積の原因というよりもむしろその結果として起こることであり、腸管内増殖は液体蓄積とは関係がなく、*B. cereus* が下痢を誘導するのはおそらく感染よりもむしろ毒素中毒の結果である。

これとは逆に Thompson 他 (1984) は、猿に対する給餌試験によって、下痢型毒素が消化管内で明らかに分解されることを突き止めた。彼らは、以前に行った猿の給餌試験 (Goepfert, 1974) で用いられた緩衝システム (BHI に続いて重炭酸塩緩衝剤を投与) が、細菌の代謝がない状態で下痢を誘起することを認めた。この著者らは、中和緩衝剤がなければ大量の粗製または部分精製した代謝産物を用いても下痢を誘発することが出来なかった。彼らは *B. cereus* を原因とする下痢は、大量の細菌を摂取した後に、腸管内で産生される毒素により引き起こされると考えた。下痢が始まる前の比較的長い潜伏期間 (8 時間 ~ 16 時間) がこのことを実証している。

これに対して、嘔吐型毒素は、抗原性のない小さなペプチド (分子量 < 5000) であるが、熱抵抗性 (126 °C で 90 分間)、極端な pH 値 (2 から 11)、そして酵素分解性に耐性が非常に強い、即ち、トリプシンとペプシンのいずれにも分解されにくい (Melling and Capel, 1978)。この毒素は定常期によく産生されるが、孢子形成との関連性はまだ明らかにされていない。猿の給餌試験以外には便利な評価分析法がないため、毒素の生物学及び薬理学の理解がなかなか進まないのが現状である。

## 検出及び菌数測定

*B. cereus* による食中毒は、現在のところこの菌の分離と菌数測定によってのみ同定することができ、食中毒にかかったものからの糞便及び嘔吐物と、汚染された食物の両方で同定されるのが望ましい。毒素を分析する方法は、いまだ広く使用されていない。*B. cereus* の単離及びコロニー計数に用いる方法のほとんどには、直接寒天平板法が用いられている。菌種による溶血生産性、レシチナーゼ活性、発酵特性もしくは形態学的特徴を基にして、さまざまな平板培地が開発されてきている。選択薬剤は、通常、競合微生物を阻害し、当該細菌の増殖を促進するように用いられる。

主な選択平板培地には、通常ポリミキシン B が選択薬剤として用いられ、寒天に入れた卵黄上でのレシチナーゼの発現で検証する。最も一般的な培地はマンニトール-卵黄-ポリミキシン寒天培地 (MYP) (Mossel その他, 1967) もしくはポリミキシン-ピルビン酸塩-卵黄マンニトール-プロモチモールブルー寒天培地 (PEMBA) (Holbrook と Anderson, 1980) が用いられる。サンプルの希釈物を MYP 上に塗抹し、30 ~ 32 °C で 20 ~ 24 時間培養して、*B. cereus* の典型的なコロニーを計数する。*B. cereus* のコロニーは、

乾燥し、扁平で”地面の草 ground glass”様の外観を呈し、コロニー周辺は卵黄沈殿物の可視ゾーンで取り囲まれた赤紫色の背景を有するクリームホワイトないし透明なものである。PEMBA 寒天培地は、*B. cereus* の持つレシチン-加水分解特性、マンニトール陰性を利用するものである。PEMBA 寒天培地上で 37℃、18 時間増殖させると、*B. cereus* はトルコブルーから孔雀ブルーの色合いで”地面の草”様外観を呈し、わずかに仮根を有する円鋸歯状の扁平なコロニーを形成する。ほとんどの菌種は、各コロニー周辺に幅 5mm 以下のゾーンを形成する卵黄沈殿反応を有する。*B. cereus* と推定されるコロニー 3 個以上を栄養培地に移植し、形態学的及び生化学的試験を行って確認する。主として血液寒天平板を糞便サンプルの検査に用いる。この培地上では、典型的な *Bacillus* 型のコロニーは完全溶血帯によって取り囲まれている。

## 同定

卵黄-ポリミキシン含有寒天培地上での *B. cereus* がみせた反応と類似する反応をする生物はほとんど存在せず、それゆえ非-*Bacillus* 種との鑑別を必要とすることはほとんどない。*B. cereus* の特異的な同定には、*B. mycoides* (コロニーの形態に基づく)、*B. thuringiensis* (*B. cereus* には副芽胞昆虫毒性結晶がない)、*B. anthracis* (*B. cereus* は運動性を有する) との鑑別が求められるだけである。さまざまな生化学的試験が用いられているが、先に述べたコロニーおよび顕微鏡検査ほど迅速で有効ではない。確認のために用いる生化学的試験には、グルコースからの嫌氣的酸産生能、硝酸塩の亜硝酸塩への還元性、アセチルメチルカルピノール産生能、L-チロシン分解性、溶血性、0.001% リゾチーム存在下での増殖性、仮根成長性、運動性、ファージに対する感受性 (*B. cereus* は陰性で、*B. anthracis* は陽性)、36 - 5 日培養後でのマンニトール、アラビノースとキシロースの非発酵性が含まれる (Lancette and Harmon 1980、Kramer and Gibert 1989)。

食中毒に由来する *B. cereus* 菌株の血清型を分類することは、食中毒の疫学的面を理解する上で重要である。鞭毛抗原にもとづいて *B. cereus* を鑑別するために用いる血清型別スキーム (serotype) が開発されている (Taylor 及び Gilbert 1975、Gilbert と Parry 1977、Kramer その他 1982)。23 種の血清型が同定されてきているが、食中毒ではいくつかの血清型がそれ以外の血清型よりも頻繁に見られている (品川 1990)。いくつかの菌株は現在の抗血清を用いてタイプ別ができないままではあるが、催吐性型の食中毒に関連する菌株の約 70% が血清型 I である。これに対して、下痢性型で見られる血清型のパターンには一貫性はない (Gilbert と Parry 1977)。

Voges-Proskauer 反応、硝酸塩還元性、クエン酸利用能、尿素分解性、デンプン加水分解性、ショ糖及びサリシンの発酵性などの生化学的特性を組み合わせることで生物学的に分類

するのもまた有用な疫学的手法である (Kozasa その他 1977)。生物学的型別は、日常的に使用できるようには標準化されておらず、その適用はそれまでに確立している個人基準に依存します。

## 代替法

Bacillus 同定キットは Analytab Products, Inc. (API) (Plainview, New York, USA) にて入手可能で、選択培地から分離した *B. cereus* の菌株を迅速に確認できる。Oxoid (Inipath Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK) は *B. cereus* の下痢毒の存在を逆受身ラテックス凝集反応によって検出する BCET-RPLA キットを開発した。その後このキットは *B. cereus* 下痢毒の特異性に欠けているとされ、誤った陽性結果をもたらすとされた。

## 自然界での分布：食品における重要性

*B. cereus* は自然界に広く存在する。土、塵埃、穀類作物、植物、動物の毛、水、沈殿物などから容易に分離できる (Kramer and Gilbert, 1989)。その結果、魚における存在および病気の発生は未だよく分かっていないが、あらゆる生の農産物の内外から検出されるのは驚くにはあたらない。

食品原料中の *B. cereus* についての Nygren (1962) の調査によると、その広範囲の汚染を示すように 1546 件の食品素材の 52%、1911 件のクリームおよびデザート菓子類の 44%、431 件の肉・野菜製品の 52% に汚染が見られた。この微生物は乳および乳製品をしばしば汚染し、UHT 処理乳 (48%) を含む乳製品の 9~48% が *B. cereus* に汚染されていた。

芽胞を形成するので、不十分なレトルト加工など食品加工のあらゆる段階で生き残ることができ、食品加工業者が使用するほとんどの原材料に存在する。通常の状態において *B. cereus* は食品中に  $< 10^3$ /g、大抵の場合は  $< 10^2$ /g で存在する。この微生物が疾病を発症するのに必要な最低レベルは  $> 10^5$ /g とされているため、この程度の菌量では無害とみなされている (Hobbs and Gilbert, 1974)。

*B. cereus* の毒素中毒についての詳細な報告には、時間/温度の不適切な組み合わせによって食品中の低レベル (無害) の *B. cereus* がかなり増加してくることが記されている。多くの食中毒発症研究では、媒体となる食品は穀物ないしは穀物を含むもの、またはスパイス原料であった。

ある研究によると 46-100%の生米、10-53%のスパイスが *B. cereus* に汚染されていた(Kramer and Gilbert, 1989)。穀物製品はしばしば加工工程を経るので、栄養細胞フロアはかなり減少する。さらに摂食する前に調理されるが、残存する芽胞フロアはそのまま残ることになる。競合する微生物のない状態では、調理された食品を増殖可能な状態に放置すると *B. cereus* は容易に増殖する。したがってこのタイプの毒素中毒の主要な制御法は、特に調理済み製品における時間と温度の誤用を防止することである。

食品のいかなる微生物の存在や疾病を発症させる可能性は、演繹的に重要であると認識されなければならない。世界的に見れば *B. cereus* 食中毒件数は増加している。しかしながら、食中毒発生に関連しこの微生物に十分な注意が払われるようになったのは、ここ 10~15 年にすぎないことを覚えておかなければならない。例えばボツリヌス症、サルモネラ症、ブドウ球菌毒素中毒症などの多くの食中毒症と比較すると、入手できる情報が少ないことから、食品中の *B. cereus* 菌数が多いことを見出した時にその疾病を *B. cereus* のせいにするには注意がいるといわなければならない。食品中での毒素生産を伴う *B. cereus* の増殖についてはさらに多くの知識が求められ、また、この食中毒の真の評価をする前に食品中の毒素を特異的に検出する方法が開発されなければならない。さらに、*B. cereus* の毒素中毒の 2 種の型の特徴として、他の食中毒症状の深刻さと比較して、症状が緩やかで短期間で済むことが *B. cereus* をより重要性の低い位置に留めることになっている。

### 増殖および生残特性

*B. cereus* の各菌株には、増殖および生存の特性に幅広い差異がある(表 B)。4~5 では増殖できるが 30~35 では増殖できない低温性の菌株もあれば、15~50 や 55 で増殖する中温性の菌株もある。増殖の至適温度範囲は 30~40 である(表 1a)。同様に、増殖の最低 pH も菌株ごとに様々で、酸耐性に依存する。一般的に、塩酸で酸性化した pH4.8 の培地や、乳酸で酸性化した pH5.6 の培地では、増殖は起きない。

食中毒菌株の増殖に及ぼす水分活性の影響については、それほど多くの文献はない。現在のデータでは、NaCl を湿潤剤として用いた  $a_w$  0.92~0.93 では増殖しないことが示されている。しかし、湿潤剤としてグリセロールを含有する培地では、当該菌は  $a_w$  0.93 で増殖できるのに、 $a_w$  0.92 では増殖しない(表 2)。概して、*B. cereus* に対する保存料の影響に関する研究は少ないが、pH5.5 の 0.26%ソルビン酸および pH6.6 の 0.39%ソルビン酸カリウムは増殖阻害環境である(表 5b)。

食品産業にとっては、*B. cereus* の芽胞を死滅させることに関心が持たれており、大きな注目を集めてきた。一般に、*B. cereus* 芽胞の熱抵抗性は大半の芽胞形成中温性細菌の熱抵抗性とよく似ている(表 1c)。しかしながら、菌株によって大きな差異があり、同等の温度に D 値を有する 2~3 の菌株の芽胞の熱耐性は、熱感受性の高い大部分の菌

株の芽胞が示す熱抵抗性よりも 15~20 倍高くなる。さらに、*B. cereus* の芽胞は他の芽胞形成細菌と比較して、放射線照射（表 4）や殺菌剤（表 7）に対して特異な耐性はない。

*B. cereus* の死滅に対する pH と水分活性（NaCl 濃度）の相互影響は、Raevuori と Genigeorgis により研究されてきた（1975 年）。両因子は死滅に大きな影響を及ぼす。しかしながら、死滅速度は、ブライン濃度 5%以下の NaCl を含有し、pH6.1 または 7.5 の基質では比較的遅い（表 8）。

pH や水分活性など、増殖に関する多くの因子については、データが極めて少ない。食品環境中での *B. cereus* の制御に影響を及ぼす因子を十分に理解するためには、こうした分野についての研究が必要である。

製パン工程での *B. cereus* の生残性に関する研究では、0.2%プロピオン酸カルシウムをパン生地に加えると当該菌の発芽とその後の増殖が遅延し、その結果、パンの中の *B. cereus* の存在による食中毒のリスクを十分に無視できることが判明した（Kaur, 1985 年）。

### 毒性の特性とその生産

*B. cereus* のエンテロトキシンを検出する方法は、特異的でも定量的でもない。したがって、こうした毒素に関するデータの多くは疑わしい。これまで、粗挽き牛肉およびラザニアでは、4 で 24 日間または 7 で 12 日間保持した場合に下痢性毒素が生産されることが報告されている。しかしながら、こうした研究は、改良された検出方法を用いて追認する必要があるであろう。米培養液における嘔吐性毒素の生産至適温度範囲は 25~30 である（Melling および Capel, 1978 年）。

嘔吐性毒素は耐熱性を有し、通常の調理操作では消滅しない。データは少ないものの、この毒素は 126 で 90 分間の耐熱性を有すると報告されている（Turnbell 等、1979 年）。反対に、下痢性毒素は熱感受性が高く、56 の 5 分間の処理で不活性化される。

### 制御

*B. cereus* は環境中に広く分布しているので、食品は一般的にこの菌に汚染されている。少菌量を摂取しても病気を引き起こすことはないため、少ない菌数の存在（1 グラム当たりの細胞数 200~300 個）には問題はない。従って、この病気を防ぐには、芽胞の発芽を抑制し、調理済みで食べられる状態の食品における栄養細胞の増殖を阻止することが必要である。

適正に調理した食品を、調理後すぐに摂取した場合には安全である。圧力蒸し、フライ、グリル、ローストなど、ほとんどの調理手段ならば、一般的に、栄養細胞は死滅し、

おそらくは芽胞も死滅する。100℃ またはそれ以下で調理した場合は、一部の芽胞の生存を許すこととなる。芽胞の発芽は、低い温度、pH、 $a_w$ で著しく減少する。嘔吐性毒素は調理操作で破壊されることはない。

調理後のシリアル・ベース食品や蛋白質含有食品を不適切に冷却すると、その過程で細菌が増殖してくることに高い関心が持たれている。食品中の *B. cereus* を増殖させやすい条件としては、調理後に緩慢に冷却したり、10℃ ~ 50℃ の温度で大量の食品を保存することによって芽胞を活性化してしまうといった調理の仕方がある。食品を保存するには、*B. cereus* の増殖を阻止できる温度まで速やかに冷却するべきである。また、食品を温かい状態で保持する場合は、60℃ 以上に維持すべきである。