

## 食中毒事例におけるセレウス菌産生毒素の食品からの検出

秋山 由美<sup>1\*</sup> 齋藤 悦子<sup>1</sup> 辻 英高<sup>1</sup> 押部 智宏<sup>1</sup>  
吉岡 直樹<sup>2</sup> 喜多 博子<sup>3</sup> 近平 雅嗣<sup>1</sup>

### Detection of Food Poisoning Toxins Produced by *Bacillus cereus* in Foods

Yumi AKIYAMA<sup>1\*</sup>, Etsuko SAITO, Hidetaka TSUJI<sup>1</sup>, Tomohiro OSHIBE<sup>1</sup>,  
Naoki YOSHIOKA<sup>2</sup>, Hiroko KITA<sup>3</sup> and Masatsugu CHIKAHIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan,* <sup>2</sup> *Life Science Division,* <sup>3</sup> *Kato Health and Welfare Office*

Both emetic toxin cereulide and diarrheal enterotoxin produced by *Bacillus cereus* were directly detected from the cause food at the food poisoning that occurred in Hyogo prefecture in October 2011. In this case, 700 packed lunchboxes were supplied to the meeting participants and were presumed to be the cause food by epidemiological inquiry of the local health center. *B. cereus* was detected from various kinds of foods in the lunchbox, and maximum number of the viable count was  $6.7 \times 10^7$  cfu/g recognized at koya-dofu (freeze-dried bean curd). Cereulide was determined by LC/TOF-MS, and obtained values were 16-59 ng/g in koya-dofu and meatball contained in the packed lunch. Enterotoxin was also detected in the identical foods by reversed passive latex agglutination kit. Certain regions of the genes coding cereulide, hemolysin BL, and non-hemolytic enterotoxin were amplified by PCR from the isolated *B. cereus* strains, and several kinds of strains carrying different toxin genes were detected from the individual food. Consequently, it was effective in confirming food poisoning toxins produced by *B. cereus* to apply both genetic analysis of plural isolates and direct quantification of toxins in the cause food.

### I はじめに

*Bacillus cereus* (セレウス菌) による食中毒は臨床症状や潜伏期間の違いから、「嘔吐型」と「下痢型」の2つが存在し、おのおの、嘔吐毒素セレウリドと下痢毒素エンテロトキシンが関与している。この下痢性エンテロトキシンの本体は、分子量数万のたんぱく質であり、現在数種類存在することが確認されている。いずれも抗原

性を有し、免疫学的に検出できることから、検出キットも市販されている。

一方、セレウリドは、アミノ酸とオキシ酸が12個連なった環状ペプチドで、抗原性を示さないため、免疫学的な検査キットは開発されていない<sup>1)</sup>。

食中毒の検査において、食品中で菌が産生する毒素を検出することは、菌の分離や遺伝子の検出と並んで、原因を特定するために有用である。これまで、セレウリドの定量には HEp-2 細胞に対する空胞化活性を測定する方法が用いられており、この手法により過去の国内食中毒事例で確認された食品中のセレウリド含量は 10～1280 ng/g であると報告されている<sup>2)</sup>。また近年、セレウリドの分析に LC/MS/MS を用いた機器分析が導入さ

<sup>1</sup>感染症部 <sup>2</sup>健康科学部 <sup>3</sup>加東健康福祉事務所  
\*別刷請求先:〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29  
兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター  
感染症部 秋山 由美

れるようになって、1 ng/g 以下の低濃度まで測定が可能となった<sup>3,4)</sup>。

そこで今回、兵庫県内で発生した食中毒事例において、精密質量による選択性の高い分析が可能な LC/TOF-MS を用いて、食品中のセレウリドの検出を試みた。その結果、セレウス菌が分離された食品から、エンテロトキシンに加えて、セレウリドも検出できたので報告する。

## II 材料と方法

### 1. 検査対象とした食中毒事例の概要

2011年10月、小野市で開催された行事で提供された約700食の弁当を原因とする食中毒が発生した。本件は喫食者数655名のうち有症者数が64名、主症状は嘔吐、腹痛、下痢で、潜伏時間の中央値は4.5時間と、毒素型食中毒を疑う事例であった。

### 2. 試料

弁当を喫食したグループが、手をつけずに冷蔵保管していた弁当を、健康福祉事務所を通じて譲り受けて、検査試料とした。

また、加東健康福祉事務所では、弁当の中の食品中の生菌数測定を行うとともに、冷蔵庫内や調理器具等のふき取り、弁当を提供した飲食店の調理従事者の糞便、有症者の糞便および吐物についても食品衛生検査指針等に従い<sup>5,6)</sup>、食中毒起因菌の検査を行った。

### 3. 試薬および試液

標準品：セレウリドは(有)バイオコントロール研究所製(1 mg 当量/mL)を、バリノマイシンは和光純薬工業(株)製(純度 89.8%)を使用した。ただし、市販セレウリド溶液はバイオアッセイで検定されており、機器分析での定量値は保証されていない。バリノマイシンはセレウリドと類似した構造を有する環状ペプチドで、LC/MSによるセレウリドの定量の標準品として使用されており<sup>7)</sup>、同重量のセレウリドとバリノマイシンの LC/MS 測定で得られるピーク面積比は 1 : 0.899 であると報告されている<sup>4,8)</sup>。そこで、本研究の LC/MS 条件で、セレウリドとバリノマイシンからともにアンモニウム付加イオンを主とするマススペクトルが得られることを確認し、バリノマイシンの標準溶液を面積換算して、セレウリドの定量に使用した。

標準溶液：バリノマイシン 5 mg をメタノール 50 mL に溶解して標準原液 (100 µg/mL) とした。これを 95% メタノールで用時希釈して、1~1000 ng/mL の標準溶液を調製した。なお、バリノマイシンの純度の補正 (×

0.898) とセレウリドへの換算 (×0.899) を行うと、この標準溶液はセレウリドとして 0.807~807 ng/mL に相当する。

試薬：メタノールおよびギ酸は高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業(株)製)、*n*-ヘキサンは残留農薬試験用 (関東化学(株)製)、その他は試薬特級を用いた。

培地：NGKG 寒天基礎培地 (日水製薬(株)製) に、20% 卵黄液を 10% の割合に加えて混合し、平板培地にした。

細菌毒素検出キット：セレウス菌のエンテロトキシンの検出に、逆受身ラテックス凝集反応による検査キット CRETRPLA 「生研」(デンカ生研(株)製)を使用した。

固相抽出用ミニカラム：Oasis HLB (60 mg, 3 mL, Waters 社製) は、メタノール 6 mL および 50% メタノール 6 mL で調整した。

メンブランフィルター：Mini-Uni Prep PVDF Filter, 0.2 µm (Whatmann 社製) を使用した。

### 4. 食品中エンテロトキシンの免疫学的検出

弁当 (Fig. 1) の 9 つの区画ごとに、それぞれの区画に盛り付けられた食品から約 5 g を均等に分取し、3 倍量の滅菌生理食塩水を加えてストマッカーで均質化したものを 3,000 rpm, 20 分間遠心分離し、得られた上清を試料原液とした。この原液および CRETRPLA キット付属の対照エンテロトキシンをマイクロプレート上で 2 倍段階希釈し、各ウェルに感作ラテックスを添加して得られた沈降像を比較して、半定量を行った。

### 5. 食品中セレウリドの LC/TOF-MS による検出

#### 5.1 装置および測定条件

液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計：Agilent technologies 社製 1200 シリーズ LC および 6210MSD TOF



Fig. 1 Picture of packed lunch

Table 1 LC/TOF-MS analytical parameters

Apparatus	Agilent 1200 series LC + 6210 time-of-flight MSD				
Column	Inertsil ODS-SP (150 mm, 3.0 mm, 5 $\mu$ m) (GL Sciences Inc.)				
Column temperature	40°C				
Mobile phase	A: 0.5% HCOOH + 100 mM HCOONH <sub>4</sub> , B: CH <sub>3</sub> OH (A / B = 10 / 90, 20 min / 1 sample)				
Flow	0.5 mL/min				
Injection volume	10 $\mu$ L				
Ionization	ESI, positive				
Capillary voltage	4000 V				
Nebulizer gas	60 psi				
Drying gas	13 L/min at 350°C				
Fragmentor voltage	200 V				
Scan rate	1 cycle/sec ( $m/z$ 50 - 3200)				
Reference mass used for internal calibration	$m/z$ 121.05087 (purine), $m/z$ 922.00980 (HP-0291)				
Analyte	Formula	Monoisotopic mass	Monitor ion ( $m/z$ )		Retention time (min)
			[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>	
Cereulide [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val] <sub>3</sub>	C57H96N6O18	1152.6781	1170.7119	1191.6413	9.94
Valinomycin [D-Hyiv-D-Val-L-Lac-L-Val] <sub>3</sub>	C54H90N6O18	1110.6312	1128.6650	1149.5943	9.25

測定条件は Table 1 のとおりである。

## 5.2 試験溶液の調製

試料に等重量の水を加えて、均一化した 5.0 g (試料 2.5 g 相当量) を採取し、食品衛生検査指針<sup>9)</sup>に従って Fig. 2 に示す手順で、試験溶液 (試料濃度 5 g/mL) を調製した。なお、低極性のため LC 分析での保持時間が長くなる食品由来の妨害成分を除去する目的で、*n*-ヘキサンによる洗浄を追加した。

## 6. PCR 法によるセレウス菌毒素遺伝子の検出

検査材料から分離されたセレウス菌について、嘔吐毒素セレウリドの合成遺伝子<sup>9)</sup>および、溶血性下痢毒素 HBL (hemolysin BL) と非溶血性下痢毒素 NHE (non hemolytic enterotoxin) の産生遺伝子 *hbl* (A, C および D)<sup>10)</sup> と *nhe* (A, B および C)<sup>11)</sup> の有無を PCR 法で調べた。

滅菌蒸留水に懸濁した菌体を、アルミブロック恒温槽で 102°C、10 分間加熱後直ちに氷冷し、12,000 rpm、5 分間の遠心分離により得られた上清液を DNA 試料液とした。タカラバイオ(株)製の PCR 反応キットおよび Invitrogen 社合成のプライマーを用い、最終濃度が (×1) Ex Taq Buffer, 200  $\mu$ M dNTP Mixture, 0.4  $\mu$ M プライマーペア, 25 U/mL Ex-Taq となるように調製し、これに DNA 試料液 2.5  $\mu$ L を加えて、全量を 25  $\mu$ L とし

Sample 2.5 g + water 2.5 mL

methanol 25 + 20 mL  
shake for 10 min  
centrifuge (3,000 rpm, 10 min)

Supernatant

*n*-hexane 10 mL  
shake for 5 min

Lower layer

evaporate and dissolve in  
3 mL of 50% methanol

HLB Clean-up

load sample  
wash with 3 mL of 50% methanol  
wash with 3 mL of 80% methanol  
elute with 3 mL of 95% methanol

Euate

evaporate under N<sub>2</sub> stream  
dissolve in 0.5 mL of 95% methanol  
filter with membrane filter (0.2  $\mu$ m)

Sample solution (5 g/mL)

LC/TOF-MS analysis

Fig. 2 Sample preparation method for LC/TOF-MS analysis of cereulide in food

た。遺伝子の増幅は Table 2 に示した条件で行い、エチジウムブロマイドを含む 1.5% アガロースゲル電気泳動で目的遺伝子を確認した。

Table 2 PCR procedure to detect toxin genes of *B. cereus* in this work

Target gene	<i>ces</i>	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>
Primer	CesF1	HBLA-N	HBLC-N	HBLD-N	nheA-S	nheB-S	nheC-S
name <sup>a)</sup>	CesR2	HBLA-C	HBLC-C	HBLD-C	nheA-A	nheB-A	nheC-A
Thermal	95°C 10min	95°C 5min			95°C 10min		
cycler	94°C 1min	94°C 0.5min			94°C 1min		
conditions	55°C 1min } × 35 72°C 1min } 72°C 10min	62°C 1min } × 36 72°C 1min } 72°C 10min			55°C 1min } × 35 72°C 1min } 72°C 10min		
PCR product (bp)	1271	873	399	439	500	770	582
Reference	9	10	10	10	11	11	11

a) Sequence of each primer was shown in our previous report (12).

### Ⅲ 結果および考察

#### 1. 食品中の生菌数

Table 3 に、弁当中の食品から検出されたセレウス菌の生菌数を示した。煮物（高野豆腐、えび、グリーンピースおよび人参）から  $10^7$  cfu/g 以上のセレウス菌が検出され、最高は  $6.7 \times 10^7$  cfu/g であった。セレウス菌は環境細菌のため、一般に食品からは  $10^7 \sim 10^8$ /g 程度の菌が検出され、食中毒時の感染菌量は  $10^7 \sim 10^8$ /g 以上とされている<sup>13)</sup>。本事例では、セレウス菌は弁当の煮物中で、消化器症状を起こすのに十分な菌量に増殖していたと考えられる。なお、弁当は9つの区画に分かれていたが、運搬や保管時の傾き具合で、隣接する食品が接触したことも考えられる。

#### 2. 食品中のセレウス菌産生毒素

##### 2.1 下痢毒素エンテロトキシン

CRET-RPLA による検査で、煮物およびミートボールからエンテロトキシンが検出された (Table 3)。エンテロトキシンの検査は、生菌数の測定とは異なる2パックの弁当で行った。検査に用いた試料原液を卵黄加 NGKG 寒天培地に塗布し、30°C で 24 時間培養した結果、煮物およびミートボールからセレウス菌が分離できた。

##### 2.2 嘔吐毒素セレウリド

セレウス菌が分離できた煮物の中で重量が多かった高野豆腐とミートボールについて、セレウリドの検査を行った。LC/TOF-MS 分析で得られたクロマトグラムとマスペクトルを Fig. 3 に示した。精密質量に基づくイオンを  $m/z$  (質量と電荷数の比) の幅 ±0.005 で抽出することにより、選択性の高いピークを得ることができた。

マスペクトルでは、アンモニウム付加イオンが、 $^{13}\text{C}$  に由来する同位体イオンとともに検出され、また、微量のカリウム付加イオンも検出できた。各々のイオンの  $m/z$  の値は、Table 1 に示した計算値と 1ppm 程度しかずれておらず、セレウリド標準品と保持時間およびマスペクトルが一致したことから、セレウリドのピークと同定した。

定量は、II 材料と方法 3 で述べたように、バリノマイシンを標準として行い、食品中のセレウリド含量は 16 ~ 59 ng/g となった (Table 3)。この値は、既報の食中毒事例でのセレウリド含量<sup>2)</sup>の範囲内にあった。ヒトにおけるセレウリドの最小発症量は、およそ 1 μg と推定されていることから、この食品は 20 ~ 60 g 程度の摂取で発症すると考えられる。本法の定量限界値は 0.5 ng/g (S/N ≥ 10) で、1 日で数検体の試料の前処理および定量を行うことができた。

なお、セレウス菌の生菌数と毒素産生量の間に関連性は認められなかったが、これは、各々の食品に異なる毒素を産生する複数の菌種が混在しているためと推測された。

#### 3. 分離されたセレウス菌の遺伝子検査

当所で弁当中の煮物とミートボールから分離したセレウス菌各 4 菌株、および健康福祉事務所で分離したセレウス菌 14 菌株 (食品由来 9 菌株とその他 5 菌株) について、PCR 法で毒素遺伝子を検出した結果を Table 4 に示した。

セレウリド遺伝子は、当所で煮物およびミートボールから分離したそれぞれ 1 菌株および 2 菌株から検出されたが、健康福祉事務所で分離した食品由来株からは検出

Table 3 Isolation of *B. cereus* and detection of its toxin from foods in a packed lunch

Partition No. in a packed lunch	Food	Laboratory H	Laboratory R <sup>a)</sup>			
		Viable count (cfu/g)	Colony isolation	Enterotoxin (ng/g) <sup>b)</sup>	Cereulide (ng/g) <sup>c)</sup>	
1	Vinegared dish	0	—	—	nt	
2	Stewed foods				(Koya-dofu)	
	Koya-dofu	6.7×10 <sup>7</sup>	}	+	100	16
	Shrimp	6.7×10 <sup>7</sup>				
	Green peas	1.2×10 <sup>7</sup>				
	Carrot	5.6×10 <sup>7</sup>				
3	Fruits					
	Orange	5.0×10 <sup>2</sup>	}	—	—	nt
	Pineapple	2.8×10 <sup>4</sup>				
4	Grilled dish					
	Salmon	5.7×10 <sup>5</sup>	}	—	—	nt
	Kinpira	7.7×10 <sup>4</sup>				
5	Fried foods					
	Pork cutlet	0	}	—	—	nt
	Quail egg	0				
6	Meatball	3.7×10 <sup>5</sup>		+	10	34
				+	10	59
7	Rice with sesami	0	—	—	—	nt
8	Rice with plum	0	—	—	—	nt
9	Rice with furikake	0	—	—	—	nt

a) In laboratory R, foods in a same partition were mixed and tested as a whole, except for the analysis of cereulide. Two packs of lunch were tested separately, and each value was described for positive samples. +:positive, -:negative, nt:not tested

b) Semi-determined by CRET-RPLA test kit.

c) Determined by LC/TOF-MS using valinomycin as a standard

されておらず、同一食品からの分離株であっても、異なる毒素遺伝子の検出結果となった。なお、健康福祉事務所で新たに患者便から分離した新鮮なセレウス菌1菌株からセレウリド遺伝子が検出された。健康福祉事務所での食品からの分離菌株は、NGKG 平板培地上で1~2週間経過したため、遺伝子の欠失や脱落により陰性となったとも考えられる。このため、セレウス菌の毒素遺伝子検出に際しては、培養後速やかに複数の菌株を釣菌して、PCR 検査等を実施することが必要と考えられた。

エンテロトキシン関連の遺伝子は、HBL 関連遺伝子が食品4菌株とふき取り1菌株から、NHE 関連遺伝子が食品7菌株、ふき取り1菌株、患者および調理従事者便3菌株から、3種類そろって検出された。HBL 遺伝子に比べて、NHE 遺伝子の検出頻度が高い傾向は、前報<sup>12)</sup>と同様であった。食品中のエンテロトキシンの検出に用いた CRET-RPLA キットでは、*hblC*によりコードされる HBL の L<sub>2</sub> コンポーネントが検出される<sup>6,14)</sup>。検査

キットで陽性となった煮物とミートボールについては、健康福祉事務所で煮物中の高野豆腐と人参から分離した菌株、および当所でミートボールから分離した菌株から *hblC* が検出された。

セレウス菌のエンテロトキシン HBL と NHE は、それぞれ3種類の遺伝子でコードされる3つのコンポーネントの相互作用によって、最大の活性を発揮すると考えられている<sup>15,16)</sup>。このため、遺伝子検査によって病原性を調べるには、個々の遺伝子に対応した多くの反応系による検査が必要である。

PCR 法による遺伝子検出法では、菌の毒素産生性を簡便かつ迅速に判定することができる。しかし、本事例のように遺伝子配列が異なる複数の菌種が混在する場合には、必ずしも全ての菌種を分離し、遺伝子をもれなく検出できるとは限らない。また、遺伝子の保有と発現が一致しない場合も考えられ、食中毒事例における原因の追究には、食品中の毒素量を確認することが重要である。

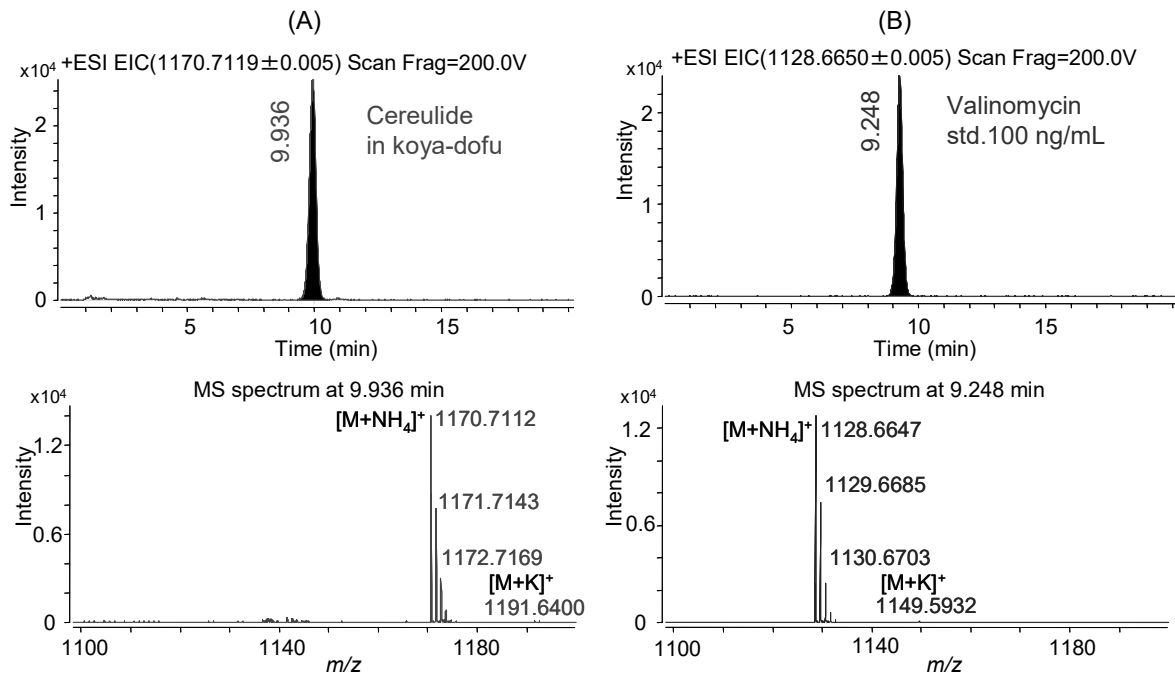


Fig. 3 Extracted ion chromatograms and mass spectra obtained by LC/TOF-MS  
 (A) Cereulide detected in koya-dofu, (B) Valinomycin standard solution (100 ng/mL)

Table 4 Occurrence of genes encoding toxins of *B. cereus* strains isolated from samples

Source	Laboratory	Cereulide <i>ces</i>	Enterotoxin					
			HBL complex			NHE complex		
			<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>
Stewed foods (including koya-dofu, shrimp, green peas, and carrot)	R	+	-	-	-	+	+	+
		-	-	-	-	+	+	+
		-	-	-	-	+	+	+
		-	-	-	-	+	+	+
Meatball	R	-	+	+	+	-	+	+
		+	-	-	-	+	+	+
		-	-	-	-	-	+	+
		-	-	-	-	-	+	+
Koya-dofu	H	-	+	+	+	+	+	+
Shrimp	H	-	-	-	-	-	-	-
Green peas	H	-	-	-	-	-	-	-
Carrot	H	-	+	+	+	+	+	+
Orange	H	-	+	+	+	+	+	+
Pineapple	H	-	-	-	+	-	-	-
Salmon	H	-	-	-	-	-	-	-
Kinpira	H	-	-	-	-	-	-	-
Meatball	H	-	-	-	-	-	-	-
Swab of a refrigerator's shelf	H	-	+	+	+	+	+	+
Vomit from patient	H	-	-	-	-	-	-	-
Feces from patient	H	+	-	-	-	+	+	+
Feces from patient	H	-	-	-	+	+	+	+
Feces from cook	H	-	-	-	-	+	+	+

+ : a PCR product of the expected size was observed, - : no PCR product was observed

R : Public Health Science Research Center, H : Health and Welfare Office

#### IV 要 旨

2011年10月に兵庫県内で発生した食中毒事例において、弁当の煮物から $10^7$  cfu/g以上のセレウス菌が検出された。食品中のセレウス菌産生毒素の検出にLC/TOF-MSを用いた結果、煮物中の高野豆腐、およびミートボールから、嘔吐毒素セレウリドが16~59 ng/g検出され、定量も可能であることが判明した。また、同じ食品から、逆受身ラテックス凝集キットで下痢毒素エンテロトキシンも検出された。原因となったセレウス菌の遺伝子検査では、異なる毒素産生遺伝子を持つ複数の菌種が同一食品中に混在していた。本事例では、セレウス菌が産生する食中毒毒素を、複数の菌株の遺伝子検査と食品中の毒素の定量により確認することができた。

#### 文 献

- 1) 安形則雄：セレウス菌とその毒素：嘔吐毒素とエンテロトキシン，食品衛生研究，**60**, 27-35 (2010)
- 2) Agata, N., Ohta, M. and Yokoyama, K. : Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods, Int. J. Food Microbiol., **73**, 23-27 (2002)
- 3) 梶田弘子, 岩淵香織, 藤井伸一郎, 畠山えり子 : LC/MS/MSによる嘔吐毒セレウリドの分析, 岩手県環境保健研究センター年報 第7号(平成19年度版)
- 4) 八津川洋一, 飯田華子, 永田和子, 宮本雅史, 松田高博, 伊藤裕信, 中村宗知, 藤田和弘 : LC-MS/MSによる穀物加工食品および粉ミルク中のセレウリドの分析, 食衛誌, **52**, 287-293 (2011)
- 5) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 微生物編, p.266-282, 社団法人 日本食品衛生協会, 東京 (2004)
- 6) 河合高生, 浅尾 努 : *Bacillus cereus*, 仲西寿男, 丸山 努監修, 食品由来感染症と食品微生物, p.439-455, 中央法規出版, 東京 (2009)
- 7) Häggblom, M. M, Apetroaie, C., Andersson, M. A. and Salkinoja-Salonen, M. S. : Quantitative Analysis of Cereulide, the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*, Produced under Various Conditions, Appl. Environ. Microbiol., **68**, 2479-2483 (2002)
- 8) Biesta-Peters, E. G., Reij, M. W., Blaauw, R. H., in't Veld, P. H., Rajkovic, A., Ehling-Schulz, M. and Abee, T. : Quantification of the Emetic Toxin Cereulide in Food Products by Liquid chromatography-Mass Spectrometry Using Synthetic Cereulide as a Standard, Appl. Environ. Microbiol., **76**, 7466-7472 (2010)
- 9) Ehling-Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A., Shaheen, R., Andersson, M., Märtlbauer, E. and Scherer, S. : Identification and Partial Characterization of the Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Responsible for Cereulide Production in Emetic *Bacillus cereus*, Appl. Environ. Microbiol., **71**, 105-113 (2005)
- 10) Rowan, N. J., Caldow, G., Gemmell, C. G. and Hunter, I. S. : Production of Diarrheal Enterotoxins and Other Potential Virulence Factors by Veterinary Isolates of *Bacillus* Species Associated with Nongastrointestinal Infections, Appl. Environ. Microbiol., **69**, 2372-2376 (2003)
- 11) Hansen, B. M. and Hendriksen, N. B. : Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis, Appl. Environ. Microbiol., **67**, 185-189 (2001)
- 12) 榎本美貴, 西海弘城, 辻 英高, 坪谷嘉子, 稲田幸司郎, 山岡政興 : セレウス菌およびウエルシュ菌が同時に分離された集団食中毒の分子疫学解析, 兵庫県立健康環境科学研究センター紀要 第3号, 12-18 (2006)
- 13) 上田成子 : セレウス菌, 防菌防黴, **30**, 511-524 (2002)
- 14) Beecher, D. J. and Wong, A. C. : Identification and Analysis of the Antigens Detected by Two Commercial *Bacillus cereus* Diarrheal Enterotoxin Immunoassay Kits, Appl. Environ. Microbiol., **60**, 4614-4616 (1994)
- 15) 品川邦汎, 重茂克彦 : セレウス菌 (*Bacillus cereus*) エンテロトキシン, 櫻井 純, 本田武司, 小熊恵二編, 細菌毒素ハンドブック, p.47-54, サイエンスフォーラム, 東京 (2002)
- 16) Lund, T. and Granum, P. E. : Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*, Microbiology, **143**, 3329-3336 (1997)