

[原 著]

High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry 法を用いた
Bacillus cereus セレウリド（嘔吐毒）検出法の検討川村久美子¹⁾・平間佑美¹⁾・安形則雄²⁾・伊藤秀郎¹⁾・太田美智男³⁾¹⁾ 名古屋大学医学部保健学科・検査技術科学専攻基礎検査学講座²⁾ 名古屋市衛生研究所・微生物部³⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学

(平成 16 年 11 月 11 日受付, 平成 17 年 3 月 16 日受理)

Bacillus cereus 嘔吐型食中毒の診断においては, 分離株のセレウリド産生性を検査することが重要である。近年, マススペクトロメトリー (High-performance liquid chromatography (HPLC)-mass spectrometry (MS)) を用いたセレウリド高感度検出法が行われるようになってきたが, 定量性や操作法において未だ改良すべき点が残されている。

本測定法ではバリノマイシンを内部標準物質として添加し, Multiple Reaction Monitoring (MRM) モードによる HPLC-MS/MS 解析を行った結果, 精製セレウリド 1.0 pmol 以上を検出することができた。さらに, 精製セレウリドとバリノマイシンとのマスクロマトの面積比を算出することにより得られた検量線は, 0.1 から 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の広範囲内で原点を通る直線性を示した。また, 本論文で用いたアセトニトリル抽出液の上層を Hydrophilic Durapore (PVDF) 膜にてろ過する簡易セレウリド抽出法の結果は, 従来法である HEp-2 細胞空胞化変性試験結果と一致した。

本測定法は従来法と比較して, 感度・特異性および定量性に優れており, 簡易抽出法を導入することにより, 簡便で迅速なセレウリド検出法になることが示された。

Key words: *Bacillus cereus*, セレウリド, HPLC-MS, 検出法

はじめに

Bacillus cereus は, 土壌, 塵埃などの自然界に広く分布するグラム陽性好気性芽胞菌で, 食品を汚染し, 腐敗, 変敗などを起こすことが知られている¹⁾。*B. cereus* 食中毒は下痢型と嘔吐型の 2 種類に分けられており²⁾, これらの食中毒に関与する物質はそれぞれ本菌が産生する下痢原性毒素 (エンテロトキシン) および嘔吐毒であると考えられている^{3~5)}。

B. cereus が産生する嘔吐毒は Agata ら⁶⁾が単離・精製して, 化学構造 (分子量 1191.642 (D-O-Leu-D-

Ala-L-O-Val-L-Val)₃) を決定し, セレウリドと命名した。精製ならびに合成セレウリドは赤毛ザルやスキンスに投与後 0.5~5 時間で嘔吐を引き起こし^{7,8)}, さらに HEp-2 細胞に対して空胞形成を示す⁸⁾。Agata ら⁸⁾はセレウリドによる細胞の空胞化を電子顕微鏡で観察し, 細胞内のミトコンドリアが膨張していることを示した。また, 1997 年 Mahler ら⁹⁾はセレウリドに汚染されたスパゲティを食し, 急性肝不全で死亡した症例における肝細胞の病理学的所見および動物実験から, セレウリドが肝細胞のミトコンドリア毒であることを証明した。彼らが述べているように, セレウリドは嘔吐などの消化器症状を主とする食中毒症状を引き起こすのみならず, 肝臓などの細胞内のミトコンドリアに傷害を及ぼすことから, 本食中毒診断にとっては原因食品中から直接セレウリドを検出すると同時に, 分離した菌株のセレウリド産生性を検査することが重要である。

従来, セレウリド検出法としては主に HEp-2 細胞

著者連絡先: (〒461-8673) 名古屋市東区大幸南 1-1-20
名古屋大学医学部保健学科・検査技術科学
専攻基礎検査学講座

川村久美子

TEL: 052-719-3116

FAX: 052-744-2107

E-mail: kumiko@met.nagoya-u.ac.jp

空胞化変性試験による生物活性の測定が行われてきた¹⁰⁻¹³⁾が、より高感度な測定法として、マスマスプロトメトリー (High-performance liquid chromatography (HPLC)-mass spectrometry (MS)) を用いた測定法や、PCR 法によるセレウリド合成酵素遺伝子の検出^{14, 15)}が報告されている。HPLC-MS 分析を用いたセレウリド定量法は、従来の HEp-2 細胞空胞化変性試験よりも、高感度で特異的な測定法である^{14, 15)}が、セレウリドの抽出操作が煩雑であること、定量性が乏しいなどの問題点があり、測定法の普及にはさらに改良が必要であった。今回、我々は HPLC-MS 分析を用いたセレウリド定量法の改良を目的とし、内部標準物質としてバリノマイシンを用いた Multiple Reaction Monitoring (MRM) モードによる定量法について検討を行った。さらに操作法の簡便化および測定時間の短縮を図るために、セレウリド簡易抽出法の有用性についても検討を行った。

I. 方法および材料

材料

1) 使用菌株: 名古屋市衛生研究所より供与された嘔吐型食中毒由来 *B. cereus* NC7401 株、ほか 10 株 (セレウリド産生陽性) および *B. cereus* type strain ATCC14579 株 (セレウリド産生陰性) を使用した。

2) 使用培地: 10% スキムミルク培地 (Difco) および LB 培地 (Difco) を使用した。

3) HEp-2 細胞: 名古屋市衛生研究所より供与されたものを使用した。培養培地は 10% Fetal bovine serum (FBS; Invitrogen Corporation) を含む Minimal Essential medium (MEM; 大日本製薬) を使用し、37°C, 5% CO₂ 存在下にて培養を行った。HEp-2 細胞は 3 日ごとに継代を行い、MEM で細胞を 1 回洗浄後、細胞凍結保存液 BLC-1 セルバンカー (和光純薬工業) に浮遊させたものを -80°C に保存した。

方法

1. 培養条件

スキムミルク培地への接種菌量を一定にするために、菌液の調製を行った。LB 培地 3 mL にて 37°C, 24 時間の前培養を行い、この培養液を遠心 (3000 rpm, 20 分), phosphate-buffered saline (Mg²⁺, Ca²⁺-free) (PBS (-)) にて洗浄した後、得られたペレットを PBS (-) 3 mL に再浮遊した。培養は 10% スキムミルク培地 1 容に対し、先に調製した菌液 1/1000 容を接種して、30°C, 200 rpm, 30 時間の振とう培養を行った。

2. 検量線用標準セレウリド (精製セレウリド) の分離・精製

セレウリドの分離・精製は Agata らの方法⁶⁾に従って行った。10% スキムミルク培地 (200 mL) にて *B. cereus* NC7401 株を一夜振とう培養 (30°C, 200 rpm) した後、121°C, 15 分間滅菌した。滅菌後の培養液にアセトニトリル-*n*-ヘキサン混液を 1:1 の割合に混和し、分液漏斗振とう器にて 250 rpm, 10 分間振とうした後、室温に 20 分間静置した。得られた上層を Sep-Pak C₁₈ カートリッジ (Waters Co., Milford, MA, USA) を用いた FPLC にて精製後、ロータリーエバポレーターにて蒸発乾固した。これを 75% メタノールで溶解し、精製セレウリドとした。なお、精製セレウリドの毒素力価は HEp-2 細胞空胞化試験によって測定した。

3. 菌株からのセレウリド簡易抽出法

各菌株は 10% スキムミルク培地 10 mL にて一夜振とう培養 (30°C, 200 rpm) した後、121°C, 15 分間滅菌した。滅菌後の培養液にアセトニトリルを 1:1 の割合に混和し、室温にて 200 rpm, 3 時間振とう後、数分間静置した。得られた上層を Hydrophilic Durapore (PVDF) 膜 (Millex-LG 0.2 μm, ミリポア社) を用いてろ過し、HPLC-MS 分析用試料とした。

4. HEp-2 細胞空胞化変性試験によるセレウリド毒素活性の測定

セレウリド毒素の活性測定は Hughes らの方法¹⁰⁾に従って行った。各菌株は 10% スキムミルク培地 3 mL にて一夜振とう培養 (30°C, 200 rpm) した後、121°C, 15 分間滅菌した。滅菌後の菌液を 1500 rpm, 30 秒間遠心し、上清をサンプルとした。96 穴滅菌平底マイクロプレートに PBS (-) 25 μL を分注し、第 1 穴にサンプル 25 μL を加え、以後連続 2 倍希釈系列を行った。プレートの各穴に継代 1 日目の HEp-2 培養液 (2 × 10⁴ cells/mL) 100 μL を加え、37°C, 5% CO₂ 存在下に 2 日間培養した。結果の判定は、倒立位相差顕微鏡にて細胞内の空胞形成の有無を観察し、空胞の認められた最終希釈倍数に検出感度 5 ng/mL¹⁶⁾ を乗じた値をセレウリド力値 (産生量) とした。

5. HPLC-MS 分析によるセレウリドの測定

HPLC-MS 分析は UK-Phenol (Imtakt 社, 1.0 × 50 mm) を備えた MAGIC 2002TM HPLC System (Michrom BioResources 社) および三連四重極型マスマスプロトメトリー API300 (Applied Biosystems 社) を用いた。HPLC では流速 50 μL/min にて移動相 A (MilliQ 水-アセトニトリル-ギ酸 = 98:2:0.1) と移動相 B (MilliQ 水-アセトニトリル-ギ酸 = 2:98:0.1)

を用いたリニアグラディエントにより分離した。HPLCにサンプル 10 μ L を注入し、分離後、三連四重極型マスマスペクトロメトリー API300 を用いて Multiple Reaction Monitoring (MRM) モードによる質量分析を行い、データを解析した。検量線用標準物質として *B. cereus* NC7401 株から精製したセレウリドを用いた。内部標準としてはセレウリドと化学構造および化学的挙動が類似しているバリノマイシン (和光純薬工業)⁶⁾ を用いた。

II. 結 果

1. 精製セレウリドのマスマスペクトル

精製セレウリドの質量分析は三連四重極型マスマスペクトロメトリー API300 を用いて行った。図 1 に示すように、精製セレウリドは m/z 1153.7[M+H(1152.7+1)]⁺: 水素イオン付加体, 1170.8[M+NH₄(1152.7+18)]⁺: アンモニウムイオン付加体, 1191.7[M+K(1152.7+39)]⁺: カリウムイオン付加体の 3 種類のイ

オン付加体として検出された。

2. セレウリドおよびバリノマイシン (内部標準物質) の HPLC-MS 分析

2.1 MRM モードにおけるプリカーサーイオン (親イオン) とプロダクトイオン (娘イオン) の特定

本測定法ではバリノマイシンを内部標準物質として添加し、MRM モードにより分析を行うために、精製セレウリドおよびバリノマイシンのプリカーサーイオン (親イオン) およびプロダクトイオン (娘イオン) を特定した。図 2(a) に示すように、精製セレウリドについては m/z 1170.8[M+NH₄]⁺ をプリカーサーイオンとして選択し MS/MS 分析を行った結果、 m/z 1125.8 のプロダクトイオンの生成を確認した。同様に、 m/z 1153.7[M+H]⁺ についても MS/MS 分析を行った結果、同一の m/z 1125.8 のプロダクトイオンの生成を確認したことにより、 m/z 1153.7 および m/z 1170.8 のプリカーサーイオンと m/z 1125.8 のプロダクトイオンの組み合わせをセレウリドと特定し

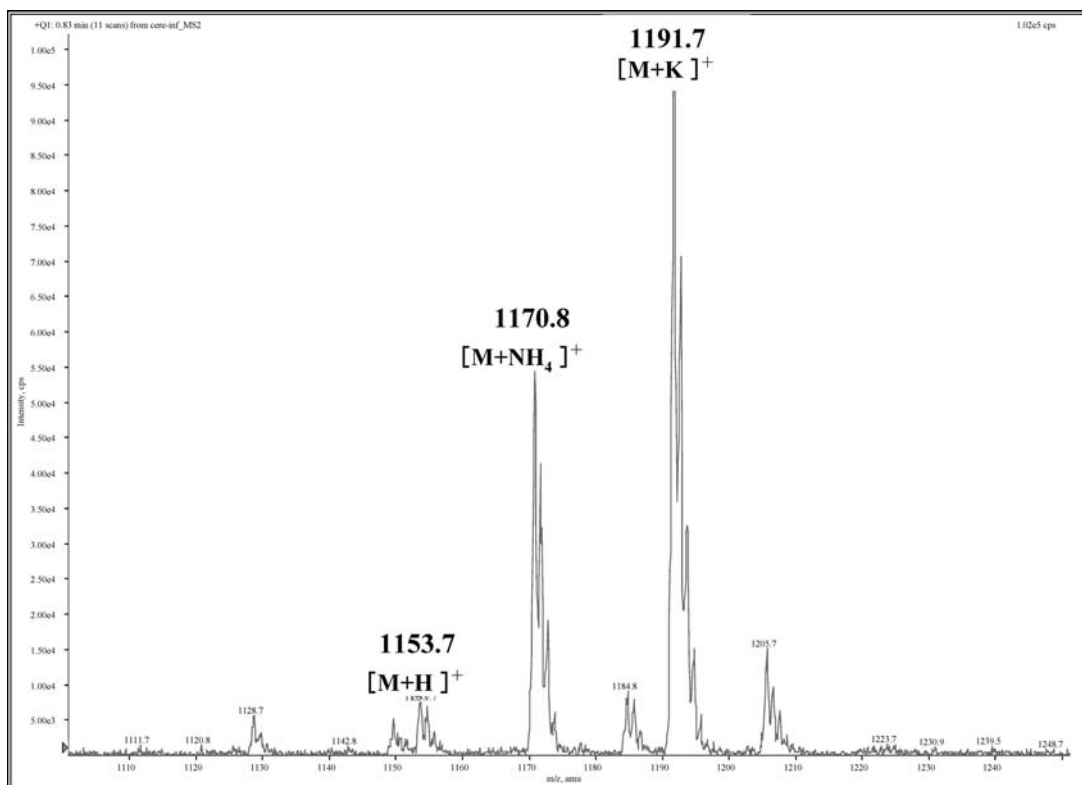


図 1 精製セレウリドのマスマスペクトル

m/z 1000 から 1250 までのマスマスキャンを示す。精製セレウリドは 3 種類のイオン付加体として検出され、 m/z 1153.7 は水素イオン付加体 [M+H(1152.7+1)]⁺, 1170.8 はアンモニウムイオン付加体 [M+NH₄(1152.7+18)]⁺, 1191.7 はカリウムイオン付加体 [M+K(1152.7+39)]⁺ を示す。

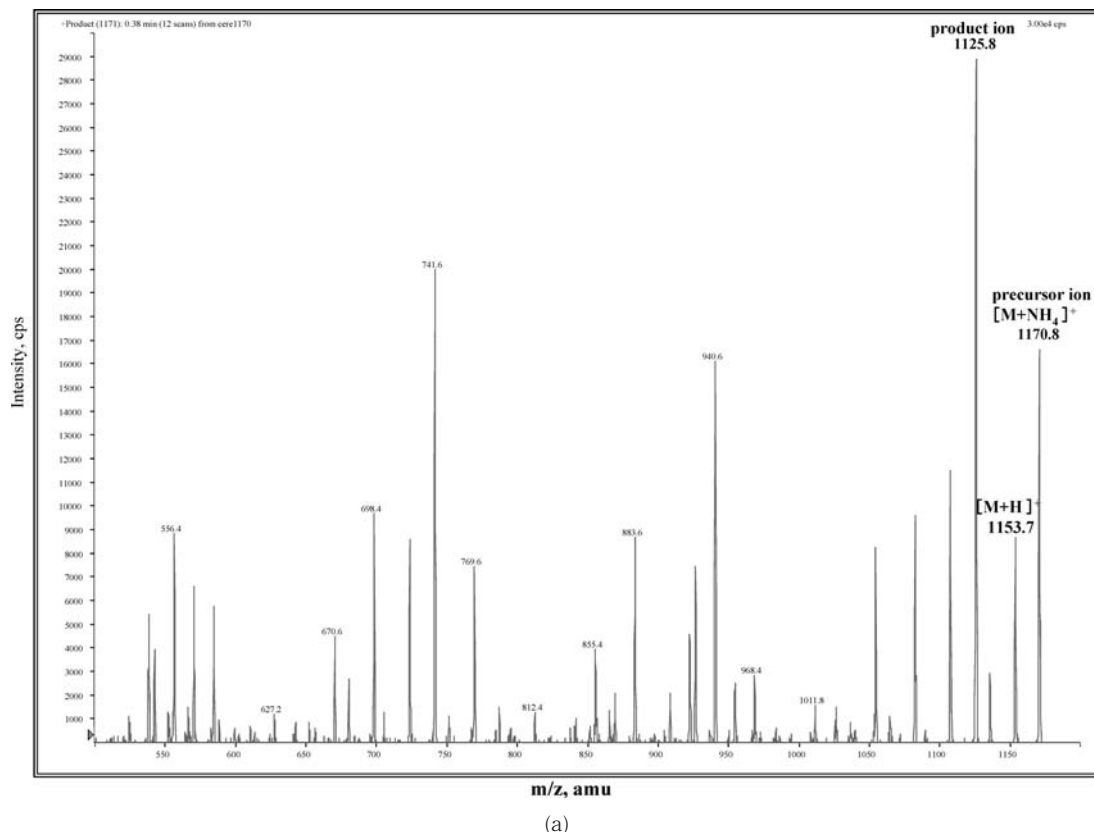


図 2 精製セレウリドおよびバリノマイシンのプロダクトイオン解析

(a): 精製セレウリドの MS/MS スペクトル

m/z 1170.8 をプレカーサーイオンとしたときの MS/MS スキャンを示す。

(b): バリノマイシンの MS/MS スペクトル

m/z 1128.6 をプレカーサーイオンとしたときの MS/MS スキャンを示す。

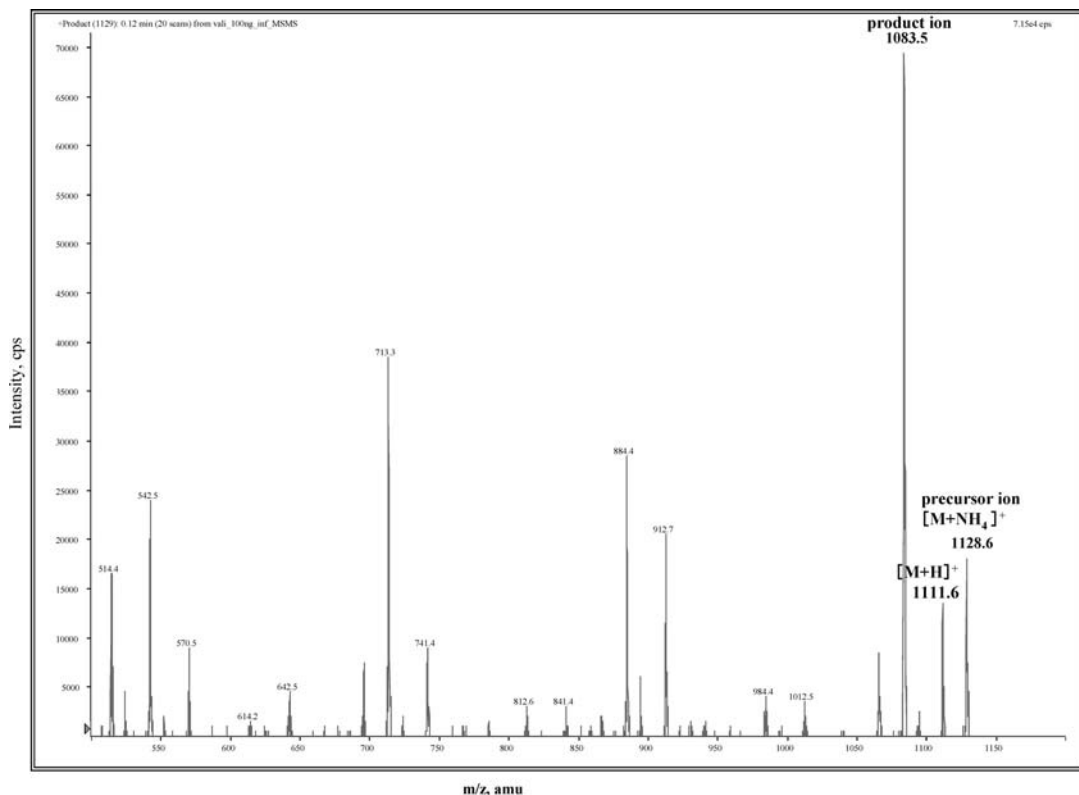
特定の質量 (m/z) のイオンをプレカーサーイオンとして選択し、エネルギーを与えて分解させると、そのイオン構造を反映したプロダクトイオンが得られる。

た。同様の分析にて m/z 1111.6 $[M+H]^+$ および m/z 1128.6 $[M+NH_4]^+$ のプリカーサーイオンと、これに対応する m/z 1083.5 のプロダクトイオンの組み合わせをバリノマイシンと特定した (図 2(b))。

2.2 HPLC-MS/MS おける retention time の測定

先の結果をもとに、MAGIC 2002TM HPLC System および三連四重極型マススペクトロメトリー API300 を連結して、MRM モードを用いた精製セレウリドおよびバリノマイシン混液の HPLC-MS/MS 分析を行った結果、図 3(a) に示すように retention time 10.35 分と 10.69 分にピークが認められた。10.35 分に検出されたピークからは、図 3(b) に示すように m/z 1111.6 および m/z 1128.6 の二つのプリ

カーサーイオンと各プリカーサーイオンから生成される m/z 1083.5 のプロダクトイオンが認められた。この結果から、retention time 10.35 分に検出されるピークをバリノマイシンと同定した。同様の分析にて 10.69 分に検出されたピークからは m/z 1153.6 および 1170.8 の二つのプリカーサーイオンから m/z 1125.8 のプロダクトイオンが得られたことから、retention time 10.69 分に検出されるピークをセレウリドと同定した (図 3(c))。以上の結果から、retention time 10.69 分に検出されたピークを選択して MS/MS 分析を行い、 m/z 1125.8 のプロダクトイオンが得られた場合をセレウリド陽性と判定した。なお本測定法における精製セレウリドおよびバリノマイシンの検出限界値は 1.0 pmol 以上であった。



(b)

図2 つづき

3. 検量線の作成

本測定法をセレウリド定量法として用いる場合、最も重要となる検量線について検討した。検量線の標準物質として *B. cereus* NC7401 株から分離・精製した精製セレウリドを用い、一定濃度に希釈した。バリノマイシン 20 ng/mL と各精製セレウリドを 1:1 の割合で混和し、セレウリド濃度 0.1, 0.5, 2.5, 5.0, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ の標準物質を作製し、これを用いて検量線の作成を行った。本精製法によるセレウリドは、図3に示すように H イオン付加体と NH_4 イオン付加体の 2 ピークとして検出されるため、各成分の MRM のマスクロマトから面積を求め、2 種類の付加体の面積を加算し面積比 (セレウリドの面積/バリノマイシンの面積) を算出した。図4に示すように面積比を縦軸に、セレウリド濃度を横軸にとり両者の関係を見ると、検量線はセレウリド濃度 0.1 から 25.0 $\mu\text{g/mL}$ の間で、 $Y=8.3132X$, $R^2=0.9949$ の原点を通る直線を示した。

4. 簡易抽出法による臨床分離株からのセレウリドの検出

嘔吐型食中毒事例から分離されたセレウリド陽性 *B. cereus* 10 株およびセレウリド陰性 *B. cereus* type strain ATCC14579 株を用いて、本簡易抽出法によるセレウリドの検出を試みた。嘔吐型食中毒事例分離 *B. cereus* 10 株は、いずれも 10.69 分付近にピークが認められた。得られたピークの MS/MS 分析を行った結果、 m/z 1125.8 のプロダクトイオンが認められ、セレウリド陽性と判定した。一方、ATCC14579 株は retention time 10.69 分付近にピークは認められず、セレウリド陰性と判定した。これらの結果は従来法である HEp-2 細胞空胞化変性試験の結果と一致した。

III. 考 察

B. cereus は環境中に広く分布しているため食品の規格基準設定が困難であり、現在フランス・スウェーデンなどわずかな国で、カット野菜やバニラソースパウダーなど一部食品についての閾値が設定されている

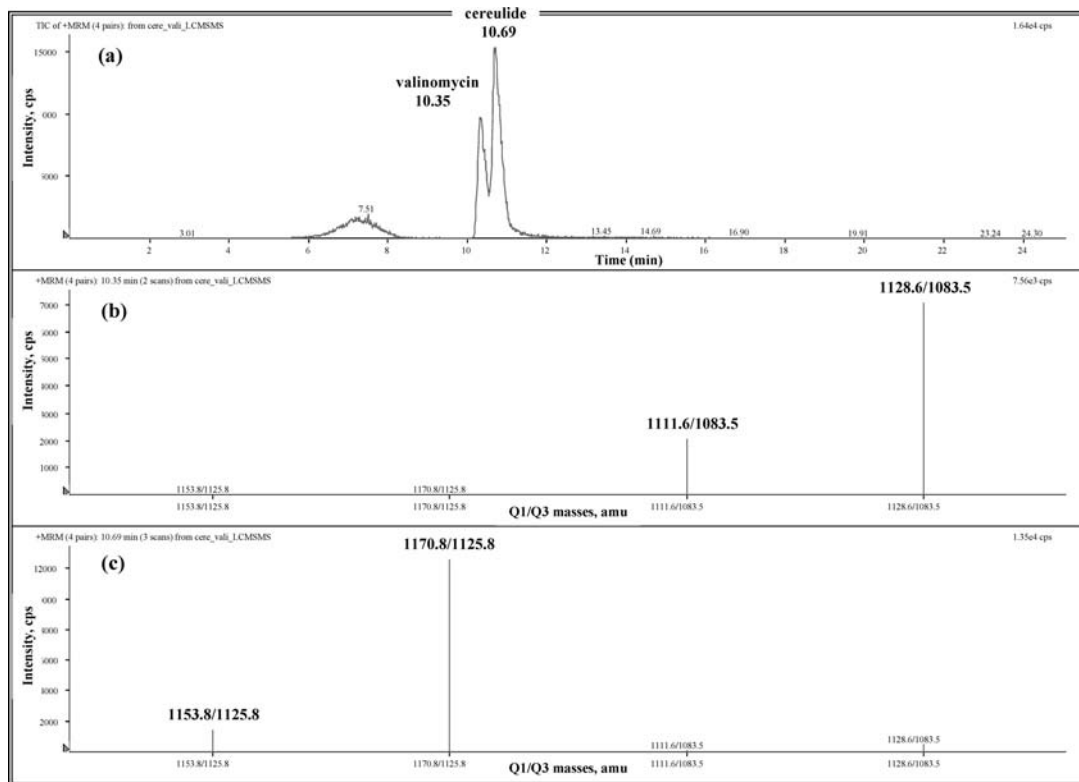


図 3 精製セレウリドおよびバリノマイシンの HPLC-MS/MS 分析

(a): HPLC-MS/MS による Total Ion Chromatogram

(b): retention time 10.35 分のマスペクトル

1111.6/1083.5 および 1128.6/1083.5 は m/z 1111.6 および m/z 1128.6 のプリカーサーイオンと、各イオンから生じた m/z 1083.5 のプロダクトイオンを示す。

(c): retention time 10.69 分のマスペクトル

1153.8/1125.8 および 1170.8/1125.8 は m/z 1153.8 および 1170.8 のプリカーサーイオンと、各イオンから生じた m/z 1125.8 のプロダクトイオンを示す。

のみである¹⁷⁾。しかし、これらの国々においても閾値以下の *B. cereus* 汚染による食中毒事例が報告されている¹⁸⁾。一方、国内では Agata ら¹⁹⁾が嘔吐型食中毒事例における原因食品中のセレウリド濃度および原因菌株のセレウリド産生量について報告しているが、嘔吐型食中毒のヒトへの発症最少毒素量については十分明らかになっていない。このような理由から、高感度で迅速なセレウリド定量法の開発が望まれているなか、近年 HPLC-MS 分析を用いた定量法が報告され^{14, 15)}、注目されている。HPLC-MS 分析を用いた定量測定については、すでに Häggblom ら¹⁴⁾がバリノマイシンを標準物質とした検量線からセレウリド濃度を算出する方法を報告している。しかし、日本質量分析学会は、HPLC-MS による定量分析をする際には、目的物と内

部標準物質の量比を算出して検量線を作成する必要があると述べており²⁰⁾、彼らの方法では不十分であると考えられる。今回、我々はこの問題点を改良するため、日本質量分析学会推奨法²⁰⁾に基づき、内部標準物質としてバリノマイシンを添加し、多成分一斉分析に適している MRM モードにて HPLC-MS/MS 解析を行うセレウリド定量法を検討した。セレウリドおよびバリノマイシンのピークを各々分離・特定したのち、精製セレウリド・バリノマイシン混液を用いた検量線の作成を試みたが、検量線の作成にあたり問題となったのは、精製セレウリドが HPLC-MS 分析にて NH_4 イオン付加体および H イオン付加体の 2 種類のイオン付加体として検出され、この二つのイオン付加体の割合が同一株においても必ずしも一定でなかったことであ

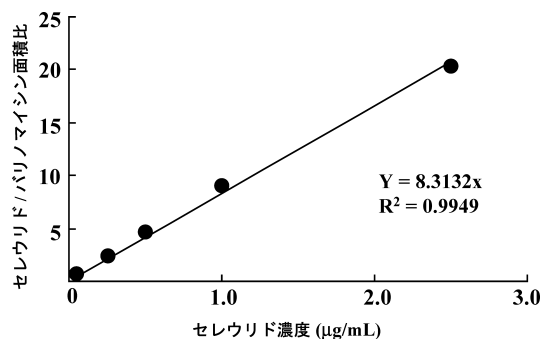


図4 検量線の直線性

バリノマイシン (20 ng/mL) と精製セレウリド希釈系列を 1:1 の割合で調製し、セレウリド終濃度 0.1, 0.5, 2.5, 5.0, 25.0 µg/mL の標準物質を作製した。各濃度における H⁺付加体と NH₄⁺付加体の MRM のマスクロマトから面積を求め、2種類の付加体の面積を加算し、面積比 (セレウリドの面積/バリノマイシンの面積) を算出した。

る。このようにイオン付加体の割合が試料の抽出方法などにより変化することは Isobe ら²¹⁾によっても報告されており、今回の場合も分離・精製の操作過程での微細な条件変化が影響したためと考えられた。この二つのイオン付加体の割合が一定でないことは定量値の正確性および測定法の安定性などに影響すると考えられたため、これを回避する方法が必要である。我々は HPLC-MS/MS 分析における2種類のイオン付加体のマスクロマト面積を加算し、内部標準物質との面積比 (セレウリドの面積/バリノマイシンの面積) を求めることにより検量線を作成した。得られた検量線は 0.1 から 25.0 µg/mL の間で、原点を通る直線性を示しており、傾き ($Y=8.3132X$) にも再現性があることから、本条件において良好な検量線が得られたものと考ええる。また、検量線の範囲 (0.1~25.0 µg/mL) は、嘔吐型食中毒事例から分離された *B. cereus* の約 70% が 1 µg/mL 以上のセレウリド産生性を示し、また原因食品中のセレウリド濃度が食品 1 g 当たり 0.02~1.28 µg であったこと¹⁹⁾などを考慮しても、十分な範囲と考える。

HPLC-MS 分析の検出感度は 1.0×10^{-15} mol 程度であると言われており²²⁾、我々も同様の成績を得ている。しかし、今回のように HPLC-MS/MS 分析を用いてセレウリドを検出・同定する場合、正確かつ再現性がある結果を得るためにはセレウリド 1.0 pmol (1.0×10^{-12} mol) 以上が必要であった。従来法の HEp-2 細胞空胞化変性試験の検出感度は 5 ng/mL ($4.2 \times$

10^{-15} mol/µL)¹⁶⁾ であるので、1 反応ウェル (25 µL) 中のセレウリド約 0.105 pmol を検出できることになり、これと比較すると本測定法の検出感度はやや低い。しかし、これまでの我々の検討では、HEp-2 細胞空胞化変性試験において精製ならびに合成セレウリドを用いた場合には 5 ng/mL より検出することができたが、臨床分離菌株の培養上清を用いた場合は検出感度が約 10 倍程度低くなる傾向が認められた。一方、HPLC-MS 分析は精製セレウリドと臨床分離菌株を用いた場合の検出感度に差が認められず、安定した検出感度が得られた。これらのことから、HPLC-MS 分析は HEp-2 細胞空胞化変性試験よりも実際の適用ではやや高感度な測定法であり、測定材料が検出感度に影響を及ぼさないことが、HPLC-MS 分析を用いる大きなメリットの一つと考えられる。

HPLC-MS 分析によるセレウリド測定法を普及するためには、操作法の簡便化および測定時間の短縮が必要である。これまでに報告されている HPLC-MS 分析によるセレウリド測定法はメタノールなどの有機溶媒による抽出およびロータリーエバポレーターによる溶媒の蒸発乾固などの煩雑な操作が必要である。我々はアセトニトリル抽出と PVDF 膜ろ過による簡便抽出法により得られたサンプルを用い、セレウリドの検出が可能であることを示した。本方法では PVDF 膜によるろ過により、一部のセレウリドがろ過膜部分に残り収量が減少することが考えられたため、サンプルをろ過した後にサンプルの 1/2 量のアセトニトリルを通す工夫をした。簡便抽出法の結果が従来法の HEp-2 細胞空胞化変性試験の結果と一致したことから、セレウリド産生性を定性的に確認する目的にはこの簡易抽出法で十分対応できるものとする。しかし、上述したように、セレウリドの H イオン付加体と NH₄ イオン付加体の割合が試料の抽出方法により変化し²¹⁾、このことが生物アッセイによる測定値とマススペクトロメトリーによる定量値が相関しない原因であるという指摘もある。定量測定における抽出量の再現性や生物アッセイとの相関性について、さらに検討が必要であると思われる。

近年、厚生労働省医薬食品局の調査により、粉ミルクへのセレウリド混入による新生児の感染例が明らかとなり²³⁾、基準値設定の導入が検討されつつある。このように食中毒事例のみならず、食品安全の観点からも正確なセレウリド濃度の測定がますます重要となってきた。本測定法は HPLC による成分の分離および質量分析を行うことから、共雑物の影響を回避したセレウリドに特異的な測定法である。さらに検出感

度も高く、食品から直接セレウリドを検出・同定することができ、食品衛生の分野においても有用なセレウリド検出法になるものと思われる。また、本測定法は精製セレウリドを用いた検量線の作成が可能であったことから、今後さらに条件の最適化を行うことによって優れた定量法になることが期待される。

謝 辞 本研究の遂行にあたりまして、ご指導・ご助言を賜りました名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学講座の岡本 陽氏、名糖産業株式会社・名古屋研究所の橋川真之介氏、ならびに名古屋大学大学院医学系研究科・教育研究機器部門の山川良典氏に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 鈴木 昭, 河西 勉. 1961. 脱脂粉乳に由来する好気性有芽胞かん菌の衛生学細菌学的研究, 分離菌の生物学的性状と動物実験に対する毒性について. 食品衛生学雑誌 2: 26-32.
- 2) Turnbull, P. C. B., J. M. Kramer, K. Jorgensen, et al. 1976. Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. Am. J. Clin. Nutr. 32: 219-228.
- 3) Glatz, B. A., J. M. Goefert. 1973. Extracellular factor synthesized by *Bacillus cereus* which evokes a dermal reaction in guinea pigs. Infect. Immun. 8: 25-29.
- 4) Lund, T., P. E. Granum. 1996. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. FEMS Microbiol. Lett. 141: 151-156.
- 5) Spira, W. M., J. M. Goefert. 1972. *Bacillus cereus*-induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. Appl. Microbiol. 24: 341-348.
- 6) Agata, N., M. Mori, M. Ohta, et al. 1994. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEP-2 cells. FEMS Microbiol. Lett. 121: 13-34.
- 7) Shinagawa, K., H. Konuma, H. Sekita, et al. 1995. Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEP-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 130: 87-90.
- 8) Agata, N., M. Ohta, M. Mori, et al. 1995. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 129: 17-20.
- 9) Mahler, H., A. Pasi, J. M. Kramer, et al. 1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. N. Engl. J. Med. 336: 1142-1148.
- 10) Haughes, S. 1988. Potential application of a HEP-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. FEMS Microbiol. Lett. 52: 7-12.
- 11) Andersson, M. A., R. Mikkola, J. Helin, et al. 1998. A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1338-1343.
- 12) Finley, W. J. J., N. A. Logan, A. D. Sutherland. 1999. Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1811-1812.
- 13) 安形則雄, 太田美智男. 1996. *Bacillus cereus* の食中毒毒素. 日本細菌学会誌 51: 993-1002.
- 14) Häggblom, M. M., C. Apetroaie, M. A. Andersson, et al. 2002. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2479-2483.
- 15) Jääskeläinen, E. L., M. M. Häggblom, M. A. Andersson, et al. 2003. Potential of *Bacillus cereus* for producing an emetic toxin, Cereulide, in bakery products: Quantitative analysis by chemical and biological methods. J. Food Prot. 66: 1047-1054.
- 16) Isobe, M., T. Ishikawa, S. Suwan, et al. 1995. Synthesis and activity of cereulide, a cyclic dodecadepsipeptide ionophore as emetic toxin from *Bacillus cereus*. Bioorg. & Med. Chem. Lett. 5: 2855-2858.
- 17) European Commission. 1997. Harmonization of safety criteria for minimally processed foods. Inventory report FAIR concerted actions. FAIR CT96-1020. European Commission, Brussels, Belgium.
- 18) Notermans, S., J. Dufrenne, P. Teunis, et al. 1997. A risk assessment approach for foodborne *Bacillus cereus* and its toxins. J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 84: 51S-61S.
- 19) Agata, N., M. Ohta, M. Mori. 1996. Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. Current Microbiology 33: 67-69.
- 20) 日本質量分析学会. 2003. 定量分析をわかりやすく説明すると. p. 106-111. マススペクトロメトリーってなあに(平山和雄, 明石知子ら編集, 第1版), 国際文献印刷社, 東京.
- 21) Pitchayawasin, S., M. Kuse, K. Koga, et al. 2003. Complexation of cyclic dodecadepsipeptide, cereulide with ammonium salts. Bioorg. Med. Chem. Lett. 13: 3507-3512.
- 22) 志田保夫. 2002. はじめて質量分析計に出会う人のために. p. 2-26. これならわかるマススペクト

ロメトリー (志田保夫, 笠間健嗣ら著, 第1版),
化学同人, 東京.

23) 橋本和広, 中村健治, 岩朝 徹, 他. 2003. セレウ

ス菌による敗血症・脳膿瘍の一例. 日本新生児学
会雑誌 39(2): 333.

A Detection Method of Cereulide, an Emetic Toxin of *Bacillus cereus*, Using High-Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry

Kumiko Kawamura,¹⁾ Yumi Hirama,¹⁾ Norio Agata,²⁾ Hideo Ito,¹⁾ Michio Ohta³⁾

¹⁾ Department of Medical Technology, Nagoya University School of Health Sciences, 1-1-20 Daikominami, Higashi-ku, Nagoya 461-8673

²⁾ Nagoya City Public Health Research Institute, 1-11 Hagiya-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8615

³⁾ Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550

This paper describes a sensitive and specific chemical assay for cereulide, the heat-stable emetic toxin, produced by *Bacillus cereus*. The previous method for measuring cereulide is a bioassay that gives a cytotoxicity (HEp-2 cell vacuolation) titer, but not an accurate concentration and requires a specific skill. We developed a sensitive and specific chemical assay for cereulide based on high-performance liquid chromatography (HPLC)-mass spectrometry (MS). This method was calibrated with the purified cereulide and valinomycin as an internal control and a structurally similar cyclic depsipeptide. The detection limit for cereulide by this method was 1.0 pmol and this method gave constant results over a wide range of cereulide concentrations, ranging from 0.1 to 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Therefore, this method enabled the quantification of cereulide in this range of concentration. The results obtained by this method were in good agreement with those of the HEp-2 cell vacuolation test. This method is reproducible and so sensitive and specific that it can be applied for detecting a trace amount of cereulide in causative foods.