報 文

惣菜中のセレウス菌芽胞の制御における加熱処理の効果

(平成 15 年 11 月 7 日受理)

田中啓子^{*1,†} 本井博文^{*1} 工藤由起子^{*2}Heat Treatment for the Control of *Bacillus cereus* Spores in FoodsKeiko TANAKA^{*1,†}, Hirofumi MOTO^{*1} and Yukiko HARA-KUDO^{*2}(*¹ Nisshin Seifun Group Inc., Research Center for Basic Science: 5-3-1, Tsurugaoka, Oi-machi, Iruma-gun, Saitama 356-8511, Japan;*² National Institute of Health Science, Division of Microbiology: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; [†]Corresponding author)

The effect of heat treatments on food products related to soybean curd contaminated with *Bacillus cereus* spores was investigated for the purpose of preventing food-poisoning outbreaks by *B. cereus*. In the case of *B. cereus* strains isolated from foods, heating foods inoculated with the spores for 20 min at 70°C, 5 min at 75°C, 2 min at 100°C, or 10 sec with a microwave oven plus reheating after standing for 2 hr at 25°C reduced the number of surviving cells within the foods to less than one-hundredth. In the case of a heat-resistant strain isolated from a food poisoning outbreak, heating for 20 min at 70°C plus reheating after standing for 1.5-2 hr at 35°C, heating for 10 min at 75°C plus reheating after standing for 1.5-2 hr at 35°C, or heating for 2 min at 100°C plus reheating after standing for 4 hr at 25°C was effective. There was not much difference between the flavor components in foods with and without heat treatment at 70°C, as analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. These results indicate that these heat treatments are available to control *B. cereus* spores, without affecting the sensory quality of the foods.

Key words: セレウス菌 *Bacillus cereus*; 芽胞 spore; 発芽 germination; 加熱処理 heat treatment; 食品 food; 総菜 delicatessen; 豆腐 soybean curd

緒 言

近年、豆腐類を用いた総菜の消費は多い。豆腐は *Bacillus cereus* (以下セレウス菌) による汚染度が高いことが報告されており¹⁾、セレウス菌芽胞は通常の食品製造過程の殺菌処理後にも残存することがあるため、仮に食品の取り扱いに欠陥があった場合は、これらが発芽・増殖して食品の腐敗・変敗を招くばかりでなく、一部の系統の株が食中毒を引き起こすこともある^{2), 3)}。セレウス菌食中毒は、その臨床症状から嘔吐型と下痢型に分けられるが、我が国で発生する食中毒のほとんどは嘔吐型である。その原因食品としては、穀類およびその加工品が最も多い⁴⁾が、最近、うの花によるセレウス菌食中毒事例が報告された⁵⁾。また、おからおよび振とう培養した豆乳では、嘔吐毒産生株が増殖して毒素を産生することも示されている⁶⁾。

セレウス菌芽胞の耐熱性は、食品を汚染する他の芽胞形

成細菌と比べ必ずしも高くない⁷⁾が、食中毒由来株芽胞の耐熱性は比較的高い⁸⁾ことから、加熱調理後の総菜においては特に嘔吐型食中毒の原因となる株が生残する可能性がある。また、嘔吐毒産生株は 10°C では増殖・毒素産生しないが、セレウス菌株の中には 10°C 以下の冷蔵温度域で増殖するものがあることが知られている^{9), 10)}。さらに食品から分離されるセレウス菌株のほとんどが下痢毒を産生する¹¹⁾ことから、10°C 以下の保存温度で流通・販売される総菜においてもセレウス菌が増殖し、下痢型食中毒を発症する可能性があると考えられる。

以上のことから、豆腐類を用いた惣菜に対してはセレウス菌による食中毒の発生防止対策を講じる必要がある。そこで、豆腐類を用いた惣菜に混入したセレウス菌芽胞を制御する手段として、間歇殺菌法を応用した加熱処理を検討した。

実験方法

1. 試 料

試料には「ほうれん草白和え」および「うの花」を用いた。白和えの配合は重量配合で豆腐 50%、ほうれん草

[†] 連絡先^{*1} (株)日清製粉グループ本社基礎研究所: 〒356-8511 埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡 5-3-1^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

20%, こんにゃく 15%, ニンジン 10%, 砂糖 2%, 醤油 2%, 胡麻 1%とした。また、うの花の配合は重量配分でおから 50%, こんにゃく 10%, 砂糖 10%, 醤油 10%, 鶏肉, ごぼう, ニンジン, ちくわ各 5%とした。各試料は実験ごとに調製したものを用いた。

なお、調製した試料中の自然汚染セレウス菌は 10^3 cfu/g 以下であった。

2. 菌 株

実験には、同定検査試薬 BD BBL CRYSTAL GP (日本ベクトンディッキンソン(株)) でセレウス菌と同定された白和え由来株 (BC-1), うの花由来株 (BC-2), および食中毒事例における患者吐物由来株 (BA06ce, Taylor & Gilbert's の抗 H-血清の血清型別 I 型, 東京都立衛生研究所より分与) の 3 株を用いた。これらの株はいずれも BA-CILLUS DIARRHOEAL ENTEROTOXIN VISUAL IMMUNOASSAY (TECRA) によって下痢毒を産生することを確認した。また、デンプン分解性は BC-1 と BC-2 が陽性, BA06ce が陰性であった。BC-1 は白和えの加熱実験に, BC-2 はうの花の加熱実験に, BA06ce は両食品の加熱実験に供試した。

3. 芽胞液の調製

セレウス菌を標準寒天培地 (栄研化学(株)) に塗布して 35°C で 2 日間培養した後, 1 週間室温に静置した。培地上に成育した菌体を採取して, 位相差顕微鏡で細胞の大部分が芽胞であることを確認した後, 1 白金耳の菌体を滅菌リン酸緩衝液 (PBS) 1 mL に懸濁した。これを 12,000 rpm, 5 分間遠心分離して上清を取り除くことを 2 回繰り返して再び PBS に懸濁したものを芽胞液とした。この芽胞液を 70°C 20 分間加熱の後に氷水で急冷してから, または加熱せずに, 適宜希釈して 10^4 cfu/g となるように食品 10 g に接種しストマッカー処理してから, 芽胞の食品中での発芽量を比較した。その際, 食品中の芽胞数および芽胞から発芽した栄養細胞数の計測は以下のとおりに行った。芽胞液を接種した食品を 25°C に保持し, 0, 1, 2 時間後に 9 倍量の PBS を加えストマッカー処理して 10% 乳剤を作製した。この食品乳剤を 70°C 20 分間加熱の後に氷水で急冷してから, または加熱せずに, 適宜 PBS で希釈した。これを NGKG 寒天培地 (日水製薬(株)) に 0.1 mL 塗抹して 35°C 24 時間の培養の後, 生育した典型的なセレウス菌集落を計測した。加熱した 10% 乳剤での計測値を食品に生残した芽胞数, 加熱しなかった 10% 乳剤での計測値を食品に生残した全セレウス菌数として, 全セレウス菌数から芽胞数を除いた値を栄養細胞数とした。

4. 栄養細胞液の調製

セレウス菌を Trypticase soy broth (TSB) 培地 (Difco) で 35°C 18 時間培養した菌液 (約 10^8 cfu/mL) 0.1 mL を, 新たな TSB 10 mL に添加して 35°C 6 時間培養した。位相差顕微鏡で液中に栄養細胞のみ含まれることを確認した後, 12,000 rpm, 5 分間遠心して上清を取り除き, 残渣を PBS に再懸濁して栄養細胞液を調製した。

5. 食品中の芽胞数測定方法の検討

食品 10 g に 4. の手順で作製した栄養細胞液を 10^6 cfu/g となるように接種後, 9 倍量の PBS を加えストマッカー処理して食品の 10% 乳剤を作製した。これを, 100°C 10 分間, 75°C 30 分間, または 70°C 20 分間の条件の湯浴中でそれぞれ加熱した後に氷水で急冷し適宜 PBS で希釈した。それら希釈液を 0.1 mL ずつ NGKG 培地に塗抹し, 加熱処理後に生残する栄養細胞数を測定した。また, 3. の手順で作製した芽胞液を 10^6 cfu/g となるように接種した食品の 10% 乳剤を作製し, これを 100°C 10 分間, 75°C 30 分間, または 70°C 20 分間の条件で加熱して生残する菌数を測定した。

6. 食品中の栄養細胞に対する加熱処理の効果検証

ストマッカー袋中の食品 10 g に 4. の手順で作製した栄養細胞液を 10^5 cfu/g となるように接種した後, これらを湯浴中で 70°C 20 分間, 75°C 5 分間, 100°C 30 秒間, 100°C 2 分間, または電子レンジ (1.4 kW) (松下電器産業(株)) で 10 秒間の条件でそれぞれ加熱して, 生残する栄養細胞数を NGKG 培地を用いて測定した。

7. 食品中の芽胞に対する 2 回加熱処理の効果検証

食品 10 g に 3. の手順で作製した 3 株の芽胞液を約 10^5 cfu/g となるようにおのおの接種し, これらを 70°C 20 分間, 75°C 5 分間, 100°C 30 秒間, 100°C 2 分間, 電子レンジ (1.4 kW) で 10 秒間の条件でそれぞれ加熱した。その後, BC-1 および BC-2 株の芽胞液を接種した食品については 25°C または 4°C で 2 時間静置し, BA06ce 株の芽胞液を接種した食品については 25°C 2 時間静置して, 再び同一条件にて加熱した。さらに, BA06ce 株芽胞については, 70°C 20 分間, 75°C 10 分間, 100°C 2 分間の条件で加熱した後に 35°C 1.5~2 時間, 25°C 4 時間の静置をして, 再び同一条件で加熱した。セレウス菌の測定は, 芽胞接種直後, 1 回加熱直後, 1 回加熱してから 2 時間放置後, 2 回加熱直後の 4 時点で行った。食品中のセレウス菌数の測定は, 食品に 9 倍量の PBS を加えストマッカー処理して 10% 乳剤を作製し, 芽胞数測定のためにこれを 70°C 20 分間加熱後に氷水で急冷してから, または全セレウス菌数測定のために加熱せずに NGKG 寒天培地に塗抹し培養することによって行った。

8. ヘッドスペース型ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) による食品の香気成分分析

2 回加熱処理した食品の官能的品質の変化を評価するため, ヘッドスペース型ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) によって食品の香気成分を分析した。

食品 10 g を 70°C 20 分間, 100°C 20 分間の条件でそれぞれ加熱した後, 25°C 2 時間静置して再び同一条件にて加熱した。これら加熱処理食品および未加熱食品をガラスバイアル中に密封して, ヘッドスペース法によって 65°C 40 分間加熱平衡化した香気成分を下記条件で測定した。

装置: ヘッドスペース部 Takmer Headspace Auto-

Fig. 1. Influence of heat treatment on the stability of *Bacillus cereus* spores in food ($n=1$)
The limit of detection was 2 (log, cfu/g).

sampler 7000 (Takmer), GC 部 Model 6890 (Agilent), 質量分析部 四重極型 Automass SUN 200S (JEOL); カラム: DB-5 (0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚 1.0 μ m, J & W Scientific); カラム温度: 50°C (3 min)→4°C/min→260°C (15 min); トランスファー温度: 160°C; キャリヤガス流量: ヘリウム 1.2 mL/min; イオン化電圧: 70 eV; TIC: $m/z=30\sim300$

結果および考察

1. 芽胞液調製時の加熱による食品中の芽胞の発芽誘発

通常、芽胞液調製の際には、混在する栄養細胞を死滅させるために菌液を適温にて加熱処理するが、それによって芽胞の発芽が誘発されることが懸念された。また、加熱処理によって発芽が誘発された芽胞液を実験に用いると、加熱調理後に食品を汚染した芽胞の挙動を正確に検証できないと考えられた。そこで、栄養細胞を死滅させるための加熱処理が芽胞の発芽性に与える影響を検証した。

予備試験によって芽胞液中の芽胞数を減少させないことを確認した 70°C 20 分間の加熱処理をした芽胞液または加熱処理しなかった芽胞液の食品中での芽胞発芽量の平均値を Fig. 1 に示した。加熱処理した芽胞液では、加熱処理しなかった場合と比較して接種後の発芽量が著しく多く、接種 2 時間後までにほとんどの芽胞が発芽して栄養細胞となっていたことから、芽胞液の加熱処理は顕著に発芽を誘発することが示された。この結果から、加熱処理を行わずに調製した芽胞液を以後の芽胞添加試験に用いることとした。

2. 芽胞測定に必要な栄養細胞死滅のための加熱条件

食品中の芽胞数を測定するために、栄養細胞は死滅し、芽胞は影響を受けない加熱温度の設定を検討した。

芽胞を接種した食品の 10% 乳剤を加熱処理した後に生残した菌数を Fig. 2 に示した。一般的な芽胞数測定に用いられる 100°C 10 分間加熱¹²⁾またはセレウス菌の芽胞数測定に用いられる 75°C 30 分間加熱⁴⁾をした場合には、

Fig. 2. Effect of heat treatment on spores of *Bacillus cereus* in 10-fold dilutions of food ($n=3$)
BC-1: *Bacillus cereus* spores isolated from Shira-ae;
BC-2: *Bacillus cereus* spores isolated from Unohana;
BA06ce: *Bacillus cereus* spores isolated from food-poisoning outbreak.
The limit of detection was 2 (log, cfu/g).

10% 乳剤中の菌数が減少した。ただし、食中毒事例由来株の芽胞は食品由来株の芽胞と比較して加熱後の減少量が少なく、高い耐熱性を示した。一方、上記条件より弱い加熱条件として 70°C 20 分間加熱を試みたところ、いずれの株の芽胞もほとんどが生残した。

また、栄養細胞を接種した食品の 10% 乳剤を芽胞と同じ条件で加熱処理したところ、いずれの株の栄養細胞も検出限界以下まで減少し、栄養細胞に対してはこれらの加熱処理は殺菌的に作用した（詳細略）。

以上のことから、食品中に存在するセレウス菌芽胞数の測定には、食品の 10% 乳剤の加熱条件を 70°C 20 分間とするのが適当であることが示された。

3. 食品中の栄養細胞に対する加熱処理の効果

一般に、好気性菌の芽胞は 60~80°C の温度で数分間～数時間加熱することによって発芽が活性化されることが知られている¹³⁾。また、近年は、食品の官能的品質を損なわないような穏和な加熱処理をした食品が多くなっている¹⁴⁾。これらのことから、検討する食品の加熱温度は、発芽を活性化する 60~80°C の範囲内にある穏和な加熱条件として 70°C および 75°C を選択した。さらに、実際の製造工程において実施が容易と考えられる 100°C での加熱、簡便な加熱手法である電子レンジを用いた加熱を検討した。

食品に接種した栄養細胞の加熱処理後における生残量の平均値を Fig. 3 に示した。いずれの株の栄養細胞も試験したすべての加熱処理によって接種量の 1,000 分の 1 以下に減少しており、特に、75°C 5 分間、100°C 2 分間の加熱処理ではすべての株が検出限界以下にまで減少した。

Fig. 3. Effect of heat treatment on vegetative cells of *Bacillus cereus* in food ($n=3$)

BC-1: *Bacillus cereus* spores isolated from Shira-ae; BC-2: *Bacillus cereus* spores isolated from Unohana; BA06ce: *Bacillus cereus* spores isolated from food-poisoning outbreak
The limit of detection was 2 (log, cfu/g).

Fig. 4. Effect of various heat treatments on *Bacillus cereus* spores isolated from Shira-ae and Unohana ($n=3$)

BC-1: *Bacillus cereus* spores isolated from Shira-ae; BC-2: *Bacillus cereus* spores isolated from Unohana; BA06ce: *Bacillus cereus* spores isolated from food-poisoning outbreak.

I: Initial number of inoculated spores; Step 1: the first heat treatment; Step 2: standing for 2 hr at 25 or 4°C; Step 3: the second heat treatment

The limit of detection was 2 (log, cfu/g).

食品中の栄養細胞に対してこれら5種類の加熱処理が殺菌的に作用することが示された。このため、これらの加熱を、2回加熱処理の検討における加熱条件とした。

4. 食品由来セレウス菌の芽胞に対する2回加熱処理の効果

3.の結果から選択された5種類の2回加熱処理条件に

よる食品由来セレウス菌の芽胞の食品中での消長を Fig. 4 に示した。

1 回目の加熱後の静置温度を 25℃とした場合、70℃ 20 分間および 75℃ 5 分間加熱直後では芽胞数はほとんど減少しなかったが、静置後に多くの芽胞が発芽して栄養細胞となったため、その後の同一条件での再加熱によって多数の栄養細胞が死滅し、セレウス菌数は接種量の 100 分の 1 以下に減少した。また、100℃ 2 分間加熱によって芽胞数はある程度減少し、さらに 25℃ 2 時間静置によって発芽した栄養細胞が再加熱で死滅したため、セレウス菌数は接種量の 1,000 分の 1 以下に減少した。電子レンジ 10 秒間加熱処理でも同様に菌数は 1,000 分の 1 程度に減少した。ところが、100℃ 30 秒間加熱処理による菌数の減少量は多くなかった。これは食品が十分に加熱されなかったためと考えられる (Fig. 4(a))。一方、加熱後の静置温度が 4℃の場合は、25℃の場合と比較して発芽量が少なく、加えて再加熱による菌数減少量も少なかった。この静置温度の違いによる菌数減少量の差異は、特に 70℃または 75℃の加熱処理において顕著であった (Fig. 4(b))。

以上のように、加熱処理後に 25℃で 2 時間静置して再度加熱することは食品由来セレウス菌を減少させる効果があることが分かった。

5. 食中毒事例由来セレウス菌の芽胞に対する 2 回加熱処理の効果

食中毒事例由来株について食品由来株での検討と同一の加熱条件で試験したところ、加熱後における芽胞数の減少量は非常に少なかった (Fig. 5)。特に白和えに添加した芽胞では、加熱後の 25℃ 2 時間静置による芽胞の発芽がほとんど見られず、再加熱後の生残菌数もほとんど減少しな

Fig. 5. Effect of various heat treatments on *Bacillus cereus* spores isolated from patients with food poisoning ($n=3$)
I: Initial number of inoculated spores; Step 1: the first heat treatment; Step 2: standing for 2 hr at 25℃; Step 3: the second heat treatment
The limit of detection was 2 (log, cfu/g).

(a) BA06ce in Shira-ae

(b) BA06ce in Unohana

Fig. 6. Effect of various heat treatments on *Bacillus cereus* spores isolated from patients with food poisoning ($n=3$)
NT: not tested; I: Initial number of inoculated spores; Step 1: the first heat treatment; Step 2: standing; Step 3: the second heat treatment
The limit of detection was 2 (log, cfu/g).

Fig. 7. GC/MS Chromatograms of Shira-ae and Unohana
The numbering of peaks indicates retention times.

かった。食品由来株の芽胞に対して有効であった加熱処理は、食中毒事例由来株の芽胞に対しては不十分なものであった。

そこで、食中毒事例由来株の芽胞について、発芽の加熱活性化および発芽量の増大に有効な加熱条件を検索した (Fig. 6)。両食品ともに、加熱条件を 75℃ 5 分間から 75℃ 10 分間に変更して、あるいは加熱後の静置条件を 25℃ 2 時間から 35℃ 1.5～2 時間、25℃ 4 時間に変更して、70℃ 20 分間加熱後に 35℃ 1.5～2 時間静置、75℃ 10 分間加熱後に 35℃ 1.5～2 時間静置、100℃ 2 分間加熱後に 25℃ 4 時間静置し、それぞれ同一条件で再加熱することによって、食品中の芽胞数を 100 分の 1 以下に減少させることができた。ここで用いた加熱処理条件は、食

品由来株に用いたものよりも芽胞の発芽および栄養細胞の殺菌にいっそう効果的と考えられることから、これらの加熱処理は食品由来株と食中毒事例由来株のいずれに対しても芽胞数を 100 分の 1 以下にまで減少させる効果があるといえる。

6. 食品の官能的品質への加熱処理の影響

予備試験の段階で加熱処理した食品を試食したところ、いずれの加熱処理によっても食品の官能的品質を損ねるような食味の変化は見られず、特に 70℃ または 75℃ で加熱処理した場合は緑色野菜の色の変化もなく官能的品質は良好であった。

さらに、加熱処理した食品の官能的品質を確認するために香気成分の GC/MS 分析を試みた。白和えでは、加熱

処理の有無でクロマトグラムパターン全体に大きな変化はなかったが、リテンションタイム 8.1 分, 8.4 分, 12.5 分で検出されたピークについて差異を確認した。これらのピークの未加熱におけるピーク面積を 100 とすると, 70°C 20 分加熱ではそれぞれ 115, 93, 92, 100°C 20 分加熱では 255, 209, 131 であり, 未加熱と 70°C 加熱でのピーク面積には大差がなかった一方で, 100°C 加熱でのピーク面積はいずれも大きかった (Fig. 7(a))。また, うの花においても加熱処理の有無でクロマトグラムパターンに大きな変化はなかったが, リテンションタイム 12.5 分のピークについて差異を確認した。このピークの未加熱におけるピーク面積を 100 とすると, 70°C 加熱では 126, 100°C 加熱では 165 であり, 100°C 加熱でのピーク面積が大きかった。さらに, 100°C 加熱では未加熱および 70°C 加熱では見られなかったリテンションタイム 8.1 分のピークが検出された (Fig. 7(b))。これらの結果から, 今回検討した加熱処理のうち, 特に 70°C での加熱処理は食品の官能的品質に与える影響が小さいと判断された。

以上のように, 食品に含まれるセレウス菌の芽胞数を効果的に減少させるための 2 回加熱条件およびその間の静置条件を見出した。これらの加熱条件は, いずれも通常の調理で用いる範囲内の加熱条件であることから, 実際の食品製造への適用も可能である。したがって, これらの加熱処理は, 豆腐類を用いた惣菜におけるセレウス菌による食中毒発生の防止対策を講じるための一助となりうる。また, 近年は, 添加物を含む食品が敬遠される傾向が強いことから, これらの加熱処理は抗菌物質を添加することなしに微生物制御できる手法として有意性がある。

ただし, これらの加熱処理を食品製造工程へ導入する場合には, 製造に要する時間が延長されることがデメリットとしてある。また, 実際の食品に対して必要とされる滅菌効果と許容される食品の官能的品質の変化とのバランスを考慮した最適な加熱処理条件を設定することが必要である。

ま と め

豆腐類を用いた食品において, セレウス菌による食中毒発生の防止に有効な手法を開発するため, 混入したセレウス菌芽胞に対する間歇殺菌法を応用した加熱処理を検討した。食品から分離したセレウス菌株の芽胞では, 食品を 70°C 20 分間, 75°C 5 分間, 100°C 2 分間, 電子レンジにて 10 秒間加熱して 25°C 2 時間静置後にそれぞれ同一条件で再加熱することによって生残する芽胞数が 100 分の 1 以下に減少した。また, 食中毒事例由来株の芽胞では, 70°C 20 分間加熱後に 35°C 1.5~2 時間静置, 75°C 10 分間加熱後に 35°C 1.5~2 時間静置, 100°C 2 分間加熱後に 25°C 4 時間静置後に再加熱することによって生残する芽胞数が 100 分の 1 以下に減少した。さらに, 70°C 20 分加熱前後の食品の香気成分のガスクロマトグラフ質

量分析において大差が認められなかった。以上より, これらの加熱処理は食品の品質への影響が少ないセレウス菌芽胞を減少させる手段として利用可能であると考えられる。

文 献

- 1) Kusunoki, J., Ikejima, N., Arai, T., Jin, M., Irikura, Y., Tomonari, M., Itoh, T., Sakai, S., The contamination of *Bacillus cereus* in various food and biochemical characteristics and heat resistance of spores isolated strains. Tokyo Eiken Nenpou (Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.), **28**, 11-14 (1977).
- 2) 厚生省生活衛生局食品保健課監修 “食中毒菌の制御—データと文献抄録—” 東京, 中央法規出版, 1988, p. 86-100. (ISBN 4-8058-0495-5)
- 3) Sakazaki, R. ed., “Shokusuikeikansensyou To Saikinsei Shokuchudoku”, Tokyo, Chuou-houki Shuppan, 1991, p. 304-335. (ISBN 4-8058-0834-9)
- 4) Ueda, S., Shokuhincho no shokuchudokukin kensahou 14 sereusukin (Detection of food-poisoning bacteria in foods 14, *Bacillus cereus*). Boukin Boubai, **30**, 511-524 (2002).
- 5) 食中毒等事件例 (平成 12 年前期), Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **42**, J-160-J-166 (2001).
- 6) Agata, N., Ohta, M., Yokoyama, K., Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. Int. J. Food Microbiol., **73**, 23-27 (2002).
- 7) Shimizu, U. et al. eds., “Shokuhin Kigai Biseibutsu Handobukku”, Tokyo, Science Forum, 1998, p. 220-222. (ISBN 4-916164-18-0)
- 8) Shinagawa, K., Kunita, N., Sasaki, Y., Okamoto, A., Biochemical characteristics and heat tolerance of strains of *Bacillus cereus* isolated from uncooked and cooked rice after food poisoning outbreaks. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **20**, 431-436 (1979).
- 9) Finlay, W. J. J., Logan, N. A., Sutherland, A. D., *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. Lett. Appl. Microbiol., **31**, 385-389 (2000).
- 10) Choma, C., Guinebretiere, M. H., Carlin, F., Schmitt, P., Vilge, P., Granum, P. E., Nguyen-The, C., Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. J. Appl. Microbiol., **88**, 617-625 (2000).
- 11) Uemura, T., Food poisoning caused by *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus*. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **40**, J-9-J-14 (1999).
- 12) 厚生省生活衛生局監修 “食品衛生検査指針 微生物編” 1990, p. 105.
- 13) Kondo, M. et al. eds., “Supoa Jikken Manyuaru—Biseibutu No Gahou • Housi No Kisokenkyu Kara Ouyoukenkyu Made—”, Tokyo, Gihodo Shuppan, 1995, p. 73-81. (ISBN 4-7655-0229-5)
- 14) Shimizu, U., “Shokuhin Biseibutsu I Kisohen Shokuhin Biseibutsu No Kagaku”, Tokyo, Saiwai Shobo, 2001, p. 145-146. (ISBN 4-7821-0179-1)