

## [原 著]

HEp-2 細胞空胞化試験による *Bacillus cereus* 嘔吐毒素測定法の改良の試み川村久美子<sup>1)</sup>・平間佑美<sup>1)</sup>・安形則雄<sup>2)</sup>・伊藤秀郎<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 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<sup>2)</sup> 名古屋市衛生研究所微生物部

(平成 16 年 6 月 17 日受付, 平成 16 年 8 月 10 日受理)

*Bacillus cereus* による嘔吐型食中毒の原因となる毒素セレウリドは抗体が産生されないことから、検出には HEp-2 細胞空胞化試験による生物活性の測定が行われている。この方法は最小検出感度が 5 ng/ml と非常に高感度であるが、空胞化の判定に熟練を要すること、測定法の再現性に乏しいなどいくつかの問題点を有することから、現在は一部衛生研究所で行われているのみである。今回我々は検査室でも実施可能な新たなセレウリド測定法の構築にあたり、標準法となる HEp-2 細胞空胞化試験の再現性の向上が必須と考え、各種培養条件における毒素産生性について検討を行った。セレウリド産生性は培地の種類、培養温度や培養時期などの培養条件によって、顕著に変化することが明らかとなった。セレウリド産生は増殖期の mid~late-stationary phase に認められ、セレウリドの産生における培養の最適条件は 10% スキムミルク培地 50 ml にて 30°C, 30 時間, 200 rpm の振とう培養であった。この条件にて HEp-2 細胞空胞化試験の再現性を検討した結果、日差再現性 ( $n=10$ ) は改良以前の CV 64.0% から 35.3% に大きく改善された。セレウリド産生性が培養条件によって顕著に変化することは、培養条件の不適切による偽陰性化の可能性をも示唆しており、培養の最適化は再現性の向上とともに検出感度の向上にもつながるものと考えられる。

**Key words:** *Bacillus cereus*, セレウリド, HEp-2 細胞空胞化試験, 毒素産生性, 培養条件

*Bacillus cereus* による食中毒は臨床症状や潜伏期間の違いから、下痢型と嘔吐型に分類されており<sup>1)</sup>、これらの食中毒に関与する物質は、本菌が産生する下痢原性毒素 (エンテロトキシン) および嘔吐毒素 (セレウリド) であると考えられている<sup>2)~4)</sup>。嘔吐毒素セレウリドは 1994 年に Agata らによりその本体が精製され、D 型アミノ酸を含む環状デシペプチド (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)<sub>8</sub>、分子量 1,191.642 であることが示された<sup>5)</sup>。セレウリドは 121°C, 90 分の加熱や酸・アルカリにも安定であるため、加熱調理後も食品中で産生された毒素の摂取によって嘔吐を引き起こし<sup>6)</sup>、肝臓などの臓器にも障害を及ぼす<sup>7)</sup>。特に肝臓

への障害は重篤な場合には死に至ることもあり、1997 年セレウリドに汚染されたスパゲティを食した 17 歳の少年が急性肝不全で死亡した症例はセレウリド毒素の恐ろしさを世に知らしめた事例であった<sup>8)</sup>。このようにセレウス菌は食物内毒素型食中毒を引き起こすため、セレウス菌食中毒の診断にとって原因食品や患者試料から本菌を検出することはもとより、分離した菌株が嘔吐毒素セレウリドを産生するかを検査することは極めて重要であり、必須検査となっている。しかし、セレウリドはその分子量が小さく抗原性を持たないため抗体が産生されず、現在毒素の検出には HEp-2 細胞空胞化試験による生物活性の測定が行われているのみである<sup>9)~11)</sup>。

HEp-2 細胞空胞化試験は *B. cereus* の培養上清と HEp-2 細胞と混合し、48 時間後に位相差顕微鏡にて HEp-2 細胞の空胞化を観察する方法である。この方法は最小検出感度が 5 ng/ml と非常に高感度である<sup>9), 12)</sup>が、細胞培養が必要であること、空胞化の判定に熟練を要すること、測定法の再現性が乏しいことな

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

どいくつかの問題点があることから、現在は一部の衛生研究所で行われているのみである。そこで我々は検査室でも実施可能な新たなセレウリド検出法の構築にあたり、まず標準法となる HEP-2 細胞空胞化試験の再現性の向上が必須と考え、再現性に最も影響している要因を検索するとともに、良好な再現性が得られる測定条件の設定を試みた。HEP-2 細胞空胞化試験において測定系の再現性を規定するものとして、細胞の空胞化の判定における誤差および個人差、培養条件による毒素産生量のばらつき、使用する HEP-2 細胞の状態などが考えられるが、このうち培養時の毒素産生性が測定法の再現性に最も影響していた。さらに各種培養条件における毒素産生量について詳細に検討した結果、良好な再現性が得られる測定条件を見いだしたので報告する。

## I. 材料および方法

### 材料

1) 菌株は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 (セレウリド陽性, エンテロトキシン陰性) を使用した。NC7401 株は嘔吐型食中毒事例において、原因食材である焼きそばおよび患者試料より分離された。

2) 培地は 10% スキムミルク培地 (Difco), Brain heart infusion (BHI) 培地 (栄研化学(株)) および LB 培地 (Difco) を使用した。

3) HEP-2 細胞は名古屋市衛生研究所より供与されたものを使用した。培養メディアムは 10% Fetal bovine serum (FBS; Invitrogen Corporation) を含む Minimal essential medium (MEM; 大日本製薬(株)) 10 ml を使用し、37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養を行った。HEP-2 細胞は細胞の状態を観察しながら、3 日ごとに新しいメディアムにうえつきを行い、保存は MEM にて細胞を 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(株)) 1 ml に浮遊させ -80°C に保存した。

### 方法

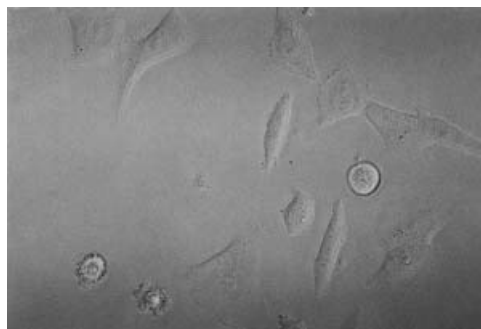
#### 1. 培養条件

各種培地への接種菌量を一定にするために、前培養として LB 培地 3 ml にて 37°C, 24 時間培養したものを準備した。培養液を遠心 (3,000 rpm, 20 分), 洗浄後、得られたペレットを phosphate-buffered saline (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free) (PBS(-)) 3 ml に再浮遊し、接種材料とした。培養はスキムミルク培地 50 ml に接種材料を 50  $\mu$ l 加え、30°C, 200 rpm, 30 時間培養を基準とした。培養条件の検討では、上記の基準を基に

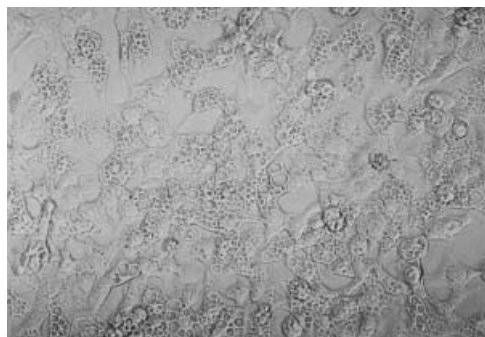
①培養温度 (25, 30, 37, 40°C), ②培養時の振とう回転数 (静置および Bio Shaker BR-33FL (TAITEC) の旋回振とう方式にて 100, 150, 200 rpm の条件で振とう培養), ③培地の種類 (LB 培地, 10% スキムミルク培地, BHI 培地), ④培養量 (5, 10, 50, 100, 200 ml), ⑤培地の pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5), ⑥セレウリド毒素活性測定時の遠心回転数 (遠心器 KM-152000 (KUBOTA) にて 1,500, 3,000, 4,500 rpm の条件で 30 秒間遠心) について測定を行い、各々の培養上清中のセレウリド毒素力値 (産生量) を比較した。なお、培地の pH の検討では各 pH に対応する good buffer (MES, HEPES, TAPS) (Sigma) を用いて 10% スキムミルク培地を作製した。

#### 2. 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<sup>5)</sup>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、アセトニトリル・*n*-ヘキサン混液 (1:1) にて抽出し、Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジ (Waters, Co., Milford, MA, USA) を用い精製した。精製後、イオントラップ型マススペクトロメトリー API300 (Perkin-



(a) HEP-2 細胞 (コントロール)



(b) Cereulide 添加による HEP-2 細胞の空胞化  
写真 1 HEP-2 細胞空胞化試験

Elmer Sciex Instruments, Thornhill, Ontario, Canada) にて分子質量を確認し、HEp-2 細胞空胞化試験にて毒素活性を定量した。

### 3. 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<sup>9)</sup>に従って行った。10% スキムミルク培地にて一夜振とう培養 (30°C, 200 rpm) した菌液を 121°C, 15 分間滅菌後、1,500 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全穴に PBS(-) 25  $\mu$ l を分注し、第 1 穴にサンプルを 25  $\mu$ l 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 ( $2 \times 10^4$  cells/ml) 100  $\mu$ l を加え、37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 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 (写真 1) を観察し、空胞の認められた最終希釈倍数に 5 ng/ml を乗じた値をセレウリド毒素力値 (産生量) とした。

## II. 結 果

### 1. HEp-2 細胞空胞化試験の再現性

HEp-2 細胞が本測定法の再現性に与える影響を検討するために精製セレウリドおよび *B. cereus* NC7401 株を用いて、同時再現性 ( $n=5$ ) および日差再現性 ( $n=10$ ) を測定した。表 1(a) に示すように精製セレウリドを用いた場合の同時再現性は  $x=1,152$  ng/ml, CV=22.2%, 日差再現性は  $x=1,152$  ng/ml, CV=22.2% と良好であったが、*B. cereus* NC7401 株を用

いた場合の同時再現性は  $x=1,408$  ng/ml, CV=44.5%, 日差再現性は  $x=1,184$  ng/ml, CV=64.0% となり、特に日差再現性にばらつきが認められた。

### 2. 各種培養条件におけるセレウリド産生性の比較

*B. cereus* NC7401 株を用いて、培地の種類・温度・振とう回数・培地容量・培地の pH など各種培養条件におけるセレウリド産生量を比較検討した。培地の種類では 10% スキムミルク培地において、最も高いセレウリド産生量が得られ、LB 培地や BHI 培地のような栄養が豊富な培地では明らかに産生量が減少した (図 1a)。培養温度はセレウリド産生性に大きく影響しており、25~30°C において最も高い産生量が得られたが、培養温度の上昇とともに産生量は減少した (図 1b)。高いセレウリド産生性を得るためには、培養時の振とう条件は 150 rpm 以上必要であり、また培地の容量は 50 から 100 ml が適量と考えられた (図 1c, d)。また、培地の pH の検討では各 pH に対応する good buffer を用いて 10% スキムミルクを作製し、培養中の pH 変化の影響が生じないような条件下で行った結果、酸性領域 (pH 4.5, 5.5) においてセレウリドの産生が大きく抑制された (図 1e)。操作手技のうち、サンプルを得る際に行う遠心の回転数が測定値に大きく影響していた (図 1f)。菌液を 1.5 ml エッペンドルフチューブにて 3,000 rpm 以上、30 秒間の遠心を行うだけで、測定値は 1,500 rpm のときと比較し約 3 分の 1 以下の低値となった。

以上の検討結果から、最も安定したセレウリド産生

表 1 HEp-2 細胞空胞化試験の同時再現性および日差再現性

(a) 改良前		(b) 改良後		
精製セレウリド		<i>B. cereus</i> NC7401 株		NC7401 株
同時再現性	日差再現性	同時再現性	日差再現性	日差再現性
1,280	1,280	1,280	1,280	1,280
1,280	1,280	1,280	640	2,560
640	640	1,280	320	1,280
1,280	1,280	2,560	1,280	1,280
1,280	640	640	640	1,280
(ng/ml)	1,280	(ng/ml)	2,560	2,560
	1,280		1,280	1,280
	1,280		640	1,280
	1,280		640	1,280
	1,280		2,560	2,560
	(ng/ml)		(ng/ml)	(ng/ml)
$n=5$	$n=10$	$n=5$	$n=10$	$n=10$
$x=1,152$	$x=1,152$	$x=1,408$	$x=1,184$	$x=1,664$
SD=256.0	SD=256.0	SD=627.1	SD=757.9	SD=586.5
CV=22.2%	CV=22.2%	CV=44.5%	CV=64.0%	CV=35.3%

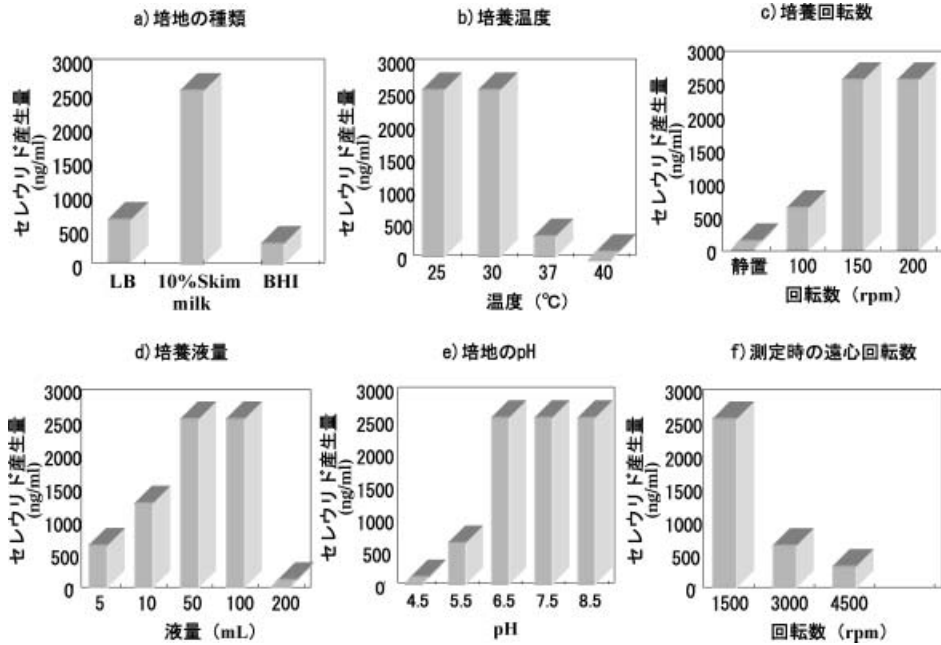


図1 各種培養条件におけるセレウリド毒素産生性の比較

性が得られる条件は「10% スキムミルク培地 50 ml にて 30°C, 30 時間, 200 rpm の振とう培養」となった。この条件にて *B. cereus* NC7401 株を用いた HEp-2 細胞空胞化試験の再現性を検討した結果, 改良後は毒素産生量も増加し, さらに日差再現性も改良以前の CV=64.0% から 35.3% と大幅に改善された (表 1(b))。

### 3. 培養時間とセレウリド産生性

培養時間とセレウリド産生量との関係を 10% スキムミルク培地および BHI 培地を用いて検討した。一夜培養した菌を  $1 \times 10^2$  CFU/ml になるように添加し, 4 から 40 時間までのセレウリド産生量および菌量を各々測定した。図 2 に示すように 10% スキムミルク培地, BHI 培地ともに培養 8 時間ではすでに最大

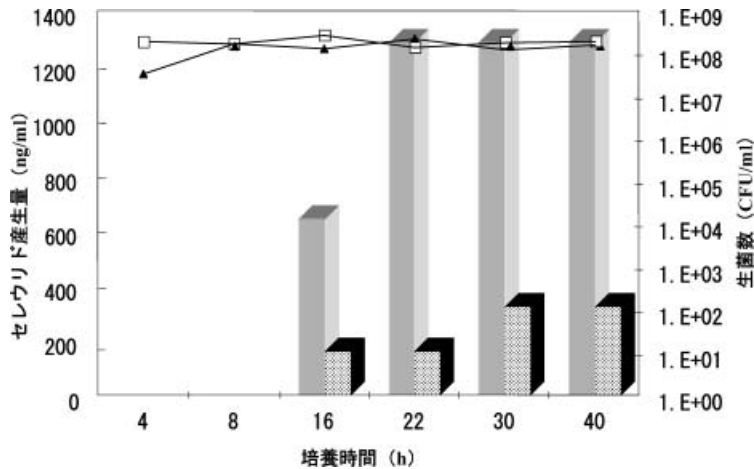


図2 培養時間とセレウリド産生性の関係

▲: 10% スキムミルク培地における生菌数, □: BHI 培地における生菌数,

■: 10% スキムミルク培地におけるセレウリド産生量, ▨: BHI 培地におけるセレウリド産生量

菌量の  $5 \times 10^8$  CFU/ml に達していたが、セレウリドは産生されておらず、16 時間後から産生が認められるようになった。特に 10% スキムミルク培地では培養 16 時間から急激な産生量の増加が認められ、22 時間以降は一定となった。また、各培養時間での菌の形態を観察すると、10% スキムミルク培地では 16 時間後にはすでに芽胞形成が認められ、セレウリド産生量の増加とともに芽胞を持つ栄養型細胞の割合が高くなっていった。一方、BHI 培地では 40 時間後も栄養細胞のみが観察された。

### III. 考 察

検査法を評価する要素として検出感度、再現性などがあり、HEp-2 細胞空胞化試験の最小検出感度は精製セレウリドを用いた場合 5 ng/ml と報告されている<sup>12)</sup>。Agata らは、嘔吐型食中毒に関連した各種検体から得られた *B. cereus* では約 70% の菌株が  $1 \mu\text{g/ml}$  以上の毒素産生性を示しており、また嘔吐型食中毒事例の原因食品中のセレウリド産生量は食品の 1 g あたり  $0.02 \sim 1.28 \mu\text{g}$  であったと報告している<sup>13)</sup>。これらの報告を考慮すると、HEp-2 細胞空胞化試験の最小検出感度 5 ng/ml は測定感度としては十分な感度であると考えられる。一方、測定の再現性についてはいくつかの問題点が指摘されており、HEp-2 細胞空胞化試験が広く普及しない原因の一つといわれてきた<sup>14)</sup>。HEp-2 細胞空胞化試験の再現性を規定するものとして、①判定（細胞の空胞化の判定）における誤差および個人差、②菌の培養上清を検査材料とすることから、培養条件による毒素産生量のばらつき、③使用する HEp-2 細胞の状態、などが考えられる。このうち判定における誤差および個人差の改善はまだまだ困難であるが、②培養条件による毒素産生量のばらつきと③ HEp-2 細胞の状態のばらつきについては改良の余地が十分にあるものと考え以下の検討を行った。はじめに精製セレウリド ( $1,000 \text{ ng/ml}$ ) を用い、同時再現性 ( $n=5$ ) および日差再現性 ( $n=10$ ) を測定することにより、HEp-2 細胞の測定への影響を検討した。精製セレウリドを用いた場合の同時再現性および日差再現性はいずれも  $\text{CV}=22.2\%$  と良好な再現性を示した。一方、*B. cereus* NC7401 株を用いた場合の再現性は同時再現性  $\text{CV}=44.5\%$ 、日差再現性  $\text{CV}=64.0\%$  となり、精製セレウリドの場合と比較して、特に日差再現性にばらつきが認められた。これらの結果から、本測定法の再現性には HEp-2 細胞の状態よりも、むしろ菌の培養条件によるセレウリド産生量のばらつきが再現性を悪くしている要因と考えられた。

そこで各種培養条件における嘔吐毒素セレウリドの産生量を比較検討した結果、産生量は培地の種類（培地組成）、培養温度や培養時期などの培養条件によって、顕著に変化することが明らかとなった（図 1, 2）。特に培養温度はセレウリド産生性に大きく影響しており、 $25 \sim 30^\circ\text{C}$  において最も高い産生量が得られた（図 1b）。培地の種類では栄養豊富で細菌が栄養型細胞を維持できるような LB 培地や BHI 培地よりもむしろ、栄養素が乏しい 10% スキムミルク培地において、最も高いセレウリド産生量が得られた（図 1a）。また、培地の量および振とう回数は培地中の酸素含量の影響を示しており、振とう回数 180 rpm と 100 rpm の酸素含量を略式にて測定した結果、180 rpm/100 rpm の酸素含量比は約 1.14 倍であり、セレウリド産生性には培地中に十分な酸素が吸収されることが必要であると考えられた。セレウリドの産生性とは直接関係はない項目であるが、サンプルを得る際の遠心条件も測定値に大きく影響することがわかった（図 1f）。平底マイクロプレートの 1 穴目への菌体の持ち越しを避けるため、菌液を遠心し、その上清をサンプルとして用いている。このときの遠心回転数を 1,500 から 3,000 rpm へと高くすると浮遊する菌体が少なくなり、空胞化している細胞の観察は容易になるが、測定値は低値となる傾向が認められた。そこで、3,000 rpm で遠心後、沈殿した菌を PBS(-) 1 ml に再浮遊し、遠心をせず毒素活性を測定した結果、培養上清の約 1/2 の値が得られた。これらの結果から遠心により測定値が低値となる原因として、疎水性が強いセレウリドが菌体に巻き込まれて菌体とともに沈殿しやすくなったか、もしくは分泌途中のセレウリドが菌体表面に付着した状態で菌体とともに沈殿しやすくなったためではないかと考えられた。

次にセレウリド産生性と培養時間、菌量、および菌の形態との関係を 10% スキムミルク培地および BHI 培地について検討した。セレウリドの産生は 10% スキムミルク培地、BHI 培地ともに増殖期の mid~late-stationary phase である 16 時間後から産生が認められるようになった（図 2）。このセレウリド産生性と菌量との関係を見ると、菌の増殖は 10% スキムミルク培地、BHI 培地とも培養 8 時間後には最大菌量の  $5 \times 10^8$  CFU/ml に達していることから、セレウリドの産生性は菌量にのみ依存するのではなく、増殖期のどの phase であるかが重要であると思われた。さらに、10% スキムミルク培地では 16 時間後にはすでに芽胞を持つ栄養型細胞が認められ、セレウリド産生量の増加とともに芽胞を持つ栄養型細胞の割合も高くなっ

ていった。このように *B. cereus* の嘔吐毒素セレウリドの産生量は培地の種類 (培地組成), 培養温度や培養時期などの培養条件によって顕著に変化しており, さらに高い産生性量を得られる最適条件は芽胞形成においても好適条件でもあることから, この二つの機構が共通の環境応答システムによって制御されている可能性も示唆され, 興味深い結果である。

今回の検討でセレウリド産生性の最適条件を設定したが, このように毒素の産生性が培地の種類 (培地組成), 培養温度や培養時期などの培養条件によって顕著に変化することは, すなわち選択する培養条件によって, 毒素産生が陰性化することも示唆しており, 培養の最適化は再現性の向上とともに検出感度の向上にもつながると考える。今後は判定 (細胞の空胞化の判定) における誤差および個人差の問題も残っており, 検査室への普及にはさらなる改良が必要と思われる。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたりまして, 菌株の供与およびご指導・ご助言を賜りました名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学教室, 太田美智男先生に深く感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 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.
- 2) Spira, W. M., J. M. Goefert. 1972. *Bacillus cereus*-induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. *Appl. Microbiol.* 24: 341-348.
- 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) 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.
- 6) 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.
- 7) Yokoyama, K., M. Ito, N. Agata, et al. 1999. Pathological effect of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice. *FEMS Immunol., Medical Microbiol.* 24: 115-120.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Andersson, M. A., R. Mikkola, J. Helin, et al. 1998. A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depeptide ionophores. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1338-1343.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 13) Agata, N., M. Ohta, M. Mori, et al. 1999. Growth conditions of and emetic toxin production by *Bacillus cereus* in a defined medium with amino acids. *Microbiol. Immunol.* 43: 15-18.

Improvement of HEp-2 cell vacuolation assay for *Bacillus cereus* emetic toxinKumiko Kawamura<sup>1)</sup>, Yumi Hirama<sup>1)</sup>, Norio Agata<sup>2)</sup>, Hideo Ito<sup>1)</sup><sup>1)</sup> Department of Medical Technology Nagoya University School of Health Sciences<sup>2)</sup> Nagoya City Public Health Research Institute

Cereulide is the causative toxin of emetic type food poisoning by *Bacillus cereus*. Because of its hydrophobic character, it does not induce specific antibodies. Therefore, HEp-2 cell vacuolation assay is usually used for the detection of cereulide. This method is highly sensitive as the minimum detection sensitivity of 5 ng/ml. However, there are several problems such as requirement for skill in the judgment of vacuolation and poor reproducibility in the quantification of cereulide in this method. Our laboratory has been trying to establish a new practicable method for the cereulide detection. In this study we improved the reproducibility of the standard HEp-2 cell vacuolation assay and examined the concentrations of cereulide production by *B. cereus*. We found that culture media, temperature and culture stages remarkably affected the cereulide production. The highest cereulide secretion was observed in mid- to late-stationary phases, when *B. cereus* was incubated in 50 ml of 10% skim milk medium for 30 h at 30°C with a rotary shaker at 200 rpm. When HEp-2 cell vacuolation assay was performed under this condition, the result of between-run reproducibility was improved dramatically to CV 35.3% from before modification of CV 64.0%. Since the cereulide production changed markedly depending on the culture conditions, false-negative results can be brought about by inadequate culture conditions. Therefore, the optimal culture condition will lead to improvement of detection sensitivity as well as reproducibility.

**Key words:** *Bacillus cereus*, emetic toxin cereulide, HEp-2 cell vacuolation assay, cereulide production, culture condition