

低温流通食品の品質および安全性確保に関する基礎的研究

本城, 賢一
九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品衛生化学分野

<https://hdl.handle.net/2324/7183501>

出版情報 : Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 61 (3), pp.101-107, 2014-03-15. 日本食品科学工学会
バージョン :
権利関係 : © 2014, Japanese Society for Food Science and Technology



総 説

低温流通食品の品質および安全性確保に関する基礎的研究 (平成 25 年度日本食品科学工学会奨励賞)

本 城 賢 一*

九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品衛生化学分野

Basic Studies on the Quality and Safety of Foods Stored and Distributed at Low temperature

Ken-ichi Honjoh*

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Graduate School,
Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Fukuoka, Fukuoka 812-8581

Convenience and a rise in health awareness has increased the demand for ready-to-eat vegetables and fruits; however, along with this increase in demand has been an increase in the number of food poisonings associated with the low-temperature storage and distribution of foods. To maintain the quality and safety of vegetables, we have conducted basic research on the freezing tolerance of plants by using *chlorella* and yeast. First, two low-temperature inducible genes from *Chlorella* were investigated by genetic modification techniques. Next, the availability of taurine and trehalose to plants stored at freezing temperatures was investigated. Finally, a rapid detection method for *Listeria monocytogenes*, a psychrophilic bacterium and a pathogen in foods stored and transported at low temperature, was developed based on subtyping clinical isolates and isolates from food and the environment. (Accepted Dec. 6, 2013)

Keywords : freezing tolerance, food storage, low-temperature distribution foods, quality, safety

キーワード : 凍結耐性, 食品貯蔵, 低温流通食品, 品質, 安全性

1. はじめに

近年, 簡便性や健康志向の高まりにより, カット野菜などの ready-to-eat 野菜や果物の消費量が増加しており, それに伴い, これらの未加熱生食用野菜などを原因食品とする食中毒事件も増加している¹⁾²⁾。これらの野菜や果物の品質を保持した流通は低温流通システムの整備により可能となってきたが, 生産段階での汚染および加工段階での不十分な殺菌などにより生残した食中毒細菌などの微生物が非凍結温度の低温でも増殖する事が食中毒発生の原因ともなっている。

低温流通には冷蔵と冷凍の二つの手法があるが, もし, 冷蔵で流通している生食用野菜を冷凍状態で流通することができれば, 微生物の増殖温度域 (−10℃程度) より低い温度での流通となり, 食中毒の危険性の低減につながる。

植物の中には, 非凍結温度の低温処理により凍結耐性を獲得するものがある。その際, 種々の遺伝子発現が誘導されるが³⁾, これらの中には直接凍結耐性獲得に関わるものや

低温で発現誘導された酵素によって生合成された適合溶質と呼ばれる物質が凍結耐性に関与する場合もある⁴⁾⁵⁾。

著者らは, これまでに単細胞緑藻であるクロレラ (*Chlorella vulgaris* C-27) を用いて凍結耐性獲得機構について解明を進め, 凍結耐性獲得時に発現が誘導される遺伝子をクローニングした^{6)~9)}。このうち特に重要と思われた二つの遺伝子に着目し, 酵母や植物で作製した遺伝子組換え体を用いて凍結耐性に関する解析を行った。また, 凍結耐性向上に寄与すると推察された二つの物質 (タウリン, トレハロース) に着目し, 添加実験¹⁰⁾ ならびに遺伝子組換え酵母¹¹⁾¹²⁾ を用いて, 凍結貯蔵への利用性について検討を行った。

さらに, 著者らは低温流通食品において問題となる低温増殖性食中毒細菌であるリステリア (*Listeria monocytogenes*) の臨床株ならびに食品由来株について病原性関連遺伝子の解析に基づく分類を行い, ヒトへの高い病原性を有する可能性が高いリステリア検出法の開発を行った¹³⁾。

本総説では, これまで著者らが取り組んできた低温流通食品の品質および安全性確保のための基礎的研究について

¹ 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

*連絡先 (Corresponding author), honjoh@agr.kyushu-u.ac.jp

解説する。

2. 凍結耐性関連遺伝子の利用

著者らはこれまでにクロレラを 3℃での低温処理により
発現する遺伝子についてディファレンシャルスクリーニン

グ, サブトラクション法などにより解析を行い, 137 種の
遺伝子の cDNA を取得している^{6)~9)} (表 1). 多くの遺伝子
は, 植物が低温などのストレスを受けた際に発現が見られ
るものであった. このうち, ノーザンブロッティングやリ
アルタイム PCR 法による解析によって, 特に発現量が多

表 1 クロレラ由来低温誘導性遺伝子

分類	機能 (種類数)
転写・翻訳	60S ribosomal proteins (L10 など) 40S ribosomal proteins (S20 など) 50S ribosomal proteins (L1 など) 30S ribosomal proteins (S6 など) Elongation factor Translation initiation factor (29 種)
ストレス応答	Late embryogenesis abundant (Lea) proteins (HIC6, HIC12)* Desiccation-related protein NADPH thioredoxin reductase Catalase (5 種)
代謝	Δ 12 fatty acid desaturase (FAD2) ω -3 fatty acid desaturase (FAD3) Tryptophan synthase Thiazole biosynthesis enzyme Prohibitin Transketolase Flavodoxin Methionine synthase など (18 種)
タンパク質の修復・分解	Chaperonin 60B HSP 70 Prefoldin Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase Clp protease FtsH Ubiquitin-conjugating enzyme Ferritin (8 種)
光合成	Ferredoxin Chlorophyll a/b-binding protein (2 種)
輸送	2-oxoglutarate/malate translocator ATP/ADP translocator (2 種)
シグナル伝達	Ca ²⁺ -binding protein GTP-binding protein Adenylylsulfate kinase (3 種)
未知	— (70 種)
計	137 種

* HIC : hardening-induced *Chlorella*

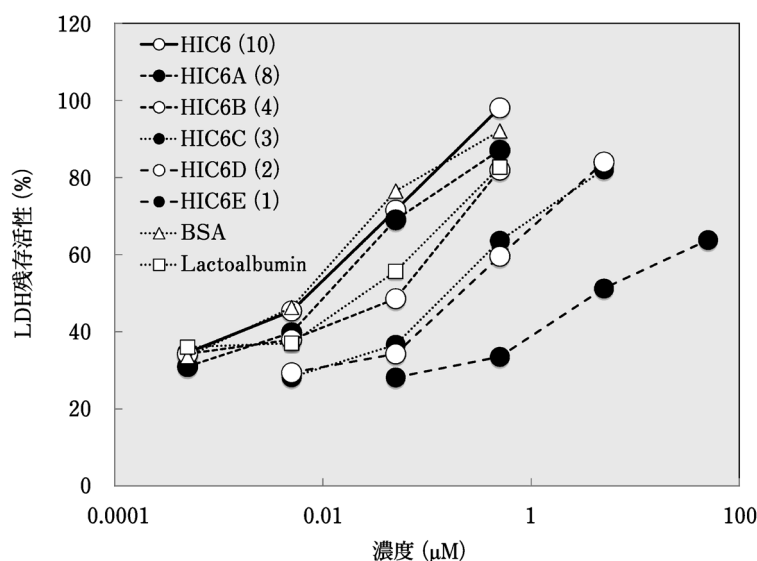


図 1 *hiC6* 遺伝子由来合成ポリペプチドの凍害防御効果

各濃度でポリペプチドを乳酸脱水素酵素 (LDH) 溶液に添加後, -20°C で 24 時間凍結融解後の残存活性を測定. 括弧内の数値はそれぞれのポリペプチドが持つ 11 アミノ酸のモチーフ数を示す.

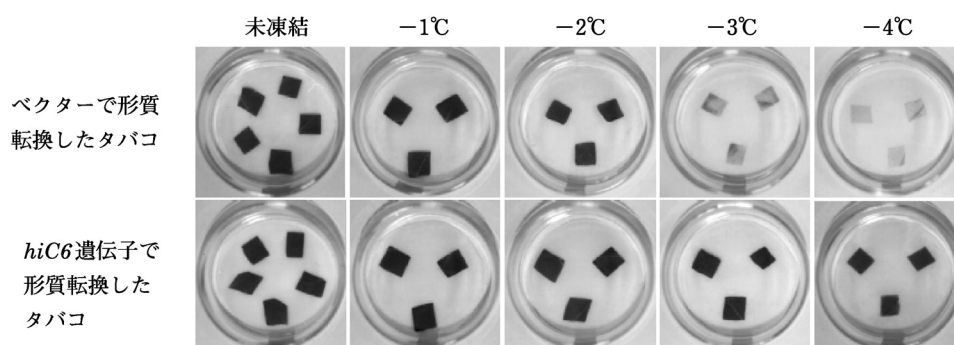


図 2 *hiC6* 遺伝子を導入したタバコ葉の凍結耐性

タバコの葉を各温度で 3 時間凍結し, その後 25°C に戻して 4 日後に写真を撮影した.

く, 凍結耐性との関わりについて新規性ならびに強い関与が推察された二つの遺伝子に着目した.

まず, 一つ目は Late Embryogenesis Abundant (LEA) タンパク質をコードする *hic6* 遺伝子⁶⁾ であるが, この遺伝子は 11 アミノ酸の繰り返し配列¹⁴⁾ を有し, その繰り返し配列が凍結耐性に強く関与している可能性が考えられた. そこで, 大腸菌組み換え体による生産や化学合成法により, 11 アミノ酸の繰り返し数が異なるポリペプチドを合成し, 凍結に弱い乳酸脱水素酵素 (LDH) に共存させて凍結し, 融解後の LDH 残存活性を測定した. その結果, HIC6 タンパク質は BSA などと同程度の凍害防御活性を有し, その活性は 11 アミノ酸の繰り返し数に依存していることを明らかにした (図 1)¹⁵⁾. さらに, この遺伝子を酵母¹⁶⁾あるいはタバコ植物 (図 2) に導入した組み換え体では¹⁷⁾, それぞれにおいて凍結耐性が向上した. 植物での凍結耐性は -3°C ~ -4°C 程度の比較的高い温度ではあったが, 実際にタバコ

植物でも凍結耐性が向上したことから, HIC6 タンパク質の実用性が示された.

二つ目として, NADPH 依存性葉緑体局在型チオレドキシン還元酵素 (NTRC) 遺伝子に着目した. 本酵素は, 葉緑体に局在し¹⁸⁾, ペルオキシレドキシン (Prx) と協働して過酸化水素などの過酸化物を還元する酵素である¹⁹⁾. そこで, クロレラから NTRC と相互作用するタンパク質を精製し, N-末端アミノ酸配列決定により同定したところ, Prx タンパク質であった²⁰⁾. そのため, 共同研究していた東京農業大学の新村洋一教授より本 *Prx* 遺伝子ならびに大腸菌での発現ベクターの分与を受けた. NTRC ならびに Prx タンパク質を大腸菌で大量発現させて精製後, 活性を測定したところ, 両タンパク質存在下で過酸化水素および過酸化物の分解が確認された²¹⁾. さらに, 両遺伝子を発現する組換え酵母の凍結耐性あるいは酸化ストレス耐性について評価したところ, NTRC 単独発現あるいは NTRC-

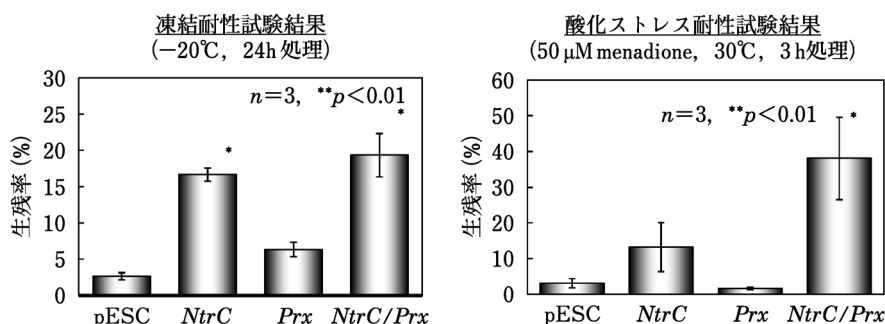


図3 NTRCならびにPrx遺伝子導入酵母の凍結耐性ならびに酸化ストレス耐性試験

Prx共発現酵母でストレス耐性の向上が認められた(図3)。このことから、NTRC-Prx抗酸化系酵素群が、凍結時あるいは融解時に発生する活性酸素種の分解に働くことで凍結耐性向上に寄与していることが推察された。

3. 凍結耐性関連物質の利用

タウリンは動物細胞において膜の安定化、浸透圧調節、抗酸化作用が報告されていることから²²⁾²³⁾、凍結耐性の向上にも機能することが期待された。そこで、酵母をタウリン添加培地で培養してタウリンを蓄積させた酵母について凍結耐性評価を行った¹⁰⁾。その結果、凍結耐性向上は認められたものの、凍結耐性向上に寄与することが知られているプロリンと比べ、低かった。しかし、細胞への取込量(モル数)当たりで凍結耐性増加率を比較したところ、プロリンよりも高いことが確認された(図4)。そこで、タウリン生合成に関わる二つの酵素遺伝子(システインデオキシゲナーゼ(CDO)、システインスルフィン酸デカルボキシラーゼ(CSD))のcDNAをコイのcDNAライブラリーよりクローニングした¹¹⁾。さらに、これらの遺伝子をそれぞれ個別に共発現、あるいは融合タンパク質として発現させる形で酵母に導入し、凍結あるいは酸化ストレス耐性について評価した。その結果、共発現および融合タンパク質いずれの発現酵母においても、凍結耐性は明確に向上しなかったものの、酸化ストレス耐性は顕著に向上した(図5)。CDOおよびCSDにより、ヒポタウリンが合成され、その後、自動酸化によりタウリンに変換される。しかし実際には合成されたヒポタウリンのうち、6-7割がタウリンまで変換されることなく残っていた¹¹⁾。この結果は、ヒポタウリンにより酸化ストレス耐性は大きく改善したが、これ以降のタウリンまでの変換がうまく機能していないために凍結耐性は向上しなかったものと考えられた。

次に、動物や酵母で凍結耐性向上効果についてすでに報告されているトレハロースについても検討を行った。元々、トレハロースを蓄積する植物は少ない²⁴⁾。そこで、植物が持つトレハロース合成に関わる遺伝子を改変することでトレハロース合成および蓄積量を増やす可能性について検討を行った¹²⁾。モデル植物であるタバコからトレハロー

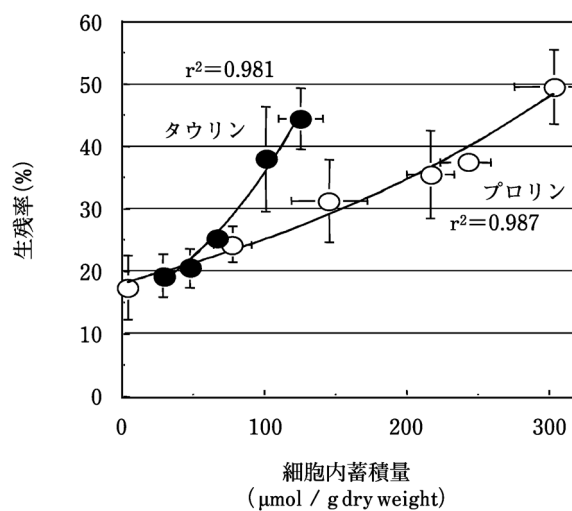


図4 タウリンの細胞内蓄積量が酵母の凍結融解後の生残率に及ぼす影響

ス合成に関わるトレハロース 6-リン酸合成酵素(TPS)およびトレハロース 6-リン酸フォスファターゼ(TPP)をコードする遺伝子をクローニングした。他の生物由来の配列と比較したところ、タバコのTPSにおいても、シロイヌナズナ由来のTPSと同様に、トレハロースを蓄積する大腸菌や酵母のTPSには見られない配列がN末端側に確認された。そこで、N末端側のアミノ酸配列を欠損させた $\Delta NTPS$ 遺伝子またはTPS遺伝子およびTPP遺伝子を、TPS1欠損酵母($\Delta tps1$)に導入し、そのトレハロース蓄積と凍結耐性について評価した。その結果、 $\Delta NTPS$ を導入した酵母では、トレハロース蓄積量の増加ならびに凍結耐性の向上が認められ(図6)、遺伝子を改変することで植物にトレハロースを蓄積できる可能性が示された。

4. 低温増殖性食中毒細菌の検出法の開発

低温増殖性細菌のリステリアは低温のみならず、塩に対しても強いことから、低温流通食品で危害因子となりうる²⁵⁾。食中毒患者から分離される菌株の血清型としては1/2a, 1/2b, 4bが多いが、この血清型であるからといって必ずしも病原性を示すものではないことから、病原性を有

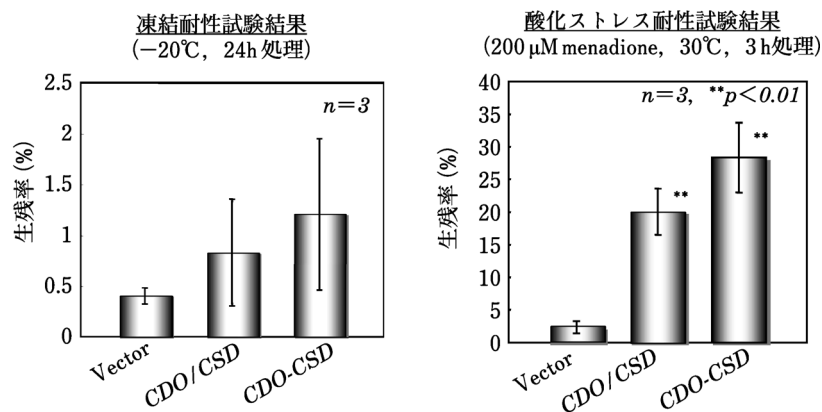


図 5 CDO および CSD 発現酵母の凍結および酸化ストレス耐性
CDO/CSD：個別に発現，CDO-CSD：融合タンパク質として発現。

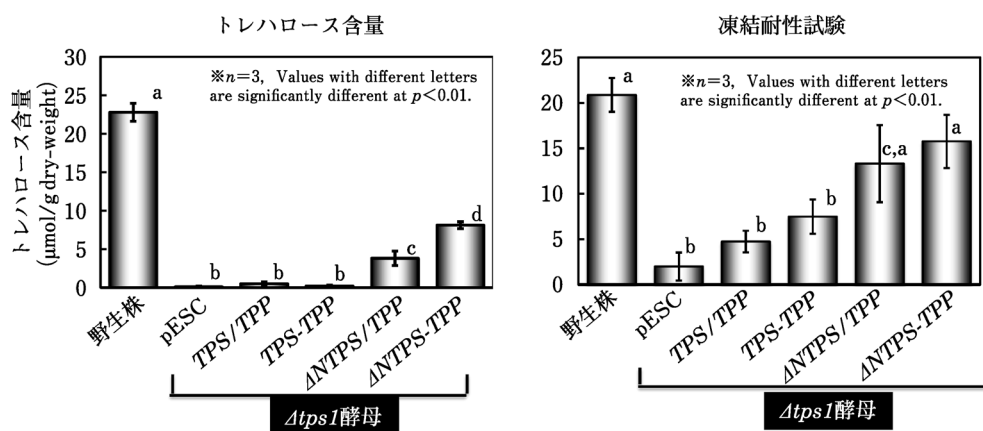


図 6 トレハロース合成酵素遺伝子導入酵母のトレハロース蓄積ならびに凍結耐性
TPS/TPP, ΔNTPS/TPP：個別に発現，TPS-TPP, ΔNTPS-TPP：融合タンパク質として発現。

するリステリアの検出法の開発が重要である。そこで著者らは、収集した臨床株 31 株ならびに食品・環境由来株 161 株、全株について、病原性に関与する *hlyA*, *inlA*, *clpC*, *plcA* の 4 遺伝子の内部塩基配列決定後、配列比較によりサブタイピングを行った¹³⁾²⁶⁾。その結果、*hlyA*, *clpC*, *inlA*, *plcA* は 12, 17, 28, 30 のグループに分けられた。この中で特に二つの遺伝子について臨床株と高い相関が認められ、病原性を有する可能性が高い株に特徴的な配列が見出された。すなわち、*hlyA* については、臨床株であり血清型 1/2a の 11 株中 7 株がグループ 5 に分類される配列を有した。また、*clpC* については、臨床株で血清型 1/2b の 8 株中 7 株が、また臨床株で 4b の 12 株中 9 株がグループ 13 に分類される配列を有していた。著者らの研究室で保存する食品由来で血清型 1/2a の 43 株中 11 株が *hlyA* グループ 5 の配列を有し、また、血清型 4b の 34 株中 13 株ならびに 1/2b を示す 56 株中 17 株が *clpC* のグループ 13 に分類される配列を有することが判明し、これらについては高い病原性を有する可能性が疑われた¹³⁾。さらに、*hlyA* グループ 5 および *clpC* グループ 13 の塩基配列中に特異的な

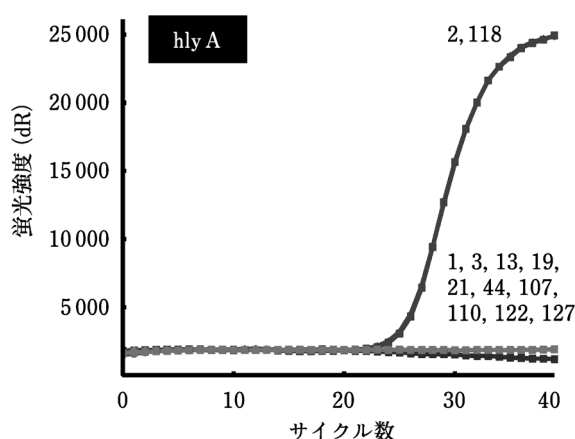


図 7 サイクリングプローブ法を用いた *hlyA* 遺伝子グループ 5 に分類されるリステリアの特異的検出
数値はリステリアの保有株番号。No. 2 と No. 118 は *hlyA* グループ 5 に分類された。

一塩基置換箇所を見出し、その周辺箇所に相補的な蛍光標識した RNA プローブを合成した。このプローブを用いたサイクリングプローブ法²⁷⁾により、病原性を有する可能性

が高い株を特異的に検出するリアルタイム PCR 法を開発した (図 7)¹³⁾。

5. おわりに

低温流通の整備により, 簡便なカット野菜などの生食用青果物の市場規模はさらに拡大していくことが予想されるが, それに伴い, 食中毒事件も増加する可能性があり, 加工, 流通各段階での品質と安全性を確保に向けた取り組みは強化される必要がある。本研究は高品質を維持できる様に低温流通に適した生食用野菜への品種改良・育種を目的とした基礎研究と低温流通食品の安全性確認確保のための検査法の開発である。今後, 実用レベルでの活用を目指して研究を進めていく予定である。

本研究は, 九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品衛生化学研究室で行われた研究であります。研究を遂行するにあたり, 直接ご指導ご鞭撻を賜りました, 九州大学名誉教授 波多野昌二先生, 九州大学名誉教授 飯尾雅嘉先生, 九州大学教授 宮本敬久先生, 鹿児島女子短期大学教授 吉元誠先生に心より感謝申し上げます。また, ご支援ならびにご協力を賜りました九州大学の九州大学農学部旧食糧化学工学科の先生方ならびに共同研究者の皆様にも心より御礼申し上げます。また, 研究遂行にご協力頂いた食品衛生化学研究室の同窓生の皆さんに厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 泉 秀実 (2009)「カット野菜品質・衛生管理ハンドブック」SCIENCE FORUM.
- 2) Doyle, M.P. and Erickson, M.C., Summer meeting 2007 – the problems with fresh produce : an overview. *J. Appl. Microbiol.*, **105**, 317–330 (2008).
- 3) Thomashow, M.F., Plant cold acclimation : Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 571–599 (1999).
- 4) Coutinho, C., Bernardes, E., Félix, D. and Panek, A.D., Trehalose as a cryoprotectant for preservation of yeast strains. *J. Biotechnol.*, **7**, 23–32 (1988).
- 5) Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshida, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K., Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **461**, 205–210 (1999).
- 6) Joh, T., Honjoh, K., Yoshimoto, M., Funabashi, J., Miyamoto, T. and Hatano, S., Molecular cloning and expression of hardening-induced genes in *Chlorella vulgaris* C-27 : the most abundant clone encodes a late embryogenesis abundant protein. *Plant Cell Physiol.*, **36**, 85–93 (1995).
- 7) Machida, T., Murase, H., Kato, E., Honjoh, K., Matsumoto, K., Miyamoto, T. and Iio, M., Isolation of cDNAs for hardening-induced genes from *Chlorella vulgaris* by suppression subtractive hybridization. *Plant Sci.*, **175**, 238–246 (2008).
- 8) Suga, K., Honjoh, K., Furuya, N., Shimizu, H., Nishi, K., Shinohara, F., Hirabaru, Y., Maruyama, I., Miyamoto, T., Hatano, S. and Iio, M., Two low-temperature-inducible *Chlorella* genes for $\Delta 12$ and ω -3 fatty acid desaturase (FAD) : Isolation of $\Delta 12$ and ω -3 *fad* cDNA clones, expression of $\Delta 12$ *fad* in *Saccharomyces cerevisiae*, and expression of ω -3 *fad* in *Nicotiana tabacum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1314–1327 (2002).
- 9) Honjoh, K., Machida, T., Hagiwara, T., Suga, K., Yonekura, M., Shimizu, H., Ohashi, N., Miyamoto, T., Hatano, S. and Iio, M., Molecular cloning and characterization of a cDNA for low-temperature inducible cytosolic glucose 6-phosphate dehydrogenase gene from *Chlorella vulgaris* and expression of the gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Sci.*, **172**, 649–658 (2007).
- 10) Honjoh, K., Machida, T., Nishi, K., Matsuura, K., Soli, K.W., Sakai, T., Ishikawa, H., Matsumoto, K., Miyamoto, T. and Iio, M., Improvement of freezing and oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by taurine. *Food Sci. Technol. Res.*, **13**, 145–154 (2007).
- 11) Honjoh, K., Matsuura, K., Machida, T., Nishi, K., Nakao, M., Yano, T., Miyamoto, T. and Iio, M., Enhancement of menadione stress tolerance in yeast by accumulation of hypotaurine and taurine : Co-expression of cDNA clones, from *Cyprinus carpio*, for cysteine dioxygenase and cysteine sulfinate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Amino Acids*, **38**, 1173–1183 (2010).
- 12) Machida, T., Honjoh, K., Aso, A., Yamamoto, M., Iio, M. and Miyamoto, T., Trehalose 6-phosphate synthase and trehalose 6-phosphate phosphatase from *Nicotiana tabacum* function in trehalose biosynthesis and environmental stress tolerance of yeast. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **55**, 261–268 (2010).
- 13) Honjoh, K., Fujihara, K., Haraguchi, T., Ono, Y., Kobayashi, H., Hiwaki, H., Kamikado, H., Jang, S.S., Ryu, S. and Miyamoto, T., Subtyping of *Listeria monocytogenes* based on nucleotide polymorphism in *clpC*, *inlA*, *hlyA*, and *plcA* genes and rapid identification of *L. monocytogenes* genetically similar to clinical isolates. *Food Sci. Technol. Res.*, **14**, 557–564 (2008).
- 14) Dure, L.III, Crouch, M., Harada, J., Ho, T.-H.D., Mundy, J., Quantrano, R., Thomas, T. and Sung, Z.R., Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.*, **12**, 475–486 (1989).
- 15) Honjoh, K., Matsumoto, H., Shimizu, H., Ooyama, K., Tanaka, K., Oda, Y., Takata, R., Joh, T., Suga, K., Miyamoto, T., Iio, M. and Hatano, S., Cryoprotective activities of group3 late embryogenesis abundant proteins from *Chlorella vulgaris* C-27. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1656–1663 (2000).
- 16) Honjoh, K., Oda, Y., Takata, R., Miyamoto, T. and Hatano, S., Induction of the *hiC6* gene, which encodes a homologue of a late embryogenesis abundant (LEA) protein, enhances freezing tolerance of yeast. *J. Plant Physiol.*, **155**, 509–512 (1999).
- 17) Honjoh, K., Shimizu, H., Nagaishi, N., Matsumoto, H., Suga, K., Miyamoto, T., Iio, M. and Hatano, S., Improvement of freezing tolerance in transgenic tobacco leaves by expressing the *hiC6* gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1796–1804 (2001).
- 18) Serrato, A.J., Perez-Ruiz, J.M., Spinola, M.C. and Cejudo, F.J., A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 43821–43827 (2004).
- 19) Moon, J.C., Jang, H.H., Chae, H.B., Lee, J.R., Lee, S.Y., Jung, Y. J., Shin, M.R., Lim, H.S., Chung, W.S., Yun, D.J., Lee, K.O. and

- Lee, S. Y., The C-type *Arabidopsis* thioredoxin reductase ANTR-C acts as an electron donor to 2-Cys peroxiredoxins in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**, 478–484 (2006).
- 20) Machida, T., Kato, E., Ishibashi, A., Sato, J., Kawasaki, S., Niimura, Y., Honjoh, K. and Miyamoto, T., Expression pattern of a chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase in *Chlorella vulgaris* during hardening and its interaction with 2-Cys peroxiredoxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 695–701 (2009).
- 21) Machida, T., Ishibashi, A., Kirino, A., Sato, J., Kawasaki, S., Niimura, Y., Honjoh, K. and Miyamoto, T., Chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase from *Chlorella vulgaris* alleviates environmental stresses in yeast together with 2-Cys peroxiredoxin. *PLoS ONE*, **7**, e45988 (2012).
- 22) Schaffer, S., Azuma, J., Takahashi, K. and Mozaffari, M., Why is taurine cytoprotective? In “Taurine” eds. Lombardini, B., Schaffer, S. and Azuma, J. Kluwer Plenum, New York, pp.307–321 (2003).
- 23) Takeuchi, K., Toyohara, H. and Sakaguchi, M., A hyperosmotic stress-induced mRNA of carp cell encodes Na⁺- and Cl⁻-dependent high affinity taurine transporter. *Biochim. Biophys. Acta*, **1464**, 219–230 (2000).
- 24) Müller, J., Boller, T. and Wiemken, A., Trehalose and trehalase in plants : recent developments. *Plant Sci.* **112**, 1–9 (1995).
- 25) Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. and Kreft, J., *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**, 584–640 (2001).
- 26) Liu, P., Mizue, H., Fujihara, K., Kobayashi, H., Kamikado, H., Tanaka, T., Honjoh, K. and Miyamoto, T., A new rapid real-time PCR method for detection of *Listeria monocytogenes* targeting the *hlyA* gene. *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 47–57 (2012).
- 27) Bekkaoui, F., Poisson, I., Crosby, W., Cloney, L. and Duck, P., Cycling probe technology with RNase H attached to an oligonucleotide. *BioTechniques*, **20**, 240–248 (1996).

(平成 25 年 12 月 6 日受理)