

卵の微生物学的研究 (第1報)

鶏卵への大腸菌の実験的汚染について

友松 滋 夫
水谷 雅 子

私共の食生活において、鶏卵は食品としての重要な位置を占め、日常欠かすことのできないものとなってきている。このように利用している鶏卵は夏期には比較的いたみ易いが、冬期では案外長時間放置しても腐敗しにくいという性質がある。この冬期において腐敗しにくいのは、卵の卵白中にリゾチームと呼ばれる腐敗を防ぐ機能があるためとされている。

Wurtz¹⁾ (1890) が初めて卵白に殺菌作用のあることを示唆して以来、1909年Laschtschenko²⁾ がさらにこの卵白をブイヨン、水、生理的食塩水に溶かしても *Bacillus subtilis* に対して殺菌作用があるのを認め、その作用は酵素的なものとした。この酵素活性は55~60°C に加温しても、その活性に変わりはないが、しかし 65~70°C に加温した場合には、その機能を失うことを確認している。その後Fleming³⁾、Epstein-Chain⁴⁾、Smolelis-Hartsell⁵⁾、Meyer⁶⁾ 等⁷⁾⁸⁾ により卵白中のこの作用を有する成分にリゾチームなる名がつけられ、このリゾチームは 5×10^4 に稀釈しても細菌に対する作用がある。さらにこの作用機序は細菌の細胞膜の特定の糖の部分破壊する溶菌作用のためであり、その酵素活性はアルカリ性では不安定であるが酸性では比較的安定である等が判明し、今では卵に細菌の侵入に対し防禦する機能のあることを疑うものはない。

しかし Haines-Moran⁹⁾ は卵殻、卵殻膜に *Saccharomyces* のような比較的大きな微生物が通過できる細孔を認めている。また腐敗卵からの原因菌の分離も盛んに行われてきている。Jenkins-Henderickson¹⁰⁾ は45例の腐敗卵中42例に細菌を認め、Turner¹¹⁾ は37°C では発育をみないが、室温で発育する *Achromobacter perolens* を分離し、Levine-Anderson¹²⁾ は *Pseudomonas Gravelens* 等3種の菌を分離し、その後¹³⁾ *Pseudomonas aerginoasa*, *Streptococcus fecalis*, *Proteus morgani*, *Escherichia coli*, *Aerobacter cloacae*, *Bacterium prodigiosum*, 等多数の菌種が卵の腐敗を起す原因菌として分離されてきた。

このように微生物と卵の関係は次第に解き明かされつつある。実験的汚染については、Bean-Maclaury¹⁴⁾ が *Pseud. aerginosa*, *Streptococcus fecalis*, *Prot. morgani*, *Prot. vulgaris* の培養液に鶏卵を15分間浸漬した後、12.8°C 及び 37~40°C の濁度の条件下で7日間貯蔵した場合の卵内への細菌の侵入について検索し、その実験例の10~40%に細菌の侵入を認めている。

私共は卵が生産者より消費者の手に渡る間に卵は比較的大腸菌と接触する機会があるものと考えられるので、*Esch. coli* を使用し、卵殻を通しての細菌の侵入機序を知る目的で次の実験を試みた。

先づ実験(1)において正常卵の卵殻に菌を接種した場合について観察し、次いで実験(2)においては卵の前処置を行なった後、菌を接種し、一定期間放置後、卵白への細菌の侵入の有無を観察した。この結果興味ある一知見をえたので報告する。

実験材料及び方法

鶏卵及び菌株：鶏卵はバタリー式飼育によるロックホーン種の産卵後2日以内の新鮮無精卵を使用した。また大腸菌菌株は北研 *Escherchia coli* 4 を普通寒天培地上に37°Cで24時間培養したものをを用いた。

実験方法：実験1及び実験2の2項に分けて行なった。実験1では正常卵の卵殻に菌を接種した後、種々の貯蔵法による卵内への菌の侵入に与える影響を検索し、実験2では前処置を加え卵の卵殻に菌を接種した後37°Cで貯蔵した場合の卵内への菌の侵入に与える影響を検索した。

「実験1」先づ正常卵を3%逆性石ケンで十分に洗滌した後、滅菌蒸留水に浸して洗剤をよく落とし、この水洗を3回繰り返した。続いて *Esch. coli* の菌浮游液（菌数約200万/ml、液温5°C）に5秒間浸した後、滅菌したプラスチック製の卵保存容器に納卵し、これらの卵殻に菌を接種し室温（20~25°C）、ふ卵器（37°C）、氷室（5°C）の条件下でそれぞれ12日間貯蔵した。これら卵を取り出し、0.1%昇汞水に10分間浸して卵殻表面を滅菌し、滅菌蒸留水でよく洗い、アルコール綿で清拭し、割卵して滅菌シャーレに卵内容に移した。さらに卵白1ml中の菌数を調べるためこの卵内容の卵白部分を滅菌ピペットで2ml吸い取り滅菌した生理的食塩水2mlに加えて卵白をよく溶解した後、再びこの溶解卵白を2ml滅菌ピペットで吸い取り直径9cmの滅菌シャーレに移した。これに50°Cに加温溶解してあるデスオキシコレート培地を加えて均一に混釈し、冷却後、37°Cのふ卵器で24時間培養をおこなってこの平板培地中の赤変集落を数え判定を行なった。尚各実験例には卵を10個宛使用した。

「実験2」卵を先づ3%逆性石ケンで十分に洗滌した後、滅菌蒸留水に浸して洗剤をよく落とすこと3回、それらの卵を自然乾燥し、無菌的に次の3種の処置をそれぞれ行なった。

(1) 卵殻クチクラを滅菌したサンドペーパー（coarse No.60）で除去したもの、(2) 37°Cのふ卵器に48時間放置したもの、(3) 37°Cのふ卵器に48時間放置後卵殻クチクラを滅菌サンドペーパーで除去したものをそれぞれ *Esch. coli* の菌浮游液（菌数約200万/ml、液温5°C）に5秒間浸したこれら卵を滅菌したプラスチック製の卵保存容器に納卵し、それぞれの卵殻に菌を接種し37°Cのふ卵器内に12日間貯蔵した後、卵白1ml中の菌数を調べるために実験1の場合と同様に卵白を処理し平板培地中の赤変集落を数え判定を行なった。尚各実験には卵を10個

宛使用した。

実験結果

(実験1) 正常卵の卵殻に *Esch. coli* を接種した後、貯蔵法の違いによる卵への菌の汚染についての結果は第1表に示す如くであり室温、ふ卵器、氷室など3つの条件下での12日間の貯蔵では卵白中に菌を認めることができなかった。

第1表 貯蔵法の違いによる卵への菌の汚染に与える影響

貯蔵法 実験例数	室温(20~ 25°C)に貯蔵	ふ卵器(37°C) に貯蔵	氷室(5°C) に貯蔵
1	—	—	—
2	—	—	—
3	—	—	—
4	—	—	—
5	—	—	—
6	—	—	—
7	—	—	—
8	—	—	—
9	—	—	—
10	—	—	—

貯蔵期間：12時間

—：卵白の培養の結果、菌の発育を認めず

第2表 卵の前処置による卵への菌の汚染に与える影響

卵の前 処置 実験例数	卵殻クチクラ 除去例	37°Cに48時間 放置した例	37°Cに48時間放 置後卵殻クチク ラを除去した例
1	—	—	—
2	—	—	—
3	—	—	—
4	—	—	—
5	—	2	—
6	—	—	—
7	—	2	9
8	—	—	4
9	—	—	—
10	—	4	—

(実験2) 前処置を加えた卵の卵殻に *Esch. coli* を接種し、37°Cで12日間卵を貯蔵した時の卵への菌の汚染についての結果は第2表に示してある如く、a) 卵殻クチクラを除去後、菌を接種した例では10例とも卵白中に菌を証明することはできなかったが、b) 37°Cに48時間放置後菌を接種した例では10例中3例に、菌数は少ないが(2~4生菌数/ml) 赤変菌の発育が認められた。また、c) 37°Cに48時間放置後卵殻クチクラを除去し菌を接種した例では10例中2例に4~9生菌数/ml が検出された。これらの結果から卵殻クチクラを除去するよりも37°Cに48時間放置する方が卵は菌に汚染され易い結果を示した。

貯蔵期間：12日間

表中の数字：卵白1ml中の生菌数

—：卵白の培養の結果、菌の発育を認めず

考 接

卵と細菌との関係を考察するにあたり、周知のごとく卵はクチクラにより被れておりその下の卵殻及び卵殻膜には細孔がある。この細孔は酵母すら通す程の大きな間隙であるため卵への細菌の侵入は容易であると考えられる。がしかし、古く Wurtz をはじめ多くの研究者によって指摘されている如く正常卵の卵白中には溶菌作用が有るため容易に細菌の侵入、増殖を許さず比較的無菌的な状態で卵が保持されているものと考えられる。

このような細菌に対する防禦機構を有する卵でも中には腐敗卵が検出されるが、それら原因菌については Jenkins(1918)¹⁰⁾、Turner(1927)¹¹⁾、Levine 及び Anderson (1932)¹²⁾ 等によって詳細に分類されている。

近年卵の腐敗の機序として野並(1960)¹⁴⁾は新鮮卵の内容物は大体無菌的であるが、卵殻表面に付着している微生物が卵殻の細孔を通して内部に侵入するためと考えている。

またBean及びMaclaury(1959)¹³⁾等は卵殻表面に *Pseud. aeruginosa*, *Strept. fecalis*, *Prot. morganii*, *Prot. vtilgaris* を接種し、卵内への細菌の侵入を試み、その腐敗の割合は10~40%であると報告している。

新鮮卵に対して *Esch. coli* の単なる接種では 37°C のふ卵器内におかれても卵の菌による汚染はおこらないことは実験 1 から明らかである。さらに卵の防禦構造の一つである卵殻クチクラを除去してもその除去後直ちに菌接種を行なったものでは菌検出が認められなかったという実験 2-a の事実は卵白内の溶菌物質の活性的存在を示すものと考えられる。

菌検出が認められた実験 2-b、2-c の場合はいずれも 37°C 加温 2 回後に *Esch. coli* 接種を行なったものであり、卵白中の成分変化が菌の侵入を容易にしたものと考えられ、これが直ちにリゾチームの変性によるものとは断定しがたいが卵白中にあるリゾチームは比較的熱に安定であり、56~70°C に加温すると初めてその溶菌作用が低下するとしている報告²⁾⁶⁾ は検討の余地があると考ええる。尚、野並⁵⁾ は新鮮卵の pH は 7.5~8.0 位であるが、これが鮮度の低下とともに上昇するとしている。また、リゾチームがアルカリ側では不活化され易いという。この二点によって加温処置を行なった卵では菌の侵入が比較的容易になるのではないかと考えられる。

このような結果からして卵への細菌の侵入という問題については、卵白中のリゾチームの溶菌作用のみならず、卵の貯蔵によって卵内に起きる pH の変動、卵白中の成分の変化等総合的に立って観察されるべきである。

結 論

1. 正常卵(無精、新鮮卵)の卵殻表面に *Escherichia coli* を接種後、室温(20~25°C)ふ卵器(37°C)、氷室(5°C)にそれぞれ12日間貯蔵した卵の卵内への菌の汚染を検索したが

菌の証明はできなかつた。

2. 卵殻クチクラの除去したもの、37°Cに48時間放置したもの、37°Cに48時間後卵殻クチクラ除去したものについてそれぞれ卵殻表面に *Esch. coli* を接種後、37°Cに12日間貯蔵した卵の、卵内への菌の汚染を検索した結果、卵殻クチクラ除去のみの場合では菌の証明はできなかつたが、37°Cに48時間放置したもの、37°Cに48時間放置後卵殻クチクラ除去したものの場合では少数例ではあるが卵白中に菌が証明された。

文 献

- 1) Wurtz, R.: *Semaine Med.*, Paris, **3**, 21(1890)
- 2) Laschtschnko, P.: *Ztschr. F. Hyg.*, **64**, 419(1909)
- 3) Fleming, H.: *Proc. Roy. Soc., London*, **93**, 306(1922)
- 4) Epstein, A. & Chain, E.: *Britt. J.Exptl. Path.*, **21**, 339(1940)
- 5) Smolelis, A.N. & Hartsell, S.E.: *J.Bact.*, **63**, 665(1936)
- 6) Meyer, K. et al: *J.Biol. chem.*, **113**, 479(1936)
- 7) Cotterill, O.J. & Winter, A.R.: *Poultry Sci.*, **33**, 1185(1954)
- 8) Fevold, H.L.: *Advances in protein Chem. Academic Press.* **6**(1951)
- 9) Haines, R.B. & Moran, T.: *J. Hyg.*, **40**, 453(1940)
- 10) Jenkins M.K. & Hendrikson, N.: *U.S.Dept. Agr. Bul.*, 391(1918)
- 11) Turner, A.W.: *Australian Jour. Exp. Biol. & Med.Sci.* **4**, 57(1927)
- 12) Max Levine, & Anderson, D.Q.: *J. Bact.*, **23**, 337(1932)
- 13) Bean, K.C. & Maclaury, D.W.: *Poultry Sci.*, **38**, 693(1959)
- 14) 野並慶宣：鶏卵の化学と利用法、地球出版、p.128.(1960)