

卵の微生物学的研究（第2報）

鶏卵への大腸菌の実験的汚染について

小 島 信 夫
水 谷 雅 子

私共の食生活の内、鶏卵の利用度は増々増加している。しかし乍ら一般市場で購入する鶏卵にはしばしば変敗しているものを認める。この鶏卵の変敗の原因として多くの種類の細菌が検出されているが、特に大腸菌による変敗については依田¹⁾はその報告の中で大腸菌群 (faecal coli, non-faecal coli, intermediate type) が変敗鶏卵の内37%にもおよぶ高率で検出されていることを指摘している。私共は大腸菌の卵への汚染の一つの断面を観察することを目的として鶏卵を大腸菌液に浸たして見たところ、意外に細菌は卵内に侵入し難いことを知った(1965、友松・水谷²⁾)。この原因としては古くは Fleming³⁾, Meyer⁴⁾ により 指摘されたある種の卵内物質、近年では Eqstein⁵⁾ 等、Fevold⁶⁾ 等、Smolelis⁷⁾ 等、Cotterill⁸⁾ 等、によって明らかとなった卵白中に含まれるリゾチームが細菌の侵入を阻止しているものか、または卵の外側殻組織 (卵殻及び卵殻膜) が侵入を阻止しているものか、その2通りが考えられる。そこでそれらに対する手がかりを得るために、第1の実験では卵白が大腸菌の菌数の増加にどの程度影響するものかを観察し、第2の実験では卵全体を濃厚大腸菌液に浸たしたのち、細菌は卵殻や卵殻膜を通してどの程度卵内に侵入するかを形態学的に観察した。

実験材料および方法

「実験1」卵白の大腸菌の菌数の増加におよぼす影響

鶏卵はバタリー式飼育による白色レグホン種の無精卵で産卵後24時間以内に受け取ったものを6日以内にこの実験に使用した。また大腸菌には北研 *Escherichia coli*-4 株を使用した。

上記鶏卵10個を3%逆性石ケンで洗滌し、更に滅菌蒸留水で3回洗滌した後割卵し卵白を無菌的に採取した。この卵白を濃厚卵白と水様卵白とに分離し、これら卵白を滅菌した生理的食塩水に50%に溶解した。この50%卵白溶液 100mlへ大腸菌浮游液 10ml (2×10^4 生菌数/ml) をそれぞれ加え、37°Cに1時間、24時間、48時間、72時間放置した後、これら菌を接種した卵白溶液を1mlずつ採取した。この卵白液1mlをデスオキシコレート培地に混釈し37°Cで24時間培養した後、赤変集落数を集落計数機により数えた。対照として(a)生理的食塩水 100mlへ上記大腸菌液を10ml加えたものについても菌数を数えた。更に(b)50%卵白溶液(濃厚、水様)を37°Cに1、24、48、72時間放置後1mlを採取し同じ方法で培養を行なった。

各試料は採取時および実験使用前に1mlを取り水素イオン濃度の測定の日立堀場 pH 測定機 (M-4型) により行なった。

「実験2」濃厚大腸菌液に浸した卵の光学顕微鏡的観察

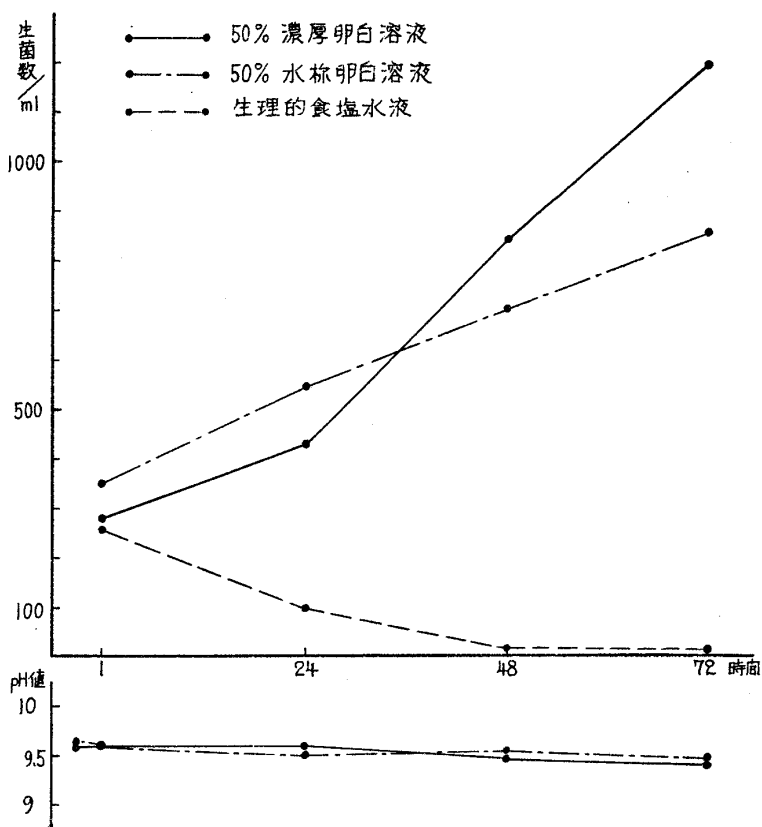
実験に用いた鶏卵および大腸菌は実験1と同じである。鶏卵は実験1の如く逆性石ケンおよび蒸留水で洗滌した後、大腸菌の濃厚菌液 (10^9 生菌数/ml) の中に6時間浸漬、70%アルコール溶液に3日間浸たして固定を行なった。なお70%アルコール溶液のみでは卵白部の凝固が不完全なため 80°C で15分間加熱して卵白の凝固を行なった。固定後脱灰は Pereney 氏液、5%トリクロール醋酸液、5%蟻酸液で、パラフィン包埋、切片 (5μ) およびヘマトキシリン、エオジン染色は一般に用いられている方法で行なった。なお大腸菌液のみについてもヘマトキシリン、エオジン染色を行なった。

実験結果

「実験1」卵白の大腸菌菌数の増加におよぼす影響

50%濃厚卵白、50%水様卵白の何れも肉眼的には混濁を認める程の著しい大腸菌の菌数の増加は見られなかった。しかし第1表に示す如く、50%濃厚卵白液 (使用前は pH 9.60) の各採取時の 1 ml 当りの大腸菌および pH 値は、1時間後菌数 290 pH 9.60 ; 24時間後 430、pH 9.57 ; 48時間後 840、pH 9.48 ; 72時間後 1,200、pH 9.42 であった。また 50%水様卵白液 (使用前は pH 9.62) の菌数および pH 値は 1時間後 350、pH 9.62 ; 24時間後 540、pH 9.50 ; 48時間後 700、pH 9.53 ; 72時間後 850、pH 9.46 であり、時間の経過につれわづかではあるが生菌数の増加するのが認められたが pH 値については 72 時間を経過しても、僅かながらの低下を認めるにすぎなかった。

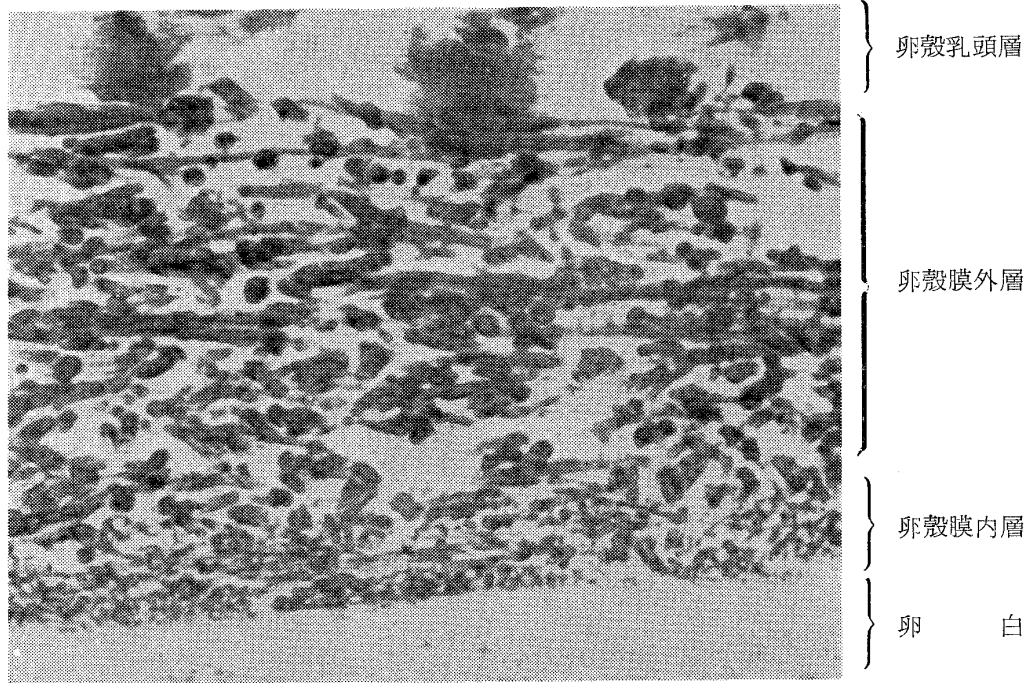
生理的食塩水中の菌数は 1 時間後 260 ; 24 時間後 100 ; 48 時間後 20 ; 72 時間後 10 であり卵白溶液中の場合と逆に菌数は時間を経過と共に減少を示した。



第1図 時間の経過に伴う50%濃厚卵白溶液および50%水様卵白溶液中の大腸菌数の変動と各々の溶液の水素イオン濃度の変化。

「実験 2」大腸菌液に浸した卵の卵殻および卵殻膜の光学顕微鏡的観察。

第 2 図 卵を大腸菌液に37°C 6 時間浸した後の卵殻、卵殻膜、卵白組織、× 2,700



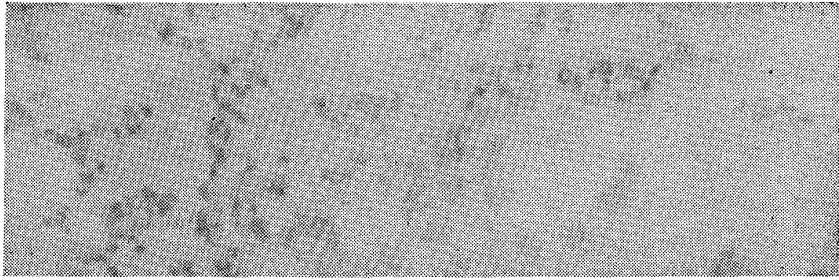
第 2 図に示めすごとく脱灰によって卵外殻はいちづるしく膨張し、その際の発泡により卵殻上皮 (cuticle) 及び卵殻多孔層 (spongy layer) は破損消失し、卵殻乳頭層 (mammillary layer) が処々に残っている。その内側にある卵殻膜はエオジン好性の太さ2~4 μ の繊維が交錯する外層と、太さ1~2 μ の繊維が交錯する内層とから成っている。そして更にその内側にはエオジン好性の卵白質が認められる。第 3 図は大腸菌のみを卵殻組織と同様にヘマトキシリン・エオジン染色をしたものであるが、菌体はヘマトキシリンに淡く染まっていることが認められる。第 4 図及び第 5 図は卵殻膜組織の拡大図であるが、その中のどの層にも大腸菌体の存在は認められなかった。

考 察

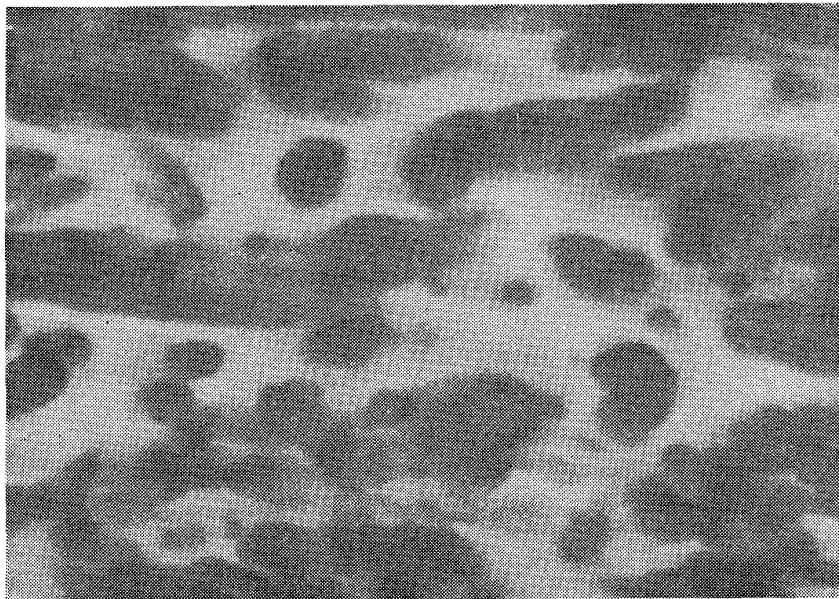
鶏卵の変敗の原因については1878年 Zimmerman⁹⁾ が産卵の際汚染されることを指摘している。その後細菌に対する透過性について Wilm,¹⁰⁾ Lange,¹¹⁾ Turner,¹²⁾ Max Levine¹³⁾ 等、Haines¹⁴⁾ 等、Miller¹⁵⁾ 等、Orel,¹⁶⁾ 等は卵殻 (egg shell) に Elliot,¹⁷⁾ Waldn¹⁸⁾ 等、Elliott,¹⁹⁾ Bean²⁰⁾ 等、は卵殻膜 (shell membrane) 迄もそれを認めている。

これら示唆から卵殻形成前の汚染については卵白そのものの菌に対する防禦性を、卵殻形成後の汚染については卵殻の菌に対する透過性について考える必要がある。実験 1 の結果の如く濃厚、水様卵白液中での大腸菌の菌数はブイヨン培地中で見られるような対数的増加はみられないが、時間的経過にともなって徐々に増加する。しかしこの際の水素イオン濃度変化は殆んどなく pH 9.60が9.42に下る程度である。Sharp²²⁾ 等はその報告の中で卵白の pH を種々にか

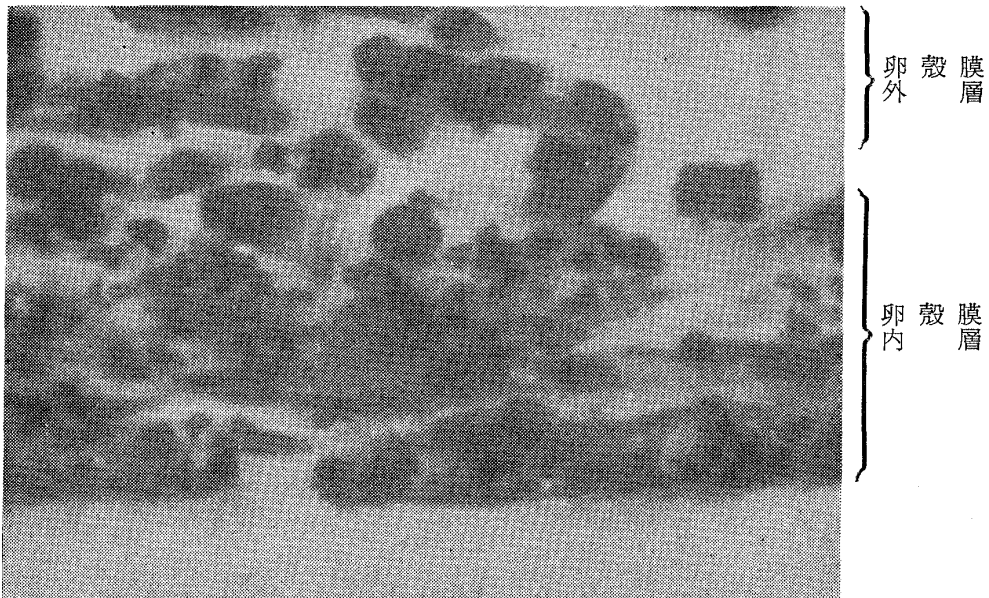
第3図 菌液中の大腸菌×13,500



第4図 第2図の卵殻膜外層の部分拡大×13,500



第5図 第2図の卵殻膜内層の部分拡大×13,500



えたものに37°Cで6時間大腸菌を接触させた場合、pH 5.34~8.28では菌数に大きな変動はないが pH 9.47以上になるとそれは著しく減少する。故に大腸菌自身 pH 9.0以上ではその発

育は可成り阻害されるのではないかとしている。

Fleming, Smolells 等はそれぞれの報告で卵白中の リゾチームは $\text{pH} \approx 7$ (中性付近) で *Micrococcus lysodeikticus* に対し効果的な溶菌作用があることを認めている。

我々も亦卵白内物質がその pH の変動との関連において大腸菌の増殖に影響を及ぼしていることを知った。しかし乍ら、新鮮卵の卵白の pH 値 (7.4~7.6) が日数の経過と共に pH 値を高め 9.6 以上にも達する事実 (著者: 未発表 及び 1962、田坂等²²⁾) が菌に対する防禦機構の中でいかなる作用をなしているかの究明は今後の問題である。

次に卵殻・卵殻膜は細菌通過可能な多くの細孔があるにもかかわらず第 1 報およびその追試 (前掲未発表) によっても卵殻に接触させた細菌は卵の中へ侵入し難い。かかる卵の細菌侵入防禦機構についての研究として Kroft 等²³⁾、Lifshitz 等²⁴⁾ は *Pseudomonas* 株を使った実験で卵殻膜内層が細菌の侵入を阻止するのに重要な役目を果していることを指摘している。

第 2 の実験結果から、卵を菌液に 6 時間浸漬したのみでは卵殻膜に菌体を認めることは困難である。卵殻が物理・化学的に菌に対しいかなる防禦機構を有するかは今後脱灰法、染色方法等に改良を加え、先づ形態学的に観察する必要があるものと考えられる。

結 論

1. 50%濃厚卵白溶液、50%水様卵白溶液に大腸菌を加えた後、1、24、48、72時間と経時的にその生菌数と水素イオン濃度変化の測定を行なった。この結果、濃厚、水様の両卵白液にも、水素イオン濃度には著変が認められない ($\text{pH} 9.4 <$) に抱らず わづかではあるが生菌数の増加しているのを認めた。

2. 大腸菌液に 6 時間浸した新鮮無精卵で卵殻、卵殻膜、卵白中のどの層にまで菌が侵入しているかを組織学的に観察した。この結果、脱灰処理による卵殻乳頭層の組織の損失が著しくまた大腸菌のヘマトキシリン・エオジンによる染色性が悪いため良い結果を得ることができなかった。本研究を行なうにあたり、いろいろ御指導をいただいた本学助教授友松滋夫先生ならびに御助言をいただいた本学教授長谷川通雄先生に感謝いたします。

文 献

- 1) 依田慶市: 衛生学伝染病学雑誌、33、1 (1937)
- 2) 友松滋夫・水谷雅子: 東海学園女子短大紀要、1、175 (1965)
- 3) Fleming, H.: Proc. Roy. Soc., London, 93, 306 (1922)
- 4) Meyer, K. et al: J. Biol. Chem., 113, 479 (1936)
- 5) Epstein, A. & Chain, E.: Brit. J. Exp. Path., 21, 339 (1940)
- 6) Fevold, H. L.: Advances in Protein Chem., Vol. 6, Academic Press. (1952)
- 7) Smolells, A.N. & Hartsell, S.E.: J. Bact., 63, 665 (1952)
- 8) Cotterill, O.J. & Winter, A.R.: Poultry Sci. 33, 1185 (1954)

- 9) Zimmerman: Landwirtschaft. Jahrbücher, Bd. 7, 755 (1878)
- 10) Wilm, H.: Hyg. Rundschau, 4 Jahrgang, 1009 (1894)
- 11) Wilm, H.: Arch. f. Hyg., Bd. 23, 145 (1895)
- 12) Lange, A.: Arch. f. Hyg., Bd. 23, 145 (1907)
- 13) Turner, A.W.: Australian J. Exp. Biol. & Med. Sci., 4, 57 (1927)
- 14) Max Levine., & Anderson, D.Q.: J. Bact., 23, 337 (1932)
- 15) Haines, R.B. & Moran, T.: J Hyg., 40, 453 (1940)
- 16) Miller, W.A. & Morrison, R. W.: Poultry Sci., 37, 1022 (1958)
- 17) Orel, V.: 同上、38, 8 (1959)
- 18) Walden, C.C.' Allen, I. V. F. & Trussell, P.C.: 同上、35, 1190 (1956)
- 19) Elliott, R.P.: Appl. Microbiol., 2, 158 (1958)
- 20) Bean, K.C. & Maclaury, D. W.: Poultry Sci., 38, 693 (1959)
- 21) Sharp, P.F. & Whitaker, R.: J. Bact., 14, 17 (1927)
- 22) 田坂邦子・能島英子・松本武・守康則：家政学雑誌、13, 399 (1962)
- 23) Koft, A.A., Elliot, L.E. & Brant. A.W.: Poultry Sci., 37, 238 (1958)
- 24) Lifshitz, A., Baker, R.C. & Naylor, H. B.: J. Food Sci., 29, 94 (1964)