
研究報文

鮮度低下による卵黄膜脆弱化と大腸菌の増殖性

久保 七彩¹, 山下 真由子¹, 八田 一^{1*}

Weakening of egg yolk membrane and growth of *E.coli* in eggs stored for long periods beyond their expire dates

Nanase Kubo, Mayuko Yamashita, Hajime Hatta

Summary

Japanese shell egg expire dates are determined by Dr. Humphrey's formula indicating the date in relation to the storage temperature when bacterial rapid growth starts on the egg yolk (EY) membrane in eggs. The validity of this formula was evaluated in this study. First, Haugh Unit (HU), yolk index (YI) and EY membrane strength were measured for fresh eggs (stored at 5 °C after laying) and for eggs stored at 30 °C for 6 days (within expire date) and for 12 days (beyond expire date). It was confirmed that the freshness as well as EY membrane strength decreased with longer term storage of eggs at 30 °C. Similarly, the leakage of iron and IgY on the EY membrane increased in the washed solution of the yolk when eggs were stored for longer periods at 30 °C beyond their expire dates. Moreover, the *E.coli* growth test in the washed solution containing leaked yolk components showed that EY of eggs stored for longer periods had a higher increase rate of *E.coli* compared to fresh eggs. This tendency was the most obvious in eggs stored at 12 days beyond expire date. In conclusion, the validity of Japanese egg expire date based on Dr. Humphrey's formula was verified by showing rapid growth of *E.coli* in culture with whole EY separated from stored eggs at 30 °C.

(Received 31 October 2018, Accepted 5 December 2018)

I. 序文

一般に流通する殻付き卵には、10万個に2～3個の確率¹⁾で卵黄膜の表面または卵白中に数個のサルモネラ菌 (*Salmonella Enteritidis*:SE)^{2,3)}が付着している卵 (in egg 汚染卵)が存在する。

卵黄膜は、卵黄側の内層・卵白側の外層という、それぞれ厚さ約4 μmの構造の異なる2つの膜と両者の間に存在する連続層から構成される⁴⁾。卵白や、卵白に近い組成を持つ卵黄膜外層上では、卵白中の因子の存在や鉄の不足によって菌の増殖が制限される⁵⁾。また、新鮮卵では卵黄膜強度が強く、卵黄 /

卵白間の大きな浸透圧の差 (1.8 atm) にも耐えられる⁴⁾。したがって、たとえ in egg 汚染卵であっても、鮮度の良い状態で低温で保存すると数日間はサルモネラ菌の増殖は起こらないと考えられる。

一方、この in egg 汚染卵が長期間保存され鮮度が低下し、卵白の pH 上昇に伴って卵黄膜が弱くなる⁶⁾と、高栄養価である卵黄中の成分 (鉄分や遊離脂肪酸など) が卵黄外に漏れ出し SE が増殖する⁵⁾とされている。このような状態になった卵を生食するとサルモネラ食中毒が発生する。

卵を生食する日本では、このサルモネラ食中毒を防ぐためにテーブルエッグの鮮度と安全性が保証される必要があり、平成11年から卵の賞味期限 (「生食可能な期限」を意味する) が設定されている⁷⁾。この賞味期限は、図1に示す通り Dr.Humphrey の式

¹京都女子大学大学院 家政学研究所 食物栄養学専攻

*連絡先 hatta@kyoto-wu.ac.jp

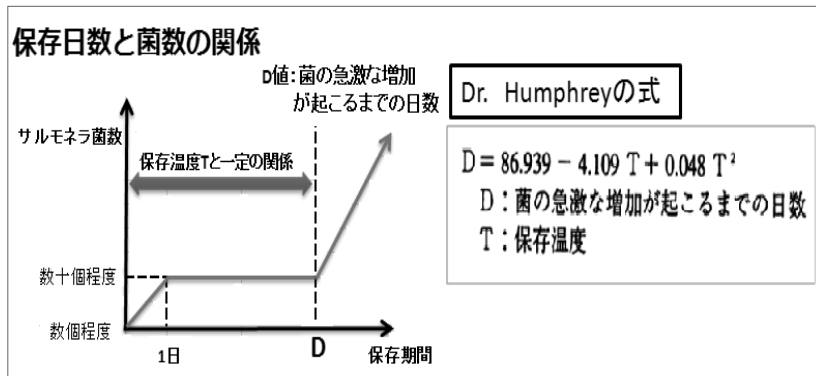


図 1. Dr.Humphrey の式の概要

に保存温度を代入して得られる“D 値”（「菌の急激な増加が起こるまでの日数」を示す）に 7 日を足した日数として示されている（家庭における冷蔵庫内での 1 週間程度の保存を想定）。なお平成 22 年からは Dr.Humphrey の式に従い、かつより消費者に分かりやすい賞味期限として、「産卵日より 21 日以内に賞味期限を設定すること」となっている⁸⁾。

一方、この鶏卵賞味期限の設定根拠になっている Dr.Humphrey の式の正確性を明らかにする研究は未だに行われていないのが現状である。そこで本研究では、この式に従って保存した卵を用い、卵黄内部からの成分溶出を確認した。また SE の代替菌として大腸菌を使用して鮮度の低下に伴う菌の増殖を再現した。さらにこれらの結果より、Dr.Humphrey の式および現行の賞味期限の妥当性を確認した。

II. 実験方法

1. サンプル

京都府畜産センターから、新鮮卵（ボリスブラウン種、産卵 1 日目）を入手した。Dr.Humphrey の式によると、30℃ 保存における D 値は 6.87 日である。よって、入手後 5℃ で保存した「新鮮卵（0 日目卵）」と、30℃ 湿度 75% で 6 日もしくは 12 日間保存した卵（それぞれ、「6 日目卵」、「12 日目卵」）を用意した。なおすべての卵は 30℃ 保存後、測定まで 5℃ にて保管した。

2. 試薬

標準抗体 AP-Rabbit 抗 Chicken/Turkey IgG (H+L) はコスモ・バイオ(株)製のもの、E-CAN (エディブルコラーゲン) は日本商事(株)製のものを用いた。大腸菌 (Competent cell JM109) はタカラバイオ(株)製のものを使用した。FeSO₄, HCl, NaCl,

パラニトロフェニルリン酸 Na 六水和物, Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monolaurate (Tween20), その他試薬は和光純薬工業(株)製のものを用いた。

3. 統計

全ての統計処理は、Excel 統計 (社会情報サービス(株))を用いて行った。データは全て平均値±標準偏差で示した。また、対応のない 3 群間のデータの比較には一元配置分散分析を行い有意差が認められた場合 Tukey 検定を行った。危険率 5% で有意差ありとした。

4. HU・YI および卵黄膜強度の測定

各日数保存した鶏卵の鮮度測定を、ハウ・ユニット (HU) と卵黄係数 (Yolk Index: YI) を指標として、デジタルエッグテスター (DET6000, ナベル(株))を用いて行った。また、卵黄膜強度は、卵割後に卵黄と卵白を分離し卵黄膜を傷つけないように卵黄を 20ml 容量のピーカーに入れ、テキソグラフ (TexoGraph JAPAN FOOD R&D INSTITUTE) を用いて圧縮変形率 (gf/cm²) を測定した (プランジャー: 2.0cm², 降下速度: 1.0mm/sec)。

5. 漏出 Fe 量の測定

卵黄表面を生理食塩水 (15ml) で洗浄し、その液を回収し 3 個分まとめたもの (計 45ml) をサンプルとした。これを 100℃ で一晚凝縮させた後、灰化 (550℃, 5 時間) させた。この灰を 1N HCl 30ml に溶解させ、残留灰を濾過により除いた。これを、ICP 発光分光分析装置 (エスアイアイテクノロジ(株), 京都府立中小企業技術センター所有) で Fe 強度を測定した。次いで、FeSO₄ 標準液 (1.00, 0.50, 0.10, 0.01 ppm/1N HCl) を用いて作成し

た検量線から各 Fe 強度に対する Fe 濃度を求め、得られた値から卵黄 1 個当たりの膜表面より回収した Fe 量【卵黄表面 Fe 量 (μg /卵黄 1 個) = Fe 濃度 (ppm) \times 30 (ml) \times (灰化後サンプル重量/ICP 用灰化後サンプル重量) / 使用卵数】を算出した。

6. 漏出 IgY 量の測定

各卵黄表面を 0.85% 生理食塩水 (15ml) で洗浄し、その液を回収したものをサンプルとし、96 連マイクロプレート (秋田住友ベーク (株)) に $50\mu\text{l}/\text{well}$ 撒き、 37°C で 1 時間インキュベートし 0.05% Tween20 を加えた TBS (TBS-T) で 4 回洗浄した。次いで、E-CAN 10mg/ml (TBS-T) を $200\mu\text{l}$ ずつ散布し 37°C 1 時間 (または 5°C にて一晩) インキュベートした後、TBS-T で 4 度洗浄した。さらに標準抗体 AP-Rabbit 抗 Chicken/Turkey IgG(H+L) の 2000 倍希釈液 (TBS-T) を $100\mu\text{l}/\text{well}$ 撒き 37°C 1 時間インキュベートし、TBS-T で 4 度洗浄した。パラニトロフェニルリン酸 Na 六水和物 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ (基質溶液、pH9.4) を $100\mu\text{l}/\text{well}$ 撒き、 37°C にて 15 分反応させ、 2mol/l NaOH を反応停止液として $50\mu\text{l}/\text{well}$ 撒いた。その後、プレートリーダー Infinite200 PRO (TECAN (株)) を用いて 405nm の吸光度を測定した。

7. M9 培地を用いた卵黄洗液における大腸菌の培養

各サンプル卵の卵殻表面を、流水中で 30 秒間および 70% エタノール中で 10 秒間のみみ洗いを行ったのち、裏表の両面とも 5 分程度紫外線殺菌を行った。それらの卵を安全キャビネット内で割卵し、シャーレ中で卵黄膜が破れないように卵黄を無菌的に分離した。可能な限り卵白を除いた後、M9 培地 15ml を振りかけ卵黄表面の物質を洗い取り、この液をすべて回収した。 30°C 、120rpm で一晩振とう後、8000rpm で 10 分間遠心分離して析出した卵白たんぱく質を除き、各溶液を 50ml 遠沈管に 12ml ずつ分注した。そこに *E.coli* JM109 一晩培養液 (M9 培地使用) を $12\mu\text{l}$ 接種し、 30°C 、120rpm にて 2 日間培養を行った。培養スタートより 17 時間後、24 時間後、48 時間後に吸光度計を用いて波長 600nm にて濁度の測定を行った。

8. 生理食塩水中における卵黄漏出成分による大腸菌の培養

流水、70% エタノール、紫外線によって卵殻殺菌した卵を安全キャビネット内で割卵し、シャーレとピペットを用い卵黄膜が破れないように卵黄を無菌

的に分離し、可能な限り卵白を除いた。*E.coli* JM109 一晩培養液 (M9 培地使用、菌量約 $10^9\text{cfu}/\text{ml}$) に生理食塩水を加えて 10^7 倍に希釈した菌液 30ml を滅菌処理後の 50ml ビーカーに分注し、そこに卵黄を割れないように浸した。その後、アルミホイルで蓋をし、 37°C で 16 時間、60rpm で振とう培養した。培養後の液を 96 連マイクロプレートに $100\mu\text{l}/\text{well}$ となるように撒き、BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay (Promega) を用いて各サンプル菌液中の *E.coli* 濃度を Luminescence 強度として、プレートリーダーで測定した。

Ⅲ. 結果

1. 鶏卵鮮度の変化

30°C で保存することにより、HU および YI の値が低下したことから鶏卵の鮮度が低下していることが示された (図 2, 3)。YI では、0 日目卵と 6 日目卵の間、および 6 日目卵と 12 日目卵の間で有意な差がみられた ($P < 0.01$)。一方、HU では 0 日目卵と 6 日目卵の間でのみ有意な差が見られた ($P < 0.5$)。テクニクによる卵黄膜強度測定では、 30°C での保存期間の長期化により、膜強度が低下する傾向

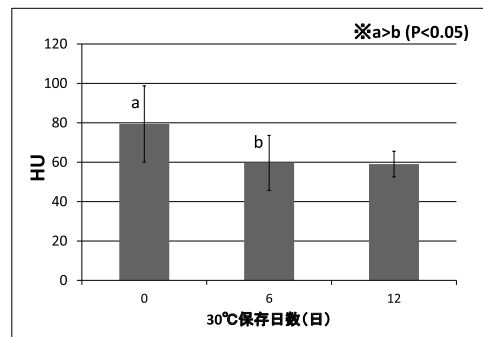


図 2. 30°C 保存期間と HU (n=7)

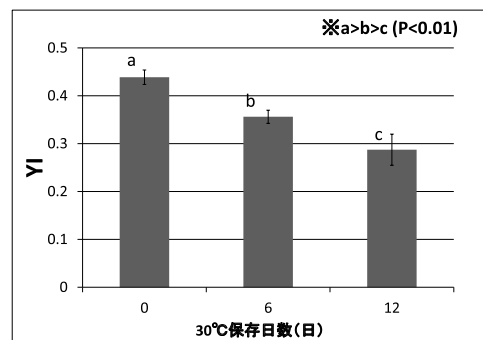


図 3. 30°C 保存期間と YI (n=7)

があることが示され、0日目卵と6、12日目卵に有意な差がみられた (図4)。

2. 漏出 Fe 量の測定

卵黄表面の Fe 量は図5のように30℃保存期間の長期化に伴って増加する傾向にあった。ただし、0日目卵で既に Fe 量が多く、0日目卵と6、12日目卵には有意な差がみられたが、6日目卵と12日目卵の間に差はみられなかった。

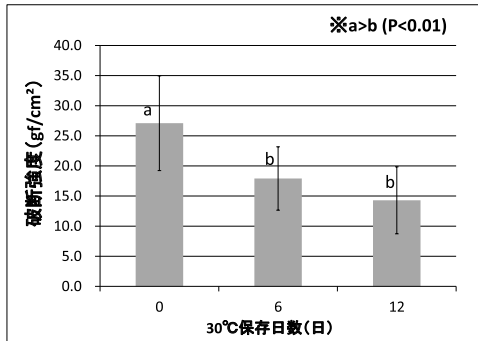


図4. 30℃保存期間と卵黄膜強度 (n=5)

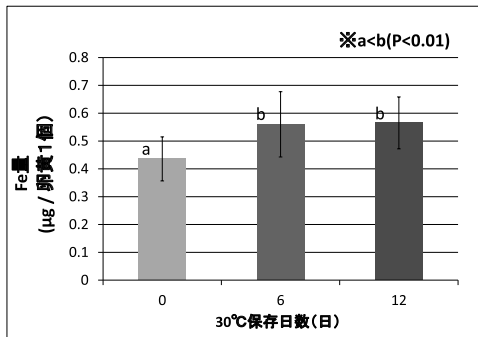


図5. 30℃保存期間と卵黄膜表面 Fe 量 (n=13)

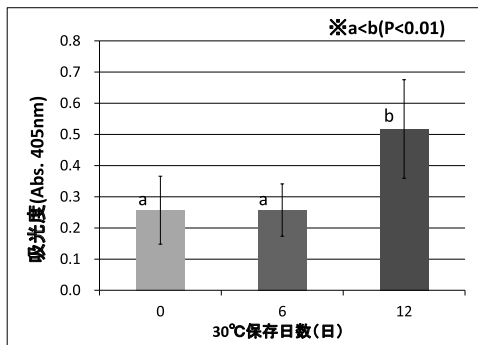


図6. 30℃保存期間と卵黄膜表面 IgY 量 (n=9)

3. 漏出 IgY 量の測定

30℃での保存日数が長くなるほど、IgY 検出量は多くなる傾向にあった。12日目卵は特に検出量が多くなっており、ばらつきも大きくなった (図6)。0、6日目卵と12日目卵の間に有意な差が見られた。

4. 卵黄膜表面洗浄培地における E.coli JM109 の培養

0日目卵および6日目卵ではわずかな濁度の上昇がみられ、12日目卵ではより大きな濁度を示した。また12日目卵では個々のデータのばらつきが非常に大きかった (図7)。

5. 卵黄を浸した生理食塩水中における E.coli JM109 の増殖

各群の Luminescence 強度の平均値および標準偏差は0日目卵で2,144±4,734、6日目卵で100,704±268,653、12日目卵で1,118,076±1,400,490であった (n=8~9)。一元配置分散分析の検定結果において0、6日目卵と12日目卵の間に有意な差がみられた (P<0.05)。Luminescence 強度の実測値と中央値を図8に示す。

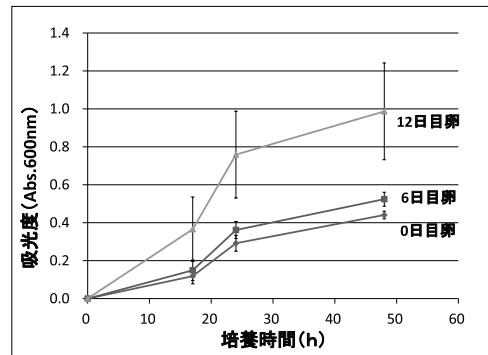


図7. 30℃保存期間と菌液濁度の変化 (n=4)

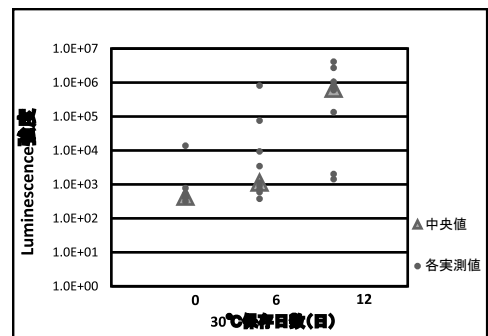


図8. 30℃保存期間と Luminescence 強度 (n=8~9)

IV. 考察

1. 鶏卵鮮度の変化

HU・YIの測定結果（図2, 3）から、30℃、6日および12日間の保存によって鶏卵鮮度が低下していることが示された。なお、アメリカ農務省の卵質基準となっており世界的に知られている鶏卵の鮮度指標はHU⁹⁾であるが、図2より6日目と12日目卵の鮮度の差を評価することが困難であることが明らかとなった。

テキソグラフによる卵黄の押しつぶし結果（図4）から、保存期間が長期である程、卵黄膜強度が低下することが示された。なお、テキソグラフを用いた測定は、得られるデータのばらつきが大きかった。卵黄膜の強度は主として卵黄膜の外層によって支配されており、卵が古くなり卵白中のCO₂が卵殻の気孔から蒸発し、卵白pHがpH9.5～9.7にまで上昇すると、卵黄外層の基本骨格を形成するオボムシンのS-S結合が切断されて卵黄膜強度が低下する⁶⁾とされている。本実験によって鮮度が異なる鶏卵における卵黄膜強度低下の程度が、圧縮変形という物理的な操作によって明らかになった。

2. 鮮度低下による卵黄内物質の漏出

電子顕微鏡観察から、鶏卵貯蔵による卵黄膜の形態変化は、卵黄膜を覆うカラザ層および外層が連続層を残して次第に剥離し、内層も緻密さが減少する現象と報告されている⁴⁾。また、卵黄膜脆弱化によって膜の透過性が向上し、卵黄の成分が卵白側へ、卵白の水分が卵黄側へ移行することが知られており、in egg 汚染卵で問題となるSEは他の多くの菌と同様に鉄要求性を持つ¹⁰⁾ことを踏まえて、鮮度の低下に起因する卵黄膜上のFe量の増加がSEの増殖に特に影響すると考えられている^{5,8)}。本研究においても、30℃で6日および12日間保存した卵では、卵黄膜表面に存在するFe量が新鮮卵よりも増加していることが明らかとなった。

しかし、本研究により示された卵黄膜上のFe量は、新鮮卵で既に多く、分離しきれなかった卵白中のFeが一部含まれている可能性は否定できない。また、本実験用に作成した卵黄膜洗浄後サンプルのFe濃度は、ICP発光分光分析装置の定量限界（10ppb以下）¹¹⁾に近かった。加えて、6日目卵と12日目卵の間には差がなく、これは実際に大腸菌を用いて行った実験（図7,8）と合致しないという結果となった。一方で、卵黄膜上のIgY量の変化を調べた実

験（図6）では、0, 6日目卵と12日目卵の間でIgY検出量が大きく増加しており、これは菌の増殖性試験の結果（図7,8）とも合致する。以上の結果より、本研究で菌増殖の原因としての鉄の影響の大きさについて述べることは難しく、鉄を含めた栄養価の高い卵黄成分が漏れ出すことによって菌の増殖が起こると結論付けられる。

3. *E.coli* JM109 を使用した培養実験

鉄を含まない液体培地（M9培地）で卵黄表面を洗浄した液中での大腸菌の増殖実験結果（図7）は、Dr.Humphreyの式で示されるD値以前である0日および6日目卵では大幅な菌の増殖は起きず、一方でD値の約2倍の期間保存した12日目卵では菌の大幅な増殖が起きることから、Dr.Humphreyの式の妥当性を示す結果になった。これにより、D値を大きく過ぎたことで卵黄膜が弱くなり卵黄中の物質の一部が漏れ出た卵では、その栄養分を利用した菌の増殖が起こりやすくなることが示された。また、特に12日目卵の濁度のばらつきが大きいことから、卵黄膜の強度低下には卵の個体差が存在する可能性が示唆された。

生理食塩水に卵黄を浸した状態で16時間*E.coli* JM109の増殖性を調べる実験（図8）においては各群でばらつきが大きかったものの、新鮮卵では菌は増えにくく、12日間保存した卵では菌の大幅な増殖が起こる可能性が高くなることが示された。本実験では培養スタート時の液中の菌量をin egg 汚染卵の卵黄表面もしくは卵白中に存在する菌量（<10～20cfu/個）⁵⁾により近い値にする目的で10²～10³cfu/mlとしている。したがって、in egg 汚染卵の鮮度が低下したときに生じる菌の増殖をピーカー内で簡易的に再現したと言える。

4. 鶏卵賞味期限の正確性

以上の結果より、定説の通り鮮度の低下による卵黄膜の脆弱化は卵黄内の物質の漏出を引き起こすことが示された。また、Dr.Humphreyの式により決定されたD値を超えて保存した卵では、大腸菌の増殖が起こりやすくなっていることが示され、D値直前の卵ではこの傾向は見られなかった。従って、あくまでもSEの代替菌として大腸菌を使った場合の結果ではあるが、現在鶏卵賞味期限の設定のために使用されているDr.Humphreyの式はある程度正確なものであると考えられる。また、その式から算出されるD値に家庭での冷蔵庫保存期間として7日間

を加えて算出される鶏卵賞味期限も、サルモネラ菌が10℃以下ではほぼ繁殖しない^{3,12,13)}という研究結果を加味すれば妥当なものであると考えられる。

今後は、少数のSEを用いてより正確にin egg汚染を再現し、かつ保存期間をより細かく設定することでSE増殖の変化を観察する実験が求められる。

V. 要約

日本における、卵賞味期限の基準であるDr. Humphreyの式の妥当性を実験的に検証した。まず新鮮卵（産卵後5℃保存）と新鮮卵を30℃、湿度75%において6日、12日間保存した卵を用意した。それらの卵のHU、YIおよび卵黄膜強度を測定することで30℃保存日数の長期化により鮮度が低下することを確認した。さらに、卵黄表面のFe量測定と卵黄表面のIgY量測定を行うことで、鮮度低下に伴い卵黄内成分の卵白側への漏出量が多くなることが明らかとなった。また、卵黄膜表面に存在する卵黄からの漏出物質を用いて行った*E.coli*の培養試験、卵黄を菌液に浸して行った培養実験により、古い卵を用いた場合ほど菌が増殖しやすくなることが明らかとなった。総合して、特にD値を超えて12日間保存した卵において、これらの傾向が強かったことからDr.Humphreyの式の妥当性が確認された。

謝辞

本研究にご協力いただきました、京都府立中小企業技術センターの上野栄義先生に深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) H. ESAKI, K. SHIMURA, Y. YAMAZAKI, M. EGUCHI, M. NAKAMURA: *Epidemiol. Infect.*, **141**(5), 941-943 (2013)
- 2) 村瀬稔, 仲西寿男: *食品と微生物*, **8**(4), 181-187 (1992)
- 3) 鈴木光一, 眞野容子, 古谷信彦, 對馬宣道, 藤谷克己: *生物試料分析*, **39**(4), 277-281 (2016)
- 4) 木戸詔子: *本誌*, **52**, 1-9 (1997)
- 5) Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, Ad Hoc Group on Eggs: "An update on the microbiological risk from shell eggs and their products" (2016)
- 6) 森誠: *日本家禽学会誌*, **30**(4), 249-262 (1993)
- 7) 品川邦汎: *食品衛生学会誌*, **40**(1), 7-18 (1999)
- 8) 鶏卵日付表示等改訂委員会 [(社)日本養鶏協会

内]: 鶏卵の日付等表示マニュアル 改訂版 (2010)

- 9) 中村良 編: 卵の科学, 朝倉書店(株), p.104-112 (1998)
- 10) 山本重雄, 篠田純男: *日本細菌学雑誌*, **51**(2), 523-547 (1996)
- 11) 日立ハイテクサイエンス HP
<https://www.hitachi-hightech.com/hhs/products/tech/ana/icp/descriptions/index.html> (2018年11月10日アクセス)
- 12) 茶菌明: *日本家禽学会誌*, **30**(1), 72-83 (1993)
- 13) 相川勝弘, 村上裕之, 猪俣恭子, 丸山務, 藤澤倫彦, 高橋孝則, 山井志郎: *食品衛生学会誌*, **43**(3), 178-184 (2002)