牛乳中の大腸菌群の熱抵抗性に関する実験的研究

Studies on the Heat-resistibility of Coliform Organisms in Milk

(昭和 34 年 1 月 9 日受理)

春 田 三 佐 夫
(Misao Haruta)

The studies on the heat-resistibility of coliform organisms in milk were done, and the following results were obtained.

- 1) Coliform organisms isolated from raw-and pasteurized-milk were heated in saline solution and 6 strains, out of 76 *Escherichia Coli* strains, survived after that at 63°C for 30 minutes.
- 2) Coliform organisms suspended in milk had, in general, more heat resistibility than in other medium.
- 3) The destruction of coliform organisms occurs logarithmically according to the monomolecular reaction equation, and coliform organisms may survive after the pasteurization at 63°C for 30 min. when present in excessive numbers.
- 4) There is no difference in heat-resistibility between the strains cultured in milk and the one cultured in broth when the concentration of bacteria in heating medium is the same numbers.
- 5) The heat shocked coliform organisms may lie dormant for some periods without multiplying in desoxycholate agar and other medium.

緒 論

市乳(牛乳)の大腸菌群に対する規格が定められて以来(昭和 25 年 10 月 16 日厚生省令第 58 号),従来細菌数のみを対象とした細菌学的面からの牛乳衛生指導,取締に大きな変革もたらされた。自来このような新しい規格に沿うような市乳の生産ということについての牛乳衛生指導面の調査研究も各方面で行われ,これらの成果を實際面に応用することによって市乳の品質が漸次向上を見つゝあることは,牛乳が国民の保健上に重大な意義を持つ関係上裨益するところ大なるものがある。しかし未だに大腸菌群による市乳の汚染率が高いことは否定し得ない事実であり,誠に遺憾である。しかもこの傾向は全国的であり,現在大きな問題になつてゐる。東京都における例年の調査においても市乳における大腸菌群検出率は製造直後の製品は別としても,販売店舗などの末端における製品では 50~60% の陽性率を示している。松井⁴⁾らの調査例では 40~60%, 米山, 和田⁵⁾らによれば 50~80% とそれぞれ陽性を示し, 飯田⁶⁾らによれば神戸市における汚染率は昭和 27 年 36%, 昭和 28 年 42%, 昭和 29⁷⁾年 71% と逐年上昇の一途をたどると述べており, 福原⁸⁾らの京都市における検査では夏季において 50 例中 46 例, 実に 92% という極めて高い陽性率を示している。この

ように大都市においてすら高い陽性率を示していることは,これが国民保健上極めて重要な食品であるところからみて公衆衛生上等閑視し得ない事実であり,われわれ公衆衛生業務に携わるものにとつて一大関心事と言わざるを得ない。

市乳における大腸菌群の由来については,過去数年来内外の多数の人々により追求がなされて来たが,今ここにその由来に関する調査研究報告を眺めてみると,大体二傾向に分れていることが判る。すなわち,一方は牛乳処理行程別検査の結果から,汚染原因,汚染個所を指摘あるいは推定し,その由来が殺菌処理施設の構造不良とそれに基づく未殺菌乳の殺菌乳への漏洩,残存,機械器具⁸⁾⁻¹³⁾の洗滌,殺菌の失宜等による二次汚染としたものである。

他の一つは市乳中の大腸菌群陽性の原因を,大腸菌群の所謂低温殺菌温度と時間に対する熱抵抗性の面から追求したものである。元来 North 及び Park³⁴⁾らの研究結果に基づき,牛乳を所謂低温殺菌(わが国では省令で 62~65°C 30 分と規定されている)すれば,牛乳を汚染する可能性のある結核菌を始め,バング菌等の病原菌は勿論のこと,大腸菌群も完全に死滅するとされているので,従来一般に検出の比較的容易な大腸菌群の有無をもつて所謂低温殺菌の場合の操作の完全度を計る尺度としてい

るわけである。従つて、もし本質的に耐熱性のある大腸菌群の存在が事実であるとすれば、Newman^{12), 35)}らの説くように本菌群を指標とする意義がなくなることになる。

さて、耐熱性大腸菌群については、古くから欧米でも問題視されていたことであり、すでに1915年にAyers³⁶⁾及びJohnson³⁷⁾が、本菌群中に63°C、30分の所謂低温殺菌に耐える菌株があるとの最初の報告をしている。彼らは牛糞、牛乳、クリーム、糞、人糞、チーズ等から174株の大腸菌群を分離し、種々の温度で加熱して、その生存数をみた結果、牛乳殺菌の際に用いられる最低温度の60°Cでは54.6%が生じ、最も普通に用いられる62.8°Cではなお6.9%が生じ、65.6°Cに至りようやく174株中1株が生き残るのを認め、62.8°Cを数度上下することが大腸菌群の殺菌効果に甚だしく重大な影響を及ぼすと述べている。その後、Tanner³⁹⁾及びWindser, Beavens, Wilson, Hemrelberg^{40), 41)}及びWendt, Long^{42), 43), 44), 45), 46)}らが、またわが国では斎藤、鈴木、北村、中島、神保らが本菌群中に所謂低温殺菌で完全に死滅しない菌株があると報告している。中でもWilsonは耐熱性を有する菌株の大部分が*Escherichia Coli*に属すること、しかもこれらの菌株は牛乳中にある場合、特に耐熱性が強く、従つてこのような菌株が牛乳中に存在する場合には、63°C、30分の所謂低温殺菌を行つても残存することがあると述べている。

これに対して、Craig⁴⁷⁾は原料乳、低温殺菌乳、アイスクリームから分離した*Coli*型株、中間型株、*Aerogenes*型株の各8株について耐熱実験を試みた結果、大量の菌が存在する場合には62°C、30分の加熱で全部生き残ることを認め、殺菌前の菌量が1cc当り700以下ならば供試菌はいずれも死滅するものであり、従つて菌量が多ければ、正規の殺菌温度と時間(62°C、30分)でも残存すると述べており、同様Buchbinder⁴⁾らも原料乳中に大量の大腸菌群が含まれているときは殺菌後残存する可能性が多いと述べている。

いずれにしても、市乳中の大腸菌群陽性の原因は以上の諸要因が総合された結果であると考えられるが、しかし未だに明確な解決がなされているわけではない。ことに理解に苦しむ問題は、しばしば経験することであるが、びん詰直後の製品については一応陰性であるのに、保存後数時間または数十時間後に検査すると陽性になるという点である。この問題については勿論ある場合には増菌ということを、ある場合には松井らの言うように供試量の問題等を考えれば一応の解決はつくように思われるが、なおそれだけでは簡単に説明のつかない憾があるように思う。

そこで、今般市乳中の大腸菌群の由来の一因が、一部に考えられているように所謂低温殺菌では死滅し得ない

耐熱性大腸菌群の存在によるものか否かを検討する意図をもつて実験的研究を試みた結果、本質的な耐熱性大腸菌群の存在を是認するまでには至らなかつたが、今後さらに大腸菌群の由来を検討する際、あるいは殺菌処理効果、衛生管理の是非等を判定する際に何等かの示唆を与えと思われる2、3の知見を得たので、ここに報告する次第である。

I 牛乳処理行程の各段階における大腸菌群の消長について

緒論において述べたように、最近市乳においてかなり高率に大腸菌群が検出される事実鑑み、これら大腸菌群の由来が一部の人々がとなえるように果して63°C、30分の所謂低温殺菌に耐える耐熱性大腸菌群の存在によるものであるか、あるいは殺菌法が不備なために本菌群が死滅し得ずに、そのまま市乳中に出現するものか、または殺菌操作は完全に行われており、しかも耐熱性菌の存在もなく、殺菌後の処理行程において機械、器具の構造の不備あるいは洗滌殺菌の失宜による二次汚染によるものかを知ることは、牛乳衛生上意義あることと考えられるので、先人の例にならい、かつそれらの成績を勘案して、牛乳処理行程の各段階について大腸菌群検出試験を試みた。

A. 試験方法

本試験は某社牛乳工場において早朝第1回目の牛乳処理行程について実施したものである。大腸菌群が牛乳処理行程のどの段階において発見されるかをできるだけつきり知りたいために、次の各段階の牛乳を試料として検討を試みた。

- 1) 原料乳
- 2) 殺菌乳
- 3) 殺菌完了後の殺菌槽中の牛乳表面の泡沫
- 4) 殺菌機の排乳コック
- 5) 冷却機下の貯乳槽
- 6) びん詰機の貯乳槽
- 7) びん詰牛乳

上記各行程について、それぞれ次のような方法で試料の採取及び検査を実施した。

1) 原料乳

殺菌機に原料乳を注入しながら殺菌機付属プロペラーを回転攪拌し、出来るだけ原料乳の細菌分布を均一にし、720lの原料乳を収納完了後、直ちに内径8mm、長さ40cmの滅菌ガラス管をもつて各部から約10ccの原料乳を採取し、この試料について食品衛生検査指針記載のM. P. N. 方式による大腸菌群検出試験を試み、陽性の場合

は大腸菌群を分離して、IM Vic system による菌型鑑別を行った。

2) 殺菌乳

63°C、30 分の殺菌後直ちに原料乳採取の場合と同様の方法で殺菌槽中から殺菌乳 100cc を採取し、原料乳と同様の方法で大腸菌群検出試験を行った。

なお、原料乳と殺菌乳については一般生菌数測定を食品衛生検査指針に示す方法により実施した。

殺菌機はフォードラー型 720/ 容バストライザーであり、試験に際しては予め充分洗滌し、塩素による消毒を実施したものである。

3) 殺菌槽中の牛乳表面の泡沫

泡沫の採取法には一定した方法がないので、本実験では次の方法によつた。予め滅菌したガーゼを用意し、これを泡沫上にかぶせて泡沫部分を吸いとり、ガーゼごと滅菌びんに収め、後ガーゼに吸収されている牛乳を絞り出し、全量約 8cc を B. G. L. B. 酸管 (1.5 倍濃度の B. G. L. B. 20cc を容れたもの) に接種し、以下 1) と同様の方法により大腸菌群検出試験を行った。

4) 殺菌機の排乳コック

予め殺菌機を消毒した際に外部からの汚染防止の目的で滅菌硫酸紙でコックを包み、そのままの状態で牛乳を殺菌し、パイピング直前に硫酸紙をとり除き、コックを開いて牛乳 100cc を採取し、以下 1) と同様の方法で大腸菌群検出試験を行った。

5) 冷却機下の貯乳槽

冷却機下の貯乳槽から 100cc の殺菌乳を滅菌ピペットで採取し、以下 1) と同様の方法で大腸菌群検出試験を行った。

6) びん詰機の貯乳槽

試料の採取、検査法共に 5) と同様に実施した。

7) びん詰牛乳

びん詰開始後まず 1 分間隔で、予め滅菌した牛乳びん 5 本にそれぞれ殺菌乳を詰め、滅菌した紙栓を施し、つづいて普通の方法でびん詰した市乳を 1 分間隔で 5 本採取し、これらの試料について 1) と同様の方法で検査を実施した。

なお、処理室内の空気中大腸菌群が存在するか否かを見る為にコッホ氏の空中落下細菌検査法により、E. M. B. 平板培地を殺菌室及び冷却機室にそれぞれ 5 枚ずつ計 10 枚を室内の任意の場所におき、10 分間露出した後、37°C、24 時間培養して本菌群の有無を検査した。

B. 試験成績

成績は第 1 表に示す通りである。すなわち、原料乳は当然のことながら大腸菌群は 1cc 当り 540,000 で、一般

第 1 表 牛乳処理行程別大腸菌群検査成績

No.	試料採取部	採取試料量 単位 cc	大腸菌群		生菌数 1cc 当り
			結果 1cc 当り	菌数 1cc 当り	
1	原料乳	10	+	540,000	1,700,000
2	殺菌乳 (殺菌槽内)	100	—	0	82,000
3	殺菌槽内の 泡沫	8	—	—	—
4	殺菌槽の排 乳コック	60	+	33	—
5	冷却機下の 貯乳槽	60	—	0	—
6	びん詰機の 貯乳槽	60	+	110	—
7	滅菌牛乳び んに採取し た殺菌乳	180	+	> 18,000	220,000
8	製品	180	+	> 18,000	290,000
9	処理室内の 空気	10 カ所	—	—	—

〔備考〕 No. 7, No. 8 はいずれもびん詰牛乳を指す。

生菌数は 1cc 当り 1,700 万であつた。これに対して殺菌直後の牛乳については大腸菌群は一応陰性という結果を得た。なお一般生菌数は 1cc 当り 82,000 であつた。泡沫については全量については検査したが、大腸菌群陰性の結果を得た。コックから採取した牛乳については大腸菌群 1cc 当り 33 を示したのに対して、それ以降の冷却機下の牛乳については大腸菌群陰性であつた。しかしながらびん詰機貯乳槽から採取した牛乳については再び大腸菌群陽性を示した。びん詰牛乳については、無菌牛乳びんに採取したもの、普通にびん詰したもの共に大腸菌群陽性を示し、その菌数においても、一般生菌数においても両者間に殆んど差を認めなかつた。なお、殺菌室、冷却機室の空気中からは大腸菌群は検出されなかつた。

上記行程別試験において検出分離した大腸菌群菌株 60 株につき、IM Vic system による菌型鑑別を行った結果は次の通りである。

原料乳由来の 25 株の中、中間 I 型に属する株が 17 株 (68%)、中間 II 型に属する株が 2 株 (8%)、不規則型に属する株が 6 株 (24%) で、Coli 型に属する株は分離菌株中には 1 株も認められなかつた。ところがコックの部分から採取した牛乳由来の 30 株についてみると、Coli I 型に属する株が大部分で、25 株 (83%) を占め、他に中間 I 型に属する株が 4 株 (13%)、中間 II 型に属する株が 1 株 (4%) 認められた。びん詰機の牛乳由来の 10 株については Aerogenes I 型株が 5 株 (50%)、中間 I 型に属する株が 5 株 (50%) であつた。なおびん詰牛乳については大腸菌群の分離は実施しなかつた。

C. 小括並びに考察

以上の調査結果から、殺菌機の排乳コック以降に大腸菌群の存在を認め、以後びん詰牛乳に至る行程において急激に大腸菌群の増加するのを認めた。そこで使用したフォードラー型殺菌機のコックの構造について調査したところ、構造が不備な為、原料乳が完全に殺菌されずにその部分に残り得ることを発見した。従つて本調査では殺菌後大腸菌群陽性の一原因が明らかに殺菌不完全乳の残存によるものであることを突き止め得た。しかしその後の行程である冷却機下の牛乳においては、大腸菌群陰性を示したり、極めて短時間に大腸菌が増加していること並びに各部分から分離した大腸菌群の分布がかなり異なっていることから、この場合コック部分の欠陥が唯一の汚染源であるときめつけられない節が多分に存在する。この他にも大腸菌群陽性を示した原因があつたことを考慮しなければならないが、それらについては本調査では明らかになし得なかつた。しかし本調査とは別に殺菌直後殺菌機内の牛乳について大腸菌群検出試験を試みたところ、表面の泡沫から大腸菌群を検出し、その際自記温度計は63°Cを示すにもかかわらず表層部は61°Cと内部より2度も低い事実を認め、また殺菌機的能力以上の牛乳処理を行つた場合、内部が63°Cを示すのに表層部では55°Cに止まり、さらに65°C、30分の処理でもなお泡沫中から大腸菌群を検出した。この点についてはすでにWhittakerら^{48), 49)}が同様の事実のあることを報告し、殺菌機における泡沫の温度は牛乳そのものの温度よりも常に3°C程低く、また泡中の細菌を調査した結果、牛乳自身の細菌数よりも常に多かつたと述べている。しかもこの泡は牛乳を殺菌機から流し出しても一部残り、さらに殺菌を経ずして残るというのである。このことは大腸菌群についても言えることであつて、泡の形成が殺菌乳中に大腸菌群陽性の原因になることも当然考慮されねばならない。また上述の温度分布の不均一なことも原因になることは当然である。また冷却機表面の僅かなキズに大腸菌群が付着し、これが汚染源となることも松井ら⁴⁾によつて明らかにされている。以上今次調査結果並びに文献に報告されている諸事実を総合すると、汚染の原因が、耐熱性大腸菌群の存在によるとする考え方もさることながら、二次汚染、すなわち未殺菌乳の残存、漏洩、機械器具の衛生管理、構造の不備による汚染等がより多くを占めていることが考えられると同時に、温度分布が不均一なために必要な温度と時間加熱されない部分ができ、そこに存在した大腸菌群が死滅を免れて残存することも考えられる。従つて今後大腸菌群による汚染を極力防止するためには、殺菌後の再汚染の防止に十分意を用いる

と共に、殺菌機内温度分布の均一化を計る必要があり、特にコック洩れ、生乳導入管から殺菌中の牛乳に未殺菌乳が混入すること等に注意を怠つてはならないと思う。

II 牛乳中の大腸菌群の所謂低温殺菌に対する態度について

先の調査において、市乳の大腸菌群汚染の原因が主として殺菌不完全乳による汚染及び機械器具の洗滌殺菌の失宜による汚染、さらに殺菌時における加熱不十分など種々の点にあることを推察し得たのであるが、一方において耐熱性大腸菌群の存在が市乳の大腸菌群陽性の一因であるということが内外多数の人々により強く叫ばれている。この点について一応検討しておく必要があると考え、先の調査の際分離した大腸菌群並びにこれまでに牛乳その他から分離した大腸菌群を対象として、これら菌株について実験室内の殺菌を試み、一定の殺菌温度と時間に対する態度につき検討を行つた。

A. 第1次実験

本実験では供試菌株について63°C、30分の加熱条件下で熱抵抗性を示すものの有無を検討した。

1. 実験方法

本実験に供試した菌株は76株であるが、これらは先の行程別試験の際並びにこれまでの各種調査で牛乳その他から検出分離した菌株中から、任意に選んだもので、その由来は第2表の通りである。この中に牛乳輸送罐由来

第2表 供試菌株の分類及び生残株数

由 来		供 試 菌 株		生 残 株 数	
		型	株 数		
牛 乳 处 理 過 程	原 乳	中 間	I 型	3	0
	殺菌槽の排出 コック	Coli	I 型	5	4
		中 間	I 型	2	0
	装詰機の貯乳 槽	Aerogenes	I 型	5	0
牛 乳 輸 送 罐		Coli	I 型	2	1
		Aerogenes	I 型	2	0
		中 間	I 型	5	0
		中 間	II 型	1	0
原 乳		Coli	I 型	1	1
		Aerogenes	II 型	5	0
		中 間	I 型	17	0
		中 間	II 型	28	0
計				76	6

の10菌株があるが、これらは罐内壁から「ふき取り法」⁵⁰⁾によつて検出分離したものである。

実験に際してはまず保存菌株を消毒薬の標準検定法にならつて、それぞれ37°C、24時間ずつ3代に亘り普通ブイヨン(pH 6.9)に継代培養して、population が均一になつたと思われる3代目のものを供試菌液とした。次に径2.2cm、高さ9cm、厚さ1mmの共蓋付試験管に10ccの滅菌生理食塩水を容れ、これを63°C±0.5°Cに調節した電気恒温槽に収め、管内温度が63°Cに達した後に、供試菌液を生理食塩水1cc当り10⁶程度になるように添加した。添加の際は供試菌液0.05ccを注射器で生理食塩水の中心部に注入した。なお一応菌の分布を均等にす意味で、管壁上部に飛沫が付着せぬよう、静かに攪拌した。次で63°Cに30分間保持加熱し、直ちに試験管を取り出して、氷水で4°C以下に急冷した。その後それぞれの試験管から1ccずつとり、これをB. T. B. 乳糖ブイヨン(pH 7.1)に接種して37°Cに24時間から1週間培養した。ガス発生と酸形成をみた場合は、その1白金耳をE. M. B. 培地に塗抹し、大腸菌群の発育を認めたなら、さらに完全試験とIM Vic systemにより供試菌か否かを同定し、それが供試菌に一致したなら、63°C、30分の加熱に耐えたものと判定した(第3表)。

第3表 第1次実験における実験方法

2. 実験成績

実験の結果、得た成績は第2表に示す通りである。すなわち76菌株中、63°C、30分の加熱に耐えて生き残つたものは6株で、しかもこれらがすべてColi I型に属することを認めた。

B. 第2次実験

本実験では供試菌株76株の中から無作為に抽出したColi I型、Aerogenes I型、中間I型の計3株について63°C及び65°Cの両温度における熱抵抗性につき検討を試みた。先の実験では加熱用mediumとして生理食塩水のみを用いたが、本実験ではさらに脱脂乳(乳酸酸度0.16%)及び普通ブイヨン(pH 6.9)を併用し、生理食塩水の場合と異なる結果が得られるかどうかを観察した。なお、後培養にはB. T. B. 乳糖ブイヨンと牛乳培地(滅菌脱脂乳、乳酸酸度0.16%)及びB. G. L. B. を併

用して、被加熱菌がどのような発育態度を示すかを検討した。

1. 実験方法

実験方法は第1次実験の場合と同様であるが、本実験では加熱時間を40分間とし、菌液添加後1分から25分迄は5分ごとに、25分以降40分迄は2分30秒ごとにそれぞれ加熱時間を12段階に区分し、それぞれの時間ごとに菌の生死を観察した(第4表)。

第4表 第2次実験における実験方法

2. 実験成績

実験の結果、得た成績は第5、6、7表に示す通りである。すなわち、Coli I型 No. 51株は63°C及び65°Cいずれの場合をみてもブイヨン中では熱抵抗性が弱く、生理食塩水、牛乳中における場合、熱抵抗性が強い様な傾向を示した。なお、63°C加熱の際は37分30秒迄生存したが、65°Cの場合には15分前後で完全に死滅した。ここで注目すべきことは後培養にB. G. L. B. を用いた場合には、B. T. B. 乳糖でブイヨン、牛乳培地を用いて発育したものも、本培地では発育を示さなかつたことである。中間型株は63°Cの場合1分前後で死滅し、65°Cではすべて1分以内に死滅し、また加熱用medium及び後培養培地における差は認められなかつた。Aerogenes型株は63°C及び65°Cいずれの場合も1分以内に死滅するのを認めた。この場合も前者と同様加熱用medium及び後培養培地における差は全く認められなかつた。

C. 小括並びに考察

牛乳その他から分離した大腸菌群について、生理食塩水、牛乳培地、普通ブイヨンを加熱用mediumとして、耐熱実験を試みた結果、1cc当り10⁶程度の菌量において63°C、30分殺菌した場合は、Aerogenes型及び中間型菌株は完全に死滅したが、Coli型に属する菌株の大部分が生き残ることを認めた。このことは1935年Wilson⁵²⁾の報告と全く一致している。さらにZavagli, Wilson^{53)~56)}等が述べているように牛乳中にある場合耐熱性が強いような傾向にあることもまた同様であつた。このことは木俣等が報告しているように、加熱用medium中に何等

栄 養 と 食 糧

第5表 E. Coli I 型 No. 51 株の 63°C-40 分加熱における熱死点測定成績

加 熱 環 境	後 培 養 培 地	加 熱 時 間											
		1 分	5 分	10 分	15 分	20 分	25 分	27.5 分	30 分	32.5 分	35 分	37.5 分	40 分
生食 塩 理水	B. T. B. 乳糖ブイヨン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	B. G. L. B.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	牛 乳	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ブイ ヨ ン	B. T. B. 乳糖ブイヨン	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	B. G. L. B.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	牛 乳	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
牛 乳	B. T. B. 乳糖ブイヨン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	B. G. L. B.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	牛 乳	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

第6表 E. Coli I 型 No. 51 株の 65°C-40 分加熱における熱死点測定成績

加 熱 環 境	後 培 養 培 地	加 熱 時 間											
		1 分	5 分	10 分	15 分	20 分	25 分	27.5 分	30 分	32.5 分	35 分	37.5 分	40 分
生食 塩 理水	B. T. B. 乳糖ブイヨン	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B. G. L. B.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	牛 乳	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ブイ ヨ ン	B. T. B. 乳糖ブイヨン	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B. G. L. B.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	牛 乳	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
牛 乳	B. T. B. 乳糖ブイヨン	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	B. G. L. B.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	牛 乳	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

第7表 中間 I 型株の 63°C-20 分加熱並びに 65°C-20 分加熱における熱死点測定成績

加 熱 環 境	後培養培地	加 熱 時 間					加 熱 環 境	後培養培地	加 熱 時 間				
		1 分	5 分	10 分	15 分	20 分			1 分	5 分	10 分	15 分	20 分
生食 塩 理水	B. T. B. 乳糖ブイヨン	+	-	-	-	-	生食	B. T. B. 乳糖ブイヨン	-	-	-	-	-
	B. G. L. B.	-	-	-	-	-	塩	B. G. L. B.	-	-	-	-	-
	牛 乳	+	-	-	-	-	理水	牛 乳	-	-	-	-	-
ブイ ヨ ン	B. T. B. 乳糖ブイヨン	-	-	-	-	-	ブイ	B. T. B. 乳糖ブイヨン	-	-	-	-	-
	B. G. L. B.	-	-	-	-	-	ヨ	B. G. L. B.	-	-	-	-	-
	牛 乳	-	-	-	-	-	ン	牛 乳	-	-	-	-	-
牛 乳	B. T. B. 乳糖ブイヨン	+	-	-	-	-	牛	B. T. B. 乳糖ブイヨン	-	-	-	-	-
	B. G. L. B.	-	-	-	-	-	乳	B. G. L. B.	-	-	-	-	-
	牛 乳	-	-	-	-	-	乳	牛 乳	-	-	-	-	-

かの保護物質が多量に存在する場合には細菌の熱死点 (Thermal Death Point) が一般に高くなるという事実から推して、この場合、牛乳そのものが一種の膠質溶液であり、牛乳に含まれるカゼインカルシウムなどの膠

質粒子が保護作用を呈することにより、熱伝導を緩慢にするためか、あるいは化学的殺菌の場合に有機物が存在すると、それが保護コロイド作用 (Protective Colloid Effect) を呈すると同様な理由で大腸菌群の熱死点が高

まるものと想像される。

なお後培養培地として乳糖ブイオン、牛乳培地及び B. G. L. B. を併用した場合、B. G. L. B. では発育を示さないこと、牛乳培地ではかなり長く加熱を受けたところで発育が認められるなど興味ある知見を得た。この点については第V章において論ずることとする。

Ⅲ 所謂低温殺菌における加熱方法と大腸菌群の熱抵抗性との関係について

先の実験において、予め 63°C に保持した加熱用 medium に菌液を添加する方法により、1cc 当り 10^6 程度の菌量において Coli 型に属する株が 30 分間でなお生存する事実を認めた。しかしながら、牛乳の所謂低温殺菌が工業的に実施される場合には先のような形態で行われるのではなく、殺菌槽内の牛乳はジャケット内の温湯あるいは蒸気により漸増的に加熱され、全内容が一定温度に到達して始めてその温度で 30 分間保持加熱されるわけであり、実際には予熱期 (Preheating Period) があることを考慮に入れねばならぬ訳である。従つて加熱方法により何等かの差異があらわれて来ることが想像される。そこで本実験では、先の加熱方法 (直接恒温加熱法と名づける) と一定温度に達するまでの予熱期間を含めて漸増的に加熱する方法 (漸増加熱法と名づける) の 2 様の加熱方法で、先の実験で 63°C、30 分の殺菌に耐えた Coli I 型 No. 51 株について耐熱実験を試み、菌の熱抵抗性にどのような差異があるかを観察検討した。

A. 直接恒温加熱実験

1. 実験方法

先の実験におけると同様に、所定の試験管数本を用意し、それぞれに加熱用 medium として脱脂乳 (乳酸酸度 0.16%) 10cc を容れ、これを 63°C $\pm$ 0.5°C に保持した恒温槽に収め、加熱用 medium の温度が 63°C に到達した後、37°C、24 時間ずつブイオン (pH 6.9) で 3 代継代培養した菌液を、脱脂乳 1cc 当り $10^6 \sim 10^7$ 程度含有するように添加した。加熱時間は 45 分とし、その間添加後 10 分までは 2 分 30 秒ごとに、10 分以降は 5 分ごとに

試験管をとり出して、氷水で 4°C 以下に急冷し、その 1cc ずつを後培養培地に接種して、熱死点並びに生残菌数の測定を行つた。後培養培地として熱死点の測定用に B. T. B. 乳糖ブイオン (pH 7.1) を、生残菌数測定用には遠藤培地 (pH 7.2) を用いた。菌数測定用として遠藤培地をえらんだのは本培地と乳及び乳製品用標準寒天との間に菌数差がなく、しかも集落が赤変するので、あやまつて他菌が迷入した場合などでも識別が容易であるなどの基礎実験結果によるものである。なお判定は一応両培地とも 35°C で 48 時間培養した後に行つた。

2. 実験成績

上述の方法により実験して得た成績は第 8 表に示す通

第 1 図 直接恒温加熱法による E. Coli I 型 No. 51 株の死滅曲線

第 2 図 直接恒温加熱法による E. Coli I 型 No. 51 株の死滅率対数曲線

第 8 表 直接恒温加熱条件の下で加熱した場合の *Escherichia Coli* I 型 No. 51 株の熱死点及び生残菌数 (1cc 当り) (最初から 63°C で加熱し、30 分間保持した場合)

時間 培地	当 初	2.5 分	5 分	7.5 分	10 分	12.5 分	15 分	20 分	25 分	30 分	35 分	40 分	45 分
B. T. B. 乳 糖 ブイオン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
遠藤培地	33×10^5	10×10^5	11×10^4	11×10^3	10×10	12	1	1	1	1	1	1	0

第9表 漸増加熱条件の下で加熱した場合の *Escherichia Coli* I 型 No. 51 株の熱死点
及び生残菌数 (1 cc 当り) (40°C から加熱し, 10 分間の予熱期を経て 63°C に到達後 30
分間保持した場合)

時 間 培 地	当 初	5 分	10 分 (63°C 到達時)	5 分	10 分	15 分	20 分	25 分	30 分
B. T. B. 乳 糖 ブ イ ヨ ン	+	+	+	+	+	+	+	-	-
遠 藤 培 地	10×10^6	77×10^5	37×10^5	41×10^3	15×10^2	21	7	0	0

り, 63°C 直接恒温加熱方法では 40 分までの加熱に耐えて生き残ることを認めた。この場合の死滅曲線を見ると第1図に示すようにほぼ S 型曲線を描いており, さらに生残菌数の対数と時間との関係をプロットして生菌曲線 (Survival Curve) を描いてみると, 第2図にみられるように 2 分 30 秒以降はほぼ直線的関係にあることを示し, 加熱時間の経過ともない菌が対数的減少を示しているのが認められ, 死滅過程が Chick 及び Martin, Madsen 及び Nymann の述べているように単分子反応の法則 (Law of Monomolecular reaction equation) に従うことを認めた。

B. 漸増加熱実験

1. 実験方法

実験の要領は先の場合とほぼ同様であるが, 本実験では恒温槽並びに加熱用 medium を 40°C にしておき, 先と同様の方法で Coli I 型 No. 51 株のブイヨンで 37°C, 24 時間ずつ 3 代継代培養した菌液を加熱用 medium 1 cc 当り $10^6 \sim 10^7$ 程度になるよう添加し, 40°C から約 10 分間の予熱期を経て 63°C まで温度を上げ, さらに 30 分間当該温度で加熱し, 加熱開始後 5 分ごとに試験管を取り出し, 氷水で 4°C 以下に急冷し, 先と同様熱死点並びに生残菌数の測定を行った。

2. 実験成績

第9表に示すように, 直接恒温加熱法では 40 分まで熱抵抗性を示したにもかかわらず, 漸増加熱法では 63°C 保持開始後 25 分前後で発育を示さなくなり, 比較的低い熱死点を示した。死滅曲線を示すと第3図に示されるように先の場合と同様 S 型曲線を描いているが, 保持期 (Holding Period) における死滅曲線についてみると完全に指数型曲線に一致している。次いで生菌曲線を描いてみると第4図に示すように保持期において直線的関係を示し, この場合にも先と同様死滅過程が単分子反応の法則に従うことを示した。

C. 小括並びに考察

第3図 漸増加熱法による *E. Coli* I 型
No. 51 株の死滅曲線

第4図 漸増加熱法による *E. Coli* I 型
51 株の死滅率対数曲線

Coli I 型 No. 51 株を用いて同一菌量について直接恒温加熱法と漸増加熱法との 2 様の方法で, 耐熱実験を行った結果, 前者の場合には 30 分では死滅しなかつたのに, 後者の場合には保持期に入つて 25 分で一応死滅する成績を得, 直接恒温加熱の場合よりも漸増加熱の方が低い熱死点を示し, 死滅が早いことを認めた。そこで事実大腸菌群の死滅が単分子反応の法則に従つて行われるものか否かをさらに確認する意味で, それぞれの実験において得た数値に基いて両加熱法における死滅過程につい

て数学的解析を試みた。今、死滅過程が単分子反応の法則に従うものとするならば、単分子反応の速度式

$$k = 2.303 \frac{1}{t} (\log a - \log x)$$

(但し a は加熱前の菌数、 x は時間 t に対応する菌数) において、各時間ごとに得た生残菌数の対数、すなわち x を本式に代入した場合、速度恒数 (Velocity Constant) が一定の値を示す筈である。そこで、それぞれの場合について k を求めてみた。

1) 直接恒温加熱法による場合

菌添加後 $t = 2.5$ 分のとき $k = 0.56$

$t = 5$ 分のとき $k = 0.68$

$t = 7.5$ 分のとき $k = 0.76$

$t = 10$ 分のとき $k = 1.04$

$t = 15$ 分のとき $k = 1.00$

となり、加熱初期の間は k の値に変動がみられ (漸次 k の値が大になる) るが、ある時間以降はほぼ一定して来るのが認められる。なお、 k の値が一定するまでの時間の長さについて、その後 2, 3 同様な実験を行つた結果、加熱開始後間もなく一定になる場合とならない場合とあることが判つた。これは恐らく供試菌の population を構成する細菌個体が常に等質でなく、抵抗差を持つていることによると考えられる。

2) 漸増加熱法による場合

40°C から加熱開始 5 分のとき $k = 0.05$

$t = 10$ 分のとき $k = 0.1$

$t = 15$ 分のとき $k = 0.37$

$t = 20$ 分のとき $k = 0.44$

$t = 25$ 分のとき $k = 0.52$

$t = 30$ 分のとき $k = 0.47$

となり、40°C から加熱開始後 10 分まで、すなわち漸増加熱期間 (予熱期) 中は、初めに k の値が小さいが、温度上昇に伴い漸次 k の値が大になつて行くのが認められ、保持期に入るとほぼ一定し、この場合には平均値が 0.45 となつている。すなわち、本加熱法でも、保持期に入ってから大腸菌群の死滅が単分子反応の法則に従つて行われることが明らかになつた。

以上二つの場合につき数学的解析をこころみた結果、Chick^{(57), (58)} その他が述べているように、細菌の熱、あるいは化学物質による死滅現象が質量作用の定律 (Law of Mass Action) から誘導された化学反応の速度式である単分子反応の法則に従う事実が、大腸菌群の熱により死滅する場合にも完全に当てはまることが実証されたわけである。

以上大腸菌群の死滅が単分子反応の法則に従つて行われ、かつ予熱期を伴つて漸増的に加熱されると死滅が早

いという事実を実際の工業的殺菌の場合にあてはめてみると、必ず予熱期があるから、この事が牛乳中の大腸菌群は勿論、他の細菌の死滅を早める結果を招来することになり、漸増的に加熱することが殺菌効果をより大にする意味で重要な意義をもつことになる。従つて、現行の 63°C、30 分という加熱殺菌条件は、規定温度に到達するまでに必ず予熱期があることを考慮すると温度と時間にかなり「ゆとり」があると思われる。

IV 大腸菌群の熱抵抗性に及ぼす培養基の影響、特にブイヨン培養菌と牛乳培養菌の熱抵抗性の比較について

細菌の熱抵抗性が發育した培地の種類、組成により著しく異り、特にその影響を著しくうけるのが芽胞であると言われている。Burke^{(59), (60)} によれば Clostridium botulinum の芽胞はブイヨン及び脳培養基中で生成されたものが強い抵抗性を有し、しかも脳培地のものはブイヨン培養のものよりも強いと報告されている。また Sommer⁽⁶¹⁾ によれば 4% ペプトン培地中で生成された芽胞は pH 7.0 の磷酸塩混液中においては 100°C で 1.5~2.5 時間の加熱で死滅するが、磷酸塩加 4% ペプトン培地中で生成されたもののうちには 4 時間加熱して初めて死滅するようなものが存在すると報じられている。しかし、培養基にブドウ糖を添加したり、培養基のペプトンの濃度を高めたりした場合には細菌数は増加するが、その生成された芽胞の抵抗性は増加しないと言われている。以上芽胞についてはかなり研究されているが、細菌 (植物体) そのもの⁽¹⁶⁾ についてはあまり報告がみられないが、1952 年増山らが⁽¹⁶⁾ 大腸菌群を牛乳中で増菌した場合、その熱抵抗性を増強するとふれている。そこで一応この点につき検討しておく必要があるので、同一菌株のブイヨン培養したものと牛乳培養したものを供試菌として、同一菌量につき同一条件で耐熱実験を行い、両者間に差が認められるか否かを検討した。

A. ブイヨン培養菌の熱抵抗性

1. 実験方法

本実験においても Coli I 型 No. 51 株を供試菌として用いた。実験方法としては、これまでの実験の場合と同様、所定の試験管を使用し、加熱用 medium として脱脂乳 (乳酸酸度 0.16%) 10cc をいれ、恒温槽に収め、管内温度が 63°C に達した後、ブイヨン (pH 6.8) を用い 35°C、24 時間ずつ 3 代継代培養の供試菌液を加熱用 medium 1cc 当り 10×10^6 前後の菌量を含むよう添加した。

第10表 ブイヨン培養菌の熱死点測定成績 (63°C, 50分加熱)

加 熱 時 間 実 験	当 初	5 分	10 分	15 分	20 分	25 分	30 分	35 分	40 分	45 分	50 分
No. 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
No. 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
No. 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
No. 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

第11表 ブイヨン培養菌の生残菌数測定成績 (63°C, 50分加熱)

実 験 加熱時間	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
当 初	33×10^5	12×10^6	70×10^6	89×10^6
5 分	11×10^4	16×10^5	40×10^5	47×10^5
10 分	10×10	19×10^4	38×10^4	39×10^4
15 分	1	15×10^3	32×10^3	31×10^3
20 分	1	10×10^2	40×10^2	45×10^2
25 分	1	10×10	29×10	45×10
30 分	1	1.0×10	2.0×10	3.0×10
35 分	1	5	3	5
40 分	1	4	1	1
45 分	0	0	0	1
50 分	0	0	0	0

加熱方法は直接恒温加熱法を採用し、63°C, 50分間保持し、5分ごとに試験管をとり出して、氷水で4°C以下に急冷した。熱死点の測定はB. T. B. 乳糖ブイヨンにより、生残菌数測定は遠藤培地により行い、判定は37°C, 48時間で行った。

2. 実験成績

以上の方法により前後4回同様の実験を試みた結果、第10表及び第11表に示すような成績を得た。medium 1cc当りの菌量が $10^5 \sim 10^6$ 程度では、熱死点はほぼ一定で、大体40分前後の熱死点を示し、1例だけは45分まで生残した。この際の死滅過程は、第5図にみるように

第5図 ブイヨン培養菌の死滅率対数曲線

対数的減少を示している。なお最後まで生き残った菌について3代から4代にわたり繰り返し熱死点測定を試みたが、同一菌量では熱抵抗性に变化なく、熱死点は同様40~45分であつた。すなわち、この実験の範囲では熱抵抗性の増強は認め得なかつた。

B. 牛乳培養菌の熱抵抗性

1. 実験方法

本実験では牛乳培養菌を前実験と同一菌量の下でその熱抵抗性をみた。この場合、菌量の調節には松井らの方法に準拠して行つた。すなわち、型の如くブイヨンで24時間ずつ3代継代培養した3代目の菌液を直径3mmの渦巻白金耳で1白金耳採り、これを脱脂乳(乳酸酸度0.16%)10ccに接種して、35°Cで約6時間培養した。この方法によると牛乳中で培養したものは、ブイヨンで24時間ずつ3代継代培養したと同様1cc当り 10^8 程度の菌量を含むことになるので、この菌液を加熱用 medium である脱脂乳10ccに、1cc当り $10^5 \sim 10^6$ 程度含有するように添加した。以下A)の場合と全く同様の方法で実験を行つた。

2. 実験成績

以上の方法により実験した結果、第12表及び第13表に示すような成績を得た。すなわち 10^6 前後の菌量ではブイヨン培養菌と全く同様、いずれも40~45分まで加熱に耐えた。死滅過程も第6図にみるように対数的減少を示し、その様相がブイヨン培養菌と全く同様なことが認められた。生残菌についてA)と同様繰返し行つたが、この場合にも熱抵抗性増強の傾向は認められなかつた。

C. 小括並びに考察

増山らの大腸菌群を牛乳で増菌すると耐熱性を増すと言う報告を基として、培養基の熱抵抗性に及ぼす影響の有無を検討する意味で、Coli I型 No. 51株のブイヨン及び牛乳培養菌につき、同一菌量、同一加熱条件の下で63°C, 50分間加熱した。その結果、両者間に差異がなく、また生残菌について3~4代繰返し耐熱試験を行つても、何等耐熱性が増強する傾向は認められなかつた。

以上の成績並びに大腸菌群の死滅過程が単分子反応の

第12表 牛乳培養菌の熱死点測定成績 (63°C, 50分加熱)

加熱時間 実験	当初	5分	10分	15分	20分	25分	30分	35分	40分	45分	50分
No. 1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
No. 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
No. 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
No. 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

第13表 牛乳培養菌の生残菌数測定成績
(63°C, 50分加熱)

加熱時間 実験	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
当初	60×10^5	23×10^6	23×10^7	98×10^6
5分	33×10^4	21×10^5	23×10^6	21×10^5
10分	20×10^3	18×10^4	25×10^5	17×10^4
15分	21×10^2	12×10^3	24×10^4	20×10^3
20分	20×10	21×10^2	20×10^3	19×10^2
25分	1.9×10	16×10	22×10^2	15×10
30分	2	1.2×10	21×10	1.2×10
35分	1	2	2.0×10	4
40分	0	1	1	1
45分	0	0	1	0
50分	0	0	0	0

第6図 牛乳培養菌の死滅率対数曲線

法則に従う事実から考えて、加熱による大腸菌群の死滅時間は、一定温度の下では、一定容積中に存在する菌量の多寡により異なるものである。すなわち最初の菌量が多いほど死滅に長時間を要することになり、この事は既に数学的にも立証されている。従つてもし原料乳中に大量の大腸菌群が存在する場合には規定の温度と時間加熱されても、なお残存する可能性のあることが考えられる。先に述べたように、Craig⁴⁷⁾ もこの点を考慮して牛乳 1cc 当りの菌数 700 以下の場合には、大腸菌群は 63°

C, 30 分で死滅するが、菌量が多いと残存することがあると報告し、松井⁴⁾ もこの点について詳細な検討を試み、Craig と同様牛乳中に含まれる菌量を考慮すべきことを強調している。なお、試みに 10 cc の牛乳培地並びにブイヨンに Coli I 型 No. 51 株の斜面培養 1 白金耳を接種して、同一時間 37°C で培養した後、1cc 当りの両者の菌量を比較したところ、ブイヨンにおけるよりも牛乳培地における方が発育が旺盛で、10 時間ではブイヨン 1 cc 当り $10^5 \sim 10^6$ 程度なのに、牛乳では $10^{10} \sim 10^{11}$ の菌量を示した。従つて両培地で同一時間培養した菌液等量について耐熱実験を試みたとすれば、先の理論から考えても、両者間に菌量の差があること、すなわち牛乳培養菌の方が菌量が多いわけであるから、ブイヨン培養菌よりも牛乳培養菌の方がみかけ上熱死点が高くなるは想像に難くない。従つて、今次実験の結果並びに Craig, 松井らの得た事実から考えて、今後細菌の死滅現象、熱抵抗性について論ずる場合には、対象とする菌について、その個体についてでなく、常に莫大な数について論ずるのであるであるから、集団を形成する菌量を考慮した、いわゆる定量的考え方をもつ必要がある。特に牛乳中の大腸菌群の熱抵抗性の問題を討議する場合、従来実験方法は勿論のこと、菌量について特別考慮されておらず、単に熱死点という表現で論争されている。斯う考えて行くと、Foster^{(63), (64)} らが述べているように、従来用いられていた細菌の熱死点という表現で熱抵抗性を論ずることは妥当性を欠くように思われる。すなわち、菌量によつて熱死点が変化するため、これは菌の熱抵抗性を示す正確な表現ではない。従つて、Foster^{(63), (64)} らの言うように熱死時間 (Thermal Death Time) をもつて表わす方が殺菌効果、熱抵抗性を説明する場合、より妥当であり、正確な事実を表現することになる。もし、熱死点という表現を用いるとすれば、一応供試菌量を明示せねばならない。ある場合にはこれでも十分なこともある。

V 熱衝撃を受けた大腸菌群の後培養培地に対する態度について

市乳中の大腸菌群の由来については、その原因が殺菌

後の二次汚染にあること、殺菌温度及び時間が規定通りに実施されなかつたのではないかと言うこと、更に先に述べたように大腸菌群の死滅が単分子反応の法則に従うことから原料乳中に大量の菌が存在したのではないか、などがあげられる。なお、また殺菌直後は陰性なのに数時間経過後検査すると陽性を示すことがあるという問題については、当然その間に増殖の事実があつたことも考えられるが、松井らも述べているように、市乳中の大腸菌群が少い場合には検出し得る場合と得ない場合とあることが考えられる。さらに今一つ考えねばならぬ点は、熱あるいは化学的物質により活性を失つた大腸菌群が Metabolite の刺激により復活する事実があるとする Tayler 及び Heinmets⁶⁵⁾ らの考え方である。1954 年 Tayler 及び Heinmets らは Coli を対象とし、これを熱、塩素、過酸化水素、エチルアルコールで処置したものと、さらに処置後クエン酸、乳酸、蓆酸等で一定時間処置したものの発育菌数を比較検討したところ、乳酸のような Metabolite の作用をうけた菌が復活するという事実を発見していることである。さらにⅡにおいて少しく触れておいたように、熱衝撃を受けた菌を培地に接種してみると、第 5 表に示すように、牛乳培地及び乳糖ブイヨンではかなり長時間加熱されたところまで発育がみられるのに、B. G. L. B. では発育がみられないという現象を等閑視することは出来ない。これに関連性をもつ問題としては既に Eijkman⁶¹⁾、Burke^{59), 60)} らが述べているように、加熱菌の菌数測定の際に培養期間の長い程菌数が多く、芽胞では特にその傾向が著しいという事実があることである。この現象を休眠 (dormancy) と称し、このような休眠期間の存在は恐らく破壊された重要酵素の再生に時間がかかること及び障害をうけた菌体が培地中の何等かの毒性物質に対し感受性が強いことに原因するためと考えられている。⁶⁴⁾

以上述べた諸問題については、今後大腸菌群の由来を追及する場合に十分考慮すべきものと考ええる。そこでこれらの問題の中から特に休眠という問題を考慮して、熱衝撃を受けた菌の培地に対する発育態度について、遠藤培地及び最近使用されるに至つた大腸菌群検査用固形培

地であるデスオキシコレート寒天を後培養培地として検討を行つた。

A. 実験方法

本実験に使用した菌株は当研究所の北村が豆腐から分離したかなり熱抵抗性の強い Coli I 型 T-57 株である。実験に際してはこれまでと同様予めブイヨン (この場合は Heart Infusion broth [pH 7.4] を用いた) を用いて 37°C に 24 時間ずつ 3 代継代培養した菌を用いた。加熱用 medium は脱脂乳 (乳酸酸度 0.16%) を用い、供試菌量は加熱用 medium 9 cc に対して前記菌液 1 cc を添加し、medium 1 cc 当りの菌量を $10^9 \sim 10^{10}$ 程度含むようにした。加熱方法は前に述べた漸増加熱法を採用し、前に述べたと全く同様の方法で耐熱実験を行い、生残菌数の測定を行つた。実験 (1) では培地としてデスオキシコレート寒天“栄研”を、実験 (2) ではデスオキシコレート寒天“栄研”と遠藤培地 (自家製) を併用し、37°C で 72 時間培養し、24 時間ごとに菌の発育状況を観察した。なお今次実験では供試菌液は培養菌液そのままではかなり大きい菌塊を含んでおり、これらが熱抵抗性に影響することが懸念されるので、大きい菌塊を排除し⁶⁶⁾て、比較的均一な population を得るために、Readらの例にならない、添加前東洋濾紙 No. 7 号を用いて濾過した。なお、実験 (1) では 61°C で、実験 (2) では 62°C で加熱した。

B. 実験成績

1. 実験 (1) の成績

上記の方法により 61°C で 15 分加熱し、61°C 到達時、61°C 保持後 5 分、10 分、15 分と 5 分ごとにそれぞれ生残菌数を測定した。この際の所謂予熱期は 6 分であつた。その結果は第 14 表に示すように加熱前のものではデスオキシコレート寒天でも 20~24 時間で全集落の発現がみられ、48~72 時間培養しても集落数には変化がなく、単に集落の大きさを増すのみであつた。それに反し加熱された場合には 24 時間、48 時間、72 時間培養によつてそれぞれ菌数の差が見られ、漸増している。また、時間が短い場合にはその差が殆んどないのに反し、加熱時間が

第 14 表 61°C 加熱菌のデスオキシコレート培地における発育態度

後培養 加熱時間 測定値	37°C, 24 時 間		37°C, 48 時 間		37°C, 72 時 間	
	菌 数	対 数	菌 数	対 数	菌 数	対 数
加 熱 直 前	12×10^{10}	11.1	12×10^{10}	11.1	12×10^{10}	11.1
0 分 (61°C 到達時)	37×10^7	8.57	38×10^7	8.58	38×10^7	8.58
5 分	31×10^6	7.49	36×10^6	7.56	40×10^6	7.60
10 分	11×10^5	6.04	31×10^5	6.49	33×10^5	6.52
15 分	17×10^4	5.20	53×10^4	5.72	67×10^4	5.83

第15表 62°C 加熱菌のデスオキシコレート培地と遠藤培地における発育態度

加熱時間	後培養 培地 測定値	37°C, 24 時間				37°C, 48 時間				37°C, 72 時間			
		デスオキシコレート寒天		遠藤培地		デスオキシコレート寒天		遠藤培地		デスオキシコレート寒天		遠藤培地	
		菌数	対数	菌数	対数	菌数	対数	菌数	対数	菌数	対数	菌数	対数
加熱直前		10×10 ⁸	9.00	10×10 ⁸	9.00	10×10 ⁸	9.00	10×10 ⁸	9.00	10×10 ⁸	9.00	10×10 ⁸	9.00
0分 ^(62°C到達時)		19×10 ⁶	7.28	61×10 ⁶	7.79	21×10 ⁶	7.32	13×10 ⁷	8.11	21×10 ⁶	7.30	15×10 ⁷	8.26
2.5分		72×10 ⁵	6.86	32×10 ⁶	7.51	16×10 ⁶	7.20	50×10 ⁶	7.70	16×10 ⁶	7.20	50×10 ⁶	7.70
5分		12×10 ⁵	6.08	36×10 ⁵	6.56	21×10 ⁵	6.32	20×10 ⁶	7.30	23×10 ⁵	6.36	20×10 ⁶	7.30
7.5分		30×10 ⁴	5.48	28×10 ⁵	6.42	62×10 ⁴	5.79	42×10 ⁵	6.62	12×10 ⁵	6.08	55×10 ⁵	6.74
10分		15×10 ⁴	5.18	16×10 ⁵	6.20	38×10 ⁴	5.58	20×10 ⁵	6.30	52×10 ⁴	5.72	30×10 ⁵	6.48

長くなるに従つて3者の間の差が顕著である。つまり短時間加熱されたものでは24時間で生残菌の大部分が発現し、48時間以降あまり増加はみられぬが、長時間加熱されたもの程24時間に発現する菌数は少く、48時間、72時間と漸次発現菌数の増加がみられるに至つた。また長時間加熱されたもの程発育集落は小さくなる傾向を示した。本菌の死滅過程をみると単分子反応の法則に従うことは明らかであるが、かなり熱抵抗性が強く、61°Cでは大体5分ごとに1/10に減少するのが認められた。これを Stumbo, Ball らの言うように菌濃度が1/10に減少するに要する加熱時間を熱死時間とし、これをDとすれば、デスオキシコレート寒天により測定した本菌の61°CにおけるD-値は5分になる。

2. 実験(2)の成績

本実験では62°Cで実験(1)と同様の方法で加熱を行い、この場合は加熱時間を10分とし、62°C到達時及び62°C保持後2.5分、5分、7.5分、10分と、2.5分ごとに生残菌数を測定した。この際の予熱期は5分であつた。その結果は第15表に示す通りで、大体実験(1)と同様な様相を示し、矢張り長時間加熱されたもの程菌の発現がおくれることを認めた。なお、デスオキシコレート寒天と遠藤培地とをくらべると後者の方が圧倒的に高い数値を示し、両培地間に24時間でかなりの開きがみられる。なお、デスオキシコレート寒天37°C、72時間測定値にもとづいて、本菌の62°CにおけるD-値を求めると5分で、61°Cの場合と差がない。従つて本菌の死滅に対しては1°C程度の温度差はそれほど大きな影響を与えないものと思われる。これに対して、遠藤培地による37°C、72時間値からみると、前者と同じくD-値は5分であり、D-値そのものは本質的に両者間に差がないが、一定時間ごとにおける菌数は遠藤培地の方がデスオキシコレート寒天よりも1桁高いことが認められた。

C. 小括並びに考察

61°C及び62°CでColi I型T-57株について加熱を行い、生残菌数をデスオキシコレート寒天と遠藤培地により測定し、その結果から培地に対する被加熱菌の態度を検討したところ、未加熱菌はデスオキシコレート寒天では24時間で、遠藤培地では48時間で完全に全集落の発現を終るが、被加熱菌では長時間加熱されたもの程発現がおくれる事実を認め、特に「デ」寒天ではその傾向が著しく、また両培地により得たそれぞれの定量値を比較すると、両者間にかなり差がみられ、デスオキシコレート寒天測定値がはるかに低いことを知つた。⁶⁷⁾大腸菌群の熱抵抗性を検討する際、Stumbo らの言う熱死時間をもつて熱抵抗性を論ずるのがより妥当であることは先にも述べた通りであるが、本実験の場合のように、デスオキシコレート寒天と遠藤培地を用いると、D-値そのものに本質的な差を生ずることはないとしても、「デ」寒天では定量値そのものがかかなり低くなつてくという欠陥がある。従つて前に述べた熱死点そのものも実際より低くなるという結果を招来する危険性がある。すなわち、耐熱実験の際にデスオキシコレート寒天のような培地は生残菌の定量用培地として不適當であると言える。このように加熱を受けた大腸菌の培地における発育がおくれること、さらにデスオキシコレート寒天のような特殊な培地⁶¹⁾では特にその傾向が著しい事実は、Eijkman, Burk とも経験しているように、その原因が、加熱により障害をうけた菌の酵素活性の回復に時間を要すること及び障害を受けた菌が本培地に含まれる発育抑制物質であるデスオキシコール酸ソーダの阻害作用に対して強い感受性を示すためであろうと推定される。先に述べたB. G. L. B.の場合もこれと同様、brilliantgreenの発育抑制作用に対して被加熱菌が強い感受性を示したことによると考えられる。このような現象は先に述べた休眠現象と考えてよいのではなからうか。従つて菌がさらに長く加熱された場合には休眠期間がさらに延長し、加熱の末期に至りなお残存する菌については、場合により発育をみなくなる

ることがあるのではないかと推察され、実際には十であつても一と判定する結果を招来することもあり得ると考えられる。Eijkman の成績はこの事実を明らかに示している。ところが、このようにほとんど不活化された菌でも一定期間、特に Heinmets らの報告したような良好な Metabolite である乳酸を多量に含有する牛乳のような培地におかれた場合、所謂復活現象を呈し、「デ」寒天のような培地にでも再び十分発育することがあり得ると思われる。この点については将来検討の必要がある。

以上述べたようなことから、デスオキシコレート寒天を用いると加熱殺菌により痛めつけられた残存大腸菌群については、20~24 時間で正確な検出測定が出来ないことになる。この事実は実際問題としても等閑視し得ない重要な点である。

以上要するに休眠状態が存在することは、現在のような大腸菌群検出用培地を用いての検査法で殺菌操作完了直後の牛乳について殺菌効果、衛生管理の是非判定ならびに市販品の品質検査を行う際に十分考慮されるべき事項と思う。

先の牛乳処理行程別汚染源調査の結果について考えると、以上述べた事項に符合する節があるように思われる。

VI 総括並びに結論

市乳に大腸菌群が検出される原因については、種々の要因が考えられるが、市乳から大腸菌群を追放するという実際の面の努力に対して、これらの要因が複合して発現するために、しばしばその原因追求に困難性を感じさせるものである。著者はそのうちでも主として牛乳中における大腸菌群の熱低抗性を主体にして、その要因を実験的に明かにしようと試みた。すなわち、牛乳処理行程における大腸菌群の汚染源追求、分離大腸菌群の所謂低温殺菌温度及び時間における態度、殺菌の際の加熱方法と大腸菌群の熱低抗性との関係、さらには熱低抗性に及ぼす培養基の影響の有無並びに加熱後の大腸菌群の培養基に対する発育態度等について実験的検討を試みたのである。その結果は、市乳中の大腸菌群の由来についてその要因を追求するに際し重要な示唆を与えられると思われる次のような知見を得た。

1) 牛乳処理行程における大腸菌群の汚染源については種々考えられるが、今次調査では殺菌機の排乳コック部分に不完全殺菌乳が存在したことを推定し得たが、これ以外にもなお汚染源が存在したのではないかとということが、大腸菌群が極めて短時間に、しかも急激に増加していること、各部分から分離した大腸菌群の型がかなり

異つている事実から推定された。

2) 牛乳から分離した大腸菌群 67 株について 63°C~65°C で 1cc 当り 10^6 程度の菌量を供試して耐熱実験を試みたところ、Coli 型のみが残存し、大腸菌群中耐熱性を疑われるものが主として Coli であること並に Wilson らが述べているように牛乳中にあるとき熱低抗性が最も強いこと、さらに種々の培地に対して被加熱残存菌が発育態度を異にする事実を認めた。

3) 加熱方法として、急激に所定温度で加熱する直接恒温加熱法と、予熱期を経てから一定温度で保持加熱する漸増加熱法につき検討した結果、いずれの場合でも大腸菌群の死滅が単分子反応の法則に従つて対数的減少を示すこと並びに恒温加熱の際は 63°C、30 分の加熱でも残存するのに対して、漸増加熱では 63°C、30 分で完全に死滅することを認め、漸増加熱の方が予熱期が存在することで、より殺菌を効果的にすることを認め、また工業的殺菌の場合、10~20 分間このような予熱期が存在することからみて、これが殺菌効果を事実上大ならしめていることを推察し得た。

4) 同一菌株をブイヨンと牛乳で培養し、その同一菌量を供試して耐熱実験を試みた結果、両培養菌の死滅過程に差は認められず、また大腸菌群の死滅過程が単分子反応の法則に従う事実から考察して、一定温度の下で加熱する場合は、一定容積中に存在する菌量が大であれば死滅に長時間を要し、逆に菌量が少ければ短時間でよいことになり、この事から温度と時間が一定である限り牛乳中に含まれる菌量が多い場合には残存する可能性があることを推定し得た。

5) 被加熱菌の残存菌数をデスオキシコレート寒天と遠藤培地とを用いて測定した結果、未加熱菌は前者において 20~24 時間で、後者では 48 時間でそれぞれ完全に集落の発現をみたが、被加熱菌では発現がおくれ、長時間加熱を受けたもの程その傾向の著しいことが認められた。B. G. L. B. の場合にもこれと同様な現象を認めたが、これらは被加熱菌の所謂休眠現象によるものではなからうかと考える。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました東京医科歯科大学教授柳沢文徳博士、国立公衆衛生院衛生獣医学部部長松井武夫博士、並びに終始御激励と御配慮を賜わった所長新井養老博士並びに獣医衛生科長島田幸治技師に満腔の感謝を表し、常に実験に御協力を載いた加藤千里技師、手塚利治並びに松本昌雄の諸氏に感謝致します。

引 用 文 献

- 1) 春田：日本獣医師会雑誌，11，260 (1958)

- 2) 春田：東京獣医学畜産学雑誌，No. 9 別冊 (1958)
- 3) 都衛生局編：昭和 32 年度獣医衛生業務資料，p. 86~87 (1958)
- 4) 松井他：食品衛生研究，vol. 3, No. 6, 61 (1954)
- 5) 米山他：第 4 回長野県公衆衛生研究記録，7~12 (1953)
- 6) 飯田：神戸市衛研年報，122~140 別冊 (1956)
- 7) 福原他：京都市衛研年報，No. 24, 52~55 (1956)
- 8) McCrady, M. H., Langevine, E.M.: J. Dairy Sci., 15, 321 (1932)
- 9) Delay, P. D.: J. Milk & Food Technol., 10, 297 (1947)
- 10) Weber, C. W.: J. Milk Technol., 8, 217 (1945)
- 11) Fouts, E. L., Freeman, T. R.: J. Milk Technol., 8, 89 (1945)
- 12) Buchbinder, L., Alff, E. C.: J. Milk & Food Technol., 10, 137 (1947)
- 13) Chilson, W. H., Yale, M. W., Eglinton, R.: J. Dairy Sci., 19, 237 (1936)
- 14) Tiedman, W. D., Smith, S. E.: J. Milk Technol., 8, 323 (1945)
- 15) 藤田他：昭和 27 年度千葉県衛生研究所年報，(1952)
- 16) 増山他：第 9 回厚生科学研究会総会演説要旨，p. 106~107 (1953)
- 17) 山下他：第 3 回長野県衛生研究記録 (1952)
- 18) 佐藤他：第 9 回厚生科学研究会総会演説要旨，p. 29 (1952)
- 19) 坂井他：第 8 回日本公衆衛生学会総会演説要旨，p. 106~107 (1953)
- 20) 小口他：第 4 回長野県公衆衛生研究記録，p. 29 (1953)
- 21) 深井他：第 8 回日本公衆衛生学会総会演説要旨，p. 94~95 (1953)
- 22) 飯田：食品衛生研究，vol. 3, No. 3 (1953)
- 23) 長尾他：岡山県衛研年報，4, 41~43 (1953)
- 24) 佐藤他：東京獣医学畜産学雑誌，No. 3, 53~57 (1954)
- 25) 足立他：京都府衛研年報，7, 43~48 (1954)
- 26) 小林：獣医畜産新報，No. 137, 612~613 (1954)
- 27) 中山：食品衛生研究，vol. 4, No. 4, 57~60 (1954)
- 28) 柴田他：1955 年度神奈川県衛研年報，No. 33, 別冊 (1954)
- 29) 清田他：日本公衆衛生雑誌，2, 92~93 (1955)
- 30) 大城他：日本公衆衛生雑誌，2, 23 (1955)
- 31) 福原他：京都市衛研年報，24, 55~64 (1955)
- 32) 岡田：愛媛県衛研報告，第 13 輯 1~6 (1958)
- 33) Kästli, P.: Dairy Sci. Abstract. vol. 19, No. 10 (1957)
- 34) North, C. E., Park, W. H. et al: U. S. Pub. Health Bull., No. 127 (1925)
- 35) Newman, R. W.: J. Milk & Food Technol., 14, 75~77 (1951)
- 36) Ayers, S. H., Johnson, W. T.: J. Agr. Research, 3, 401 (1915)
- 37) Tanner & Windser: J. Dairy Sci., 12, 202 (1929)
- 38) Beavens: J. Dairy Sci., 13, 94 (1930)
- 39) Wilson, G. S.: Bacteriological Grading of Milk, 165~166 (1935)
- 40) Hemreberg & Wendt: Z. J. Bakt., üte Abt, 93, 39 (1935)
- 41) Long, H. F., Hedrich, T. I., Hammer, B.W.: J. Milk Technol., 7, 20 (1944)
- 42) 斎藤他：雪印酪農科研速報，No. 2 (1951)
- 43) 鈴木：食品衛生検査術式に関する研究経過報告書 p. 155~157 (1952)
- 44) 北村他：食品衛生研究，vol. 2, No. 11, 別冊 (1952)
- 45) 中島：千葉大腐研報告，5, 29~44 (1952)
- 46) 神保：愛知県衛研年報，vol. 5, No. 2 (1955)
- 47) Craige, J. E.: J. Milk Technol., 9, 21 (1946)
- 48) Whittaker et al: U. S. Dept. Agr. Tech. Bull., 18 (1927)
- 49) Swartling & Lindgren: Svenska Mejeritidin, 46, 111 (1954)
- 50) 厚生省編：食品衛生研究，vol. 5, No. 8, 32~34 (1955)
- 51) Eijkman, C.: Biochem. Z. 11, 12 (1908)
- 52) Zawagli, V.: Z. J. Infekt. Kr. d. Haustiere, 45, 110 (1933)
- 53) 木俣他：日本水産学会誌，3 (1934)
- 54) Lange: Z. Hyg., 96 (1922)
- 55) Behrens: Z. Hyg., 100 (1923)
- 56) Hüchel: Z. Hyg., 106 (1926)
- 57) Chick, H., Martin, C. J.: J. Physiol., 40, 404 (1910)
- 58) Madsen, T., Nymann, M.: Z. J. Hyg., 57, 388 (1907)
- 59) Burke, G. S.: J. Med. Assoc., 72, 88 (1919)
- 60) Burk, S. G.: J. Infect. Dis., 33, 274 (1923)
- 61) Sommer: J. Inf. Dis., 46, 85 (1930)
- 62) 木俣：食品保蔵学，54 (1949)，朝倉書店発行
- 63) Foster, E. M. et al: Dairy Microbiology (1957)
- 64) Lamanna, C. & Mallette, M. F.: Basic Bacteriology (1953)
- 65) Heinmets, F., Tayler, W. W., Lehman, J. J.: J. Bacteriol., 67, 1 (1954)
- 66) Read, R. B., Norcross, N. L., et al: J. Dairy Sci., XL, 28~36 (1957)
- 67) Stumbo, C. R.: Food Technol., 2, 115~132 (1954)
- 68) Ball, C. O., Olson, F. C. W.: Food Research, 20, 668~686 (1955)
- 69) Ball, C. O.: Industrial & Engineering Chemistry, 35, 71~84 (1943)

(都立衛生研究所・国立公衆衛生院)
(経費著者負担)