

【技術分類】 4－1－3 評価／分析試験／微生物試験

【技術名称】 4－1－3－1 微生物試験

【技術内容】

一般に香料(精油、合成香料)には抗菌作用があり品質面での微生物汚染の問題は少なく、むしろ香りによる微生物のコントロールの観点から抗菌作用としての有用性が注目される。抗菌作用の試験法は直接接触法(寒天拡散法)と希釈法(液体希釈法、寒天平板希釈法)の微生物試験がある。

一方、香料で付香された製品(香粧品、食品、医薬品)では、一般細菌、真菌、特定菌などの微生物による汚染の危険があり、品質および安全性に大きな影響を与えるので、原料、製品中に微生物が存在するかどうかを試験する無菌試験などが必要である。

香粧品の微生物汚染試験としては、無菌試験および一般生菌数試験、特定菌試験、二次汚染試験(防腐力試験)がある。食品、医薬品についても食品衛生検査指針や日本薬局方に試験項目と試験法が定められている。

また、近年 PCR 法に代表される遺伝子検出法や免疫学的手法を利用して微生物を特異的に検出する簡易、迅速測定法も開発されている。

ペーパーディスクを用いた寒天拡散法による抗菌力の測定では、精油の一定量をペーパーディスクに添加後、あらかじめ菌を均一に分散させた寒天培地の上におき、一定時間培養した後にディスクの周辺の透明なゾーン(菌が発育していない所)の大きさから抗菌力を判定する。

最小濃度の測定では、精油を薄めていき、菌の発育を阻止する最小の精油濃度を求める方法で液体希釈法と寒天希釈法がある。液体希釈法は精油を2段階ずつ希釈した一連の精油溶液と一定量の試験菌液を栄養培地に添加し、一定時間培養する。菌が発育すると液が濁り、添加した色素の色が変わる。菌の発育がまったく認められない精油の最小濃度(MIC)を測定する。実際の操作では96穴のマイクロプレートが使用される。寒天平板希釈法は2段階ずつ希釈した精油を含む寒天培地に菌をスポット状に植えて培養し目に見えるコロニーをつくるか否かで抗菌活性を測定する。

【図表 1】

香粧品の微生物試験法

微生物試験法	概要
無菌試験	直接法：試料溶液を培地と混和し、細菌試験の場合は 30～32℃で少なくとも 7 日間、真菌試験の場合には 20～25℃で少なくとも 10 日間培養し、菌の発育の有無で生菌の有無を判定する。 メンブランフィルター法：試料または試料溶液をメンブランフィルターを用いてろ過し、そのメンブランフィルターを培地に入れて培養し、菌の発育の有無で生菌の有無を判定する。
一般生菌数試験	試料 g (ml) 当たりの汚染菌の総数を測定するもので、菌数が比較的多い製品については、寒天平板混釈法、寒天平板塗抹法が用いられ、低菌数の場合には液体培地段階希釈法 (MPN 法) を用いる。また、除菌ろ過が可能な液体試料ではメンブランフィルター法 (MF 法) が適用できる。
特定菌試験	製品中に検出されてはならない緑膿菌、黄色ぶどう状菌、大腸菌類などを分離、同定する方法で、検出対象菌は国によって異なるが、WHO において特定菌として指定されているものが基準となっている。試験法はすべて増菌培養法によって発育増殖過程を経た検体について行われる。
二次汚染試験 (防腐力試験)	製品の使用期間中に微生物の汚染があっても繁殖するか否かの防腐力の有無を試験する。自然界に存在する細菌、酵母、真菌などの標準菌を製品に接種して菌の消長を追跡して、増菌しないことを確認する。

出典：本標準技術集のために作成（参考資料：香粧品科学 理論と実際 第 4 版 2001 年 6 月 30 日、田村健夫著、有限会社フレグランスジャーナル社発行、626－629 頁）

香粧品は消費者の使用段階で微生物汚染の機会にさらされるが、微生物の汚染があっても繁殖しない防腐力を持つ必要がある。防腐力試験法は自然界に存在する無数の微生物を代表する細菌、酵母、真菌などの標準菌を製品に接種して増菌しないことを確認する方法でアメリカ薬局方 (USP XXI) では、*Candida albicans* (ATCC No. 10231)、*Aspergillus niger* (ATCC No. 16404)、*Escherichia coli* (ATCC No. 8739)、*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC No. 9027)、*Staphylococcus aureus* (ATCC No. 6588)、製品使用中に汚染を招いた製品汚染菌を試験菌とする。製品 5 個について試験を行い、製品 20ml 当たり菌液を 0.1ml 接種・混合し、20～25℃で培養する。判定は、細菌は 14 日後に 0.1%以下に減少していること、酵母・糸状菌は 14 日後に接種したままの菌数またはそれ以下であることである。

一般生菌数試験は培養によって増殖しうる細菌、または真菌の有無をチェックする方法で、原料の微生物学的清浄度、製造工程中の衛生環境、製造衛生全般の評価、製品の汚染度を知ることができる。化粧品および原料の細菌数を調べた例では化粧品の剤型において、粉体を多く用いたものに汚染が認められた。

【図表 2】

病原菌検出における迅速測定法

	測定法	対象病原菌	検出感度（個）	操作時間 （培養時間込み）
免疫学的手法	ラテックス凝集法	大腸菌O-157, 黄色ブドウ球菌, サルモネラ, カンピロバクター, リステリア 他	—	培養法との併用 (2～3日間)
	ELISA法	大腸菌O-157, 黄色ブドウ球菌, サルモネラ, カンピロバクター, リステリア 他	$10^3 \sim 10^5$ 個/mL	1～2時間 (2～3日間)
	イムノクロマト法	大腸菌O-157, 黄色ブドウ球菌, サルモネラ, カンピロバクター, リステリア, レジオネラ	10^5 個/mL 程度	15分～30分 (2～3日間)
	免疫磁気ビーズ法	大腸菌O-157, サルモネラ	—	ELISA法などと 併用 (2～3日間)
遺伝子検出法	DNAプローブ法	大腸菌O-157, 黄色ブドウ球菌, サルモネラ, カンピロバクター, リステリア, エルシニア	1個/25g	数時間 (2～3日間)
	PCR法	大腸菌O-157, サルモネラ, カンピロバクター, リステリア, ボツリヌス 他	1個～	2時間程度 (2～3日間)

出典：「これからの微生物検出について（簡易、迅速測定法を中心に）」、SCAS NEWS Vol. 2005-II（通巻 22 号） 2005 年 8 月 29 日、西島裕人、増山博幸著、株式会社住化分析センター発行、9 頁 表 1 病原菌検出における迅速測定法の一覧

【図表 2 の説明】 遺伝子検出法や免疫学的手法を利用して微生物を特異的に検出する簡易、迅速測定法である。

【出典／参考資料】

微生物と香り ミクロ世界のアロマの力 2002 年 8 月 1 日、井上重治著、有限会社フレグランスジャーナル社発行、177－188 頁

化粧品科学 理論と実際 第 4 版 2001 年 6 月 30 日、田村健夫著、有限会社フレグランスジャーナル社発行、578 頁、626－629 頁

「これからの微生物検出について（簡易、迅速測定法を中心に）」、SCAS NEWS Vol. 2005-II（通巻 22 号） 2005 年 8 月 29 日、西島裕人、増山博幸著、株式会社住化分析センター発行、7－10 頁