石 関 忠 一*

On the microbial contamination of cosmetics

Chuichi ISHIZEKI

This monograph includes the problem of microbial contamination of cosmetics, as well as the practical methods used for the microbiological control of cosmetics.

The microbial contamination was discussed separately as primary (contamination of the product itself) and secondary contamination (contamination by the consumer)

Author has reservations on the application of bacteriological standards for cosmetics at this time, however author's temporary proposal for then is as follows;

Viable aerobic count: less than 100 bacteria/ml or gram.

Pathogenic bacteria: not detected.

None of the preservatives commonly used in cosmetics to-day is universally active against all kinds of microorganisms. Therefore, preservatives should be used only for the prevention of secondary contamination.

Author tried to examine antimicrobial spectrum of some preservatives now commonly used in cosmetics. The results are shown in the table.

The readily applicable methods as a quality control produce to determine the total aerobic counts and pathogenic bacteria were described. In conclusion, it seems to author that a more logical approach and goal at this time is the production of cosmetics under controlled conditions to assure maximum sanitation.

1. 緒 言

日常皮膚が多くの環境汚染によって何んらかの悪影響を受けていることは周知の事実である。したがって皮膚の機能を正常に維持するために多くの保護的手段がとられているが化粧品もその一つであると思われる。しかしこれとて皮膚からの吸収の問題あるいは製剤自体が微生物汚染のために変敗し、そのためある種の微生物によっては製剤中に有害な代謝産物の産生をまねくおそれが生じてくるし、また一方では微生物による感染の問題もおきてくる。

最近とくに内外を問わず医薬品の安全性についての究明が盛んになってきたことは非常に好ましいことである

が微生物汚染の問題も少なからずこれらの中に包含されてよいものと考えている。化粧品についてのこのような問題は従来あまり顧みられず安全性からみれば決してみのがすことはできない。化粧品の成分のなかには重金属をはじめとして多くの色素類が、その安全性の観点から問題となっているが微生物汚染に関してはあまり論究の域に達していないのが現状と思われる。最近欧米では化粧品と微生物汚染の関係とくに病原菌に関心がもたれてきていることは事実である¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。現在ではその剤型もo/w型のものが多いようで従来のw/o型のものに比べて水分含量が多い。またノニオン系界面活性剤の製剤への応用も微生物汚染が増加した一因とも考えられる。以前はカチオン系あるいはアニオン系活性剤が多用されていたようであるが、それ自身に抗菌活性があるためか汚染は比較的少なかったようである。一方微生物の増殖がこのような製剤のいかなる相で起るかをみてみると、その多くは油相と水相との界面が最も多いとされていることは微生物が水分に依存していることから理解され

* 東京都世田谷区上用賀1-18-1
国立衛生試験所衛生微生物部
National Institute of Hygienic Sciences 18-1,
Kamiyoga 1-Chome, Setagaya-ku, Tokyo, Japan
Department of Microbiology

る。

消費者側からみれば化粧品が化学的に多くの有害物質を包含していることも危険ではあるが微生物汚染の問題も重要である。この場合製品の変敗損失は第2問題でまづ生体のうける危険の方がはるかに重大である。

このように化粧品が微生物学的には多くの問題をかかえておりながら従来あまり議題の焦点とならなかったこと自体ふしぎといわざるをえない。そこで本題のうち主として試験法についての解説をとの依頼を受けたが乏しい資料ではあるが日常著者の行なっている方法ならびに考察も含めて筆を執った次第である。なお読者の御意考に沿いかねる面も多々あることをお許し願いたい。

2. 汚染源とその微生物

汚染は化粧品にかぎらず医薬品を含めて人工的に処理加工されるほとんどの製品にあてはまる問題で大きく分けて化学物質による汚染と微生物による汚染とに分けて考えることができるが、本議題では後者の微生物汚染に焦点を求めてみたい。

本来この問題を解くためには微生物汚染が生体に与える悪影響をいかに理解するか、あるいはその汚染源をどのように究明するかにあると思われる。したがって製品の損失は第2問題として処理されなければならない。

汚染源と考えられるものに原料(水を含む)、製造従事者による汚染、付帯設備(製造環境や製造機器類とくに釜、パイプライン、バルブ、容器または保管場所、充填機)等がある。一言でいえばこれらがすべて無菌的な材料および操作のもとで衛生的処理工程をへて製造されたものであれば微生物学的にみて安全な製品が生産され消費者に対する不安感を解消することもできると同時に製品の損失をも防ぐことができる。

過去において主たる原因とされていたものに水があると思う。従来イオン交換法による脱イオン水は一般にきれいな水とされているが微生物学的にはかなり不純な水と思わなければならない。かつて Baker (1959)⁹⁾は化粧品の微生物汚染がイオン交換水にあったことを報告している。これはイオン交換樹脂層に沈着した色々な有機物が栄養源となって微生物の生息を可能にしたことによるとと思われる。したがって製品に用いる水は蒸留水であろうとイオン交換水であろうとすべて滅菌処理過程をへたものでなければ汚染源としての可能性が十分に存在することになる。

製造工程以前の未精製物質については Schiller (1968)⁷⁾らの報告によってもわかるように物質によっては化学的に精製されたものでも微生物の混在しているも

もあるとのこととくに注目しなければならない。それはこれらを処理した室の環境(空気・温度・湿度・ゴミ)容器、包装あるいは処理にたずさわった人による汚染等が問題となるからである。また物理的、化学的に処理できない物質もあるが、これらが製品化された場合には相当な汚染が生ずることはいうまでもない。また De Navarre (1969)⁸⁾は各種の天然活性物質の微生物汚染についての報告のなかで化粧品関係ではタルク中に 3,150ヶ/g の生菌数をみとめたとしている。しからばこのような各成分中の微生物はいかにしたら取り除くことができるかという問題が出てくるが、これは非常にむずかしいことである。なぜなら微生物を処理できる滅菌条件下では成分によってその性質をかえてしまうことにもつながるからである。最近 Alquire (1970)⁹⁾は化粧品各成分の微生物をコントロールする手段として 100% エチレンオキシド(E・Oと略す)による滅菌法を試み一般細菌では 2×10^6 個が 100 個以下に、また真菌では 3×10^2 個のものが 10 個以下にできると報告している。しかしその利用については一長一短があり E・O に対して充分な理解が必要となる。すなわち E・O 法を確実にこなうためには温度・湿度・E・O 濃度および加圧条件などが問題となりまた使用条件によってはすべての微生物が滅菌できるとは限らず各成分の分解変質をもまねくおそれがある。しかし適当な条件での利用によっては容器の滅菌も含めてかなり利用価値があるのではないと思われる。

設備の点ではパイプ、ジョイントから充填にいたる製品残留物の付着や痕跡程度のもので微生物蔓延の源となる。すなわち目につかない汚染源がいたる所にあることになる。これらの処理について Davis (1960)¹⁰⁾はこれらプラントの消毒には次亜塩素酸塩の 150~200 ppm で消毒が完全となるとしているが、一方この塩素の腐蝕性やプラント内の残留が問題となってくるとしている。また製品の性質上いろいろな消毒剤の利用も好ましくない。したがってその清浄法としては熱湯法が一番無難であろう。

製品中で微生物の発育が一番よくみとめられる所としては容器内キャップ裏側より製品の表面および容器辺縁等をあげることができる。これは多分に微生物の発育が水分や空気と密接な関係にあることを示していると思われる。Noble (1966)¹¹⁾はステロイド入りクリームでの緑膿菌汚染の問題で 0.1% の Chlorocresol の防腐剤が入っているにもかかわらず緑膿菌汚染がみとめられたことについて、菌がクリームの油相と水相との界面に多くみとめられた点よりして防腐剤が油相中に移行したため菌が水相中およびその界面で発育したとの解釈をとって

る。Ayliffe (1965)⁵⁾ らは緑膿菌が床、下水あるいは投薬ビンのキャップからも分離されたとし、また Tenenbaum (1971)³⁾ は化粧品中の緑膿菌汚染の意義について興味ある報告をしている。その中で本菌は汚染菌中最もやっかいな菌であることを指摘しているが、これは今日ノニオン系界面活性剤が化粧品分野で主に使用されてきたことと緑膿菌の汚染頻度が高くなって来ていることに関係がありそうである。たしかにこの菌は多くの抗菌剤に対してかなり抵抗力を示す一方人に対する病原性もかなり報告されている。とくに緑膿菌がみつめられる条件としてノニオン系界面活性剤を含む製剤 pH 7.0~8.5 の O/W 型乳剤であるとされているが、もちろんこのような製剤では他の汚染菌も多々みつめられていることに注意されたい。

次に今までのべたものを一次汚染と考えるならば、製品が消費者の手に渡って開封後に起るものを二次汚染とすることができる。たとえば広口ビンのごときは開封後の空気由来の微生物が混入し、また柔軟性の容器では押圧して内容液を出した後の容器の複元性による空気の吸引あるいは使用時の手による汚染等が日常起こることとして予想できる。またここまで汚染問題を拡大解釈すると、これを予防するために防腐剤の使用が試みられるが人に対する安全性からみれば多量の防腐剤添加は好ましくないからざる問題を提起するであろう。要は汚染の根本原因の探究によって製品自体よりの消費者側への汚染を防ぐことが第 1 であって消費者側の手に渡ってからの二次汚染は使用者の衛生的観念の普及によってある程度防ぐことができるのではないと思われる。しかし最少限の防腐剤使用は必要であろう。本来防腐剤の使用は消費者よりの二次汚染を防ぐ目的で使用すべきであり防腐剤によって製品中の菌を減らすことを考えるのは邪道である。また防腐剤が汚染可能なすべての微生物に一様に効果をもつかどうかは疑問で今日化粧品品質基準 (1967)¹¹⁾ で使用が許可されている化粧品関係の防腐剤では単体で広い抗菌スペクトルをもつものは殆んどない状態で、したがって今後は毒性の低い安全なかつ抗菌活性の広い防腐剤の開発が望まれるところである。ここで Baker (1959)⁶⁾, Wedderburn (1964)¹²⁾, Noble (1966)⁴⁾ および Tenenbaum (1971)³⁾ 等の報告から化粧品中の汚染菌を集め Table-1 に示してみた。

このように多くの微生物が汚染菌として検出されているが、これらのなかには多くの危険な微生物も発見されていることに注目されたい。

なお Foter (1950)¹³⁾ らはクリームや軟膏などの適用場所に常在する微生物として Table-2 のような菌分布

Table-1 Some of the Microorganisms Isolated from Pharmaceutical and Cosmetic Emulsions.

Bacteria	Fungi
Achromobacter sp.	Absidia
Aerobacter aerogenes	Alternaria*
Alcaligenes faecalis*	Aspergillus*
Bacillus pyocyaneus	Citromyces
Bacillus subtilis*	Cladosporium*
Escherichia coli	Dematium
Micrococcus sp.	Fusarium
Proteus vulgaris*	Geotrichum
Pseudomonas aeruginosa*	Helminthosporium
Pseudomonas fluorescens*	Hormodendrum
Sarcina sp.	Mucor*
Serratia marcescens	Paecilomyces
Staphylococcus aureus*	Penicillium*
Staphylococcus albus	Phoma
Streptococcus sp.*	Pullularia
	Rhizopus*
	Stemphylium
	Thamnidium
	Trichothecium
	Verticillium
	Candida
	Torula
	Zygosaccharomyces

* Several different species of these genera have reported.

を報告しているので参考とするのもよいと思われる。

また Knüsel (1969)²⁾ らは各種化粧品中の生菌数について防腐剤添加の場合は菌数が比較的少ないが防腐剤無添加の製品では菌数の増加にあわせて緑膿菌も検出されたと報告している。Table-3.

3. 製品中の汚染菌測定法について

試験には必ず対照実験をとまなうことは微生物の分野においても同じであるが微生物ではこれに加えて無菌性が必須の条件となってくる。また検体については試験目的である製品中の微生物を保護すべく特定な化学的あるいは物理的処理（加熱）をさけ製品そのままの状態での汚染の程度を検すべきである。

微生物検査の処理段階において最も注意しなければならないことは実験に用いるすべてのものが無菌的に処理

Table-2 MICROORGANISMS WHICH MAYBE PRESENT AT SITE OF APPLITCATION OF OINTMENTS, CREAMS, JELLIES, etc.

	<i>Pus</i>	<i>Wounds</i>	<i>Skin</i>	<i>Eyes</i>
Staphylococci (sp)	X	X	X	X
Pneumococci		X	X	X
Streptococci (sp)	X	X	X	X
<i>B. subtilis</i>	X	X	X	X
<i>B. anthracis</i>	X		X	X
Clostridia (sp)	X	X		
Corynebacteria (sp)		X	X	X
Mycobacteria (sp)	X	X	X	
Erysipelothrix			X	
Actinomyces (sp)			X	X
Neisseria (sp)			X	X
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X	X	X	X
<i>Escherichia coli</i>	X	X	X	
<i>Proteus vulgaris</i>	X	X	X	
<i>Borrelia vincentii</i>		X	X	
Non-bacterial forms (fungi, etc.)			X	

Foter and Nisonger (1950) より

Table-3 Microbial content of topical preparations (ointments, creams, lotions, pastes)

Number of batch	Total count (per g)				Pseudomonas sp.	Enterobacteriaceae
	Bacteria		Fungi			
	<100	>10,000	<10	10-100		
48	47	1*	48	—	1*	—

* Liquid emulsion without preservative; a suitable preservative has since been added.

Knüsel, Hess and Lim (1969) より

されているものでなければならない。たとえばサンプル容器、サンプリング器具（スパーテル、ピペット等）、菌数測定のための器具全般（ピペット、試験管、シャーレ等）、希釈液および培地等検体処理から菌数測定にいたる操作も含めた一連のものがすべて無菌的でなければならない。また培地についてはいろいろな処方により各自で製造される場合もあるが今日では乾燥粉末培地として市販されているものもあり、これを一定の濃度で水に溶かすことにより滅菌後使用可能となる。しかしながら培地は製造後必ず雑菌試験（30～37℃にて3日間）を行ない滅菌状態を試験した後でなければ使用可能とはならない。それは滅菌が不完全なために培地中に混入した微生物が発育したのか、あるいは検体由来の微生物かを判別できないからである。さらに厳密には検体処理前に培地の性能試験をしなければならない。これはでき上った培地に

適当な微生物を接種してその培地が微生物の発育に対してどのような態度を示すかを調らべるものであるが、まず特定培地を除いてはあまり心配ないようである。

一方コロニー（集落）として生ずる菌は検体中あるいは培地中を問わず菌が個々にばらばらの状態で存在しないものもあり細胞分裂によって数個の菌が連鎖をつくって塊となっている場合もある。これは培地中では細胞集団となって1個のコロニーをつくる。したがって1コロニー1個の生菌という概念が常にあてはまるものでないことに注意されたい。また測定される菌数も培地の組成あるいは測定法等により異なった条件下で培養すると発生する菌の数および種類も異なった結果となってあらわれるゆえ常に一定条件下でのコロニーの発生能力をもつ菌としての値を出すよう心がけるべきである。しかしこの値の信頼性がどうかとなると非常にむずかしい問題と

なるがこれについては Stearman (1955)¹⁴⁾の報告を参考にされるとよいと思われる。すなわち細胞の集塊によっては測定値も低い値として出ることや希釈誤差としてのピペットや液量の問題がある。したがって終末計算として同一処理検体について寒天平板培地および液体培地ともそれぞれ少なくとも2~4枚(本)の成績をもって評価すべきである。一般生菌数測定に関するものとしては Norris (1969)¹⁵⁾らや植村 (1960)¹⁶⁾らの著書を参考にすれば理解できるものと思われる。なお食品の場合は生菌数の外にその汚染の指標として大腸菌群をあげているが、著者は化粧品の場合外用面の使用を考慮に入れてブドウ球菌および緑膿菌を汚染指標の対象としてはと考えている。

ここでは種々の方法について文献をもととして著者の行なっている方法も加味して順にあげてみたい。

3・1 一般細菌の生菌数

製品汚染の程度を評価するためには以下の方法のうち少なくとも2つの方法による測定結果によって行なわれべきである。

3・1・1 寒天平板混釈法

イ) 検体の採取

製品にあっては未開封の容器から無菌的操作により検体を採取して試験に供するがその他の検体例えば製造工程中のものあるいは製品の材料にあっては滅菌したサンプル容器に無菌的に採取し検体とする。

試験量は、通常固体の場合は1g、液体は1mlを1回量としさらに採取場所をかえて2~3回同じ操作で採取する。

ロ) 検体の希釈

滅菌希釈液で10, 100, 1000倍(汚染の程度によりことなる)と希釈しうすめた検体はできるだけすみやかに培養操作にうつる。

通常1検体(1希釈液)につきシャーレ2枚を用いる。平板培地に発生するコロニー数は Postgate (1969)¹⁷⁾によれば200~300個の範囲内になるように希釈して菌数を測定するのが理想的とされている。一方衛生検査指針(食品または飲料水編)¹⁸⁾では培養後30~300個のコロニーが生ずる程度に希釈するとしている。しかし実際には検体が未知の場合が多い。たとえば原液で数個というようなときには検体の濁りの問題も考慮にいれなければならない。要は検体由来の菌であるか、あるいは操作によって混入した菌であるかを対照実験によってみきわめることの方が重要である。

ハ) 培養操作

検体1g(1ml)を希釈液で溶解および懸濁をかねて浸出し適当な濃度に希釈する。この各希釈液1mlづつを2枚のシャーレに分注し、あらかじめ溶かして約48~53°Cに保った菌数測定用寒天培地9mlづつを加えて培地がシャーレ内で固まらないうちに前後左右に回転させて検体と培地とがよくまざるようにして固まったシャーレを逆さにしてフラン器内で24~48時間培養する。平板(混釈された)はたくさん積みかさねたり他のもので包む(例ビニール)ようなことはしない。

ニ) 菌数計算

培養後発生コロニーの数が200~300個(30~300個)くらい希釈段階でのコロニー数を数えこれに希釈培数を乗じて検体1g(1ml)中の菌数とする。この際24時間培養と48時間培養とでは若干菌数に差を生ずるが結果は通常48時間値で求める。ただし拡散性の強い菌の場合には24時間値の平均コロニー数で表わすこともある。

3・1・2 寒天平板塗抹法

本法は現在日本抗生物質医薬品基準(1969)¹⁹⁾で生菌数測定に用いられているものに著者が若干補正したものである。検体1g(1ml)中の生菌数を求めるのであるが眼軟膏ではその生菌数が50個以下と規定されている。

菌数試験用寒天培地(普通寒天培地・Trypticase soy agarも使用可能)をとかし48~53°Cに保温したもの20mlづつをシャーレ(直径90~100mm)に分注して均一にかためて平板とする。検体は容器ごと正確にはかり30~35°Cに約1時間放置したのちその0.1~0.3gを試料として、あらかじめ30~35°Cに保温しておいた平板のうへに検体をのせた後に検体を再び容器ごと正確にはかり試験に用いた検体量を換算する(液体の場合は0.1~0.3ml)。

次に平板にうつされた検体を滅菌ガラス棒(コンラージ棒)で平板上に均等にひろげ30~37°Cで48時間培養する。培養後平板上のコロニー数をかぞえて検体1g(1ml)当りの生菌数を算出する。

このような操作はすべて無菌的に行なうことはもちろんであるが検体中の汚染菌が拡散性の強い菌の場合あるいは汚染の程度によっては希釈液の塗抹法によることもある。なお塗抹に用いる検体量は0.3g(0.3ml)まででこれ以上の量では寒天培地にしみ込まない場合があるので注意を用する。(日本抗生物質医薬品基準では0.1~0.5g(ml)とある)

3・1・3 液体培地階段希釈法

検体1g(1ml)を希釈液(接種される液体培地を用いる場合もある)で無菌的に10, 100, あるいは1,000倍と

希釈して、その検体浮遊液を一定量づつ液体培地に接種する。接種法は液体培地 9 ml に検体希釈液 1 ml を接種して 30~37°C, 24~48 時間培養後菌の発育の有無を濁りで判定する方法である。USP. XVIII (1970)²¹⁾。この方法は菌の発育がコロニーとしてみられず濁りによるため検体による濁りを考慮に入れるべきである。判定が困難な場合には一定時間培養後 (24 時間) その 1 白金耳を塗抹量として寒天平板上にうつすか、0.1~1.0 ml までの濁りをうつさない程度の適当量を同じ液体培地に再接種して 30~37°C, 24~48 時間培養後判定する。なお発育疑わしき濁濁培地から直接塗抹染色標本 (Gram 染色) を作り顕微鏡観察するのも一法である。

3.1.4 Woodward (1971)²⁰⁾ らの液体培地階段希釈法

本法では一般生菌数 (細菌・真菌) のほか特定細菌 (病原菌も含む) の検出にも利用されている比較的よい方法であると思われる。Fig.1, Table-4

検体の希釈および培養操作: 一般細菌の場合

図解されているように検体 1 g (1 ml) を BHI 液体培地 9 ml 入りの試験管 No.1 に入れてよく混和し 10 倍液

Fig-1 Scheme for mixing and diluting sample being tested. See also paragraph A. Phase I(A) for further discussion

を作る。次にこれより順次その 1 ml を No.2 にうつしてこの操作を試験管 No.5 まで行ない、No.5 からは各 5 ml を No.6 以後の試験管に希釈をかねて順次うつしかえて培養にうつす。培養は 37°C, 25~48 時間行ないその発育した試験管番号より Table-4 に示されているように菌数を算出する。たとえば試験管 No.6 に発育して No.7 に発育しない時は表の読みから少なくとも 100,000 個/1 gm (1 ml) とし 200,000 個/1 gm 以下であると表わす方法である。

3.1.5 メンブランフィルター法

本来この方法は無菌ろ過法と呼ばれ変性しやすい蛋白、酵素および不安定な物質等の水溶液から微生物を取り除くために使用されてきた。これは現在 USP·XVIII²¹⁾ および NF. XII²²⁾ 等においてその使用が規定され医薬品の検査に応用されているが、わが国ではまだ公定書に入れるまでにはいたっていない。汚染の程度が比較的低い大量の液体中より、ごくわずかな微生物を検出する場合には特に好都合である。なおこの装置とその使用にさいしての問題点については岩原 (1970)²³⁾ により詳細に報告されているので参照されたい。

本法の原理は一定サイズの孔径 (例えば 0.2 μ , 0.45 μ その他) をもつフィルターを装着して適当なろ過速度で減圧ろ過を行なうことにある。この場合検体中に多くの微生物が混入しているようなときには菌数に応じて検体を希釈してからろ過するか、あるいは少量をろ過した後フィルターを寒天平板培地上におくか液体培地中に無菌的に入れて培養する。平板培地の場合はろ過された微生物がコロニーとして生ずるが液体培地の場合には濁りによる発育しかわからない。したがって汚染菌の数または種類を早急に知りたい時には平板培地上での培養が好ま

Table-4

Growth in (tubes)	Equals: At least organisms/ML or GM	But less than
The 1st tube but not the 2nd	1	10
The 2nd tubes but not the 3rd	10	100
The 3rd tubes but not the 4th	100	1,000
The 4th tubes but not the 5th	1,000	10,000
The 5th tube but not the 6th	10,000	100,000
The 6th tube but not the 7th	100,000	200,000
The 7th tube but not the 8th	200,000	400,000
The 8th tube but not the 9th	400,000	800,000
The 9th tube but not the 10th	800,000	1.6 M
The 10th tube	1.6 M	

Woodward and Mc Namara (1971) より

しい。ここで Knüsel (1969)²⁾ らが医薬品中の微生物汚染をこの方法を用いて実験しているので引用してみたいと思う。Fig.-2 および Table-5 に示されているように同一 Lot の検体を少なくとも 3 つの容器から無菌的に採取したものを混合して、それを目的別に汙過して培養

Fig-2 Knüsel, Hess and Lim (1969) より

にうつす方法である。すなわち検体を汉過したフィルターを個々の菌別に撰択培養することにより同一検体から生菌数（細菌・真菌）および特定菌にいたるまでを同時に行なう方法である。

3・6・6 特定細菌の鑑別培養について

一般細菌の希釈系列で發育のみとめられたものからそれぞれの撰択培地を用いて特定細菌の検出を試みる。すなわちまづ希釈系列で一番高い發育試験管から塗抹標本を作ってグラム染色を行ないその染色性から次のように培地を選んで培養する。

グラム陽性の場合：V-J 培地—ブドウ球菌用

グラム陰性の場合：MEB 培地—大腸菌用

グラム陰性の場合：BiSO₃ 培地—サルモネラ用

グラム陰性の場合：UTB 培地—プロテウス用

グラム陰性の場合：PsA 培地—緑膿菌用

このような培養により特定菌株の予備的同定試験を行なうことができるが、できればこの培地使用に際しての対照として既知の菌株を同種培地に培養してその判別に利用した方がよいと思われる。

3・6・7 嫌気性細菌

本来ならば一般細菌と同様に取り扱うべきであるが本菌の性質上特殊な装置と培地とを必要とする。また製品の使用場所よりすれば特殊の場合を除いては試験価値は少ないようである。しかしその検出にあたっては日本薬局方第 8 改正の無菌試験細菌用培地に検体を接種することにより定性的には検出可能である。

3・2 真菌の検査法

真菌は元来ごく一部の菌すなわち酵母類を除いては多くは形態学的分類によって分けられ一般細菌のごとく生

Table-5 Summary of pathogenic bacteria mixed together, media employed, and results obtained in order to verify the presence of each on specified differential media.

Identification of	Media employed	Results	
		Biochemical	Gram stain
Staph. aureus	V-J	Black colonies surrounded by clear zones, indicating mannitol formulations	Gram + cocci only
	Staph 110	Deep yellow colonies	Gram + cocci only
Ps. aeruginosa	Pseudosel	Green pigment produced	Gram - small rods only
Proteus vulgaris	Urease broth	Positive for urease production	Gram - rods only
Sal. oranienburg	SS	Not clearly defined	Gram - rods only
	BiSO ₃	Metallic black colonies	
E. coli	EMB	No metallic sheen	Gram - rods only

Woodward, Mc Namara (1971) より

化学的あるいは血清学的分類のできるのの一部の酵母類とされている。したがってその分類にあたってはより専門的な知識と経験とを必要としている。真菌の多くは好気的でその増殖には多量の酸素を必要とし培養温度は細菌に比して低く 20~25°C が至適とされている。一方栄養素の面では細菌が窒素源を主にするのに反して真菌は炭素源を主とするものが多く pH も 5~6 の酸性側を好むものがほとんどである。これに加えて重要なことは湿度である。すなわち湿度10%から生えはじまる真菌があるが多くは70%以上を必要とするとされている。

3・2・1 寒天平板塗抹法

もっとも普通に行なわれている方法であるが製品の汚染の程度あるいは高濃度の防腐剤添加製品では希釈液について行なう場合もある。

製品そのままを原液とする場合または 1g (1 ml) 希釈液 (P・D 液体培地を用いる場合もある) で適当にうすめたものを検体とする。検体を 0.1~0.3 g (0.1~0.3 ml) 同定用真菌平板培地上に塗抹して 20~25°C, 1~2週間培養して発生するコロニーを観察する。

3・2・2 液体培地階段希釈法

本法は従来も行なわれていたが、最近 Woodward (1971)²⁰⁾ らによって報告されている方法に著者の考えも若干入れてまとめた。

3・1・4 の一般細菌の場合に準じて行なうが培地を細菌用から真菌用に変える。製品 1g (1 ml) を P・G 液体培地 (SD 液体培地でも可) 9 ml に入れてよく混和し10倍あるいは100倍階段希釈とする。培養は 20~25°C, 1~2週間行ない菌の発育の有無を検べる。ただここで一般細菌のごとく Table-4 より菌数を算出するのが真菌の場合にあてはまるかどうかは疑問である。しかし参考にはなるのでこれより寒天平板上にうつしかえて観察するのよいと思われる。

3・2・3 純培養法

AおよびBで発生した菌は純培養を行なったのちその菌の形態学的あるいは生理的性質などをしらべることによって菌種同定を行ない防腐剤の抗菌活性との関係の資料となしうることは一般細菌の場合と同じである。

1) 培地の撰択

POA, PDA, ZPA, および SDA 等多くの同定用寒天培地が用いられるが一般細菌の混入を防ぐ手段をとる場合がある。通常上記培地にストレプトマイシン (30~100 µg/ml) やニペシリン (20~100 U/ml) などを加えた培地での分離培養も試みられている。

2) 分離操作

発育したコロニーは白金鉤 (白金線の先をカギ形に曲

げたもの) で孢子のできているものは孢子だけを、また菌糸体のものはごく一部を静かに周囲の異種コロニーにふれないように鉤菌して斜面培地にうつして培養する。このようにして純培養できた菌株は同定試験を行なわなければならないがこの試験はかなり専門的な知識を必要とする関係上専門家に依頼された方がよいのではないかと思われる。

3・3 培 地

3・3・1 水: 脱イオン水, 蒸留水 121°C 20分高压蒸気滅菌

3・3・2 希釈液: 緩衝生理食塩水

a 液: 0.2 M KH_2PO_4 (M. W. 136.24)

b 液: 0.2 M Na_2HPO_4 (M. W. 141.98)

0.85% NaCl 液 1900 ml に a 液 20 ml, b 液 80 ml を加える。pH 7.2 になるように a, b 液を適宜増減して調製する。121°C 20分高压蒸気滅菌。

3・3・3 細菌用培地

イ) 菌数試験用寒天培地

ペプトン 10 g

肉エキス 5 g

食 塩 2.5 g

寒天 (粉末) 15 g

蒸 留 水 1.000 ml pH 7.0 (修正液・水酸化ナトリウム液) 121°C, 20分, 高压蒸気滅菌

ロ) Trypticase Soy Agar: BBL (1968)²⁵⁾

Trypticase peptone 15 g

Phytone peptone 5 g

食 塩 5 g

寒天 (粉末) 15 g

蒸 留 水 1.000 ml pH 7.0, 121°C, 20分高压蒸気滅菌

ハ) Brain Heart Infusion Broth (BHIと略す): 一般細菌用: BBL (1968)²⁵⁾ この培地は各自で調製されるものよりも市販されている製品の使用をすすめたい。

ニ) 撰択培地: BBL (1968)²⁵⁾

Vogel-Johnson Agar (V-Jと略す) ブドウ球菌用
Eosin Methylene Blue Agar (EMBと略す) 大腸菌用

Pseudosel Agar=Cetrimide Agar (PsAと略す) 緑膿菌用

Bismuth Sulfite Agar (BiSO_3 と略す) サルモネラ用

Urease Test Broth (UTBと略す) プロテウス用

3・3・4 真菌用培地

イ) Potato Dextrose Agar (PDA と略す)

ジャガイモ浸出液	200 g
ブドウ糖	20 g
寒天 (粉末)	15 g
蒸 留 水	1.000 ml pH 5.6 (無修正)
121°C, 15 分, 高压蒸気滅菌	

ロ) Czapek Dox Agar (CDA と略す)

NaNO ₃	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	0.5 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.01 g
ブドウ糖 (またはシヨ糖)	30g
寒天 (粉末)	15 g
蒸 留 水	1.000 ml pH 約5.5 (無修正)
121°C, 15 分, 高压蒸気滅菌。 (なおこれにペプトンを 1 % に加えて使用することもある)	

ハ) Sabouraud Dextrose Agar (SDA と略す)

ブドウ糖	40 g
ペプトン	10 g
寒天 (粉末)	15 g
蒸 留 水	1.00 ml pH 約5.6 (無修正)
121°C, 15 分, 高压蒸気滅菌	

ニ) 無菌試験用真菌培地 (日局第 8 改正)²⁴⁾ (PGA と略す)

酵母エキス	2 g
ブドウ糖	20 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.5 g
ペプトン	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g pH 約5.6 (無修正)
蒸 留 水	(1.000 ml)
121°C, 15 分, 高压蒸気滅菌 (場合によっては寒天培地として寒天1.5%に加える場合もある)	

4. 防腐剤加製品の防腐試験

製品を微生物汚染から防ぐためには使用に供するすべての材料および操作が無菌的に処理されればできることであるが、しかし数ある微生物すべてを対象とした場合相当にむずかしい問題となる。微生物を滅菌処理できる条件では製品中に含まれる各成分をそのままの状態で保持できるか否かが疑問となる。また製品の性質上一度に使用されてしまうようなものでなく長いものになると2～3ヶ月にもわたって使用されその間適当な所に放置される場合があり、その間に使用者の手による二次汚染も

関係してくる。したがって長期使用に耐えられるようにするためには防腐剤の使用にたよらなければならなくなる。しかしこの防腐剤としてその単体ではかなりの抗菌活性を示すものでも製品中の各成分との適合如何によっては本来の防腐作用が発揮されない場合やその作用の減弱もみられるようになる。したがって製剤中での防腐剤と各成分との間の適合性を物理化学的あるいは薬学的に究明しなければならないが防腐剤を主に考えた場合、その適合性の良否は微生物学的試験によって十分に解明されなければならないと思われる。ここで製剤中のどのような所で微生物が発育するか、また防腐剤の效果に影響する因子についての究明が必要となるがそれには Wedderburn (1964)¹²⁾の報告を参考にといい Fig.-3 に示した。

かつて Lawrence (1950)²⁶⁾, (1954)²⁷⁾ は化粧品への第4級アンモニウム塩の殺菌菌効果よりみた利用について、また各種防腐剤を用いた場合の中和剤に関する研究もその適合性に関する一端でもある。とくに Quisno (1946)²⁸⁾ は第4級アンモニウム塩の殺菌効果を評価する場合にはノニオン系ツイーン80やレシチン加培地を使用するのがよいとしているが Klarmann (1948)²⁹⁾ らはその不活化剤として, Bacto-oxygall の利用について、また Brown (1964)³⁰⁾ らはツイーン80が第4級アンモニウム塩やクロールヘキシジン醋酸塩の活性を不活化させるとしている。一方青木 (1957)³¹⁾ らはパラオキシ安息香酸エステル類の抗菌性はツイーン20で影響されると報告している。防腐剤は過去においては多くのものが使用されてきたが、それらのなかには安全性の問題から今日では使用禁止のものも多々ある。最近, Gucklhorn (1970)³²⁾ はいろいろな殺菌剤がどのような作用をもつか、あるいは細菌や真菌に対して作用面から報告しているので Table-6 に示した。これによると従来から比較的優れておりその使用頻度も高いフェノール系あるいはクロール系等が意外によくないことがわかる。このようにみてもカチオン系活性剤の抗菌性あるいは他の抗菌剤がいろいろなものによってその作用が不活化される現象がわかるが、今日汚染菌の中で、最もやっかいでかつ危険と思われる緑膿菌に対する研究にも注目すべきである。Croshaw (1964)³³⁾ らは緑膿菌を目標とした抗菌剤の研究で脂肪族ハロゲン化ニトロ化合物が 12.5～50 µg/ml で活性を示しかつツイーン80やレシチンなどによる不活性化もみとめられなかったとしている。また Schuster (1971)³⁴⁾ らはいろいろな界面活性剤とパラクロロメタクレゾールとの適合性は一定の条件下で使用されるならば効果が得られるとしている。

Wedderburn (1964) より

Fig-3 Schematic representation of the factors in emulsions which influence microbial growth and the efficacy of preservatives

このように防腐剤と各成分との間の適合性に関する研究はその多くが微生物学的試験によってその効果を評価する方法をとっている。したがって製品中の防腐剤がいかなる効果をもっているかに関する試験法について簡単

に記してみたい。なお防腐剤の効果を試験するためにはその代表として使用される試験菌をきめなくてはならないが、この点については Wedderburn (1964)¹²⁾ や USP XVIII²¹⁾ の記載にあるように Table-7 に集録した菌株について著者も今までの経験からよい選らびかただと思っている。

4.1 液体培地階段希釈法

主として Klarmann (1956)³⁵⁾, Wedderburn (1962)¹²⁾, Norris (1969)¹⁵⁾ らおよび Woodward (1971)²⁰⁾ らの報告よりまとめたものであるが著者の考えも若干考慮に入れた。

[操作]

二列の試験管系(希釈段階によっては試験管に増減がある)を用意する。

イ) 一列目の試験管系: 防腐剤単体を種々の濃度に階段希釈してその希釈濃度を含む培地を各々 9 ml づつ分注(希釈液として液体培地を使用しても可)

ロ) 二列目の試験管系: 防腐剤添加製品を種々の濃度に階段希釈しその希釈濃度を含む培地を各々 9 ml づつ分注

これらイ), ロ) の各濃度別の試験管に一定量の試験菌を接種して 30~37°C (試験菌の種類によって至適温度

Table-6 Properties of Disinfectants

	SBT-24	Phenolics	QACs	Organo-metals	Iodophors	Chlorine
Detergency	excellent	fair	poor	poor	poor	poor
Bacteristasis	excellent	excellent	excellent	excellent	excellent	excellent
Fungistasis	excellent	fair	poor	excellent	fair	fair
Sporistasis	excellent	poor	fair	excellent	good	good
Soap and surfactant compatibility	excellent	fair	poor	excellent	poor	fair
Prolonged activity on substrates	excellent	fair	fair	excellent	poor	poor
Affinity for fabric						
(a) in launder cycle	excellent	poor-fair	poor	excellent	poor	poor
(b) in rinse cycle	excellent	poor-fair	excellent	excellent	poor	poor
Activity with soil	good	fair	poor	fair	poor	poor
Mildness in handling	excellent	fair	fair	poor-fair	excellent	fair

Gucklhorn (1970) より

Table-7 Test organisms

GRAM POSITIVE	GRAM NEGATIVE
<i>Staphylococcus aureus</i> *	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Streptococcus mits</i>	<i>Escherichia coli</i> *
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aerobacter aerogenes</i>
FUNGI	YEASTS
<i>Aspergillus niger</i> *	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Candida albicans</i> *
<i>Alternaria solani</i>	

Wedderburn (1964)

* USP XVIII (1970) にも含まれている菌種

を異にする), 24~48 時間培養後, 接種菌の発育程度により判別する。なおこの場合の対照はイ) の場合は防腐剤の入らないものを, またロ) の場合は防腐剤の入らない製品の同希釈液とする。

一般細菌は通常 $10^4 \sim 10^5$ 個/ml を 1 ml 接種, 真菌の場合は斜面寒天培養から 1 白金耳を 5 ml の懸濁液にて孢子懸濁液を調製し, その 1 白金耳量をそれぞれに接種する。接種菌量は随時適当にかえて行なう。これは接種菌量によっては得られる結果もことなるからである。

ハ) 希釈液: リン酸緩衝食塩水または試験に用いる液体培地を用いる。

ニ) 培地: 普通ブイヨン, Trypticase Soy Broth, Brain Heart Infusion Broth, 合成培地 (それぞれの菌株に合った培地を選ぶ), 真菌の場合は主として日局第 8 改正真菌用液体培地あるいは Sabouroud Broth が用いられる。

ホ) その他: この試験で対照となる防腐剤単体の系ではそれに用いるが培地は通常その試験菌に合ったものが用いられるが, それは普通培地の場合培地成分によって防腐剤の作用が影響をうけることがあるからである。一方蛋白加製剤の場合はこれとは逆に培地に血清や卵等を入れた培地での対照実験が必要となる。しかし微生物の発育に敏感な pH は元来製品の pH に近づけたものが使用されるが, すべての試験菌にこれを適用することはできない。したがって個々の菌に対して至適に近づけることが必要である。接種菌は一般細菌の場合ブイヨン培養菌を遠沈操作により希釈液にて 3~4 回無菌的に洗い培地成分を除きかつ接種菌数を一定にする方法がとられている。なおこの方法は防腐剤と他の処方成分間との相関をみるのには便利である。

4.2 寒天培地法

この方法は寒天が基礎をなしている関係上防腐剤の活

性が若干低くあらわれる可能性があるとしてされている。Foter(1950)¹³⁾ら。これはある種の防腐剤が寒天による物理的吸着現象の結果活性低下を起すことによるものと考えられているが拡散しやすい物質が製品中に共存している場合は, その阻止帯はあまり意味がない。また防腐剤単体の抗菌性を評価する場合はよいとしても防腐剤と他の成分間の相関関係を理解するためには不都合である。

4.2.1 カップ法

この方法は日本抗生物質医薬品基準 (1967)¹⁹⁾ にその詳細が規定されているので参考にするといよい。しかし化粧品の場合は製品の性質上, 抗生物質とは若干異なる所もあるので簡単に記してみたい。

イ) 菌液の調製

斜面培養菌を種菌として液体培地 10 ml に少量 (白金耳あるいは白金線にて) 移植して 30~37°C, 18~24 時間培養し菌液とする。この菌液 1~2 ml をすでに溶かして (寒天培地) 48~53°C に保温されている寒天培地 100 ml に加え, よく混和して試験菌液とする。

ロ) カップ用寒天平板

シャーレ (通常内径 90 mm) に寒天培地 20 ml を分注して均等にかたまらせて平板とする。これにイ) の試験菌液 4 ml を平らに重層するように分注してかたまらせる。カップ (外径 7.9~8.1 mm, 内径 5.9~6.1 mm, 高さ 9.9~10.1 mm) を適当数 (抗生物質の場合は 4 ケ) を等間隔になるように置き平板とする。

ハ) 検体の調製

製品そのまま, あるいは適当な希釈液をカップ内に気泡の入らないように満たす。また対照としては製品に添加された防腐剤の濃度を対照として用いる。

ニ) 培養

カップを立てたまま 30~37°C, 18~24 時間培養した後阻止帯の径を測定して比較検討する。

4.2.2 重層法

4.2.1~イ) の試験菌液を小試験管に適量分注しその上に検体 (場合によっては希釈液) を重層して 30~37°C, 18~24 時間培地した後阻止帯の長さを比較検討する。

4.2.3 比濁法

この方法は製品に添加される防腐剤単体の抗菌活性をみるのにはよいが製品中での防腐効果を評価するのには不都合である。また完全発育阻止を必要としないような場合にはよい方法で液体培地に一定濃度の被検液を入れて 30~37°C で静置培養あるいは振盪培養 (多くは後者が利用されている) により一定時間後の発育の濁度を比濁計を用いて (ブイヨン培養の場合は波長 650 mμ における) 吸光度を測定する。この方法は精度は高いし短時

間で結果が出せる利点はあるが、はじめから被検液に濁りのある検体には不適当である。

操作は斜面培養で 30~37°C, 18~24時間培養しこれよりごく少量を 10 ml の液体培地に接種して30~37°C, 18~24時間培養したものを菌液とする。次に防腐剤加液体培地 9.9 ml にその菌液 0.1 ml を接種して静置あるいは振盪培養にうつる。培養は 30~37°C で行なうが測定時間は通常30分または1時間間隔とし、これを対数に読みかえることによりプロットするとその増殖曲線がえられる。この曲線の状態により防腐剤の抗菌作用が細胞分裂のどのような発育期例えば誘導期、対数期あるいは定常期等のいずれで作用を発揮するかがわかる。しかし正確には各使用菌株によってそれぞれの条件を異にする。たとえば振盪培養の場合は振幅、振盪回数、温度、培地、接種菌量等により得られる結果も異なってくるがゆえに一定条件下での成績を求めるようにしなければならない。

Gain (1947)³⁶⁾ らは第4級アンモニウム塩の殺菌効果を簡易急速測定法として比濁計を利用した報告をしているが Wailes (1962)³⁸⁾ はマノメーター法についての報告をしている。この方法は従来のワールブルグ検圧計を利用したもので防腐剤の試験としては短時間で結果が読みとれる利点はあるが、その操作において技術的問題が関与することに留意しなければならない。

防腐剤の効果を評価するには上記のいずれか1つの方法だけにたよることは危険であって少なくとも2~3の方法による判別を行なうべきである。通常変敗を起す微生物はその種類のうへでは真菌よりも細菌の方がはるかに多い。しかし乳剤を例にみれば一般細菌は肉眼的にその発育を発見することはできないが真菌とくにカビはその限りでない。またこれを発育に要する日数からみれば製品に含まれる成分あるいは製造環境によっても異なるが一般細菌は比較的短時日で増殖するのに対しカビは長い潜伏期間後に肉眼で見える程度に繁殖して来る。したがってでき上がった製品の防腐試験においても普通防腐剤添加製品と無添加製品との比較試験が必要となってくる。あるいはこれに貯蔵試験(常温、苛酷試験)を行なうべきである。次に接種試験を行なうのも1法である。それはある一定期間後にもしも菌を接種した製品であるならば、その発育により菌が増えているか、否か、または接種菌数に対比して減少しているか、否かの2通りの方法で検討してみるのである。一方試験菌を接種しない製品では製造後菌が汚染されているか否かの経時変化も同時に究明しなければならないと思われる。

なお化粧品品質基準(1967)¹¹⁾において規定されている

品目中で主に防腐剤に関与すると思われるものを選び著者が寒天平板法で行なった抗菌活性値を参考までに Table-8 に示した(1971)³⁸⁾。

すなわちこの表からもわかるように試験菌によっては数 $\mu\text{g/ml}$ で発育阻止作用のみられる化合物も緑膿菌に対してはほとんどの化合物が約 100~1000 倍以上の高濃度を必要とし、化合物単体で広いスペクトルをもったものはみあたらないことが1目でわかる。しかしこの活性値も試験法およびその作用条件をかえることによって、またその活性値に変動を生ずることはいうまでもない。

5. む す び

化粧品の微生物汚染がどのようにして起るのかについては、まず製品に使用される材料からすべて無菌的操作のもとで衛生的に製造されているかどうかにかかってくる。しかしその製造にあたっては各社が秘伝とも思われる方法で極秘の研究にたよっている現状ではその実態をつかむことは困難で使用者側にあたえる不安も解消することはできない。

最近 Wolven (1971)³⁹⁾ は FDA における化粧品に関する会合での報告で多くの忠告をしている。その主たるものは消費者の場に立って製品を考え製造することにあるとしている。たとえば防腐剤についてみれば多くの種類をもつ化粧品それぞれに少なくとも5種類の微生物を用いて研究をすべきであるし、また同時に製造後2つのことなる温度条件で28日間の経時変化および毒性試験を行なうべきであるとしている。もちろん製品中に病原菌を発見してはならないことはいうまでもないが、この他に非刺激性、非感作性、処方成分と適合性であること、抗菌活性に広いスペクトルをもつこと、安全性、製品の色や臭に影響を与えないこと等をあげている。また防腐剤を抗菌性の面からみると次のようなことが考えられる。

1) 防腐剤が化粧品中の成分あるいは微生物の死菌成分と反応して不活性な複合体を作り防腐剤の有効濃度が本質的に減少する。

2) 微生物の発育による過程で防腐剤が不活性な形に変化するために有効濃度が減少する。

3) 微生物の発育にともない製剤中の pH が変化し防腐剤の解離状態が変化して活性が低下する場合。

4) 防腐剤に抵抗性の変異菌の出現とその増殖による防腐剤の活性低下

いずれにしても化粧品中に微生物汚染を起させないような配慮を望むところであるが、本来無菌性を要求することはコスト面からいって無理と思われる。それでわが

Table-8 AntiMicrobial Activity of preservatives used in Cosmetics

Microorganisms	Bacteria				Fungi			
	S. aureus FDA 209P.	E. coli U5/41	B. subtilis IAM 1213	Ps-aeruginosa P ₂	C. albicans NHL 4019	Geo. Candidum SL-1	Asp. niger NHL 5088	Tri. asteroides des T-14
compounds								
Benzoic acid	1,000	1,000	1,000	1,000	—	—	—	—
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	1,000<	1,000<	1,000<	1,000<	—	—	—	—
<i>p</i> -Oxybenzoic acid ethyl ester	2,000	2,000	2,000	2,000	—	—	—	—
" methyl ester	2,000	1,000	2,000	2,000	—	—	—	—
" propyl ester	1,000	1,000	1,000	2,000<	—	—	—	—
" benzyl ester	1,000	2,000	1,000	2,000	—	—	—	—
" butyl ester	1,000	1,000	1,000	2,000<	—	—	—	—
Salicylic acid	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000<	1,000<	1,000<	1,000
Phenol	2,000	2,000	2,000	2,000	1,000<	1,000<	1,000	1,000
Sorbic acid	2,000	1,000	2,000	1,000	1,000	1,000<	1,000	500
Dehydroacetic acid	2,000	2,000	2,000	2,000	500>	500>	500>	500>
Sodium dehydroacetate	8,000	8,000	8,000	10,000<	500>	1,000<	1,000>	500>
Hexachlorophene	1	100	1	20	—	—	—	—
Boric acid	5,000	5,000	5,000	5,000	—	—	—	—
Resorcin	5,000	5,000	5,000	5,000	1,000<	1,000<	1,000<	1,000>
Isopropyl methyl phenol	200	500	200	2,000	500	200	500	100
Benzalkonium Chloride	5	200	5	500	200	200	500	200
Chlorhexidine	5	5	2	500	500	100	500	500
Alkyl isoquinolinium bromide	5	200	5	1,000	200	200	200	200
3, 4, 4'-Trichlorocarbanilide	1	2,000<	1	2,000<	1,000<	1,000<	1,000<	200
4, 4'-Dichloro-3-(trifluoromethyl) carbanilide	1	2,000<	1	2,000<	1,000<	1,000<	1,000<	100
2-Hydroxydiphenyl	200	200	200	500	200	100	200	100
Zinc- <i>p</i> -phenolsulfonate	2,000	2,000	2,000	5,000	—	—	—	—

1) Numerals in the table indicate the minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g/ml}$)

国では眼軟膏において50個以下と現在規定されており、また欧米では100個以下の生菌数が要求されている。したがって著者も便宜的にこれら数値以下の生菌数であってほしいことを提案したい。また著者は化粧品関係の製品ではとくに一般生菌数の外にグラム陽性菌としてブドウ球菌、グラム陰性菌として緑膿菌を汚染菌の指標としてはと考えている。それは化学物質による抵抗性の問題で一般にブドウ球菌は弱い、緑膿菌はかなり抵抗性が強いことを強調しておきたい。しかしながら微生物の試験は化学試験が器械で処理されるのとことなり人為的に操作することと永年の経験と知識をもととした判断によらざるをえない困難さがある。しかし最近の化粧品中の化学物質の安全性に対する世論の注目もさることながら微生物汚染の問題もここであらためて注目をしておく必要があると思われる。そこで注意しなければならないことは防腐剤をあまり過大評価することはさけ、あくまで2次汚染の防腐に対してのみその使用目的をおくべきであると結論したい。

文 献

- 1) FDA papers; 4 (No. 2) 21 (1970)
- 2) Knüsel, F., Hess, H. K., and Lim, W., Proc. Eurp. Soc. for the Study Drug toxicity., 10, 139 (1969)
- 3) Tenenbaum, S., Am. perfumer and Cosmetic., 86, 33 (1971)
- 4) Noble, W. C., Lancet., 1, 347 (1966)
- 5) Ayliffe, G. A. J., Lowburg, E. J. L., Hamilton, J. G., Small, J. A., Asheshow, E. A., and Parker; M. T., Lancet., 11, 365 (1965)
- 6) Barker, J. H., J. Soc. cosmet. Chem., 10, 133, (1959)
- 7) Schiller, I., Kuntscher, H., Wolff, A., and Nekola, M., App. Microbiol., Dec. 1924 (1968)
- 8) De Navarre., Am. perfumer and cosmetic., 84, 22 (1969)
- 9) Alquire, D. E., Am. perfumer and Cosmetic., 85, 31 (1970)
- 10) Davis, J. G., J. pharm., Lond. Suppl. 12, 29 T (1960)
- 11) 化粧品品質基準・厚生省告示第321号, p. 6 (1967)
- 12) Wedderburn, D. L., Ad. pharmaceut. Sci., 1, 195 (1964)
- 13) Foter, M. J., and Nisonger, L. L., Ann. New York Acad. Sci., 53, 112 (1950)
- 14) Stearman, R. L., Bact. Rev., 19, 160 (1955)
- 15) Norris, J. R., and Ribbons, D. W., Methods in Microbiology., 1, 593 Academic press London & New York (1969)
- 16) 植村定次郎, 福見秀雄, 柳田友道, 微生物生理学, p. 138., 朝倉書店 (1960)
- 17) Postgate, J. R., Methods in Microbiology., 1, 611., Academic press London & New York (1969)
- 18) 衛生検査指針 (Ⅲ) 厚生省, p. 131 協同医書出版社 (1950)
- 19) 日本抗生物質医薬品基準・厚生省, p. 468 (1969)
- 20) Woodward, C. R., and Mc Namara, T. F., Am. perfumer and Cosmetic., 86, 29 (1971)
- 21) USP., XVIII, p. 849, p. 853 (1970)
- 22) N. F., XII, p. 958 (1970)
- 23) 岩原繁雄, Medical apparatus Culture., 11, 16 (1970)
- 24) 日本薬局方第7改正第1部解説書, p. B-110 広川書店 (1961)
- 25) BBL Manual of Products and Laboratory procedures., 5th Ed. (1968)
- 26) Lawrence, C. A., Ann. New. York. Acad. Sci., 53, 66 (1950)
- 27) Lawrence, C. A., Soap. perfumery and cosmetic., 27, 369 (1954)
- 28) Quisno, R. A., Gibby., I. W., and Fother, M. J., J. Am. Pharmaceutical Assoc., 35, 317 (1946)
- 29) Klärman, G. G., and Wright, E. S., Am. J. Pharmacy., 120, 1 (1948)
- 30) Brown, M. R. W., and Richards, R. M. E., J. pharm. pharmacol., 16, 41T (1964)
- 31) 青木大, 鎌田皎, 松崎藤一郎, 中谷治実, 薬学雑誌 77, 410 (1957)
- 32) Gucklhorn, I. R., Manufacturing Chemist & Aerosol News., Second Series part 1, 44 (1970)
- 33) Croshaw, B., Groves, M. J., and Lessel, B., J. pharm. pharmacol., 16, 127 (1964)
- 34) Schuster, G., and Modde, H. K., Am. perfumer and cosmetic., 86, 37 (1971)
- 35) Klarmann, E. G., Am. J. pharmacy., 128, 1 (1956)
- 36) Gain, J. F., and Lawrence, C. A., Science., 106, 525 (1947)
- 37) Wailes, J. L., J. pharm. Sci., 51, 165 (1962)
- 38) 石関忠一; 衛生試験所報告, 89投稿中 (1971)
- 39) Wolven, A., Am. perfumer and Cosmetic., 86, 47 (1971)