

化粧品用パフから分離される細菌類について

山本 直子 荒木 裕子 丸井 正樹

Isolation and Characterization of Bacteria from Powder-Puffs

NAOKO YAMAMOTO, HIROKO ARAKI and MASAKI MARUI

One hundred forty-nine strains of bacteria were isolated from 24 powder-puffs used daily by 24 female students. All the powder-puffs had some bacteria which grew on Soybean-Casein-Digest-Lecithin-Polysorbate 80 broth agar medium. Six powder-puffs had many bacteria of more than 1000 colony forming unit per 1 ml of powder-puff washing. Bacteria including genus *Staphylococcus*, genus *Micrococcus* and genus *Bacillus* were isolated, of which common species were *S.epidermidis* and *B.subtilis* or *B.pumilus*. The incidence of *S.aureus* was as low as 7 strains in 149 ones.

化粧品用パフは多くの女性が日常使用しており、化粧品同様直接皮膚に接触するものである。使用中の化粧品用パフは化粧品が付着しており、そのまま保管されるため、微生物が増殖しやすい状態にある。

ヒトの皮膚には常在菌が存在し、また化粧品も無菌ではない。これらの菌が化粧品用パフで増菌することも考えられ、その場合、衛生面に留意する必要がある。皮膚の常在菌叢や化粧品の汚染微生物についての報告はあるが^{3,6,9,10}、化粧品用パフの微生物については報告された例がほとんど見当たらない。そこで健康な女子の使用中の化粧品用パフの細菌類について調べたので報告する。

実験方法

化粧品用パフの細菌検査法については、化粧品では、衛生管理規制対象として確立された方法があるが、化粧品用パフのような補助用具

は対象外となり公定法はない。それ故、今回は化粧品の微生物試験法⁹⁾に準じて行った。

1. 供試材料の調製

化粧品用パフは本学学生(年齢18-20才)24名を対象として、日常使用しているもの(平均48×52×8mm, 3社の製品)24個を用い、1990年9-10月に実施した。

化粧品用パフは滅菌済みのシャーレ(直径9cm)に入れ、これに滅菌生理食塩水10mlを加え、ピンセットを用いて、化粧品用パフ内の菌を充分にもみ出したものを供試液とした。

2. 分離培地および培養法

培地は、生菌数測定用として 1)化粧品に添加されている防腐・殺菌剤を不活化するレシチンおよびポリソルベート80を含む医薬品・化粧品検査用のSCDLPブイヨン培地⁷⁾“栄研”(Soybean-Casein-Digest-Lecithin-Polysorbate 80 Broth)に1.5%寒天を添加したものを、選択培地として 2)マン

Key words : powder-puffs, bacteria.

表1. 3培地から分離された生菌数と検体数

培地	検体数	供試液 1 mlから分離された生菌数				
		0	10-100	101-1,000	1,001-10,000	10,001<
S C D L P培地	24	0	11	7	3	3
デスオキシコーレイト培地	24	21	1	0	0	2
M S E Y培地	24	5	8	4	4	3

ニット食塩培地“栄研”に卵黄を添加したもの (M S E Y培地) と 3) デスオキシコーレイト培地“栄研”を用いた。前項の供試液0.1mlを上記の3種類の寒天培地に滴下し、コンラージ棒を用いて培地一面に塗布し、37°Cで好氣的に48時間培養し、さらに室温で24時間放置後に観察した。

3. 分離菌株の同定

上記3種類の培地に発育したコロニーは大きさ、色などの形態の異なるごとにそれぞれを釣菌してトリプトソイ寒天培地“栄研”で純培養した。これらの菌株は、グラム染色と菌形を検査したのち、それぞれについて Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986年) と CDC のデータ¹¹⁾の生化学的性状試験項目から適当なものを選び、以下の方法で同定を行った。

1) グラム陽性桿菌：顕微鏡検査による芽胞の有無を調べたのち、有芽胞株については嫌氣的発育試験、レシチナーゼ反応、7.5%食塩耐性試験、マンニット分解試験、V P 反応 (V P 半流動培地)、クエン酸塩利用能試験 (シモンズ・クエン酸ナトリウム培地) を行った。

2) グラム陽性球菌：変法オキシダーゼ試験、⁴⁾カタラーゼ試験、グルコース発酵試験¹⁴⁾ (G F培地) により Micrococcus 属と Staphylococcus 属とに分け、Staphylococcus 属については7.5%食塩耐性試験、マンニット分解試験、卵黄反応試験、コアグラール反応試験を行った。また、ノボビオシン感受性試験 (5 µg/disk, Difco) についても検査した。

3) グラム陰性桿菌：オキシダーゼ試験 (チトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙“ニッス

イ”)、カタラーゼ試験、O F 試験、グルコース・ラクトース・シュクロースの分解およびガス産生試験 (T S I 培地)、運動性試験 (S I M培地)、硫化水素産生性試験 (T S I 培地およびS I M培地)、クエン酸塩利用能試験、インドールの生成試験 (S I M培地)、V P 反応、メチルレッド試験 (ペプトン培地) を行った。

実験結果

1. 生菌数

化粧用パフ24検体の生菌数の結果は、表1に示すように、S C D L P培地においてすべての検体から菌が検出された。24検体中18検体 (75%) の供試液1mlから分離された生菌数は1,000個以下であったが、1,001個以上の菌数を有するものが6検体もあった。

2. 分離株の同定

分離株149株は、グラム染色性とその菌形から、有芽胞グラム陽性桿菌56株 (19検体) とグラム陽性球菌78株 (21検体) が大部分を占めており、グラム陰性桿菌は、10株 (3検体) 分離されたのみであった。(表2) その他の5株は顕微鏡による菌形から酵母類と推定された。

表2. 24検体から分離された149株の細菌の菌形

菌の形態	検体	株	分離頻度 (%)
グラム陽性球菌	21	78	52
グラム陽性桿菌 (有芽胞)	19	56	38
グラム陰性桿菌	3	10	7
その他	5	5	3
計		149	100

表3. 分離された Bacillus 属の生化学的性状

性状試験	群 別	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
嫌気的条件下での発育		-	-	-	+	+	+	+	+
VP		+	-	-	-	+	-	+	+
マンニット分解		+	+	d	+	-	-	-	+
クエン酸塩利用		d	-	+	+	-	-	+	+
卵黄反応		-	-	-	-	-	-	-	-
7.5%食塩耐性		+	d	d	+	+	-	-	+
株 数		44	5	2	1	1	1	1	1

+ : 90%以上, d : 89-11%, - : 10%以下.

I *Bacillus subtilis*: *B. pumilus* 群 II *B. firmus*; *B. lentus* 群 III *B. megaterium*

1) グラム陽性桿菌

グラム陽性桿菌56株はすべて芽胞が観察されたので、*Bacillus*属の同定法に従った。生化学的性状試験の成績を表3に示した。嫌気的発育陰性のものが51株で、嫌気的発育陽性のものが5株認められた。嫌気的発育陰性の51株のうち44株は *Bacillus subtilis* または *B. pumilus* であり、残り7株は、*B. firmus* または *B. lentus* が5株、*B. megaterium* が2株であった。嫌気的発育陽性の5株はそれぞれの性状が異なるもの1株ずつであり、未同定株とした。

2) グラム陽性球菌

グラム陽性球菌は21検体から78株得られ、変法オキシダーゼ試験およびグルコース発酵試験により54株が *Staphylococcus* 属、22株が *Micrococcus* 属であった。他の2株は同定できなかった。 *Staphylococcus* 属については表4に示すように3つのグループに分けられた。III群の7株はマンニット分解試験陽性、卵黄反応陽性、コアグラゼ反応陽性であったことから *Staphylococcus aureus* であり、これらは2検体から得られた。コアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) は、マンニットの分解性により I 群31株、II群16株に分けられた。ノボピオシン感受性試験の結果は *Staphylococcus* 属全株が感受性であった。22株の *Micrococcus* 属については種の同定を行わなかった。

3) グラム陰性桿菌

3検体から分離されたグラム陰性桿菌10株のうち4株はカタラーゼ活性陽性、オキシダーゼ活性陰性、OFテスト F (Fermentative) で腸内細菌科であり、その4株は *Escherichia coli* 1株、*Klebsiella oxytoca* 1株、*Klebsiella aerogenes* 2株であった。また、10株のうち1株はカタラーゼ活性陽性、オキシダーゼ活性陽性、OFテスト F であり、腸内細菌以外の菌と同定した。残りの5株は継代培養中に死滅したため同定不能であった。

表4. 分離された *Staphylococcus* 属54株の生化学的性状

性状試験	群 別	I	II	III (<i>S.aureus</i>)
カタラーゼ		+	+	+
オキシダーゼ		-	-	-
ブドウ糖 (酸)		F	F	F
マンニット分解		-	+	+
7.5%食塩耐性		+	+	+
卵黄反応		-	-	+
コアグラゼ		-	-	+
ノボピオシン耐性		-	-	-
株 数		31	16	7

考 察

化粧品は各種の有機物、無機物、乳化物質などを含んでおり、微生物の菌種によっては好ましい栄養源となる故に、保存剤が有効でないと、菌の増殖が起こることが知られている。化粧用パフは化粧品そのものではないが、使用后、その表面および内部に化粧品が残存する時は、化粧品と同様に条件さえ良ければ、微生物が増殖すると推測できる。このことは、化粧用パフに皮膚上の微生物が移行することを、また、化粧用パフから皮膚に微生物が移行することを示唆する。

本実験の成績では、使用後のすべての化粧用パフから菌が検出されており、またその細菌数は、供試液1ml中1,000個以上を示したものが25% (24検体中6検体) あった。これらの数値に関しては、比較できる化粧用パフの報告がないが、かなり汚染されていると考えられる。化粧品では、微生物管理の基準値(自主基準)を1,000個未満/g (ml) と定めている⁹⁾。化粧用パフの衛生度を示す基準値(洗浄液あるいは面積当たりの菌数)についても、今後検討する必要があると思われる。つぎに汚染菌種についてみると、分離株の大部分がグラム陽性球菌類と有芽胞グラム陽性桿菌類によって占められていた。Wilsonら¹⁵⁾は、女子の眼周辺部の微生物とその女子の使用していた化粧品の汚染微生物は菌種の一致を示したという。ヒトの皮膚常在菌叢の報告によると、頬部¹³⁾および前額部⁶⁾ではCNS (coagulase negative Staphylococcus) の*S. epidermidis*が多数を占めているので、本報のStaphylococcus属のI群31株は、その生化学的性状を既報のデータ^{1,2,11)}とも比較したところ、*S. epidermidis*である可能性が高い。*B. subtilis*は化粧品^{12,15)}やヒトの皮膚からしばしば分離されている。*S. aureus*は2検体から分離されたが、本菌は化粧品の特定菌(病原細菌)の一つに指定され¹²⁾、また一方食中毒菌としても重要な菌種であるので、少数例ではあるが重要視したい。

化粧用パフから分離される微生物は、パフの製造工程で混入したものと使用後の二次汚染があるので、両者を考えた汚染防止対策が重要となろう。

要 約

本学学生の使用中の化粧用パフ24検体に存在する細菌類について調べた。

1. 全ての検体から細菌類が検出され、供試液1mlから分離された生菌数1,000個以上が6検体(25%) あったことから、化粧用パフはかなり微生物汚染されていることがわかった。
2. 149株が分離されたが、グラム陽性桿菌の*Bacillus subtilis*または*B. pumilus* (44株)とグラム陽性球菌のStaphylococcus属 (54株) およびMicrococcus属 (22株)が大部分を占めていた。その他にグラム陰性桿菌が10株認められた。
3. Staphylococcus属の中には*S. aureus*が2検体から7株分離された。
4. 検出された菌数および分離株の由来について考察を行なった。

終わりに臨み懇篤なる指導と校閲の労をとられた本学非常勤講師跡部ヒサエ博士に心から拝謝します。

文 献

- 1) 荒田次郎：西日皮膚，50，108 (1988)。
- 2) 荒田次郎：西日皮膚，50，303 (1988)。
- 3) 朝田康夫：臨床細菌学，講義編，小沢 敦他編，講談社 (東京)，p.71 (1977)。
- 4) FALLER, A. and SHLEIFER, K.H.: J. Clin. Microbiol., 13, 1031 (1981)。
- 5) 伊藤芳和，小林正人，小野正宏：防菌防黴，17，35 (1989)。
- 6) 木村雅行，山田弘生，平木吉夫，徳田安章：日皮会誌，96，103 (1986)。
- 7) 厚生省：内用液剤およびX線造影剤の菌数の限度および試験法について，薬発297号，1976年4月1日。
- 8) 倉田浩，石関忠一，宇田川俊一：医薬品・

- 化粧品の微生物試験法, 講談社サイエンティフィック, p.167 (1977).
- 9) NOBLE, W.C.: Microbiology of human skin, Lloyd Luke, London, p.168 (1981).
- 10) NOBLE, W.C.: J. Med. Microbiol., 17, 1 (1984).
- 11) 坂崎利一, 吉崎悦郎訳: グラム陽性菌の同定, 医典社, (1984).
- 12) 瀬戸尚典: 微生物の分離法, 山里一英編, R&Dプランニング, p.392 (1986).
- 13) 浦田裕次, 森 俊二, 渡辺邦友, 上野一恵: 岐阜大医紀, 33, 478 (1985).
- 14) 潮田弘, 辻明良, 小川正俊, 五島瑳智子, 坂井千三: 日細誌, 35, 753, (1980).
- 15) WILSON, L.A., KUEHN, J.W., HALL, S.W. and AHEARN, D.G.: Am. J. Ophthalmol., 71, 1928 (1971).
-