

「第52回年次大会に参加して」

小川 廣幸

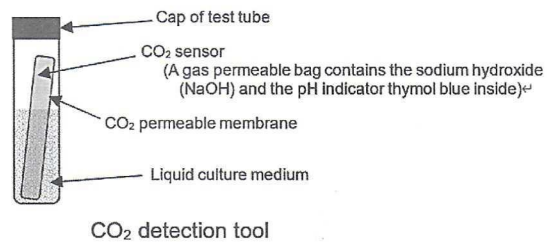
日本防菌防黴学会の第52回年次大会は、三重県の賢島で開催された3日間の学会でした。今回の学会シンポジウム4は、「微生物試験・防腐力試験迅速化の最前線」をテーマにしています。実行委員会から参加を依頼されています。当社は、微生物検出キットと微生物検出装置を製造・販売しているのですが、いずれもオリジナル製品です。これらの製品を防腐力（化粧品などの）の効果の確認に適用したとき、極めて確実に結果が把握できることから、今回は、「防腐力試験の迅速化の提案」として、シンポジウムでプレゼンテーションをしています。

日本薬局方（JP）が規定している保存効力試験ですが、試料に含まれる防腐剤の効力を、寒天培地で試料を培養しながら、長期間（例えば、7日間）に渡り、微生物によるコロニーの出現を観察しながら確認していく作業になります。これは、人手による目視検査で労力の要するたいへんな作業であるためなのか、チャレンジテストと呼ばれています。当社の微生物検出装置は、PMDA（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）が規定・分類しているマイクロコロニー法の装置で、農学分野と工学分野のクロスオーバーなのです。ミクロンサイズの微小コロニー（立体影像）を生菌として確実に検出するため、増殖能を確認した上で検出する複数のオリジナル画像解

析アルゴリズムを駆使した、ハイテクの全自動検出装置です。（目視検査よりも、生菌検出・計数が速くて正確です。）

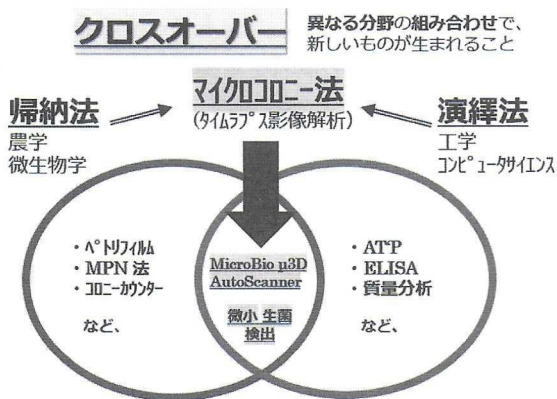
しかしながら、なぜ保存効力試験の実施がたいへんなのかは、微生物増殖を抑制する効果を、“コロニーの出現を検出する”ことにより確認しているからなのです。そして、この試験は防腐力を把握するためのものではなく、この防腐剤を使用して保存したとき、その効果はどうか、を把握するためのものなのです。

そこで、このシンポジウムで、防腐力試験を速く、確実に把握できる方法として、検査キットを使用することを紹介しています。この検査キットもクロスオーバーで、見かけによらず、凶らずもハイテク法のものなのです。密閉した試験管に培養液とCO₂センサーが入っているシンプルな用具で、フタを開けて試料を添加して、フタを閉め、培養するだけの検査キットなのですが、試料を添加して試験管を密閉した後は、自己増殖以外に内部の微生物を増殖させる要因はないのです。微生物の増殖と世代時間は、内部の微生物が生成するCO₂の量に直接関係していますので、時間tにおける微生物の数をn(t)としますと、n(t)は微分方程式 $\frac{dn(t)}{dt} = \gamma n(t)$ を満たしています。ここでγを1時間あたりの増加率とし、2分裂の世代時間をβとしますと、 $\gamma = \ln 2 / \beta$ であり、n₀を微生物の初期数とすれば、微分方程式の解は、 $n(t) = n_0 2^{\frac{t}{\beta}}$ となります。これは、この検査キットのbinary fission（2分裂増殖）を数値解析したものです。この検査キットは、*Escherichia coli*が35℃で培養されたとき、10⁰乗の初期菌数の試料が12時間程度でセンサーが反応するように、反応時間Tを設定しています。



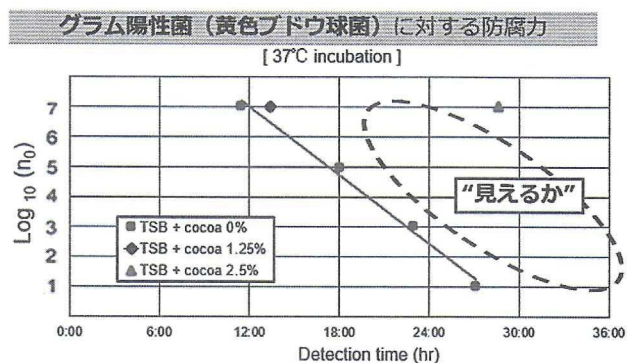
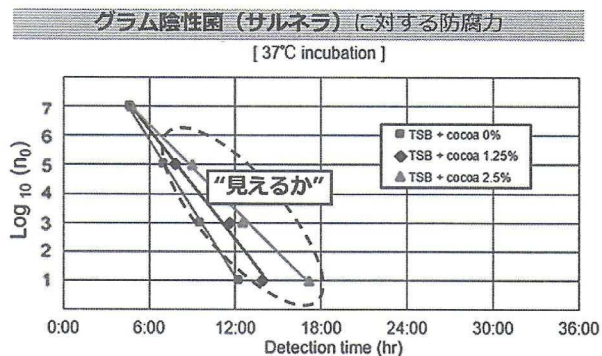
コントロールの菌希釈系列と、培養液に防腐剤（化粧品など）を添加したものに菌希釈系列を培養して、CO₂検出時間を横軸に初期菌数を縦軸に表した指数関数グラフに、各検出グラフをスーパーインポーズすると、抑制されたものが“見えるか”できます。

（防腐効力試験（チャレンジテスト）は、指定された



4 菌種（細菌）について、48時間で防腐力が確認できます。）

（*Aspergillus brasiliensis*（真菌）は、孢子（分生子）による無性生殖で増殖しますし、液体培地での培養では増殖が遅いので、好気性菌用の検査キットが用意されています。細菌同様真菌も48時間で防腐力が確認できます。）



防腐力は、検査キットを使用すれば、効果は容易に確認できるので、防腐剤の濃度などは、適切に設定できます。基本的に防腐剤は殺菌剤ということですので、菌の細胞壁の造り（グラム陰性か、グラム陽性か、）が大きく関係してきます。防腐剤の適切な濃度設定は、比較的容易にできるのです。

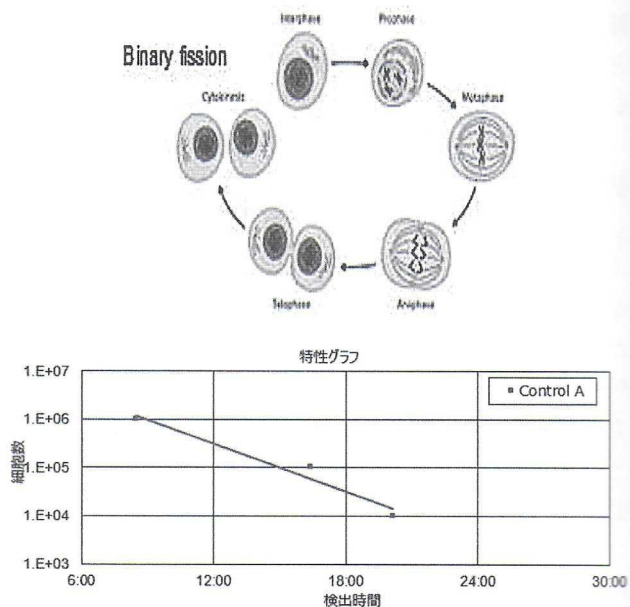
チャレンジテストは、化粧品に含まれる防腐剤の防腐力を調べるため、一定数の細菌・真菌を化粧品に混入させて、その数を経時的測定（7日など）して防腐剤の適正量について評価を行うものです。当社の微生物検出装置は、PMDAが指定するマイクロコロニー法を実施する装置であり、正確な生菌数の計数を実施できます。そして、シンポジウムでの提案は、防腐剤の適正量が設定されていることを、この装置で、チャレンジテストを自動化し、ラクに正確に（＝迅速に）、保存力を確認する、という提案していたのでした。

今回の学会シンポジウムでのプレゼンテーションを機に、センシメディア内での binary fission の格式の導出

を再確認してみました。検出時間 T は、微生物（細菌）に設定してあったのです。細菌も細胞も、一つの式として導出されますが、細胞の場合は、世代交代時間 β が約 24 時間とされているのですが、反応時間 T は、24 時間以内だったのです。導出された細胞の binary fission の式は、 $n_0 = \frac{A}{a} \frac{1}{T}$ ですので、セルサイクル中の代謝の数値化ができたこととなります。しかしながら、ど～も、世界的に、セルサイクル中でのセル代謝の数値化ができていないようなのです。

（※ a は、細胞 1 時間あたりに生成する CO₂量。細胞が生成する CO₂の総量が A モルに達した時に CO₂センサーが反応する時間を T としています。）

ご参考のページは、細胞に与える防腐剤の影響がグラフ表示できた、ということの説明するためのものでした。



上皮細胞などを使用して、コントロールの希釈系列と防腐剤（化粧品など）の試料を培養液に添加した希釈系列を培養したもののグラフを作成したとき、表示に差異がなければ、細胞の増殖に悪影響がなかったことを、意味しています。

化粧品の防腐効力試験について、迅速化の検討していたときに、細胞（上皮細胞）への防腐剤の影響が数値で分かるようになったので、[ご参考](#)、ということ、プレゼンテーションでカンタンに触れていましたが、これは、細胞のセルサイクル中の代謝を数値化したことを紹介しているのです。（この CO₂を検出する検査キットは、当社しか製造していないのです。（世界的に））しかし、Binary fission は、細胞と細菌が増殖する形態ですので、

学会の「防菌」分野の「守備範囲」だったように思われました。それでも、「日本」防菌防黴学会で、世界的な知見をさりげなく日本語で触れてしまっているのです。

今回、シンポジウムに参加させていただいた結果、思ったのですが、日本防菌防黴学会が、防菌防黴学会となって、当学会で発表された日本語の論文も自動的に英語の論文となって、Journal of Microorganism Controlの学術誌に accept されるレベルとして、世界的に発信

されるようなシステムを持つ学会であれば、防菌防黴の研究者の皆さまにとって、論文投稿にチャレンジし易いのではないのでしょうか。「ChatGPT」、「Google 翻訳」、「DeepL 翻訳」など AI 翻訳が利用できるようになっていいる現状ですので、工夫すればそのような学会に転換できるのではないか、と愚考してならないのです。

(マイクロバイオ株) 小川廣幸