

クリーニングと公衆衛生に関する 研究報告書

第43巻

■ 平成28年度 ■

平成29年4月17日

クリーニングと公衆衛生に関する研究委員会
委員長

相澤好治

(北里大学名誉教授)

はじめに

委員長 相澤好治

北里大学名誉教授・日本繊維状物質研究協会理事長

早いもので今年も平成 28 (2016) 年度の「クリーニングと公衆衛生に関する研究」のご報告の時期となりました。変わらぬ会員の皆様のご理解とご支援をもちまして、本年度も数多くの成果をあげることが出来ました。まずは御礼申し上げます。今後共、変わらぬご支援を宜しくお願い申し上げます。2016 年度はインフルエンザなどの感染症の遷延、熊本地震からの復興などクリーニング業界として寄与していかなければならない課題があったことと同時に、電通の痛ましい過労自殺が社会問題となり、管理する側の責任が問われた一年でもありました。クリーニング業界として社会に寄与するだけでなく、クリーニング従事者の健康管理もきちんとしていかなければならない状況にあります。

クリーニング業には、清潔な環境を維持し感染症予防へ貢献する役割があります。クリーニング溶剤がどのようなメカニズムで細菌を排除するのかを知り、より効果的な殺菌法を追求していく必要があります。そのためには殺菌効果の把握法の確立も重要です。更に近年では溶剤以外に、より使用後の環境負荷が少ないと考えられる微酸性混和水を殺菌に用いる検討も始まっています。また細菌のみならず真菌（カビ）の除去は健康の面からも衣類自体の美しさを保持するためにも必要です。一方、溶剤を扱うクリーニング業に従事される方々の健康も重視しなければなりません。そのためにはクリーニングで使用されている溶剤が、皮膚に影響を及ぼすかどうかの解明は重要と言えます。またクリーニング業界の従事者全体として、日本人の死亡原因の第一位を占めている悪性新生物（がん）が過剰に起こっているかどうかを把握することは、今後のクリーニング従事者の健康推進のために必要です。

以上から、これまでの研究を踏まえつつ、今年度の研究課題が設定されました。

平成 28 年度は、

1. 繊維素材へのカビの吸着性

(高鳥浩介・NPO 法人カビ相談センター理事長)

2. ドライクリーニング用液体洗剤の抗菌活性機序の形態学的解析

(神谷 茂・杏林大学医学部感染症学講座教授)

3. クリーニング用洗剤あるいは溶剤で処理した後の生残菌の定量的検出

(三好伸一・岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授)

4. ドライクリーニング用石油系溶剤及びテトラクロロエチレンの皮膚障害：
ヒト不死化皮膚細胞 HaCaT を用いた細胞増殖及び炎症に関する検討
(角田正史・北里大学医学部衛生学准教授)
5. クリーニング業従事者の悪性新生物による過剰死亡の検討
(堤 明純・北里大学医学部公衆衛生学教授)
6. 芽胞汚染タオルに対する微酸性混和水による消毒効果の検討
(北里英郎・北里大学医療衛生学部微生物学教授)

以上6分野のテーマを設定し調査研究を行い、貴重な成果を得ることができました。これらの研究成果をクリーニング事業の現在、将来に反映できるような発信のひとつとして、この報告書が参考になれば幸いです。

今年度の本研究委員会の運営については、橋本博、篠田純男、本田武司、中村賢各先生を相談役とし、厚生労働省 医薬・生活衛生局 生活衛生・食品安全部 生活衛生課担当官のご助言を得て、研究の検討を行って参りました。

平成 28 年度研究課題と研究の概要

1. 繊維素材へのカビの吸着性（高鳥浩介理事長）

繊維にはカビが吸着しやすく、発育しやすいことが知られているが、実際にはカビが吸着しやすい繊維とそうでない繊維が存在している。衣類業界では、カビが吸着しやすい繊維は綿・毛およびキュプラ、カビが吸着し難い繊維は絹・ポリエステルおよびナイロンだとされるが、明確なデータや、カビが繊維に吸着する仕組みについては、明らかにされていない。そこで繊維へのカビによる吸着性を調べた。供試菌株は *Penicillium*、*Cladosporium*、*Fusarium*、*Aspergillus* 等の身近にあるカビを用いた。供試繊維は日本工業規格（JIS）で定められた綿、麻、毛（ウール）、絹、レーヨン、キュプラ、ナイロン、ポリエステルおよびアクリルの計9種類を用い、生菌数を測定し繊維に対するカビの吸着率を求めた。カビの吸着率が最も高かった繊維は、毛であった。それに対して吸着率が最も低かったのは絹、ナイロンであった。吸着率が最も高かったカビは、*Aspergillus ochraceus* SIY112 であった。それに対して、吸着率が最も低かったのは *Fusarium solani* SIY202 であった。吸着率の違いは繊維の性質や、カビの胞子の大きさおよび形状が関与しているものといえた。

2. ドライクリーニング用液体洗剤の抗菌活性機序の形態学的解析（神谷茂教授）

ドライクリーニングは、石油系溶媒やテトラクロロエチレンに界面活性剤（アニオン、カ

チオン、ノニオン)を添加してクリーニングを行っている。これらの界面活性剤には抗菌活性があるが、その抗菌活性の詳細を明らかにするため、洗剤接触時の2菌種の細菌を標的に走査型電子顕微鏡(SEM)による形態学的解析を行った。細菌株は*Bacillus cereus*、*Escherichia coli*の2菌種を用いた。カチオン系洗剤を実際のクリーニングの現場で使用されている濃度を基準に希釈し、細菌に10分間処理し、細菌の形態に関してSEM解析を行った。カチオン系洗剤を処理させた場合*B. cereus*、*E. coli*ともに形態に変化が確認された。形態学的な変化のあった菌数の割合を算定すると、*B. cereus*では対照群で0.8%であったが0.05%カチオン系洗剤で処理したサンプルは5.4%であった。*E. coli*では対照群で0.6%であったが同洗剤で処理したサンプルは15.1%であった。カチオン系洗剤は*B. cereus*、*E. coli*に対して形態学的変化をもたらすことが示唆された。カチオン系洗剤の抗菌活性はこの変化に起因すると考えられる。

3. クリーニング用洗剤あるいは溶剤で処理した後の生残菌の定量的検出(三好伸一教授)

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS:クリーニング用洗剤に含まれる界面活性剤)の殺菌作用を評価できる新定量法の開発を目的として、プロピジウムモノアジド(PMA:二本鎖DNAを永久的に修飾する光反応性色素)処理による死菌DNAの修飾を併用したリアルタイムPCR法(PMA-qPCR法)の開発について研究した。土壌から単離された*Pseudomonas sp.* NLA 4株(LAS感受性株)、*Pseudomonas sp.* NLA10株(LAS抵抗性株)を使用した。生菌試料は、各菌株をOD₆₀₀が1.0になるまで乾燥ブイヨンで培養して調製し、死菌試料は生菌試料を100℃で加熱処理して調製した。培養法での測定では、生菌あるいは死菌試料を2.0%LASで25℃、30分間処理し、暗所において、5分間の50μM PMA処理を行った。そして、LEDライト照射後、遠心操作によって未反応のPMAを除去し、生残細菌数を普通寒天プレートで測定した。qPCR法での測定では、PMA処理後の試料からDNAを精製した後、16S rDNAの保存領域を標的としたqPCRを行った。Ct値(PCR増幅産物がある一定量に達するまでのサイクル数)を算出した。NLA 4株では、LAS処理によって殆どの細胞が死んでしまい、培養法ではコロニー数が0.5%以下にまで減少した。しかしqPCR法では、PMA処理を行ってもCt値は1.0しか増加しなかった(つまり、死菌DNAの50%は修飾を受けていなかった)。ところが、PMA処理のみを行った試料では、コロニー数が2.7%にまで減少した。またCt値も2.4増加した。一方NLA10株では、LAS処理後もほぼ全ての細胞が生き残ったが、PMA処理では、コロニー数が0.1%にまで減少した(Ct値は1.9増加した)。これらの結果は、LAS存在下ではPMAによる死菌DNAの修飾が強く阻害されること、およびPMAが生菌に対して致命的な影響を与えることを示している。PMA-qPCR法が、LASの殺菌作用を定量的に測定する方法として応用できるか検討したが、LAS処理後の生残菌の定量には不適であると結論された。

4. ドライクリーニング用石油系溶剤及びテトラクロロエチレンの皮膚障害：

ヒト不死化皮膚細胞 HaCaT を用いた細胞増殖及び炎症に関する検討（角田正史准教授）

ドライクリーニングで使用される溶剤、石油系溶剤（クリーニングソルベント）、テトラクロロエチレンに関して炎症への関連が注目されているため、これら溶剤をヒト表皮角化細胞 HaCaT に曝露し、炎症に関連するサイトカイン IL-33 及び受容体 ST-2 の mRNA 発現に影響が起こるか検討を行った。更に低濃度長期間曝露による細胞の生存への影響について検討を行った。ヒト表皮角化細胞 HaCaT を 1×10^6 個ずつ播種し、石油系溶剤を 0 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、テトラクロロエチレンを 0 ~ 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加え曝露し、6 時間後に mRNA を抽出しリアルタイム PCR 法を用い IL-33 及び ST-2 の mRNA の発現について検討した。低濃度曝露実験に関しては、細胞 2×10^4 個に対して、石油系溶剤 0, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、テトラクロロエチレン 0, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ として曝露し、1 週間後に細胞数をカウントし細胞生存及び増殖に与える影響を評価した。IL-33、ST-2 の mRNA 発現に関しては、共に群間で有意性を示さなかった。長期曝露では、石油系溶剤、テトラクロロエチレン共に曝露群で細胞数は対照群より少なかった。IL-33、ST-2 を介して石油系溶剤、テトラクロロエチレンによる炎症が起こる可能性は少ない。長期曝露により、細胞への直接傷害が比較的低濃度で起こる可能性がある。

5. クリーニング業従事者の悪性新生物による過剰死亡の検討（堤明純教授）

クリーニング業界では、がん検診の受診率が低いことなどが指摘されている。そこで、本研究では、全国クリーニング生活衛生同業組合連合会に加盟する組合員の悪性新生物による死亡の最新の状況を把握するために、全国クリーニング生活衛生同業組合連合会全国生命共済制度のデータを用いた現状調査を実施した。平成 27 年度から再開し、本年度が 2 年目である。平成 26 年度に構築したデータベースに、平成 27 年度に提出された生命共済加入者が死亡時に提出する共済金請求書類について、死因、生年月日、死亡年月日、性別を追加しデータベースを更新した。今回は、平成 27 年 1 月 1 日から 12 月 31 日までに死亡した 35 件（男性 28 件（64.9 歳 \pm 6.8 歳）女性 7 件（66.1 歳 \pm 7.2 歳））を解析対象とし、男女別死因別に集計し、全死亡と全悪性新生物による死亡について、人口動態統計をもとに標準化死亡比（SMR）とその 95% 信頼区間を算出した。全悪性新生物による死亡（N=15）には、食道がん（n= 1）、胃がん（n= 2）、大腸がん（n= 2）、肝臓がん（n= 1）、胆のうがん（n= 1）、すい臓がん（n= 3）、肺がん（n= 2）、前立腺がん（n= 1）、原発性中枢神経リンパ腫（n= 1）、尿管腫瘍（n= 1）を含めた。全死亡の SMR は、男性 94.9（95% 信頼区間 64.3-139.1）、女性 88.8（38.9-191.8）、全悪性新生物による死亡の SMR は、男性 102.0（56.7-179.5）、女性 51.0（8.8-205.5）であった。平成 26 年度に引き続き、本年度も全死亡、全悪性腫瘍の死亡について、過剰死亡は認めなかった。今後、経年的に死亡データの蓄積を行い、今回の結果が、一過性のものではなく、継続している結果なのか、確認する必要がある。

6. 芽胞汚染タオルに対する微酸性混和水による消毒効果の検討（北里英郎教授）

Bacillus cereus 芽胞液についてタオルに付着した芽胞に対する消毒効果は不明である。そこで、今回は芽胞汚染タオルに対する微酸性混和水の消毒効果の検討を行った。芽胞汚染タオルは、滅菌した2 cm四方の白色タオルに *Bacillus cereus* 芽胞液（ 10^4 cfu/ml、 10^5 cfu/ml、 10^6 cfu/mlの3段階）を1 ml滴下することで作製した。この汚染タオルを簡易洗濯機モデルにより洗浄を行った。洗浄に用いた洗浄液として、100ppm 微酸性混和水、250ppm 次亜塩素酸ナトリウム、滅菌水の3方法で比較検討を行った。洗浄後のタオルを滅菌生理食塩水で洗い出しを行い、タオルに残留した芽胞数を計測した。微酸性混和水による洗浄では全ての芽胞液濃度に対して、残留芽胞は検出されなかった。一方、次亜塩素酸ナトリウムによる洗浄では 10^5 cfuもしくは 10^6 cfuの芽胞添加群では残留芽胞が検出された。微酸性混和水は芽胞汚染タオルを十分に消毒することができ、その効果は次亜塩素酸ナトリウムによる消毒よりも優れていることが示された。

以上、6つの研究課題の概要を紹介致しましたが、いずれもクリーニング業にとって、有用な情報を提供する知見であり、またクリーニング従事者に健康な労働の場を提供することにつながる知見でもあると考えます。クリーニング業界の進歩と発展に寄与する貴重な研究成果が得られたと確信しております。

今後も本研究委員会の研究について、その果たす役割、社会的意義をご理解下さり、ご協力、ご支援頂く事を切望致します次第です。

最後に、各分担研究者、ご協力、ご支援を頂いた関係各位に対し、深甚な謝意を表します。

平成 29 年 4 月

委員長	相澤 好治	（北里大学名誉教授・日本繊維状物質研究協会理事長）
相談役	橋本 博	（元海外渡航者健康管理協会理事長）
	篠田 純男	（岡山大学名誉教授）
	本田 武司	（阪大微生物病研究会技術顧問）
	中村 賢	（北里大学名誉教授）

平成28年度 研究課題及び研究者

研究課題	研究者氏名	頁
繊維素材へのカビの吸着性	NPO法人カビ相談センター 高鳥 浩介 口地眞智子 桐生大学 高橋 淳子	7
ドライクリーニング用液体洗剤の 抗菌活性機序の形態学的解析	杏林大学医学部感染症学講座 神谷 茂 杏林大学大学院医学研究科 共同研究施設部門実験動物施設部門 北条 史	12
クリーニング用洗剤あるいは溶剤で 処理した後の生残菌の定量的検出	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 三好 伸一	16
ドライクリーニング用石油系溶剤及び テトラクロロエチレンの皮膚障害： ヒト不死化皮膚細胞HaCaTを用いた 細胞増殖及び炎症に関する検討	北里大学医学部衛生学 (防衛医科大学校衛生学公衆衛生学) 角田 正史	20
クリーニング業従事者の悪性新生物による 過剰死亡の検討	北里大学医学部公衆衛生学 堤 明純 江口 尚	24
芽胞汚染タオルに対する微酸性混和水による 消毒効果の検討	北里大学医療衛生学部微生物学 北里 英郎 中村 正樹	28

繊維素材へのカビの吸着性

NPO 法人カビ相談センター 高鳥浩介 口地眞智子
桐生大学 高橋淳子

I. 研究の背景

衣類を構成する繊維は、さまざまな粒子状物質を吸着することが知られている。また、粒子の大きさはさまざまであり、繊維素材に取り込まれると容易に取り除けないことも多々見受けられる。繊維に危害を及ぼすカビも微粒子物質の一つであり、このような物質は一度吸着すると普通の洗浄だけでは取り除くことが難しい。

これまでの研究から、繊維に吸着したカビは、条件が揃うと繊維上で発育することが知られており、NPO 法人カビ相談センターでは過去3年間にわたり繊維素材へのカビの吸着と発生の関係を研究してきた。その結果、綿・毛・キュプラはカビが吸着・発生しやすい繊維であり、一方、絹・ポリエステル・ナイロンはカビが発生しにくい繊維であることをまとめた。

本研究では、カビの繊維への吸着性がカビ発生に関わる重要な要因であると仮定し、種々の繊維素材におけるカビ胞子の吸着性について評価を行った。

II. 材料及び方法

供試カビ

本研究では、衣住環境に多く分布するカビを用いた。各カビの胞子特性を次にまとめた。

①アオカビ

Penicillium citrinum SIY003

胞子径 球形 3-4.5 μ m

Penicillium roqueforti SIY002

胞子径 球形 4.5-6 μ m

Penicillium glabrum SIY001

胞子径 球形 3-4.5 μ m

②クロカビ

Cladosporium sphaerospermum SIY005

胞子径 球形 4-4.5 μ m

Cladosporium cladosporioides SIY007

胞子径 だ球形 3-6.5 μ m

Cladosporium herbarum SIY109

胞子径 長円形 5-7.5 μ m

③カワキコウジカビ

Eurotium chevalieri SIY108

胞子径 球形 4-5.5 μ m

④コウジカビ

Aspergillus ochraceus SIY112

胞子径 球形 4.5-6 μ m

⑤アカカビ

Fusarium solani SIY202

胞子径 長円形 4-25 μ m

供試繊維

繊維素材として「JIS L 1030-2 繊維製品の混用率試験方法」に定められた9種類の繊維を用いた。

表 1 繊維の特徴

	天然繊維				化学繊維				
	植物繊維		動物繊維		再生繊維		合成繊維		
	綿	麻	毛	絹	レーヨン	キュプラ	ナイロン	ポリエステル	アクリル
吸水性 (水の吸いやすさ)	○	○	×	△	○	△	×	×	×
吸湿性 (水蒸気の吸いやすさ)	○	○	○	△	○	○	×	×	×
速乾性 (水分の乾きやすさ)	△	△	△	○	△	△	○	○	○

- 1) 天然繊維 (綿・麻・毛・絹)
- 2) 化学繊維 (レーヨン・キュプラ・ナイロン・
ポリエステル・アクリル)

表 1 に各繊維の特徴をまとめた。

試験法及び評価

前培養した供試菌を 10^6 個 / ml の孢子液となるよう調整し、5 cm 角の繊維に $100\mu\text{l}$ 滴下して 3 時間乾燥させ、繊維にカビ孢子を吸着させた。次に、0.05% Tween80 生理食塩水が入った試験管に、カビ孢子を吸着させた繊維を入れて超音波洗浄機にかけた。

試験管内の液を 0.05% Tween80 生理食塩水で随時希釈し、ポテト・デキストロース寒天培地に塗抹して 25°C で 1 週間培養し、カビの生菌数 (CFU: Colony Forming Unit) を測定した。なお、*Eurotium chevalieri* SIY108 については M40Y 寒天培地を使用した。

回収されたカビの生菌数 (CFU) から、各種繊維へのカビ孢子吸着率を求め、評価を行った。

III. 結果

天然繊維 4 種及び化学繊維 5 種に対するカビ 9 種の吸着性試験を行った結果をまとめた (図 1~9)。

(1) 繊維からみたカビの吸着率

綿

吸着率が最も高かったカビは *Aspergillus ochraceus* SIY112 であり、低かったカビは *Penicillium citrinum* SIY003 であった。

麻

吸着率が最も高かったカビは *Aspergillus ochraceus* SIY112 であり、低かったカビは *Fusarium solani* SIY202 であった。

毛 (ウール)

吸着率が最も高かったカビは *Aspergillus ochraceus* SIY112 であり、低かったカビは *Cladosporium cladosporioides* SIY007 であった。

絹

吸着率が最も高かったカビは *Aspergillus ochraceus* SIY112 および *Cladosporium sphaerospermum* SIY005 であり、低かったカビは *Fusarium solani* SIY202 であった。

レーヨン

吸着率が最も高かったカビは *Aspergillus ochraceus* SIY112 であり、低かったカビは *Cladosporium cladosporioides* SIY007 であった。

キュプラ

吸着率が最も高かったカビは *Aspergillus ochraceus* SIY112 であり、低かったカビは *Cladosporium cladosporioides* SIY007 であった。

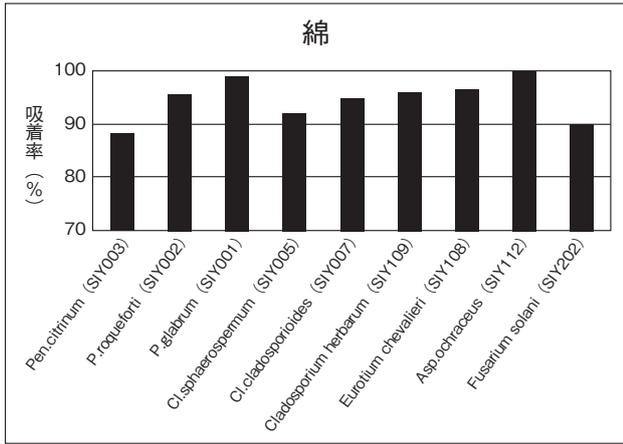


図1 綿に対するカビの吸着率

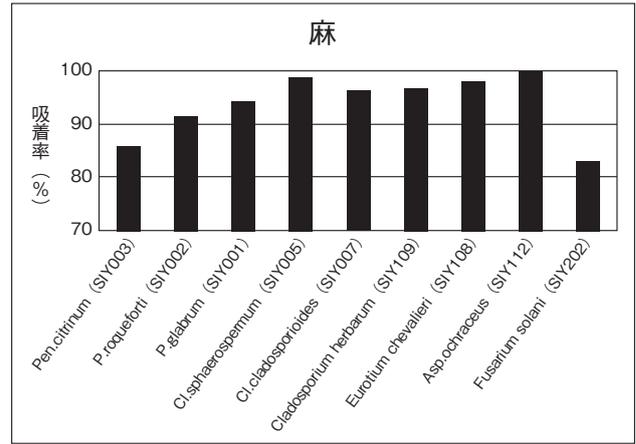


図2 麻に対するカビの吸着率

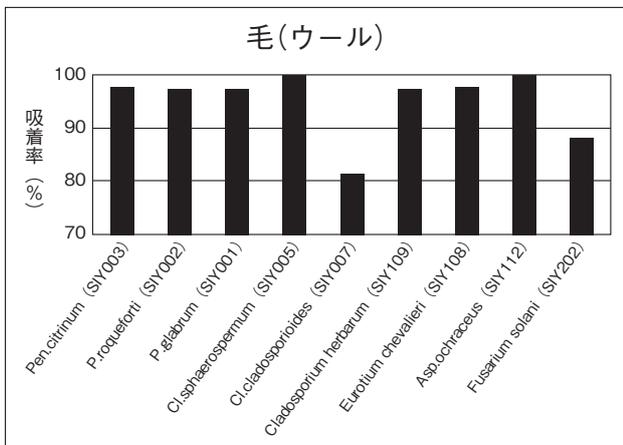


図3 毛(ウール)に対するカビの吸着率

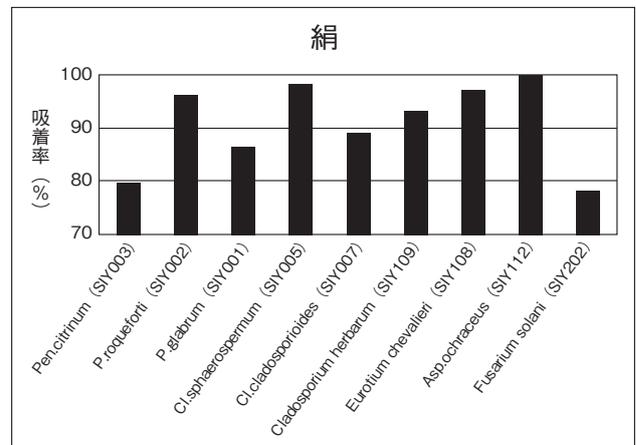


図4 絹に対するカビの吸着率

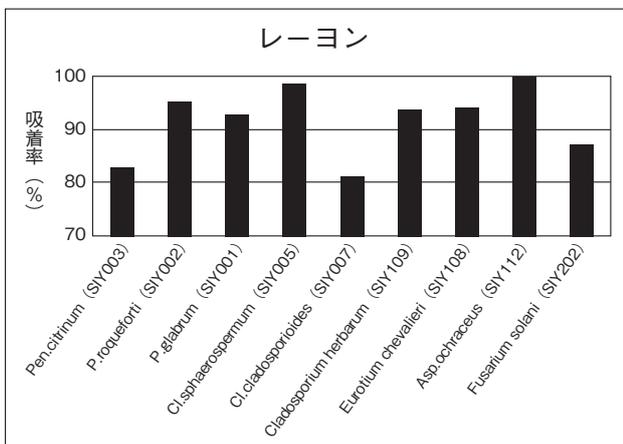


図5 レーヨンに対するカビの吸着率

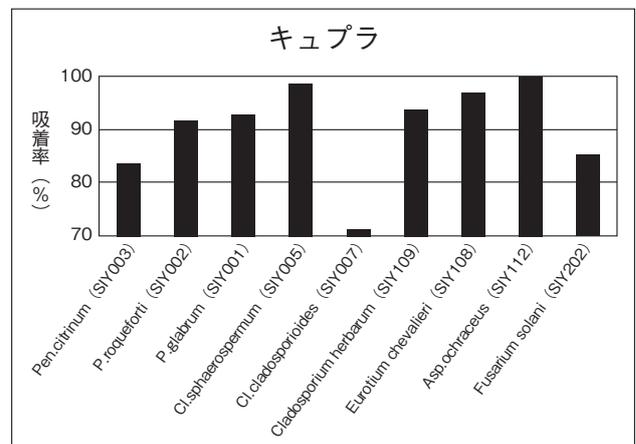


図6 キュプラに対するカビの吸着率

ナイロン

吸着率が最も高かったカビは *Aspergillus ochraceus* SIY112 であり、低かったカビは *Fusarium solani* SIY202 であった。

ポリエステル

吸着率が最も高かったカビは *Aspergillus ochraceus* SIY112 であり、低かったカビは *Fusarium solani* SIY202 であった。

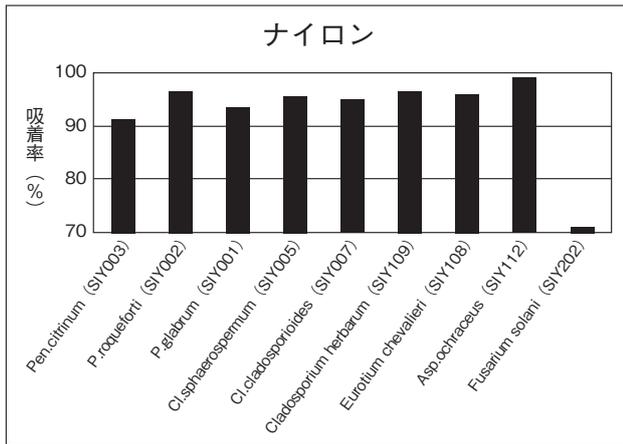


図7 ナイロンに対するカビの吸着率

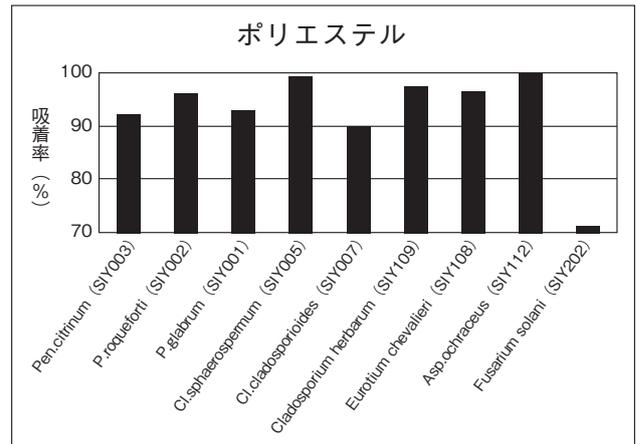


図8 ポリエステルに対するカビの吸着率

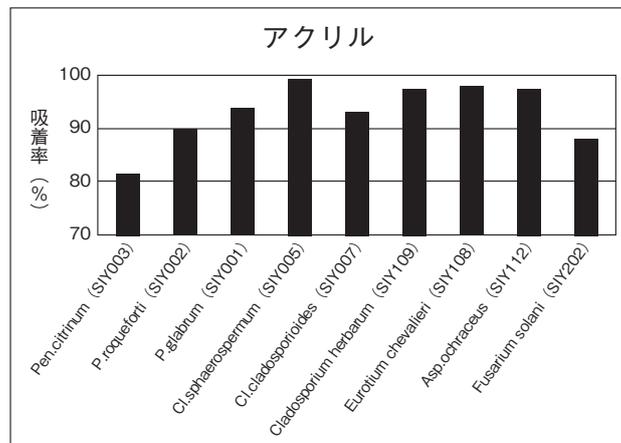


図9 アクリルに対するカビの吸着率

アクリル

吸着率が最も高かったカビは *Cladosporium sphaerospermum* SIY005 であり、低かったカビは *Penicillium citrinum* SIY003 であった。

(2) カビからみた吸着率

Penicillium citrinum SIY003

吸着率が最も高かった繊維は毛（ウール）で、低かった繊維は絹であった。

Penicillium roqueforti SIY002

吸着率が最も高かった繊維は毛（ウール）であり、低かった繊維はアクリルであった。

Penicillium glabrum SIY001

吸着率が最も高かった繊維は綿であり、低かった繊維は絹であった。

Cladosporium sphaerospermum SIY005

吸着率が最も高かった繊維は毛（ウール）であり、低かった繊維は綿であった。

Cladosporium cladosporioides SIY007

吸着率が最も高かった繊維は麻であり、低かった繊維はキュプラであった。

Cladosporium herbarum SIY109

吸着率が最も高かった繊維はポリエステルで、低かった繊維は絹であった。

Eurotium chevalieri SIY108

吸着率が最も高かった繊維は麻であり、低かった繊維はレーヨンであった。

Aspergillus ochraceus SIY112

吸着率が最も高かった繊維は麻・毛（ウール）・レーヨン・キュプラおよびポリエステルであり、低かった繊維はアクリルであった。

Fusarium solani SIY202

吸着率が最も高かった繊維は綿であり、低かった繊維はナイロン・ポリエステルであった。

IV. 考 察

カビの吸着率が高かった毛(ウール)は、特徴として吸湿性に優れていること、内部層を構成する多数のコルテックス細胞および表皮層を構成する扁平なクチクル細胞が細胞膜複合体を介して集合した多細胞繊維であること、水分を吸収し、もみ作用を加えると繊維が絡み合うという点が挙げられる。

クチクル細胞は鱗状に重なり、細胞の先端は毛先の方向に向いて、スケールと呼ばれるものを形成しているが、水分を吸収するとこのスケールが開き、毛先とは逆方向に毛羽立つ。そして、もみ作用によってスケールが絡み合い収縮し、硬くなる。このことから、吸着されたカビの胞子は、離脱し難くなり、吸着率が高くなったのではないかと考えられる。

次に、カビの吸着率が低かった絹、ナイロン、レーヨンおよびポリエステルは、どちらも繊維の表面が平滑な性質を持っている。そのため、

カビの胞子が吸着し難かったのではないかと考えられる。

カビごとにみた吸着率では、カビの胞子の形や大きさに着目した。吸着率が最も高かったカビは *Aspergillus ochraceus* SIY112 であった。*Aspergillus* 属の胞子の特徴として、とげ状の突起があり、これによって繊維に絡みついたのではないかと考えられる。吸着率が最も低かったカビは *Fusarium solani* SIY202 であった。*Fusarium* 属の胞子は、大型分生子と小型分生子というものを形成する。大型分生子は $3 \times 27 \mu\text{m}$ と大きいことから繊維に吸着し難かったのではないかと考えられる。

以上の結果から、「カビが吸着しやすい繊維は綿・毛およびキュプラ、カビが吸着し難い繊維は絹・ポリエステルおよびナイロン」と同結果であり、カビの吸着と離脱について証明できた。

【引用文献】

- 1 高鳥浩介 クリーニングと公衆衛生に関する研究委員会 平成26年度研究報告書(2014)
- 2 高鳥浩介 クリーニングと公衆衛生に関する研究委員会 平成27年度研究報告書(2015)
- 3 本宮達也, 鞠谷雄士, 高寺政行, 高橋 洋, 成瀬信子, 浜田州博, 原 一正, 峯村勲弘, 繊維の百科事典, 丸善, 東京(2002)

ドライクリーニング用液体洗剤の 抗菌活性機序の形態学的解析

杏林大学医学部感染症学講座 神谷 茂

杏林大学大学院医学研究科共同研究施設部門実験動物施設部門 北条 史

I. 緒 言

ドライクリーニングは、石油系溶媒やテトラクロロエチレンに界面活性剤（アニオン、カチオン、ノニオン）を洗剤として添加してクリーニングを行っている。これまでの本委員会の研究によってこれらの界面活性剤には抗菌活性および抗原生動物活性があることが示された。また、これらの界面活性剤を含み、実際にクリーニング店で洗浄に使われる洗剤も抗菌活性および抗原生動物活性があることが示された。界面活性剤の特徴として膜に障害を与えることが挙げられ、抗菌活性および抗原生動物活性はこの特徴に起因すると考えられるが、詳細は不明である。

クリーニングの対象となる衣類などの洗濯物にはヒトあるいは環境由来の様々な細菌が付着し、更にこれらの細菌の中にはヒトに病原性を持つものも含まれると考えられる。

*Bacillus cereus*はグラム陽性桿菌であり、下痢型食中毒および嘔吐型食中毒の原因菌となる。また血流から感染する菌血症を引き起こし、院内感染の起因菌としても重要な病原体である。

*Escherichia coli*はグラム陰性桿菌で、株によって腸管を始め、尿路、虫垂、腹膜などに炎症を引き起こす。腸管出血性大腸菌 (EHEC) に分類される血清型は出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群、急性脳症など重篤な疾病を引き起こ

すことが知られているが、その他の腸管病原性大腸菌 (EPEC)、毒素原生大腸菌 (ETEC) も病原性が報告されている。これら洗濯物を汚染する可能性のある病原性細菌に対する洗剤の作用機序を解析することは公衆衛生的に意義がある。

本年度はクリーニングに使用される洗剤の抗菌活性の詳細を明らかにするため、洗剤接触時の上記 2 菌種の細菌を標的に走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態学的解析を行った。

II. 研究方法

*B. cereus*は ATCC14579 株を用いた。*E. coli*は ATCC25922 株を用いた。被験溶媒には石油系溶媒を用いた。被験界面活性剤としてクリーン K2 プラス (ゲンブ株式会社より分与) を用いた。被験洗剤は 0.05%, 0.5% または 5% に石油系溶媒で希釈した。

細菌は LB 寒天培地を用いて 37°C 好気条件で 1 晩培養した。培養した細菌をリン酸緩衝液 (PBS) に懸濁した。懸濁液は 10 倍希釈して *B. cereus* は OD₆₀₀=0.669, *E. coli* と *S. aureus* は OD₆₀₀=0.132 となるよう希釈調整し、マイクロチューブに各 100 μ l ずつ分注した。対照には PBS を 100 μ l 添加した。被験洗剤は 900 μ l 添加し、サンプルとした。サンプルは 10 秒間攪拌あるいはマルチピーズショッカーを用いて 10 分間 (1500rpm, 60sec オン, 10sec オフ, 10 サイクル)

攪拌した。各サンプルに500mlのPBSを添加し、遠心分離を行って油層を除去し、水層と沈殿を分離した。水層と沈殿からグラム染色標本と走査型電子顕微鏡標本を作成した。グラム染色標本はサンプルをクリスタル紫による染色、ルゴール液による媒染、エタノールによる脱色、サフラニンによる対比染色することによって作成した。走査型電子顕微鏡標本はサンプルをφ0.2μmメンブレンフィルターに濾過し、フィルターを2.5%グルタルアルデヒドに浸し、18時間以上固定を行い作成した。標本は1%四酸化オスミウムによる後固定、エタノールによる脱脂の後、ブチルアルコールの凍結乾燥を行い、走査型電子顕微鏡 (JOEL 製) にて観察を行った。

Ⅲ. 研究結果

グラム染色標本は対照となる細菌の染色像が確認された (データ未掲載) が、解像度が低く、形態学的観察は不可能であった。SEMでサンプルを観察したところ、*B. cereus*, *E. coli* いずれも対照群では典型的な細菌像が観察された (図1) が、界面活性剤と接触させたサンプルでは菌体に形態学的な変化が確認された (図2)。形態学的な変化のあった菌数の割合を算定すると、*B. cereus* では対照群で0.8%であったが0.05%カチオン系洗剤で処理したサンプルは5.4%であった。*E. coli* では対照群で0.6%であったがカチオン系洗剤で処理したサンプルは15.1%であった (表1)。0.5%カチオン系洗剤で処理したサンプルでは菌体数が少なく、算定することができなかった。菌体の短径、長径に関して解析を行ったが、統計学的に有意な変化は得られなかった (図3)。

表1 形態学的異常がある菌体の割合

	観察視野数 (視野)	算定菌数 (個)	異常菌体数 (個)	異常菌体比 (%)
<i>B. cereus</i> 対照	5	1036	8	0.8
0.05% カチオン処理	11	478	26	5.4
<i>E. coli</i> 対照	5	2251	13	0.6
0.05% カチオン処理	25	463	70	15.1

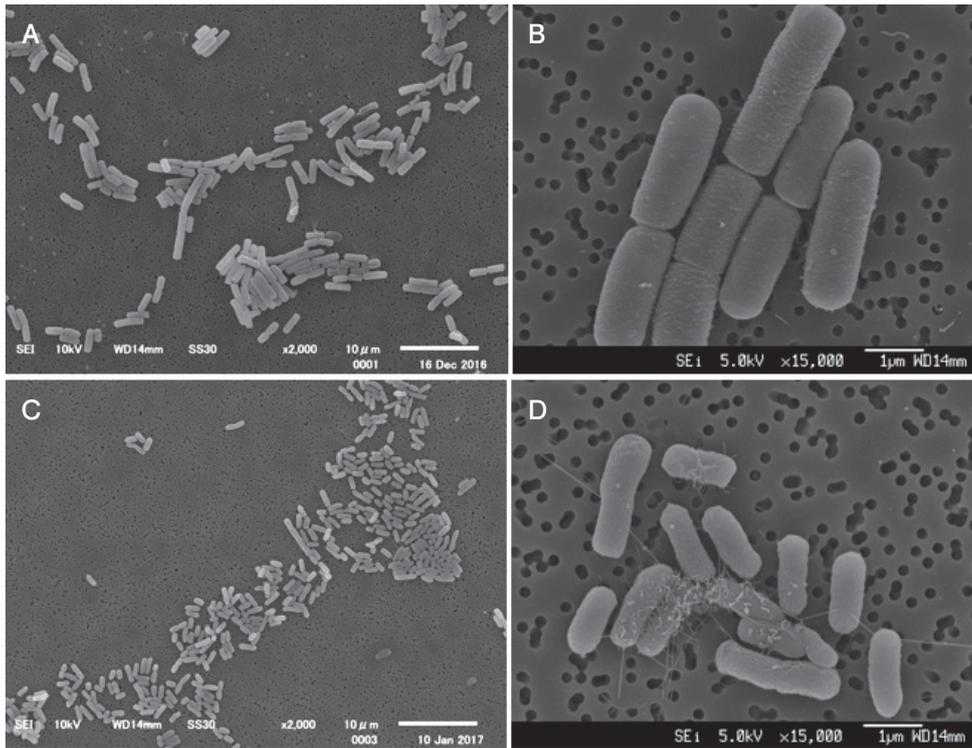


図1 対照群における *B. cereus* および *E. coli* のSEM像
 A : *B. cereus* 弱拡大観察 B : *B. cereus* 強拡大観察
 C : *E. coli* 弱拡大観察 D : *E. coli* 強拡大観察

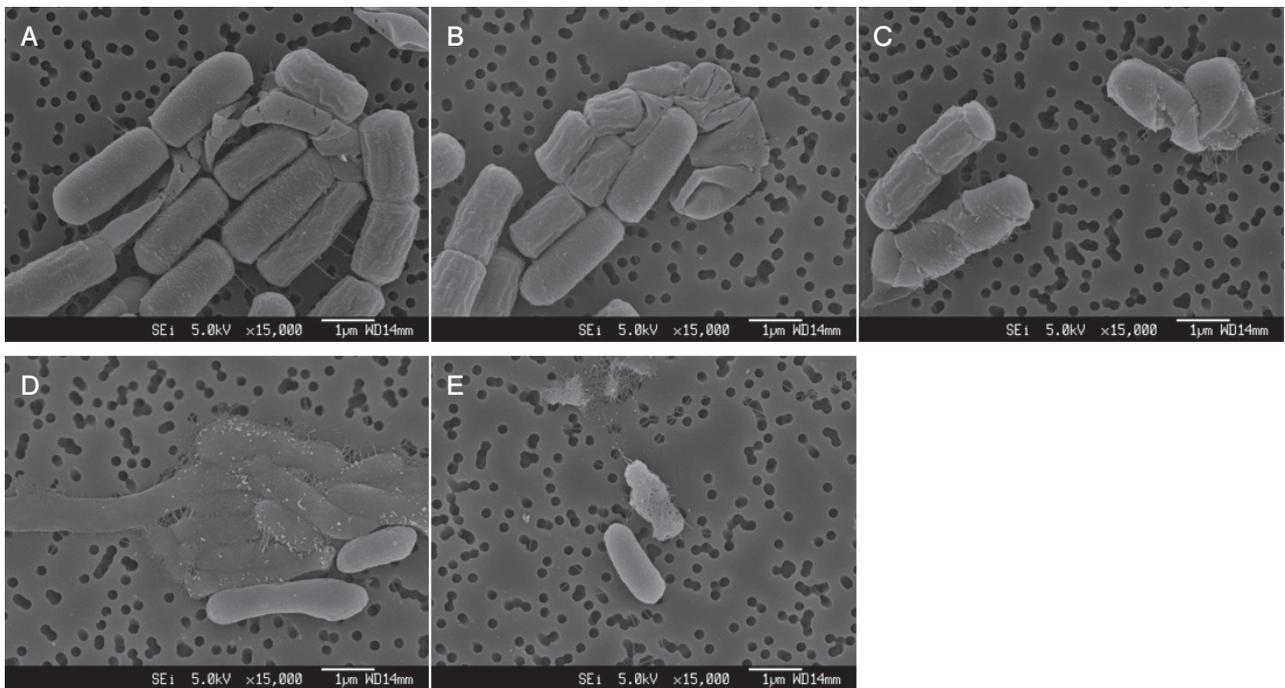


図2 0.05% カチオン系洗剤処理群における *B. cereus* および *E. coli* のSEM像
 A～C : 0.05% カチオン系洗剤処理 *B. cereus*
 D : 0.5% カチオン系洗剤処理 *E. coli*
 E : 0.05% カチオン系洗剤処理 *E. coli*

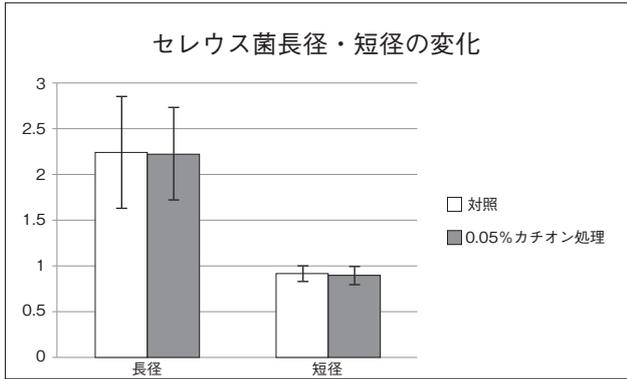
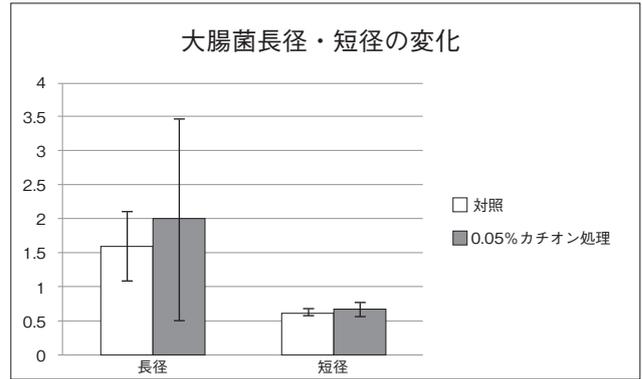


図3 *B. cereus*, *E. coli*の長径および短径の変化



IV. 考 察

今回のSEM観察の結果、通常クリーニング店で使用される濃度以下の0.05%カチオン系洗剤は*B. cereus*および*E. coli*の形態を変化させることが分かった。今回観察された形態の変化は細菌の膜が破れたり、菌体が潰れたりするものが多く見られた。平成27年度の研究報告でカチオン系洗剤が両菌種に抗菌的に働くことが分かっており、今回の結果と総合して洗剤が膜に作用して抗菌的に働くことが示唆された。高濃度のカチオン系洗剤処理をしたサンプルでは菌体が少なかったことは処理によって細菌が完全に溶菌したか、残渣がフィルターを通過してしまった可能性がある。この実験系では洗剤の作用を受けて溶菌した菌体に関しては解析することができないため、洗剤の作用は今回の報告よりも大きいものと考えられる。

形態の変化について長径・短径の定量的解析を試みたが、有意な変化は見られなかった。菌体は栄養状態や分裂の過程で差が大きく、対照群でもばらつきがあった。加えてSEMにおいては菌体の向きがフィルターに対して垂直に立っていることもあり、形態学的変化に関して長径・短径で捉えることは難しいと考えられる。菌体の大きさではなく、膜構造の変化を指標化することができれば、より正確な定量的解析が可能となる。

V. 結 語

カチオン系洗剤は*B. cereus*, *E. coli*に対して形態学的変化をもたらすことが示唆された。カチオン系洗剤の抗菌活性はこの変化に起因すると考えられる。

クリーニング用洗剤あるいは 溶剤で処理した後の生残菌の定量的検出

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 三好伸一

I. はじめに

クリーニング用洗剤には、界面活性剤として直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS) やポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル (POLE) などが含まれている。このうち、LASは陰イオン性の界面活性剤であり、80%が家庭用の洗濯洗剤、20%が業務用の洗浄剤として用いられている。一方のPOLEは非イオン性の界面活性剤であり、家庭用の台所洗剤や洗濯洗剤、あるいは業務用洗浄剤として使用されている。しかしながら、環境中の水生生物に悪影響を及ぼすため、PRTR法（化学物質排出把握管理促進法）では、LASとPOLEはともに第一種指定化学物質に指定されている。ところが、平成26年度でも環境中への排出量は多く、PRTR法による排出量では、どちらも上位10位以内となっている。

環境微生物は、生態系における分解者として、環境中に排出された種々の化学物質や毒物に対する分解・除去機能を担っている。しかしながら、環境微生物の中にはヒトに対して病原性や有害性を示す種類が存在する。したがって、病原（有害）環境微生物の付着による衣類や寝具などの汚染は、公衆衛生上危惧すべき問題となる。それゆえ、感染症予防や健康保持の観点からは、クリーニング用洗剤においては、洗浄作用に加えて殺菌作用も重要となる。

私たちは、クリーニング用洗剤の環境微生物に対する殺菌作用に関する研究の一環として、LASあるいはPOLEに抵抗性を示す環境微生物の単離と同定を行ってきた。その結果、特定のヒト病原菌が選択的に生残することはないが、使用する培地や培養条件によって単離される抵抗菌の数と種類が異なることを明らかにした。一方では、通常の培養法では検出されないが、感染症の原因となり得る耐久型の細胞が環境中に存在することも知られている。したがって、従来の培養法（コロニー形成法）では、洗剤の殺菌作用を正確に評価することはできない。それゆえ、耐久型の微生物も含めて、LASやPOLEなどに抵抗性を示す環境微生物を網羅的かつ普遍的に定量する方法の開発が必要となる。

プロピジウムモノアジド (PMA) は、二本鎖DNAに高親和性を示す光反応性色素であり、DNAに結合した後、可視光によって分解され、DNAに共有結合する。その結果、DNAが永久的に修飾される。また、この色素は細胞膜不透過性であると考えられており、細胞膜が障害を受けている死細胞のDNAのみが、PMAによって選択的に修飾される。したがって、微生物集団をPMAで処理することによって、生菌のみを特異的に検出することが可能となる。実際、PMA処理を併用した核酸増幅法 (PCR法など) が、環境水や食品の微生物汚染評価に応用され

ている。平成28年度は、培養法(コロニー形成法)に代わるLAS処理後の生残菌の定量的検出法として、PMA処理を併用したリアルタイムPCR法(PMA-qPCR法)の開発に関する研究を行った。

II. 研究方法

LASとPMAの調製

LASは和光純薬より購入し、20%となるように精製水に溶解した。一方、20 mM PMAはBiotiumより購入した。

生菌試料と死菌試料の調製

本研究には、グラウンド土壌から単離された*Pseudomonas* sp. NLA 4株(LAS感受性株)、および*Pseudomonas* sp. NLA10株(LAS抵抗性株)を使用した。

生菌試料は、各菌株をOD₆₀₀が1.0になるまで乾燥ブイヨン(日水製薬)で培養して調製した。また、生菌試料の一部については、100℃で5分間加熱処理し、死菌試料とした。

培養法による生残菌の測定

調製した生菌試料あるいは死菌試料0.5mlを20%LASまたは滅菌精製水1.0ml、ペプトンブロス(20 mMリン酸緩衝液で調製した0.2%ペプトン, pH 7.0) 5.0ml, および滅菌精製水3.5mlと混合し、25℃で30分間振とうしながら保温した。

次に、その一部(1.0ml)をチューブに分取し、これに20 mM PMAあるいはリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH7.0)を1.25 μ l加え、暗所に

において、室温で5分間保温した。その後、LED Crosslinker 12(タカラバイオ)を用いて、15分間LEDライトを照射した。続いて、遠心分離(15,000 \times g, 10分間)によって未反応のPMAを除去した後、生残している細菌数を測定するため、それぞれの試料を適切な菌密度となるようにPBSで希釈した。そして、普通寒天プレートに100 μ l播種し、25℃で2日間培養した。

qPCR法による生残菌の測定

NucleoSpin Soilを用いて、それぞれの試料からDNAを精製した。そして、16S rDNAの保存領域を標的としたqPCRを行った。すなわち、精製したDNA標品1.0 μ l, Eva Green (Bio-Rad) 10.0 μ l, プライマー16SFおよび16SR(表1)各20pmol(1.0 μ l), およびRNase/DNase-free water 7.0 μ lを混合してqPCR反応液とした。この反応液について、pPCR(95℃で10秒間の変性, 60℃で30秒間のアニーリングと伸長)を40サイクル繰り返した。そして、Ct値(増幅産物がある一定量に達するまでのPCRのサイクル数)を算出した。

III. 研究結果

LAS感受性菌NLA 4株の生残菌測定

表2に示したように、LAS感受性であるNLA 4株では、2.0%LAS処理によって、ほとんど全ての細胞が死んでしまい、コロニー数は0.5%以下にまで大きく減少した(試料2と4)。しかしqPCR法では、Ct値は1.0しか増加しなかった。つまり、試料中にはqPCR法で増幅され得る死

表1 本研究で使用した16S rDNA用プライマー

プライマー	塩基配列	位置
16SF	5'-AAACTCAAAGGAATTGACGG-3'	901-920
16SR	5'-GGGTTGCGCTCGTTGC-3'	1100-1115

表2 NLA4株の生残菌測定に対するLAS処理とPMA処理の影響

	生 菌				死 菌	
	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6
LAS処理	有	有	無	無	有	無
PMA処理	有	無	有	無	有	有
Ct値	26.1	26.2	27.6	25.2	27.9	30.6
コロニー数	20	13	90	3,300	0	0

菌のDNAが、1/2(50%)残っていた(試料2と4)。

そこで、LAS処理死菌から遊離したDNAをqPCRに不応答なものへ修飾するため、qPCRの前に50 μ M PMA処理を行った(試料1)。しかしながら、PMA処理を行っていない試料2と比較して、Ct値の増加が認められなかった。この結果は、LAS存在下ではPMAによる死菌DNAの修飾が強く阻害されることを示している。また、LASがPMAのDNA修飾作用を阻害することは、死菌試料において、LAS処理をした試料5では、LAS処理をしていない試料6と比較して、qPCRでのCt値が2.7減少している(未修飾のDNA量が6.5倍増加している)ことから支持された。

LAS処理を行っていない試料3と4に関して、PMA処理を行った試料3では、この処理を行っていない試料4と比較して、コロニー数が2.7%にまで減少し、Ct値が2.4増加した(未修飾のDNA量が1/5.3に減少した)。この結果は、細胞膜不透過性のため生菌には影響を与えないと考えられているPMAが、実際には大部分の

生菌に対して致命的な影響を与えることを示している。

LAS抵抗性菌NLA10株の生残菌測定

表3に示したように、NLA10株ではLAS処理を行ってもコロニー数とCt値に大きな変化は認められなかった(試料2と4)。この結果は、NLA10株はLAS抵抗性が高いため、2.0% LAS処理を行ってもほぼ全ての細胞が生き残ることを示している。

LAS抵抗性の高いNLA10株においても、LAS処理を行っていない試料(3と4)では、50 μ M PMA処理を行った場合(試料3)には、PMA処理を行っていない場合(試料4)と比較して、コロニー数が0.1%にまで減少し、未修飾のDNA量が1/3.7(27%)にまで減少した(Ct値が1.9増加した)。すなわち、PMA処理によって大部分の生菌が致命的な影響を受けた。

しかし、LAS処理を行った試料(1と2)では、PMA処理によるコロニー数の減少やCt値の増加は観察されず、PMAの致死作用やDNA修飾作

表3 NLA10株の生残菌測定に対するLAS処理とPMA処理の影響

	生 菌				死 菌	
	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6
LAS処理	有	有	無	無	有	無
PMA処理	有	無	有	無	有	有
Ct値	25.9	25.7	27.5	25.6	27.0	30.0
コロニー数	3,500	1,500	2	1,700	0	0

用がLASによって阻害されることが確認された。

IV. 考察

本研究では、クリーニング用洗剤に含まれる界面活性剤成分であるLASの殺菌作用を簡便かつ定量的に測定するために、PMA処理によって死菌DNAを修飾した後、qPCRで生菌DNAのみを選択的に増幅する定量法の開発を目指した。しかしながら、LAS存在下では死菌DNAのPMAによる修飾が著しく抑制されることが明らかとなった。この原因としては、PMAがLASと結合してサイズの大きい複合体となり、結果として、PMAの死菌DNAへの結合が妨害されることが考えられる。

さらには、細胞膜不透過性のため生菌には影響を与えないと考えられているPMAが、実際

には大部分の生菌に対して致命的な作用を及ぼすことも示された。

以上のことから、PMA-qPCR法はLAS処理後の生残菌の定量法としては不適であると結論できる。

V. おわりに

PMA-qPCR法は、生菌のみを選択的に定量する方法として、環境水や食品の微生物汚染評価などに応用されている。しかしながら、本研究によって、この定量法がクリーニング用洗剤の殺菌作用の評価には応用できないことが強く示唆された。したがって、DNase処理など、PMA処理に代わる前処理法の開発について検討する必要がある。

ドライクリーニング用石油系溶剤及び テトラクロロエチレンの皮膚障害： ヒト不死化皮膚細胞 HaCaT を用いた 細胞増殖及び炎症に関する検討

北里大学医学部衛生学（防衛医科大学校衛生学公衆衛生学） 角田正史

I. 研究の背景

クリーニング溶剤として広く使用されている石油系溶剤（クリーニングソルベント）については、以前使用されたトリクロロエチレンに比べて有害性は低いと考えられている（岩崎，他，1993）。石油系溶剤による健康影響，皮膚障害の報告については，アレルギー性接触皮膚炎に関連があるとする報告（花井，他，2005）がある。

全国消費生活ネットワークシステムによればクリーニング溶剤による皮膚障害のうち，石油系溶剤によると判断されたものもある。一方，テトラクロロエチレンに関しては，接触性皮膚炎をはじめ，肝障害，末梢神経炎，化学熱傷などが従来から指摘されている。

我々は，石油系溶剤及びテトラクロロエチレンの皮膚毒性を特に炎症に関して検討する基礎資料を得るため，不死化されたヒト表皮角化細胞であり Biosafety レベル 1 で使用可能という利点がある HaCaT 細胞を用いて石油系溶剤及びテトラクロロエチレンの毒性試験を行ってきた。

昨年度研究では炎症系サイトカインであるインターロイキン-1 β (IL-1 β)，IL-6 に関しては曝露群と対照群で mRNA 発現に差が見られなかった。細胞増殖に関しては，doubling time が 2 日である HaCaT 細胞に 1 週間の曝露を行い，1 週間後の細胞数をもって細胞増殖の評価

としたが，石油系溶剤では細胞数に関しては 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群で有意な平均値の低下を示し，12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群でも平均値が低い傾向にあった。テトラクロロエチレンでは細胞数に関しては 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群で有意な平均値の低下を示し，25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群でも平均値が低い傾向にあった。

近年，皮膚の炎症，特にアトピー性皮膚炎には IL-33 が関連しているとの報告（Savinko, et al., 2012）があり，IL-33 は HaCaT 細胞においても mRNA 発現が観察されている。また IL-33 の受容体である ST-2 も皮膚角化細胞での発現が報告されている。IL-33 と ST-2 の mRNA 発現は石油系溶剤及びテトラクロロエチレンの曝露によって影響が起こる可能性がある。また 1 週間の低濃度曝露における最大無毒性量（No observed adverse effect level, NOAEL）が石油系溶剤では 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，テトラクロロエチレンでは 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であるかどうかの確認も必要である。

そこで，本年度の研究は石油系溶剤及びテトラクロロエチレンの皮膚毒性に関して基礎資料を得るため，ヒト表皮角化細胞 HaCaT に石油系溶剤またはテトラクロロエチレンを曝露し，IL-33 及び ST-2 の mRNA 発現に焦点を当てて影響が起こるか検討を行った。更に低濃度長期間曝露による細胞の生存への影響について，石油系溶剤では 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，テトラクロロエチレンでは 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度を用いて検討を行った。

II. 方法

使用細胞は、ヒト表皮角化細胞HaCaTであった。Dulbecco's modified Eagle medium (低グルコース, L-グルタミン, フェノールレッド含有, 和光, 東京) に, 抗生物質 (X100, ペニシリン10,000units/ml及びストレプトマイシン10mg/ml含有, Merck Millipore, Billerica, MA, USA), MEM非必須アミノ酸 (X100,Gibco, ライフテクノロジーズ, 東京), 牛胎児血清Fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific, 横浜) を加えて細胞培養液を調製した。細胞培養液においてFBS濃度は最終的に10% v/vとした。細胞培養フラスコにて37°C, 5%CO₂の条件下で増殖させた。細胞状態を良好に保つために, 2日おきに細胞培養液を交換した。細胞培養フラスコの底面が約85%の占有率となったところで, 培養液を捨て, Phosphate Buffered Salineによる洗浄後, 0.25w/v%トリプシン溶液を用いて細胞を剥離し, 新しいフラスコに分けて細胞を分けて, 十分な細胞数を得るまで培養を続行した。

IL-33とST-2のmRNA発現に対する, 石油系溶剤及びテトラクロロエチレンの影響については, 細胞1×10⁶個数ずつ, 石油系溶剤に関しては24穴の細胞プレートに, テトラクロロエチレン群に関してはガラス製容器に培養液2ml中に播種し, 細胞生存率の実験と同様にエタノール10μlを用いて最終濃度を石油系溶剤については0, 25, 50, 100μg/ml, テトラクロロエチレンについては0, 50, 125, 250μg/mlとなるように調製した (n= 6/群)。6時間培養した後, TRIzol 試薬を用いてRNAを抽出し, cDNA合成試薬 (Roche, 東京) を用いて, cDNAを合成した。IL-33及びST-2のmRNA発現に関して, Roche社製のLightCycler System 2.0 (Roche Diagnostics) を用いてリアルタイムPCRを行っ

た。LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I (Roche Diagnostics) を蛍光色素として用いた。プライマーはグライナー社に依頼して合成した。プライマー配列はIL-33については, sense 5'-aatcaggtgacgggtgttg-3', antisense 5'-acactccaggatcagctctgt-3'であり, ST-2についてはsense 5'-caactggacagcacctcttg-3', antisense 5'-aatcacctgcgtcctcagtc-3'であった。

またhouse keeping geneにはHuman 18S rRNAを用い, プライマー配列はsense 5'-gcaattattcccatgaacg-3', antisense 5'-gggacttaatcaacgcaagc-3'であった。リアルタイムPCRのサーマルサイクルはdenaturationが94°C, アニール温度はIL-33については48°C, ST-2については50°C, 18S rRNAについては53°Cとした。extensionを72°Cとして, 45サイクル, 各サンプルについて行った。

IL-33及びST-2のヒト18S rRNAに対するcalibrator normalized relative ratioをRoche社のプロトコールに従い, 以下の式を用いて算出し, mRNA発現の指標とした。

Calibrator normalized relative ratio =

$$E_T^{CpT (control) - CpT (sample)} \times E_R^{CpR (sample) - CpR (control)}$$

CpT (sample): Crossing point of the *IL-33* or *ST-2* gene in a sample;

CpR (sample): Crossing point of the *18s RNA* gene in a sample;

CpT (control): Crossing point of the *IL-33* or *ST-2* gene in a control;

CpR (control): Crossing point of the *18s RNA* gene in a control;

E_T: E_T=10^{-1/slope} Value of slope calculated from calibration curve of *IL-33* or *ST-2* gene;

E_R: E_R=10^{-1/slope} Value of slope calculated from calibration curve of *18s RNA* gene.

細胞増殖についての石油系溶剤及びテトラクロロエチレンの影響については, 12穴の細胞培

養プレートに、細胞を 2×10^4 個ずつ播種し、石油系溶剤に関して $0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、テトラクロロエチレンに関しては $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で曝露した ($n=3$ /群)。液量は 2ml とした。2日おきに溶剤入り培養液を交換し、1週間後に細胞数をカウントし、細胞の増殖について評価した。

Ⅲ. 結果

図1に石油系溶剤に曝露されたHaCaT細胞におけるIL-33のmRNA発現を示した。石油系溶剤では曝露群でcalibrator normalized relative ratioの高値は観察されたが、群間で有意性を示

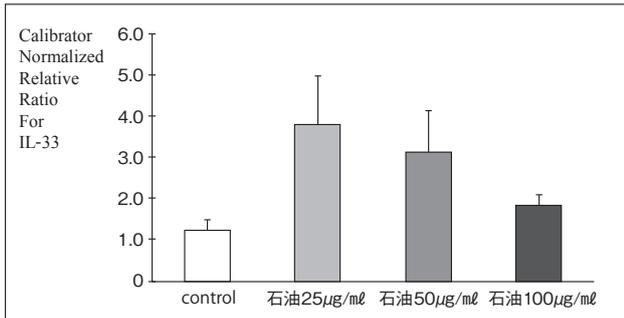


図1 石油系溶剤に曝露されたHaCaT細胞におけるIL-33のmRNA発現
注) 平均値及び標準誤差で示す。P=0.113 by ANOVA

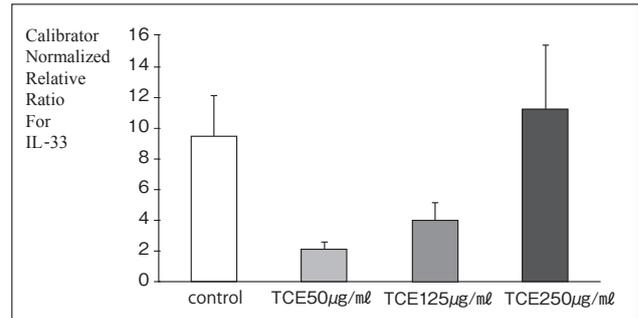


図2 テトラクロロエチレンに曝露されたHaCaT細胞におけるIL-33のmRNA発現
注) 平均値及び標準誤差で示す。P=0.082 by ANOVA

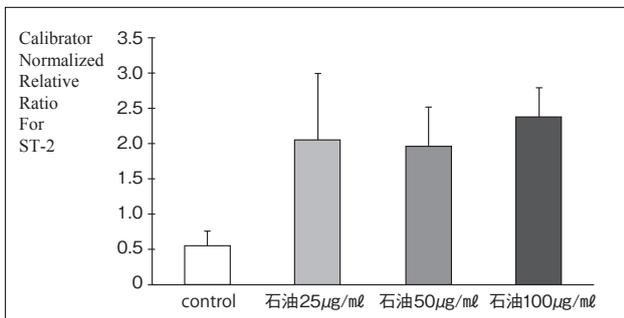


図3 石油系溶剤に曝露されたHaCaT細胞におけるST-2のmRNA発現
注) 平均値及び標準誤差で示す。P=0.162 by ANOVA

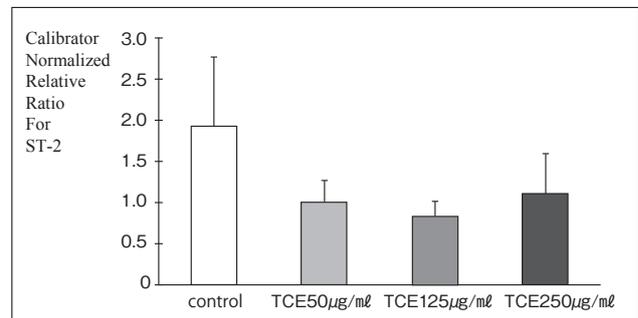


図4 テトラクロロエチレンに曝露されたHaCaT細胞におけるST-2のmRNA発現
注) 平均値及び標準誤差で示す。P=0.453 by ANOVA

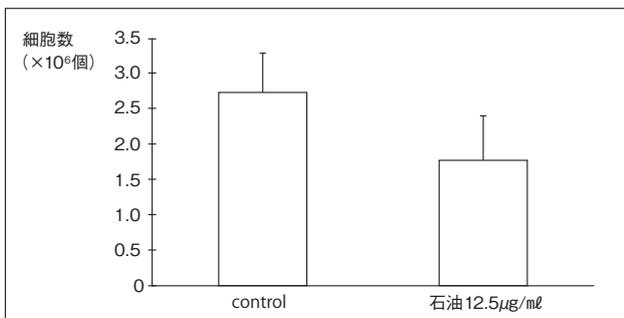


図5 石油系溶剤に曝露されたHaCaT細胞の1週間後の細胞増殖
注) 平均値及び標準誤差で示す ($n=3$ /群)。P=0.316 by t test.

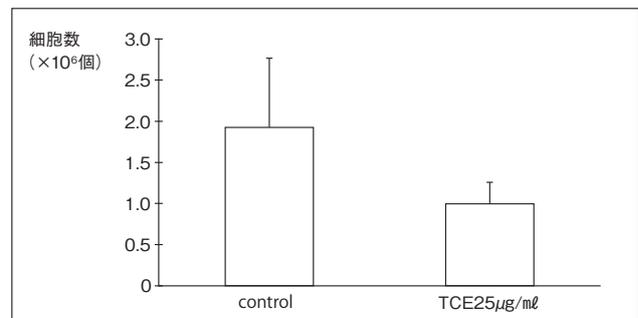


図6 テトラクロロエチレンに曝露されたHaCaT細胞の1週間後の細胞増殖
注) 平均値及び標準誤差で示す ($n=3$ /群)。P=0.478 by t test.

さなかった。図2にテトラクロロエチレンに曝露されたHaCaT細胞におけるIL-33のmRNA発現を示した。こちらも群間で有意性を示さなかった。図3に石油系溶剤に曝露されたHaCaT細胞におけるST-2のmRNA発現を示した。曝露群にcalibrator normalized relative ratioの高値は観察されたが、群間で有意性を示さなかった。図4にテトラクロロエチレンに曝露されたHaCaT細胞におけるST-2のmRNA発現を示した。こちらも群間で有意性を示さなかった。長期曝露では、図5に石油系溶剤、図6にテトラクロロエチレンの結果を示した。1週間後の細胞数で評価したが、共に曝露群で細胞数は対照群より少なかったが有意な結果には至らなかった。

IV. 考察

皮膚の角化細胞は、皮膚における防御ラインとしての役割とともに、炎症性サイトカインの産生により炎症反応を制御する役割も指摘されている。石油系溶剤、テトラクロロエチレンによる皮膚障害、炎症が角化細胞が関わって起こりうるのかについて検討するために、本年度は皮膚角化細胞におけるIL-33及びST-2のmRNA発現が石油系溶剤、テトラクロロエチレンの曝露により変化するかどうかに着目した。また比較的長期に石油系溶剤やテトラクロロエチレンに曝露された場合の細胞障害性について検討するため、昨年度の研究で増殖が有意には達しないが、抑えられる傾向にあった濃度における1週間曝露によっても検討を行った。

石油系溶剤の曝露によりIL-33、ST-2の

mRNA発現ともに対照より高い値は示したが、群間で有意性を示すには至らなかった。以上より石油系溶剤による皮膚の炎症が起こったとしても、IL-33、ST-2を介する可能性は高くないと考える。テトラクロロエチレンの曝露によっては、IL-33に実験結果のばらつきがあったこともあり、IL-33、ST-2のmRNA発現とも群間で有意性を示すには至らなかった。テトラクロロエチレンの皮膚障害についてもIL-33、ST-2を介する可能性は高くないと考える。

1週間曝露による細胞増殖の抑制に関しては、今回用いた石油系では12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、テトラクロロエチレンでは25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が実験上でNOAELとなる。今年も実験上の制約で実験のn数が多くできない問題は残った。しかしいずれにせよ、低濃度でも長期的な曝露(付着溶剤を継続的に皮膚に曝露した場合が考えられる)は角化細胞に直接的な傷害を起こしうることが示唆された。

今後の課題ではあるが、角化細胞への直接的影響を見る際には、IL-1 α やIL-8を重視すべき、という意見があり、また制御に関してはIL-17についても検討すべきという指摘があり、これらのサイトカインの検討が、長期低濃度曝露のNOAELの更なる検討も含め必要になると考える。

【参考文献】

- 花井 博, 照井 正, 鈴木啓之(2005) 刺激性接触皮膚炎. 皮膚病診療, 27, 1027-1030.
- 岩崎好陽, 辰市祐久, 上野広行(1993) ドライクリーニングにおける溶剤対策の検討. 東京都環境科学研究所年報, 1993年, 171-173.
- Savinko, T., Matikainen, S., Saarialho-Kere, U., Lehto, M., Wang, G., Lehtimäki, S., Kariosola, P., Reunala, T., Wolff, H., Lauerma, A. and Alenius, H. (2012) IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: Expression profiles and modulation by triggering factors. *Journal of Investigative Dermatology*, 132, 1392-1400.

クリーニング業従事者の悪性新生物による 過剰死亡の検討

北里大学医学部公衆衛生学 堤 明純
江口 尚

I. はじめに

定期健康診断や、がん検診の実施状況は、事業所規模が小さくなるほど、実施率が低下している¹⁾。過去1年間のがん検診を実施した事業所は、300人以上の事業所では60%以上で実施されているのに対して、10~29人の事業所での実施率は30%程度であった¹⁾。また、自営業者の健康診断受診率は一般労働者と比較して低い²⁾³⁾。健康診断を受診しない理由としては、「忙しくて時間がない」「症状もなく、自分は健康だと思ったから」「費用がかかるから」という理由が挙げられている³⁾。そのため、自営業者の多いクリーニング業従事者のがん検診の受診率についても、健康診断と同様に、一般労働者と比較して低く、未受診の理由についても類似していると考えられる。

世界的に、ドライクリーニングにおけるテトラクロロエチレンに対する環境規制の強化や、健康への有害性への関心が高まっている⁴⁾。テトラクロロエチレンは、発がん性が指摘されている⁵⁾。米国において、ドライクリーニングの過程での、テトラクロロエチレンの代替の有機溶剤の健康障害についての研究が行われている⁴⁾。

わが国においても、平成28年10月からテトラクロロエチレンの作業環境中の管理濃度が50ppmから25ppmに引き下げられ、作業環境管理が強化された⁶⁾。中小零細企業が多いクリー

ニング業においては、テトラクロロエチレンへの曝露について、十分な作業環境対策が行われていない可能性がある⁴⁾。

わが国のクリーニング業界は、従事者規模1~4人が、普通洗濯業で84.8%を占めており全国平均と比較して小規模事業所の割合が高い⁷⁾。一世帯当たりのクリーニング代支出額は、16,304円(1996年)、9,019円(2006年)、6,615円(2016年)と推移し⁸⁾、全国の施設数(機械施設のある一般施設と特定施設の合計)も、41,998件(2005年度)から29,423件(2015年度)(前年度比3.1%減)と減少している⁹⁾。このようにクリーニング業界の経営環境が厳しい原因は、クリーニング代の節約志向、家庭用洗濯機の大型化、ドライ対応洗剤の普及などにあると言われている¹⁰⁾。わが国のクリーニング業界は、他の業界と比較して、小規模事業所が多く、経営状況が厳しいことから、がん検診の受診率が、全国平均と比較して低くなっている可能性がある。

クリーニングと公衆衛生に関する研究において、小規模事業所の多いクリーニング業界では、ドライクリーニング従事者において悪性新生物による過剰死亡や、がん検診の受診率が低いことが指摘されている^{11~13)}。悪性新生物による過剰死亡については、対象とした最終年度(2004年度)から10年以上が経過している¹¹⁾。そこで、平成26年から全死亡、全悪性腫瘍による死亡についての、標準化死亡比による過剰死亡の検討

を再開した¹⁴⁾。初回である平成26年（平成26年1月1日から平成26年12月31日）は、全死亡、全悪性腫瘍による死亡について過剰死亡は認めなかった。今回は、これまでの調査結果を踏まえて、平成27年（平成27年1月1日から平成27年12月31日）の全国クリーニング生活衛生同業組合連合会に加盟する組合員の悪性新生物による死亡の最新の状況を把握するために、平成26年に準じて全国クリーニング生活衛生同業組合連合会全国生命共済制度のデータを用いて現状調査を行った。

II. 研究・調査方法

1. 死因データベースの作成

平成26年度に構築したデータベースに、平成27年度に生命共済加入者が死亡時に提出する共済金請求書類（平成27年4月1日から平成28年3月31日）について、死因（死亡診断書又は死亡証明書で確認）、生年月日、死亡年月日、性別、を追加し、エクセルを用いてデータベースを作成した。死因は、死因簡単分類表を用いてコード化した。

2. 男女別死因別の集計

死亡による共済金請求件数は、平成27年度は33件（男性26件 女性9件）であった。このうち、人口動態統計を利用するために、平成27年1月1日から12月31日までに死亡した35件（男性28件 女性7件）を解析対象とし、男女別死因別に集計した。

3. 標準化死亡比 (standardized mortality ratio: SMR) の算出

平成27年の男女別の死因（全死因、悪性新生物）毎の実死亡数と、平成27年人口動態統計調査結果を用いた全国の年齢階級別死亡率をもと

に算出した期待死亡数を用いて、全死亡と全悪性新生物による死亡についてSMRとその95%信頼区間を算出した。期待死亡数の算出には、生命共済加入者数を用い、事務局から提出を受けた平成28年10月1日現在の資料を使用した。加入者数は、18歳から75歳、男性3,871名（平均年齢55.6歳）、女性2,005名（平均年齢58.0歳）であった。

統計解析にはSPSS 23.0 for Windowsを用いた。

III. 研究結果

1. 性別死因別の人数（平成27年）

男女別死因別の集計結果を表1に示す。虚血性心疾患（n=4）と肺炎（n=4）が多く、次いで、すい臓がん（n=3）、胃がん（n=2）、大腸がん

表1 平成27年性別死因別の人数 (N=35)

	男性	女性
虚血性心疾患	4	0
肺炎	2	2
すい臓がん	3	0
胃がん	2	0
大腸がん	1	1
アルコール性肝硬変	2	0
慢性腎不全	1	1
肝臓がん	1	0
肺がん	2	0
胆のうがん	1	0
食道がん	0	1
前立腺がん	1	0
原発性中枢神経リンパ腫	1	0
尿管腫瘍	1	0
がん性髄膜炎	1	0
うっ血性心不全	1	0
脳出血	1	0
脳塞栓症	1	0
肺血栓塞栓症	0	1
急性腹症	1	0
急性胆管胆嚢炎	1	0
溺死	0	1
合計	28	7

表2 全死亡、全悪性腫瘍のSMR (平成27年)

全死亡 (N=35)	SMR	95%信頼区間
男性 (n=28)	94.9	(64.3-139.1)
女性 (n=7)	88.8	(38.9-191.8)
全悪性腫瘍による死亡 (N=15)	SMR	95%信頼区間
男性 (n=13)	102.0	(56.7-179.5)
女性 (n=2)	51.0	(8.8-205.5)

(n=2), 肺がん (n=2), アルコール性肝硬変 (n=2), 慢性腎不全 (n=2) の順であった。

2. 標準化死亡比 (平成27年)

全死亡、全悪性新生物による死亡のSMRを表2に示す。全悪性新生物による死亡 (N=15) には、すい臓がん (n=3), 肺がん (n=2), 胃がん (n=2), 大腸がん (n=2), 食道がん (n=1), 肝臓がん (n=1), 胆のうがん (n=1), 前立腺がん (n=1), 原発性中枢神経リンパ腫 (n=1), 尿管腫瘍 (n=1) を含めた。全死亡、全悪性新生物による死亡については、全国と比較して、有意な過剰死亡は認められなかった。

IV. 考察

全国クリーニング生活衛生同業組合連合会が運用する全国生命共済制度を活用して、平成26年に引き続き、平成27年分について組合員の死亡状況について検討を行った。平成27年についても、平成26年と同様に全死亡、全悪性新生物による死亡について、過剰死亡は認めなかった。

今回の平成27年調査では、全死亡については、平成26年調査に引き続いて、男女ともに過剰死亡は認めなかった。クリーニング業界は、中小零細企業が多く、経営環境が厳しい。先行研究では、中小企業の労働衛生の現状は、大企業と比較して労働者の健康状況が悪く、労働災害の件数が多いことが指摘されている^{1) 15) 16)}。近年、

全国的に、中小零細企業の事業主、役員、従業員が加入する生命共済制度への加入者数は、企業業績の悪化などにより、減少傾向にある¹⁷⁾。

今回の調査の母集団である共済制度への加入者数も、前回調査と比較して、男性が4,327名から3,871名 (10.5%減) に、女性が2,215名から2,005名 (9.5%減) に減少していた。観察された所見を評価するには、毎月の掛け金を支払える比較的経営状況が良く、相対的に健康状況の良い加入者が残っているセレクションバイアスを念頭に置いておく必要がある。

平成27年調査では、全悪性新生物による死亡については、平成26年調査に引き続いて、過剰死亡は認めなかった。一方で、昭和56年度 (1981年度) から平成16年度 (2004年度) の死亡を集計、解析した前回の調査では、悪性新生物による死亡のSMRは、男性145 (95%信頼区間: 135~166), 女性164 (143~187) であり、過剰死亡を認めた¹¹⁾。この結果の違いは、上述したような生命共済制度への加入者の減少による対象者の変化とともに、クリーニング業における衛生管理や施設、設備の改善が進み、テトラクロロエチレンや石油系溶剤への曝露が低減するなど、労働者の職場環境が改善し、¹⁸⁾ 職場環境の改善が進み、その結果、発がんのリスクが低下した可能性も考えられた。

今回の調査は、調査再開後、2年目であり、今回の結果をもって、クリーニング従事者の健康状況が改善しているとは言い切れない。今後、

先行研究と同様に、経年的に死亡データの蓄積を行い、これまでの過剰死亡を認めないという結果が、一過性のものではなく、継続している結果なのか、確認する必要がある。

V. 結語

平成27年における全国クリーニング生活衛生同業組合連合会に加盟する組合員の死亡調査において、全死亡、全悪性腫瘍について、過剰死亡は認めなかった。今後、経年的に死亡データの蓄積を行い、今回の結果が、一過性のものではなく、継続している結果なのか、確認する必要がある。

【参考文献】

- 1) 厚生労働省. (2013) 平成24年労働者健康状況調査.
- 2) 京都府. (2015) 平成27年度京都府がん検診受診率調査報告書. <http://www.pref.kyoto.jp/kenshin/documents/26kekka.pdf>.
- 3) 木村好美. (2013) 健康診断の受診と社会階層. 早稲田大学大学院文学研究科紀要. 35～44.
- 4) Ceballos DM et al. (2016) Occupational exposures to new dry cleaning solvents: High-flashpoint hydrocarbons and butylal. J Occup Environ Hyg. 13 (10) :759-69.
- 5) National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) : "Dry Cleaning." <https://www.cdc.gov/niosh/topics/dryclean/>
- 6) 特定化学物質障害予防規則の規定に基づく厚生労働大臣が定める性能等の一部を改正する告示の適用等について <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11300000-Roudoukijun-kyokuanzeneiseibu/0000099851.pdf>
- 7) 総務省. (2016) 平成26年経済センサス-基礎調査 調査の結果.
- 8) 総務省. (2016) 平成27年家計調査年報.
- 9) 厚生労働省. (2016) 平成27年度衛生行政報告例.
- 10) 厚生労働省. (2006) 平成17年生活衛生関係営業経営実態調査「クリーニング業の実態と経営改善の方策」.
- 11) 堤明純ら. (2013) ドライクリーニング従事者の悪性新生物による過剰死亡に関する検討：汎用化学物質に注目して. 平成24年度クリーニングと公衆衛生に関する研究委員会報告書. 42～47.
- 12) 堤明純ら. (2014) クリーニング作業従業員の長期的健康調査のための基礎資料の整備. 平成25年度クリーニングと公衆衛生に関する研究委員会報告書. 39～47.
- 13) 江口尚ら. (2015) クリーニング業小規模事業所経営者の健康調査. 平成26年度クリーニングと公衆衛生に関する研究委員会報告書. 37～44.
- 14) 江口尚ら. (2016) クリーニング業従事者の悪性新生物による過剰死亡の検討. 平成27年度クリーニングと公衆衛生に関する研究委員会報告書. 31～33.
- 15) Baumeister T et al. (2010) Health inequalities according to plant size--comparison of small- and medium-sized enterprises. J Occup Environ Med. 52 (8) :807-12.
- 16) Hoshuyama T et al. (2007) Inequality in the health status of workers in small-scale enterprises. Occup Med (Lond) . 57 (2) :126-30.
- 17) 全国労働者共済生活協同組合連合会. (2015) FACT BOOK 2014年度決算音ご報告など. <http://www.zenrosai.coop/library/disclosure/factbook/2015/factbook2015.pdf>.
- 18) 厚生労働省健康局生活衛生課. (2015) クリーニング業の振興指針. <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/seikatsueisei05/02.html>.

芽胞汚染タオルに対する微酸性混和水による消毒効果の検討

北里大学医療衛生学部微生物学 北里英郎
中村正樹

I. 緒言

当研究室では前年度の研究として、*Bacillus cereus* 芽胞液に対して微酸性混和水による消毒効果を検証した。本年度は、同芽胞液をタオルに添加することで汚染タオルモデルとし、これに対する微酸性混和水の消毒効果を検証することを目的とした。

II. 材料と方法

①標準化汚染タオルの作製

一般的な白色タオルを2cm四方に切断し、これをオートクレーブ滅菌した。滅菌タオルに*Bacillus cereus* 芽胞液 (10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/mlの3段階)を1ml滴下し、37℃のふ卵器で24時間乾燥させ標準化汚染タオルモデルとした。なお、*Bacillus cereus* 菌株はATCC 14579を用い、65℃、30分の加熱処理にて芽胞液を調製した。

②簡易洗濯機モデルにおける微酸性混和水消毒効果の検討

簡易洗濯機モデルは50mlの遠心管を震盪器に固定することで作製した(図1)。同モデルに洗濯液として100ppmの微酸性混和水を10ml加え恒温槽で30℃に加温した。そこに標準化汚染タオルを入れ、230~240rpmで激しく攪拌し5分間洗浄した。終了時に10%チオ硫酸ナトリウム

を1ml添加して残留塩素を不活化した。コントロール群として、250ppmの次亜塩素酸ナトリウムによる洗浄(洗浄時間は5分もしくは10分)ならびに滅菌水による洗浄(洗浄時間は5分)を行った。

③タオル残留芽胞の洗い出しと計測

上記の方法で洗浄したタオルをピンセットでしぼり、新しい50ml遠心管に入れた。そこに10mlの生理食塩水を加え、5分間激しく混和し、残留芽胞の洗い出しを行った。洗い出した液体100 μ lをトリプトソイ寒天培地に滴下し、コー

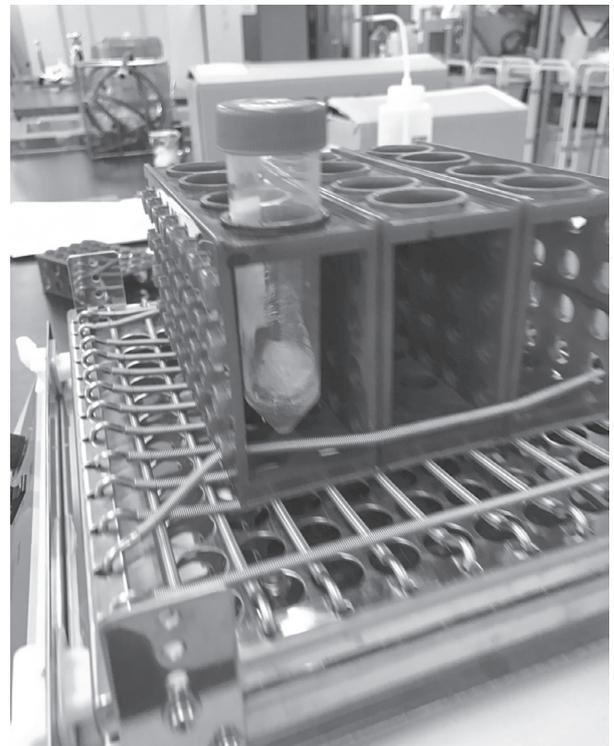


図1 簡易洗濯機モデル

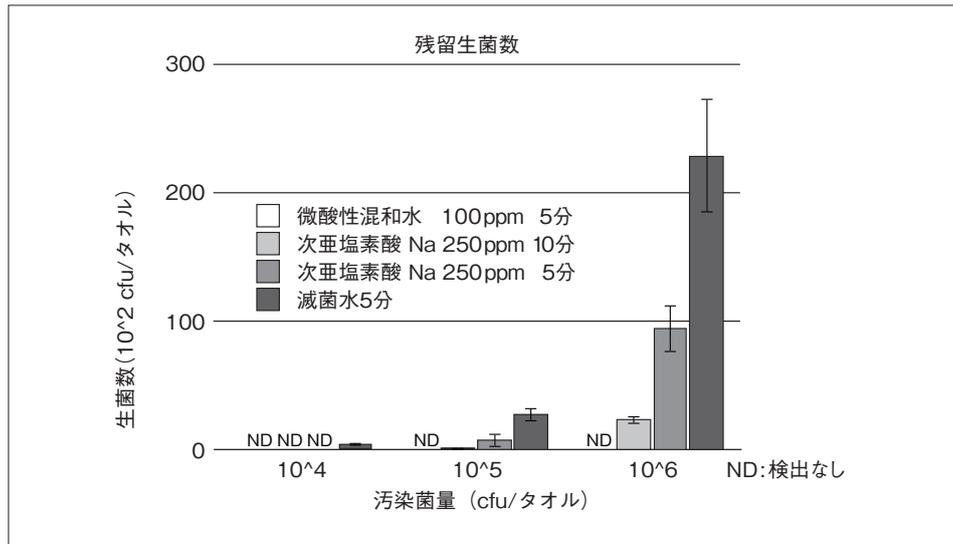


図2 各種消毒薬による洗浄効果

ンラージ棒で均等に広げ30℃で一晩培養した。培養後に出現したコロニー数を計測し、タオルに残留した生菌数を算出した。

Ⅲ. 結果

結果を図2に示す。微酸性混和水による洗浄では全ての菌液濃度において残留芽胞は検出されなかった。一方、次亜塩素酸ナトリウムによる洗浄では10⁴cfuの芽胞を添加した群では残留芽胞を検出できなかったものの、10⁵cfuもしくは10⁶cfu添加群では残留芽胞が検出された。

Ⅳ. 考察

標準化汚染タオルに対して微酸性混和水の消毒効果を検討したところ、100ppm、30℃、5分

間という洗浄条件で、芽胞を完全に失活させることができた。一方、次亜塩素酸ナトリウムによる消毒では時間依存性に消毒効果は高くなっていったものの、高濃度の芽胞に対してはその消毒効果は不完全という結果が得られた。このことから、芽胞汚染タオルに対する消毒効果は、次亜塩素酸ナトリウムに比べて微酸性混和水が優位であることが示された。

Ⅴ. 結語

微酸性混和水は芽胞汚染タオルを十分に消毒することができ、その効果は次亜塩素酸ナトリウムによる消毒よりも優れていることが示された。今回は実験室レベルでの検証であったが、実際のクリーニング現場においても微酸性混和水の有効性が期待できるものと考えられる。

今後の課題

(あ と が き)

「クリーニングと公衆衛生に関する研究」はクリーニング業に関連する公衆衛生学的課題を取り上げ、クリーニングに求められている感染症予防をはじめとした社会的役割を果たすための溶剤の殺菌作用など基本的データの蓄積を行うとともに、クリーニング従事者の健康保持のための毒性学的知見や疫学的知見など基本的なデータの蓄積を行い、必要に応じて厚生労働省などに解決策を提言しました。クリーニング業界として自主的に行っているこの事業は、過去40年の長きにわたり、評価を得て参りました。

今年度の課題のうち3つの研究は、クリーニングに期待される公衆衛生学的役割である殺菌、感染症予防に関連する研究でした。カチオン系洗剤はセレウス菌、大腸菌に形態学的変化をもたらし、この変化が殺菌作用のメカニズムである可能性が示唆され、カチオン系洗剤を用いた効果的な殺菌につながる研究でした。直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)の殺菌作用を正確に評価できる新定量法の開発に関しては、環境水や食品の微生物汚染評価に応用されているPMA-qPCR法はLAS処理後の生残菌の定量に適さないことが示され、処理法の改善などが今後の課題です。微酸性混和水は実験室レベルでは芽胞汚染タオルを十分に消毒することができ、その効果は次亜塩素酸ナトリウムよりも優れていることが示されましたが、今後、実際のクリーニング現場においての検証が必要です。いずれの研究も発展を期待したいところです。

本年度の真菌に関する研究はカビの吸着率に関する研究で、カビの吸着率が最も高かった繊維は、毛(ウール)で吸着率が最も低かったのは絹、ナイロンであり、一方吸着率が最も高かったカビは、*Aspergillus ochraceus* SIY112、吸着率が最も低かったのは *Fusarium solani* SIY202 ということが明らかになりました。今後、繊維素材の構造と真菌汚染の関連が課題です。

人間の健康に関連する研究については、基礎的な皮膚の炎症に関わる細胞培養実験と死亡データを用いたがんに対する疫学研究の2つが実施されました。細胞培養実験では、人間の表皮角化細胞細胞を用いた研究で、石油系溶剤とテトラクロロエチレンは低濃度の曝露でも長期間にわたれば細胞生存に影響が出ることが示唆されました。細胞傷害のメカニズムはまだ課題として残っております。疫学研究に関しては、クリーニング業従事者に、特に悪性新

生物（がん）が多いかどうかの検討が行われ、現時点では一般の集団と比べて、死亡全体とがんが多いということにはなりません。但し、今後、経年的に死亡データの蓄積を行い、今回の結果が、一過性のものでなく、継続している結果なのか、確認する必要があります。

クリーニング業は、清潔で快適な生活環境の維持という社会的役割を果たすことが求められると同時に、業界が従事者の職業災害の防止、健康状況の改善に努めることが社会的責任として必須となって参りました。今回の研究成果を生かし調査研究の成果を、クリーニング従業員の安全衛生教育に反映されることが期待されます。会員の皆様におかれましては、今後も、本研究委員会の活動、意義にご理解を頂き、ご支援下さいますようお願い申し上げます。

（相澤好治、角田正史 記）

編集責任者

相澤 好治（北里大学名誉教授、日本繊維状物質研究協会理事長）

橋本 博（元海外渡航者健康管理協会理事長）

篠田 純男（岡山大学名誉教授）

本田 武司（阪大微生物病研究会技術顧問）

中村 賢（北里大学名誉教授）