

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山信司 国立感染症研究所 寄生動物部

令和 5 年度分担研究報告書

家庭用洗濯機におけるレジオネラ属菌の汚染実態

研究分担者	黒木俊郎	岡山理科大学 獣医学部
研究協力者	陳内理生	神奈川県衛生研究所 微生物部
○研究協力者	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所 微生物部
研究協力者	佐原啓二	東海大学 健康学部

レジオネラ症の感染事例の大半は散発事例であるため、感染源は不明であることが多く、感染源を明らかにして対策することが望ましい。本研究では感染源になる可能性の一つとして洗濯機に着目した。洗濯機は、湿潤環境であるためレジオネラに汚染されやすい設備と想定されるが、あまり注目されていなかった。本研究では利用者の協力を得て計 10 台の家庭用洗濯機を対象に、パルセーター裏のバイオフィルムの拭き取り、又は洗濯槽からの採水を実施し、平板培地によるレジオネラ生菌の分離培養、quantitative PCR (qPCR)法および Liquid culture ethidium monoazide-quantitative PCR (LC EMA-qPCR)法によるレジオネラ遺伝子の検出、従属栄養細菌数の測定、アメーバ分離を実施した。結果として、培養検査は雑菌の増殖に阻害されてレジオネラ生菌を分離できなかったが、全ての洗濯機から LC EMA-qPCR 法により生菌に相当するレジオネラ遺伝子が検出され、従属栄養細菌数も少なくなかった。アメーバ分離を試みた 2 台の洗濯機からはいずれも *Acanthamoeba* sp.が分離された。これらの通り、洗濯機はレジオネラ属菌による汚染・増殖が起り得る条件が揃っており、レジオネラ症の感染源となる可能性が示唆された。対策として 1 台の洗濯機を塩素消毒したところ、レジオネラの遺伝子量と従属栄養細菌数は低下したが、1 か月後には上昇して、特にレジオネラの遺伝子量は洗浄前よりも多くなった。洗濯機の適切な洗浄管理の必要性が示唆された。

#### A. 緒言

レジオネラ症は、レジオネラ属菌による汚染・増殖が起こった人工水環境を感染源として、多く発生することが知られている。主な感染源として入浴施設が挙げられ、入浴施設が集団感染事例の感染源としてしばしば報告されている[1-2]。一方、感染事例の大半は散発事例であ

り、その感染源は不明であることが多い。感染源となり得る人工水環境は生活圏に多数存在すると考えられ、これまでに家庭内の水道やシャワーにおけるレジオネラ汚染が複数報告されている[3-4]。一方、多くの家庭に備えられている洗濯機もまた、湿潤環境であるためレジオネラに汚染されやすい設備と想定されるが、感

染源としてはあまり注目されていない。洗濯機水を調査した Kuroki らの報告[5]では、Loop-mediated Isothermal Amplification 法によりレジオネラ属菌の遺伝子が高率に検出されていた。

本研究では、洗濯機が感染源になる可能性を改めて検討するため、複数の家庭用洗濯機を対象とし、平板培地によるレジオネラ属菌の分離培養に加え、quantitative PCR (qPCR)法および Liquid culture ethidium monoazide quantitative PCR (LC EMA-qPCR)法によりレジオネラ属菌数を測定した。人工水環境中でのレジオネラ汚染と関連があるとされている従属栄養細菌や自由生活性アメーバ(以下、アメーバ) [5-6]の存在も調査した。検討過程で洗濯機にレジオネラの汚染を多く認めたことから、洗濯機の洗浄による汚染の軽減を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 試料の調製

調査対象は、大学の部活寮で使用している洗濯機(以下、部活寮洗濯機、試料番号 W1~W9)を9台、および単身者の住宅で使用している洗濯機(以下、単身者洗濯機、W10)を1台の、合計10台とした。いずれも2022年~2023年の間に採取した。4台(W1~W4)からは、パルセーターの裏に付着したバイオフィルムを滅菌スワブで採取した。拭き取ったスワブを1/50に希釈した phosphate-buffered saline(PBS)の5 mLに入れて、バイオフィルムを懸濁した(以下、スワブ液)。6台(W5~W10)からは、洗濯槽内の水を採取した。すなわち、洗濯槽を水道水(各洗濯機における最小量設定、数十 L)で満たして、十分量の25%チオ硫酸ナトリウム溶液を添加後、10分間、洗浄機能モードを利用して装置を動かしてから500 mLを採取し

た。この水試料を直径47 mm、孔径0.2 μmのポリカーボネートメンブランフィルターでろ過し、1/50希釈したPBSの5 mLに再浮遊した(以下、濃縮液)。

洗濯機用洗浄剤(以下、洗浄剤)による洗浄効果の確認は1台に限られるが単身者洗濯機で行い、洗浄前(再出、試料番号 W10)、洗浄直後(W11)および洗浄から1か月後(W12)に採水した。洗浄剤は市販の塩素系商品を選択し(過炭酸や過酸化水素の酸素系の化学的洗浄ではなく、250mg/L程の遊離塩素消毒)、指定された取扱方法(数時間つけ置き)に従い使用した。

### 2. qPCR 法によるレジオネラ属菌数の測定

DNA抽出は、スワブ液(W1~W4)の1 mLから QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)を、濃縮液(W5~W12)の1 mLから Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 (タカラバイオ)を用いて行った(最終溶出液量50 μL)。溶出液5 μLを鋳型に CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ)を用いて qPCRを実施した。キットのマニュアルに従い、スワブ液1 mLあたりまたは洗濯機水100 mLあたりの菌数を算出した。

### 3. LC EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌数の測定

分取した1 mLのスワブ液(W3~W4)および濃縮液(W5~W12)を遠心分離でさらに10倍濃縮してから(後述の)酸処理をした。そこに *Legionella* LC medium (タカラバイオ)0.9 mLを添加し、37°Cで18時間培養した。培養後の100 μLを分取し、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (タカラバイオ)を用いて EMA 処理をした。さらに、Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2を用いて DNA を抽出した(最

終溶出液量 50  $\mu$ L)。溶出液 5  $\mu$ L を鋳型に CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ)を用いて qPCR を実施した。キットのマニュアルに従い、スワブ液 1 mL あたりまたは洗濯機水 100 mL あたりの生菌に相当する菌数を算出した。

#### 4. レジオネラ属菌の分離培養

平板培地による培養の前処理は次の方法で行った。酸処理は、等量の pH 2.2 緩衝液を加えて 4 分間静置した。熱処理は、50°C の恒温水槽中で 20 分間静置した。熱・酸処理は、上述の熱処理をしてから酸処理した。一部試料は、これらの前処理を行わない、未処理の培養も行った。

培地は次の 5 種類、①GVPC 寒天培地(島津ダイアグノスティクス)、②GVPC  $\alpha$  寒天培地(日研生物)、③GVPC 寒天培地(関東化学)、④MWY 寒天培地(関東化学)、⑤WYO  $\alpha$  寒天培地(栄研化学)を使用した。

試料 W1~W2 は、スワブ液の一部を分取し、未処理、酸処理および熱処理の 3 条件で培養した。3 条件の試料およびこれら試料を 10 倍希釈したもの各 0.1 mL を培地①および④の各 1 枚に塗抹した。W3~W4 は、スワブ液の一部を熱・酸処理し、その 10 倍希釈した 0.1 mL を培地①および④の各 5 枚に塗抹した。W5~W12 は、濃縮液の一部を熱・酸処理し、その 10 倍希釈した 0.1 mL を培地②~⑤の各 5 枚に塗抹した。

試料を培地に塗抹した後は、36 $\pm$ 1°C で少なくとも 7 日間培養した。レジオネラ属菌を疑うコロニーを BCYE  $\alpha$  寒天培地(日研生物)に転培し、性状により鑑別を行った。

#### 5. 従属栄養細菌数

スワブ液および濃縮前の洗濯機水を PBS で 10 倍段階希釈し、それらの 1 mL を混釈法により R2A 寒天培地(BD)に接種した。20°C で 7 日間培養し、集落数を計数した。

#### 6. アメーバの分離および同定

アメーバの分離はレジオネラ症防止指針[7]の方法に準拠した。スワブ液(W1~W2)の 0.5 mL をアメーバ分離用培地(大腸菌の死菌を塗布した無栄養寒天平板)に塗抹し、30°C で 5 日間培養した。形成されたプラークの辺縁を切り出し、新しいアメーバ分離用培地に継代した。3 日間程度培養後、プラークの辺縁部に 10  $\mu$ L の精製水を滴下し、ピペッティング後にアメーバを含む精製水を 1.5 mL マイクロチューブに回収した。DNA 抽出は InstaGene matrix (Bio-Rad)を用いた。これを鋳型 DNA とし、プライマーに AmeF977 および AmeR1534 を用いて 18S rRNA 遺伝子の一部を PCR で増幅した[8]。約 600 bp の増副産物からサンガー法で塩基配列を決定し、この塩基配列を Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)を用いて GenBank 上の配列と比較した。

#### C. 結果および考察

部活寮洗濯機において、4 台の拭き取りスワブ検体(W1~W4)および 5 台の洗濯機水検体(W5~W9)を調査した結果、すべての検体で qPCR 法および LC EMA-qPCR 法によってレジオネラ属菌が検出された(表 1, 2)。qPCR 法によるレジオネラ属菌数は、拭き取りスワブ検体(W1~W4)が  $2.5 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^3$  CFU/mL であり、洗濯機水検体(W5~W9)が  $3.3 \times 10^1 \sim 9.0 \times 10^3$  CFU/100 mL だった。一方、LC EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌数は、拭き取りスワブ検体(W3~

W4)が $2.0 \times 10^2 \sim 3.6 \times 10^3$  CFU/mLであり、洗濯機水検体(W5~W9)が $1.1 \times 10^1 \sim 7.2 \times 10^2$  CFU/100 mLだった。LC EMA-qPCR法の結果から、洗濯機中には生菌のレジオネラ属菌が存在することが示唆された。

しかし、培養ではすべての検体でレジオネラ属菌のコロニーを分離できなかった。初めに実施した拭き取りスワブ検体のW1~W2では、未処理、酸処理および熱処理のいずれにおいても、雑菌が培地表面全体を覆ってしまい、レジオネラ属菌の発育を確認できなかった。対象試料を10倍希釈することで培地上の雑菌の発育が軽減されたものの、レジオネラ属菌を発育させるには不十分だった。

そこで、次に実施した拭き取りスワブ検体のW3~W4および洗濯機水検体のW5~W9では、熱・酸処理を実施してさらに10倍希釈した0.1 mLを培地に塗抹した。これにより雑菌の発育は十分に抑制されたが、レジオネラは培養で不検出であった。なお、この熱・酸処理はレジオネラ属菌の発育も抑制する影響があるものの、処理した50%以上は生存できると報告されている[9]。以上のことから、培地への塗抹量はスワブ液・濃縮液1 mL中のおよそ $1/200 (= 5 \mu\text{L})$ に相当し、LC EMA-qPCR法によるレジオネラ属菌数から計算すると、各平板培地上にはスワブ液から1.0~18.0 CFU、濃縮液から0.1~3.6 CFUに相当する生菌が塗抹されたことになる。使用した培地の枚数は、拭き取りスワブ液(W3~W4)に10枚(=前処理1条件×塗布1濃度×培地2種類×培地各5枚)、濃縮液(W5~W9)に20枚(=前処理1条件×塗布1濃度×培地4種類×培地各5枚)だったため、いずれかの培地上に発育する可能性は十分あった。それにも関わらず1つのコロニーも分離できな

ったことから、LC EMA-PCRで検出された生菌に相当するレジオネラは、生菌ではあるが培地には発育できない状態(いわゆるVNC)や、通常の選択分離培地では発育しない菌種であった可能性が考えられた。

従属栄養細菌は、拭き取りスワブ検体(W1~W4)で $3.3 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^8$  CFU/mL、洗濯機水検体(W5~W9)で $2.9 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^6$  CFU/mLであり、すべての洗濯機で菌数が多かった。

アメーバ分離を実施した拭き取りスワブ検体(W1~W2)の結果は、いずれも陽性だった。分離したアメーバにおける18S rRNA遺伝子の部分配列(600 bp)を用いてBLAST検索した結果、*Acanthamoeba* sp.(Accession No. KR780551.1)と、W1由来株は100% (600 bp/600 bp)、W2由来株は98% (588 bp/600 bp)一致した。*Acanthamoeba* sp.は、レジオネラ属菌の宿主として知られている[7]。

以上の通り、洗濯機からレジオネラ属菌、従属栄養細菌およびアメーバが検出された。洗濯機はレジオネラによる汚染が起こりやすく(上述の9台中の9台、後述の試料W10を含めれば10台中の10台)、感染源となり得る可能性が示唆された。PCRで検出されたレジオネラ属菌の種類については、今後の検討課題としたい。

洗濯機のレジオネラ汚染を軽減するためには、洗濯機内のバイオフィームや有機物を除去する必要がある。市販の洗浄剤(消毒剤)の有効性を検証するため、単身者洗濯機の1台を対象に、洗浄前後のタイミングでレジオネラ属菌の分離と菌数測定(qPCR法およびLC EMA-qPCR法による)および従属栄養細菌数を測定した(図1)。

レジオネラの分離培養はいずれも不検出であったものの、qPCRのレジオネラ属菌数、および従属栄養細菌数は、洗浄前(W10)に比べて、洗浄直後(W11)に低下した。特に生菌(LC EMA-qPCR法による)が不検出となったことから、洗浄剤に含まれる塩素により消毒されたと考えられた。

しかしながら、1か月経過後(W12)の各細菌数は高く、特にレジオネラ属菌数は洗浄前(W10)よりも多くなった。洗浄剤により洗濯機内の細菌叢の再構築が起こり、レジオネラ属菌が優勢になった恐れが推察された。市販の洗浄剤を単発で使用するだけでは洗濯機中のレジオネラ属菌が完全には死滅せず、むしろレジオネラ属菌が優勢な環境を生じさせ、ヒトへの感染の危険性を上昇させるかもしれない。洗濯機を高い頻度で洗浄し、適切に管理する必要性が示唆された。

既報でも、医療機関のレジオネラに汚染された水道配管において、高濃度塩素消毒の2か月後は消毒前のレジオネラ汚染レベルに戻っていたと報告されている[10]。入浴施設においても高濃度塩素消毒を実施することはレジオネラの抑制・汚染軽減に効果的であるが、同様の事象が起きる可能性があるため、実施後も洗浄およびモニタリングを含めた継続した管理が必要となる。また、通常の塩素消毒をしていてもレジオネラが培養で検出されることがある。洗濯機、医療機関、そして入浴施設のいずれにおいても消毒だけでは良いというのではなく、適切な管理を怠ることができないと考えられた。

#### D. 結論

調査した全ての洗濯機から生菌に相当するレジオネラがLC EMA-qPCR法により検出さ

れ、洗濯機はレジオネラ症の感染源となる可能性が示唆された。

#### E. 参考文献

1. 日帰り温泉施設におけるレジオネラ症集団発生事例ー埼玉県. IASR. 2013, Vol 34, 157-158.
2. 日帰り入浴施設におけるレジオネラ症集団発生事例と衛生管理上の対策ー神奈川県. IASR. 2016, Vol. 37, 140-141.
3. Gleason JA, Conner LE, Ross KM. Associations of Household Factors, Hot Water Temperature, and Chlorine Residual with *Legionella* Occurrence in Single-Family Homes in New Jersey. *Sci Total Environ.* 2023;870:161984.
4. Hayes-Phillips D, Bentham R, Ross K, Whiley H. Factors influencing *Legionella* contamination of domestic household showers. *Pathogens.* 2019, 8:27.
5. Kuroki T, Watanabe Y, Teranishi H, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Kura F. *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. *Epidemiol Infect.* 2017, 145:1398-1408.
6. Nisar M. A., Ross K. E., Brown M. H., Bentham R, Hinds J, Whiley H. Molecular screening and characterization of *Legionella pneumophila* associated free-living amoebae in domestic and hospital water systems. *Water Res.* 2022, 226: 119238.
7. 公益財団法人日本建築衛生管理教育センター. レジオネラ症防止指針第4版.
8. Liang SY, Ji DR, Hsia KT, Hung CC, Sheng WH, Hsu BM, Chen JS, Wu MH,

- Lai CH, Ji DD. Isolation and identification of *Acanthamoeba* species related to amoebic encephalitis and nonpathogenic free-living amoeba species from the rice field. *J Appl Microbiol.* 2010;109:1422–1429.
9. 春日修, 高木紀美子, 谷佳都, 絹巻明生. 環境水由来レジオネラ属菌の分離方法に関する検討. *感染症学雑誌.* 1999, 73 (1), 25-34.
10. Muzzi A, Cutti S, Bonadeo E, Lodola L, Monzillo V, Corbella M, Scudeller L, Novelli V, Marena C. Prevention of nosocomial legionellosis by best water management: comparison of three decontamination methods. *J Hosp Infect.* 2020, Aug;105(4):766-772.
- F. 研究発表  
紙上発表  
なし  
学会発表  
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

表1 大学の部活寮で使用している洗濯機の拭き取りスワブ検体(スワブ液)の結果

検体番号	レジオネラ属菌数 (CFU/mL)		レジオネラ属菌 分離培養	従属栄養細菌数 (CFU/mL)
	qPCR	LC EMA-qPCR		
W1	$4.0 \times 10^3$	未実施	検出不能	$4.9 \times 10^7$
W2	$2.5 \times 10^2$	未実施	検出不能	$1.4 \times 10^8$
W3	$2.8 \times 10^3$	$3.6 \times 10^3$	不検出	$3.3 \times 10^7$
W4	$7.3 \times 10^2$	$2.0 \times 10^2$	不検出	$4.3 \times 10^7$

表2 大学の部活寮で使用している洗濯機水の結果

検体番号	レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)		レジオネラ属菌 分離培養	従属栄養細菌数 (CFU/mL)
	qPCR	LC EMA-qPCR		
W5	$3.3 \times 10^1$	$1.1 \times 10^1$	不検出	$2.9 \times 10^4$
W6	$2.1 \times 10^2$	$5.2 \times 10^1$	不検出	$4.4 \times 10^5$
W7	$1.3 \times 10^3$	$1.0 \times 10^2$	不検出	$7.5 \times 10^4$
W8	$3.2 \times 10^3$	$1.8 \times 10^2$	不検出	$1.1 \times 10^5$
W9	$9.0 \times 10^3$	$7.2 \times 10^2$	不検出	$1.1 \times 10^6$

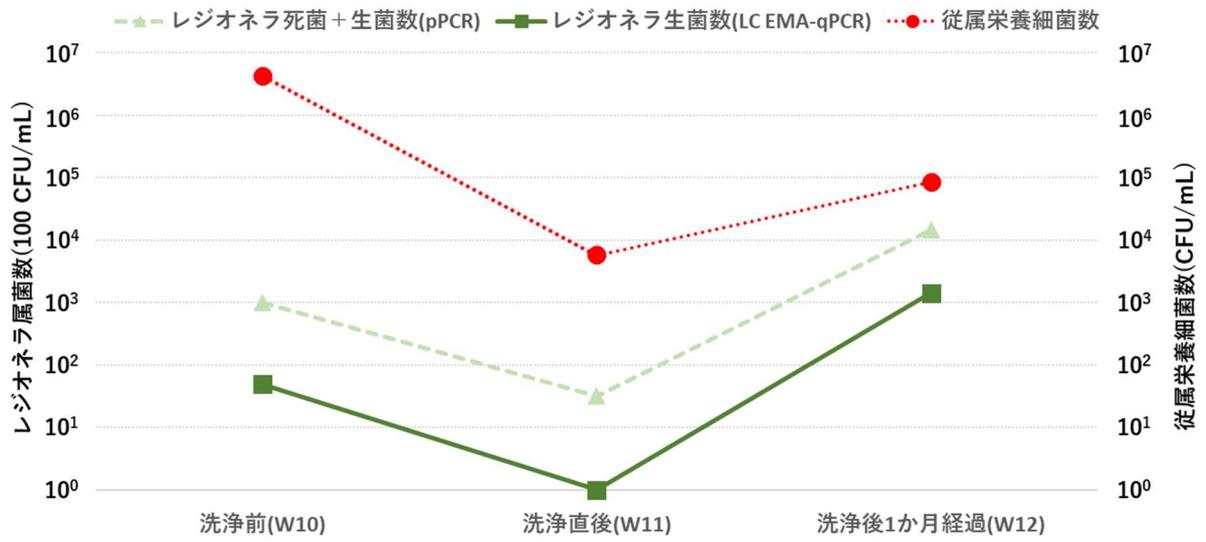


図1 単身者洗濯機の洗浄前後のレジオネラ属菌数および従属栄養細菌数の推移