

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）
公衆浴場等におけるレジオネラ発生防止及び衛生管理推進のための研究
研究代表者 泉山信司 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所

令和 7 年度分担研究報告書

家庭用洗濯機における塩素系消毒剤によるレジオネラ属菌に対する洗浄効果

○研究分担者 中嶋直樹 神奈川県衛生研究所 微生物部

レジオネラ症の感染源は不明であることが多く、身近な生活圏に感染源が存在する可能性がある。先の研究により、家庭用洗濯機が潜在的な感染源と示唆されたことから、洗濯機の塩素洗浄を試みたが、除染は容易ではなかった。本研究では洗濯機の塩素洗浄を 2 回実施することで除染を試みた。洗浄前後で洗濯機から採水し、レジオネラ属菌の生菌の培養、quantitative PCR (qPCR)法及び Liquid culture ethidium monoazide-quantitative PCR (LC EMA-qPCR)法によるレジオネラ属菌遺伝子の測定、従属栄養細菌数の測定、16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスによる菌叢解析を実施した。qPCR 法及び LC EMA-qPCR 法から換算したレジオネラ属菌数は、2 回の洗浄で検出限界未満まで減少した。この状態は洗浄後 4 か月まで維持されたが、7 か月後には再増加した。レジオネラ属菌の生菌は分離培養されなかったが、菌叢解析から Uncultured *Legionella* sp.と高い相同性を示す配列が検出された。菌叢の割合として、バイオフィーム関連の細菌である *Mycobacterium* 属の相対存在率が低下しており、短期の 2 回の洗浄はバイオフィームの除去に有用であったことが示唆された。以上の通り、洗濯機はレジオネラ属菌による汚染・増殖が起こる環境であることを改めて確認し、洗濯機の適切な維持管理の必要性を改めて喚起する結果であった。

A. 緒言

レジオネラ症の主な感染源として、レジオネラ属菌による汚染・増殖が起こった入浴施設の浴槽水が知られている[1-2]。一方で、多くの場合は感染源が不明であり[3]、家庭内の水道やシャワーといった身近な生活圏における感染源の存在が示唆されている[4-5]。しかし、家庭内の水利用環境のうち、洗濯機の汚染実態については十分に検討されていない。

先の研究班において、洗濯機がレジオネラ症

の感染源となり得るか調査したところ、10 台の家庭用洗濯機すべてから Liquid culture ethidium monoazide-quantitative PCR (LC EMA-qPCR)法によりレジオネラ属菌が検出された[6]。そのうちの 1 台の洗濯機を対象に、塩素系消毒剤の洗浄によるレジオネラ属菌の汚染軽減が試みられたものの、洗浄後 1 か月で洗浄前と同程度の汚染レベルに再増加し、除染が十分でなかったことが確認された。このことから、本研究では洗濯機の洗浄、除染の方法に

ついて、さらなる検討を行った。

本研究では洗濯機の洗浄を 1 回ではなく 2 回実施して、その効果から、洗浄、除染の方法を改めて検討することとした。レジオネラ属菌の測定は、平板培地による培養、quantitative PCR (qPCR)法及び LC EMA-qPCR 法による遺伝子の検出とした。加えて、洗浄による菌叢の変化を観察するため、16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスも実施した。洗濯機における洗浄方法を検討することで、入浴施設を含む人工水環境の衛生管理手法の改善に資する知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

1. サンプルング

調査対象は、単身者の住宅で使用している洗濯機 1 台とした。調査期間中の洗濯の頻度は週 5 回程度で、他の清掃はせず、乾燥モードは使用しなかった。市販の塩素系洗浄剤（以下、洗浄剤）による洗浄前後でサンプルングした。すなわち、洗浄前、洗浄 1 回目直後、洗浄 2 回目直後、洗浄後 2 か月、4 か月及び 7 か月経過後の合計 6 回のサンプルングを実施した。洗浄 2 回目は、洗浄 1 回目直後のサンプルング後に続けて実施した。洗濯槽の洗浄方法は、洗浄剤に記載された方法を参考に、約 100 mg/L の遊離塩素濃度で洗濯槽を満たし、約 10 時間のつけ置きとした。採水方法は、洗濯槽を最小水量（約 10 L）の水道水で満たし、十分量の 25%チオ硫酸ナトリウム溶液を添加後、10 分間洗浄モードで装置を動かしてから 500 mL を採取した。

また別に、洗濯槽に注がれる前の水道水を調査するため、蛇口から直接水道水を採水した。この検体はレジオネラ属菌の培養並びに qPCR 法及び LC EMA-qPCR 法による遺伝子

検出のみに供試した。

これらの水試料を直径 47 mm、孔径 0.2 μ m 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）。また別に、16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを外注先で実施するため、洗濯機水から採取した水試料を面積 49 cm²、孔径 0.2 μ m の PES フィルターでろ過し、そのフィルターを送付まで冷凍保管した。

2. qPCR 法によるレジオネラ属菌数の測定

以前の報告[6]に従い実施した。すなわち、DNA 抽出は、濃縮液の 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 μ L）。溶出液 5 μ 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、洗濯機水 100 mL あたりの、死菌を含む、レジオネラ属菌数（CFU 換算値）を算出した。

3. LC EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌数の測定

以前の報告[6]に従い実施した。すなわち、濃縮液を遠心分離でさらに 10 倍濃縮してから等量の pH 2.2 緩衝液で酸処理をした。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 μ L 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 μ L）。溶出液 5 μ 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、洗濯機水 100 mL あたりの生菌に相当する菌数 (CFU 換算値) 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以前の報告 [6] を参考に熱・酸処理を行った。すなわち、50°C の恒温水槽中で 20 分間静置した後、等量の pH 2.2 緩衝液を加えて 5 分間静置した。別に、Inoue ら [7] の報告を参考に、エタンブトールを 10 mg/L に調製した pH 2.2 緩衝液と、濃縮液を等量混合して 5 分間静置する処理も行った (以下、EB 加酸処理)。これら 2 通りの処理液を、1/50 希釈した PBS でさらに 5 倍希釈 (濃縮液を 10 倍希釈した計算) し、その 0.1 mL を GVPC 寒天培地 (関東化学) 及び MWY 寒天培地 (関東化学) に 10 枚ずつ塗抹した。試料を培地に塗抹した後は、36 ± 1°C で少なくとも 7 日間培養した。

5. 従属栄養細菌数

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. 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス

16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域 (配列長およそ 427 bp) を対象としたアンプリコンシーケンスを生物技研 (神奈川) に外注した。水試料をろ過したフィルターを送付し、MPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Bio) で DNA を抽出後、illumina NextSeq 1000 でシーケンスした。取得したリードデータは QIIME2 (ver. 2024.10) を用いて解析した。Amplicon Sequence Variant (ASV) 推定には DADA2 プ

ラグインを使用し、Greengenes データベース (ver. 13_8) を用いて分類した。個々に識別分類された配列は、ASV_数字として名前 (ID) をつけて、記載した。ASV 分類情報のうち Genus (属) レベルまで分類された ASV を対象に集計し、検体から取得した ASV 数に対する属確定 ASV 数の割合を属同定率として算出した。次に、各検体における属確定 ASV 数に対する各属の ASV 数の割合を相対存在率として算出した。別に、*Legionella* 科あるいは属に分類された ASV を対象に、BLAST 検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により、データベース上の配列との一致率を確認した。

C. 結果及び考察

洗濯機の洗浄前後における qPCR 法及び LC EMA-qPCR 法に基づき算出したレジオネラ属菌数並びに従属栄養細菌数を、図示した (図 1)。洗浄前のレジオネラ属菌数は qPCR 法で 1.7×10^4 CFU/100 mL、LC EMA-qPCR 法で 1.5×10^2 CFU/100 mL だった。洗浄を 1 回実施したことで、レジオネラ属菌数は qPCR 法で 1.5×10^1 CFU/100 mL、LC EMA-qPCR 法で検出限界未満 (1 CFU/100 mL 未満) と大きく減少し、さらに洗浄 (2 回目) を実施したことで qPCR 法でも検出限界未満となった。

洗浄実施から 4 か月経過後も qPCR 法ではわずかにレジオネラ属菌は検出されたが、LC EMA-qPCR 法では検出限界未満で維持された。しかし、7 か月経過後には qPCR 法で 7.3×10^3 CFU/100 mL、LC EMA-qPCR 法で 7.8×10^2 CFU/100 mL であり、洗浄前よりも同等あるいはそれ以上の菌数が検出された。

従属栄養細菌数もまた、洗浄前は 7.0×10^4 CFU/mL だったのが、洗浄したことで $5.4 \sim 7.7 \times 10^3$ CFU/mL に減少し、洗浄後 2 か月後以降には $4.8 \sim 6.3 \times 10^5$ CFU/mL となり、洗浄前よりも増加した。

これらのことから、2 回の洗浄は、1 回よりもレジオネラ属菌を洗浄、除染する効果が高く、その状態は 4 か月程度維持できていた。

なお、蛇口から直接水道水を採水した検体からは、qPCR 法及び LC EMA-qPCR 法でレジオネラ属菌は検出されなかった。

調査対象とした洗濯機において、レジオネラ属菌の分離培養の結果は全ての検体（蛇口から直接水道水を採水した検体を含む）で不検出（レジオネラ属菌を疑うコロニーの発育を認めず）だった。培養前の熱・酸処理及び EB 加酸処理で培地上の雑菌は抑制され、レジオネラ属菌が発育可能な条件は整っていたと考えられるが、LC EMA-qPCR 法でレジオネラ属菌が検出された検体（洗浄前及び洗浄後 7 か月経過）においても不検出だった

16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスで取得した菌叢解析の結果から、*Legionella* 科あるいは属に分類された ASV を精査した。洗浄前検体の ASV_710 並びに洗浄後 7 か月経過検体の ASV_114 及び ASV_393 がレジオネラ属菌の配列に該当し、ASV_710 が 0.10%、ASV_114 と ASV_393 は、それぞれ 0.41%、0.02% 存在していた（表 1）。それぞれの ASV 配列の BLAST 検索の結果は、いずれも上位が Uncultured *Legionella* sp. で占められ、その最上位配列との一致率は ASV_710 及び ASV_393 で 100.00%、ASV_114 で 99.53% だった。培養及び 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスの結果から、洗濯機

中に存在したレジオネラ属菌は、VBNC 状態や人工培地では増殖しにくい菌種と考えられた。

以上の通り、洗濯機はレジオネラ属菌による汚染・増殖が起こる環境であり、潜在的な感染源になり得ると推測された。洗浄によってレジオネラ属菌を完全に除去することは困難であり、定期的な洗浄でレジオネラ属菌を抑制し続ける必要があった。

次に 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスに基づき、各検体の上位 15 属を抽出し、それらを統合した計 38 属の菌叢推移を図示した（図 2）。結果として、塩素洗浄により菌叢は一時的に単純化し、特定の属が優占化したが、その後の時間経過と共に再び洗浄前に近い構成へと戻る傾向であった。一方、バイオフィーム形成に関与するとされる *Mycobacterium* 属[8]は、1 回の洗浄では相対存在率に大きな変化はなかったが、2 回目の洗浄後には相対的に低下した。複数回の洗浄は、バイオフィーム除去を、より促進できる可能性が示唆された。バイオフィームの存在はレジオネラ属菌の増殖基盤となり、塩素耐性を高めることが知られており[9]、バイオフィームを除去することは汚染軽減に重要である。入浴施設は、洗濯機と同様、高濃度塩素消毒を頻回に実施する衛生管理が有用と推測される。

D. 結論

洗濯機には、レジオネラ属菌が定着・増殖できる環境が存在することを改めて確認した。洗浄を複数回実施することで、より効果的にレジオネラ属菌及びバイオフィームの除去が促進され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;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;37:140-141.
3. レジオネラ症 2013～2023 年. IASR. 2024;45:133-140.
4. 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.
5. Hayes-Phillips D, Bentham R, Ross K, Whiley H. Factors influencing *Legionella* contamination of domestic household showers. Pathogens. 2019, 8:27.
6. 黒木俊郎, 陳内理生, 中嶋直樹, 佐原啓二. 家庭用洗濯機におけるレジオネラ属菌の汚染実態. 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」, 令和5年度分担研究報告書.

7. Inoue H, Taguchi M, Kitazume M, Saito Y, Iwasawa T. Ethambutol inhibited the growth of acid-fast bacteria and enhanced the detection of *Legionella* in environmental water samples. J Microb Control. 2024;29:1-7.
8. Steed KA, Falkinham JO 3rd. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. Appl Environ Microbiol. 2006, 72:4007-4011.
9. Cooper IR, Hanlon GW. Resistance of *Legionella pneumophila* biofilms to chlorine-based disinfection. J Hosp Infect. 2010, 74:152-159.

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(予定を含む)

該当なし

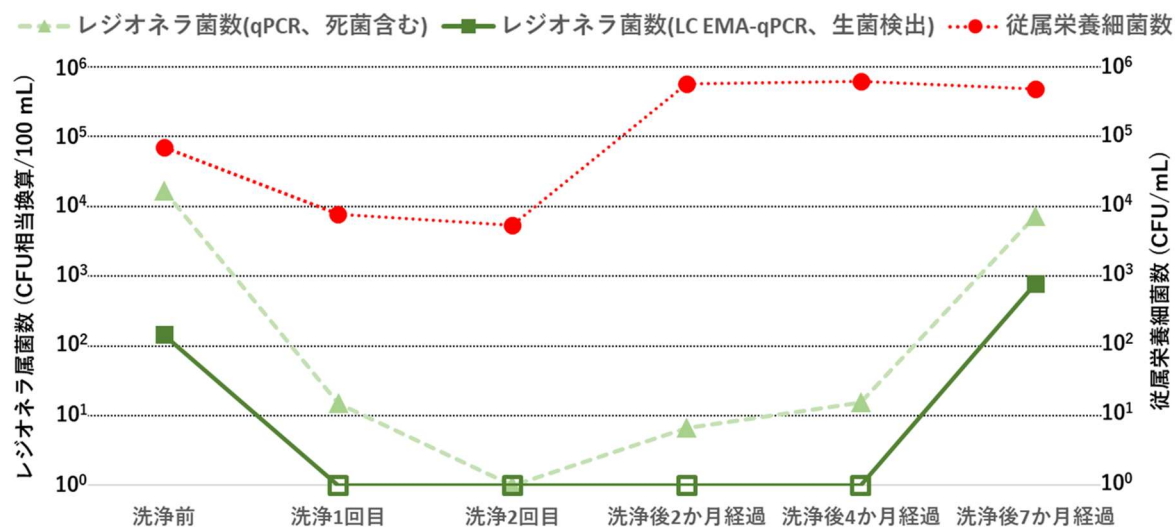


図1 家庭用洗濯機 (N=1) における洗浄前後の菌数の推移
白抜きマーカーは検出限界未満(1 CFU/100 mL 未満)を示す。

表1 レジオネラ属関連 ASV の検出結果

16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンス結果							BLAST検索結果			
ASV ID	属レベルまで同定されたリードに基づく相対存在率(%)						最上位 該当菌種	Accession 番号	一致率 (%)	配列長 (bp)
	洗浄前	洗浄 1回目	洗浄 2回目	洗浄後 2か月	洗浄後 4か月	洗浄後 7か月				
ASV_710	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	Uncultured <i>Legionella</i> sp.	AB858029.1	100.00	427
ASV_114	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41	Uncultured <i>Legionella</i> sp.	AY924021.1	99.53	427
ASV_393	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	Uncultured <i>Legionella</i> sp.	LC278637.1	100.00	427

ASV: Amplicon Sequence Variant

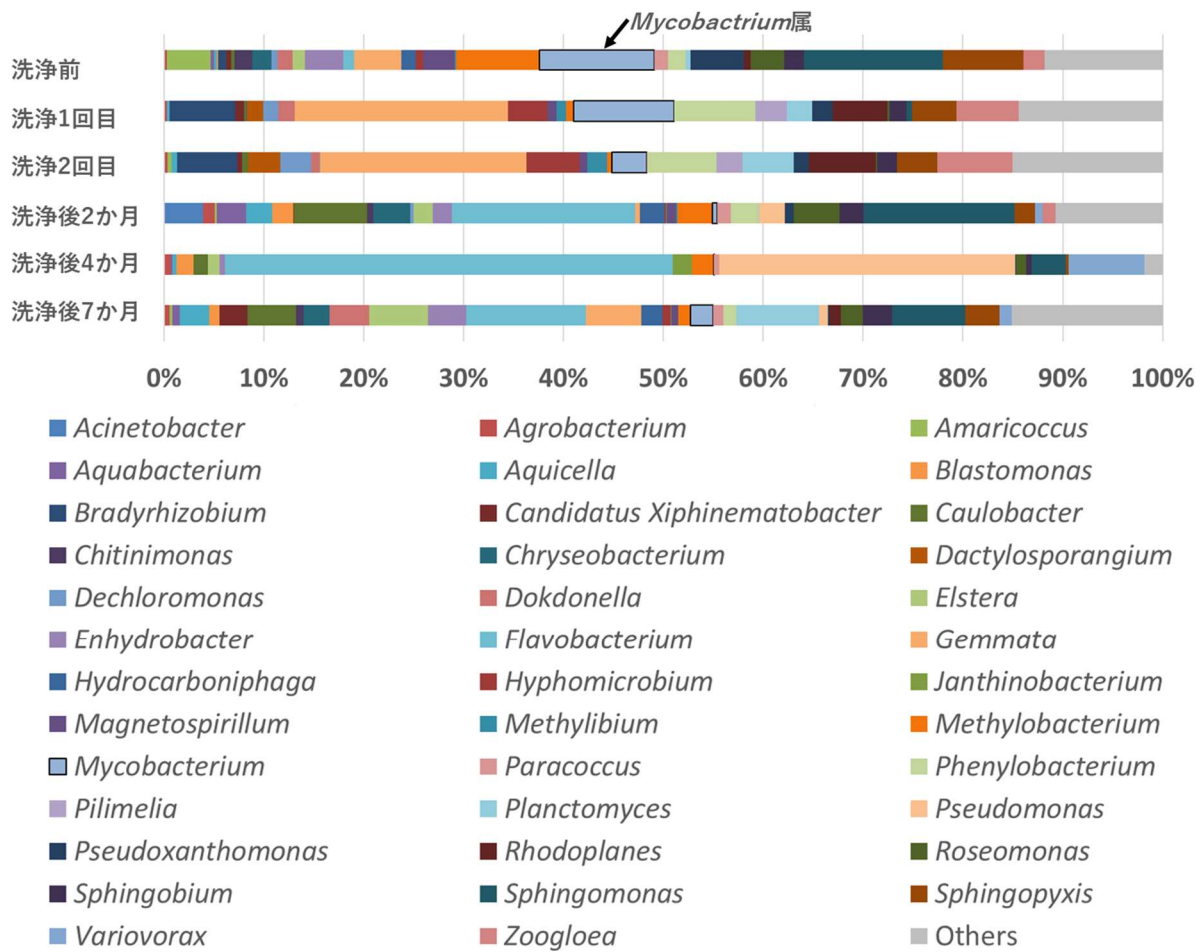


図2 家庭用洗濯機 (N = 1)における洗浄前後の菌叢
各検体における上位 15 属を抽出し、それらを統合した 38 属を図中に示した。各検体で 17～32 属を表示し、その他の属は Others に集約した。