

しては、次年度の課題としてさらに検討を進めたい。

一方、菌の感染性については、実際の浴槽水に存在する菌にはどの程度の感染性があるのか、またそれが実際にヒトの感染に結びつくのかどうか、という問題が残されている。本研究では、この菌による汚染と感染との関係において、解析が小規模で簡便になるように浴槽に近似したモデル実験系を作成し、菌の生存性と感染性の関係を調べた。その結果、興味深いことにアメーバ外に出た菌は水中で長期に維持されるものの、そのアメーバに対する感染性は経時的に低下することが示された。浴槽水中に菌が蓄積し高度な汚染と判断される場合でも、感染力のある菌の数量は極限られることは十分に想定されることが明らかとなった。循環式浴槽システムの微生物叢の増殖は極めて複雑な要因の影響を受けているものと考えられるが、水中に浮遊するレジオネラのアメーバへの感染性が速やかに減衰することは注目される。長期間の試験水暴露で感染性が低下する中で、菌の形態はアメーバ放出時と変わらないことから、BCYE α 培養菌株と言われるような形態の変化、フィラメント化が感染性低下に関連する可能性は少ないと考えられる。一方で、浮遊菌の中には極僅かな割合で感染性を維持する菌が存在するも示された。その意味合いは、細菌学的には生存適応の結果と見ることができるし、公衆衛生的には潜在的な感染リスクの持続ということも言える。その意味では、浴槽水をリサイクルする循環式システム(ろ過装置)はレジオネラ感染アメーバおよび潜在的な感染性のある菌を常に浴槽系内に内在させることになり、そのデメリットは水質浄化能力を超えるものと判断される。

今回観察された菌の感染性の変化に関しては、さらに検討をすすめるとともに、この

モデル実験系を確立し水質による感染性への影響を調査することで、水質による感染のリスクの違いを検討する。また菌の感染性変化の要因を解明し、真に感染性の高い注意すべき菌を的確に検出する技術的開発、検出方法の改良を図ることも次年度の課題としたい。

E. 結 論

アメーバ 1 細胞が内包する菌量によりマウスにおいて感染が成立したことから、菌感染アメーバ自体がエアロゾル以外の感染経路として、レジオネラ感染症の発生メカニズムに介在する可能性が示された。また浴槽に近似したモデル実験系より、アメーバ内増殖菌は水中で長期に生存するものの、アメーバに対する感染性を喪失することが示された。これらの知見はレジオネラ感染症における“dose paradox”問題の解明に宿主アメーバが重要な意味をもつことを明らかにした。

参考論文

1. Brieland J.K. et al., (1996) Coinoculation with *Hartmannella vermiformis* enhances replicative *Legionella pneumophila* lung infection in a murine model of legionnaires' disease. *Infect.Immun.* 64(7):2449-2456.
2. Brieland J.K. et al., (1997) The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of legionnaires' disease. *Infect.Immun.* 65(12):5330-5333.
3. Cirillo J.F., et al., (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect.Immun.* 62:3254-3261.

4. Harb O.S. et al., (2000) From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. Environ. Microbiol. 2(3):251-265.
5. 倉文明

- F. 研究発表
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

- I. 知的財産権の出願・登録状況
なし

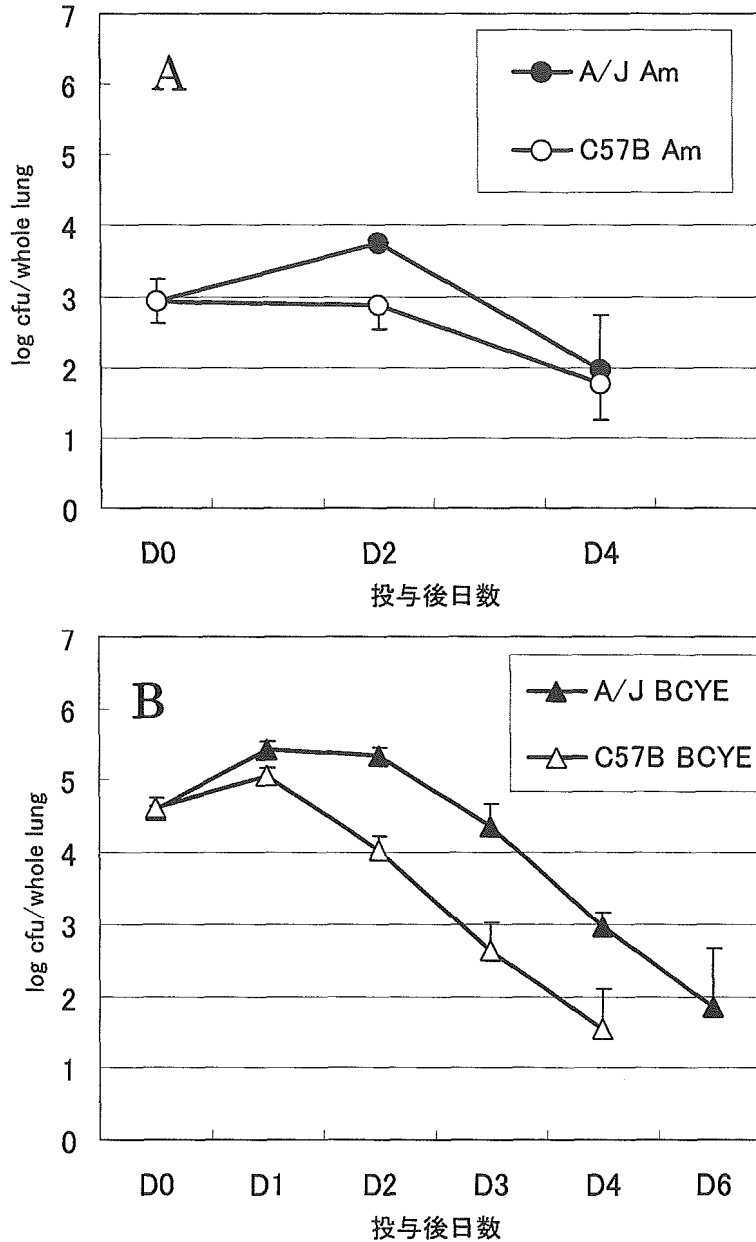


図 1. 単離した感染アメーバ投与(A)および BCYE α 培養菌投与(B)したマウスからの回収菌数の経時変化

感受性マウス(A/J)ならびに抵抗性マウス(C57B)の 2 系統を用い、感染アメーバ(図1A)または、BCYE α 培養菌(図1B)を経鼻的に投与し、継時的に肺から菌の回収を行った。図1Aの0日目(投与直後)の菌数は投与に用いた試料5個体に含まれるレジオネラの平均菌数から求めた。Y軸はマウスの肺からの回収菌数(\log_{10})を示す。

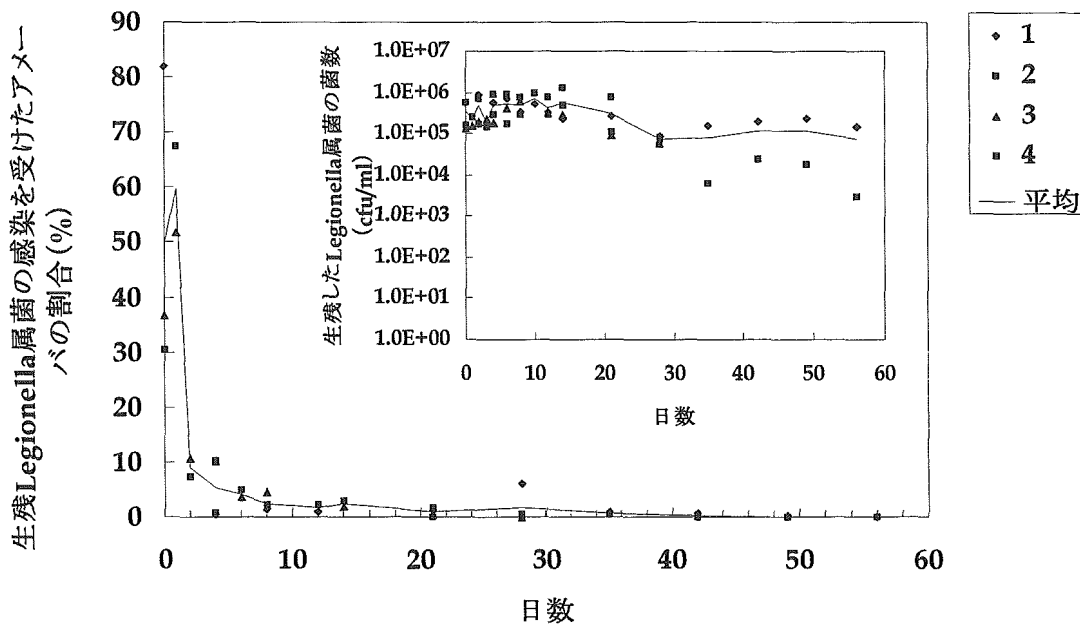


図2. 宿主アメーバから遊出したレジオネラの水における生残性ならびにアメーバに対する感染性の経時変化

右上挿入図: アメーバから遊出したレジオネラの生残菌数(cfu/ml)の経時変化を示す。ボトルより継時的に試料を採取しBCYE α で培養、菌数を測定した。培地での増殖性は8週間の観察期間中に1~2log₁₀程度の低下を記録した。

下図: アメーバへの感染性は短期間のうちに著しく低下した。上述の培養ビンよりレジオネラを回収し、10⁵個のアメーバを入れた25cm²の培養フラスコに10⁶個程度となるようにレジオネラ接種し、2日間共培養した後にアメーバをメタノール固定、ギムザ染色して顕微鏡下でレジオネラの感染状況を観察した。

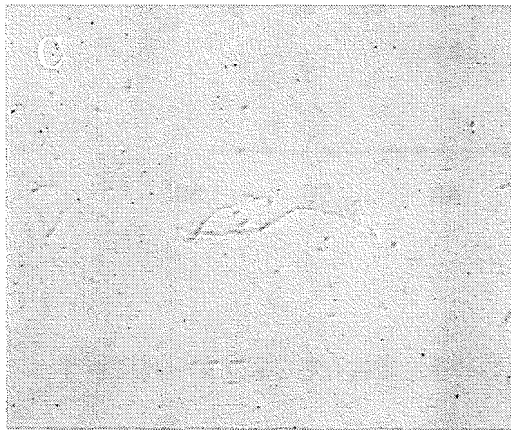
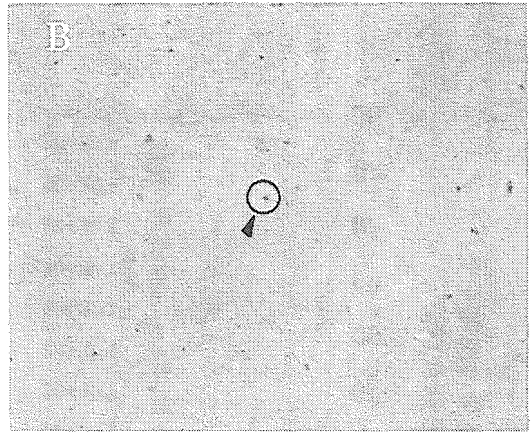
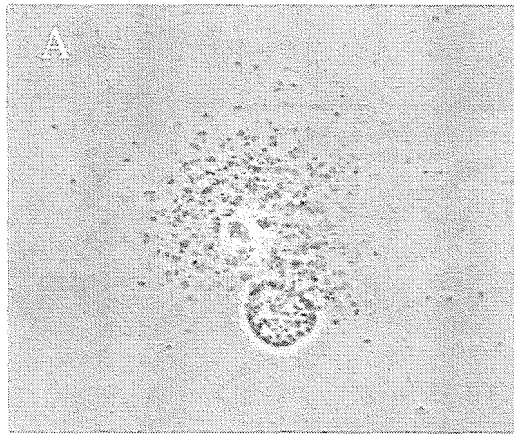


図3. 水注に遊出したレジオネラおよび BCYE α 培地上で増殖するレジオネラの形態

A: 感染アメーバより放出直後の菌 (位相差顕微鏡像). B: 水中に遊出後 8 日目の菌 (矢印の小円内に一つの菌体を示す) (位相差顕微鏡像). C: BCYE α 培地で 5 日間培養の菌で中央にフィラメント化した菌体が観察される (微分干渉顕微鏡像).

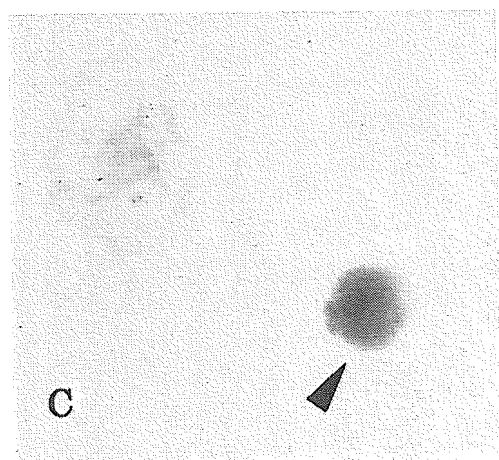
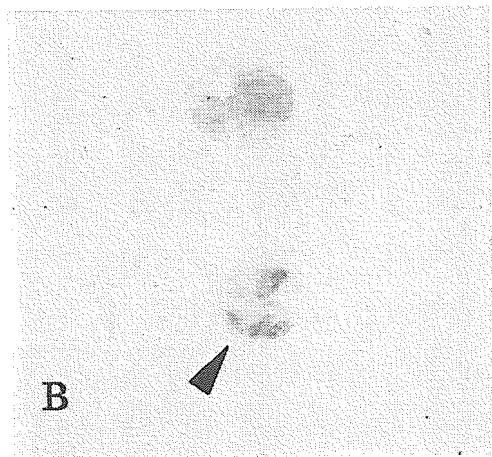
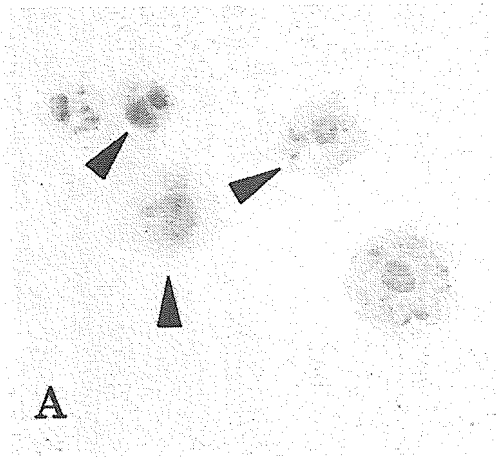


図4. アメーバ由来のレジオネラによる感染

A: 宿主アメーバから遊出直後のレジオネラを新たな宿主アメーバに感染させた。

B: 遊出後 4 日目のレジオネラによる感染像。

C: 同じく、遊出後 8 日目の菌によるアメーバ感染像。

矢印は細胞内で増殖する菌の集塊。いずれも菌とアメーバを2日間共培養して得られた像。(ギムザ染色)

循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究

「HACCP システムの導入を伴う循環式浴槽の管理について」

主任研究者 国立感染症研究所寄生動物部 遠藤卓郎
分担研究者 神奈川県衛生研究所微生物部 黒木俊郎

研究概要：レジオネラ症の防止のために公衆浴場や旅館の浴槽の管理について、厚生労働省から種々の要領が発行されている。これらは清掃・消毒にいたるまで記載されているが、実際の浴槽の管理の現場ではさらに細かい留意点や重点的に管理すべき個所があることは容易に想像される。そこで、循環式浴槽の衛生管理について、一般衛生管理における重点管理項目を検討するとともに、HACCP システムの導入の留意点をまとめた。

A. はじめに

厚生労働省が旅館・公衆浴場などにおけるレジオネラ症防止対策として、以下のような通知を発行している。

1. レジオネラ症の知識と浴場の衛生管理
2. レジオネラ症防止対策について（平成 11 年 11 月 26 日）
3. 循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルについて（平成 13 年 9 月 11 日）
4. 公衆浴場法第 3 条第 2 項並びに旅館業法第 4 条第 2 項及び同法施行令第 1 条に基づく条例等にレジオネラ症発生防止対策を追加する際の指針について（平成 14 年 10 月 29 日）
5. 公衆浴場における衛生等管理要領

等の改正について（平成 15 年 2 月 14 日）

6. 参考：レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針（平成 15 年 7 月 25 日）

こうした通知には浴槽・浴場の遵守すべき基準や一般衛生管理の内容などが記載され、あるいは解説されている。さらに、こうした通知に基づいて各自治体はレジオネラ対策のための条例などを定めており、これらに従って公衆浴場や旅館においては浴場の衛生管理が行われている。しかし、厚生労働省の通知や自治体の通知などでは一般的な項目が記載されていないものの、実際の管理、特にレジオネラなどの微生物の侵入や増殖を抑え、微生物学的安全性を確保するための管理

には細かい事項にまで配慮した換水、清掃、消毒などが必要である。そこで、本研究では浴場・浴槽の衛生管理において重点的に管理すべき個所や事項を挙げ、さらに HACCP システムの導入を図ることで、より効果的かつ効率的に衛生管理を進めることが可能となるように、管理手法の検討を行った。

B. 衛生管理における重点項目

レジオネラなどの微生物の定着、増殖を防ぐには、菌を入れない、増やさない、殺す、が基本である。貯湯槽、配管、濾過槽および浴槽といった、浴槽とその周辺の機器、装置を洗浄、消毒することは不可欠である。しかし、何の配慮もなくただ漫然と浴槽の管理を行っていると気付かないうちに微生物が定着し、増殖してしまう。細かい配慮をすることで微生物の侵入や増殖を防がなければならない。

公衆浴場や旅館の浴槽などの管理には厚生労働省の衛生等管理要領などがある。これらには以下のように、水質基準や浴槽などの清掃方法などが示されている。

〔1〕原湯、原水、上り用湯の水質基準

- ア 色度は、5度以下であること。
- イ 濁度は、2度以下であること。
- ウ 水素イオン濃度は、pH値 5.8～8.6 であること。
- エ 過マンガン酸カリウム消費量は、10mg/L 以下であること。
- オ 大腸菌群は 50mL 中に検出されないこと。
- カ レジオネラ属菌は、検出されない

こと (10cfu/100mL 未満)。

〔2〕浴槽の水質基準

- ア 濁度は、5度以下であること。
- イ 過マンガン酸カルウム消費量は、25mg/L 以下であること。
- ウ 大腸菌群は、1個/mL 以下であること。
- エ レジオネラ属菌は、検出されないこと (10cfu/100mL 未満)。

〔3〕ろ過器の構造

- 1) ろ過器は、1時間当たり浴槽の容量以上のろ過能力を有し、かつ、逆洗浄等の適切な方法でろ過器内のごみ、汚泥等を排出することができる構造であるとともに、ろ過器に毛髪等が混入しないようろ過器の前に集毛器を設けること。
- 2) 浴槽における原水又は原湯の注入口は、湯水を浴槽とろ過器との間で循環させるための配管(以下「循環配管」という。)に接続せず、浴槽水面上部から浴槽に落とし込む構造とすること。
- 3) 循環してろ過された湯水が浴槽の底部に近い部分から補給される構造とし、当該湯水の誤飲又はエアロゾルの発生を防止すること。
- 4) 浴槽水の消毒に用いる塩素系薬剤の注入又は投入口は、浴槽水がろ過器内に入る直前に設置されていること。

〔4〕ろ過器の構造設備

- 1) ろ過器は、1時間当たり浴槽の容量以上のろ過能力を有し、かつ、逆洗浄等の適切な方法でろ過器内のごみ、汚泥等を排出することができる構造であるとともに、ろ過器に毛髪等が混入しないようろ過器の前に集毛器を設けること。
- 2) 浴槽における原水又は原湯の注入口は、湯水を浴槽とろ過器との間で循環させるための配管(以下「循環配管」という。)に接続せず、浴槽水面上部から浴槽に落とし込む構造とすること。
- 3) 循環してろ過された湯水が浴槽の底部に近い部分から補給される構造とし、当該湯水の誤飲又はエアロゾルの発生を防止すること。
- 4) 浴槽水の消毒に用いる塩素系薬剤の注入又は投入口は、浴槽水がろ過器内に入る直前に設置されていること。

〔5〕その他の設備構造

打たせ湯及びシャワーは、循環している浴槽水を用いる構造でないこと。

内湯と露天風呂の間は、配管等を通じて、露天風呂の湯が内湯に混じることのない構造であること。

オーバーフロー回収槽(以下「回収槽」という。)内の水を浴用に供する構造になっていないこと。ただし、

これにより難しい場合には、回収槽は、地下埋設を避け、内部の清掃が容易に行える位置又は構造になっているとともに、レジオネラ属菌が繁殖しないように、回収槽内の水が消毒できる設備が設けられていること。

- (1) 水道水以外の水を原水、原湯、上り用水及び上り用湯として使用する場合は、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」に適合していることを確認したものであること。
- (2) 原湯を貯留する貯湯槽(以下「貯湯槽」という。)の温度を、通常の使用状態において、湯の補給口、底部等に至るまで60℃以上に保ち、かつ、最大使用時においても55℃以上に保つ能力を有する加温装置を設置すること。それにより難しい場合には、レジオネラ属菌が繁殖しないように貯湯槽水の消毒設備が備えられていること。

〔6〕衛生管理

- 1) 浴槽は毎日完全に換水して浴槽を清掃すること。ただし、これにより難しい場合にあっても、1週間に1回以上完全に換水して浴槽を清掃する。
- 2) ろ過器及び循環配管は1週間に1回以上、ろ過器を十分に逆洗浄して汚れを排出するとともに、ろ過器及び循環配管について、適切な消毒方法で生物膜を除去する。

- 3) 集毛器は毎日清掃する。
- 4) 貯湯槽は生物膜の状況を監視し、必要に応じて清掃及び消毒する。
- 5) 調整箱（洗い場の湯栓、シャワーへ湯を送る箱）は適宜清掃及び消毒する。
- 6) 浴室内の排水口は適宜清掃し、汚水を適切に排水する。
- 7) その他の設備は必要に応じて清掃及び消毒する。

浴槽水の消毒に当たっては、塩素系薬剤を使用し、浴槽水中の遊離残留遊離塩素濃度を頻繁に測定して、通常 0.2 ないしは 0.4mg/L 程度を保ち、かつ、遊離残留遊離塩素濃度は最大 1.0mg/L を超えないよう努めること。また、当該測定結果は検査の日から 3 年間保管すること。

ただし、原水若しくは原湯の性質その他の条件により塩素系薬剤が使用できない場合、原水若しくは原湯の pH が高く塩素系薬剤の効果が減弱する場合、又はオゾン殺菌等他の消毒方法を使用する場合であって、併せて適切な衛生措置を行う場合には、この限りではない。

以上のように、厚生労働省の通知により浴場の設備構造やそれらの清掃・消毒方法が示されており、これを実施することでレジオネラなどの病原微生物の汚染や増殖をかなり防ぐことはできる。しかし、実際の現場ではさらに細部にわたる管理を徹底することが要求され、それに

より安全な浴槽環境を維持することが重要であると考えられる。そこで、清掃や消毒、温度管理などについて、留意すべき事項を検討した。

1. 清掃

バイオフィームは適度な水分がある硬いものの表面に付着するようにして形成されるが、レジオネラは形成されたバイオフィームの中で増殖する。したがって、バイオフィームの徹底的な除去が必要である。浴槽の壁面や配管の内部はブラッシングや消毒によりバイオフィームを除くことができる。しかし、ブラシや消毒剤が届かないために部分的に残ってしまう場合がある。浴槽や配管の清掃・消毒が十分に行われていても、部分的にバイオフィームが残っていればレジオネラはそこで増殖している。バイオフィームが残りやすい場所からレジオネラは泳ぎ出し、浴槽水を汚染し、感染を引き起こす。例えば、注湯口に木が使われていると消毒剤が届かないために消毒がしにくかったり、ブラッシングのやり残しがあるためにバイオフィームが除去できないようなことが起きやすくなる。

浴槽などの材質によってもバイオフィームが形成されやすい材質、ブラッシングや消毒がやりにくい材質があり、こうした性質を熟知していなければならない。浴槽やその周辺に用いられる材質は木、FRP、石、コンクリート、タイルがある。FRP やタイルの表面は平滑であるため、清掃や消毒が容易であるが、タイルの目地はバイオフィームが残りやすい。木が

浴槽に用いられると高級感や安らぎ感が得られ、温泉の付加価値が増す要因となる反面、塩素消毒により脱色される、ブラッシングにより表面が荒れる、荒れた表面にはバイオフィームが形成されやすくなり、消毒が届きにくくなる、といった欠点があり、管理が容易ではない。

特に留意すべき、重点的に清掃・消毒を行うことが必要と思われる個所を表 1 に掲げた。

2. 消毒

レジオネラ対策では浴槽水の塩素による消毒は 0.2~0.4ppm に保ち、1.0ppm を越えないようにするとされている。泉質や浴槽あるいは配管、循環装置の状況などにより、規定の濃度内であってもそれを低めにしているとレジオネラが定着・増殖することがある。

高濃度の塩素あるいはその他の化学的消毒薬による消毒の頻度、通常の洗浄・清掃の方法とその頻度、浴槽の換水の頻度といった管理の状況と、塩素消毒のやり方がバランスの取れていなければならない。例えば、通常の浴槽の塩素の濃度を低めに設定するのであれば、高濃度塩素による消毒の頻度や浴槽の完全換水による洗浄の頻度を多くする必要がある。

塩素剤の自動注入あるいは担当者による塩素剤の手操作による塩素剤の投入による塩素の濃度は、後述の HACCP システムにおける管理点となる。

3. 温度

レジオネラなどの病原菌を殺すために

は消毒とともに、加温が効果的である。厚生労働省の通知では、貯湯槽を使用している場合は、湯の補給口、底部等に至るまで 60℃以上に保ち、かつ、最大使用時においても 55℃以上に保つようにすることとされている。貯湯槽内の水温は、季節変動、源泉の状況などにより変化することがある。55℃以上を保てるように加温装置を設置するとともに、水温を頻繁に確認する必要がある。

C. HACCP システムの導入

昨年度の報告書では HACCP システムの導入を踏まえて、その概要をまとめた。実際に温泉施設に HACCP システムを導入する際には、何か難しいことをやらなければならない、あるいは余計な経費がかかることを始めなければならないといった誤った印象を与える可能性がある。そこで、通常行われている浴槽などの管理に如何にスムーズに HACCP システムの概念を導き入れていくかを検討した。

HACCP システムの導入にあたっては、1~12 の手順を順次に進めていくことが求められる。そこで、既に十分に衛生管理が行われていることを前提にして、温泉施設に導入する場合に即した手順を考案した。

手順 1 HACCP チームの編成（誰が何をするかを明確にする）

漠然と全員が参加するのではなく、浴槽水の管理における役割を明確にする。

管理に携わる人の役割分担を再確認あるいは役割を新たに分担する。必要に応

じて書き記す。

手順 2 製品の記述（管理の対象を明確にする。）

HACCP の対象は浴槽水となる。浴槽水を安全で安心できるように管理することを再確認する。

手順 3 意図される使用方法の確認

浴槽の利用者の利用方法を明らかにしておく。気泡発生装置の有無、浴槽ごとの泉質の違い、内湯と露天風呂での客の入浴状況の違いなどを再確認する。

手順 4 製造工程一覧図及び施設の図面

浴槽に関連した設備や一連の配管の設置の構造を把握する。設備担当者と風呂担当者が設備の構造を再確認する。必要に応じて概略図を作る。作業書を作成する。

手順 5 現場確認

現場を確認する。あらためて浴槽などの構造を再確認する。

手順 6 危害分析（HA）

レジオネラが侵入して増殖しやすい場所を特定する。

レジオネラが増殖しやすい場所を復習する。レジオネラは温度と pH などが適当であれば源泉から浴槽までのどこでも増殖する。侵入する場所はどこか、特に増えやすい場所はどこかを知っておく。

手順 7 重要管理点（CCP）の特定

源泉から浴槽までに重要管理点となるのは、塩素濃度と水温がある（その他に pH、紫外線量など）。重要管理点の設定に際して作成する「重要管理点整理表」の 1 例を表 1 に示した。

日常行っている温度管理、塩素濃度管理が重要であることを再確認する。実施していないのであれば重要性を確認する。

清掃や消毒のときに、どこを重点的にするか、どこを注意すればよいかを決める。

測定方法や測定個所のマニュアルを作り、あるいは見直しを行い、測定値を記録簿に記録する。

手順 8 管理基準の設定

残留遊離塩素濃度はおおむね 0.2～0.4mg/L とすることが望ましいとなっており、水質基準では 1.0mg/L を越えないように努めるとなっていることから、管理基準を 0.2～1.0mg/L とする。実際の運用では、操作基準（Operation limit）を例えば 0.3～0.8mg/L とする。

温度管理では、貯湯槽の温度の管理基準を 60～75℃以上とし、操作基準を例えば 65～80℃とする。

既に塩素消毒や温度管理を行っているのであれば、通常の管理が正しいかどうかを再確認する。

手順 9 モニタリング方法の設定

モニタリングは重要管理点に定められた項目をリアルタイムに、あるいは高い頻度で計測する。

通常の測定が正しいかどうかを再確認する。測定したら記録する。

手順 10 改善措置の設定

モニタリングの対象とした残留遊離塩素濃度と貯湯槽の温度が操作基準から逸脱した場合の改善措置を設定する。

規定値から外れたらどうするかを再確認する。マニュアルを作成する。

手順 11 検証方法の設定

1. 作業書に従って管理を進め、これによりレジオネラの増殖がないことを確認するために、定期的にレジオネラ検査を依頼する。

どこにどのくらいの頻度で検査依頼するかを決めて、マニュアルに記載する。

2. モニタリングの対象である残留遊離塩素濃度の測定に使用するキットや測定器の信頼性を検証するための方法を定める。必要に応じてメーカーなどに相談する。

手順 12 記録保存及び文書作成規定の設定

モニタリングの結果や重点管理点の実施状況は記録を残し、保存する。

いつもの記録が重要であることを再確認する。必要な記録簿を作成し、誰が記録するか、どこにおいておくかなどを決める。

以上を受けて、清掃や消毒方法の見直し、マニュアルや記録簿の作成や変更を行う。これらに従って管理を進めていく。

D. 清掃や消毒の実施方法、その他の衛生的管理方法の検討

実施方法を検討あるいは見直す際に、レジオネラ等の病原菌に対して十分な効果があるという科学的根拠などに基づいてその方法を決めることが重要である。

例えば、浴槽の清掃は洗剤だけでは不十分であり、殺菌効果のある消毒剤を併用することが望ましい。また、こうした清掃・消毒は1週間に1度ではその間にレジオネラ等が増殖する可能性が高く、少なくとも3日に1度の頻度とすることが望まれる。

[1] マニュアル（作業書）の必要性

1. いつも決められた内容で行うことができる。
2. 担当者が代わっても同じ内容で実施できる。
3. 新人にそのまま伝えることができる。
4. 記録簿に詳細を記載しなくても実施内容を把握できる。
5. 問題の発生時に原因を探しやすい。
6. 内容を変更した場合に伝達が容易になる。

[2] そろえるべきマニュアルの例

貯湯槽

温度管理マニュアル

清掃・消毒マニュアル

異常発生時対応マニュアル

浴室

- 清掃マニュアル
- 日常管理マニュアル
- 異常発生時対応マニュアル

浴槽

- 温度管理マニュアル
- 湯張りマニュアル
- 清掃マニュアル
- 消毒マニュアル
- 異常発生時対応マニュアル

濾過装置

- 日常管理マニュアル
- 清掃・消毒マニュアル
- 異常発生時対応マニュアル

配管、ヘアキャッチュー

- 日常管理マニュアル
- 清掃・消毒マニュアル
- 異常発生時対応マニュアル

自動塩素注入装置

- 日常管理マニュアル
- 保守点検マニュアル
- 異常時対応マニュアル

その他の各種装置

- 日常管理マニュアル
- 保守点検マニュアル
- 異常発生時対応マニュアル

〔3〕記録簿の作成あるいは見直し

記録簿の様式は特に決められているわけではないので、使いやすいものを作成

する。既に使用されている記録簿があれば、見直して、必要に応じて変更する。記録簿は必ず2重チェックができるようにする。すなわち、記録の内容により毎日、1週間あるいは1ヶ月などに1度、記録の記入者以外の管理責任者が記録簿を確認できるように作成する。記録簿の1例を示した(表2)。

〔4〕危害調査およびCCPの設定

レジオネラは源泉から温泉が湧出してから浴槽までどこでも増殖する可能性がある。したがって、危害の発生個所は全個所となる。しかし、そのなかでレジオネラが侵入する場所、特に増殖しやすい場所があるため、そこを重点的に頻繁に対応することになる。

その個所は貯湯槽などの槽状構造物、濾過装置、ヘアキャッチュー、注湯口および浴槽である。これらの場所はレジオネラが侵入する場所であり、そこで増殖しやすい構造ともなっている。

これに対して配管中は基本的にレジオネラは侵入せず、上流から流れてくる。構造的に清掃や消毒が難しい面もある。上流を適切に管理することで配管の清掃や消毒の頻度を減らすことが可能となる。HACCPにおける重要管理点の設定条件は、リアルタイムで監視することで安全性を確保することである。循環式浴槽では塩素濃度と貯湯槽などの温度、場合によっては温泉水のpHが条件に当てはまる。貯湯槽での水温が60℃の達せず、温泉水への塩素添加を行わない浴槽では、換水と清掃、消毒によりレジオネラを発

生させない管理をすることになる。

E. 考察

浴槽の湯を循環するのは、ろ過装置によりゴミや汚れを取り除き、あるいは加熱器により水温を 40～42℃程度に保つことで、湯の数日にわたる利用を可能にすることを目的にしている。しかし、このように湯が維持されると、装置や設備の湯に接している表面にバイオフィームが形成され、そこはレジオネラ属菌にとって定着・増殖に適した環境となる。そのため、レジオネラ症の発生を防ぐためには換水と清掃・消毒による効率的な徹底した管理が不可欠となる。

浴槽を含む源泉から貯湯槽、ろ過装置、集毛器とそれらをつなぐ配管といった一連の設備・装置の管理は、一般衛生管理が行われるのが普通であり、厚生労働省のレジオネラ症の防止対策に関するマニュアルでも示されている。一般衛生管理

一般衛生管理に加え HACCP システムにより効率的にレジオネラ症の予防のための管理が行えることが期待される。双方を適切に進めることでその効果の確実性が保たれ、また向上する。すなわち、レジオネラ属菌を含めた微生物の侵入、定着、増殖を防ぎ、浴槽の微生物学上の安全性を確保することができる。

HACCP システムでは最終産物（浴槽水）が基準を満たし、危害が存在しないようにするだけではなく、源泉から貯湯槽、ろ過装置、加熱器などの途中の段階においても同様であること、つまり浴槽に入る直前あるいは浴槽において危害を

取り除くのではなく、どの部位においても危害が存在しないことを目指す。さらに、レジオネラの増殖・定着を防ぐための残留遊離塩素濃度を重要管理点として監視することにより効率的に管理することができる。

循環式浴槽の形態・形式は様々であり、全てを同じ様式で管理することは不可能であり、各々の施設や浴槽に適した管理を行わなければならない。それぞれの構造や規模、泉質、環境に合わせて管理の詳細を構築し、HACCP システムを導入して徹底した管理を行うことが重要である。これにより、安全で安心できる浴槽を提供することが欠かせない。そのため指針を本研究班において作成することを今後とも継続して行っていく。

F. 参考文献

1.新宮和裕：HACCP 入門 pp111、2004年、日本規格協会、東京。

G. 健康危機管理情報

なし

H. 研究発表

誌上発表

なし

学会発表

なし

表 1 重点的に清掃・消毒を行う必要がある個所

個所	材質	留意点
浴槽壁面	木	ブラッシングがしづらい 消毒が届きにくい
浴槽壁面	タイル	目地までブラシや消毒が 届きにくい
浴槽壁面	石、岩	ブラッシングがしづらい 消毒が届きにくい
注湯口	木	消毒薬が届かない 裏面などは忘れられがちで 清掃が不十分となりやすい
浴槽内の 木質部	木	消毒の効果小 清掃が行き届かない
配管の パッキン	ゴム プラスチック	清掃できない 消毒が行き届かない
貯湯槽 水位計など	不問	清掃・消毒が困難
配管 (源泉から給湯用)	不問	清掃・消毒が困難
配管 (貯湯槽からの給湯用)	不問	清掃・消毒が困難

表 2 重要管理点整理表の 1 例

CCP 番号	CCP 1
危害が発生する場所	浴槽
危害	レジオネラ属菌の増殖
危害の発生要因	残留遊離塩素濃度の低下
防止措置	残留遊離塩素濃度の管理
管理基準	残留遊離塩素濃度 0.2~1.0ppm
操作基準	残留遊離塩素濃度 0.3~0.8ppm
モニタリング方法 頻度 担当者	〇〇〇法で残留遊離塩素濃度を測定する。 営業 1 時間前から営業終了まで 2 時間毎 浴槽担当者
改善措置方法	管理基準を逸脱した場合、 <0.3ppm であれば管理基準に達するように 塩素を注入する。 >0.8ppm であれば直ちに塩素注入を止め、原因を探す。
検証方法	残留遊離塩素濃度の記録簿を確認する。1 日 1 回 レジオネラ属菌の検査 (年 2 回)
記録文書名	残留遊離塩素・湯温測定記録簿：残留遊離塩素濃度と 湯温
内容	塩素注入装置運転記録：注入装置の稼動状況

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Chang B, Kura F, Amemura-Maekawa J, Koizumi N, Watanabe H: Identification of a novel adhesion molecule involved in virulence of *Legionella pneumophila*. Infect Immun 73: 4272-4280, 2005.
2. Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, and Watanabe H: *Legionella pneumumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan from a distinct genetic cluster. Microbiol Immunol 49:1027-1033, 2005.
3. Kura F, Amemura-Maekawa J, Yagita K, Endo T, Ikeno M, Tsuji H, Taguchi M, Kobayashi K, Ishii E, Watanabe H: Outbreak of legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5. Epidemiol Infect, 134, 385-391, 2006.
4. K. Ohata, K. Sugiyama , M. Suzuki , R. Shimogawara , S. Izumiyama, K. Yagita, T. Endo: Growth of Legionella in Non-sterilized Naturally Contaminated Bath Water in Facility Which Mechanically Circulates and Purifiesthe Water. (in preparartion)
5. K. Sugiyama, K. Ohata, M. Suzuki, R. Shimogawara , S. Izumiyama , K. Yagita, T. Endo: Inhibition of Legionella Growth in Circulation Bathing Water by Filter Refreshment Method Using High Concentration Chlorine. (in preparartion)
6. 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. レジオネラ症 Update ー宿主アメーバからみたレジオネラの水系汚染対策. 臨床と微生物 32(4), 383-388, 2005.
7. 岡田美香, 河野喜美子, 倉 文明, 前川純子, 渡辺治雄, 八木田健司, 遠藤卓郎, 鈴木 泉 : 循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 I. 発症状況と環境調査、感染症誌 79(6):365-74、2005.
8. 藤井 明、河合自立、松田和也、杉山寛治、大畑克彦、鈴木光彰、加藤宏一 : 循環ろ過式モデル浴槽系内におけるバイオフィーム形成とその洗浄・殺菌について. 生活と環境 51 (2) : 67-73、2006.

Identification of a Novel Adhesion Molecule Involved in the Virulence of *Legionella pneumophila*

Bin Chang, Fumiaki Kura, Junko Amemura-Maekawa, Nobuo Koizumi, and Haruo Watanabe*

Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Received 2 September 2004/Returned for modification 23 November 2004/Accepted 24 February 2005

Legionella pneumophila is an intracellular bacterium, and its successful parasitism in host cells involves two reciprocal phases: transmission and intracellular replication. In this study, we sought genes that are involved in virulence by screening a genomic DNA library of an *L. pneumophila* strain, 80-045, with convalescent-phase sera of Legionnaires' disease patients. Three antigens that reacted exclusively with the convalescent-phase sera were isolated. One of them, which shared homology with an integrin analogue of *Saccharomyces cerevisiae*, was named *L. pneumophila* adhesion molecule homologous with integrin analogue of *S. cerevisiae* (*laiA*). The *laiA* gene product was involved in *L. pneumophila* adhesion to and invasion of the human lung alveolar epithelial cell line A549 during in vitro coculture. However, its presence did not affect multiplication of *L. pneumophila* within a U937 human macrophage cell line. Furthermore, after intranasal infection of A/J mice, the *laiA* mutant was eliminated from lungs and caused reduced mortality compared to the wild isolate. Thus, we conclude that the *laiA* gene encodes a virulence factor that is involved in transmission of *L. pneumophila* 80-045 and may play a role in Legionnaires' disease in humans.

Legionellae are gram-negative, rod-shaped bacteria that are ubiquitous inhabitants of biofilms in aquatic environments or moist soil and replicate as intracellular parasites of protozoa (12, 45, 46). Although approximately 50 species of *Legionella* are known, the majority of Legionnaires' disease cases are attributed to *Legionella pneumophila*, particularly serogroup 1 (12, 53). *L. pneumophila* causes two distinct clinical infections in humans: a potentially lethal pneumonia called Legionnaires' disease (13) and a self-limiting, flu-like disease known as Pontiac fever (17). Upon transmission to individuals through aerosols containing *L. pneumophila*, the bacteria adhere to and enter into the alveolar pulmonary macrophages and/or epithelial cells (8, 34, 36, 55) by coiling or conventional phagocytosis (22, 40). Subsequently, the bacteria replicate within the phagosomes, which interact with mitochondria, smooth vesicles, and ribosomes, but the phagosomes do not acidify or fuse with the lysosomes for at least 8 h after infection (21, 53). Lastly, when the amino acids of the host cells become scarce, the cells eventually lyse and intracellular *L. pneumophila* organisms escape from the depleted cells and are transmitted to a new host (21, 53). Adhesion to and entry into host cells are considered to be the primary and indispensable steps for infection by *L. pneumophila*.

In many microbial infections, expression of virulence genes is modulated in response to the different environments encountered at the site of infection (28, 31). The discovery and characterization of genes specifically induced in patients upon infection are indispensable in studying bacterial virulence at the molecular level. To identify the genes that are involved in virulence of pathogenic microorganisms, various techniques, such as in vivo expression technology, signature-tagged mu-

tagenesis, subtractive and differential hybridization, and in vivo induced antigen technology, have been developed (2, 18, 19, 42). Signature-tagged mutagenesis has also been used for the identification of the *L. pneumophila* genes that are necessary for infection of the guinea pig (10) and the free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii* (38). The *mip* gene of *L. pneumophila* was identified and characterized by screening a genomic library with an anti-*L. pneumophila* rabbit serum (11). In vivo induced antigen technology is a new technique for studying genes that are specifically expressed in vivo by immunoscreening with sera (18). By using the absorbed sera collected during different stages of the disease or from patients infected via different routes, the genes expressed at specific stages can be identified. The technology has been used to study the oral pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (18) and *Mycobacterium tuberculosis* (9).

In the current study, we identified three *L. pneumophila* genes whose products specifically reacted with the convalescent-phase sera of Legionnaires' disease patients but not with the sera of healthy people. One of them, *laiA*, was isolated and shown to be necessary for the virulence of *L. pneumophila* in mice.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, media, and growth conditions. Bacterial strains and plasmids used in this study are summarized in Table 1. *L. pneumophila* serogroup 1 strain 80-045, which was isolated from a Legionnaires' disease patient in Japan (48), was used for studying pathogenesis in this work. *L. pneumophila* strains were grown at 37°C either on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar (Difco) or in ACES [*N*-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid]-buffered yeast extract broth (AYE) (43). If needed, *L. pneumophila* recovered from the BCYE plates was inoculated in 5 ml of AYE medium, incubated at 37°C with shaking, and collected at an optical density at 600 nm of 2.0. *Escherichia coli* K-12 strains DH10B (Invitrogen), XL1-Blue MRF', and XL0LR (Stratagene) were used as recipient cells for recombinant DNAs. All of these *E. coli* strains were grown at 37°C on Luria-Bertani (LB) agar plates or in LB broth. For plaque formation, NZY broth (GibcoBRL) supplemented with 1.5% or 0.7% agar (Difco) was used for agar plates or top agar, respectively.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. Phone: (81) 3-5285-1171. Fax: (81) 3-5285-1171. E-mail: haruwata@nih.go.jp.