
(Bio-Rad) に流し込み氷上で冷却し、アガロースブロックを作製する。アガロースブロックをリゾチーム液 (10 mg/ml lysozyme, 0.5 M EDTA, pH 8.0) 1 ml に浸し、37°C で3時間から一晩ゆっくり振盪する。液を蛋白質分解酵素液 (1 mg/ml proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine, 0.5 M EDTA, pH 8.0) 1 ml に換え、50°C で一晩ゆっくり振盪する。アガロースブロックを半分の大きさに切断後、4 mM Pefabloc SC AEBSF (Roche Diagnostics) を含んだTEバッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 1 ml に浸し、50°C で1時間ゆっくり振盪する。液を新しい4 mM Pefabloc SC を含んだTEバッファーに換え、再び50°C で1時間ゆっくり振盪する。液をTEバッファー1 ml に換え、氷上で1時間ゆっくり振盪し、アガロースブロックを洗浄する。液を新しいTEバッファー1 ml に換え、再び氷上で1時間ゆっくり振盪する。液を制限酵素処理のためのバッファー (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 100 μg/ml bovine serum albumin) 200 μl に換え、氷上で1時間ゆっくり振盪し、バッファーの平衡化を行う。液を制限酵素 *Sfi*I (New England Biolabs) 20 units を含む制限酵素バッファー100 μl に換え、50°C で3時間から一晩ゆっくり振盪する。酵素処理を終えたアガロースブロックは液を0.5×TBE (Tris-borate 45 mM, EDTA 1 mM) に換え、電気泳動を開始するまで4°C に置く。

電気泳動はCHEF DRIII (Bio-Rad) を用いて、1% SeaKem Gold Agarose, 0.5×TBE, パルスタイム5秒から50秒, 200V, 泳動時間21時間, バッファーの温度は約16°Cで行う。電気泳動終了後、ゲルは0.5 μg/mlのエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射装置にのせ、ポラロイド107フィルムで撮影する。

●参考文献

- 1) Chien M, *et al.* : The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* 2004 ; 24 : 1966-8.
- 2) Cazalet C, *et al.* : Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* 2004 ; 36 : 1165-73.
- 3) Segal G, *et al.* : Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 1669-74.
- 4) Chang B, *et al.* : Identification of a novel adhesion molecule involved in virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 2005 ; 73 : 4272-80.
- 5) Yamamoto Y, *et al.* : Growth of *Legionella pneumophila* in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from A/J mice. *Infect Immun* 1988 ; 56 : 370-5.
- 6) Yoshida S, *et al.* : Genetic control of natural resistance in mouse macrophage regulating intracellular *Legionella pneumophila* multiplication *in vitro*. *Infect Immun* 1991 ; 59 : 428-32.
- 7) Wright EK, *et al.* : *Naip5* affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Curr Biol* 2003 ; 13 : 27-36.

- 8) Diez E, *et al.* : *Birc1e* is the gene within the *Lgn1* locus associated with resistance to *Legionella pneumophila*. *Nature Genet* 2003 ; 33 : 55-60.
- 9) Inohara N, Nunez G : NODS: Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003 ; 3 : 371-82.
- 10) Watarai M, *et al.* : *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse *Lgn1* locus. *J Exp Med* 2001 ; 194 : 1081-95.
- 11) Derre I, Isberg RR : Macrophages from mice with the restrictive *Lgn1* allele exhibit multifactorial resistance to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 2004 ; 72 : 6221-9.
- 12) Miyamoto H, *et al.* : Spectrum of *Legionella* species whose intracellular multiplication in murine macrophages is genetically controlled by *Lgn1*. *Infect Immun* 1996 ; 64 : 1842-5.
- 13) 国立感染症研究所感染症情報センター : 感染症発生動向調査, 感染症報告数 1999-2005. (<http://idsc.nih.gov.jp/idwr/ydata/report-Ja.html>)
- 14) 厚生労働省 : 旅館・公衆浴場等におけるレジオネラ症防止対策についてのホームページ. (<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/legionella/index.html>)
- 15) Amemura-maekawa J, *et al.* : *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan form a distinct genetic cluster. *Microbiol Immunol* 2005 ; 49 : 1027-33.
- 16) Fraser DW, *et al.* : Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 1977 ; 297 : 1189-97.
- 17) Glick TH, *et al.* : Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol* 1978 ; 107 : 149-60.
- 18) 倉 文明 : レジオネラ症, 総合臨床 2003 ; 52 : 1191-5.
- 19) 森 正道, 他 : *Legionella pneumophila* serogroup 7 による Pontiac fever の集団発生例. I. 臨床所見. 感染症誌 1995 ; 69 : 646-53.
- 20) 中村博幸, 他 : 循環式給湯方式公衆浴場が原因と考えられた本邦で最大のレジオネラ症の集団発生—肺炎型の臨床所見—. 日呼吸会誌 2003 ; 41 : 325-30.
- 21) 松元信弘, 他 : 循環式温泉を感染源としたレジオネラ肺炎の集団発生について. 日呼吸会誌 2004 ; 42 : 75-9.
- 22) Nagai T, *et al.* : Neonatal sudden death due to *Legionella* pneumonia associated with water birth in a domestic spa bath. *J Clin Microbiol* 2003 ; 41 : 2227-9.
- 23) 比嘉 太 : レジオネラ肺炎の治療. 化学療法の領域 2004 ; 20 : 581-6.
- 24) 齋藤 厚 : レジオネラ症 (在郷軍人病). 山口 徹, 北原光夫編, 今日の治療指針 2005 年版, 医学書院, 東京, 2005 ; pp. 146-7.
- 25) 厚生省保健医療局結核感染症課監修 : (33) レジオネラ症. 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律—法令・通知・関係資料—. 中央法規, 東京, 1999 ; p. 257.
- 26) Greer PW, *et al.* : Rapid demonstration of *Legionella pneumophila* in unembedded tissue. An adaptation of the Gimenez strain. *Am J Clin Phthol* 1980 ; 73 : 788-90.
- 27) 館田一博, 山口恵三 : アクリジン・オレンジ染色. 検査と技術 1989 ; 17 : 704-5.
- 28) 奥田敬一, 他 : 冷却塔から *Legionella* 属菌を検出するための新選択培地: Wadowsky Yee-Okuda (WYO) 培地. 感染症誌 1984 ; 58 : 1073-82.
- 29) Amemura-Maekawa J, *et al.* : Legioluulin, a new isocoumarin compound responsible for blue-white autofluorescence in *Legionella (Fluoribacter) dumoffii* under long-wavelength UV light. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 ; 323 : 954-9.
- 30) 国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会. レジオネラ症. 病原体検出マニュアル. 2003.

(<http://www0.nih.go.jp/niid/reference/pathogen-manual-60.pdf>)

- 31) 館田一博, 山口恵三: レジオネラの臨床細菌学・病原性・診断法. 化学療法の領域 2004 ; 20 : 554-61.
- 32) Kura F, *et al.* : Outbreak of legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5. *Epidemiol Infect* 2006 ; 134 : 385-91.
- 33) 岡田美香, 他: 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 2005 ; 79 : 365-74.

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

藤井 明 (ふじい あきら)¹⁾
河合 自立 (かわい よりたつ)¹⁾
松田 和也 (まつだ かずや)¹⁾

杉山 寛治 (すぎやま かんじ)²⁾
大畑 克彦 (おおはた かつひこ)²⁾
鈴木 光彰 (すずき みつあき)³⁾
加藤 宏一 (かとう こういち)⁴⁾

1. はじめに

近年、入浴施設におけるレジオネラ症集団感染事例が多発している。本来、心身のリフレッシュや健康、癒しを求めて利用される施設で、逆に健康危害を被る可能性があるという問題を抱えているなか、安全で安心な施設作りは営業者側の責務である。

こうした背景のもと、静岡県環境衛生科学研究所では、循環ろ過式モデル浴槽を研究所内に構築し、2002年4月より循環浴槽におけるレジオネラ汚染防止対策確立を目指した各種実験を開始した。その中で、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌管理下で一定期間の入浴期間を経た後、無殺菌状況下で循環ろ過を行った浴槽水中では、入浴期間中に蓄積した有機物を栄養源として利用できる一般細菌や従属栄養細菌が無殺菌循環開始直後から増加し、その後、細菌捕食性のアメーバが急激に繁殖、そして、細胞内増殖性のレジオネラ属菌の著しい増殖が自然汚染によりごく普通に起こる¹⁾ (図1) ことを報告した。

一方、レジオネラ属菌の爆発的な増殖には、配管やろ過器内部に形成されるバイオフィームの存在が不可欠であることから、本研究では、同循環ろ過式モデル浴槽において、自然汚染、無殺菌状況下での浴槽循環系内におけ

るバイオフィーム形成状況を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。さらに、過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤ならびに過酸化水素によるバイオフィーム洗浄・殺菌効果を確認した。また、これらの研究を通じて得られた衛生管理上のリスクポイントに関する知見も併せて報告する。

2. 試験方法

(1) 試験に使用した循環ろ過式モデル浴槽の概要

設備としては、約2m³の浴槽 (1m²×2槽)、粒度の異なるセラミックサンドのろ過材3層 (総量約100kg) から成るろ過器 (通水速度LV:25.5m/h)、材質の異なる配管 (SUS304: ステンレス, VP: 塩化ビニル, PP: ポリプロピレン)、ヘアキャッチャー、熱交換器及び循環ポンプ等から構成され、約40℃に保温された湯水が1時間あたり約5m³循環している (図2)。

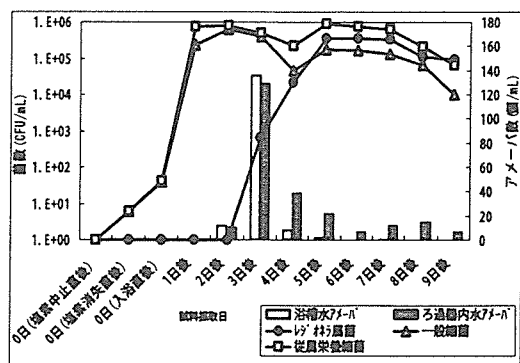


図1 自然汚染による循環浴槽水中のレジオネラ属菌及びアメーバ等の経日変化
参考文献 1) から引用

- 1) 株式会社ヘルスケミカル
- 2) 静岡県環境衛生科学研究所
- 3) 静岡工業技術センター
- 4) 名古屋市立大学システム自然科学研究科

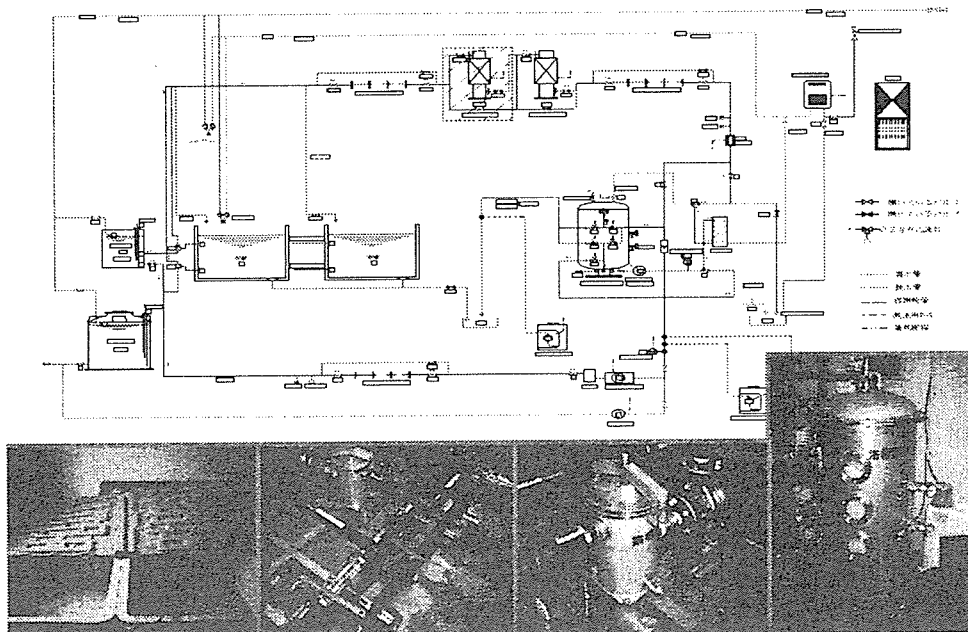


図2 循環ろ過式モデル浴槽の配管図

(2) ろ過材, VP配管テストピース及びEPDM
パッキンに形成されたバイオフィームの走
査型電子顕微鏡による観察ならびにレジオ
ネラ属菌検査

次亜塩素酸ナトリウム溶液による殺菌（遊離残留塩素濃度0.2~1.5mg/L）管理下、6日間に延べ14名が入浴することにより皮脂や垢等の有機物を蓄積させた後、次亜塩素酸ナトリウム溶液の注入を停止させ、紫外線殺菌装置を用いて残留塩素を消失させた。その後、窓を開放して3名が入浴し、以後無殺菌状況下で循環21日後にろ過材を採取した。また、VP配管テストピースは、同様のスケジュールで、殺菌管理下12日間に延べ27名入浴した後、残留塩素消失後1名入浴し、無殺菌循環0、3及び6日後に採取した。さらに、EPDMパッキンは、殺菌管理下6日間に延べ13名入浴した後、残留塩素消失後3名入浴し、無殺菌循環18日後に採取した。各採取部材の小片を、ホルムアルデヒド固定後、さらにオスミウム酸固定を行った。続いてエタノール系列による脱水を経て、液化炭酸を用いた臨界点乾燥法

により乾燥後、金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡(JEOL JSM-T100)で観察した。また、各々隣接部位のレジオネラ属菌検査を行った。レジオネラ属菌検査は、冷却遠心濃縮法²⁾により行い、分離培地にはWYO a 寒天培地（栄研化学）またはGVPC寒天培地（日本ビオメリュー）を用いた。発育した疑わしい集落は、WYO a またはGVPC寒天培地及びトリプトソイ寒天培地（栄研化学）にそれぞれ塗抹して37℃2日間鑑別培養し、WYO a またはGVPC寒天培地にのみ発育した分離株について、市販血清（デンカ生研）を用いて血清群を調べた。なお、ろ過材については、5gを50mLの滅菌リン酸緩衝液にて洗い出した後、その上清を、また、拭き取り材料は、滅菌綿棒により当該部位を均一に拭き取り、滅菌リン酸緩衝液9mLに懸濁後、各々接種し、培養検査を行った。

(3) EPDMパッキン上バイオフィーム中のレジ
オネラニューモフィラの同定

EPDMパッキン上バイオフィームの一部をスライドガラス上に取り、蛍光標識DNAプ

ローブ法（VIT-Legionella；vermicon社）により染色し、発光状況を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(4) モデル浴槽における洗浄・殺菌効果試験

過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤（グッドジョブ®配管洗浄剤、(株)ヘルスケミカル）ならびに過酸化水素を用いて洗浄・殺菌試験を行った。前者は、有機酸を主成分としたA剤、過炭酸ナトリウムを主成分としたB剤及び中和剤であるC剤の3剤を組み合わせた洗浄剤で、3剤の使用濃度は各々、湯量1t当たり0.6kg、4.6kg及び2.5kg（計7.7kg）である。過酸化水素は循環水中の濃度が2.3%となるように投入した。作業手順は図3に示す通りである。各々洗浄前後のろ過材（表層部）、ヘアキャッチャー内のストレーナー、VP配管、テフロンパッキン及びEPDMパッキン上のレジオネラ属菌検査を行った。なお、検査法は前述の通りである。

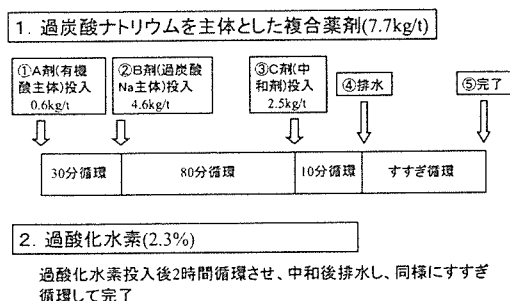


図3 モデル浴槽における洗浄・殺菌効果試験の手順

(5) 走査型電子顕微鏡によるバイオフィーム形成EPDMパッキン表面の劣化状況の観察

試験に用いたEPDM及びテフロンパッキンの表面を清浄にした後、観察部位を切り出し、乾燥後、金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡で観察した。

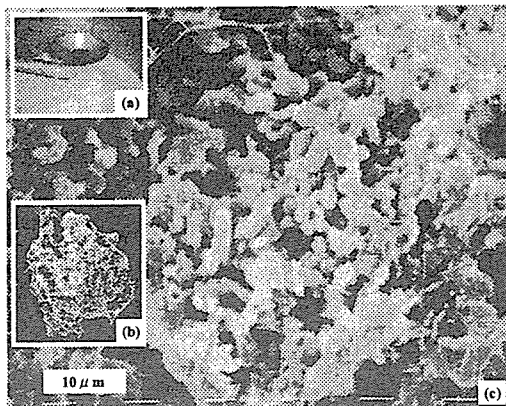


写真1 ろ過材に形成されたバイオフィームの走査電顕像（無殺菌循環21日後）

- (a) ろ過器内部
 - (b) セラミック製ろ過材粒子
 - (c) バイオフィーム拡大像
- レジオネラ属菌数： 2.8×10^6 CFU/g

3. 試験結果

(1) ろ過材、VP配管テストピース及びEPDMパッキンに形成されたバイオフィームの走査型電子顕微鏡による観察ならびにレジオネラ属菌検査

無殺菌循環21日後のろ過材表面には多量の桿菌と繊維状物が観察された（写真1）。この繊維状物は、バイオフィーム構成成分である粘液多糖類（菌体外産生物質）が、電子顕微鏡標本作成過程の脱水操作により生じたものと思われる。また、VP配管テストピースでは、無殺菌循環3日後で桿菌の散在が観察され、同6日後では長桿菌と短桿菌の集積像が観察された（写真2）。一方、無殺菌循環18日後のEPDMパッキンでは、接液部において肉眼的にも明らかな白色コロニーが観察され、走査型電子顕微鏡により、繊維状に伸長した菌体が絡み合っている像が観察された（写真3）。

なお、隣接部位におけるレジオネラ属菌数は、ろ過材、VP配管テストピース（無殺菌6日後）及びEPDMパッキンにおいて、各々、 2.8×10^6 CFU/g、 1.7×10^4 CFU/5mm²及び 5.0×10^5 CFU/swabであった。

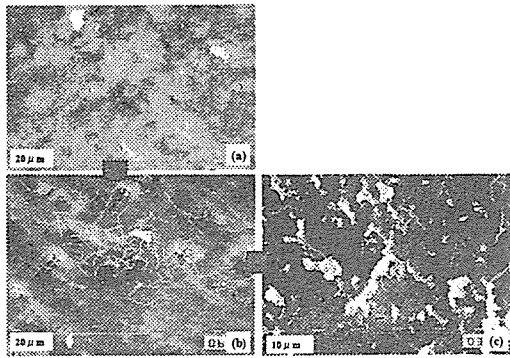


写真2 VP配管テストピースに形成されたバイオフィルムの走査電顕像（無殺菌循環直後・3日後・6日後）

- (a) 無殺菌循環直後
- (b) 無殺菌循環3日後・・・桿菌の散在
- (c) 無殺菌循環6日後・・・長桿菌と短桿菌の集積

無殺菌循環6日後のレジオネラ属菌数：
 1.7×10^4 CFU/5mm²

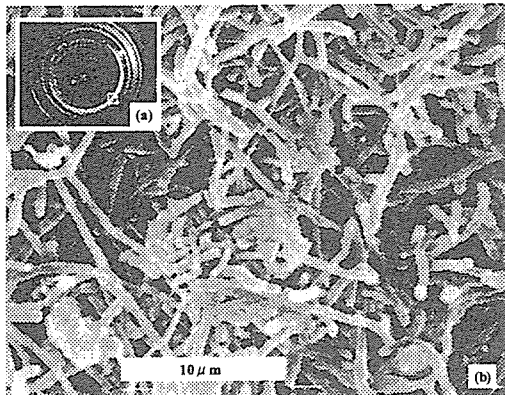


写真3 EPDMパッキンに形成されたバイオフィルムの走査電顕像（無殺菌循環18日後）

- (a) EPDMパッキン接液部付近
 - (b) バイオフィルム拡大像
- レジオネラ属菌数： 5×10^6 CFU/swab

(2) EPDMパッキン上バイオフィルム中のレジオネラニューモフィラの同定

今回用いた蛍光標識DNAプローブ法では、緑色に発光した部分がレジオネラ属菌の存在を示し、緑及び赤色に発光した部分がレジオネラニューモフィラの存在を示している。EPDMパッキンから採取したバイオフィルム

はほぼ全域に渡って緑及び赤色の発光を示したことから、レジオネラニューモフィラの存在が確認できた。また、走査型電子顕微鏡により、ほぼ全域に繊維状構造が観察されたことから、EPDMパッキン上ではレジオネラ属菌が繊維状構造を採ってバイオフィルムを形成していることが示唆された。（写真4）

(3) モデル浴槽における洗浄・殺菌効果試験

過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤（7.7kg/t）ならびに過酸化水素（2.3%）による洗浄前のろ過材、ストレーナー、VP配管及びテフロンパッキン（EPDMにテフロン被覆）においては、 $10^3 \sim 10^6$ CFU/g or swabのレジオネラ属菌が検出されたが、洗浄後では、いずれの薬剤ならびに部位においても、菌数は検出限界未満まで低下し、両者のその効果はほぼ同等であった。しかしながら、EPDMパッキンにおいては、いずれの薬剤も菌数を $10^2 \sim 10^3$ レベル低下させたものの、完全に除去することはできなかった。（表1）

(4) 走査型電子顕微鏡によるバイオフィルム形成EPDMパッキン表面の劣化状況の観察

EPDMパッキンの接液部表面には無数の微小な穴が観察され、非接液部とは異なり明ら

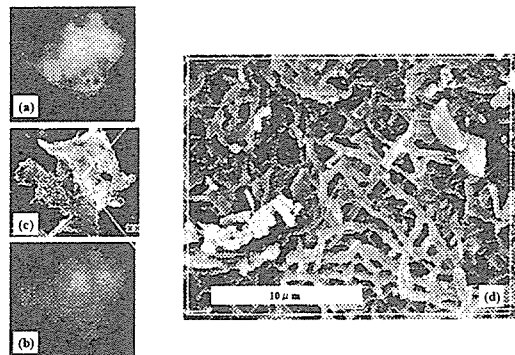


写真4 蛍光標識DNAプローブ法によるEPDMパッキン上バイオフィルム中のLegionella pneumophila の同定

- (a) 蛍光顕微鏡観察像（緑色発光）
- (b) 蛍光顕微鏡観察像（赤色発光）
- (c) 走査電顕像
- (d) 走査電顕拡大像

表1 過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤ならびに過酸化水素のモデル浴槽における洗浄・殺菌効果

1. 過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤(7.7kg/t)

検査部位	洗浄前		洗浄後	
	レジオネラ菌菌量	血漬群	レジオネラ菌菌量	血漬群
ろ過材(表層部)	2.8×10^6 cfu/g	SG1,6	$<1.0 \times 10^2$ cfu/g	—
ストレーナー	1.3×10^3 cfu/swab	SG1,6	<90 cfu/swab	—
VP配管	1.1×10^3 cfu/swab	SG1,6	<90 cfu/swab	—
テフロンパッキン	1.0×10^4 cfu/swab	SG1,6	<90 cfu/swab	—
EPDMパッキン	1.6×10^6 cfu/swab	SG6	7.0×10^3 cfu/swab	SG6

2. 過酸化水素(2.3%)

ろ過材(表層部)	7.2×10^6 cfu/g	SG6	$<1.0 \times 10^2$ cfu/g	—
ストレーナー	1.2×10^5 cfu/swab	SG6	<90 cfu/swab	—
VP配管	5.9×10^3 cfu/swab	SG6	<90 cfu/swab	—
テフロンパッキン	6.4×10^3 cfu/swab	SG6	<90 cfu/swab	—
EPDMパッキン	5.1×10^6 cfu/swab	SG6	2.2×10^4 cfu/swab	SG6

◇ろ過材: 5g + PBS 50mL

◇ストレーナー・配管・パッキン: 10回拭き取り(綿棒) + PBS 9mL

かに表面が劣化していた(写真5)。一方、テフロンパッキンでは、接液部及び非接液部共に表面構造に差は認められず、ほぼ平滑であった(写真6)。

4. 考察

無殺菌状況下で循環ろ過を行うと、自然汚染による微生物増殖に伴い、極めて短期間でバイオフィームが形成されることが明らかとなったが、その形態や生成のしやすさは、付着箇所の材質や表面微細構造、循環浴槽水の水質(汚染度)、流速等、様々な因子の影響

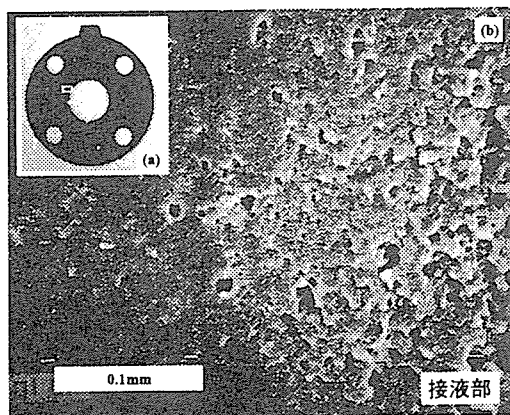


写真5 EPDMパッキン接液部の走査電顕像

- (a) EPDMパッキン全体像
(b) 拡大像

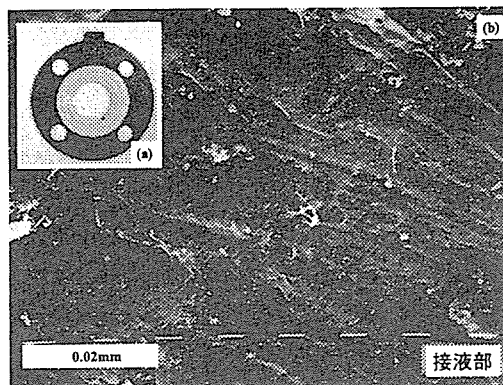


写真6 テフロンパッキン接液部の走査電顕像

- (a) テフロンパッキン全体像
(b) 拡大像

を受けていることが示唆された。例えば、今回使用しているセラミック製のろ過材は、その表面に微細な空隙を無数に有していることから、より微生物が増殖し、バイオフィームとして定着しやすいものと思われる。

一方、ろ過材を初めとしてストレーナー、VP配管及びテフロンパッキンに形成されたバイオフィームに対して、過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤は優れた洗浄・殺菌効果を示し、今回の試験において、その効果は過酸化水素(2.3%)とほぼ同等であった。過炭酸ナトリウムは水に溶解すると、過酸化水素と炭酸ナトリウムに解離し、過酸化水素が分解した時に発生する酸素ガスの酸化作用と発泡作用の働きでバイオフィームを剥離除去する。さらに、アルカリ分である炭酸ナトリウムによる有機物分散・溶解効果も期待できる。また、過炭酸ナトリウムは過酸化水素と異なり医薬用外劇物指定ではないため、安全性の高い薬剤である。

しかしながら、EPDMパッキンに付着したバイオフィームに対しては、いずれの薬剤も菌数をかなり低下させたものの、完全な除去効果を示さなかった。なお、同様に実施した試験において、高濃度塩素(50mg/L)、二酸

表2 各種洗浄・殺菌剤の部位別効果
参考文献 3) から引用

薬 剤	濃 度	ろ過材	ストレ ナー	VP配管	テフ ロン パッキン	EPDM パッキン
過酸化水素	2.3%	◎	◎	◎	◎	×
次亜塩素酸Na	50mg/L	◎	△	◎	◎	×
二酸化塩素	50mg/L	◎	◎	◎	◎	×
電解次亜塩素酸	50mg/L	◎	◎	◎	◎	×
過炭酸Na系	0.46%	◎	◎	◎	◎	×

◎: 洗浄・殺菌可能、△: 不完全な場合あり、×: 洗浄・殺菌困難

化塩素 (50mg/L) 及び電解次亜塩素酸 (50mg/L) のいずれも、EPDMパッキンに対する洗浄・殺菌効果は不完全³⁾ (表2) であった。一般にEPDMは耐薬品性や耐候性、反発弾性に優れているため、パッキンとして多く使用されているが、水中の残留塩素に長期さらされることにより、EPDMの硬化劣化⁴⁾や軟化劣化⁵⁾が起こることも知られている。また、過酸化水素も劣化を引き起こしやすい。今回用いたEPDMパッキンも、表面に微小な穴が多数見られたことから、塩素剤等による劣化を受けているものと思われる。そのため、バイオフィームが定着しやすく、且つ、除去しにくくなっているものと考えられる。さらに、フランジ接合に使用するパッキンの構造上、Oリングの中側に微小空隙が存在することも、バイオフィームの定着しやすさ、ならびに除去しにくさを助長しているものと思われる。即ち、強い水流にさらされにくい微小空隙の存在、ならびに塩素剤等による表面劣化という条件が重なると、バイオフィームが定着しやすく、各種洗浄薬剤の効果も発揮されにくい状態になっていることが推察される。それに対して、テフロンパッキンは耐薬品性があり撥水・撥油性も高いことから、バイオフィームが定着しにくく、且つ、洗浄薬剤による除去効果も現れやすいものと考えられる。今回の結果において、洗浄前のレジオネラ属菌数が、テフロンパッキンではEPDMパッキンよりも $10^2 \sim 10^3$ 少なく、洗浄後は検出限界未満まで下がった事実は、前述の説明とよく一

致している。また、今回EPDMパッキン接液部において、レジオネラ属菌が繊維状に増殖している像が観察されたが、レジオネラ属菌を振とう培養で増殖させた場合は、ほぼ全数が短桿状となり、静止培養の場合は、繊維状の菌が優位になる⁶⁾という報告もあり、このパッキン接液部が強い水流にさらされていないことの裏付けとも言える。

実際の現場では、特にろ過器周辺にフランジ接合部位が多く、これらで使用されているEPDMパッキンをテフロンパッキンに交換することは、レジオネラ感染事故の発生リスクを低減する上で有効な手段と思われる。

一旦バイオフィームが形成されると、その中に棲息するレジオネラ属菌に対しては、日常管理に用いられる濃度の塩素剤等の殺菌効果が発揮されにくくなり、レジオネラ症感染事故発生リスクも高くなるため、各部位のリスク要因を解析し、それぞれに適切な管理措置の実行が不可欠である。特にろ過器内はその機能上、微生物増殖の栄養源となる汚れ(有機物)が溜まりやすい部位のため、逆洗はもちろん、定期的な高濃度塩素消毒の実施が必須である。その中でも、ろ過器内塩素逆洗浄(フィルター・リフレッシュ)法⁷⁾や、さらに低コストで実施できるろ過器内塩素循環殺菌法⁸⁾の有用性が注目されている。

4. まとめ

- (1) 循環ろ過式モデル浴槽において、無殺菌循環下、ろ過材表面、VP配管テストピース及びEPDMパッキンへの自然汚染によるバイオフィーム形成が確認できた。
- (2) 過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤ならびに過酸化水素は、EPDMパッキンを除いて、いずれの箇所においても優れた洗浄・殺菌効果を示し、両者のその効果はほぼ同等であった。
- (3) EPDMパッキン上バイオフィームの一部残存は、塩素剤等による劣化に伴う表面構造

の変化ならびにフランジ接合部における微小空隙の存在に起因することが示唆された。

- (4) 対策として、耐薬品性が高く撥水・撥油性があるテフロンパッキンへの交換が有効である。

謝辞：本研究にあたり、アメーバ検査をしていただいた国立感染症研究所・寄生動物部の遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司、下河原理江子の各先生方に深謝いたします。

参考文献

- 1) 大畑克彦, 鈴木光彰, 江塚安伸, 曾布川尚民, 杉山寛治, 実験用循環式浴槽水浄化装置を用いた自然汚染, 無殺菌状況下におけるレジオネラ属菌の消長, 防菌防黴, 32, 593-600, 2004 (12)
- 2) 厚生省生活衛生局企画課 (監修), 新版レジオネラ症防止指針, 85-94, (財)ビル管理教育センター, 1999
- 3) 静岡県環境衛生科学研究所レジオネラ・プロジェクトスタッフ, レジオネラプロジェクト研究の成果 —温泉のレジオネラ除菌, モニタリングシステムの開発—, 34-35, 静岡県環境衛生科学研究所, 2005
- 4) 中村 勉, 城戸広宣, 竹田喜一, 大武義人, 合成ゴムの残留塩素による劣化メカニズムについて (第1報) EPDMパッキンの残留塩素による劣化事例とその劣化メカニズム, 空気調和・衛生工学会学術講演会講演論文集, 1529-1532, 2003
- 5) 城戸広宣, 中村 勉, 竹田喜一, 大武義人, 合成ゴムの残留塩素による劣化メカニズムについて (第2報) 残留塩素によるEPDMパッキンの低分子化現象の劣化メカニズム, 空気調和・衛生工学会学術講演会講演論文集, 1533-1536, 2003
- 6) 吉田真一, 生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究 —平成14年度研究報告書—, 7-13, 2003
- 7) 大畑克彦, 鈴木光彰, 倉重英明, 下河原理江子, 泉山信司, 八木田健司, 遠藤卓郎, 江塚安伸, 曾布川尚民, 杉山寛治, 循環式浴槽水浄化装置を用いた濾過器内の高濃度次亜塩素逆洗浄によるレジオネラ除菌効果, 日本防菌防黴学会第31回年次大会要旨集, 62, 2004
- 8) 杉山寛治, 大畑克彦, 鈴木光彰, 徳山千佳, 倉重英明, 江塚安伸, 曾布川尚民, 循環濾過式浴槽における濾過器内塩素循環殺菌法のレジオネラ除菌・増殖抑制効果, 日本防菌防黴学会第32回年次大会要旨集, 146, 2005

**PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS
ANALYSIS AND SEQUENCE-BASED
TYPING OF *LEGIONELLA*
PNEUMOPHILA SEROGROUP 1
ISOLATES FROM JAPAN**

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

43

In Japan, hot springs and public baths are more probable sources of legionellosis than cooling towers.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is considered to be one of the most discriminative epidemiological methods for subtyping *Legionella pneumophila* strains and for elucidating the sources of infection (2). On the other hand, sequence-based typing (SBT), which was recently developed, is also a powerful epidemiological method. Six genes, *flaA*, *mompS*, *pilE*, *asd*, *mip*, and *proA*, which are probably under selective pressure, were shown to be useful genetic markers for epidemiological typing (4). We used PFGE and SBT to analyze *L. pneumophila* serogroup 1 isolates from Japan and compared the usefulness of these techniques.

All *L. pneumophila* serogroup 1 isolates used in this study were independently obtained from a wide variety of Japanese locations (10 from cooling towers, 10 from public spas and/or hot spring baths, 7 from patients with bath-related infections, and 4 from patients infected at unknown sources (Fig. 1). These isolates were cultivated on a buffered charcoal

yeast extract agar (Difco, Detroit, MI) plate for 3 days at 35°C. The cultured colonies were directly used for PFGE and SBT.

Preparations for PFGE typing were carried out as described previously (2). A dendrogram of the PFGE pattern based on Ward's method was constructed using the Fingerprinting II software (Bio-Rad Laboratories).

The 31 epidemiologically unrelated isolates were discriminated into 30 PFGE types (Fig. 2). The dendrogram of the PFGE pattern of isolates from cooling towers formed a distinct genetic cluster. The cluster is quite different from the cluster of isolates derived from public spas and hot spring baths. This result suggests that the PFGE pattern reflects the habitat of isolates rather than their geographic location.

We applied SBT to the same *L. pneumophila* serogroup 1 isolates as those used in the PFGE analysis. The sequences of *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, and *proA* were determined. The primers used for SBT and the reaction mixture and conditions were the same as those used by Gaia et al. (4, 5; <http://www.ewgli.org>). The nucleotide sequences obtained were trimmed based on the data of *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, and *proA* presented by Norman Fry (<http://www.ewgli.org>). Putative novel variants found in this study were submitted to the curators of the European Working Group

Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Bin Chang, and Haruo Watanabe Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640, Japan.

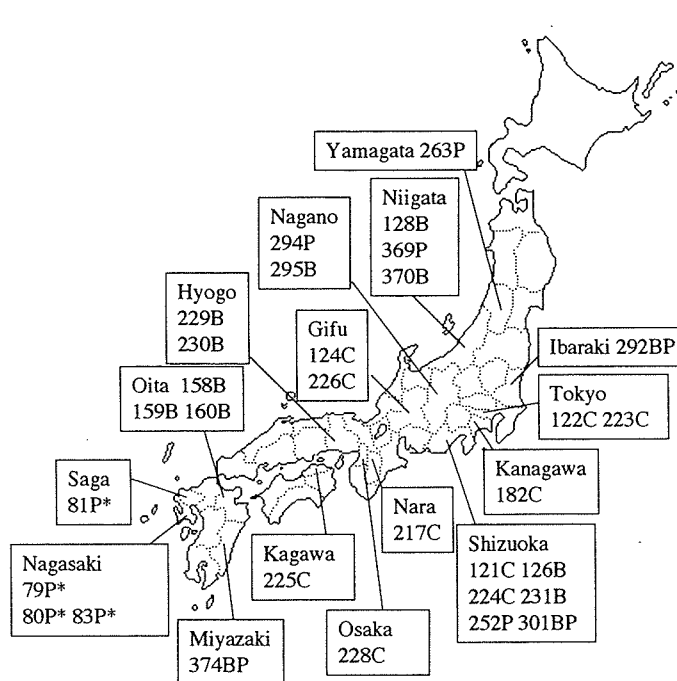


FIGURE 1 Isolates of *L. pneumophila* serogroup 1 in Japan were used in this study. All isolates are epidemiologically unrelated to each other. The names of these isolates are indicated on the map along with the names of the prefectures where they were isolated. C, isolates from cooling tower water; B, isolates from spa and/or hot spring bath water; P, isolates from patients assumed to be infected at spas and/or hot spring baths; P*, isolates from patients infected at unknown sources; BP, representative isolates obtained from both patients and bath water in an outbreak. The P isolates are indicated on the prefectures where the patients visited, and P* isolates are indicated on the prefectures where the hospitals of patients' admission were located.

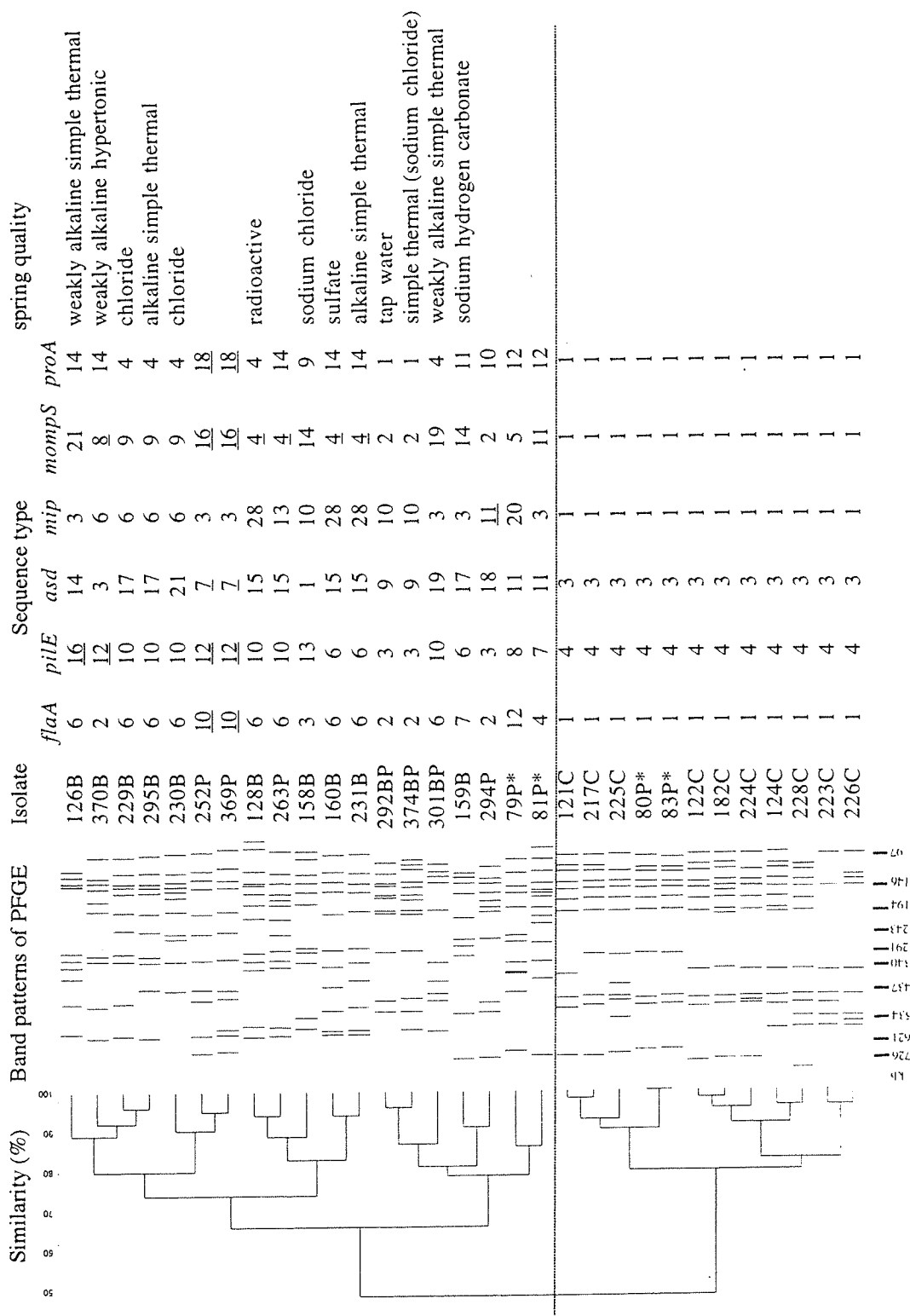
for *Legionella* Infections SBT database for verification and assignment of new allelic numbers according to the curators' instructions (<http://www.ewgli.org>).

The 31 isolates were divided into 8, 9, 11, 8, 11, and 8 types based on the sequences of *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, and *proA*, respectively (Fig. 2). As a result, the 31 isolates were divided into 16 SB types in total. The isolates with the same SBT demonstrated similar PFGE patterns. A noteworthy finding was that all 10 iso-

lates from cooling towers clustered into a unique type.

Both PFGE and SBT indicated that the spa-bath isolates from Japan were highly diverse. The water used in public spa baths in Japanese resorts is mostly obtained from hot springs. The characteristics of hot spring water, such as chemical substances, pH, and temperature, are highly variable. The genetic diversity of the spa-bath strains may reflect the wide variety of their habitats.

FIGURE 2 Cluster dendrogram by PFGE and sequence-based types of *L. pneumophila* serogroup 1 isolates in Japan. Allele numbers are according to the European Working Group for *Legionella* Infections SBT database for *L. pneumophila* (<http://www.ewgli.org>), and new alleles that were determined in this research are underlined. Characteristics of hot spring water were quoted from the reference of the hot spring.



Using the methods of PFGE and SBT, it may be possible to determine the environmental source of a strain of unknown origin. In fact, two of four isolates from patients infected at unknown sources were assigned to the cooling tower SB type and considered to derive from cooling towers. The first clinical isolate (no. 79) in Japan (6) was not assigned to the cooling tower SB-type.

Only four SB types were common between Europe and Japan (N. Fry personal communication). One of these was the SB type (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*) = (1, 4, 3, 1, 1, 1), which was the cooling tower type identified in our study. This type was most commonly isolated in Europe (see chapter 25). This type has been isolated from water samples from European spa pools, hotels, and hospitals, although it is not known if isolates of this type have been found in European cooling towers.

Although PFGE is the most widely used technique and is generally accepted to be highly effective in discriminating genomic differences, it may have certain drawbacks with regard to interlaboratory reproducibility (3). SBT appears to be less effective at discriminating between strains than PFGE. On the other hand, SBT shows excellent reproducibility, and it is easy to create a database of SBT, because SBT does not require the interpretation of gel images. We have to consider the advantages and limitations of both methods and apply the most suitable method according to the requirements.

This article is partially reprinted from the *Microbiology and Immunology* (1) with permission of the publisher.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Norman Fry and Tim Harrison (Respiratory and Systemic Infection Laboratory, Health Protection Agency) for helpful advice on SBT, providing the sequences of *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, and *proA*

of EUL strains, assigning the alleles newly identified by us the new numbers, and critical reading of the manuscript, and Jun Terajima (Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases) for helpful advice on PFGE analysis. We also thank Eiko Yabuuchi (Department of Microbial Bioinformatics, Gifu University School of Medicine), Fumio Gondaira (Denka Seiken Co., Ltd.), Akihito Wada (Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases), and the researchers in the prefectural public health institutes in Japan for providing the *L. pneumophila* serogroup 1 isolates.

REFERENCES

1. Amemura-Maekawa, J., F. Kura, B. Chang, and H. Watanabe. 2005. *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan form a distinct genetic cluster. *Microbiol. Immunol.* **49**:1027–1033.
2. Amemura-Maekawa, J., F. Kura, H. Watanabe, F. Gondaira, and J. Sugiyama. 2002. Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis and monoclonal antibodies, p. 302–304. In R. Marre, Y. Abu Kwaik, C. Bartlett, N. P. Cianciotto, B. S. Fields, M. Frosch, J. Hacker, and P. C. Lück (ed.), *Legionella*, ASM Press, Washington, D.C.
3. De Zoysa, A. S., and T. G. Harrison. 1999. Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by pulsed-field gel electrophoresis with *SfiI* and comparison of this method with restriction fragment-length polymorphism analysis. *J. Med. Microbiol.* **48**:269–278.
4. Gaia, V., N. K. Fry, B. Afshar, P. C. Lück, H. Meugnier, J. Etienne, R. Peduzzi, and T. G. Harrison. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2047–2052.
5. Gaia, V., N. K. Fry, T. G. Harrison, and R. Peduzzi. 2003. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2932–2939.
6. Saito, A., T. Shimoda, M. Nagasawa, H. Tanaka, N. Ito, Y. Shigeno, K. Yamaguchi, M. Hirota, M. Nakatomi, and K. Hara. 1981. The first case of Legionnaires' disease in Japan. *Kansensyogaku Zasshi* **55**:124–128.

GROWTH OF *LEGIONELLA* IN NONSTERILIZED, NATURALLY CONTAMINATED BATHING WATER IN A SYSTEM THAT CIRCULATES THE WATER

*Katsuhiko Ohata, Kanji Sugiyama, Mitsuaki Suzuki,
Rieko Shimogawara, Shinji Izumiyama,
Kenji Yagita, and Takuro Endo*

102

For a long time in Japan, taking a bath in the hot springs has been a popular activity. In recent years, many public bathhouses introduced bathing water circulating systems for extended use, in which a sand filtration unit was installed. However, this resulted in several large-scale outbreaks of legionellosis (1) due to the microbiologically insufficient maintenance of the bathing facilities. Occurrence of *Legionella* in bathing water circulating systems, appears to be common and is a serious public health concern in Japan.

We constructed a life-size model plant of a bathing water circulating system for the simulation experiment. The model plant is composed of a filter (a sand filtration unit filled with three layers of ceramic sand [about 100 kg], with a linear velocity of 25.5m/h), two bathtubs (1 m³ × 2), an automatic chlorine (in the form of sodium hypochlorite) injector, a hair catcher, a circulating pump, a heater, and a UV light lamp. The water temperature is kept at about 40°C (104°F) and circulated at about 5 m³/h (Fig. 1).

These experiments are aimed at monitoring changes in the microbial constituents, especially a possible occurrence of *Legionella* in a bathing water circulating system, and developing preventive measures and intervention strategies. Prior to microbial monitoring, a total of either 16 or 40 volunteers were asked to take baths for 10 days (experiment 1) or for 14 days (experiment 2), respectively. Chlorine was added at concentrations ranging from 0.2 to 1.5 mg/liter into the bathing water. After that, in experiment 1, the chlorine injector was turned off and the residual chlorine was degraded completely with the ultraviolet irradiation. Again, five volunteers took a bath, and the ultraviolet irradiation was turned off (day 0). The bathing water was circulated under nonsterilization (1st to 23rd days) and the circulating system was sterilized by 10 ppm chlorine at the end of the experiment (23rd day). In experiment 2, after the residual chlorine was totally degraded with the ultraviolet irradiation, three volunteers took a bath (0 to 1st days). After that, the ultraviolet irradiation was turned off (2nd day) and the bathing water was circulated under nonsterilization (3rd to 31st days). After the bathing water was exchanged (31st day), it was recirculated (31st to 36th days). At the end of the experiment, the system was sterilized by 6% H₂O₂ (36th day).

Katsuhiko Ohata, Kanji Sugiyama, and Mitsuaki Suzuki Shizuoka Institute of Environment and Hygiene, Shizuoka-City, Shizuoka Pref. 420-8637, Japan. *Rieko Shimogawara, Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, and Takuro Endo* Department of Parasitology, National Institute of Infectious Disease, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan.

Legionella: State of the Art 30 Years after Its Recognition
Edited by Nicholas P. Cianciotto et al.
©2006 ASM Press, Washington, D.C.

431

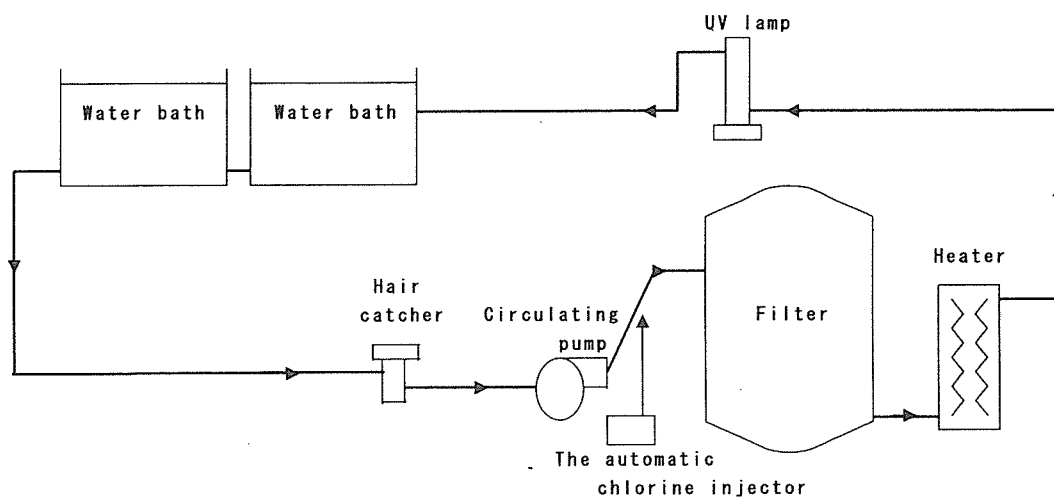


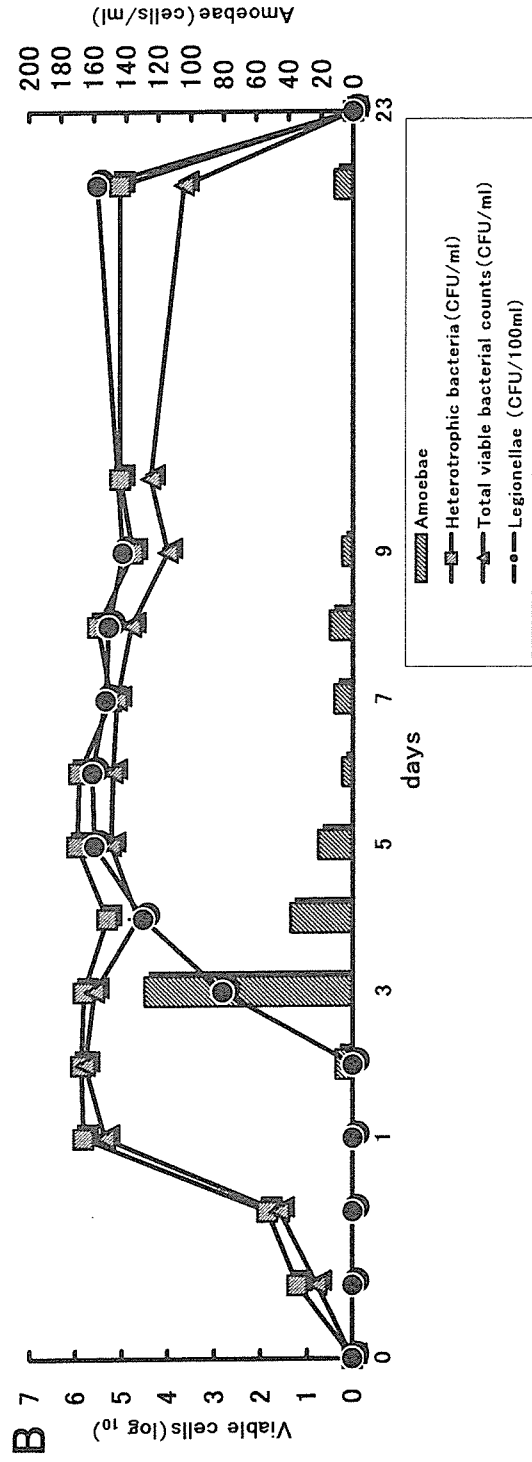
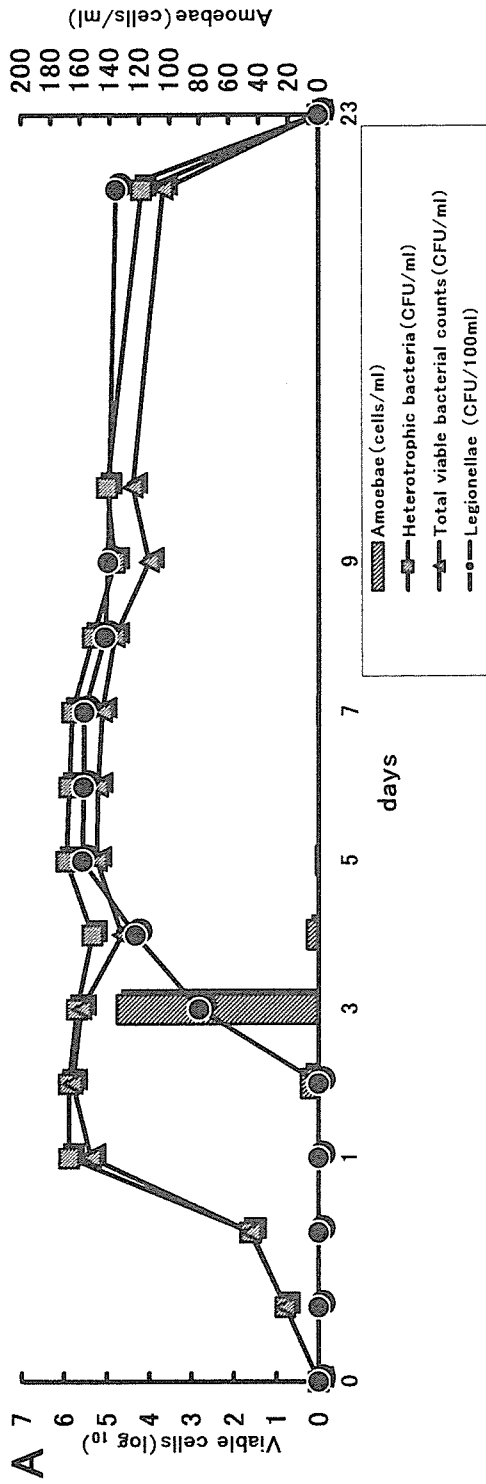
FIGURE 1 A system that circulates bathing water of the model plant. The pointed arrows show the flow of the circulating water.

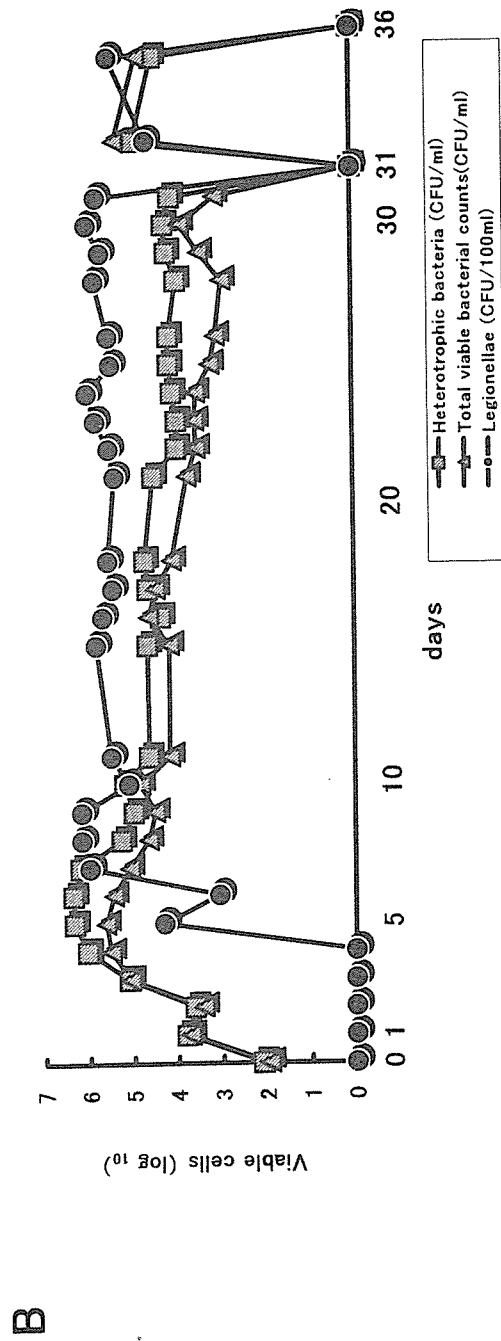
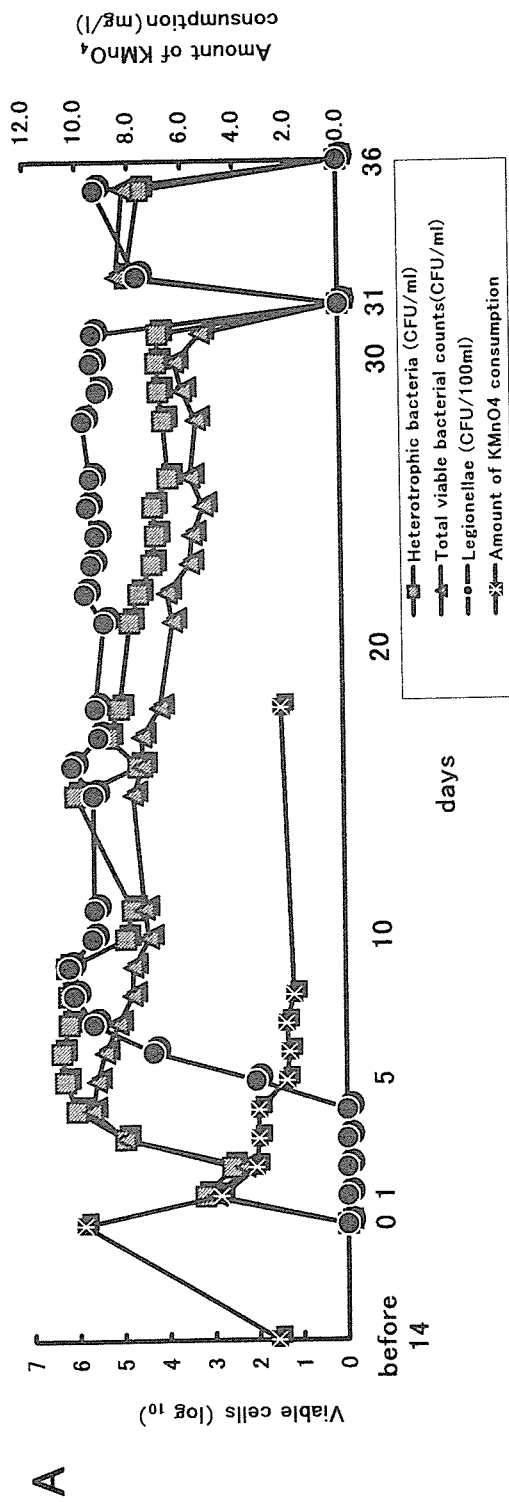
In these experiments, from the day when the chlorine injector was turned off, microbial monitoring occurred for the number of *Legionella*, total viable bacterial counts, heterotrophic bacteria, and free-living amoebae in the bathing water. This microbial monitoring occurred in the water, in the filter, and in other parts of the model plant, either almost daily or at certain intervals. GVPC Agar (bioMerieux, France) was used for detection of *Legionella*, Standard Method Agar (Nissui Pharmaceutical, Tokyo) for total viable bacterial counts, R2A Agar (Becton Dickinson, USA) for heterotrophic bacteria, and Bacto-Agar (Difco, USA), on which a monolayer of *Escherichia coli* was deposited, for free-living amoebae. The KMnO_4 consumption test was also applied continuously to the bathing water in experiment 2.

As a result of experiment 1 (Fig. 2), *Legionella* was detected in both the bathing water and the filter water at concentrations of $6.6 \times$

10^2 CFU/100 ml on the 3rd day after residual chlorine disappeared. The number of *Legionella* in the bathing water and the filter water increased to 10^5 CFU/100 ml on the 5th day and remained 10^4 to 10^5 CFU/100 ml throughout the experiment. A positive bacterial culture was obtained in the bathing water and the filter water immediately after residual chlorine disappeared, and the number of total bacterial counts reached 10^5 CFU/ml within a day. Then it decreased gradually to 10^3 to 10^4 CFU/ml at the end of the experiment. The number of heterotrophic bacteria was almost the same as the number of total bacterial counts. Free-living amoebae, known to be the hosts of *Legionella* in this environment, were detected 2 days after residual chlorine disappeared. They were calculated to be 12 cells/ml in the bathing water and 11 cells/ml in the filter water. On the 3rd day, the number of amoebae increased to 136 cells/ml and 129

FIGURE 2 The growth of *Legionella*, etc. in the bathing water (A) and the filter water (B) in experiment 1. For 10 days about 16 volunteers took baths under the system with chlorine control, in which the chlorine injector was turned off. After that, five volunteers took baths, and the ultraviolet irradiation was turned off (day 0). The bathing water was circulated under nonsterilization (1st to 23rd days). At the end of the experiment (23rd day) the whole system was sterilized by 10 ppm sodium hypochloride solution. From the day when the chlorine injector was turned off, there was microbial monitoring for the number of *Legionella*, total viable bacterial counts, heterotrophic bacteria, and free-living amoebae.





cells/ml, followed by a rapid decrease from the bathing water. They disappeared within 5 days after that, for unknown reasons. The number of amoebae in the filter water fluctuated and amounted to 12 cells/ml at the end of the experiment.

In experiment 2 (Fig. 3), *Legionella* in the bathing water and the filter water became detectable from 3 days after stopping ultraviolet irradiation, which was 5 days after residual chlorine disappeared and the number of *Legionella* detected in the bathing water and the filter water was 1.1×10^2 CFU/100 ml and 2.0×10^4 CFU/100 ml, respectively. The number of *Legionella* had increased to 10^6 CFU/100 ml within 5 days and was 10^5 to 10^6 CFU/100 ml at the end of the experiment. The total viable bacterial counts reached 10^4 to 10^5 CFU/ml in 5 days after the residual chlorine disappeared. The number of heterotrophic bacteria was almost the same as the number of total bacterial counts. A large number of *Legionella*, namely, 1.6×10^7 CFU/g, 3.1×10^5 CFU/g, and 1.8×10^5 CFU/g, was detected from the sand collected from the upper, middle, and lower parts of the filter, respectively. Similarly, 9.1×10^3 cells/g, 1.5×10^3 cells/g, and 1.6×10^3 cells/g of amoebae were detected from the filter. In addition, it is noteworthy that *Legionella* was detected from the hair catcher in the model plant at concentrations around 3.1×10^4 CFU/swab in experiment 1 and, 1.2×10^5 CFU/swab in experiment 2. The amount of KMnO_4 con-

sumption in the bathing water was 2.7 mg/liter before use and was calculated to be around 10.1 mg/liter after the use by 40 volunteers under the presence of chlorine residues.

In the present experiments, it was clearly demonstrated that *Legionella* occurred in the bathing water circulating system within a short period in a sequential manner of microbial growth. Namely, concentration of organic matter (dirt) in the bathing water that can be monitored as the KMnO_4 consumption value increased in correlation to the number of bathers. The deposited dirt allows bacteria to rapidly undergo multiplication in the bathing water, which consequently supports the occurrence of a large number of host amoebae. The growth of *Legionella* is a manifestation of the extended use of bathing water under inadequate hygienic maintenance. It also turned out that the filter acts as the main hotbed for *Legionella* multiplication (2).

REFERENCES

1. Sugiyama, K., T. Nishio, Y. Gouda, Z. Fanfei, K. Masuda, and M. Akiyama. 2000. Relationship between *Legionella* contamination of environmental water and occurrence of legionellosis: an outbreak of legionellosis linked to bath water circulating through a filter and examinations. *Bull. Shizuoka Inst. Environ. Hyg.* 43:1-4.
2. Sugiyama, K., T. Okitsu, H. Miyamoto, and N. Nakamura. 1996. Contamination and disinfection of *Legionella* in bath waters of recirculating systems at homes and large-scale bathing facilities. *Bull. Shizuoka Inst. Environ. Hyg.* 39:47-52.

FIGURE 3 The growth of *Legionella*, etc. in the bathing water (A) and the filter water (B) in experiment 2. For 14 days about 40 volunteers took baths under the system with chlorine control, in which the chlorine injector was turned off. After that, three volunteers took baths (0 to 1st days) and the ultraviolet irradiation was turned off (2nd day). The bathing water was circulated under nonsterilization (3rd to 31st days). After bathing water was exchanged (31st day), it was recirculated (31st to 36th days). At the end of the experiment (36th day) the whole system was sterilized with 6% H_2O_2 . From the day when the chlorine injector was turned off, there was microbial monitoring for the number of *Legionella*, total viable bacterial counts, heterotrophic bacteria, and the amount of KMnO_4 consumption.

INHIBITION OF *LEGIONELLA* GROWTH IN CIRCULATING BATHING WATER BY A FILTER REFRESHMENT METHOD USING A HIGH CONCENTRATION OF CHLORINE

Kanji Sugiyama, Katsuhiko Ohata, Mitsuaki Suzuki, Rieko Shimogawara, Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, and Takuro Endo

120

In most of hot spring baths in Japan, bathing water is circulated for extended use to conserve hot spring water. In recent years, massive outbreaks of Legionnaires' disease among hot spring bath users have been reported in many districts in Japan (1–3).

Through experiments using a model bathing facility (consisting of a bathtub (2 m³), a hair catcher, a circulating pump, a filter (ceramic filtering medium, 100 kg, LV: 25.5 m/h), a water heater (40°C), and pipe), we could reproduce the growth of *Legionella* (10⁵ to 10⁶ CFU/100 ml) naturally under a circulating condition when chlorine was not added into the water (see chapter 102). Furthermore, we found that the filtering medium was the most highly contaminated by *Legionella* among the parts of the circulating system. Thus, the filtering medium itself became a new source resulting in continuous contamination of bathing water by *Legionella* when disinfection of the filtering medium was inadequate, even

though the bathing water had been replaced (see chapter 102).

In the present study, we used a bath model to investigate the effectiveness of backwashing the filtering medium using a high concentration of chlorine for disinfection and growth inhibition of *Legionella*. We then assessed the usefulness of this method from the perspective of hygiene control of circulating bathing water.

The procedure for assessing short-term and long-term effectiveness of backwashing using a model bath is as follows.

Short-term effectiveness: After proliferation of *Legionella* in the model bath, backwashing with chlorinated water at concentrations ranging from 5 to 10 mg/liter was performed for 5 min. We called this "the filter refreshment method." The water samples and ceramic sand were collected from the filter unit and analyzed both for *Legionella* and for host amoebae. Bacto-Agar (DIFCO), a monolayer that heat-inactivated *Escherichia coli* is deposited on, was used for isolating amoebae. The effectiveness of backwashing with tap water (0.2 mg/liter of chlorine concentration) was also assessed.

Long-term effectiveness: After depositions of organic substances by bathing in the presence of chlorine in the model bath, the addition of chlorine was stopped while the bath was in use until the chlorine was disappeared.

Kanji Sugiyama, Katsuhiko Ohata, and Mitsuaki Suzuki Department of Microbiology, Shizuoka Institute of Environment and Hygiene, Shizuoka-City, Shizuoka Pref. 420-8637, Japan. *Rieko Shimogawara, Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, and Takuro Endo* Department of Parasitology, National Institute of Infectious Disease, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan.

Legionella: State of the Art 30 Years after Its Recognition
Edited by Nicholas P. Cianciotto et al.
© 2006 ASM Press, Washington, D.C.

497