

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

令和4年度分担研究報告書

「レジオネラ検査精度管理の向上を目的とした検討と英国 FAPAS®への試験的参加」

- | | | |
|---------|-------|----------------|
| ○ 研究分担者 | 枝川亜希子 | 大阪健康安全基盤研究所 |
| 研究分担者 | 前川純子 | 国立感染症研究所 |
| 研究協力者 | 井上浩章 | アクアス株式会社 |
| 研究協力者 | 縣 邦雄 | アクアス株式会社 |
| 研究協力者 | 杉山順一 | 日本建築衛生管理教育センター |
| 研究協力者 | 安齋博文 | 日本建築衛生管理教育センター |
| 研究協力者 | 小池真生子 | 大阪健康安全基盤研究所 |

浴槽水を対象としたレジオネラ検査結果は、行政指導の根拠となることに加え、日常的な衛生管理を行う上での重要なデータであることから高い精度が求められる。そのため、レジオネラ検査を実施している多くの検査機関は外部精度管理に参加し、自施設の検査精度の確認を行っている。

レジオネラ外部精度管理は、国内外で複数実施されている。国内は1社のみで、前研究班がサポートする形で2015年から実施されているが、この外部精度管理は指定法で行うことが定められており、自施設の日常的に行っている通常の検査方法で参加したいとの要望が強くあった。そこで本研究班では課題の抽出を行うと共に、課題解消の要望を行った。また、外部精度管理の選択肢を示すことを目的に、日本国内から参加可能な海外の外部精度管理について、情報を整理して紹介することとした。そして、その中から英国 FAPAS に試験的参加を行い、国内から問題なく参加できるかを確認した。FAPAS は、参加費支払いなどの事務的な手続き、検査内容、分析レポートの発行まで、全体的に問題なく参加可能であったことから、レジオネラ外部精度管理の選択肢の1つになり得ると考えられた。

A. はじめに

浴槽水を対象としたレジオネラ検査は、地方衛生研究所、保健所、民間検査機関を含め多くの機関で実施されている。公衆浴場

等の浴槽水のレジオネラ基準値は、厚生労働省の通知により、培養法で「検出されないこと（10 CFU/100mL 未満）」と定められている。レジオネラ検査結果は、行政指導の根

拠となることに加え、日常的な衛生管理を行う上での重要なデータであることから、高い精度が求められる。

培養法は、試料水の濃縮、レジオネラ以外の微生物類を抑制するための前処理、培地への接種の3工程で実施する。これらの工程にはそれぞれ複数の方法があり、濃縮方法としてろ過濃縮法または遠心濃縮法、前処理として酸処理または熱処理、選択培地はGVPC α 寒天培地またはWYO α 寒天培地などがある。それぞれの工程で選択肢があることは、試料水の水質、検査機関の保有機器類などを考慮して、それぞれに適した検査方法を選択できるという利点がある一方で、これら一連の操作が検査精度に反映されるため、各検査機関での精度にばらつきが出やすい要因の一つとなっている。そのため、各検査機関は外部精度管理に参加し、自施設の検査精度の確認を行っている。

レジオネラ外部精度管理は、海外を含めて複数実施されている。国内は1社のみで、前研究班がサポートする形で2015年から実施されているが、この外部精度管理は指定法で行うことが定められており、自施設の日常的な検査方法で参加したいとの要望が強くあった。そこで本研究班では、現行の国内外外部精度管理について、課題の抽出を行うと共に、実施母体の日水製薬に課題の解消を要望することとした。また、外部精度管理でのばらつきの要因の一つである培地種別による検出菌数の違いについて確認を行った。さらには、外部精度管理の選択肢を示すことを目的に、日本国内から参加可能な海外の外部精度管理について、情報を整理して紹介することとした。そして、その中から英国FAPASに試験的参加を行った。

B. 方法

1) 国内外外部精度管理の課題

日水製薬が実施する「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ（以下、サーベイ）」について、提供された実施概要から指定法や解析方法を確認すると共に、前研究班が参加したこれまでのデータを確認した。

サーベイは指定法で行うため、各工程でのばらつきは大きくないと考えられたが、使用培地の種類は指定されているものの、メーカーの指定はされていない。参加者の多くが生培地を購入して使用しており、主に国内で流通している4社の培地が使用されていた。これら培地種別およびメーカーによる検出菌数の違いを確認するために、配付試料であるバイオボール（令和3年度分）をサーベイの指定通りに生理食塩水に溶解し、それぞれの培地に接種した。選択培地はGVPC α 寒天培地（日水製薬、日研生物、関東化学）、WYO α 寒天培地（栄研化学）、MWY寒天培地（関東化学）、非選択培地はBCYE α 寒天培地（栄研化学、日水製薬、日研生物、関東化学）を使用した。

2) 外部精度管理の情報収集

国内の外部精度管理に課題が多いことから、民間検査機関の中には英国UKHSA（UK Health Security Agency）の外部精度管理に参加しているところも多い¹⁾。しかし、支払い事務での制約や、英語対応のみであることから、地方衛生研究所等の行政機関や小規模な民間検査機関が参加するのは難しい場合がある。本研究班では、外部精度管理の選択肢を示すことを目指し、今現在、日本から参加可能な外部精度管理の情報収集を行った。

3) 英国 FAPAS®レジオネラ外部精度管理プログラムへの参加

国外外部精度管理のうち、国内で代理店が設定されている英国 FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) に試験的参加を行った。FAPAS は、1990 年設立された ISO/IEC 17043 (認証番号 0009) に認定された国際的な技能試験プロバイダーの 1 つである。大きく分けて 4 つのスキームがあり、食品化学検査分野の FAPAS、微生物検査分野の FEPAS、遺伝子組換え食品検査分野の GeMMA、水質検査分野の LEAP がある。これまでに世界 140 カ国以上、4500 以上のラボが参加し、日本では 250 カ所以上のラボが参加しているが、レジオネラ外部精度管理に関しては国内参加実績がない。今回、外部精度管理の内容だけでなく、申込みや参加費支払いなどの事務的な手続きも含めて、国内から問題なく参加できるかを確認した。

令和 4 年 10 月実施された FAPAS レジオネラ外部精度管理 (LG0119) に、国立感染症研究所、大阪健康安全基盤研究所、アクアス株式会社、日本建築衛生管理教育センター、大阪府茨木保健所、大阪府藤井寺保健所、大阪府泉佐野保健所の計 7 機関が参加した。FAPAS は、自施設の方法で非選択培地 (BCYE α 寒天培地) を用いることが指定されているが、選択培地で参加も可能との回答を得た。ただし、その場合は選択培地を用いた参加機関のみで解析を行うとのことであったため、今回は非選択培地でのデータを FAPAS に回答することとし、合わせて選択培地を用いた検査を実施し、結果について解析した。

C. 結果及び考察

1) 国内外外部精度管理の課題解消へ向けての要望

日水製薬の「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」は、凍結試料 (バイオボール) を生理食塩水で溶解して精度管理用試料を作製し、培養法を実施する。濃縮操作や培地接種操作などの手技の精度確認に主眼を置いているため、通常検査で必須な前処理 (酸処理または熱処理) が指定法には含まれない。培地は非選択培地を使うことや、それぞれの工程に方法や容量が指定されており、日常的に行っている通常検査の方法とは相違が見られた。また、これまでに前研究班が実施した 8 年分の報告書やデータを確認したところ、培地 1 枚当たりの菌数が 0 や 1 桁であるものも多く、培地上のコロニー数が 30~300 が望ましいとされている中、菌数設定が少ないと考えられた。

これらのことから、研究班から日水製薬へ、日常的に行っている検査方法で参加可能な外部精度管理への変更を要望した。具体的には、前処理方法や選択培地を用いた検査を指定法に追加し、これまでの方法も同時に行うことで蓄積されたデータも生かせるように配慮した。また、参加者の培地準備の負担が増えないように、全体として必要最低限の培地枚数を提案した。これらについて、対面およびオンラインでの協議を重ねたが、最終的には研究班からの要望には応じられないとの回答があり、令和 4 年度の日水製薬「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」は前年度からほぼ変更なしで実施されることとなった。

培地種別およびメーカーによる検出菌数の違いを確認するために、同一ロットのバ

イオボール 2 個を使用して、指定法に記載の通り滅菌生理食塩水に溶解し、それぞれ培地に接種した。その結果、イオボールおよび培地メーカーの違いで若干の菌数の差が見られたものの（表 1）、Z スコアへの影響は大きくないと考えられた。培地上のコロニーの形状や色調に若干の差が見られたことから、新たにメーカーを変更する場合は、事前にコロニーの発育を確認することが必要である。

2) 外部精度管理の情報収集

日本国内から参加可能なレジオネラ検査外部精度管理について、表 2、写真 1 に示す。

3) FAPAS[®]レジオネラ外部精度管理

FAPAS の申込みは、代理店であるセントラル科学貿易 (<https://cscjp.co.jp/fera/>) を通じて行った。試料はカテゴリー B の病原体として常温で英国から Fedex で空輸され、受取り後は検査開始まで冷蔵で保存した。小型のプラスチック容器（バイオボトル）の中に試料のガラスバイアル 2 本（試料 A、B）が入っており、ガラスバイアルの底面から 1cm 程度、フリーズドライ様のものが充填されていた（写真 2）。これを指示書通りに滅菌蒸留水で溶解し、外部精度管理用の水試料を作製した。指示書に記載された検査方法は、「ルーチンメソッドで検査すること」のみであった。レジオネラ検査を実施後、検出/不検出、菌数、菌種等を報告した。報告締切後、約 3 週間で分析レポートが返却された。

分析レポートの内容は、全施設の報告結果と Z-スコアである。FAPAS レジオネラ

外部精度管理 (LG0119) には、24 施設が参加し、試料 A は 92%、試料 B は 83% がレジオネラ検出と回答していた。本研究班からの 7 機関はすべて、試料 A、B 共にレジオネラ検出で回答している。分析レポートでは全参加機関が回答した菌数や菌種が示され、Z スコアのグラフから参加機関中での自施設の位置が確認できた。この他に、各施設での検査方法やフィルターや使用培地の種類についての記載もあり、参加者にとって知りたい必要十分な情報が記載されていた。分析レポートは A4、28 ページで発行された（写真 3）。実施者である Fera への申込みから分析レポートに関する問い合わせまで、すべて日本語でセントラル科学貿易を通じて行っており、担当者の対応は丁寧かつ迅速であった。

FAPAS への報告分とは別に、試料 B について、残りの試料を用いて 7 機関で前処理と選択培地を用いた通常のレジオネラ検査を計 23 試験行ったところ、レジオネラ検出が 14 試験（10~100 CFU/100mL）、不検出が 9 試験であった。レジオネラ検出の 14 試験について、Z スコアを算出したところ、Z スコアはすべて 2.0 以下であったもの、試料 B は通常のレジオネラ検査で実施するには若干菌量が少ないと考えられた。FAPAS が指定する前処理なし+非選択培地で行った結果の菌数を 100% とすると、前処理なし+選択培地は 91.1%、酸処理+BCYE α は 48.0%、熱処理+BCYE α は 32.0%、酸処理+選択培地は 36.3%、熱処理+選択培地は 27.4% となり、前処理および選択培地を使用することで菌数の減少が見られ、前処理方法別では酸処理より熱処理の方が菌数の減少が大きかった。

今回、試料 A は 5~6Log₁₀ CFU/L の菌量が含まれており、100 倍濃縮で行うルーチンメソッドでは培地 1 枚当たりの菌数が多く、コロニーのカウントが出来ない施設があった。今回はルーチンメソッドである濃縮法のみで行ったが、菌量が多いことも想定して検査方法を追加した方がより正確な菌数を報告できると考えられた。一方、試料 B は 3~4Log₁₀ CFU/L の菌量が含まれており、前処理なし+非選択培地での検査法では培地 1 枚当たりのレジオネラ菌数が適量であったが、同時に行った前処理+選択培地では不検出となったものがあった。今回、日常的に行っている通常の検査方法で参加したいという研究班からの要望に対し、前処理+選択培地を用いた参加機関のみで解析を行うセミオーダー試験の提案があったが、セミオーダー試験で受けていた場合、試料 B については菌数の回答ができず、解析結果が得られない可能性があった。外部精度管理ではより多くの参加機関数で解析した方が偏りは小さいことから、日本国内での参加機関のみ抽出するのではなく、FAPAS の指示通りの検査方法で参加し、全参加機関数で解析した分析レポートをもらった方が有用であると考えられた。

FAPAS レジオネラ外部精度管理の毎回の菌数設定については不明であるが、LG0119 については菌量の違う 2 種の試料が配布され、それぞれの機関のルーチンメソッドで行った結果、FAPAS が設定する設問に回答が可能であった。また、返却された分析レポートの Z スコアからは、全参加者中の位置を確認することができた。また、参加費支払いなどの事務的な手続きを大阪健康安全基盤研究所（支払い等々の経理ルー

ルは大阪府と同じ）で行ったが、特に問題はなかった。全体的に問題なく参加可能であったこと、そして前処理なし+非選択培地との指定があったものの、操作自体は日常的な通常の検査方法と同じで参加可能であったことは、日頃の検査技術を確認したい参加者にとって非常に有用であり、FAPAS はレジオネラ外部精度管理の選択肢の 1 つになり得ると考えられた。今回、通常の検査方法で参加したいという研究班からの要望に対し、実施者である Fera から事前にそれに応える提案があったことや、その他の問い合わせに対しても丁寧な回答があったことは好印象であった。今後、日本国内での参加者が増えた際には、日本の参加機関からの様々な要望に引き続き対応してくれることを期待したい。

D. まとめ

現行の国内外外部精度管理について、課題の抽出を行うと共に、課題の解消を実施者に要望した。外部精度管理の選択肢を示すことを目的に、日本国内から参加可能な外部精度管理について、情報を整理して紹介した。そして、その中から英国 FAPAS に試験的参加を行った。FAPAS はレジオネラ外部精度管理の選択肢の 1 つになり得ると考えられた。

E. 引用文献

1) 井上浩章、抗レジオネラ用空調水処理剤協議会の取り組みと冷却水系のレジオネラ属菌対策、ビルと環境、No.161、pp.43-50、2018

F. 研究発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 謝辞

FAPAS 外部精度管理の参加について、大阪府健康医療部健康医療総務課ならびに大阪府茨木保健所・藤井寺保健所・泉佐野保健所の検査課にご協力いただきました。

表 1. 培地種別およびメーカーの違いによる検出菌数

	Bioball ①	Bioball ②
WYO α 寒天培地 (栄研化学)	20	31
GVPC α 寒天培地 (日水製薬)	16	44
GVPC α 寒天培地 (日研生物)	16	32
GVPC α 寒天培地 (関東化学)	24	40
MWY 寒天培地 (関東化学)	21	56
BCYE α 寒天培地 (栄研化学)	46	52
BCYE α 寒天培地 (日水製薬)	25	50
BCYE α 寒天培地 (日研生物)	46	62
BCYE α 寒天培地 (関東化学)	48	65

Bioball ①と②は、同一ロット

菌数は、培地 5 枚に接種した平均値 (CFU/plate)

培地名称は、一般名を記載 (商品名ではない)。

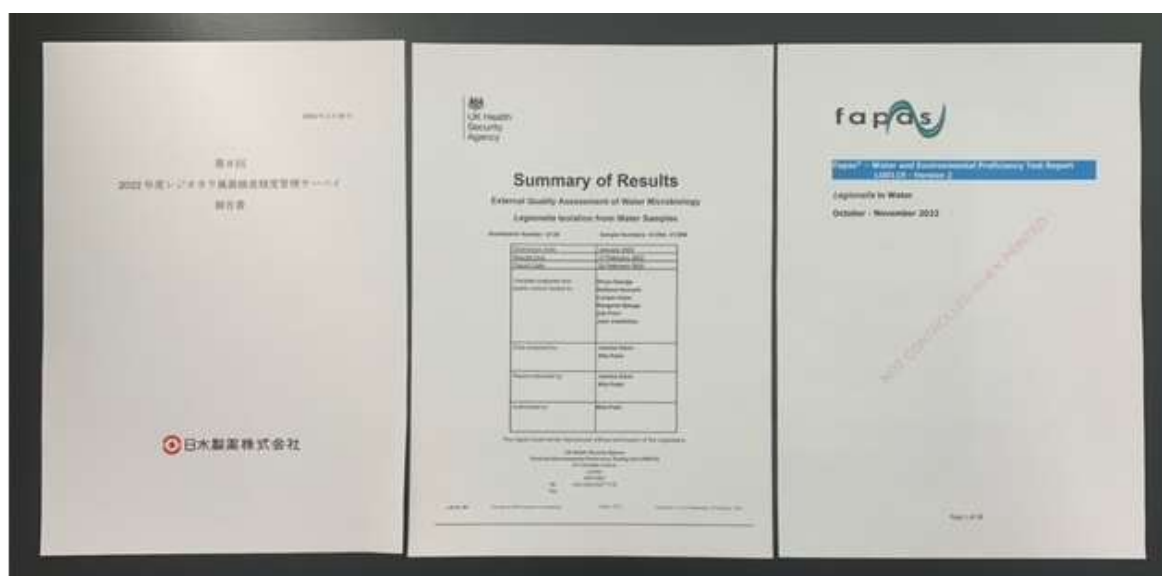


写真 1. 日本国内から参加可能なレジオネラ検査外部精度管理の分析レポート
 左からレジオネラ属菌検査精度管理サーベイ、UKHSA による外部精度管理 (資料提供：
 アクアス株式会社井上浩章氏)、FAPAS

表 2. 日本国内から参加可能なレジオネラ検査外部精度管理

名称	レジオネラ属菌 検査精度管理サーベイ	External Quality Assessment of Water Microbiology <i>Legionella</i> Isolation from Water Samples	FAPAS [®] (Food Analysis Performance Assessment Scheme)
実施者	日水製薬株式会社	UKHSA (UK Health Security Agency) 英国健康安全保障庁	Fera (The Food and Environment Research Agency) 独立行政法人英国食料環境研究 庁(英国環境食料農村地域省傘下)
国	日本	英国	英国
日本からの参加実績	あり	あり	なし
参加費 (1回あたり)	38500 円 (消費税込)	172 ポンド (2022 年度) (約 30000 円)	52800 円 (消費税込)
年間実施回数	1	4	4
参加者数	約 180	114~173 (1回あたり)	20 程度 (1回あたり)
国内代理店の有無	—	なし	あり (セントラル科学貿易)
日本語サポート	—	なし	あり
配付試料の輸送	冷凍	常温	常温
検査実施までの保管	冷凍	冷凍	冷蔵
1回あたりの 配付試料数	1	2	2
配布試料中のレジオネ ラ以外の細菌の混合	なし	あり	なし
いずれかの配布試料中 にレジオネラが含まれ ない可能性	なし	あり	あり
配布試料中に含まれる レジオネラの菌種	<i>Legionella pneumophila</i> のみ	複数種	複数種
配布試料中に含まれる レジオネラの菌種数	1 種	1~2 種	1~2 種
配布試料の形状	BioBall フリーズドライ	Lenticule Disc ゼラチン状のディスク	Lyophilized sample フリーズドライ様
検査方法	指定法	自施設の方法	自施設の方法 非選択培地を用いる (選択培地で参加も可)
検査結果の報告	菌数	菌数 菌種 (血清群)	菌数 菌種 (血清群)
解析方法	Z スコア	Z スコア	Z スコア
分析レポートの ページ数	23	10	28

この他に、米国 CDC の ELITE (The Environmental Legionella Isolation Techniques Evaluation) があるが、日本から参加可能かは不明である。



写真 2. FAPAS レジオネラ外部精度管理の配付試料

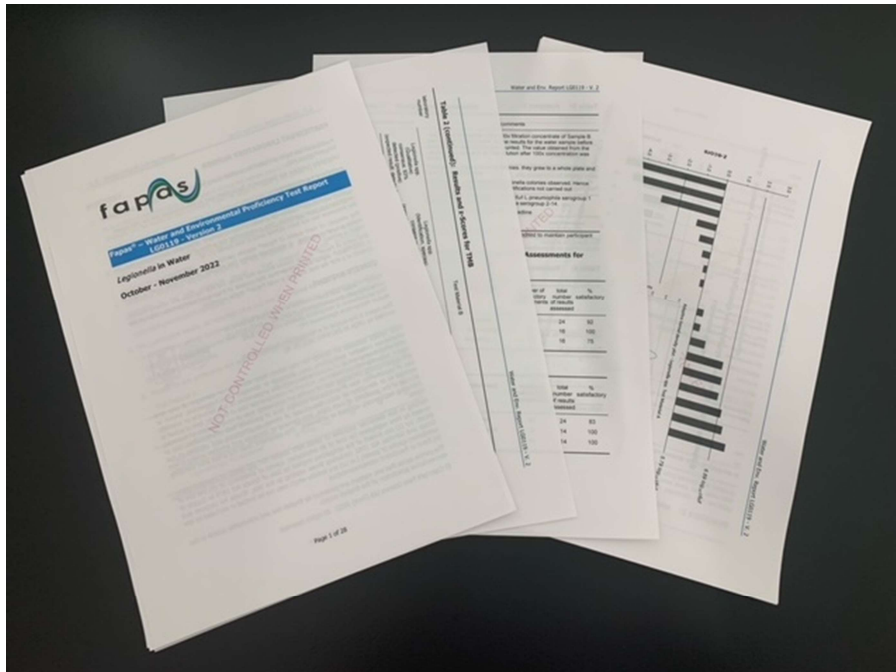


写真 3. FAPAS レジオネラ外部精度管理分析レポート