

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 5 年度分担研究報告書

「外部精度管理の選択肢整備へ向けた検討と英国 UKHSA の EQA Legionella isolation scheme への参加」

- 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。

現在、日本国内から参加可能なレジオネラ外部精度管理は 3 種（国外 2 種、国内 1 種）ある。2022 年度末の国内レジオネラ属菌外部精度管理に、本研究課題の支援のもとで、地方衛生研究所 70 機関が参加した。本外部精度管理は培養の前処理（酸・熱処理）を行わない指定法で行うことになっていたが、実際の検査に即して、前処理を行う標準的な検査方法を追加しての参加を行った。他方、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 3 種の外部精度管理の情報をアップデートした。そして、この中から今年度は英国 UKHSA の外部精度管理に参加し、試験操作や事務的な手続きを含めて、日本国内から問題なく参加できることを確認した。英国 UKHSA の配付試料はレジオネラに加えて夾雑菌を含むもので、環境水試料に非常に近い実践的な内容であったものの、事務手続きに課題があった。この課題は、国内代理店を通じた手続きを行うことで、解消の見込みである。

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。そのため、多くの検査機関は自施設で標準作業手順書(SOP)を作成し、その方法に沿って外部精度管理に参加して検査精度を確認すると共に、検査技術の維持向上に努めている。

現在、日本国内から参加可能なレジオネラ外部精度管理は3種(国外2種:英国UKHSA、英国FAPAS、国内1種:島津ダイアグノスティクス株式会社)ある。2022年度には、国内レジオネラ属菌外部精度管理に地方衛生研究所70機関が参加した。本外部精度管理は指定法で行うことになっているため、指定法に加えて、標準的な検査方法を追加して実施し、今年度はそのデータを収集して解析した。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3種の外部精度管理について昨年度から情報収集しているが、変更点について確認した。そして、この中から今年度は英国UKHSAの外部精度管理に参加し、試験操作や事務的な手続きを含めて、日本国内から問題なく参加できるかを確認した。

B. 方法

1) 国内外部精度管理への参加

島津ダイアグノスティクス株式会社(旧: 日水製薬)が実施する「2022年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ(以下、サーベイ)」に地方衛生研究所70機関が参加した。サーベイの指定法である「前処理(酸処理または熱処理)なし、非選択培地」に加え、環境水レジオネラ検査の標準的な方法である

「前処理(酸処理または熱処理)あり、選択培地」を追加して実施した。また、島津ダイアグノスティクス株式会社よりデータの提供を受け、2016年~2022年までの7年間のZスコア年度別推移の解析を行った。

2) 外部精度管理の情報収集

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、日本から参加可能な外部精度管理3種の情報収集を行っている。これらについては昨年度の報告書にまとめているが¹⁾、昨年度からの変更点を確認し、情報をアップデートした。

3) 英国UKHSAレジオネラ外部精度管理プログラムへの参加

UKHSA(英国健康安全保障庁: UK Health Security Agency)が実施するThe external quality assessment(EQA) legionella isolation schemeのG132(令和5年10月実施)に、大阪健康安全基盤研究所が参加した。EQAは、試料の作製、配付から結果の解析等すべてをUKHSAが行っている。これまでに20年以上の歴史があり、欧州を中心に150以上の検査機関が参加している。日本国内からは民間検査機関を中心に参加実績がある²⁾。EQAの検査指示書には「ルーチンメソッドで行う」と指定されており、自施設のSOPに沿った標準的な検査法で参加が可能である。一方で、国内代理店がないため、参加者はUKHSAに直接申込みをしなければならない。そのため、外部精度管理の内容だけでなく、申込や参加費の支払いなど事務的な手続きを含めて、国内から問題なく参加できるかを確認した。

C. 結果及び考察

1) 国内外外部精度管理サーベイ参加結果

2022年度サーベイ全体の参加数は175施設181名、内訳は、地方衛生研究所・保健所91施設(52.0%)、民間検査施設55施設(31.4%)、財団・社団法人等29施設(16.6%)であった。ろ過濃縮法は166名(91.7%)、遠心濃縮法は15名(8.3%)、検出菌数範囲は100~167,000 CFU/100mL(平均値:10,000 CFU/100mL、中央値:8,180 CFU/100mL)、不検出は4名であった。

参加者全体の検出結果から算出したZスコアおよび分布を示す(図1)。Zスコアは{(報告値(対数変換) - (平均値(対数変換))) / 標準偏差}により算出し(標準偏差は島津ダイアグノスティクス株式会社が解析に用いている0.25を用いた)、Zスコアの絶対値が2以内を良好範囲内とした。参加者全体のZスコア良好範囲内は142名(78.5%)、菌数範囲は3,120~21,100 CFU/100mLであった。研究班から参加した地方衛生研究所70名(ろ過濃縮法68名、遠心濃縮法2名)については、Zスコア良好範囲内は58名(82.9%)、検出菌数範囲は3,120~19,560 CFU/100mLであった。

研究班から参加した地方衛生研究所70名が実施した2種の検査方法、すなわち、サーベイの指定法である「前処理(酸処理または熱処理)なし、非選択培地」と、追加で行った環境水レジオネラ検査の標準的な方法である「前処理(酸処理または熱処理)あり、選択培地」について、検出菌数の比較を表1に示す(2021年度、2022年度、計140名)。細菌検査において、1シャーレ当たりの菌数は30~300CFUが望ましい。この範囲内であった参加者はサーベイ指定法では

115名(82.1%、報告数140名)、追加の方法では16名(16.5%、報告数97名)であった。また、追加の方法では19名(19.6%)が不検出になったことから、自施設のSOPに沿った検査方法=「前処理(酸処理または熱処理)あり、選択培地」で行うためには、菌数設定を高くする必要があると考えられた。これらを踏まえて、島津ダイアグノスティクス株式会社に対し、自施設のSOPに沿った検査方法で参加可能な外部精度管理への変更を検討するように要望した(R4年度報告書参照¹⁾)。

Zスコアの絶対値が2以内の良好範囲内の参加者数の割合(%)について、年度別に図2に示す。2016年~2022年までの7年間の良好範囲内の参加は72.0%~81.1%の範囲であった。報告値の分布が正規分布に従うとみなせる場合、Zスコアの絶対値が2以内となる確率は約95%である。この値と比較して低い傾向である理由是不明であるが、参加者全体のZスコアが正規分布を示していないことや(図1右図)、レジオネラ属菌検査はばらつきが生じやすいこと³⁾などが影響している可能性が考えられる。

外部精度管理の目的は、日常的に行われている自施設のSOPに沿った方法で参加し、その検査精度を確認するものである。指定法で行う島津ダイアグノスティクス株式会社の実施する外部精度管理については、実施者が記載している通り「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」ことに留意が必要である。

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3種について、表2に示す。

昨年度からの大きな変更点は、UKHSA の国内代理店の有無が「あり」になることである（C. 結果及び考察の3）参照）。

3) 英国 UKHSA の外部精度管理 (EQA)

EQA の G132 (令和 5 年 10 月実施) に大阪健康安全基盤研究所が参加した。日本送付分の試料をまとめて輸送したいとの希望があり、EQA に継続して参加しているアクアス株式会社に荷受協力を依頼した。カテゴリー B の病原体として英国から常温で輸送された試料は、国内到着後に輸送規則に従って再梱包され、国内輸送された。受取り後の試料は、検査開始まで冷凍で保存した (写真 1)。EQA の検査指示書

(instruction sheets) は、UKHSA のサイトに英語、フランス語など 6 か国語で公開されている

([https://www.gov.uk/government/publications/legionella-scheme-sample-](https://www.gov.uk/government/publications/legionella-scheme-sample-instruction-sheets)

[instruction-sheets](https://www.gov.uk/government/publications/legionella-scheme-sample-instruction-sheets))。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」のみであり、自施設の SOP に沿った方法で行うものであった (図 3)。試料は 2 種類あり、スクリュウキャップ付きチューブに入った LENTICULE disc で配付され、指示書通りに Page's saline (または、1:40 Ringers' solution) で溶解し、外部精度管理用の試料水を作製した。また、溶解方法は動画が用意されている

(<https://youtu.be/5lXHoiwIGpE>)。

LENTICULE disc は、チューブのキャップやラベルと同じ色 (緑・青) で色付けされおり、溶解液の中に入れた際の溶解を容易に目視で確認可能であった。この作製した試料水を用いてレジオネラ属菌検査を実

施し、検出/不検出、菌数、菌種等を報告した。報告期限日から 10 日で解答が送付され、20 日後に分析レポートが送付された。今回参加した EQA の試料には、コロニーの形状がレジオネラ様のレジオネラ属菌以外の細菌も含まれていた (写真 2)。L-システイン要求性試験など性状試験を正しく行わなければ鑑別できない内容になっており、環境水試料に非常に近い実践的な内容であった。分析レポートには、Zスコアや参加者の報告菌数が全体のどの位置に分布しているかなどが示されていた。今回の参加は良好な結果であったことを確認しており、EQA は日本国内の標準的なレジオネラ属菌検査法で問題なく参加できることを確認した。

UKHSA の EQA 参加のための事務手続きは、国内代理店がないため、UKHSA へメールで書類を取り寄せて種々の手続きを行った。参加費支払いなどの事務的な手続きは、大阪健康安全基盤研究所の経理ルール (大阪府と同じ) に従って行い、外部研究費による立替払いで行った (行政機関は海外機関への支払いが出来ないため)。申込み等のメールでのやり取りは全て英語であったこと、海外送金には審査等で時間が生じたことなどから、UKHSA へ参加者が直接申し込みするのは非常に負担が大きいと考えられた。昨年度参加した FAPAS については、実施機関は英国であるが国内代理店があるため、このような事務的負担は生じなかった。これらのことから、レジオネラ属菌検査外部精度管理の選択肢の 1 つにするためには、日本国内での代理店が必要であると考えられた。そのため、UKHSA に日本国内での代理店設定が可能かを確認した。

その結果、可能との回答が得られたことから、いくつかの民間会社に UKHSA の国内代理店の検討を要請した。2024 年度からはアイデックスラボラトリーズ株式会社が UKHSA の国内代理店となり、今後は日本国内から容易に参加できるようになる予定である。

D. まとめ

外部精度管理の目的は、日常的に行われている自施設の SOP に沿った方法で参加し、その検査精度を確認するものである。検査機関は、外部精度管理の目的を満たすプログラムに参加することが望ましい。

今年度に参加した UKHSA については、環境水試料に近い試料で実践的であった。しかしながら、国内代理店がないため海外機関と直接のやり取りが必要であり事務手続きに課題があった。この課題に対し研究班からの要請により、2024 年度からはアイデックスラボラトリーズ株式会社が UKHSA の国内代理店となり、今後は日本国内から容易に参加できるようになる予定である。令和 4 年度からの検討により、レジオネラ属菌検査の外部精度管理の選択肢が整いつつある。引き続き課題の抽出を行い改善に努める。

E. 引用文献

- 1) 枝川亜希子ら、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、厚生労働科学研究費補助金（公衆浴場の衛生管理の推進のための研究）令和 4 年度分担研究報告、研究代表者：泉山信司、112-120、2022
- 2) 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、161、43-50、2018
3) 枝川亜希子ら、浴槽水試料を対象としたレジオネラ属菌精度管理の試み、日本防菌防黴学会誌、45(11)、525-528、2017

F. 研究発表

枝川亜希子、地方衛生研究所全国協議会レジオネラレファレンスセンター会議、「レジオネラ属菌検査精度管理について」、2023 年 7 月 20 日、オンライン会議

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 謝辞

島津ダイアグノスティクス株式会社にサーベイデータの提供を受けた。

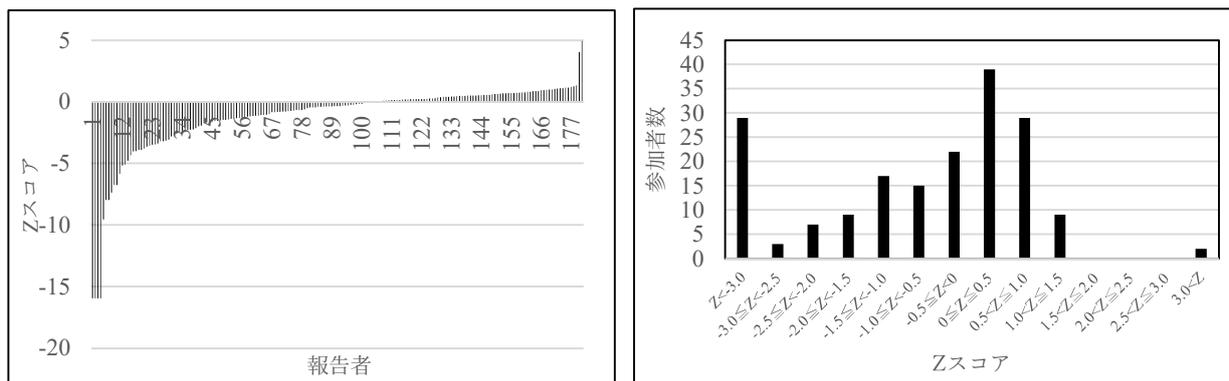


図1. サーベ全参加者のZスコアと分布（2022年度末分、参加者総数181名）

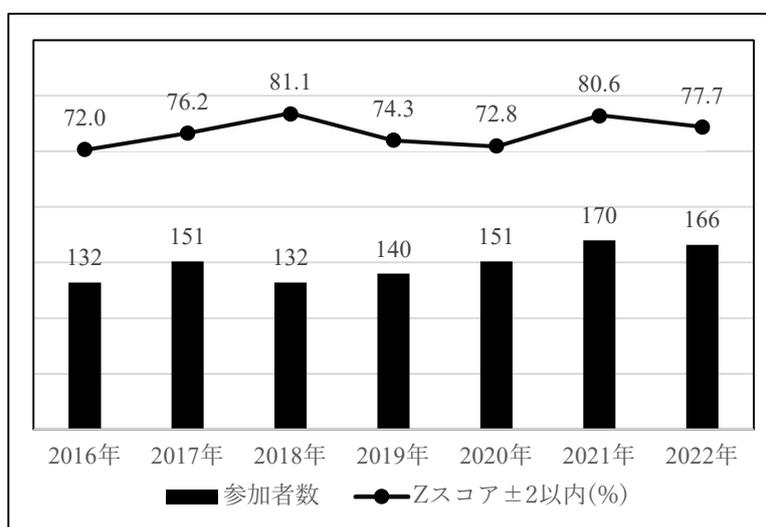


図2 サーベ年度別Zスコア±2以内の割合（2016年度～2022年度、ろ過濃縮法）

表1. サーベ指定法と標準的な方法との検出菌数比較
（2022年度末分、培地接種の液量、濃縮率は同じ）

菌数 CFU/plate	サーベ指定法	環境水レジオネラ検査の標準的な方法
	前処理（酸処理または熱処理）なし 非選択培地（n=140）	前処理（酸または熱）あり 選択培地（n=97）
0	2	19
1-29	14	61
30-99	41	13
100-199	58	3
200-299	16	0
300-500	9	1

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

略称	EQA	FAPAS®	レジオネラ属菌検査精度管理 サーベイ
実施者	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)	島津ダイアグノスティクス
国	英国	英国	日本
日本からの参加実績	あり	あり	あり
参加費 (1回あたり)	205 ポンド (約 38,000 円)	52,800 円 (消費税込)	40,700 円 (消費税込)
1回あたりの 配付試料数	2	2	1
年間実施回数	4	4	1
参加者数	114~173 (1回あたり)	20 程度 (1回あたり)	約 100
国内代理店の有無	なし ※2024 年度からあり (アイデックスラボラトリー ズ)	あり (セントラル科学貿易)	—
日本語サポート	あり	あり	—
配付試料の輸送	常温	常温	冷凍
検査実施までの保管	冷凍	冷蔵	冷凍
配布試料中のレジオネ ラ以外の細菌の混合	あり	なし	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	あり	あり	なし
配布試料中に含まれる レジオネラの菌種	複数種	複数種	<i>Legionella pneumophila</i> のみ
配布試料中に含まれる レジオネラの菌種数	1~2 種	1~2 種	1 種
配布試料の形状	LENTICULE disc ゼラチン状のディスク	Lyophilized sample フリーズドライ様	BioBall フリーズドライ
検査方法	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)	指定法 前処理 (酸処理または熱処理) なし、非選択培地を用いる
検査結果の報告	菌数 菌種 (血清群)	菌数 菌種 (血清群)	菌数
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	10	28	6

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。



Public Health
England

Protecting and improving the nation's health

Food and Environmental Proficiency Testing Unit

The final date for return of results is indicated on the accompanying request/report form

Contact details:

The Organisers - FEPTU
Public Health England
61 Colindale Avenue,
London, NW9 5EQ, UK.
Fax: +44 (0) 20 8200 8264
Tel: +44 (0) 20 8327 7119
e-mail: foodeqa@phe.gov.uk



0006

Results should be returned on-line using the web-based reporting system. Go to: www.phe-ega.org.uk. You will need your log-in details for this process. Please contact us if you experience problems with the on-line system.

www.gov.uk/government/collections/external-quality-assessment-ega-and-proficiency-testing-pt-for-food-water-and-environmental-microbiology#legionella-isolation-scheme

Water EQA Legionella Isolation – Instruction Sheet

Each distribution consists of **two** LENTICULE® discs in screw-cap plastic vials (with desiccant). The LENTICULE discs require reconstitution by a process of re-hydration and dispersion prior to examination for legionellae.

Refer also to the Safety Data Sheet: www.gov.uk/government/publications/safety-data-sheet-for-lenticules

For a video on sample processing click on link below and scroll to bottom of page:

www.gov.uk/government/publications/legionella-scheme-sample-instruction-sheets

Storage:

- Store the samples at $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ on receipt.
- Allow the LENTICULE discs to reach ambient temperature (5 - 10 minutes) before reconstituting in diluent.

Reconstitution:

- Open the sample container and transfer the LENTICULE disc into **1 Litre** of diluent (use either Page's saline or 1:40 Ringers' solution) by inverting the container over the diluent.
- Leave at ambient temperature for a minimum of 10 minutes to rehydrate. Ensure that the LENTICULE disc has dissolved completely before proceeding.
- Disperse the inoculum by inverting approximately 30 times.
- Examine samples between 30 - 45 minutes of reconstitution.

Examination:

- Each reconstituted LENTICULE disc is equivalent to a 1 Litre water sample.**
- The request/report form indicates the sample dilutions most likely to give a definitive result (rather than a censored value).
- Once the dilutions have been prepared, the samples must be examined in accordance with routine procedures.
- All samples require examination for the presence of *Legionella* spp.
- The identification and level (colony forming units per Litre (cfu L⁻¹)) of any legionellae detected must be determined.

Return of Results:

- Return your results on-line using the web-based reporting system.
- The distribution will be closed on the deadline date for return of results.
- Results cannot be accepted after the distribution has closed.

<https://www.gov.uk/government/publications/legionella-scheme-sample-instruction-sheets>



写真1. UKHSA EQA の配付試料



写真2. UKHSA EQA (G132) コロニー検出状況 (WYO α 寒天培地)
レジオネラ属菌 2 種、レジオネラ属菌以外の菌が複数種含まれる