

各都道府県・政令市・特別区水道行政担当部（局）長 殿

厚生労働省健康局水道課長

水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について

水道行政の推進につきましては、日頃から格別のご協力を賜り厚くお礼申し上げます。

さて、水道におけるクリプトスポリジウム等の対策については、今般、最新の科学的知見等を踏まえ、「水道施設の技術的基準を定める省令」（平成 12 年厚生省令第 15 号。以下、「施設基準省令」という。）を改正するとともに、新たに、「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」（平成 19 年 3 月 30 日付け健水発第 0330005 号通知の別添。以下、「指針」という。）が示され、平成 19 年 4 月 1 日より適用することとしたところですが、指針中 2. 及び 3. の（2）において別に定めることとした「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法」を別添 1～3 のとおり示したので、下記事項に御留意の上、貴管下の水道事業者等に対する検査方法の周知方をお願いします。

なお、当省においては、引き続き新たな知見の集積を行い、適宜検査方法を見直していくこととしておりますので、貴職の御協力を併せてお願いします。

記

第 1 検査方法の概要

1. 指標菌の検査方法

（1）大腸菌の定量方法

現在、水道原水の大腸菌の検査方法として、広く標準的に使用されている方法を基に、次の方法を別添 1 に示した。

- ・特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法

（2）嫌気性芽胞菌の検査方法

現在、水道原水の嫌気性芽胞菌の検査方法として、広く標準的に使用されている方法を基に、次の方法を別添 2 に示した。

- ・ハンドフォード改良寒天培地法
- ・M-C P 寒天培地法
- ・D R C (Differential Reinforced Clostridial) 培地法

2. クリプトスポリジウム等の検査方法

従来、「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法について」（平成 10 年 6 月 19 日付け衛水第 49 号通知）において、応急対応のための検査方法として定められ、標準的に使用されている方法を基に、「標準的方法」及びその他の方法を別添 3 に示した。

なお、水道の原水及び給水栓水等についての検査方法、応急対応のための検査方法については、「標準的方法」を用いて行うことを基本とするが、「標準的方法」との比較や添加系における回収実験等を行い、対象水に対する適切性、回収率の信頼性等を確認

することができた場合は、その他の方法を用いてもよいこととし、いずれの場合にあっても、試験結果の信頼性が確保できるよう、適切な条件、操作方法を選定すべきであること。

第2 留意事項

1. 定期的な原水に係る検査の実施について

水道原水におけるクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの程度を把握するため、指針に基づき、できるだけ早期に原水に係る検査の実施体制の整備等につき必要な措置を講じ、定期的に原水のクリプトスポリジウム等及び指標菌の検査を実施すること。

また、平成20年度以降については、原水の指標菌の検査及びクリプトスポリジウム等による汚染のおそれのある施設における原水のクリプトスポリジウム等の検査についても、水道法（昭和32年法律第177号）第20条第1項の規定に基づく水質検査に準じて、水道法施行規則（昭和32年厚生省令第45号）第15条第6項の規定に基づく水質検査計画に位置付けられたいこと。

2. 定量的な汚染リスクに関する知見の収集について

クリプトスポリジウム等及び指標菌に関しては、水道原水におけるクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの程度に関する定量的な知見が必ずしも十分でないことから、今回示した指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法により、汚染リスクに関する定量的なデータの集積に努めるべきであること。また、当省においては、これらの知見を踏まえ、今後、定量的な汚染リスクに基づく予防対策等について検討を進めることとしていること。

3. 検査方法の見直しについて

当省においては、引き続き新たな知見の集積を行い、通知に示す検査方法と同等以上の方法と認められるものについては、積極的に採用するべく、逐次、検査方法を見直す予定であること。

4. 飲料水における検査結果について

飲料水についての検査において、クリプトスポリジウム等の判別が困難な場合には、別途通知により示すこととしているクロスチェック実施要領に基づくクロスチェックにより、検査結果の確認が適切に行なわれるべきものであること。

なお、水道、飲用井戸等（水道法の規制を受けない水道を含む。）から供給される飲料水において、クリプトスポリジウム等の塩素消毒に耐性のある病原生物の検出情報を把握した場合には、「飲料水健康危機管理実施要領について」（平成14年6月28日付け健水発第0628001号通知）に基づき直ちに当職宛に連絡いただくようお願いしているところであるので念のため申し添えます。

また、クリプトスポリジウム等が水道原水中に存在する場合には、紫外線処理を行っても、クリプトスポリジウム等は浄水にも存在することとなるが、紫外線処理が適切に行われている場合には、ヒトに対する感染性はなく、指針に基づく運転管理を確実に実施することにより、浄水の安全性を確保すべきこと。

第3 関係通知の改廃等

平成19年4月1日付けをもって、厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長通知「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法について」（平成10年6月19日付け衛水第49号）及び「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法の付録の送付について」（平成12年3月30日付け衛水第18号）は廃止する。

別添 1 大腸菌の定量方法

特定酵素基質培地法

1 培地及び試薬

(1) MMO-MUG培地

硫酸アンモニウム5g、硫酸マンガン0.5mg、硫酸亜鉛0.5mg、硫酸マグネシウム100mg、塩化ナトリウム10g、塩化カルシウム50mg、ヘペス(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)6.9g、ヘペスナトリウム塩(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸ナトリウム)5.3g、亜硫酸ナトリウム40mg、アムホテリシンB 1mg、o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド500mg、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド75mg及びソラニウム500mgを無菌的に混合し、試験容器に100分の1量ずつ分取したもの

この培地は、黄色く着色したものは使用しない。

この培地は、冷暗所に保存する。

(2) IPTG添加ONPG-MUG培地

硫酸アンモニウム2.5g、硫酸マグネシウム100mg、ラウリル硫酸ナトリウム100mg、塩化ナトリウム2.9g、トリプトース5g、トリプトファン1g、o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド100mg、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド50mg、イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド100mg及びトリメチルアミン-N-オキシド1gを精製水約450mlに溶かし、pH値が6.1~6.3となるように調整した後、精製水を加えて500mlとし、ろ過除菌した後、試験容器に10mlずつ分注したもの

この培地は、冷暗所に保存する。

(3) XG a 1-MUG培地

塩化ナトリウム5g、リン酸一水素カリウム2.7g、リン酸二水素カリウム2g、ラウリル硫酸ナトリウム100mg、ソルビトール1g、トリプトース5g、トリプトファン1g、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド50mg、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド80mg及びイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド100mgを無菌的に混合し、試験容器に100分の1量ずつ分取したもの

この培地は、冷暗所に保存する。

(4) ピルビン酸添加XG a 1-MUG培地

塩化ナトリウム5g、硝酸カリウム1g、リン酸一水素カリウム4g、リン酸二水素カリウム1g、ラウリル硫酸ナトリウム100mg、ピルビン酸ナトリウム1g、ペプトン5g、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド100mg、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド100mg及びイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド100mgを無菌的に混合し、試験容器に100分の1量ずつ分取したもの

この培地は、冷暗所に保存する。

(5) 希釈水(リン酸塩緩衝希釈水)

リン酸二水素カリウム42.5gを精製水500mlで溶かし、1mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH値を7.2に調整した後、精製水を加えて1Lとした溶液1mlを精製水1Lで溶かし、高圧蒸気滅菌したもの

2 器具及び装置

(1) 採水瓶

検査方法告示の別表第1の2(1)の例による。

(2) 試験容器

検水10mlと培地が密封できるもので、滅菌したもの

(3) MMO-MUG培地用比色液

検査方法告示の別表第2の2(3)の例による。

(4) IPTG添加ONPG-MUG培地用比色液

検査方法告示の別表第2の2(4)の例による。

(5) XGa1-MUG培地用比色液

検査方法告示の別表第2の2(5)の例による。

(6) ピルビン酸添加XGa1-MUG培地用比色液

検査方法告示の別表第2の2(6)の例による。

(7) 恒温器

検査方法告示の別表第1の2(3)の例による。

(8) 紫外線ランプ

検査方法告示の別表第2の2(8)の例による。

(9) 紫外線防護眼鏡

3 試料の採取及び保存

検査方法告示の別表第1の3の例による。

4 試験操作

(1) 希釈検水の調製

検水中の大腸菌数が多いと予想される場合は、次の操作によって希釈検水を調製する。

検水10mlを採り、希釈水90mlに加えてよく振り混ぜる。次に、その10mlを採り、同様な操作を行いながら希釈を繰り返し、10倍ごとの数段階の希釈検水を作る。10倍希釈法の操作を図-1に示す。

なお、希釈検水は、微生物が増殖することや死滅することもあるので、室温に30分以上放置してはならない。

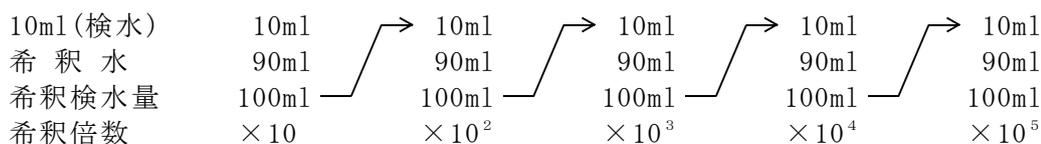


図-1 10倍希釈法の操作

(2) 培養操作

検水10mlを上記1のいずれかの10ml用培地入り試験容器5本に接種する。次いで、各段階の希釈検水について、同様に操作する。接種後、容器を振って培地を溶解あるいは混合させ、恒温器に収め、35～37℃で24時間培養する。なお、接種の際に、5本以上の接種本数となる組み合わせを用いてもよい。培養後、紫外線ランプを用いて波長366nmの紫外線を照射し、蛍光の有無を確認する。培地に対応する比色液より蛍光が強い場合は陽性と判定し、弱い場合は陰性と判定する。

5 菌数の算出

検水、各段階の希釈検水列の陽性管数を数え、最確数法に従って対応する最確数を求める。

別添 2 嫌気性芽胞菌の検査方法

第 1 ハンドフォード改良寒天培地法

1 培地及び試薬

(1) 標準濃度ハンドフォード改良寒天培地

大豆ペプトン4.8g、ペプトン15g、酵母エキス4.8g、クエン酸鉄アンモニウム0.90g、4-メトキシ-6-スルファ-ニルアミドピリミジン0.09g、ピロ亜硫酸ナトリウム0.90g、オレアンドマイシン0.48g、硫酸ポリミキシンB 9,000単位、カナマイシン0.048g、粉末寒天18gを精製水1Lに加熱溶解し、滅菌後のpH値が7.5~7.7となるように調整した後、高圧蒸気滅菌したもの

この培地は、恒温水槽で約45℃に保温し、三重層法に用いる。

この培地は、使用の都度調製する。

(2) 標準濃度ハンドフォード改良寒天平板培地

標準濃度ハンドフォード改良寒天培地を疎水格子用ペトリ皿又はメンブランフィルター用ペトリ皿に約15mlずつ分注して平板に固めたもの

この培地は、疎水格子フィルター法及びメンブランフィルター法に用いる。

この培地は、使用の都度調製する。

(3) 1.67倍濃度ハンドフォード改良寒天培地

標準濃度ハンドフォード改良寒天培地の各成分を精製水600mlを用いて(1)と同様に調製したもの

この培地は、パウチ法に用いる。

この培地は、使用の都度調製する。

(4) 希釈水(リン酸塩緩衝希釈水)

特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法の1(5)の例による。

2 器具及び装置

(1) 採水瓶

検査方法告示の別表第1の2(1)の例による。

(2) 加熱用容器

容量100ml以上のもので、滅菌したもの

(3) 疎水格子フィルター

50mm四方で1mm四方の1600区画にわけられているもので、滅菌したもの

(4) 疎水格子フィルターろ過装置

滅菌したもの

(5) 疎水格子用ペトリ皿

検査方法告示の別表第1の2(2)の例による。

(6) メンブランフィルター

孔径0.2~0.45 μ m、直径47mmのもので、滅菌したもの

(7) メンブランフィルターろ過装置

滅菌したもの

- (8) メンブランフィルター用ペトリ皿

直径約5cm、高さ約1.5cmのものであって、ガラス製又はプラスチック製で滅菌したもの

- (9) 嫌気ジャー

内部の酸素を除去し、嫌気状態にすることができるもの

- (10) パウチ

滅菌したもの

- (11) プラスチックシーラー

- (12) 恒温水槽

水温を45℃又は75℃に保持できるもの

- (13) 恒温器

温度を44～46℃に保持できるもの

3 試料の採取及び保存

検査方法告示の別表第1の3の例による。

4 試験操作

- (1) 検水の加熱処理

検水約100mlを加熱用容器に採り、75℃の恒温水槽に20分間浸して加熱した後、速やかに氷水に浸して冷やす。

- (2) 希釈検水の調製

特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法の4(1)の例による。

- (3) 培養操作

次のいずれかの培養操作を行う。なお、汚染の著しい検水では希釈検水を用いてもよい。

- a) 疎水格子フィルター法

疎水格子フィルターろ過装置にフィルターを装着し、ファンネルに加熱処理した検水又は希釈検水の30ml以上を入れ、吸引ろ過する。検水又は希釈検水のろ過が終了した後、希釈水20～30mlによりファンネル内壁を洗浄し、検水の場合と同様に吸引ろ過する。この洗浄ろ過操作を2～3回繰り返す。ろ過が完了した後、フィルターをろ過装置から外し、フィルターのろ過面を上にして気泡が入らないように標準濃度ハンドフォード改良寒天平板培地に密着させる。これを倒置して嫌気ジャーに入れて恒温器に収め、44～46℃で22～26時間培養する。

培養後、直径0.25mm以上の黒色集落をウェルシュ菌芽胞と判定する。

- b) メンブランフィルター法

メンブランフィルターろ過装置にフィルターを装着し、ファンネルに加熱処理した検水又は希釈検水の30ml以上を入れ、吸引ろ過する。検水又は希釈検水のろ過が終了した後、希釈水20～30mlによりファンネル内壁を洗浄し、検水の場合と同様に吸引ろ過する。この洗浄ろ過操作を2～3回繰り返す。ろ過が完了した後、フィルターをろ過装置から外し、フィルターのろ過面を上にして気泡が入らないように標準

濃度ハンドフォード改良寒天平板培地に密着させる。これに標準濃度ハンドフォード改良寒天培地約10mlを重層して固化した後、更に標準濃度ハンドフォード改良寒天培地約5mlを重層する。これを嫌気ジャーに入れて恒温器に収め、44～46℃で22～26時間培養する。

培養後、直径1mm以上の黒色集落をウェルシュ菌芽胞と判定する。

c) 三重層法

標準濃度ハンドフォード改良寒天培地5～10mlをペトリ皿2枚以上に注いで固めた平板をあらかじめ用意する。次いで、加熱処理した検水又は希釈検水1mlずつをペトリ皿の中央部に入れ、溶解して約45℃に保温した標準濃度ハンドフォード改良寒天培地約10mlを注いだ後、直ちに蓋をし、速やかに前後左右に揺り動かして検水と培地を十分に混和させ、平板に固めて混積平板とする。次に、この平板に溶解して保温した標準濃度ハンドフォード改良寒天培地約5mlを注いで直ちに蓋をし、ペトリ皿を静かに揺り動かして混積平板の表面全体に培地を行きわたらせた後、静置し、平板に固める。培地が固まったことを確認した後、これを嫌気ジャーに入れて恒温器に収め、44～46℃で22～26時間培養する。

培養後、直径1mm以上の黒色集落をウェルシュ菌芽胞と判定する。

d) パウチ法

加熱処理した検水をパウチ2枚以上に10mlずつ入れ、1.67倍濃度ハンドフォード改良寒天培地15mlを加え、直ちに指でよく揉んで検水と培地を十分に混合する。培地に混入した気泡をパウチの首部に集めて排除した後、パウチ首部をプラスチックシーラーで溶着して封じ、平らな面において室温で平板状に固める。これを恒温器に収め、44～46℃で22～26時間培養する。

培養後、直径1mm以上の黒色集落をウェルシュ菌芽胞と判定する。

5 菌数の算出

ウェルシュ菌芽胞と判定された集落をそれぞれの方法の計数方法に従って計数し、菌数を算出する。

第2 M-C P寒天培地法

1 培地及び試薬

(1) M-C P寒天平板培地

トリプトース3.0g、粉末酵母エキス2.0g、シュクロース0.50g、L-システイン塩酸塩0.10g、硫酸マグネシウム(7水塩)0.01g、プロモクレゾールパープル0.004g、粉末寒天1.5gを精製水90mlに加熱溶解し、pH値を7.6に調整した後、高圧蒸気滅菌し、滅菌後、速やかに約50℃に冷却した後、D-シクロセリン0.04g、ポリミキシンB硫酸塩0.0025g、インドキシル-β-D-グルコシド溶液8ml、フェノールフタレインニリン酸塩溶液2ml、塩化第二鉄溶液0.2mlを無菌的に加えて混合し、調製後、直ちに疎水格子用ペトリ皿には約10mlずつ、メンブランフィルター用ペトリ皿には約3mlずつ分注して平板に固めたもの