

「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」
における指標菌検査方法の見直しについて

1.はじめに

クリプトスポリジウム等の対策については、水道事業体毎に「クリプトスポリジウム等対策指針（以下、「指針」という。）」に基づく対策が講じられている。

指針では汚染のおそれに応じた予防対策として原水等における大腸菌、嫌気性芽胞菌及びクリプトスポリジウム等の検査を実施することとしており、その検査方法が「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（以下、「検査方法通知」という。）」に示されている。

嫌気性芽胞菌の検査方法として検査方法通知には1) ハンドフォード改良寒天培地法（以下、「ハンドフォード法」という。）、2) M-CP 寒天培地法、3) DRC 培地法が示されているが、他の方法より検査が容易である等の理由から、水道水質検査機関のほとんどでハンドフォード法が採用されている状況である。

今年度当初に、当時検査方法通知に示す組成の培地（以下、「O 培地」という。）の国内唯一の製造・販売会社である栄研化学株式会社から、O 培地を組成する抗菌薬オレアンドマイシンが国内で入手困難になったため、O 培地の製造を中止するとの情報提供があった（在庫も既に尽きている状況）。なお、ハンドフォード法以外での嫌気性芽胞菌の検査体制の構築は、大規模水道事業体でも困難としている。

このような現状を受け、平成 22 年 7 月 12 日に水質基準逐次改正検討会（以下、「RR 検討会」という。）にて本件を審議いただき、別添 1 の資料に示す新たな検査法を採用するまでの暫定的な対応について了承いただいたところである。

- ・ハンドフォード法の嫌気性芽胞菌の検査が困難になった場合、ハンドフォード法以外の方法により嫌気性芽胞菌の検査を実施するか、又は、クリプトスポリジウム等の検査体制を強化することで対応する。
- ・ハンドフォード法以外の嫌気性芽胞菌の検査が困難な場合、対策指針における汚染のおそれの程度に応じた予防対策としての原水等の検査について、原水のクリプトスポリジウム等や大腸菌の検査回数を増やすことで対応する。

これらの暫定的な対応については、「水道における微生物問題検討会」及び「水道水質検査法検討会」においても審議いただいたうえで、水道事業体に周知することを予定していた。

しかしながら、RR 検討会后、以下のように、培地製造会社によるハンドフ

フォード法の培地の製造に関する取組が進み、これらの状況の変化に対応することが必要となった。

- ・ 関東化学株式会社が国外にてオレアンドマイシンを確保することで、平成 23 年 1 月より O 培地（以下、「K・O 培地」という。）の製造を開始している。
- ・ 栄研化学株式会社の製造するオレアンドマイシンの代わりにエリスロマイシンを用いた培地（以下、「E 培地」という。）が、現行培地と同等の検出性能を示すとして日本水道協会の協会誌（平成 22 年 12 月版）に掲載されている。

また、大腸菌の検査方法として検査方法通知には特定酵素基質培地法が示されているが、「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法（平成 15 年厚生労働省告示第 261 号）」（以下、「検査方法告示」という。）に示された方法と異なる点につき、先の RR 検討会において問題提起されたところである。

2.検査方法通知の見直しについて

2.2.嫌気性芽胞菌の検査方法（ハンドフォード法）

K・O 培地が組成において O 培地と同様であることは関東化学株式会社の保証するところであるが、検出性能においても差意がないことが別添 2 のとおり水質検査機関の確認試験において明らかにされている。

なお、E 培地が O 培地と同等の検出性能を示すことは別添 3 のとおり日本水道協会の協会誌に示されたとおりである。

これらの事実を受けて、現行の O 培地に加え、E 培地も使用できるよう検査方法通知を見直すこととする（別添 4）。

なお、これらの社が培地を製造中止する等状況の変化によって、検査方法通知に基づく嫌気性芽胞菌検査の実施が事実上困難となった場合、対策指針における汚染のおそれの程度に応じた予防対策としての原水等の検査について、別添 1 に示す暫定的な対応を水道事業体に周知することで対応する。

2.2.大腸菌の検査方法（特定酵素基質培地法）

大腸菌の検査方法について、検査方法告示は定性試験法（検水量 100ml）、検査方法通知は定量試験法（検水量約 60ml）と、検査方法告示と検査方法通知そ

れぞれで違う方法が示されている。

指針に基づきクリプト等の汚染の恐れを判断するうえで、指標菌検査は検出菌数の把握ではなく検出の有無が重要であるため、検査方法通知における大腸菌の検査方法（特定酵素基質培地法）においては、検査方法告示に示された定性試験法を追加するとともに、定性試験法にて大腸菌の検査を行うことを基本とするよう検査方法通知を見直すこととする（別添4）。なお、既に原水から大腸菌の検出実績がある施設（指針中2.における汚染のおそれがレベル3もしくはレベル4の施設）においては、大腸菌数の変化を把握することが水質管理の面から望ましいことから、定量試験法にて検査を行ってもよいこととする。

ハンドフォード改良寒天培地法（嫌気性芽胞菌の検査法）に必要な 培地の製造中止について

1. 背景

○クリプトスポリジウム等の対策について

クリプトスポリジウム等の対策については平成 19 年 4 月 1 日より「クリプトスポリジウム等対策指針（以下、「対策指針」という。）」に基づき、各水道事業体に取り組んできているところ。

対策指針では、水道原水に係るクリプトスポリジウム等による汚染の判断について、糞便により汚染された水源の水にクリプトスポリジウム等が混入するおそれがあるとし、また糞便汚染の指標として大腸菌及び嫌気性芽胞菌（以下「指標菌」という。）が有効であるとしている。そのため、指標菌のいずれかが検出された場合には原水に耐塩素性病原生物が混入するおそれがある場合に該当するとし、汚染のおそれの程度に応じた施設整備や原水等の検査などの予防対策を講じることとしている。

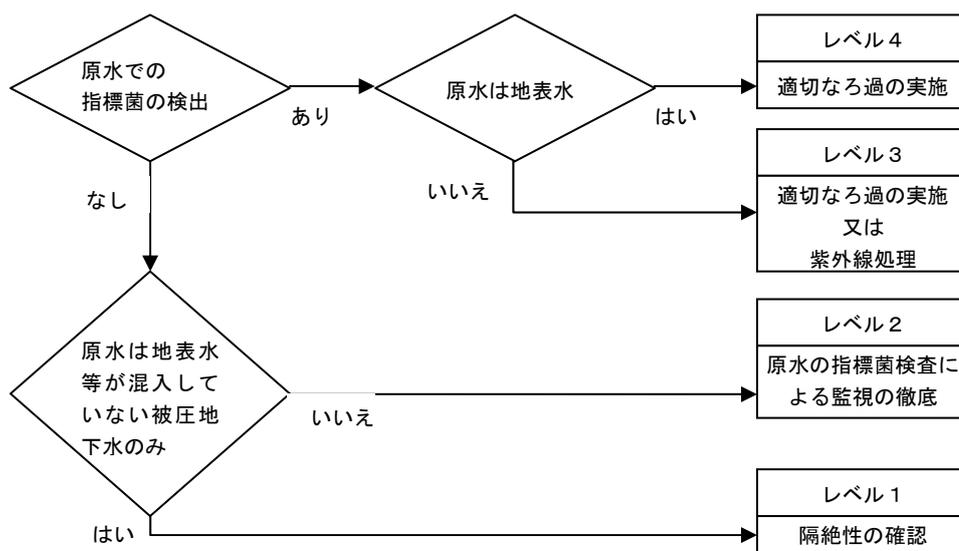


図 水道水源に係るクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの判断の流れ

施設整備

レベル 4 :

ろ過池またはろ過膜（以下、「ろ過池等」という。）の出口の濁度を 0.1 度以下に維持することが可能なろ過設備の整備

レベル 3 :

ろ過池等の出口の濁度を 0.1 度以下に維持することが可能なろ過設備、またはクリプトスポリジウム等を不活化することができる紫外線設備の整備

原水等の検査

レベル4及びレベル3：

水質検査計画等に基づいた適切な頻度でのクリプトスポリジウム等及び指標菌の検査を実施。ただし、上記の必要な施設を整備中の期間においては、原水のクリプトスポリジウム等を3ヶ月に1回以上、指標菌を月1回以上検査すること。

レベル2：

3ヶ月に1回以上、原水の指標菌の検査を実施すること。

レベル1：

年1回、原水の水質検査による被圧地下水以外の水の混入の有無の確認、1回/3年の井戸の状況確認。

○嫌気性芽胞菌の検査方法とハンドフォード法の培地の製造中止について

嫌気性芽胞菌の検査方法については「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（平成19年3月30日付け健水発0330006号）」において以下のとおり示している。

- ① ハンドフォード改良寒天培地法（以下、「ハンドフォード法」という。）
- ② M-CP寒天培地法
- ③ DRC（Differential Reinforced Clostridial）培地法

この中でハンドフォード法は、他の方法より検査が容易である等の理由から、自ら水質検査を実施する水道事業体のほとんどが採用している状況である。

しかし、そのハンドフォード法に必要な培地を国内で唯一製造・販売する栄研化学（株）から、当該培地に必要な抗生物質（製造元：ファイザー）が数年前から製造中止されており、抗生物質の在庫も尽きたため培地の製造を中止することにし、在庫も今年秋頃に尽きるとの情報提供が今年あった。

ハンドフォード法が嫌気性芽胞菌の実質的な標準検査方法である点を踏まえると、培地がなくなることにより嫌気性芽胞菌の検査体制に混乱を生ずることも予想されるため、各水道事業体に今後の対応も含めた情報提供を行う必要がある。

2. 今後の対応について

ハンドフォード法が使用できなくなった時における対策指針に基づく指標菌のモニタリングについて検討する必要がある。

ハンドフォード法の培地がなくなる時点で、当該検査方法を嫌気性芽胞菌の検査方法から削除するという対応が考えられる。その一方、各水道事業体や登録検査機関等においてハンドフォード法の培地について一定のストックを有していると考えられ、ストックがなくなる時期は水道事業体等によって異なることから、この対応を取る時期を見極めるのは現時点で難しい。

また、東京都水道局や横浜市水道局等の大規模水道事業体でもハンドフォード法以外の方法は非常に手間がかかり、ハンドフォード法以外の2つの方法による嫌気性芽胞菌の検査体制の構築は事実上困難としており、ハンドフォード法以外の検査方法で嫌気性芽胞菌の検査を行うように示すことには課題がある。

日本水道協会等によると、ハンドフォード法の培地の代替となる新しい培地が、数社で製造されていることから、ハンドフォード法について新たな培地を採用する対応が最も現実的な対応である。しかし、新たな培地を採用するにあたって、嫌気性芽胞菌の培養に関するバリデーションの実施や評価の期間が必要となる。

これらのことを前提に、各水道事業体等においてハンドフォード法の培地のストックがなくなったときにおける嫌気性芽胞菌の検査に関して、新たな検査法が採用されるまでの間の暫定的な対応を検討する必要がある。

新たな検査法を採用するまでの暫定的な対応（案）

ハンドフォード法の嫌気性芽胞菌の検査が困難になった場合、ハンドフォード法以外の方法により嫌気性芽胞菌の検査を実施するか、又は、クリプトスポリジウム等の検査体制を強化することで対応する。

ハンドフォード法以外の嫌気性芽胞菌の検査が困難な場合、対策指針における汚染のおそれの程度に応じた予防対策としての原水等の検査について、以下のとおり読み替え、各水道事業体に新たな検査法が採用されるまでの間の暫定的な対応として周知することとしたい。

また、暫定的な対応（案）については、「水道における微生物問題検討会」及び「水道水質検査法検討会」においても審議いただいたうえで、水道事業体に周知することとしたい。

原水等の検査

レベル4及びレベル3：

水質検査計画等に基づいた適切な頻度でのクリプトスポリジウム等及び大腸菌指標菌の検査を実施。ただし、上記の必要な施設を整備中の期間においては、原水のクリプトスポリジウム等及び大腸菌を~~3ヶ月に~~月1回以上、指標菌を月1回以上検査すること。

レベル2：

~~3ヶ月に~~月1回以上、原水の~~大腸菌及び~~指標菌の検査を実施すること。

レベル1：

年1回、原水の水質検査による被圧地下水以外の水の混入の有無の確認、1回/3年の井戸の状況確認。

ハンドフォード改良寒天培地の確認試験結果について

これまで一般的に使用されている栄研化学株式会社のハンドフォード改良寒天培地（E・O 培地）と新たに販売が開始された関東化学株式会社のハンドフォード改良寒天培地（K・O 培地）の検出性能の差異について、地方公共団体の機関 2 機関、登録水質検査機関 1 機関の合計 3 機関にて確認試験を実施した。

試料水は、それぞれの検査機関が測定している実環境の水試料を用い、同一試料について 5 回試験を行い、平均値および標準偏差を求めた。A 機関は、50mL の試料水を用いたメンブレンフィルター法、B 機関は 100mL の試料水を用いたメンブレンフィルター法、C 機関は 100mL の試料水を用いた疎水格子メンブレンフィルター法で実施した。

結果は、下表に示すように、E・O 培地に対して K・O 培地のコロニー形成率は（86.5～）116～153%と、僅かではあるが高めの値を示したが、E・O 培地における繰り返し試験の相対標準偏差が 11.9～23.6%と大きい点から、本結果が特段の差と認められる結果ではないと評価できた。さらに、E・O 培地のロット違いの製品においても、ばらつき（17～23 コロニー）は認められた。

以上の結果から、関東化学株式会社のハンドフォード改良培地は、「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」におけるハンドフォード改良寒天培地の組成と同様であるとともに、検出性能にもいっても問題がないと認められた。

○試験結果

試験機関			A	B	C	C(畜産排水)
E・O 培地	計測コロニー数	1	19	17	8	258
		2	24	17	10	212
		3	17	19	11	240
		4	20	21	11	237
		5	18	22	6	239
平均(A)			19.6	19.2	9.2	237.2
相対標準偏差			2.70	2.28	2.17	16.42
K・O 培地	計測コロニー数	1	21	18	9	205
		2	26	26	12	216
		3	31	32	11	180
		4	23	33	11	194
		5	13	38	21	232
平均(B)			22.8	29.4	12.8	205.4
相対標準偏差			6.65	7.67	4.71	19.97
B/A			116%	153%	139%	86.6%

A：メンブレンフィルター法； 50mL C：疎水格子メンブレンフィルター法； 100mL

B：メンブレンフィルター法； 100mL C(畜産排水)：疎水格子メンブレンフィルター法； 5mL

「資 料」

新処方ハンドフォード改良培地の性能評価

日本水道協会水質試験方法等調査専門委員会
微生物・生物部会

1. はじめに

上水試験方法の糞便性指標として使われる指標微生物のひとつにウェルシュ菌芽胞があり、その測定にはハンドフォード改良培地が用いられている¹⁾。本培地には、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) を選択的に検出するため、オレアンドマイシン、硫酸ポリミキシン B とカナマイシンといった抗菌薬が使用されている。

それらの選択剤のひとつであるオレアンドマイシンの入手が困難という情報を得た。このため、本培地を水道事業体に幅広く供給している栄研化学株式会社は、オレアンドマイシンに代わり、エリスロマイシンを使用した培地に処方変更を行った。そこで、エリスロマイシンを使用した新処方培地の検出性能を、標準菌株及び実試料を用いて評価を行ったのでその結果を報告する。

なお、「水道におけるクリプトスリジウム等対策指針」(厚労省 平成19年3月)では、水道原水

の糞便汚染の指標菌として、大腸菌と嫌気性芽胞菌が指定されている。ここで「嫌気性芽胞菌」としているものは、ウェルシュ菌をさしている。

2. 材料及び方法

(1) 培地

新処方培地 (以下「E 培地」という。)は、現在の培地 (以下「O 培地」という。)に含まれているオレアンドマイシン (0.48mg/1,000mL) の代わりにエリスロマイシンを0.06mg/1,000mL に添加して調製した。

(2) 標準菌株を用いた評価

a. 菌株

C. perfringens 5 株を含む *Clostridium* 属菌 6 菌種、計10株と *Clostridium* 属以外の14菌種23株を用いた (表-1、2、3)。

b. 試験方法

E 培地及び O 培地の検出感度の比較は、検出対象の *C. perfringens* が含まれる *Clostridium* 属菌については生菌数測定法で行い、それ以外の菌株については Miles & Misra 法²⁾を用いて行った。また、*C. perfringens* 4 株、*C. sporogenes*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis* 各 1 株については、上水試験方法のパウチ法を用いて検出性能を確認した。各試験法については以下のように実施した。

・生菌数測定法

ABCM 寒天培地上の集落を McFarland #1 の濃度に懸濁したものを原液とし、その10倍連続希釈液を作製した。各希釈液 1 mL をシャーレに接種した後、標準濃度の各培地19mL を添加、混合し、46℃、24時間嫌気培養したのち、集落数を測定し、原液中の生菌数を算定した。

・Miles & Misra 法

ハートインフュージョン寒天培地上の集落を

ハンドフォード改良寒天培地の組成

	単位	通知法 (2007)	O 培地	E 培地
酵母エキス	g/L	4.8	4.8	4.8
ペプトン	g/L	15	15	15
ソイペプトン	g/L	4.8	4.8	4.8
クエン酸鉄アンモニウム	g/L	0.9	0.9	0.9
メタ重亜硫酸ナトリウム	g/L	0.9	0.9	0.9
4-メトキシ-6-スルファニルア ミドピリジン (Sulfadiazine)	g/L	0.09	0.09	0.09
オレアンドマイシン	mg/L	0.48	0.48	—
エリスロマイシン	mg/L	—	—	0.06
硫酸ポリミキシン B	u/L	9,000	9,000	9,000
カナマイシン	mg/L	48	48	48
カンテン	g/L	18	18	18

McFarland #1の濃度に懸濁したものを原液とし、その10倍連続希釈液を作製した。Miles & Misra法に従い、各希釈液を標準濃度の各培地表面に20 μ L ずつ接種、37°C、24時間培養後、発育状態を確認した。

・パウチ法

Clostridium 属菌は ABCM 寒天培地、その他の菌株はハートインフュージョン寒天培地上の集落を McFarland #1の濃度に懸濁したものを原液とし、その10倍連続希釈液を作製した。各希釈液のうち 10^{-4} から 10^{-8} 倍希釈液の10mL をパウチに接種した後、パウチ法濃度の培地15mL を添加、混合し、46°C、24時間培養後、集落数を測定し、原液中の菌数として算定した。*C. perfringens* は4回、その他の菌株は2回繰り返し行った。

(3) 実試料を用いた評価

日本水道協会水質試験方法等調査専門委員会所属の水道事業者の10検査機関（関東：5、関西：5）において実施した。各々の検査機関が実施しているウェルシュ菌芽胞試験方法を用いて、E培地とO培地を併行して試験し、両培地の比較を行った。

a. 試料

各事業者での原水を試料とした。

b. ウェルシュ菌培養操作

通常の業務で用いている培養操作（疎水格子フィルター法、メンブレンフィルター法、パウチ法、三重層法）により行った。

3. 結果

(1) 標準菌株を用いた評価

C. perfringens を含む *Clostridium* 属菌10菌株を用いて生菌数測定法で比較した結果を表-1に示す。McFarland #1の濃度に調製した試験菌懸濁液中の生菌数は、*C. perfringens* 5菌株ではすべて 10^7 colony forming unit (cfu)/mL レベル、*C. sporogenes*, *C. difficile*, *C. tetani* は 10^8 cfu/mL、*C. paraputrificum* は 10^6 cfu/mL レベルであった。E培地とO培地ではややE培地が高い値を示した株があったが、ほぼ同じ値であった。また、*C. perfringens* の鑑別となる集落の黒変も両培地で差は認められなかった。*C. sphenoides* は両培地とも集落の確認はできなかった。*Clostridium* 属以

表-1 生菌数測定法による新処方ハンドフォード改良培地の性能比較

菌株名	培地	生菌数 (CFU/ml)
<i>Clostridium perfringens</i> 842-2	E 培地	6.3×10^7
	O 培地	5.2×10^7
<i>Clostridium perfringens</i> 2908	E 培地	4.2×10^7
	O 培地	2.3×10^7
<i>Clostridium perfringens</i> 2910	E 培地	2.5×10^7
	O 培地	2.5×10^7
<i>Clostridium perfringens</i> 2922	E 培地	5.9×10^7
	O 培地	4.3×10^7
<i>Clostridium perfringens</i> 356	E 培地	3.1×10^7
	O 培地	2.8×10^7
<i>Clostridium sporogenes</i> 1	E 培地	1.6×10^8
	O 培地	1.6×10^8
<i>Clostridium difficile</i> 2959	E 培地	2.1×10^8
	O 培地	2.2×10^8
<i>Clostridium tenani</i> 1	E 培地	1.9×10^8
	O 培地	1.7×10^8
<i>Clostridium paraputrificum</i> 2911	E 培地	1.5×10^6
	O 培地	1.4×10^6
<i>Clostridium sphenoides</i> 2946	E 培地	ND
	O 培地	ND

ND；発育せず

外の菌を Miles & Misra 法で試験した結果を表-2に示す。*Enterococcus* 属の4株はE培地、O培地ともすべての希釈濃度で発育が認められた。*Pseudomonas aeruginosa* は最高濃度の 10^{-1} 希釈のみ発育が認められたが、その他の17菌株はE培地、O培地ともすべて発育が抑制された。パウチ法の成績も *C. perfringens* では生菌数測定法と同様の傾向があったが、*C. sporogenes* は両培地とも発育は認められるものの微小集落のため菌数の測定は出来なかった。*C. freundii* と *E. faecalis* はE培地、O培地とも発育が認められなかった（表-3）。

(2) 実試料を用いた評価

河川水を水源とする10事業者の水道原水を試料とした。培養操作の内訳は、疎水格子フィルター法5、メンブレンフィルター法2、パウチ法2、三重層法1であった（表-4）。全ての操作法において *C. perfringens* 様の黒色集落が認められた。両培地とも5回測定し、その平均値で評価した。

表-2 Miles & Misra 法による新処方ハンドフォード改良培地の性能比較

培地	<i>Bacillus cereus</i> N4						<i>Bacillus cereus</i> P2						<i>Bacillus subtilis</i> 6633					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
E 培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O 培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

培地	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923						<i>Staphylococcus aureus</i> COWAN						<i>Enterococcus faecalis</i> 29212					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
E 培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	53	7
O 培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	56	7

培地	<i>Enterococcus faecalis</i> 19343						<i>Enterococcus faecium</i> 19344						<i>Enterococcus faecium</i> 51559					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
E 培地	+	+	+	+	+	8	+	+	+	+	+	10*	+	+	+	+	+	9*
O 培地	+	+	+	+	+	8	+	+	+	+	+	7	+	+	+	+	+	10

培地	<i>Proteus vulgaris</i> H19						<i>Proteus vulgaris</i> 13315						<i>Salmonella</i> Enteritidis 1					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
E 培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O 培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

培地	<i>Salmonella</i> Arizonae 1						<i>Shigella flexneri</i> 3a						<i>Shigella sonnei</i> 222					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
E 培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O 培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

培地	<i>Escherichia coli</i> 25922						<i>Escherichia coli</i> T40 (O157)						<i>Klebsiella pneumoniae</i> 10031					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
E 培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O 培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

培地	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883						<i>Serratia marcescens</i> L-2						<i>Serratia marcescens</i> 8100					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
E 培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O 培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

培地	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853						<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A-2					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
E 培地	+	4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
O 培地	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

* ; 微小集落

表-3 パウチ法による新処方ハンドフォード改良培地の性能比較

菌株名	培地	生菌数* (CFU/ml)
<i>Clostridium perfringens</i> 842-2	E 培地	3.9×10 ⁵
	O 培地	3.4×10 ⁵
<i>Clostridium perfringens</i> 2908	E 培地	6.5×10 ⁶
	O 培地	6.0×10 ⁶
<i>Clostridium perfringens</i> 2910	E 培地	6.5×10 ⁶
	O 培地	3.6×10 ⁶
<i>Clostridium perfringens</i> 2922	E 培地	7.3×10 ⁶
	O 培地	4.0×10 ⁶
<i>Clostridium sporogenes</i> 1	E 培地	ND
	O 培地	ND
<i>Citrobacter freundii</i> H13	E 培地	ND
	O 培地	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	E 培地	ND
	O 培地	ND

* ; *Clostridium perfringens* は 4 回測定 の 平均値
ND ; 発育せず

①疎水格子フィルター法は、試料水量が40から100mLでE培地とO培地とでの菌数比(E/O)は0.95から1.42であった。②メンブランフィルター法は、試料水量が20mLと100mLでE/Oはそれぞれ1.06、1.01であった。③パウチ法は、2事業者とも試料水量が10mLで、E/Oは0.85、1.00であった。④三重層法は試料水量が1mLと少なく、ほとんどの試料で不検出であった。以上のことから、E培地、O培地との間には特段の傾向が見られず、大きな違いもなかった。また、三重層法を除く各培養操作法による違いもほとんどなかった。なお、検査当日の原水水質は表-5に示した。

4. 考察

ハンドフォード改良培地は、1974年 Handford³⁾により食品中の *C. perfringens* の検出と菌数測定用の培地として Oleandomycin-polymyxin-sulfadiazine-perfringens agar (OPSPA) として報告された培地を基礎とし、その後 Kanzaki ら⁴⁾に

表-4 新処方ハンドフォード改良培地の評価結果

事業者	採水日	培養操作	試料水量	培地	測定回数					平均	E/O
					1	2	3	4	5		
A	2010/9/8	疎水格子フィルター法	40ml	E 培地	74	57	61	71	46	61.8	1.02
				O 培地	56	48	66	72	60	60.4	
B	2010/9/8	疎水格子フィルター法	100mL	E 培地	23	23	28	34	31	27.8	0.96
				O 培地	26	20	28	33	38	29	
C	2010/9/1	疎水格子フィルター法	100mL	E 培地	22	20	17	22	30	22.2	0.98
				O 培地	17	18	21	29	28	22.6	
D	2010/9/8	疎水格子フィルター法	100mL	E 培地	44	52	50	42	53	48.2	1.42
				O 培地	25	30	41	36	38	34	
E	2010/9/29	疎水格子フィルター法	100mL	E 培地	108	58	78	56	74	74.8	0.95
				O 培地	64	78	100	90	60	78.4	
F	2010/9/14	メンブランフィルター法	20ml	E 培地	17	32	26	12	24	22.2	1.06
				O 培地	34	17	22	14	18	21	
G	2010/9/2	メンブランフィルター法	100mL	E 培地	14	14	18	18	15	15.8	1.01
				O 培地	11	18	19	14	16	15.6	
H	2010/9/15	パウチ法	10ml	E 培地	1	1	0	0	1	0.6	1.00
				O 培地	1	0	0	1	1	0.6	
I	2010/9/15	パウチ法	10ml	E 培地	6	8	1	4	4	4.6	0.85
				O 培地	7	5	7	4	4	5.4	
J	2010/8/30	三重層法	1ml	E 培地	1	1	0	0	0	0.4	-
				O 培地	0	0	0	0	0	0	

注：測定結果は検水中のコロニー数を示す。

E 培地とはエリスロマイシンを処方した新培地

O 培地とはオレANDOMマイシンを処方した従来培地

個々の事業者における検査結果 (数値は試料量あたりの集落数)

表-5 供試水の水質

事業体	一般細菌 (CFU/mL)	大腸菌 (MPN/100mL)	水温 (°C)	濁度 (度)	色度 (度)	pH	アンモニア態 窒素 (mg/L)	TOC (mg/L)	総アルカリ度 (mg/L)
A	21,000	870	23.4	53	13	8.8	0.02	2.7	—
B	2,300	15	25.7	2.8	2.6	7.64	<0.02	0.77	—
C	2,000	33	29.1	14	9	7.7	<0.02	2.9	32
D	900	3,500	29.8	2.0	14	7.5	0.07	2.5 (DOC)	35.4
E	38,000	3,100	22.7	6.0	13	7.3	0.01	2.1	29
F	69,000	500	27.9	21	10	7.5	0.34	3.7	59.0
G	660	62	25.6	4.4	4.7	8.0	—	0.7	28.6
H	790	2.0	28.7	1.0	—	8.8	—	—	—
I	1,500	550	21.3	1.8	3	7.9	0.00	0.7	37.6
J	—	—	28.7	1.5	6	8.1	—	—	39.9

個々の事業体における検査結果 (— ; 実施せず)

より、カナマイシンを80 μ g/mLの濃度に添加された培地である。Handfordはこの報告の中で、選択剤として抗菌薬10種類を比較し、腸内細菌の抑制にポリミキシンを選択し、*C. perfringens* 以外の *Clostridium* 属菌と *Bacillus* 属菌の抑制剤としてオレアンドマイシンあるいはエリスロマイシンが適していると記載している。そのうち、オレアンドマイシンが極わずかに選択性が高かったことと、当時エリスロマイシンが入手困難という理由から最終的にオレアンドマイシンを選択している。オレアンドマイシンとエリスロマイシンはともに構造にマクロライド環を持つマクロライド系の薬剤で、グラム陽性菌と一部のグラム陰性菌に抗菌力を有し、細胞内浸透性が高いことが特長となっている抗菌薬である。抗菌活性はエリスロマイシンの方がやや高く、Handfordの報告でも至適濃度はオレアンドマイシン0.5 μ g/mL、エリスロマイシン0.1 μ g/mLとしている。今回、オレアンドマイシンが入手困難となったため、それに代わる薬剤として Handford の検討結果、抗菌薬の物性と抗菌スペクトルなどを考慮しエリスロマイシンを用いたが、*C. perfringens* 5株を含む *Clostridium* 属菌6菌種、計10株と *Clostridium* 属以外の14菌種23株の標準菌株を用いた生菌数測定法、Miles & Misra 法、及びパウチ法による評価結果では、E培地とO培地で *Clostridium* 属菌の発育支持に差は認められなかった(表-1、2、3)。

Clostridium 属以外では、*Enterococcus* 属が Miles & Misra 法を用いたときに両培地で発育が認められた(表-2)。Handfordの報告においても *Enterococcus* 属の発育抑制は出来ないと言われており、オレアンドマイシン、エリスロマイシン及びこの培地に処方されている抗菌剤では効果的に発育抑制されないとされた。その一方、パウチ法では両培地ともに *Enterococcus* 属の発育は完全に抑制されていた。この理由としては、パウチ法の培養温度が44~46°Cであるのに対し、Miles & Misra 法では37°Cで高温での培養条件が *Enterococcus* 属の発育抑制に効果的に働いたためと考えられる。

Enterococcus 属以外の菌株についてはE培地、O培地とも強く発育を抑制し、良好な選択性を有していることが確認できた(表-3)。

表-4に示したように、10の水道検査機関で実試料を用いた評価結果でも、各事業体で実施している疎水格子フィルター法、メンブレンフィルター法、パウチ法、三重層法の培養操作の違いにかかわらず、E培地とO培地で検出菌数、選択能、鑑別性に差が認められなかった。これらの結果から、エリスロマイシンを使用した新処方培地は発育支持、選択能、鑑別能とも対照としたオレアンドマイシン処方培地と同等の性能であることが確認された。

5. まとめ

ハンドフォード改良培地で使用されてきたオレアンドマイシンに代わる選択剤としてエリスロマイシンを0.06mg/1,000mLに添加した新処方培地の性能を従来のオレアンドマイシン処方培地と比較した。菌株を用いた評価と水道事業者での実試験を用いた評価を行った結果、新処方培地は従来の培地と比較して *C. perfringens* の発育支持と鑑別、その他の菌の選択性とも差はなく、従来の培地と同様にウェルシュ菌検出培地として使用可能であることが確認できた。

謝辞

本調査に協力していただいた日本水道協会水質試験方法等調査専門委員会所属の水道事業者及び栄研化学株式会社の関係各位に感謝します。

参 考 文 献

- 1) 日本水道協会：上水試験方法 2001年版、pp. 633-635、2001.
- 2) 坂崎利一：新 細菌培地学講座・上、pp. 200-210、近代出版、1978.
- 3) Handford, P. M. : A new medium for the detection and enumeration of *Clostridium perfringens* in foods, J. appl. Bact. 37, 559-570, 1974.
- 4) Kanzaki, M., et al. : *Clostridium perfringens* taken as a food microbiological indicator for processed meat products. 東獣畜誌, 24, 39-43, 1977.

水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等検査方法について (平成 19 年 3 月 30 日付け健水発第 0330006 号) 記以下新旧対比表

改正後 (新)	改正前 (旧)
<p>第1 検査方法の概要</p> <p>1. 指標菌の検査方法</p> <p>(1) 大腸菌の検査方法</p> <p>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、「特定酵素基質培地法」を別添1に示した。なお、別添1内4試験操作においては、(1)定性試験を用いることを基本とするが、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ある施設においては(2)定量試験を用いてもよいこととする。</p> <p>(2) (略)</p> <p>2. (略)</p> <p>第2～第3 (略)</p> <p>別添1 大腸菌の検査方法</p> <p>特定酵素基質培地法</p> <p>1 培地</p> <p>(1) MMO-MUG培地</p> <p>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、へペス(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、へペスナトリウム塩(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</p>	<p>第1 検査方法の概要</p> <p>1. 指標菌の検査方法</p> <p>(1)大腸菌の定量方法</p> <p>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。</p> <p>・特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法</p> <p>(2) (略)</p> <p>2. (略)</p> <p>第2～第3 (略)</p> <p>別添1 大腸菌の定量方法</p> <p>特定酵素基質培地法</p> <p>1 培地及び試薬</p> <p>(1) MMO-MUG培地</p> <p>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、へペス(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、へペスナトリウム塩(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</p>

ウム)5.3g、亜硫酸ナトリウム40mg、アムホテリシンB1mg、o-ニトロフエニル-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を無菌的に混合したもの。

MMO-MUG培地を試験容器に10分の1量ずつ分取したものを100ml用MMO-MUG培地という。

MMO-MUG培地を試験容器に100分の1量ずつ分取したものを10ml用MMO-MUG培地という。

これらの培地は、黄色く着色したものは使用しない。

これらの培地は、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-ス5g、トリプトファン1g、o-ニトロフエニル-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-N-オキシド1gを精製水約900ml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1Lとし、ろ過除菌したもの。

IPTG添加ONPG-MUG培地の成分を精製水約80ml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90mlとし、ろ過除菌した後、試験容器に10mlずつ分注したものを100ml用IPTG添加ONPG-MUG培地という。

IPTG添加ONPG-MUG培地の成分を精製水約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

ウム)5.3g、亜硫酸ナトリウム40mg、アムホテリシンB1mg、o-ニトロフエニル-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-ス5g、トリプトファン1g、o-ニトロフエニル-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-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、ろ過除菌したもの。

菌した後、試験容器に10mlずつ分注したものを10ml用MMO-MUG培地という。

これらの培地は、冷暗所に保存する。

(3) XGal-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、トリプトン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romo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトトピラノシド80mg及びソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトトピラノシド100mgを無菌的に混合する。

XGal-MUG培地を試験容器に10分の1量ずつ分取したものを10ml用XGal-MUG培地という。

XGal-MUG培地を試験容器に100分の1量ずつ分取したものを10ml用XGal-MUG培地という。

これらの培地は、冷暗所に保存する。

(4) ピルビン酸添加XGal-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romo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトトピラノシド100mg及びソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトトピラノシド100mgを無菌的に混合する。

ピルビン酸添加XGal-MUG培地を試験容器に10分の1量ずつ分取した

この培地は、冷暗所に保存する。

(3) XGal-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、トリプトン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romo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトトピラノシド80mg及びソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトトピラノシド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を

この培地は、冷暗所に保存する。

(4) ピルビン酸添加XGal-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romo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトトピラノシド100mg及びソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトトピラノシド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を

ものを100ml用ピルビン酸添加XGal-MUG培地という。
ピルビン酸添加XGal-MUG培地を試験容器に100分の1量ずつ分取した
ものを10ml用ピルビン酸添加XGal-MUG培地という。

これらの培地は、冷暗所に保存する。

2 器具及び装置

(1) (略)

(2) 試験容器

検水 (100ml用若しくは10ml用) 検水と培地が密封できるもので、滅菌
したもの

(3)~(9) (略)

3 (略)

4 試験操作

(1) 定性試験

検水100mlを上記1のいずれかの100ml用培地入り試験容器1本に加え、
直ちに試験容器を密封し、試験容器を振って培地を溶解又は混合させた
後、恒温器内に静置して24時間培養する。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、蛍光が弱い場合は陰性と
判定する。

(2) 定量試験

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) (略)

(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)~(9) (略)

3 (略)

4 試験操作

a) 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

b) 検水から希釈検水の調製

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もので、室温に30分以上放置してはならない。

c) 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。

d) 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。

(1) 希釈検水の調製

検水の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。

(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。

<p>別添2 嫌気性芽胞菌の検査方法</p> <p>第2 ハンドフォード改良寒天培地法</p> <p>1 培地及び試薬</p> <p>(1) 標準濃度ハンドフォード改良寒天培地</p> <p>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-スルフア-ニルアミドピリミジン0.09g、ピロ亜硫酸ナトリウム0.90g、オレアノドマイシン0.48mg若しくはエリスロマイシン0.06mg、硫酸ポリミキシンB9,000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</p> <p>この培地は、恒温水槽で約45℃に保温し、三重層法に用いる。</p> <p>この培地は、使用の都度調製する。</p> <p>(2)～(4) (略)</p> <p>2～5 (略)</p> <p>別添3 (略)</p> <p>付録1～3 (略)</p>	<p>別添2 嫌気性芽胞菌の検査方法</p> <p>第2 ハンドフォード改良寒天培地法</p> <p>1 培地及び試薬</p> <p>(1) 標準濃度ハンドフォード改良寒天培地</p> <p>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-スルフア-ニルアミドピリミジン0.09g、ピロ亜硫酸ナトリウム0.90g、オレアノドマイシン0.48g、硫酸ポリミキシンB9,000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</p> <p>この培地は、恒温水槽で約45℃に保温し、三重層法に用いる。</p> <p>この培地は、使用の都度調製する。</p> <p>(2)～(4) (略)</p> <p>2～5 (略)</p> <p>別添3 (略)</p> <p>付録1～3 (略)</p>
--	---