

「水質汚濁に係る生活環境の保全に関する環境基準の見直しについて（第2次報告案）」に対する意見募集（パブリックコメント）の結果について

令和3年3月23日（火）から令和3年4月21日（水）にかけて「水質汚濁に係る生活環境の保全に関する環境基準の見直しについて（第2次報告案）」に対する意見募集を行い、その結果を以下のとおり取りまとめましたので、公表します。

今回の意見募集に当たり、御協力いただきました方々へ御礼申し上げますとともに、今後とも環境行政の推進に御協力いただきますようよろしくお願い申し上げます。

1. 実施期間等

- ・意見募集期間：令和3年3月23日（火）～令和3年4月21日（水）
- ・告知方法：電子政府の窓口（e-GOV）への掲載
- ・意見提出方法：電子政府の総合窓口（e-Gov）の「意見提出フォーム」又は郵送

2. 意見提出数

12通（意見の件数16件）

3. 御意見の概要及びそれに対する考え方

別紙のとおり。

質問分類	No.	御意見の概要	御意見に対する考え方
測定方法について	1	<p>培地上に大腸菌以外の大腸菌群が多数生えてしまい大腸菌が培地上でコロニーを形成することが出来ていないのではないかとと思われることがよくあります。コロニーが重ならない程度に希釈すると大腸菌が少ない場合検出できないので希釈試料を何枚もろ過して合計しなければなりません。このようなことが環境水では多々あり非常に手間となります。特定酵素基質培地の液体培地で蛍光を確認する MPN 法であれば既製品使い捨てトレーも販売されていて手間もあまりかからず計数が簡単だと思われます。採用されなかった理由があるのでしょうか。</p> <p>出典 上水試験方法（2011）微生物編 p 65～72 既製品使い捨てトレー EC ブルーMPN プレート「ニッスイ」</p>	<p>複数の種類の特定酵素基質寒天培地を用いたメンブランフィルター法と特定酵素基質培地の液体培地で蛍光を確認する MPN 法について検討を行ったところ、海域試料において、液体培地を用いた MPN 法の方が大腸菌数が高い測定値を示す場合が多く、また、擬陽性が示されたとの報告がありました。このような検討を踏まえ、特定酵素基質寒天培地を用いたメンブランフィルター法が適当としました。</p> <p>なお、メンブランフィルター法は、従来から水浴場の水質判定基準のふん便性大腸菌群数の測定に用いられている方法であり、測定方法としては一般的に普及している方法と考えます。</p> <p>御意見は今後の検討の参考とさせていただきます。</p>
	2	<p>基準値と測定方法が、CFU/100ml となっているが、MPN 法も採用して欲しい。</p> <p>水道水原水利用の表流水を MPN 法で検査しているが、特に QT トレイを用いた検査方法は、簡便で試料数に制限が無く、緊急の検査にも対応できる。</p> <p>別紙 1 の測定法では、ろ過装置などの滅菌を予め済ませておく必要があり、設備的にも時間的にも多試料を検査するのに適さない。ろ過器については、使用したら滅菌して繰返し使うことになるが、着手時間の制限がある本検査においては、滅菌にかかる 2 時間は現実的には許容できない。</p>	
	3	<p>従来は MPN/100mL で結果を算定していたが、今後は MPN 法では全く分析ができないことになる。市販の培地やキットでも大腸菌数を MPN で求められるもの（日水製薬製の MPN プレートや IDEXX 製の QT トレイ等）があるので、それらも使用可能にして頂けると、分析操作が簡便になると思われる。</p>	
	4	<p>過去数十年間、特定酵素基質培地は世界中において大腸菌検出の非常に有効な手段のひとつであると証明されてきた。そのため、特定酵素基質培地を使用するという方針には完全に賛成である。しかしながら、本手法を「特定酵素基質“寒天”培地」と限定するのではなく、より広く「特定酵素基質培地」と規定することを推奨したい。</p> <p>(1) そのように変更することで、検査機関が各検査施設での既存の設備やワークフローに応じて任意の手法を選択できるようになる。これにより、最終的な結果の同等性は担保された上で、より処理時間の短い手法や、より簡易で検査法習熟のトレーニングが最短で済む手法、より客観的な結果判断ができる手法等、各施設にとって最適な検査方法を構築することが可能となる。</p> <p>(2) また、このように検査法選択に幅を持たせておくことは、将来において適切な品質を有した新製品が開発され、入手できるようになった際に検査機関が独自の判断で環境基準変更のさらなる改訂を待たずして新製品を採用できるようになるため、結果としてイノベーションを奨励することにもつながる。以って、公衆衛生の保持に資することが可能となることが期待できる。</p> <p>(3) 「特定酵素基質培地」法という名称は、国内では 1993 年に初めて厚生（労働）省で飲料水の試験方法（厚生労働省告示：第 261 号）として承認を受けて以来、飲料原水（厚生労働省：健水発第 0330006 号）、学校環境衛生基準（文部科学省：学校環境衛生管理マニュアル）、下水道法施行規則（国土交通大臣：平成 20 年告示第 334 号）などの幅広い水質基準で使用されていることから十分に普及しており、かつ検査法としての有効性も実証されている。さらに海外では、55 もの国と地域で承認を受け、使用されている（※出典）。</p> <p>(4) 水浴利用水については、2018 年に世界保健機関（WHO）が「特定酵素基質培地」法 ISO 9803-2 2012 について、“it（※特定酵素基質培地を指している） has been validated for bathing water monitoring for E. coli in European marine and freshwater bathing sites and is currently in use.”と述べ、“should be an approved method in the European Bathing Water Directive”と具体的に推奨した事例がある（現在、この推奨を受けて EU 飲料水指令 [EU Drinking Water Directive] は、基準改訂プロセスに着手した）。さらに、特に注目すべき点として、第 2 次報告案における水浴利用水の新基準値として米国環境保護庁（EPA）の基準（米国水浴水質基準、2012 年）を参考にしたとの記述がある一方で、同庁が承認している手法については特段考慮がなされていないことが挙げられる。EPA が承認している測定法として、メンブランフィルター法他、“multiple well enzyme substrate”法（特定酵素基質培地に基づく手法で、専用のトレーを用いて MPN を計数する方法）が記載されている（Title 40: Protection of Environment, Part 136 Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants Section IH）ことをここに特記しておく。</p> <p>（※出典）「特定酵素基質培地」法にもとづく当社製品 Colilert の世界各国承認状況：アルゼンチン、オーストラリア、オーストリア、ベルギー、ボスニアヘルツェゴビナ、ブラジル、ブルガリア、カナダ、チリ、中国、コロンビア、コスタリカ、クロアチア、キプロス、チェコ、デンマーク、エルサルバドル、エストニア、フィンランド、フランス、ドイツ、ギリシャ、グアテマラ、ハンガリー、アイスランド、アイルランド、イタリア、ジャマイカ、日本、ラトビア、リトアニア、ルクセンブルク、マルタ、メキシコ、オランダ、ニュージーランド、ノルウェー、オマーン、パナマ、フィリピン、ポーランド、ポルトガル、ルーマニア、スロバキア、スロベニア、南アフリカ、韓国、スペイン、スウェーデン、ウクライナ、英国、米国、ウルグアイ、ベネズエラ、ジンバブエ</p>	

測定方法について	5	<p>別紙中の大腸菌数の試験方法において試薬について培地が特定酵素基質培地（酵素基質 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニド（X-GLUC）を含む特定酵素基質寒天培地）が規定されており、注釈に「これと同等以上の品質、性能を有すると確認された培地を用いてもよい。」との但し書きがある。</p> <p>これと同等以上の品質、性能を有すると確認された培地について一般に入手できるものの中で使用できるものについて具体的に例示して頂けると、選択性も広がり、欠品時の対応などが可能になると考えられる。</p>	<p>大腸菌数を測定可能な特定酵素基質寒天培地は複数市販されているところ、原案においてその一例を示していることから、例示の追記は不要と考えます。</p> <p>なお、同等性評価について、個別の試薬や器具毎に具体的手順を記載することはいたしません、必要に応じて御指摘のような手順で実施いただくことが適当と考えます。</p>
	6	<p>生活環境項目環境基準専門委員会が今回新手法を提案するにあたり、一切の具体的商品を推奨しなかったこと、また報告案に記載の方法と同等性が認められたものについては使用を認める旨が明確に記述されている点については高く評価したい。ただ、その上で一步進んで同等性評価の具体的手順について言及してはどうか。この指針として、具体的かつ客観的に有効であると考えられるものとして、「ISO/IEC17025」の手順を提案する。この手順を踏まえ、同等性を証明する方法を採用することを希望する検査機関が、1) 大腸菌数の定量試験結果が統計学的に解析されている信頼できる研究例を引用するか、2) 検査機関内で通常に行われている同等性評価の手順にもとづき、適宜必要に応じて行えば良い旨の記載があることが望ましい。</p> <p>理由：実際に検査を実施する検査機関にとっても、検査手法を認証する側にとっても、異なる検査手法間の同等性を証明する方法の具体的指針があれば有益である。</p>	
	7	<p>希釈時の培養方法について→濾過法でなく混釈や塗抹でもよろしいでしょうか。</p> <p>濾過の目的は濃縮と思われます。菌密度が低く、通常の平板培養法に供する試料 1mL 程度では、コロニー形成数が少ない（あるいは無い）と予想されますので。</p> <p>逆に、希釈時は、フィルター濾過は必要なく、試料原液または希釈液の適量を、平板培地に混釈または塗抹すれば良いのではないのでしょうか。試料原液 1mL は百倍希釈相当、0.1mL は千倍希釈相当。</p> <p>濾過法では操作時の汚染や更なる希釈誤差が懸念されますし、操作の手間・経費も増えます。</p> <p>ただし、濾過の目的が、濃縮だけでなく「大腸菌の生育阻害物の除去」もあるのなら、希釈時も濾過法を適用、が理解できます。</p> <p>平板培養法定法：JISK0350-20-10 用水排水中の大腸菌群試験方法 等</p>	<p>培地の種類、培養操作、培養条件等の条件で結果が変動する可能性があり、精度を保つために測定方法及び操作を統一することが適当と考えます。従って、希釈試料についても同じようにメンブランフィルター法で測定いただくことを考えております。</p>
	8	<p>別紙1 大腸菌数の測定方法の「2 器具及び装置（1）計量器具」について、「高圧蒸気滅菌器で滅菌したもの又は同等の性能で滅菌したもの」とされているが、メスピペット等のガラス器具は乾熱滅菌するのが通常と思われるため、「高圧蒸気滅菌器又は乾熱滅菌器で滅菌したもの若しくは同等の性能で滅菌したもの」としてはいかがか また、その場合、乾熱滅菌の温度・時間条件もこの項に記載していただきたい。</p>	<p>原案の「同等の性能」では御指摘の乾熱滅菌器での滅菌も想定していることから、原案の通りとさせていただきます。</p>
	9	<p>別紙1 大腸菌数の測定方法の「2 器具及び装置（4）ペトリ皿」について、日本産業規格 K0950 に定めるプラスチック製滅菌シャーレが指定されている。JIS 規格で示されているシャーレは丸型となっているが、培地の厚さが測定方法どおりであれば、シャーレの形状は検査結果に影響するものではないためプラスチック製滅菌シャーレの JIS 規格を外していただきたい。</p>	<p>原案の「2 器具及び装置（注2）市販の滅菌済みの器具及び装置を用いてもよい。」により、滅菌してあることを前提に各分析機関において器具及び装置を選んでいただくことが可能な旨を記載していることから、原案のとおりとさせていただきます。</p>
	10	<p>別紙1 大腸菌数の測定方法の「2 器具及び装置（4）ペトリ皿」について、乾熱滅菌の条件が 170°Cで約 1 時間とされているが、温度条件に幅を持たせることはできないか。参考までに食品衛生検査指針では、「160～180°Cで 1 時間加熱する」と表記されている。</p>	<p>御指摘を踏まえ、適宜文章を修正いたします。</p>
	11	<p>別紙1 ページ1</p> <p>（注1）大腸菌数試験用の特定酵素基質寒天培地として以下の組成の培地が市販されている。ここで示す培地の組成は、この測定試験法使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、この組成の培地を推奨するものではなく、これと同等以上の品質、性能を有すると確認された培地を用いてもよい。</p> <p>・意見内容 該当箇所を下記に変更。</p> <p>（注1）大腸菌数試験用の特定酵素基質寒天培地として以下の組成の培地や簡易培地が市販されている。ここで示す培地の組成は、この測定試験法使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、この組成の培地を推奨するものではなく、これと同等以上の品質、性能を有すると確認された培地、または簡易培地を用いてもよい。なお、簡易培地を用いる場合、試験操作における（1）培地の調製を省くことができる。</p> <p>・理由 特定酵素基質を用いた各種の簡易培地が市販されており、寒天培地の代替としてこれらの簡易培地も対象であることを明記することによって、使用者の選択肢が増えます。簡易培地を使用すれば培地の自家調製が必要なく、培地の精度管理についてもメーカーの試験成績</p>	<p>広く一般に普及されている方法をもとに検討を進めたことから、御指摘の簡易培地については精度確認試験を実施しておりません。今後の検討の参考とさせていただきます。</p>

		<p>書を引用をすることができ、作業負担の軽減につながります。</p> <p>コンパクトドライ EC は、培地組成中に X-GLUC を含み、大腸菌を青～青紫色に発色させます。</p> <p>https://cosmokai.com/youran/06742.pdf</p> <p>また、直径 47mm のメンブランフィルターを滅菌生理食塩水を加えるだけの操作で検査することができます。</p> <p>https://cosmokai.com/img/pdf/14.pdf</p>	
測定方法について	12	<p>別紙 1 大腸菌数の測定方法（注 11）「大腸菌が特異的に保有・産生する酵素βグルクロニダーゼ」とありますが、同酵素は大腸菌だけでなく、魚や哺乳類も保有します。あくまでも「腸内細菌」での特異性です（大腸菌の 95%と赤痢菌などが保有）。河川中には魚や貝など水生生物がいるので、非大腸菌由来の擬陽性があり得るのではないのでしょうか。心配しすぎでしょうか。文献資料を探しましたが、河川調査の知見は見当たりませんでした。特定基質酵素培地は、食品分野で良く使われており、知見が多いかと思われます。</p> <p>濾過法により、擬陽性の可能性のある妨害物を除去可能、というのであれば理解できます。</p> <p>参考資料：食品衛生検査指針微生物編 2018、大腸菌群、酵素基質培地法</p>	<p>大腸菌数の環境基準値を導出するにあたり、環境水中の大腸菌数については主として特定酵素基質寒天培地を用いたメンブランフィルター法で測定した大腸菌数の測定値を基に検討しており、この方法に基づいた測定値から基準値を算出していることから、原案通りとさせていただきます。御意見は今後の参考とさせていただきます。</p>
	13	<p>提示案の【別紙】水質汚濁に係る生活環境の保全に関する環境基準の見直しについて（第 2 次報告案）別紙 1 に記された測定方法に関して、大腸菌数の過剰計数につながる問題点があるため、本法の再検討ならびに下記の案についてご検討願います。</p> <p>意見者が所属する機関では、環境省通知に従い特定酵素基質寒天培地を用いたメンブランフィルター法による公共用水域の大腸菌数検査を約 8 年間に渡り実施しています。本法において大腸菌はβ-グルクロニダーゼ活性により青色のコロニーとして検出されますが、これと共に約 3 割の検水でスタフィロコッカス属を主とするグラム陽性球菌とみられる青色コロニーが検出されています。これについて、提示案の別紙 1 「大腸菌数の測定方法」の「4 試験方法（5）菌数の計算」の項目においては「培養後、拡大鏡を用いてフィルター上の青色のコロニーを数える」と記されており、これに従って検査を実施した場合、グラム陽性球菌も計数されてしまうため大腸菌数の過剰計数が生じることが危惧されます。よって本項目については測定方法の再検討が必須であると考えます。</p> <p>上記のグラム陽性球菌は特定酵素基質寒天培地上に直接塗抹した時は培地中の発育 阻害剤の効果により増殖が抑制されますが、特定酵素基質寒天培地に貼付したメンブランフィルター上では増殖し青色コロニーを形成します。これに対し大腸菌、大腸菌群はメンブランフィルターの有無に関わらず効率よく増殖します。これらのことから、本件はグラム陽性球菌に特異的に生じるメンブランフィルター法の問題点であると考えられます。よって、大腸菌数の測定方法についてはこの問題を回避するための対策が必要であると考えます。</p> <p>この問題の原因としては特定酵素基質寒天培地に含まれるグラム陽性球菌に対する発育阻害剤であるラウリル硫酸ナトリウムの効果がメンブランフィルターを介することによって軽減されている可能性が考えられます。意見者らは特定酵素基質寒天培地中のラウリル硫酸ナトリウムの濃度を上げる（別紙 1 「大腸菌数の測定方法」の「1 試薬 培地の組成」に記載された量の 2 倍程度）ことにより球菌の増殖を特異的に抑えられることを示唆する予備的データを既に得ており、今後検水を用いて検証していく予定です。大腸菌数の測定方法の改善案として、この検証結果を測定方法に反映して頂けるようお願いいたします。要請があれば詳細なデータの提供も可能です。</p>	<p>大腸菌数の環境基準値を導出するにあたり、環境水中の大腸菌数については主として特定酵素基質寒天培地を用いたメンブランフィルター法で測定した大腸菌数の測定値を基に検討しており、この方法に基づいた測定値から基準値を算出していることから、原案通りとさせていただきます。御意見は今後の参考とさせていただきます。</p>
単位について	14	<p>第 2 次報告案において、水道 1～3 級、水浴、自然環境保全の各環境中における大腸菌数の基準値を国内外のデータや基準を参照しながら慎重に検討した上で新しく設定したことは高く評価したい。今回のパブリックコメントの募集において、当社から「大腸菌数の測定方法について」と題したコメントを別途提出（受付番号：195200110000000007）しているが、そちらでは、「検査実施者が特定酵素基質“寒天”培地に限らず、特定酵素基質培地を広く使えるようにすべき」との趣旨の提案をしている。これに深く関連し、大腸菌の数の報告形式も、検査実施者が行った検査方法に従って計算される大腸菌数単位の形式で報告することも認めていく必要がある。そのため、第 2 次報告案中の大腸菌数に関わる記述を「CFU/100 mL」から、「培養菌数/100 mL」や、「個体数/100 mL」、「個/100 mL」等の検出手法の別を問わない普遍的な単位にしてはどうか。あるいは、「CFU/100 mL」と「MPN/100 mL」という 2 つの最もよく使われる単位形式を併記することも代替案として有効であると考えます。</p> <p>（1）MPN (Most Probable Number)は、液体培地に生育した細菌の数を計測した単位で、細菌の計数単位として 100 年以上用いられてきた歴史がある。現在、改訂の最終段階を終えて発行準備中となっている最新の「ISO/FDIS Standard 6107:2021(E) Water Quality - Vocabulary 2021 Final Draft」では、微生物学における“count”とは、“observed number of objects such as colonies or cells determined by direct counting, or most probable number”と定義され、“Culturable microorganism per volume can replace CFU per volume or MPN per volume when giving a result.”と明言されている。同 ISO 文書中では同様に、CFU と MPN は試料中における生物数の“Maximum Likelihood Estimates”であると定義されている。</p> <p>（2）日本には、「MPN/100 mL」の報告形式を認めてきた前例がいくつもある。現行の環境基準における大腸菌群数はもとより、水道原水の基準（厚生労働省：健水発第 0330006 号）、食品・添加物等の規格基準（食品衛生法）等において、MPN 形式での菌数が記載されている。</p>	<p>原案では培養後に形成された大腸菌のコロニーを計数して大腸菌数を算出していることから、大腸菌数の単位は「CFU/100ml」が適当と考えます。</p> <p>単位に関する御意見は今後の検討の参考とさせていただきます。</p>

		<p>(3) 海外では、米国環境保護庁 (US-EPA) や欧州連合 (EU) 諸国を含む、世界 55 か国において CFU と MPN が互換性あるものとみなされ、どちらの単位での検査結果報告も使用できることが正式に承認されている (当社からの別コメント (受付番号: 195200110000000007) 「大腸菌数の測定方法について」中の出典を参照)。</p> <p>(4) 日本においても、米国や EU など先進諸国を含む上述の世界的潮流を受け入れ、各国の行政担当官や研究者のレベルで水質指標の相互比較や測定技術の共有を可能とさせるべく水質検査における世界調和実現のための社会基盤を整備していくことが必要と思われる。なお、より良くは、MPN・CFU のように限定せず「微生物数/100 mL」や「個/100 mL」のような包括的名称が最適であると考えられる。単位が限定されているままであると、それ自体が潜在的なイノベーション障壁となってしまう、全く新しい日本発の微生物数計測技術が生まれてくることはできない。</p>	
その他	15	<p>環境基準の見直しに賛成です。</p> <p>瀬戸内海沿岸で事業を行う中、排水中の大腸菌群数を測定していますが、報告案に記載の通り、大腸菌群が多く検出されていても、大腸菌が検出されない場合があり、大腸菌群数がふん便汚染を的確に捉えていない状況を実感しています。</p> <p>そのため、一律排水基準についても見直して頂きたい。</p>	いただいた御意見は、今後の検討の参考にさせていただきます。
	16	<p>大腸菌数の測定にあたっては、新たに器具等の整備が必要であり、また、公共用水域の水質測定計画の策定にも影響が及ぶことから、経過措置を含め、施行時期の考え方について御教示いただきたい。</p>	今回の意見募集の内容を踏まえた法令等の改正を行う際は、準備等のための一定の期間を考慮した施行期日等を検討してまいります。