

令和5年3月31日

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進
委託事業のうち短期課題解決型研究
研究成果報告書

課題番号：21454554

農業用水中に含まれる大腸菌を対象とした簡易検査法の開発

研究期間：令和3年度～令和4年度（2年間）

研究総括者名：稲津 康弘

試験研究機関名：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

＜別紙様式3＞最終年度報告書

1 研究目的

海外で発生している生食用野菜による食中毒事案の原因の一つは糞便汚染された農業用水の使用であると言われており、生食用野菜に使用した水からの有害微生物による汚染の可能性は使用水の大腸菌検査の結果によって推測できる場合があり、欧米において生産段階での野菜の衛生管理に活用されている。また、農林水産省「栽培から出荷までの野菜の衛生管理指針」の試行第2版（2020年9月）に「収穫までの1週間以内にかん水や薬剤散布をする場合は、水道局等の行政や生産者等が実施した水質検査により安全性を確認した水、飲用に適する水又は消毒した水を使うよう努める。」とする規定が盛り込まれた。さらに、適正農業規範（GAP）の外部認証取得・維持のためにも、農業用水の検査は必要とされる。このような事情から、水道局等の行政や生産者等が安価かつ簡単に迅速に実施できる農業用水の大腸菌検査法のニーズが高まっている。

このため、本研究では、

1. 農業用水中の大腸菌検査法の検討
2. 採取検体の保存安定性等の検討

により、試料1個あたり1000円程度かつ結果確定まで1日程度で実施できる、農業用水中の大腸菌数が行政の目安値（100mLあたり100個）以下であるかどうか、また、超える場合にどの程度のオーダー（ 10^2 、 10^3 若しくは 10^4 以上等）かを判定することを目的とした検査法を開発することを目指す。

その結果、

1. 国内野菜農家の自主衛生管理の動機付け
2. 国産農産物の摂食による食中毒リスクの低減

が期待される。

2 研究内容

(1) 農業用水中の大腸菌検査法の開発（農研機構）

水道局等の行政や生産者等が安価・簡便・迅速に実施できるという前提のもと、農業用水に含まれる大腸菌の数が行政の目安として設定する値を超えていないか否か、一定の確実性をもって判定しうる方法を作成する。また検体の望ましい保存条件と保存可能期間の検討を行う。

1) 農業用水中の大腸菌検査法の検討

農業用水に特化した大腸菌簡易検査法（①酵素基質培地（簡易寒天培地）を用いたコロニー計数法及び②酵素基質培地（液体培地）を用いた最確法（MPN））について情報を収集した上で、その中で、農業用水中の大腸菌について水道局等の行政や生産者等が安価・簡便・迅速に用いることができるものを選定する。次に、ISO 16140等のバリデーションメソッドを参考にしつつ妥当性確認された分析法（水等に含まれる大腸菌を対象としたものから選択）を参照分析法として農業用水を用いたシングルラボバリデーションを行い、当該簡易検査法の妥当性を検証する。そのような既存の簡易検査法がない場合には農業用水の特性（土壌等の夾雑物を含む）を踏まえて妥当性確認済の水一般の検査法を改良し、上記と同様のことを実施する。

農業用水をモデルとしたマトリクスを対象とした検査法の改良や農業用水を用いたバリデーションは夾雑菌を含む水に既知量の大腸菌を混入した検体を分析して、夾雑物の分析結果に与える影響を確認した上で行う。参照分析法とのバリデーションにおいて妥当性に不適切な内容が生じた場合は、検査法の改善を行う。

2) 採取検体の保存安定性等の検討

検体の輸送・保存条件を決定するために必要とされる情報を得るために、土壌等の夾雑物を含む水に既知量の大腸菌を混入した検体を保存して大腸菌数の変化の測定又は文献調査を行う。また、試験終了後の検体の廃棄方法について検討を行う。

(2) 達成目標及び進捗目標

農業用水に含まれる大腸菌（100個/100 mL程度）の簡易・迅速・安価な検査法を開発する（1試料当たり1000円程度かつ結果確定まで1日程度）。また、以下の3点を明らかにする。

- ① 統計学的に一定の確実性が保証される検体数
- ② 検体に混入した土壌等の検査結果に与える影響
- ③ 試料の適切な保存条件

(3) 研究成果の行政施策・措置への貢献

本研究で開発する簡易検査法は行政機関が野菜の衛生管理指針へ記載するか、その参考資料としてまとめることが予定されている。安価かつ簡便で迅速な農業用水の検査法が示されることで、野菜の衛生管理指針に沿った農業事業者の自主衛生管理の取り組みが促進されることが期待される。

(4) 年次計画

研究課題				
	3	4	機関	研究室
1 農業用水の大腸菌検査法の開発				
1-1 農業用水中の大腸菌測定法の検討	←→		農研機構 食品研究部門	食品安全・信頼グループ
1-2 採取検体の保存安定性等の検討		←→	農研機構 食品研究部門	食品安全・信頼グループ

(5) 研究体制

参画機関が一つであるため省略した。

(6) 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者	エフォート(%)
	機関	研究室		
研究総括者	農研機構 食品研究部門	食品安全・信頼グループ	◎稲津康弘	5
1. 農業用水の大腸菌検査法の開発				
(1) 水中の大腸菌測定法の検討	農研機構 食品研究部門	食品安全・信頼グループ	○稲津康弘	15
(2) 採取検体の保存安定性等の検討				

(7) 各年度の研究費

令和3年度 1,500,000円

令和4年度 1,500,000円

3 研究推進会議の開催状況

令和3年度および4年度に2回ずつ開催した（「様式2、3の別添」を参考）。

4 研究成果の概要

（1）主な成果

1） 成果の内容

農業用水モデル検体に含まれる大腸菌数を MPN 法に基づいた方法で測定する方法を複数個開発し、農業用水中の大腸菌数について妥当性確認された既存の分析法を参照法としてシングルバリデーションでの同等性を確認した。また検体の保存方法や分析後の検体の処理法について検討した（具体的な内容については（2）に記載した）。

2） 成果の活用

野菜の衛生管理指針に基づく、野菜の栽培に使う水の自主衛生管理（安全確認のための検査）に使用されることが期待される。

（2）各研究課題の成果

1）小課題名：農業用水の大腸菌検査法の開発

（ア）研究目標

1－1）水中の大腸菌検査法の検討

農業用水に含まれる大腸菌の数が行政の目安として設定する値を超えているか否か、また、超える場合に 10^2 、 10^3 若しくは 10^4 以上のオーダーであるかを一定の確実性をもって判定しうる方法を作成する。

1－2）採取検体の保存安定性等の検討

採取した検体の輸送・保存を想定して、短期貯蔵中に大腸菌数が大きく変化しないことを確認する。また、試験終了後の検体の廃棄方法について検討を行う。

（イ）研究内容

1－1）水中の大腸菌測定法の検討

MPN法（3段5本法（市販MPN用プレート使用）、2段10本法および1段32～48本法）を開発法とし、” Method 1603: *Escherichia coli* (*E. coli*) in Water by Membrane Filtration Using Modified membrane-Thermotolerant *Escherichia coli* Agar (Modified mTEC)” (US-EPA, 2009 Dec)（以下「EPA Method 1603」という。）を対照法として、ISO16140-2：2016に準拠したシングルバリデーションでの同等性確認試験を行った。開発法については、「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7月22日厚生労働省告示第261号）」に記載されている3種類の特定酵素基質培地（計5製品）について検討を行った（下図1参照）。なお、模擬検体として野菜栽培土壌中の細菌を含む検体水に一定量の大腸菌を添加したものをを使用した。

1－2）採取検体の保存安定性等の検討

上述した模擬検体を5-30℃で保存し、EPA method 1603によって時間経過による大腸菌数の変化を測定した。また使用後の検体溶液に1/100体積の市販オスバン溶液または次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加し、常温（20-25℃）で一日放置後の菌数を測定した。

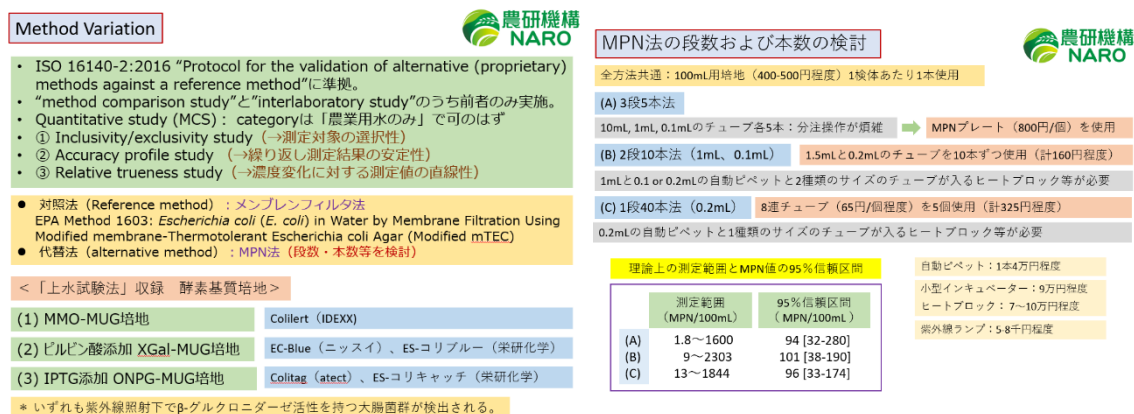


図 1 Method Validationの概要と検討した方法の比較

(ウ) 研究結果

1-1) 水中の大腸菌測定法の検討

対照法と代替法（開発法）の比較に関して、ISO 16140-2:2016 は①Inclusivity and Exclusivity study、②Relative trueness studyおよび③Accuracy profile studyの3種類の試験を求めている。そこで本研究でもこれら3種類の試験を実施した。

① Inclusivity and Exclusivity study : Inclusivity study では、大腸菌 50 種類を使用して 35.0℃および 44.5℃（予備実験に基づいて設定）で培養を行った。MMO-MUG 培地（1 種類）は 44.5℃での増殖が悪い菌が 4 株みられた一方で、ピルビン酸添加 XGal-MUG 培地（2 種類）と IPTG 添加 ONPG-MUG 培地（2 種類）では全ての株が 35℃及び 44.5℃で陽性の結果を示し、一部の培地においては 35.0℃よりも 44.5℃のほうがより明瞭な結果が得られた。対照法は培養温度を 44.5℃に上げることで夾雑菌の増殖を抑制しているが、MMO-MUG 培地を使用する場合は培養温度を 44.5℃に上げると偽陰性が生じる場合があることが判明した。Exclusivity study では、全ての培地について、非大腸菌 47 種類のうち 5 種類は 44.5℃で増殖したが、増殖しても大腸菌としては陰性の結果を示した。以上の結果より、対照法と同様に 44.5℃で培養した場合、ピルビン酸添加 XGal-MUG 培地と IPTG 添加 ONPG-MUG 培地については目的とする菌（50 種類以上）では陽性の結果を与え、目的外の菌（30 種類以上）では陰性の結果を与えたことから、ISO 16140-2:2016 の要求事項を満たすことが確認された。以下②および③の実験はこれらの培地を使用し、44.5℃±0.5℃で培養を行った。

② Relative trueness study : ピルビン酸添加 XGal-MUG 培地（2 種類）と IPTG 添加 ONPG-MUG 培地（2 種類）について、5 種類の野菜栽培土壌（バジル、ズッキーニ、ナガイモ、トウガラシおよびラッカセイ）を用い、一種類につき 6 種類の濃度（計 30 検体）で実験を行った。ISO 16140-2:2016 に従う場合、Bland-Altman-difference plot の外れ値は 20 検体あたり 1 つまで許容され、2 段 10 本法及び 1 段 48 本法の分析結果は全ての培地においてこの要件を満たしていた。3 段 5 本法および 1 段 40 本法では一部の培地で逸脱数が 2 つとなったものがあったが、1 段 40 本法については負の逸脱が見られたデータは約 1.5 log CFU/100 mL よりも低い濃度で生じており、今回開発する検査法の使用目的の濃度範囲ではないことから、検査（法）の問題と捉える必要はないものと考えられた。3 段 5 本法を用いた対照法と開発法による測定結

果のバイアス（開発法－対照法）は0.16～0.19 log MPN/100 mLであった。2段10本法および1段40～48本法を用いた対照法と開発法による測定結果のバイアス（開発法－対照法）は-0.01～0.09 log MPN/100 mLであった。

- ③ Accuracy profile study：ピルビン酸添加 XGal-MUG 培地（2種類）と IPTG 添加 ONPG-MUG 培地（2種類）について、2種類の野菜栽培土壌（トマトおよびダイズ）を用いて異なる3濃度（高・中・低）の検体を作成し、ISO 16140-2:2016 に従って各検体について測定を5回繰り返し、得られた結果の全体の分散を元に上側および下側の許容限界値（AL 値 0.5）を算出した。許容条件は各濃度における繰り返し測定値の80%信頼区間の上限または下限がそれぞれ AL 値を上回るまたは下回らないこととされる。全体として見た場合、XGal-MUG 培地よりも IPTG 添加 ONPG-MUG 培地を用いた方が繰り返し精度は高く、特に3段5本法で XGal-MUG 培地を使用した場合は、1-3 log MPN/100 mL の範囲でバイアスが AL の上限または下限を超えることがほとんどであった。2段10本法および1段40～48本法については、何点かの逸脱は見られるものの、いずれの培地を使用した場合でも 1.5-3.0 log MPN/100 mL の範囲ではおおむね良好な結果が得られた。

（まとめ）

評価を行った3種類の培地のうち2種類（ピルビン酸添加 XGal-MUG培地、IPTG添加 ONPG-MUG培地）の使用が望ましい。MPN法をベースとする3種類の開発法のうち市販MPNプレートを使用する方法は操作性がよいが、コストがやや高く、精度が2段10本法や1段40本法よりも劣る。2段10本法と1段40本法はコストや作業性、精度の点から見て大きな差はみられない（図2）。

(1) MMO-MUG培地（粉末培地：室温で1年間保存可能）				
35℃培養でも蛍光が弱め（→結果が判定しにくい場合がある）。 44.5℃で生えにくい大腸菌がいる（→夾雑菌の増殖を抑制しにくい）。				
使用が推奨できない				
(2) ピルビン酸添加 XGal-MUG培地（粉末培地：室温で1年または2年間保存可能）				
- 損傷菌の回復力が強いが雑菌の増殖抑制力が低め（1.5-2.0 log CFU/100mL近辺で繰り返し測定値のバイアスが(3)よりも高めに出る）。 - 陽性検体の蛍光が強く判定しやすいが、陰性検体が微弱な蛍光を示すことがある。				
(3) IPTG添加 ONPG-MUG培地液体培地（液体培地：冷蔵で1年間保存可能）				
MPNプレートを使用した場合、(2)よりも繰り返し測定の精度が良い。				
44.5℃±0.5℃で22±2時間培養				
	分析の精度	作業性	分析コスト	備考
(A) 3段5本法 (MPN plate)	△ ※培地差あり	◎	△	培地は(3)の使用を推奨。
(B) 2段10本法 (1mL、0.1mL)	○ ※培地差あり	○	○	作業性は(C)と大差がない。
(C) 1段40本法 (0.2mL)	○ ※培地差あり	○	○	本数は32本では不足、48本までは必要ない。

図2 Method validation結果のまとめ

1－2）採取検体の保存安定性等の検討

- ① 保存検体の大腸菌数の変化：4種類の野菜栽培土壌（ナガネギ、ソラマメ、キャベツおよびチンゲンサイ）で作成した検体水（大腸菌濃度 約 100 MPN/100 mL）を 5～30℃で 2 本ずつ（500 mL）保存し、EPA Method 1603 で大腸菌数を測定した。いずれの温度で保存した場合でも、一日後の生菌数は 3 割以下に有意（ $P < 0.05$ ）に低下したことから、採取後の検体は当日に分析する（培養を開始する）必要があると結論された。
- ② 廃液の殺菌：4種類の野菜栽培土壌（ジャガイモ、ネギ、ダイズ、トマト）で作成した検体水を用いて行った実験の廃液（60 mL）に 10%オスバン溶液または次亜塩素酸ナトリウム溶液を 1/100 体積量加え、室温で一日放置した後に EPA Method 1603 で大腸菌数を測定した。いずれを使用した場合でも廃液に含まれていた約 7 log CFU/mL の大腸菌は検出限界（1.2 log CFU/mL）未満に低下した。

（エ）研究成果の活用における留意点

ISO16140-2：2016に含まれている室間共同試験を行っていないため、1－1の研究結果について、試験室や作業者の違いに起因する分析結果の誤差については検討されていない。ただしその作業の簡易さから、開発法は対照法に比べ、作業者の技能に起因する分析値のばらつきは測定法自体に起因するばらつきよりも小さい可能性が高いと考えられる。

上述のいずれの培地を使用していずれの方法を用いて検体の分析を行う場合でも、1検体あたりの分析コストは当初目的であった1,000円前後に収まる（100 mLの検体を1つ分析するのに必要なコストは市販MPNプレートを用いた3段5本法で1,250円程度、マイクロチューブを使用した2段10本法または1段40–48本法で800円程度：図1）。対照法のModified mTEC培地の代わりに市販簡易培地（大腸菌検査用）を使用したメンブレンフィルタ法のコストは、1検体あたり710円程度と試算され開発法と同程度だが、作業の難易度及び結果の解釈の難易度が高く、専門の分析機関以外での実施は推奨されない。

培地混合後の検体の分析方法の選択に関して、液体を流し込んで培養するだけの市販MPNプレート（3段5本法）を利用すると最も作業が容易であるものの、分析精度が他の方法よりも劣る点とIPTG添加 ONPG-MUG培地を使用の方がよい点に注意を要する。2段10本法と1段40–48本法の間に作業時間の差はそれほどなく、分析精度もそれほど大きな差はみられない。

本研究におけるそれぞれの方法（MPN法の本数等）・培地での結果を踏まえ、目的に応じて選択して使用することが望ましいものと考えられる。

（参考：目的に応じた検査法の選択例）

目安（大腸菌数100個/100 mL以下）を超えるおそれが比較的低い地下水※については、今回検討したものの中で比較的精度の低いMPNプレート（3段5本法）を使い、より厳しい目安（例えば、100個/100 mL以下の1/2である50個/100 mL以下や約-0.5 logである30個/100 mL以下といった水準）を用いた管理を許容し、目安を超えるおそれが比較的高い表流水（河川水、池の水等）※については、対照法と同等の検査法と考えられる2段10本法や1段40本法等を使い、100個/100 mL以下の目安を用いた管理を行う。

※野菜の栽培に使う水の微生物実態調査（令和2年度、農林水産省）において、国内の野菜産地878地点において計2160点の野菜の栽培に使う水を採取し大腸菌について検査した

結果、水試料を採取した各地点のうち、表流水（河川水、池の水等）で93.8%、地下水で99.8%の地点において大腸菌数の目安（100個/100 ml以下）を満たしていた。

具体的な作業プロトコールについては別紙を参考にされたい。

（オ）研究目標の達成に当たっての問題点
特になし。

5 研究成果の発表
別添のとおり。

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等
特になし。

<研究総括者の自己評価>

項目		評価結果
試験研究全体		○A：順調 B：概ね順調 C：やや遅れているD：遅れている
研究 小 課 題	農業用水の大腸菌検査法の開発	○A：順調 B：概ね順調 C：やや遅れているD：遅れている
		A：順調B：概ね順調 C：やや遅れているD：遅れている
		A：順調B：概ね順調 C：やや遅れているD：遅れている
		A：順調B：概ね順調 C：やや遅れているD：遅れている
		A：順調B：概ね順調 C：やや遅れているD：遅れている
自己評価コメント		当初目的のスペックを満たす農業用水中の大腸菌数の検査法を開発した。

(別紙) 作業プロトコール「農業用水中の大腸菌簡易定量法」
農研機構 食品研究部門 稲津康弘 (2023年1月23日 ver. 02)

以下、最確数 (MPN) 法に基づく農業用水中の大腸菌数簡易検査法について述べる。この方法は液体の特定酵素基質培地において44.5℃で増殖可能な β -グルクロニダーゼ活性を有する大腸菌群を大腸菌と判定した結果から、その検水中の大腸菌数を確率論的な方法によって推定するものである。

【適用範囲】

栽培から出荷までの野菜の衛生管理指針（農林水産省、最終改正令和3年7月）において、栽培に使用する水の検査に係る参考の目安とされている100 個/100 mLの水準の超過の是非について、生産現場での生産者による衛生管理上の確認のために使用することを目的とした簡易検査法である。

【試験手順等】

(1) 検水の採取および保存

- 検査対象とする水（例：農業用水）を採取する。
 - *（参考）検水の採取方法については環境省の「水質調査方法（昭和46年09月30日環水管30号）」などを参考にされたい。
- 採取した検体は速やかに分析すること（直ちに分析ができない時は、少なくともその日のうちに培養を開始すること）。
 - *（参考）使用土4種類、各2本の繰り返し試験では、5～20℃、24時間の保存によって、大腸菌数は平均で1/4～1/5程度に減少することが示されている。

(2) 検水の分析

採取された検水のうち100 mLを、以下に示す共通手順(1)と、個別手順(2-1)または(2-2)に従って分析する。個別手順によらず共通で必要とされるものは以下の通りである。

1. 試験用培地

- 「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）」の別表第2に記載された特定酵素基質培地のうち「ピルビン酸添加 XGal-MUG 培地」か「IPTG 添加 ONPG-MUG 培地」を使用する。
 - *（参考）前者の市販品には、例えば、EC-Blue（ニッスイ）やES-コリブルー（栄研化学）等、後者の市販品には、例えば、Colitag（atect）やES-コリキャッチ（栄研化学）等がある。
- 大腸菌定性試験用（例えば、100mL 等）として販売されているものを購入し、メーカーが指定した条件で保存後、使用期限内に使用する。
 - *（参考）例えば、ピルビン酸添加 XGal-MUG培地は粉体で常温保存が可能であるが、IPTG添加 ONPG-MUG培地は液体で要冷蔵である。

2. 100 mL メスシリンダー

- 検水の100 mL 計量に使用する。

- プラスティック製品の使用が望ましい（作業者の安全確保の観点）。
 - 市販の食器用洗剤などを用いて洗浄し、水洗後に乾燥させたものを用いる。
*（参考）メスシリンダーを殺菌したい場合は 1000 倍希釈したオスバン溶液（10%）に 10 分間以上漬けた後に、十分量の水道水で流水洗浄する。
3. プラスティックボトル（100 mL）
- 秤量した検水と試験用培地を混ぜるために用いる。
*（参考）使い捨て製品（例えば、PSスクリー管瓶（アズワン）など）の使用を推奨。
 - 試験用培地入りのボトルを購入して使用する場合は、本プラスチックボトルを用意する必要はない。
4. インキュベーターまたはヒートブロック
- 検水と培地を混ぜた混合液の培養に使用する。
 - 44.5℃±0.5℃に保持できるもの。
 - ヒートブロックのホールサイズは使用するチューブの大きさに合わせる。
*（参考）ガラス温度計などで使用前後に内部の温度を確認し、必要に応じて温度設定を修正することを推奨。
5. ハンディ紫外線ライト（ブラックライト）またはUV トランスイルミネーター
- 培養後の大腸菌の確認に使用する。
 - メーカー指定の波長を使用すること（例：365 nm 付近）。
- *（注意）使用時は紫外線保護メガネ等の保護具を着用すること。
6. 殺菌剤
- 使用後の容器および溶液の殺菌に使用する。
 - 10% ベンザルコニウム塩化物液（「オスバン S」など）の使用を推奨。
- *（参考）「オスバン S」は薬局、ドラッグストアや通信販売などで購入できる。

個別手順によらず実施する作業は次の通りである。

<共通手順(1)>

1. 採取した検水を、メスシリンダーを用いて 100 mL 計量する。
2. これを 100mL 用の試験用培地と混合する。
*（参考）粉体の培地は完全に溶けるまで静かに混ぜる（激しく振らない）。
*（参考）100 mL用の試験用培地入りのボトルを使用する場合、メスシリンダーを使用する必要はない（例えば、ボトルに指定された目盛り線まで検水を入れる等、メーカーの指定に従う。）。

検水に培地を加えた後、30分以内に手順（2-1）または（2-2）の作業を行う。

<手順(2-1)：MPN 1段40本法>

この方法を利用するメリットはマイクロピペットとマイクロチューブを1種類しか利用せず、また単一ホールサイズのヒートブロック（またはPCR応用のサーマルサイクラー）を利用できる点である。欠点は1検水あたり40回、チューブに液を分注する必要があるところだが、作業時間と手間は手順(2-2)と大差がない。

本方法では以下の器具及び装置を使用する。

1. 8連PCRチューブ（0.2 mL）：1検水あたり5個
*（注意）蓋が別売りの場合があるので、これも忘れないように準備すること。
2. マイクロピペット（200 μ L）：例えば、ピペットマン P200（ギルソン）など
*（参考）8連マイクロピペットを使用すると作業が省力化できる。
3. ピペットチップ（200 μ L）：箱入り品であれば特に滅菌は不要。
*（参考）作業に慣れない人は吸い込み時のコンタミネーション防止のためにフィルター付きのチップを使用した方がよい。

作業手順は以下の通りである。

1. 5個の8連チューブ全て（40本）に検水と培地の混合液を200 μ Lずつ分注し、蓋を閉める。
*（参考）同じ混合液からの分注は同じピペットチップで行ってよい。
*（参考）蓋が閉まり切っていないと培養中に液量が減って適切な培養ができなくなるため注意が必要。
2. これをヒートブロックまたはインキュベーターにて 44.5°C $\pm$ 0.5°C、22 $\pm$ 2 時間培養する。
3. UVライトやUVトランスイルミネーターなどを用いて培養後のチューブに紫外線を照射する。
4. 明確な蛍光を発したチューブの本数を数え、別表1から検水の100 mL当たりの大腸菌数を求める。
*（注意）紫外線照射前に変色していても、紫外線照射時に蛍光を発しないものは「陰性」と判断する。
5. 使用後のチューブは蓋を開けてから100倍希釈したオスバン溶液（10%）に一晩漬けて殺菌する。
*（参考）オートクレーブ殺菌または5分以上の煮沸殺菌の処理でも可能。
6. 殺菌後のチューブはプラスチックごみとして廃棄する。殺菌液は流水とともに廃棄する。
*（注意）5.及び6.の処理を試験室として初めて行う場合には、実施前に、試験室の所在する自治体の担当部局に適正な処理であるか確認した上で実施する。

<手順(2-2)：MPN 2段10本法>

この方法は1 mLと0.1 mL（または0.2 mL）のマイクロチューブとマイクロピペットを使用するため、チューブとマイクロピペットが2種類必要である。繰り返し分析精度は手順(2-1)と同等以下である。

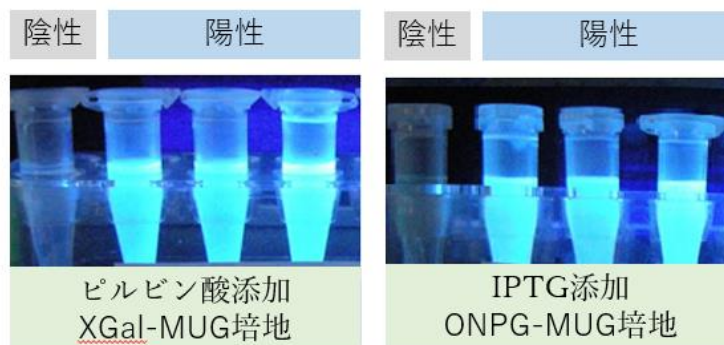
本方法では以下の器具と装置を使用する。

1. PCR チューブ (0.1 mL または 0.2 mL) : 1 検水あたり 10 個。
2. プラスティックチューブ (1.5 mL) : 1 検水あたり 10 個。
3. マイクロピペット (100 または 200 μ L) : ピペットマン P100 または P200 (ギルソン) など。
4. マイクロピペット (1000 μ L) : ピペットマン P1000 (ギルソン) など。
5. ピペットチップ (0.1 mL または 0.2 mL) : 箱入り品であれば特に滅菌は不要。
* (参考) 作業に慣れない人は吸い込み時のコンタミネーション防止のためにフィルター付きのチップを使用した方がよい。
6. ピペットチップ (1 mL) : 箱入り品であれば特に滅菌は不要。
* (参考) 作業に慣れない人は吸い込み時のコンタミネーション防止のためにフィルター付きのチップを使用した方がよい。

作業手順は以下の通りである。

1. PCR チューブ (0.1 mL または 0.2 mL) 10 本に培地を混合した検水を 100 μ L ずつ分注し、蓋を閉める。
2. * (参考) 同じ溶液の分注は同じピペットチップで行ってよい。プラスチックチューブ (1.5 mL) 10 本に培地と検水の混合液を 1000 μ L ずつ分注し、蓋を閉める。
* (参考) 同じ混合液からの分注は同じピペットチップで行ってよい。
* (参考) 蓋が閉まり切っていないと培養中に液量が減って適切な培養ができなくなるため注意が必要。
3. これらをヒートブロックまたはインキュベーターにて 44.5°C $\pm$ 0.5°C、22 $\pm$ 2 時間培養する。
4. UV ライトや UV トランスイルミネーターなどを用いて培養後のチューブに紫外線を照射する。
7. 1 mL と 0.1 mL のチューブそれぞれについて明確な蛍光を発したチューブの本数を数え、別表 2 から検水の 100 mL 当たりの大腸菌数を求める。
* (注意) 紫外線照射前に変色していても紫外線照射時に蛍光を発しないものは「陰性」と判断する。
8. 使用後のチューブは蓋を開けてから 100 倍希釈したオスバン溶液 (10%) に一晩漬けて殺菌する。
* (参考) オートクレーブ殺菌または5分以上の煮沸殺菌の処理でも可能である。
9. 殺菌後のチューブはプラスチックごみとして処分する。殺菌液は流水とともに廃棄する。
* (注意) 8. 及び 9. の処理を試験室として初めて行う場合には、実施前に、試験室の所在する自治体の担当部局に適正な処理であるか確認した上で実施する。

参考図 紫外線照射下での結果の判定



別表1 MPN表 (1段40本法 : 0.2 mL)

陽性本数	MPN/100mL	陽性本数	MPN/100mL
0	<13	21	372
1	13	22	399
2	26	23	428
3	39	24	458
4	53	25	491
5	67	26	525
6	81	27	562
7	96	28	602
8	112	29	646
9	128	30	694
10	144	31	746
11	161	32	805
12	178	33	872
13	197	34	949
14	216	35	1040
15	235	36	1152
16	256	37	1296
17	277	38	1499
18	299	39	1846
19	322	40	>1846
20	347		

* (参考) 0.2mLのチューブ40本のうちn本が陽性となる場合の大腸菌数の計算式

$$\text{MPN/100mL} = 1152 \times \log_{10} (40 / (40 - n))$$

別表2 MPN表（2段10本法：1 mL/0.1 mL）

1mL	0.1mL	MPN/100mL	1mL	0.1mL	MPN/100mL	1mL	0.1mL	MPN/100mL
0	0	<9	4	0	45	8	0	130
0	1	9	4	1	57	8	1	151
0	2	18	4	2	69	8	2	172
0	3	28	4	3	82	8	3	196
0	4	37	4	4	94	8	4	221
0	5	47	4	5	107	8	5	249
0	6	56	4	6	121	8	6	278
0	7	66	4	7	134	8	7	310
0	8	76	4	8	148	8	8	345
0	9	85	4	9	162	8	9	384
0	10	95	4	10	177	8	10	426
1	0	10	5	0	61	9	0	171
1	1	19	5	1	74	9	1	198
1	2	29	5	2	87	9	2	228
1	3	39	5	3	101	9	3	263
1	4	49	5	4	115	9	4	302
1	5	59	5	5	130	9	5	346
1	6	69	5	6	145	9	6	398
1	7	79	5	7	160	9	7	458
1	8	90	5	8	176	9	8	527
1	9	100	5	9	192	9	9	607
1	10	111	5	10	209	9	10	697
2	0	20	6	0	79	10	0	240
2	1	30	6	1	94	10	1	287
2	2	41	6	2	109	10	2	348
2	3	51	6	3	124	10	3	429
2	4	62	6	4	141	10	4	542
2	5	73	6	5	157	10	5	702
2	6	84	6	6	175	10	6	918
2	7	95	6	7	193	10	7	1204
2	8	106	6	8	212	10	8	1610
2	9	118	6	9	232	10	9	2303
2	10	129	6	10	253	10	10	>2303
3	0	32	7	0	101			
3	1	43	7	1	118			
3	2	54	7	2	136			
3	3	65	7	3	154			
3	4	77	7	4	174			
3	5	89	7	5	194			
3	6	101	7	6	216			
3	7	113	7	7	239			
3	8	125	7	8	263			
3	9	138	7	9	289			
3	10	151	7	10	316			

研究推進会議の開催状況、研究成果の発表（論文、特許等）等

課題 番号	(1) 研究推 進会議 等開催 回数	(2) 行政が 活用し うる成 果の有 無	(3)学術論文数		(4)口頭発表回数		(5) 出版 図書数	(6)国内特許権等数		(7)国際特許権等数		(8) 報道 件数	(9) 物品購 入の有 無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
21454554		無				1							無

(1)研究推進会議等の開催実績
区分:①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者 数	消費・安全局担当 官の出席有無	主な議題及び決定事項
1	令和3年度第1回研究推進会議	2021年9月13日	オンライン	10	あり	全体の研究方針の確認
1	令和3年度第2回研究推進会議	2022年2月18日	オンライン	10	あり	R3年度の研究成果の確認
1	令和4年度第1回研究推進会議	2022年9月14日	オンライン	10	あり	R4年度前半期の研究成果の確認
1	令和4年度第2回研究推進会議	2023年3月2日	オンライン	10	あり	全期間の研究成果の確認

(2)行政が活用しうる成果
区分:①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況

(3)学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名

(4)口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
Inatsu et al. "Importance of the bacterial quality of irrigation water –Choice of the source and quantitative analysis of E. coli" INTERNATIONAL CONFERENCES ON FOOD & AGRICULTURE ADVANCED TECHNOLOGY FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT 2022、ホーチミンシティ、2022年11月26日	農研機構

(5)出版図書

区分:①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名

(6)国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(7)国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(8)報道件数

区分;①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考

(9)購入物品

品名	規格	員数	購入実績(円)		使用目的	備考
			単価	金額		

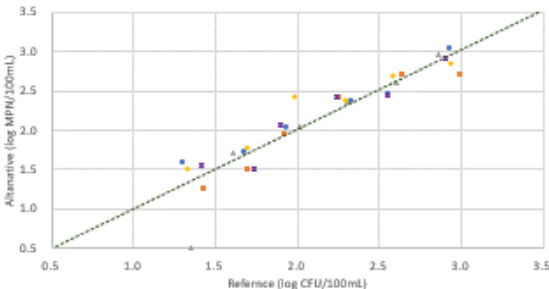
農業用水中に含まれる大腸菌を対象とした簡易検査法の開発

背景・目的：農水省「栽培から出荷までの野菜の衛生管理指針（第2版）」（2021年7月）に生食野菜（収穫部位）に対し、収穫までの1週間以内に使用するかん水等に係る水質管理の参考の菌数（大腸菌100個/100mL（目安）以下）が記載。
→ 水道局等の行政や生産者等が安価かつ簡単に迅速に実施できる農業用水中の大腸菌数の簡易検査法の開発が求められている。

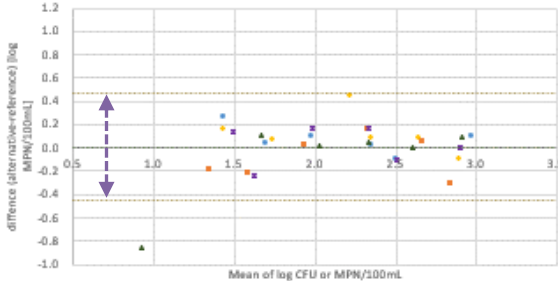
ISO 16140-2:2016に基づき候補の開発法*1（MPN法3種×特定酵素基質培地3種）のバリデーションを実施（対照法：EPA method 1603）
*1 上記目安の超過の有無、超えた場合のおおよその菌数（10の何乗個/100 mL程度か）を判定する方法

- Inclusivity/exclusivity study: 用いる培地での大腸菌（50種）の陽性/非大腸菌（47種）の陰性を確認
- Relative trueness study: 同一試料を分析した時の対照法との差が一定の範囲内（図1）
- Accuracy profile study: 繰り返し分析結果が対照法と比べ大きくばらつかない（図2）

図1 Relative trueness studyの例

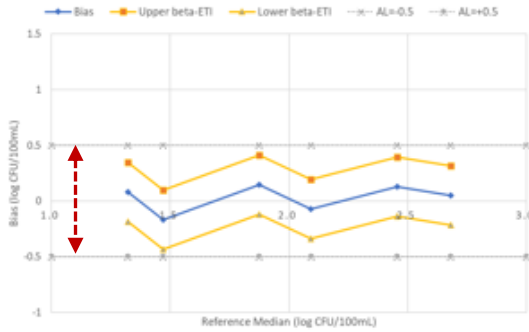


→ 傾きが1の直線に近いほど望ましい（横軸：対照法、縦軸：開発法）



→ 紫色破線の範囲外となるのは20試料に1試料以下が期待される

図2 Accuracy profile studyの例



→ 上下の線が赤色破線の範囲に全て入る場合に対照法と同等と許容される

結果

44.5℃±0.5℃で22±2時間培養

開発法	分析の精度（*2）	作業性	分析コスト	備考
(A) 3段5本法（MPN plate）	△	◎	△	特にIPTG添加 ONPG-MUG培地の使用を推奨。
(B) 2段10本法（1mL、0.1mL）	○	○	○	作業性は(C)と大差なし。
(C) 1段40本法（0.2mL）	○	○	○	本数は32本超が必要、48本までは不要。

*2 MMO-MUG培地ではなく、ピルビン酸添加 Xgal-MUG培地とIPTG添加 ONPG-MUG培地の使用を推奨。また、分析の精度には培地差がある。