〈論文〉

特定酵素基質培地を用いた下水試料の大腸菌測定法の性能確認方法に関する考察

山　下　洋　正[1)]，諏　訪　　守[2)]，松　橋　　学[3)]，重　村　浩　之[3)]

[1)] 土木研究所流域水環境研究グループ水質チーム（現　国土技術政策総合研究所上下水道研究部）
（〒305‑0804　茨城県つくば市旭１　E-mail：yamashita-h92ta@mlit.go.jp）

[2)] 土木研究所流域水環境研究グループ水質チーム
（〒305‑0804　茨城県つくば市南原1‑6　E-mail：suwa@pwri.go.jp）

[3)] 国土技術政策総合研究所上下水道研究部下水処理研究室
（〒305‑0804　茨城県つくば市旭１　E-mail：matsuhashi-m92ta@mlit.go.jp, shigemura-h92ta@mlit.go.jp）

概　要

下水道法の放流水の水質基準および水質汚濁防止法の排水基準において，衛生指標の水質項目が大腸菌群数から大腸菌数に変更される。このため大腸菌測定の公定法を定める必要があり，特定酵素基質培地を用いた混釈平板法について，必要な性能確認に関する検討の一部を，本研究にて実施した。公定法の性能のうち，回収率（真度），繰り返し精度について，複数の市販培地の組成の違いや希釈水の種類の違い，試料中の大腸菌濃度の影響も含めて検討し，確認方法の適用性や測定の実用面における技術的課題も含めて考察した。

キーワード：大腸菌，特定酵素基質培地，下水試料，公定法，性能確認

原稿受付 2024.7.29　　原稿受理 2024.9.15　　**EICA**: 29(2・3) 38‑49

1. は　じ　め　に

下水道法の放流水の水質基準および水質汚濁防止法の排水基準において，衛生指標の微生物測定項目が大腸菌群数から大腸菌数に変更される。いずれも2025年４月１日施行であり，下水道放流水水質基準は下水道法施行令の改正（2024年１月４日公布）[1)] によるものであり，排水基準は水質汚濁防止法の施行令改正（2024年１月４日公布）[1)] および施行規則改正（2024年１月25日公布）[2)] によるものである。基準値については，従前は「大腸菌群数が１立方センチメートルあたり3,000個以下」であったものが，「大腸菌数が１ミリリットルあたり800コロニー形成単位以下」に改正される。この基準値への適合を判断するための公定法として大腸菌の測定法を定める必要があり，特定酵素基質培地を用いた混釈平板法が，下水の水質の検定方法等に関する省令の改正として公布され（2024年３月13日公布，2025年４月１日施行）[3)]，測定法の詳細に関する事務連絡[4)] も発出されている。本研究は，下水試料の大腸菌測定法を公定法として定めるに当たり必要な性能確認方法について，技術的な観点より考察を行い明確化に資することを目的とするものである。

基準変更の背景として，水質の衛生学的な指標については，大腸菌群数が長らく用いられてきた。具体的な測定法としては，環境基準では最確数法（MPN法），下水道放流水水質基準や排水基準では混釈平板法であった。基準制定当時の測定技術水準や実施可能性も踏まえて選定されたものであるが，一方で，温血動物の腸管由来ではない土壌中の細菌等も一部検出されうることから，ふん便汚染の指標として正確性が十分でない等の課題があった。近年の技術の進展により，容易に大腸菌のみを特異的に検出可能な測定法が利用可能となっていることから，まず水質環境基準において，指標が大腸菌群数から大腸菌数に見直された（告示改正として2021年10月７日公布，2022年４月１日施行）[5)]。これを受けて，下水道放流水水質基準や排水基準においても，同様に検討が進められてきた[6,7)]。

大腸菌の特異的な検出原理としては，ほとんどの大腸菌が特異的に有するβグルクロニダーゼ活性を利用しており，この酵素反応により発色する基質を添加した特定酵素基質培地を用いている。

公定法に採用するための測定法に求められる性能として，基準への適合を判断しうる測定精度等が挙げられるが，具体的な精度目標の設定に関する知見は必ずしも十分ではない。例えば，水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン[8)]では，水道水中の無機物，有機物，農薬類等の検査対象物の濃度の検査結果に関する精度として，真度，併行精度，室内精度を具体的に挙げているが，微生物試験については示されていない。大腸菌の測定法の検討においては，このうち農薬類の精度目標を参考に，回収率（真度）は70～120%以内，繰り返し精度（併行精度）は変動係数（相対標準偏差）30%以内と設定されたものである[6)]。一方，国際

的にも ISO/TC 147（Water Quality）/SC4（Microbiological methods）[9] において，微生物学的手法による水質測定法に関して 30 件もの IS 規格が発行されているが，基準適合の判断およびそのための試験方法の評価の観点でこれらの規格の活用可能性について分かりやすい説明は見当たらない。また，実際の測定で得られる精度は試料濃度や性状によっても異なることに加え，試験操作の難易度やコスト面も含めた現実的な導入可能性も考慮して測定法を選定する必要がある。

このため，本論文では，大腸菌の測定精度のうち，同一試験機関で確認できて最も基本となる回収率・繰り返し精度について，既存研究資料[10]の測定結果に基づきつつ微生物試験方法の理論的観点からの検討を加えて再評価を行い考察した。考察にあたっては現実的な導入可能性の観点にも留意した。

2. 方　　法

2. 1　測定値の統計分布の検討

大腸菌の測定結果の精度を確認する方法として，測定値をどのような統計分布に基づいて評価できるかを検討した。一般に細菌のコロニー等をカウントする場合，比較的少ない個数を離散的に取り扱うことから，理論的には（式 1）に示すポアソン分布に従うものと考えられる[11,12]。また，ポアソン分布の平均 m が大きくなると正規分布（平均と分散が m）に近づくことから，この特性を用いた統計手法の適用も考え得る。

しかしながら，実試料では微生物粒子の分散の不均質性や測定操作に由来する誤差等の影響も考えられるため，実際の適合度を評価する必要がある。このため，既存研究資料[10]の回収率試験および繰り返し精度確認試験（培地・希釈水の種類ごと）の測定データに基づき，（式 2）により Fisher の分散指数 D^2を算出し，この D^2が自由度 n-1 の χ^2分布に従うものとして，ポアソン分布への適合度を評価した[11–14]。

なお，（式 2）に代入する母分散 σ^2の推定値として，（式 1）のポアソン分布の母平均 m が母分散に等しい性質に基づき，母平均の不偏推定量である標本平均を用いた。

$$P_{(x)}=\frac{m^x}{x!}\cdot e^{-m} \qquad \text{（式 1）}$$

$P_{(x)}$：観測値 x の生起確率，x：観測値（コロニー数等），m：母平均

$$D^2=\frac{(n-1)\cdot S^2}{\sigma^2} \qquad \text{（式 2）}$$

D^2：分散指数，n：繰り返し測定数（標本サイズ），S^2：測定値の不偏分散，σ^2：母分散

2. 2　測定値の分散状況の評価

測定値をポアソン分布に従うものとして扱うことが妥当と判断された場合でも，実際の測定値では理論的分布（母分散と母平均が一致）から乖離が生じうるとともに，理論的分布においても有限個のサンプリングに伴うばらつきが不可避であり，不偏分散が標本平均より過大または過少となることがしばしば観測される[11,12]。

測定結果の変動が理論的な予測よりも過大の場合は目標精度の達成に影響するため，測定値の分散状況を把握し，理論的な予測からの乖離の程度を評価することが重要である。理論分布からの乖離は（式 2）の分散指数 D^2によっても判断可能であるが，より分かりやすい指標として，ISO 19458（2006）[11] で示されている次の（式 3）より過分散係数 K（$=S^2/m$）を用いて評価を行った。なお，$K=D^2/(n-1)$ の関係にある（（式 2）の σ^2の推定値として m を用いているため）。

$$S^2=K\cdot m \qquad \text{（式 3）}$$

S^2：不偏分散
K：過分散係数（過分散の場合は $K>1$）
m：標本平均

2. 3　測定回数と精度の評価

測定法の精度確認試験において，繰り返し測定回数（標本サイズ）を増やせば結果の信頼性が高まることが期待されるが，測定回数を増やすにつれて，試料や測定条件の均質性を保つのが難しくなることに加え，測定作業のコストや労力も増大することから，現実的に妥当な測定回数を見いだす必要がある。

このため，測定法の精度の目安のうち，回収率（真度）および繰り返し精度（変動係数 CV）について，精度把握に対する繰り返し測定回数の影響を試算した。

まず，測定値がポアソン分布に従うとして扱える場合について，正規分布近似により回収率の計算を，χ^2分布近似により繰り返し精度の計算をそれぞれ行った。実測試験で設定した濃度に合わせてポアソン分布は平均 $m=30$（コロニー数またはコロニー形成単位 CFU，以下同様）とし，標本サイズは $n=2$～15 とした。

回収率は「測定値の平均値/設定した真値（添加濃度値）」で評価するため，正規分布 N(平均 m，分散 σ^2) からのサイズ n の標本の平均値が N(平均 m，分散 σ^2/n) に従うことを利用して，偶然誤差に基づく値の範囲を推定した。

繰り返し精度は変動係数 CV で評価するため，（式 2）および（式 3）より導出される（式 4）に基づき，D^2が自由度 n-1 の χ^2分布に従うものとして，CV の値の範囲を決定した。

$$CV=\frac{\sqrt{S^2}}{m}=\frac{\sqrt{K\cdot m}}{m}=\frac{\sqrt{K}}{\sqrt{m}}=\frac{\sqrt{D^2/(n-1)}}{\sqrt{m}}=\frac{\sqrt{D^2}}{\sqrt{m\cdot(n-1)}}$$

（式 4）

あわせて，分布の近似によらない方法として，ポアソン分布に従う乱数を発生させた数値計算により確認を行った。繰り返し測定回数（標本サイズ）n=2, 5, 10, 15 のそれぞれの場合について，平均 m=30 のポアソン分布の乱数を 10,000 組生成し，平均値，変動係数等を 10,000 個算出して分布を把握した。計算は Python（NumPy）で行った。

これらの分布の近似に基づく結果，数値計算による結果，および精度確認試験の実測定データにおける標本サイズと回収率・CV との関係を対比させて，計算の妥当性や精度確認試験に求められる標本サイズについて検討した。

2.4　実測定における精度の評価

実務の水質管理における測定では，2 回以上の繰り返し測定の結果より平均値を算出して基準値への適合を評価する。測定回数（標本サイズ）が結果（平均値）の信頼性に直接的に影響することに加え，実務の測定においてはコストや労力の制約がより重要となることを踏まえ，2 回測定の平均値を採用する場合にどの程度のばらつきが見込まれるのか，また，ばらつきを考慮した上で基準値適合を確実とするためには濃度にどの程度余裕が必要かについて，検討した。

平均値のばらつきについては，低濃度ほど相対的なばらつき（例えば変動係数）が大となることを踏まえ，2.5(2) で後述のとおり測定法の濃度下限と想定する 30 CFU/mL で計算した上述の計算結果を用いて把握した。また，基準値付近の濃度（10 倍希釈により 80 CFU/mL 付近）についても，2 回測定の平均値のばらつきを試算した。

2.5　測定データの取得方法および測定条件の設定

(1) 測定データの取得方法

詳細は既存研究資料[10]のとおりであるが，概要を記載する。回収率試験データは，0.2 μm メンブレンフィルターでろ過滅菌した実下水処理水試料（嫌気無酸素好気法処理水）に市販の大腸菌標準試料を添加して 30 CFU/mL 程度の濃度に調整して試験（培地 5 種類×試行 3 回）を実施したものである。繰り返し精度試験データは，実下水処理水試料（嫌気無酸素好気法処理水）を希釈水により 30 CFU/mL 程度に希釈して試験（培地 5 種類×希釈水 3 種類×試行 2 回）を実施したものである（元試料中の大腸菌濃度に応じて希釈倍率は約 2 倍〜11 倍）。いずれも 1 試験機関における繰り返し測定として同一試料について同時測定・同一人物による操作の試験結果を解析した。特定酵素基質培地については，市販の A〜E の 5 種類の試験結果に基づいて評価した。いずれも，大腸菌が特異的に有する β グルクロニダーゼ活性を検出するために 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニドを含有しているが，その他の成分も含めた全体組成はそれぞれ異なっており，測定結果の違いにつながりうるものと考えられた。希釈水については，滅菌蒸留水，滅菌生理食塩水および滅菌リン酸塩緩衝液の 3 種類を試験した。なお，環境基準の告示[5]における大腸菌測定法（メンブレンフィルター法）では滅菌ペプトン水も希釈水の一つに挙げられており，環境中で損傷を受けた大腸菌でもより検出しやすくなる等の利点が考えられるが，下水試料の測定においては処理や消毒による不活化も含めた放流水の水質を把握することが目的であり，また，栄養豊富なペプトン水の取り扱いにおけるコンタミネーションの恐れや準備の労力等も考慮して，積極的に採用する理由に乏しいと考えて試験対象としなかった。

(2) 測定条件の設定

測定方法の評価において，設定濃度等の測定条件が影響するため，目的に合致するよう設定する必要がある。本研究の実施時点において，下水道放流水および排水の大腸菌に関する基準値案として 800 CFU/mL 程度が可能性として想定されていた[15]。ϕ90 mm のペトリ皿（シャーレ）を用いる一般的な混釈平板法において適正なコロニー数としては 30〜200 または 300 程度とされており（下水試験方法[16]，上水試験方法[17]，Standard Method[18]），測定対象以外のコロニーの増殖による影響等が懸念される場合は，100 コロニー程度まで希釈することが望ましいとされている。混釈平板法において 800 コロニーを 1 枚に生育させて計数することは困難であり，その 10 倍希釈の 80 コロニーが計数に至適の範囲であることから，基準値相当の 800 CFU/mL の試料を 10 倍希釈した試料 1 mL を混釈平板法で測定する方法を基本とすることとした。大腸菌数の特定酵素基質培地による測定において，コロニー数が多くなると，コロニーが不鮮明となったり生育が抑制されたりする懸念があることも踏まえ，希釈による試料濃度の範囲はコロニー数として 30〜100 が最も望ましく，混釈平板法の一般的な対象範囲として 30〜200 コロニーに収めることを希釈操作の目標とし，10 倍希釈で調整可能な濃度範囲が 10 倍刻みとなることを考慮して，20〜200 コロニーを許容範囲とすることが現実的と考えられた。この考えに基づくとともに，30 CUF/mL より低濃度で変動係数が大となる傾向が報告されている[19]ことも踏まえ，測定方法の精度確認においては，目標濃度の下限として 30 CUF/mL 付近

の試料を測定して評価することとした。

なお，混釈平板法を用いる理由として，これまでの指標である大腸菌群数の測定において，デソオキシコール酸塩培地による混釈平板法が用いられており，培地の種類を大腸菌用の特定酵素基質培地に変更することにより，現在の測定設備および測定者の技術により大腸菌の測定も実施可能となるため，実用面で導入が容易であることが挙げられる。また，環境基準に関する大腸菌の測定法ではメンブレンフィルター法が採用されており，20～100 CFU/100 mL の低濃度にも対応可能とされているが，下水道放流水および排水の基準値 800 CFU/mL への適合有無の判断の観点からは，10 倍希釈試料で 80 CFU/mL よりもはるかに低濃度であることが確認さえできれば問題ないため，積極的に採用する理由はなく混釈平板法で十分であると考えられた。

また，試験操作の難易度およびコスト面での現実的な導入可能性の考慮のため，培地カタログ等の各種情報が整理されている資料[20]を参照し，混釈平板法に関して確認した。ここまで2章で述べた本研究の検討の流れの概要を **Fig. 1** に示した。

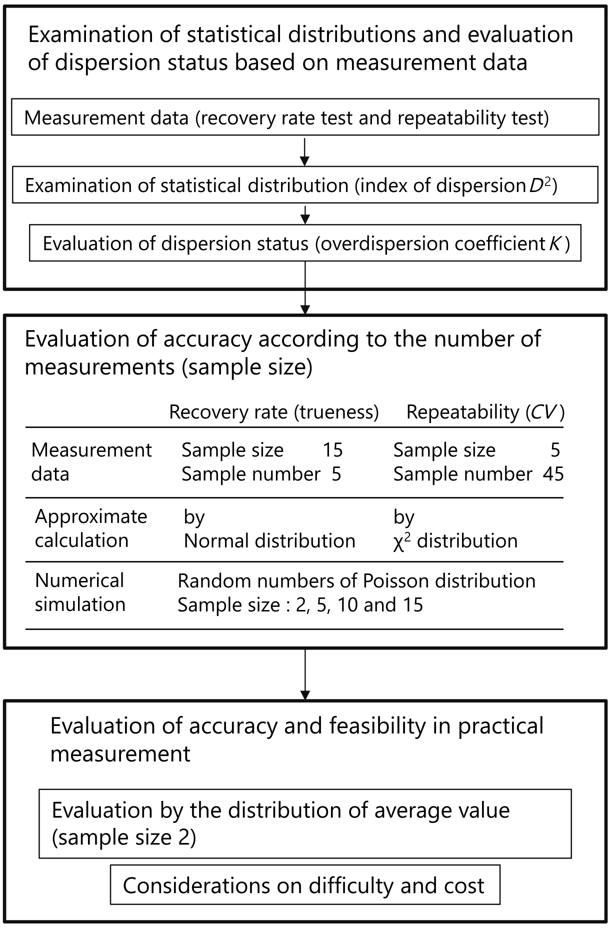

Fig. 1　Outline of the study

3. 結果および考察

3.1　測定値の統計分布の検討

既存研究資料[10]の測定結果に基づき，繰り返し測定5回（標本サイズ5）を1標本とした平均 m，不偏分散 S^2，分散指数 D^2 等を，回収率試験データについて **Table 1** に，繰り返し精度確認試験データについて **Table 2** に，それぞれ示した。なお，回収率試験データについて，回収率（真度）の確認においては，できるだけ多数のデータで確認するものとして繰り返し測定5回1組の測定を3組行った全15回測定の平均で評価しているが，ここではデータの変動の評価に活用するため，個別の3回の測定（標本数3）として取り扱った。

(1) 回収率試験データ

回収率試験データ（培地5種類×試行3回）において，各培地での各回の試行（標本サイズ5）ごとに評価した計15組の D^2 について，Run 1 で 0.92～5.69，Run 2 で 1.12～5.43，Run 3 で 1.14～9.33 であり，いずれも自由度4の χ^2 分布の上側5％値である 9.49 よりも小さかった。なお，分布からのずれの検出としては両側検定を行うことも考えられるが，ここでは分散について過大か否かが精度管理での主要な着眼点と考え，片側検定（上側）で実施した。各培地での1回の試行（標本サイズ5）ごとのP値は 0.053～0.921 であり，有意水準5％でいずれも有意でなかった。この検討で用いた回収率試験データは，ろ過滅菌を行った下水処理水に市販の大腸菌標準試料を添加した試験で得られたデータであり，一般的な下水試料（懸濁物を含んだ試料水中に，大腸菌以外にも多様な細菌が存在）を用いた場合と比べて良好に制御された測定条件と考えられ，理論的なポアソン分布からの有意な乖離が見られなかった理由の一つと推察される。また，A～E の5培地をまとめて各回の試行（標本サイズ25）ごとに評価した3組の D^2 について，19.78～23.13 であり，いずれも自由度24の χ^2 分布の上側5％値である 36.42 よりも小さかった。P値は 0.512～0.709 であり，有意水準5％でいずれも有意でなかった。培地の違いにより測定結果に著しい差異が生じている場合は，全培地をまとめて評価した場合に D^2 が有意に大となりうるが，上記の結果では有意性は見られなかった。以上より，回収率試験データについて，ポアソン分布からの有意な乖離は見受けられなかった。

(2) 繰り返し精度試験データ

繰り返し精度試験（培地5種類×希釈水3種類×試行2回）において，各培地と各希釈水の組み合わせでの各回の試行（標本サイズ5）ごとに計30組の D^2 を評価し，あわせて5種類の培地をまとめて各回の試行（標本サイズ25）ごとに評価した計6組の D^2 につい

Table 1　Mean, variance, and index of dispersion for recovery rate test data

Medium	Run 1			Run 2			Run 3			Recovery rate (%)
	Mean	S^2	D^2	Mean	S^2	D^2	Mean	S^2	D^2	
A	26.0	28.5	4.38	15.4	4.3	1.12	29.8	12.2	1.64	82.5
B	23.4	33.3	5.69	18.2	11.7	2.57	27.4	7.8	1.14	80.7
C	20.6	6.8	1.32	19.2	14.7	3.06	30	70	9.33	81.8
D	18.6	4.3	0.92	18.2	6.7	1.47	32.6	9.3	1.14	81.2
E	23.4	15.8	2.70	21.6	29.3	5.43	34.8	33.2	3.82	93.5
All	22.4	21.6	23.13	18.5	15.3	19.78	30.9	28.8	22.38	83.9

Sample size (Repeat n)＝5 for each medium A to E
Sample size (Repeat n)＝25 for 'All' (aggregated data of 5 medium)
Mean: mean of colony counts (CFU)
S^2 : variance
D^2 : index of dispersion

Table 2　Mean, variance, index of dispersion, and CV for repeatability test data

Medium	Distilled Water 1				Distilled Water 2			
	Mean	S^2	D^2	*CV* (%)	Mean	S^2	D^2	*CV* (%)
A	32.6	8.8	1.08	9.1	32.4	16.3	2.01	12.5
B	29.8	16.2	2.17	13.5	23.6	20.3	3.44	19.1
C	31.8	14.2	1.79	11.8	23.8	13.2	2.22	15.3
D	31.2	12.7	1.63	11.4	23.2	34.2	5.90	25.2
E	30.8	19.7	2.56	14.4	24.6	15.8	2.57	16.2
All	31.2	12.9	9.88	11.5	25.5	29.2	27.44	21.2
Medium	**Saline Solution 1**				**Saline Solution 2**			
	Mean	S^2	D^2	*CV* (%)	Mean	S^2	D^2	*CV* (%)
A	26.6	35.3	5.31	22.3	25.4	35.3	5.56	23.4
B	28.8	4.7	0.65	7.5	21.8	24.7	4.53	22.8
C	29.2	71.7	9.82*	29.0	23.6	33.8	5.73	24.6
D	26.4	55.3	8.38	28.2	18.8	20.7	4.40	24.2
E	27.2	36.7	5.40	22.3	23	16	2.78	17.4
All	27.6	35.3	30.67	21.5	22.5	26.8	28.52	23.0
Medium	**Phosphate Buffer 1**				**Phosphate Buffer 2**			
	Mean	S^2	D^2	*CV* (%)	Mean	S^2	D^2	*CV* (%)
A	28.2	18.2	2.58	15.1	25	6.5	1.04	10.2
B	27	20.5	3.04	16.8	23.6	11.3	1.92	14.2
C	27.8	16.7	2.40	14.7	21.6	40.8	7.56	29.6
D	29.4	45.3	6.16	22.9	21	14	2.67	17.8
E	33	4.5	0.55	6.4	24.4	19.3	3.16	18.0
All	29.1	22.2	18.29	16.2	23.1	17.9	18.54	18.3

Sample size (Repeat n)＝5 for each medium A to E
Sample size (Repeat n)＝25 for 'All' (aggregated data of 5 medium)
Mean : mean of colony counts (CFU)
S^2 : variance
D^2 : index of dispersion

ても評価した。

結果として，C 培地で希釈水が滅菌生理食塩水の場合の測定 2 回のうち 1 回の結果のみ，D^2＝9.82 で自由度 4 の χ^2 分布上側 95% 値 9.49 より大となり有意であった（P 値は 0.042）。それ以外の各培地ごとの 29 組の D^2 は 0.55～8.38，A～E の 5 培地をまとめて評価した 6 組の D^2 は 9.88～30.67 であり，いずれも有意でなかった。以上より，繰り返し精度試験データにおいても，ほとんどの場合にポアソン分布からの有意な乖離は見受けられなかった。

本測定の繰り返し精度試験では，同一処理場の下水試料を，実験室内で各希釈水にて所定の濃度に調整して繰り返し測定を行ったものであり，回収率試験においてろ過滅菌した下水処理水へ大腸菌標準試料を添加している試験条件と比べて，実下水由来の懸濁物が存在し，実環境中の大腸菌に加えて大腸菌以外の多様な細菌も存在することより測定精度への影響可能性がより大であると考えられるが，その場合でも，測定値をポアソン分布に基づいて評価できると考えられた。

(3) 統合的考察

上述の二種類のデータについて，多数の検定が多重比較的な面を持つことに留意して有意水準を 5％より小さく調整した場合でも，より棄却されにくくなるため判断結果は変わらない。

測定データとポアソン分布との関係についての上述の結果を既往の知見と比較すると，例えば，微生物試験におけるサンプリング方法を規定するISO 19458[11]では，理想的な均質化条件においては，細菌数の分布はポアソン分布に近似的に従うとしている。一方で，下水等の実試料には懸濁物も含まれており，それらへの微生物の付着や微生物粒子の塊の形成等の可能性も考慮すると，微生物が均質に分散しているとは限らない。この理想的条件からのずれが測定値の分布に及ぼす影響については，試料性状や測定条件に応じて具体的に検討する必要があると考えられる。一例として，環境水試料3種類中のふん便性連鎖球菌を培地種類や培養温度等が異なる5種類の方法で繰り返し測定（標本サイズ5）を行った結果について，測定法と試料の組み合わせ15組の評価では1組を除きD^2が有意に大とならなかったが，試料ごとに5種類の測定法をまとめて評価した場合に3試料ともD^2が有意に大となり，測定法の違いの影響が無視できなかったとの報告例がある[14]。本検討で用いた回収率試験データおよび繰り返し精度確認試験データの測定条件の範囲では，培地組成の違いや希釈水の種類の違いの影響は限定的であり，概ねポアソン分布を適用して評価することに問題は見いだされないとの知見が得られた。

3.2　測定値の分散状況の評価

3.1と同様に既存研究資料[10]の測定結果に基づき，繰り返し測定5回（標本サイズ5）ごとの平均m，不偏分散S^2により過分散係数$K(=S^2/m)$を算出し，回収率試験データについて**Fig. 2**に，繰り返し精度確認試験データについて**Fig. 3**に，それぞれ示した。

回収率試験データ15組（5培地・3試行）の過分散係数Kは0.23～2.33であり，$K>1$が4組，$K<1$が11組であった。繰り返し精度試験データ30組（5培地・3希釈水・2試行）の過分散係数Kは0.14～2.46であり，$K>1$が11組，$K<1$が19組であった。いずれも過分散（過大，$K>1$）よりも，過小分散（$K<1$）の方が多かった。

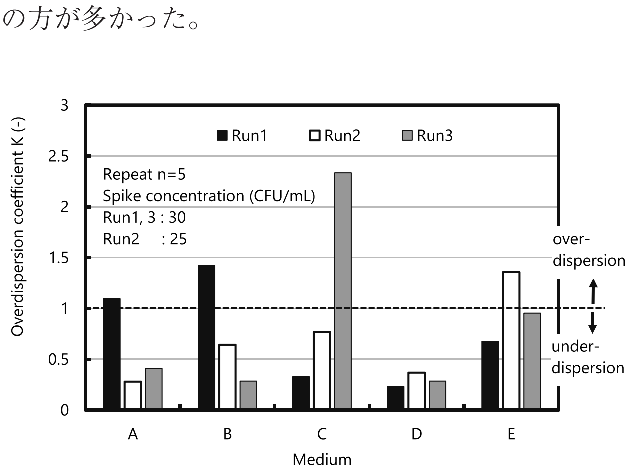

Fig. 2　Overdispersion coefficient K for each medium

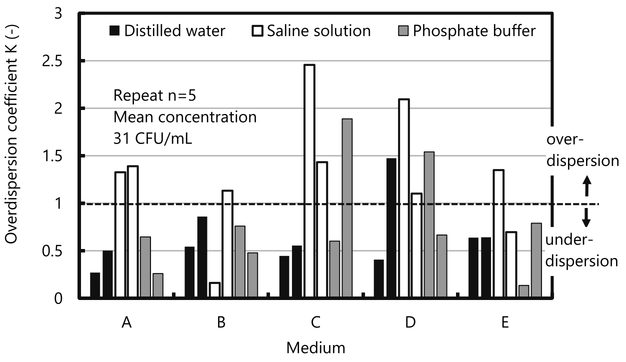

Fig. 3　Overdispersion coefficient K for each combination of medium and diluents

ここで，$K=D^2/(n-1)$であり，標本サイズ5のD^2が自由度4のχ^2分布に従うことより，Kの理論的分布も推定できる。3.1(1)のD^2の評価では片側検定としたが，ここでは上述の過大および過小の両方を考察するため両側検定の考え方とした。下側2.5%値～上側2.5%値（95%の範囲）に対応するKの値は0.121～2.79であり，過大および過小の両方を含む範囲であった。また，50%値に対応するKの値は0.839であり，1より小さい値（過小側）であった。上述の測定データの結果と照らし合わせると，まず，回収率試験データ15組および繰り返し精度試験データ30組のKの値はすべて，理論的分布の95%の統計的ばらつきの範囲に収まるものであった。よって，測定値が理論的なポアソン分布に従う場合でも，繰り返し測定結果の分散についてこの程度の過大過小は発生しうるものと考えられた。また，試験データで過大よりも過小な分散が多かったことは，理論的にKの50%値が1より小さく分散の過小側となる（自由度が小さいほどχ^2分布が左に偏るため）ことと整合した。

過分散の発生傾向について，例えばISO 19458 (2006)[11]では，測定試料中の個数（CFU/試料体積）が12未満（例えば水道水中の大腸菌数測定などで想定される低濃度）の場合はポアソン分布によく従うが，12個以上の場合は分散S^2が平均値（理論的には分散に等しいと期待される）よりも大となること（過分散）が多いとしている。本解析で対象とした測定データは，測定試料の微生物コロニー数として30 CFU/試料体積(mL）程度であり，上記で過分散が多いとしている12個以上の状況であったが，実際には過小分散の方が多かった。この違いについて，ISO 19458 (2006)[11]は実試料における微生物粒子の分散の不均質性や懸濁物質の影響等が高濃度試料で増大傾向となることも踏まえた記述であるのに対して，本解析で対象とした測定データはこれらの影響が卓越しない試験条件下で取得されたものであり理論的分布に由来する変動が主であったためと考えられた。

3. 3　測定回数と精度の評価

(1)　回収率

標本サイズと回収率（真度）の精度の関係を把握するため，標本サイズを n=2〜15 とした場合に，平均値（標本平均）が正規分布近似により偶然誤差として確率 95% で取り得る範囲（2.5%〜97.5% 値）に基づき，平均値を設定真値（本計算ではコロニー数 30）で除した回収率の上限 97.5% 値および下限 2.5% 値として，**Fig. 4** に示した。同様に，ポアソン分布の乱数発生による数値計算結果（標本サイズ n=2, 5, 10, 15）について，同図に重ねて示した。さらに，精度確認試験の実測定データ（標本サイズ n=15）における回収率の範囲（最小値〜最大値，標本数 5）についても同図に重ねて示した。

同図より，偶然誤差により回収率が取り得る範囲の上限 97.5% 値および下限 2.5% 値について，正規分布近似による計算結果は，数値計算結果の n=2, 5, 10, 15 の場合において概ね一致することが確認され，近似による計算結果を採用可能と考えられた。標本サイズが大になるほど，回収率が取り得る範囲の上限〜下限の幅が狭まり，100% の周りに近づく傾向が見られた。回収率の精度目標と比較すると，下限 70% については標本サイズ n=2 以上で常に上回って達成していた。上限 120% については，n=2 では超過しており，n=3 でほぼ同値（約 120.66%）となり，n=4 以上で常に下回って達成していた。従って，理論的には，標本サイズ n=3 以上で，平均値より計算する回収率について偶然誤差のみに基づく変動範囲では，目標精度 70%〜120% が概ね達成できると考えられた。

ただし，ここでの「回収率が取り得る範囲」は，元の試料中のポアソン分布の分散による標本サイズ n の平均値のばらつき（正規分布近似）のみに由来する変動範囲を示しており，測定方法に由来する変動は一切考慮していないため，実際の測定値ではさらに取り得る範囲が大きくなる可能性がある。また，標本平均値の分布の平均は元の分布の平均と同じ（系統誤差なし）として計算しているが，実際の測定では，大腸菌が典型コロニーを形成せずに計数対象とならない場合（偽陰性）や，非大腸菌が類似コロニーを形成して誤って計数対象となる場合（偽陽性）も考えられるため，分布の平均が異なっている（系統誤差あり）可能性もある。特に，ろ過滅菌した試料に大腸菌の標準試料を添加する回収率試験においては，偽陽性よりも偽陰性（大腸菌の一部が生育せず過小評価となる）のために回収率が低めに出る可能性が重要と考えられる。

これらの点について，精度確認試験の実測定データの回収率で確認すると，標本サイズ n=15（標本数 5）において最小 80.7%〜最大 93.5% であり，目標精度は達成しているものの，計算による回収率の取り得る範囲 90.8%〜109.2% と比べると，実測定データの最小値の方が下回っており，全体として下方にシフトしていた。このように回収率が計算よりも低めとなっており，上述の偽陰性等による系統誤差の影響が考えられた。生きた微生物の培養法による測定においては，偶然誤差および系統誤差のどちらも不可避の誤差要因であるが，目標精度は達成できており，許容範囲内と考えられた。なお，回収率試験の実測データの一部は，大腸菌標準試料の添加濃度が 30 CFU/mL ではなく 25 CFU/mL であったが，その場合の計算における回収率が取り得る範囲は 89.9%〜110.1% であり，違いは上下ともに 1 ポイント未満であり，まとめて 30 CFU/mL の計算との比較により評価して問題ないと判断した。

ここで論じている回収率は，JIS Z8101-2（1999）[21] における「真度」と同義であり，「試験結果または測定結果の期待値と真の値との一致の程度」と定義されている。さらに JIS Z8402-1（1999）[22] において，「十分多数の測定結果から得られた平均値と，採択された参照値との一致の程度」と定義されており，偶然誤差ではなく系統誤差による偏りを表すものとされている。真度の試験方法について，水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン[8]では，5 個以上の添加試料の試験結果より求めることとされている。上述の実測定結果のように，回収率が 100% から離れた値（系統誤差による偏り）となりうること，および，偶然誤差により回収率の取り得る範囲が広がることを考慮すると，回収率の評価の際の標本サイズについては理論的な n=3 以上よりも余裕をもって「十分多数」とすることが望ましく，本検討の n=15 のように，できるだけ多くの測定値の平均に基づくことで偶然誤差の影響を抑えて系統誤差の評価として実施することが適当と

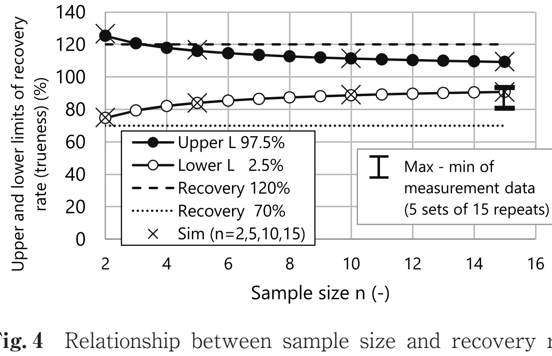

Fig. 4　Relationship between sample size and recovery rate (trueness) in calculations (colony count＝30 CFU) and multiple measurements with a colony count of approximately 30 CFU
Recovery rate of measurement data
＝mean of measured concentration of samples (n repeats) / spiked concentration.
Recovery rate calculated by normal distribution approximation or numerical simulation
＝mean of calculated concentration of samples (n repeats) / set value of mean concentration.

考えられた。具体的に試算すると，n=5の場合に確率95%で回収率が70～120%に収まるためには，系統誤差としては85～103%が許容範囲となり，元の範囲より上下で約15%ずつ狭まっているが，n=15の場合は許容範囲が79～110%と広くなり，元の範囲からの狭まりも上下で約10%ずつと緩和されている。また，試験を複数行った結果がすべて目標を満たすかどうかには，標本数も影響する。例えば95%の確率で目標を達成できる試験であっても，標本数14回の試行を行えば，$1-0.95^{14}=0.512$となり1/2以上の確率で1回以上未達成が発生すると見込まれるためである。標本サイズと標本数の積を総測定数と考えて，測定コストや労力の全体制約の中での合理的な試験計画を考える場合，回収率試験に関しては，標本数よりも標本サイズを優先することが合理的と考えられた。

(2) 変動計数

標本サイズと繰り返し精度（変動係数）の関係を把握するため，標本サイズをn=2～15とした場合に，（式4）のD^2がχ^2分布に従うことにより変動係数CVが確率95%で取り得る範囲（2.5%～97.5%値）として，CVの上限97.5%値および下限2.5%値を，**Fig. 5**に示した。同様に，ポアソン分布の乱数発生による数値計算結果（標本サイズn=2, 5, 10, 15）について，同図に重ねて示した。さらに，精度確認試験の実測定データ（標本サイズn=5）におけるCVの範囲（最小値～最大値，標本数45）についても同図に重ねて示した。

同図より，変動係数CVについては，取り得る範囲の上限97.5%値および下限2.5%値について，χ^2分布近似による計算結果は，数値計算結果の標本サイズn=2, 5, 10, 15の場合において概ね一致することが確認され，近似による計算結果を採用可能と考えられた。標本サイズが大になるほど，CVが取り得る範囲の上限～下限の幅が狭まり，中央値の周りに近づく傾向が見られた。なお，中央値はn=5で約16.7%であり，標本サイズの増大に伴い，ポアソン分布の理論的

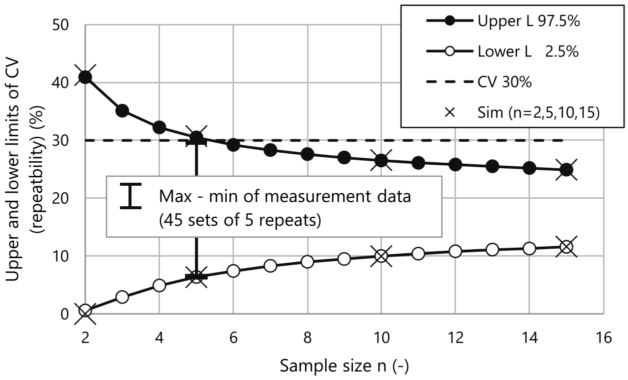

Fig. 5　Relationship between sample size and CV (repeatability) in calculations (colony count=30 CFU) and multiple measurements with a colony count of approximately 30 CFU

CV値である$1/\sqrt{平均}$（平均30では約18.3%）に向けて緩やかな増加傾向であった。CVの計算結果を精度目標である上限30%と比較すると，標本サイズn=5でほぼ同値（約30.47%）となり，n=6以上で常に下回って達成していた。従って，標本サイズn=5以上で，CVについて目標精度30%以下が概ね達成できると考えられた。

ただし，ここでの「CVが取り得る範囲」は，元の試料中のポアソン分布の理論的な過分散の状況による，標本サイズnにおけるCVのばらつき（D^2がχ^2分布に従う）のみに由来する変動範囲を示しており，測定方法に由来する変動は一切考慮していないため，実際の測定値ではさらに取り得る範囲が大きくなる可能性がある。また，元の分布からのサンプリング（測定行為に該当）において値を変化させずに計算しているが（系統誤差を考慮せず回収率100%に相当），上の回収率の実測定結果のとおり系統誤差により回収率が低めに出ることを反映させてサンプリング値（測定値に該当）を小さくした場合はCVが大きくなることが想定される。

これらの点について，精度確認試験の実測定データのCVで確認すると，標本サイズn=5（標本数45）において最小6.43%～最大29.6%であり，目標精度である30%以下を達成していた。計算によるCVの取り得る範囲6.35%～30.47%と比べると，実測で得られたCVの範囲はほぼ一致していた。従って，繰り返し精度の確認試験においては，ポアソン分布により理論的にCVが取り得る範囲と同等の範囲が実測値により得られており，理論的な変動以外に，測定方法に由来する追加的変動の寄与は限定的であったと考えられた。またCVの評価の際に必要な標本サイズはn=5以上と考えられた。実測定データのCVがより大の場合は，測定方法に由来する追加的変動の寄与も想定されるため，必要に応じて標本サイズを大に見直すことも考えられる。

3.4　実測定における精度の評価

実務的な測定を想定して2回測定（標本サイズn=2）の平均値を採用する場合に，値が95%の確率で取り得る範囲は，**Fig. 4**のn=2の場合に相当し，ポアソン分布の平均m=30に対して74.7%～125.3%（22.4～37.6）であった（ここでは系統誤差による低下は考慮せず）。これが10倍希釈試料1 mLでコロニー数30付近における測定結果である場合，22～38 CFU/mLの10倍で実濃度220～380 CFU/mLと推定されることになり，基準値800 CFU/mLを大きく下回っていることは明らかであるため，基準適合判断において支障はない。一方で，範囲の上限が基準値ぎりぎりとなる具体例として，ポアソン分布の平均m=

68の場合，正規分布近似により $n=2$ の平均値は N（コロニー数平均68，分散34）に従い，取り得る値の範囲が83.2%～116.8%（コロニー数56.6～79.4）となる。これが10倍希釈試料の測定結果である場合，57～79 CFU/mLの10倍で実濃度570～790 CFU/mLと推定され，基準値ぎりぎりとなる。このため基準値800 CFU/mLを95%の確率で下回るためには，例えば15%以上の余裕を持って低濃度側の680 CFU/mL以下で水質管理を行うことが考えられる。また，例えば標本サイズを $n=3$ に増やせば680 CFU/mLを700 CFU/mLに緩めることができる等，必要に応じて繰り返し測定数を増やすことで精度を上げて管理に反映することも可能ではある。しかしながら，実際には，理論的な分布の変動よりも，流入水質や処理・消毒状況の変化に伴う変動の方が対数スケールで発生してはるかに大であると考えられることから，水質測定の精度をむやみに上げることよりも，より低い濃度を念頭に水質管理する方が現実的な対応と考えられる。

このように，実試料における測定値の変動を踏まえると，基準値を少し下回る濃度付近でも基準値超過の測定結果（偽陽性）が得られる可能性がある。逆に基準値を少し超えていても，変動により基準値未満の測定結果（偽陰性）が得られる可能性もある。これらの点への懸念より，「偽陽性（偽陰性）の可能性を考慮して，基準値を変動幅の分だけ高めに（低めに）設定すべき。」との考えもありうる。しかしながら，下水処理水や排水の大腸菌濃度の基準設定においては，これまでの大腸菌群数の基準値を，相当する大腸菌数に置き換えるものであり，基準の強化や緩和ではないため，追加的に変動幅への考慮を導入する合理性はないと考えられる。つまり，従来の大腸菌群数の基準値も同様に偽陽性・偽陰性の可能性も含めて3,000個/mLに設定されていたものと考えると，今回の大腸菌数への置き換えにおいて，追加的に変動幅へ考慮を導入して低めまたは高めに設定する意義は見いだしがたいものと考えられた。

また，本論文では，公定法として法令に規定する測定方法として，基準適合判断の目的を達成できる範囲で最小限の要求にとどめるのが合理的との考えに基づき，10倍希釈での測定のみで判断する前提で評価を行った。一方で，基準適合の判断だけでなく，水質データの取得や下水の処理・消毒の運転管理への反映等のために，より正確な定量値を得ることを測定目的とする場合は，必要に応じて複数の希釈段階の設定や繰り返し測定数の増加等により，目標とする精度を考慮した測定を行うことができる。

3.5　測定における難易度およびコスト面での導入可能性の考慮

(1) 難易度

特定酵素基質培地を用いた大腸菌の測定法として，混釈平板法の試験操作の難易度については，2.4(2)でも記述したとおり，現行基準として広く実施されている大腸菌群数の測定法（デソオキシコール酸塩培地による混釈平板法）と同程度と考えられ，導入の支障となることは想定しがたい。

(2) コスト面

コスト面で主に考慮するものとしては，労務費と消耗品・装置費が考えられる。労務費は，試験操作の作業量に影響され，消耗品・装置費は，培地やシャーレ等の試薬・器材類の価格および消費量，専用の分析装置の必要性等に影響される。

既往の情報整理資料[20]に基づき，平板法の二種類（混釈平板法とメンブレンフィルター法）で検討すると，参考作業時間として混釈平板法が21分/検体，メンブレンフィルター法ではそれにろ過作業時間が追加とされている。混釈平板法の操作は従来の大腸菌群数の測定とほぼ同様であることも考慮すると，労務費の観点で，混釈平板法の採用による大幅な費用増大や導入支障は考えにくい。

同様に，培地やシャーレ等の費用は，希釈を3段階と想定した場合で，混釈平板法で約400円/検体（培地約254円，シャーレ約144円），メンブレンフィルター法ではそれにメンブレンフィルターのコストが追加で合計約1,010円/検体とされている[20]。従来の大腸菌群数測定と比べると，培地が異なるため培地費用部分の増加はやむを得ないが（製品により異なるが平均で2倍程度のオーダー），それ以外の費用については同等である。また，従来の大腸菌群数測定と同じ設備で実施可能なため設備費の増加はなく，消耗品・設備費として，混釈平板法の採用による大幅な費用増大とはならない。

以上より，コスト面として，労務費（作業時間に関連）はほぼ変わらず，消耗品・設備費（培地費用や分析設備費用に関連）の増大も限定的であるため，混釈平板法の導入の支障となることは想定しがたい。

(3) 統合的考察

上述のとおり，特定酵素基質培地の混釈平板法による大腸菌測定法の導入可能性について，難易度およびコスト面を考慮した結果，現行基準で広く実施されている大腸菌群数の測定から大幅な増大はなく，導入において問題ないと考えられた。

4. 結　　論

本論文では，特定酵素基質培地を用いた混釈平板法による大腸菌の測定方法の精度確認方法について，組成の異なる 5 種類の培地を対象とした，回収率試験および 3 種類の希釈水を用いた繰り返し精度試験の実測定データに理論的検討を加え，公定法として求められる性能の観点より考察した。以下に得られた結果を示す。

(1) 繰り返し測定データとして，回収率試験および繰り返し精度試験のデータ（標本サイズ 5，標本数 45 組）に基づき測定値の統計分布を検討したところ，1 標本を除きすべての標本の分散指数 D^2 は自由度 4 の χ^2 分布の上側 95% 値を下回ったことから，ポアソン分布からの有意な乖離はほぼ見られなかった。

(2) 同データに基づき，5 種類の培地の結果を統合したデータ（標本サイズ 25，標本数 9 組）のすべての標本の分散指数 D^2 は自由度 24 の χ^2 分布の上側 95% 値を下回ったことから，組成の異なる培地の間の測定結果に顕著な差異は見られなかった。

(3) 同データに基づき，測定値の分散状況について過分散係数 K を用いて評価したところ，過大分散（$K>1$）よりも過小分散（$K<1$）が多い傾向であったが，45 組すべての標本の K の値は理論的分布の 95% の統計的ばらつきの範囲に収まり，理論的 50% 値は過小側であったことから，測定値がポアソン分布に従う場合でも確率的に発生しうる程度の妥当な分散状況であると考えられた。

(4) 同データに基づき，測定回数（標本サイズ）と繰り返し精度（変動係数 CV）との関係を検討したところ，CV が 95% の確率で取り得る値の範囲について，χ^2 分布近似による計算がポアソン分布乱数による数値計算の結果とほぼ一致し，実測定データの CV の範囲 6.43%～29.6% も精度目標の 30% 以下を達成するとともに分布近似の計算結果の範囲とほぼ一致していたことから，理論的な変動以外に，測定方法に由来する追加的変動の寄与は限定的であったと考えられた。

(5) 回収率試験データ（標本サイズ 15，標本数 5 組）に基づき，測定回数（標本サイズ）と回収率（真度）の精度との関係を検討したところ，回収率が 95% の確率で取り得る値の範囲について，正規分布近似による計算がポアソン分布乱数による数値計算の結果とほぼ一致したが，実測定データの回収率の範囲 80.7%～93.5% は精度目標の 70%～120% は達成しつつも分布近似の計算結果の範囲よりも下方にシフトしており，偽陰性による系統誤差（回収率が 100% より低い）が考えられた。

(6) 回収率試験の目標精度 70%～120% の評価に必要な標本サイズ n について検討したところ，偶然誤差の影響に関しては理論的計算としては $n=3$ 以上で目標範囲内に収まるが，偶然誤差の影響を抑制して系統誤差を評価する観点からは $n=5$ でも影響が残り，本論文の測定で採用した $n=15$ 程度でより明確に評価できると考えられた。

(7) 繰り返し精度試験の目標精度 30% 以下の評価に必要な標本サイズ n について検討したところ，統計的ばらつきの観点では $n=5$ 以上で目標精度がほぼ達成できるが，測定方法に由来する追加的変動の寄与等により CV がより大となる場合は，n をより大に見直すことも考えられる。

(8) 回収率試験の計算結果（分布の近似による）に基づき，水質管理の実測定を想定した 10 倍希釈試料 1 mL での 2 回測定（標本サイズ 2）の平均値の精度を検討したところ，コロニー数 30 付近の場合，ポアソン分布の 95% 変動範囲として実濃度 220～380 CFU/mL と推定されるため基準値 800 CFU/mL への適合判断に支障ないが，基準値ぎりぎりの例としてコロニー数が 68 では実濃度 570～790 CFU/mL と推定されることから，95% の確率で基準値達成とするためには例えば 15% 以上の余裕を持って低濃度側の 680 CFU/mL で水質管理することが考えられた。また，混釈平板法による大腸菌測定の難易度やコスト面について，従来の大腸菌群数測定法から大幅な増大はなく，現実的な導入可能性に問題はないと考えられた。

以上，可能な限り科学的・定量的な根拠に基づいて論じることに取り組んだが，項目によっては厳密な形で整理することが難しく，やや定性的な表現とならざるを得ないものもあった。科学的知見に基づく成果を，現実の行政・実務に実装するためには，このような現実的制約にどのように対処するかという観点も不可欠であり，本論文では，これらの点にも着目して技術的・現実的な方法論として整理を試みた。実試料における微生物・水質の多様性や変動，測定法における多様な技術の継続的発展等の中で，本論文が扱えているのはその一部に過ぎないが，水質管理の向上・合理化の一助として資することができれば幸いである。

謝　辞

本研究は，国土交通省「国における下水道技術検討タスクフォース」の連携テーマ「処理水の安全性向上検討」の活動の一環として実施した。メンバーとして，著者らに加え，国土交通省水管理・国土保全局下水道

部流域管理官付（令和５年度までの研究実施当時）の担当各位にも研究成果の行政への反映等において貢献いただいたことに謝意を表します。また，下水試料の提供に協力いただいた自治体の下水道管理者にも謝意を表します。

参 考 文 献

1）国立印刷局：水質汚濁防止法施行令及び建築基準法施行令の一部を改正する政令（一），下水道法施行令の一部を改正する政令（二），官報第 1134 号，2024 年 1 月 4 日（2024）
2）国立印刷局：水質汚濁防止法施行規則等の一部を改正する省令（環境四），官報第 1148 号，2024 年 1 月 25 日（2024）
3）国立印刷局：下水の水質の検定方法等に関する省令及び下水の処理開始の公示事項等に関する省令の一部を改正する省令（国土交通・環境一），官報号外第 55 号，2024 年 3 月 13 日（2024）
4）国土交通省：大腸菌数の検定方法について，令和 6 年 3 月 29 日 国土交通省水管理・国土保全局下水道部流域管理官付課長補佐事務連絡，https://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/content/001749363.pdf, 2024 年 6 月 20 日アクセス（2024）
5）環境省：水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件，令和 3 年 10 月環境省告示第 62 号，2021 年 10 月 7 日（2021）
6）環境省：令和 5 年度　大腸菌群数の排水基準の見直しに係る検討会の開催について，https://www.env.go.jp/press/press_02036.html, 2024 年 6 月 20 日アクセス（2023）
7）国土交通省：下水道における水系水質リスク検討会，https://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/mizukokudo_sewerage_tk_000447.html, 2024 年 6 月 20 日アクセス（2022）
8）環境省：水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン，水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成 24 年 9 月 6 日健水発 0906 第 1 号別添，最終改正：平成 29 年 10 月 18 日薬生水発 1018 第 1 号），https://www.env.go.jp/content/900546879.pdf, 2024 年 6 月 20 日アクセス（2017）
9）ISO: ISO/TC 147（Water quality）/SC 4（Microbiological methods），https://www.iso.org/committee/52944.html, 2024 年 6 月 20 日アクセス（2024）
10）山下洋正，諏訪守，植松龍二，重村浩之，李善太：公共用水域における消毒耐性病原微生物の管理技術に関する研究（消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案），令和 3 年度下水道関係調査研究年次報告書集，土木研究所資料第 4448 号，pp. 169－193（2024）
11）ISO: Water quality – Sampling for microbiological analysis, Annex A（informative）, ISO 19458（2006）
12）ISO: Water quality – Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods, Annex A（informative）, ISO 13843（2017）
13）R. A. Fisher, H. G. Thornton and W. A. Mackenzie: The accuracy of the plating method of estimating the density of bacterial populations, Annals of Applied Biology, Vol. 9, pp. 325–359（1922）
14）A. H. El-Shaarawi, S. R. Esterby and B. J. Dutka: Bacterial density in water determined by Poisson or negative binomial distributions, Applied and environmental microbiology, Vol. 41, No. 1, pp. 107–16（1981）
15）国土交通省：放流水の水質の技術上の基準における大腸菌数の検討，令和 4 年度第 1 回下水道における水系水質リスク検討会，資料 3，https://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/content/001510843.pdf, 2024 年 6 月 20 日アクセス（2022）
16）㈳日本下水道協会：下水試験方法下巻，2012 年版，p. 23 および p. 226（2012）
17）㈳日本水道協会：上水試験方法Ⅳ．微生物編，2020 年版，p. 32（2020）
18）APHA, AWWA and WEF: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition, p. 9–13（2017）
19）諏訪守，李善太，重村浩之：下水試料に対する大腸菌定量手法の評価と下水処理場における大腸菌と大腸菌群の実態調査，下水道協会誌，2019, Vol. 56, No. 676, pp. 85–92
20）国土交通省：放流水の大腸菌数測定法の比較検討，令和 4 年度第 2 回下水道における水系水質リスク検討会，資料 4，https://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/content/001575372.pdf, 2024 年 6 月 20 日アクセス（2022）
21）日本産業標準調査会：統計 ― 用語及び記号 ― 第 2 部：統計の応用，JIS Z8101-2（1999），2015 年 10 月 20 日最終改訂，2020 年 6 月 22 日最新確認（2020）
22）日本産業標準調査会：測定方法及び測定結果の精確さ（真度及び精度）― 第 1 部：一般的な原理及び定義，JIS Z8402-1（1999），2024 年 6 月 20 日最新確認（2024）

Study on a Method for Confirming the Performance of Enumeration Method of *Escherichia coli.* in Sewage Samples by Using Enzyme Substrate Media

Hiromasa Yamashita[1)†], Mamoru Suwa[2)], Manabu Matsuhashi[3)] and Hiroyuki Shigemura[3)]

[1)] Water Quality Research Team, Water Environment Research Group, Public Works Research Institute
（currently belong to Water Supply and Sewerage Department, National Institute for
Land and Infrastructure Management）
[2)] Water Quality Research Team, Water Environment Research Group, Public Works Research Institute
[3)] Wastewater and Sludge Management Division, Water Supply and Sewerage Department,
National Institute for Land and Infrastructure Management

† Correspondence should be addressed to Hiromasa Yamashita:
（Water Quality Research Team, Water Environment Research Group, Public Works Research Institute
（currently belong to Water Supply and Sewerage Department, National Institute for
Land and Infrastructure Management）
E-mail：yamashita-h92ta@mlit.go.jp）

Abstract

In the water quality standards for treated effluent under the Sewerage Act and the effluent standards of the Water Pollution Prevention Act, the water quality item of the hygienic microbiological indicator is changed from the total coliforms count to the *Escherichia coli.* counts. Thus, it is necessary to establish an official enumeration method of Escherichia coli. In this study, we conducted a part of the study on the performance confirmation of the pour plate method using enzyme substrate media. As for the performance of the official method, we examined the recovery rate（trueness）and repeatability, including the effect of difference in the composition of multiple commercial media, in the type of diluted water, and in the concentration of Escherichia coli in the sample, and also examined the applicability of the confirmation method and the technical issues in the practical aspects of measurement.

Key words: *Escherichia coli.*, enzyme substrate media, sewage sample, official enumeration method, performance confirmation