

バラスト水管理システムの承認の際の

生物分析方法(第2回改訂版)

平成 22 年 3 月

財団法人 日本舶用品検定協会

目 次

まえがき

I 背景

1. バラスト水管理条約の概要	3
1. 1 バラスト水管理条約の目的	3
1. 2 条約が要求するバラスト水管理	3
1. 3 条約規則 D-2 バラスト水排水基準	4
2. バラスト水管理システムの承認のためのガイドラインの概要	5
2. 1 ガイドラインの目的	5
2. 2 ガイドラインの構成	5
2. 3 ガイドラインの要求事項	6
2. 4 ガイドラインの品質管理要求	8
3. 本書の概要	9
3. 1 目的	9
3. 2 構成	9
3. 3 定義	10

II 生物分析方法

1. 品質保証及び品質管理要求事項	12
1. 1 試験全体の品質保証及び品質管理要求事項	12
1. 2 細菌分析に関する品質管理	14
2. サンプリングの準備	15
2. 1 サンプリング設備の準備	15
2. 2 サンプル用容器の準備	15
3. サンプリング	16
3. 1 予備排水	16
3. 2 細菌のサンプリング	16
3. 3 S サイズグループのサンプリング	17
3. 4 参考情報としての目視観察	18
3. 5 水質分析用サンプルのサンプリング	18
3. 6 水質計測用サンプルのサンプリング	18
3. 7 水質計測項目のクロスチェック用サンプルのサンプリング	19
3. 8 水質計測	19
3. 9 L サイズグループのサンプリング	19
3. 10 サンプリング後の整理（次のサンプリングに向けて）	21
4. 分析方法	22
4. 1 L サイズグループ	22
4. 2 S サイズグループ	28
4. 3 細菌	32
4. 4 水質	41

III 附属資料

資料 1	ISO /IEC 17025 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項 (仮和訳)	
		4 3
資料 2	サンプリングノート及び機材リストの参考例	6 7
資料 3	分析ノート及び分析機材リストの参考例	6 9
資料 4	分析参考データ	
1.	試験調査船試験結果	7 5
2.	一般商船試験結果	8 5
資料 5	本生物分析方法に関する良くある質問と回答例	9 6
資料 6	染色法と viability 判定法 (参考)	1 0 0

バラスト水管理システムの承認の際の

生物分析方法(第2回改訂版)

まえがき

船舶バラスト水による水生生物の移動の防止を目的とする“バラスト水管理条約”は、2004年2月に国際海事機関(IMO)で“船舶バラスト水及び沈殿物の制御及び管理のための国際条約¹⁾”として採択された。この条約の附属書規則D-3(バラスト水管理システムの承認要件)では、条約を遵守するために重要なアイテムであるバラスト水管理(処理)システムは、IMOが策定したガイドラインを考慮し、主管庁(日本では国土交通省)に承認されることが必要と規定されている。このIMOが策定したガイドラインが“バラスト水管理システムの承認のためのガイドライン²⁾”であり、2005年7月にIMOで開催された海洋環境保護委員会(MEPC)第53期会合で採択され、今後、主管庁によるバラスト水管理システムの承認活動が可能となった。ただし、このガイドラインには、バラスト水管理システムの承認行為の根幹となる水生生物数の具体的な分析方法が定められておらず、これらは、主管庁の決定要件となっている。

この“バラスト水管理システムの承認の際の生物分析方法”は、これら背景に基づき、バラスト水管理システムの承認作業に不可欠な水生生物の分析方法を具体的に定めたものである。本書は、2部構成となっている。“I 背景”は、“バラスト水管理条約”及び“バラスト水管理システムの承認のためのガイドライン”から、“II 生物分析方法”の理解に必要な内容を抜粋している。“II 生物分析方法”は、“I 背景”の要求にもとに基づき具体的な分析方法を定めたものである。

本書は、平成18年3月に最初に作成され、その後の国際的な動向を踏まえて、平成19年3月に第1回目の改訂が行われた。今回の第2回改訂は、その後の技術確認に伴って行うものである。また、今後の技術革新によって、新たな分析技術の開発も期待される。このような新技術に関しては、常に情報収集をはかり、有効性が確認された場合には、本生物分析方法を改正したい。

なお、本生物分析方法の内容等に関する質問は、(財)日本舶用品検定協会³⁾にお問い合わせいただきたい。

本生物分析方法は、サンプリング及び分析方法の実行性等の確認のため、調査研究を実施した上で作成している。調査研究には、東京海洋大学及び商船三井(株)の多大なる御協力を頂いた。関係各位に厚く謝意を表します。

平成22年3月
(財)日本舶用品検定協会

¹⁾ International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments

²⁾ Resolution MEPC.125(53), Guidelines for Approval of Ballast Water Management Systems (G8)、2008年10月のMEPC第58期会合において、活性物質を使用するバラスト水管理システムの排水毒性の環境影響評価を追加する改訂決議MEPC.174(58)³⁾が採択されている。

³⁾ 〒102-0094 東京都千代田区紀尾井町3-32、TEL:03-3261-6611、(財)日本舶用品検定協会調査研究部

本生物分析方法は、下記の委員会の基で作成された。

“バラスト水管理システムの承認の際の生物分析方法”
委員会 名簿（敬称略）

委員長

東京大学アジア生物資源環境研究センター教授 福代 康夫

委員

東京海洋大学海洋科学部教授 石丸 隆

東京大学海洋研究所教授 木暮 一啓

協力者

(社) 日本海難防止協会海洋汚染研究部 和田 雅人

東京大学アジア生物資源環境研究センター 都丸 亜希子

東京大学アジア生物資源環境研究センター 大村 卓朗

東京大学アジア生物資源環境研究センター 佐藤（現姓：大村） 加奈

(株) 水圏科学コンサルタント企画開発室 吉田 勝美

(株) 水圏科学コンサルタント技術部 久城 圭

(株) 水圏科学コンサルタント技術部 豊田 圭太

関係官庁

国土交通省海事局安全基準課課長補佐 村岡 英一

事務局

(財) 日本舶用品検定協会技術部 久野 勝秀

第1回改訂版の作成は、下記の委員会の基で行われた。

委員長

東京大学アジア生物資源環境研究センター教授 福代 康夫

委員

東京海洋大学海洋科学科教授 石丸 隆

東京大学海洋研究所教授 木暮 一啓

海洋政策研究財団主任研究員 華山 伸一

(株) 水圏科学コンサルタント技術部長 吉田 勝美

事務局

(財) 日本舶用品検定協会技術部 田口 史樹

第2回改訂版の作成は、下記の委員会の基で行われた。

委員長

東京大学 アジア生物資源環境研究センター長教授 福代 康夫

委員

東京海洋大学 海洋科学部海洋環境学科教授 石丸 隆

東京大学海洋研究所海洋生態系動態部門・微生物分野教授 木暮 一啓

広島大学 大学院生物圏科学研究科准教授 小池 一彦

東京大学 アジア生物資源環境研究センター特任助教 大村 卓朗

(株) 水圏科学コンサルタント事業本部長 吉田 勝美

芙蓉海洋開発 (株) 環境システムセンター技術部長 植村 泰治

事務局

(財) 日本舶用品検定協会調査研究部 荒木 康伸

I 背景

1. バラスト水管理条約の概要

1.1 バラスト水管理条約の目的

“船舶バラスト水及び沈殿物の制御及び管理のための国際条約”（以下、バラスト水管理条約）は、主に船舶バラスト水及びバラストタンク内沈殿物の制御及び管理を通じて、有害水生生物及び病原体の移動により発生する環境、人間の健康、財産及び資源への危険を防止、減少及び完全に除去することに加え、当該制御による好ましくない副次的影響を回避し、関連する知識の進展及び技術の開発について奨励することを目的としている。

1.2 条約が要求するバラスト水管理

バラスト水管理条約では、基本的にバラスト水を保持する全ての国際航行船舶に対して、次のバラスト水管理を要求している。

- バラスト水管理計画の策定と所持及び実施
- バラスト水管理記録簿の所持及び記載
- バラスト水管理の実施

要求されるバラスト水管理の実施時期は、各船舶のバラスト水容積によって異なり、外洋におけるバラスト水交換、あるいは 1.3 章に記す条約規則 D-2 バラスト水排水基準を満たすバラスト水管理が要求されている。なお、順次 D-2 基準の適用範囲が拡大され、条約が発効した場合には、2016 年以降は全ての船舶が D-2 基準以上のバラスト水管理を義務づけられる。

- バラスト水を保持する区画からの沈殿物の除去あるいは処分

1.3 条約規則 D-2 バラスト水排水基準

条約規則 D-2 バラスト水排水基準（以下、D-2 基準）は、2009 年から順次適用され、2016 年以降は基本的にバラスト水を保持する全ての国際航行船舶に適用される。すなわち、いずれはこの基準以上のバラスト水管理が国際航行全船舶に義務づけられ、よって、この基準値を達成可能な水生生物の除去、殺滅、不活性化技術、つまりバラスト水処理装置によるバラスト水管理が必要となる。

D-2 基準は、次の D-2.1 及び D-2.2 からなる。

D-2.1 この規則に従ってバラスト水管理を実施する船舶が排出しうる生物量は、最小サイズ⁴50 μ m 以上の生物（以下、L サイズグループ）については、1m³ 当たり生きた生物⁵数 10 個体未満、また、最小サイズ 50 μ m 未満で 10 μ m 以上の生物（以下、S サイズグループ）については、1 ml 当たり生きた生物数 10 個体未満としなければならない。

D-2.2 人間の健康基準としての指標微生物は、次の濃度としなければならない。

- .1 毒素産生性コレラ菌（O-1 及び O-139）については、1 cfu/100ml 未満（cfu = colony forming unit）、あるいは動物プランクトンについては 1 cfu/1g 湿重量未満
- .2 大腸菌については、250 cfu/100 ml 未満
- .3 腸球菌については、100 cfu/ 100ml 未満

⁴本書Ⅱ部 4.1.2 及び 4.1.3 項参照

⁵本書Ⅱ部 4.1.4 項参照

2. バラスト水管理システムの承認のためのガイドラインの概要

2.1 ガイドラインの目的

2005年7月に採択された“バラスト水管理システムの承認のためのガイドライン”（2008年10月に改訂、以下、G8）は、主管庁あるいは主管庁が指定する機関が、承認申請されるバラスト水管理システムの性能がD-2基準を満たすか否かを検査するために策定されたものである。同時に、システムの製造者及び船主が、システムを承認申請する際に要求される内容を確認することを可能にしている。

なお、G8では、化学薬品等の活性物質を使用する管理システムの場合には、IMOが別途定めた“活性物質を使用するバラスト水管理システムの承認のための手順”（以下、G9）⁶にしたがってIMOの承認を取得することも求めている。

2.2 ガイドラインの構成

G8は本文と4つの附属書からなり、本文は序文、背景、定義の他に、型式承認を取得するために必要なバラスト水管理システム等に関する技術仕様と必要書類、主管庁が行う型式承認と承認書の内容、サンプリング設備の設置要求、管理システムの設置検査で構成されている。また、附属書はPart 1システムの文書による事前審査仕様、Part 2システムの承認試験及び性能仕様（陸上試験、船上試験）、Part 3システムの承認環境試験仕様、Part 4承認試験のための水生生物サンプル分析方法で構成されている。

なお、附属書Part 4の承認のための水生生物サンプル分析方法は、分析方法に関する基本概念を規定するにとどまっており、具体的な分析方法については記述されていない。

⁶ Resolution MEPC.126(53), Procedure for Approval of Ballast Water Management Systems that Make Use of Active Substances (G9)、後に Resolution MEPC.169(57)で改訂

2.3 ガイドラインの要求事項

G8 は、バラスト水管理システムの承認に関し、適切な設計、構造（サンプリング設備を含む）、作動パラメーター及び性能（水生生物に対する処理効果）について、事前書類審査、バラスト水管理システムの承認試験（陸上試験及び船上試験）、及び環境試験でその性能を証明することを要求している。各審査及び試験の要求事項の概要は、次の通りである。なお、詳細に関しては、G8 原文を参照されたい。

2.3.1 事前書類審査

バラスト水管理システムが後記の承認試験を受けるのに相応のシステムであるか、製造者が提案する試験要件及び方法が適切であるかを審査するものである。

提出書類には、技術マニュアル、バラスト水管理システムの図面、船舶のバラスト水管理計画との関連、環境及び公衆衛生への影響を最低限含まなければならない。

2.3.2 バラスト水管理システムの承認試験（陸上試験及び船上試験）

試験は、国際標準に基づいた適切な品質管理の基で実施しなければならない。試験は、船上試験と陸上試験で構成される。

(1) 船上試験の要求事項

1) 試験サイクル

試験は対象船舶の通常のバラスト水量で行う。一つのサイクルにはバラスト水漲水、保管、排水までの一連の作業を含まなければならない。

2) 試験の有効基準

各サイクルの試験は、漲水時の水生生物濃度が D-2 基準の D-2.1 規定値の 10 倍以上で、かつ排水時の未処理バラスト水を保管するバラストタンク（以下、対照タンク）の水生生物濃度が D-2.1 規定値以上である場合のみ有効試験とみなされる。

3) 承認基準：

処理したバラスト水の排水時の水生生物濃度が、3 回の連続した有効試験において D-2 基準を満たした場合のみ承認される。

4) サンプル数

性能評価に必要なサンプル数は、対照タンクは漲水時及び排水時にそれぞれ 3 サンプル（初期、中間、末期）で、処理したバラスト水に対しては排水期間中に 9 サンプル（初期×3 サンプル、中間×3 サンプル、末期×3 サンプル）である。

5) サンプル容量等

サンプル容量は、L サイズグループの水生生物については最低 1m³、S サイズグループの水生生物については最低 1ℓ で、細菌用としては最低 500ml である。また、L サイズグループの生物、及び S サイズグループの生物を濃縮する場合は、それぞれ開口径が網目の対角線長で 50µm 未満と 10µm 未満の網地を使用しなければならない。

6) 水質測定項目

水質測定に関しては、各試験サイクルで塩分、水温、粒子状有機炭素及（以下、POC）及び総浮遊物量（以下、TSS）の計測が要求されている。

(2) 陸上試験の要求事項

陸上試験は、地域に適用される検疫、排出規定を考慮した上で、以下の規格に従い実施しなければならない。

1) システムの縮尺規定

陸上試験は、バラスト水管理システムの定格処理能力（TRC）、あるいはG8で定める縮尺規定で縮小したシステムで実施する。

2) 試験サイクル及び回数

試験サイクルには、ポンプによるバラスト水漲水、バラストタンクを模擬した遮光タンク内での最低5日間の保管、ポンプによるバラスト水排水、及びバラスト水管理システムによるバラスト水処理を含まねばならない。また、バラスト水処理を実施しない対照タンクでの試験も同時に実施しなければならない。試験回数は、塩分で規定される海水（32 PSU 以上）、汽水（3 から 32 PSU 未満）、陸水（3 PSU 未満）の試験区の内2つを選択し、各々5回の試験サイクルを実施せねばならず、合計で10回の試験が要求されている。

3) 試験水

2つの試験区における試験時の塩分は、10 PSU 以上隔たっていなければならない。溶存態有機炭素（以下、DOC）、粒子態有機炭素（POC）、総浮遊物質量（TSS）を一定濃度以上にした環境下で試験することも要求されている。また、試験水は、一定濃度以上の水生生物濃度と種数が含まれていることも要求されており、Lサイズのグループの水生生物については3つの異なる分類群5種以上の生物が 10^5 個体/ m^3 以上、Sサイズのグループの水生生物については3つの異なる分類群5種以上の生物が 10^3 個体/ ml 以上、さらに、従属栄養細菌の濃度が 10^4 個 cfu/ml 以上と規定されている。

4) 試験の有効基準

3)の要件を満たした試験水を用いて、対照タンクの排水時の水生生物濃度がD-2基準のD-2.1規定値の10倍以上であれば有効試験として認められる。

5) 承認基準

各試験サイクルにおける処理水の排水時の水生生物濃度が、平均でD-2基準を達成していた場合に、適切な性能を持つシステムと見なされる。

6) サンプル数

サンプルは、処理対象水に関しては処理装置の流入直前、直後及び排水時、対照タンク水に関しては流入時と排水時に、それぞれ3個収集しなければならない。

7) サンプル容量等

Lサイズグループのサンプル容量は、流入時が20ℓ以上、処理水（処理直後と排水時）は $1m^3$ 以上である。

Sサイズグループのサンプル容量は、流入時が1ℓ以上、処理水（処理直後と排水時）が10ℓ以上である。

細菌用としては、流入時及び処理水（処理直後と排水時）共に、500ml以上である。

8) 分析時間

サンプルは、収集後速やかに分析しなければならない、6時間以内に分析を終了するか、あるいは適切な分析が実施可能となる状態にしなければならない。

9) 水質測定項目

環境パラメータとしての水質は、pH、水温、塩分、溶存酸素（以下、DO）、TSS、DOC、POC 及び濁度（以下、NTU⁷）の各項目をサンプル収集時に計測する。

10) その他

サンプル分析方法の規定（G8 Part 4）では、サンプル収集、保管及び分析方法に関して、生物の検出、同定、及び生死判定方法を含む標準的方法を用いて実施し、試験計画書及び報告書にその方法を明記することが要求されている。

2.3.3 環境試験

バラスト水管理システムの電気及び電子部品に関しては、承認された試験場において、振動試験、温度試験、湿度試験、電力供給変動、傾斜試験等を実施して、いずれにおいても正常に作動することを証明しなければならない。

2.4 ガイドラインの品質管理要求

G8 は、試験を実施する試験機関に関して、主管庁が認める国際標準に基づいた適切な品質管理手段を実行している機関であることを要求している。また、試験機関は、品質管理計画書（QMP）及び品質保証プロジェクト計画書（QAPP）を作成することになる。

⁷ Nephelometric Turbidity Unit

3. 本書の概要

3.1 目的

G8 では、バラスト水管理システムの承認に関する手順及び申請者に対する要求事項を詳述している。ただし、D-2 基準に対する適合を判定する水生生物採集（以下、サンプリング）及び水生生物の分析方法に関しては、生物の検出、同定、及び生死判定方法を含む標準的方法を用いて実施することと、その方法が試験計画書及び報告書に明記されることを要求するに留まり、具体的な方法に関しては主管庁の決定事項となっている。また、現時点では国際的な標準方法は確立されておらず、各種文献⁸⁻¹⁵を参考にして標準的な分析方法を定めることとされているにすぎない。

よって、本書第Ⅱ部の生物分析方法は、G8 で要求されているサンプリング及び分析方法に関して、我が国における現時点での標準的方法を定める目的でまとめたものである。

3.2 構成

本書第Ⅱ部の生物分析方法は、船上試験及び陸上試験で実施するサンプリング、及び分析方法に関する我が国における現時点での標準的な方法を定めている。記載対象は、G8 で規定されている水生生物と水質分析項目である。

なお、生物分析方法に定める内容は、現時点における標準的方法として整理している。今後の技術革新に伴って適宜修正と追加される性格のものである。

8-15

8 The Handbook of Standard Method For the Analysis of Water and Waste Water

9 ISO standard methods

10 UNESCO standard methods

11 World Health Organization

12 American Society of Testing and Materials (ASTM) standard methods

13 U.S.EPA standard methods

14 Research papers published in peer-reviewed scientific journals

15 MEPC paper

本生物分析方法における用語の定義を以下に示す。なお、特段の規定が無い内容に関しては、“バラスト水管理条約”と“バラスト水管理システムの承認のためのガイドライン”の定義を適用する。

(1) 生きて生物 (“バラスト水管理条約” では *viable organisms*)

形態、運動性、細胞内活性状態が正常な状態と確認される生物、あるいは増殖至適環境下において再生産及び繁殖が可能と確認される生物¹⁶。

(2) 最小サイズ (“バラスト水管理条約” では *minimum dimension*)

生物の幅、長さ、厚みのうち最も小さいもののサイズ。群体を形成する生物については、その構成個体・細胞を1個体として扱い、個体別の幅、長さ、厚みのうち最も小さいサイズ¹⁷。

(3) 細菌

D-2 基準の D-2.2 に規定されている *Escherichia coli* は大腸菌、*Intestinal Enterococci* は腸球菌、*Toxiogenic Vibrio cholerae* (O1 and O139) は毒素産生性コレラ菌とし、G8の2.3.20に規定されている Coliformは大腸菌群、*Enterococcus group* は腸球菌グループ、*Vibrio cholerae* はコレラ菌、*Heterotrophic bacteria* は従属栄養細菌と邦訳し、以下のように定義する。これらの一般的な定義は、国内外の試験法¹⁸⁻²⁵等を参照すること。

大腸菌および大腸菌群は酵素基質法により検出されるものとする。大腸菌群はβ-ガラクトシダーゼ活性を指標とし、大腸菌はβ-グルクロニダーゼ活性で同定する。

腸球菌グループは、アジ化ナトリウムでグラム陰性菌の増殖を抑制した培地上の集落の中で、塩化トリフェニルテトラゾリウム (TTC) を還元する、もしくは、β-D-グルコシダーゼ活性がある細菌と定義する。腸球菌は、これらの中で、6.5%塩化ナトリウム濃度、45±0.5°Cの温度条件で増殖するものとする。

コレラ菌は、グラム陽性菌の増殖を阻害するアルカリ性の培地上にスクロースまたは硫黄を利用し好氣的に集落を形成する菌群で、これらの菌のうち無塩アルカリペプトン水で増殖可能なものと定義する。毒素産生性コレラ菌は、これらの中でO抗原としてO1もしくはO139を有するものとし、本方法ではコレラエンテロトキシン (*cholera enterotoxin*) 陽性の有無は問わない。

従属栄養細菌 *Heterotrophic bacteria* は、海水 (人工海水) および精製水に有機栄養物を比較的低濃度を含む培地を用いて 20 - 28°C で 5 - 7 日間培養したとき、培

¹⁶ 本書Ⅱ部 4.1.4 項参照

¹⁷ 本書Ⅱ部 4.1.2 及び 4.1.3 項参照

18-25

18 Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, Md.

19 Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

20 Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, D.C.

21 International Organization for Standardization.

22 Standard methods for examination of dairy products. American Public Health Association, Washington, D.C.

23 Standard methods for examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, D.C.

24 日本薬学会編 (2005) 衛生試験法・注解 2005 金原出版株式会社

25 厚生労働省監修 (2004) 食品衛生指針 微生物編 社団法人 日本食品衛生協会

地上に集落を形成する全ての微生物と定義する。

(4)培養種

陸上試験における下記の試験水要件を満たすために、試験水に添加される人工的に培養された生物種を指す。

- .1 最小サイズで 50 μm 以上の生物は、少なくとも 1 立方メートルあたり 10^5 以上の個体の総濃度を有する。また、少なくとも 3 つの異なる phylum/division で、少なくとも 5 種から構成される。
- .2 最小サイズで 10 μm 以上 50 μm 未満の生物は、ミリリッター当たり少なくとも 10^3 以上の個体の総濃度を有する。また、最低 3 つの異なる phylum/division で、少なくとも 5 種から構成される。

なお、最小サイズ 10 μm 以上 50 μm 未満の生物として、培養種を添加する場合には、添加前 6 時間以内に 10 μm 以上 50 μm 未満の個体が含まれていること、及び光学顕微鏡下で添加する培養種が単一種で構成されていることを確認しなければならない。

II 生物分析方法

本生物分析方法の部に記載されている方法は、バラスト水処理装置の性能評価などバラスト水管理条約に関するプランクトン等の水生生物と細菌のサンプリング及び分析方法として、現時点での我が国における標準的な方法である。ただし、他の方法の使用を否定排除するものではない。もし、申請者が適切と考える方法があり、その方法での試験を希望する場合には、(財)日本舶用品検定協会に相談して頂きたい。

1. 品質保証及び品質管理要求事項

1.1 試験全体の品質保証及び品質管理要求事項

G8 では、試験機関に対し、国際標準に従った品質管理の方策を保持することを求めている。

G8 原文から要求事項を以下に抜粋した。

2.1 Quality Assurance and Quality Control Procedures

品質保証及び品質管理

2.1.1 The testing body performing the tests should have implemented appropriate quality control measures in accordance with recognized international standards acceptable to the Administration.

試験を実施する試験機関は、主官庁が認めた国際標準に従い履行される、適切な品質管理の方策を保持すること。

2.1.2 The approval testing process should contain a rigorous quality control/quality assurance program, consisting of:

認定試験工程は、次から構成される品質管理/品質保証プログラムを含むこと。

.1 Both a Quality Management Plan (QMP) and a Quality Assurance Project Plan (QAPP). Guidance on preparation of these plans, along with other guidance documents and other general quality control information are available from appropriate international organizations (ISO17025).

品質管理計画書 (QMP) 及び品質保証プロジェクト計画書 (QAPP) .

これらの計画書の準備に関する指導要領は、他の指導要領の書類及び他の一般的な品質管理の情報と併せ、適切な国際機関 (ISO17025) より入手可能である。

.2 The QMP addresses the quality control management structure and policies of the testing body (including subcontractors and outside laboratories).

QMP は、品質管理の構成及び試験機関 (下請け契約者及び外部の実験場を含む) の方針が取り扱われていること。

.3 The QAPP is a project specific technical document reflecting the specifics of the BWMS to be tested, the test facility, and other conditions affecting the actual design

and implementation of the required experiments.

QAPP は、試験される BWMS の特性、試験施設、及び実際の設計及び要求される実験の実行に影響するほかの条件を反映したプロジェクト固有の技術文書である。

具体的には、分析機関は、ISO/IEC17025（試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項）に従った、以下に示す品質管理計画書（QMP）及び品質保証プロジェクト計画書（QAPP）を保持すること、及びその運用が求められている。

○品質管理計画書（QMP）：

ISO/IEC17025 で定める下記要求事項について文書化された計画書が必要となる。

4 管理上の要求事項

- 4.1 組織
- 4.2 品質システム
- 4.3 文書管理
- 4.4 依頼、見積仕様書及び契約の内容の確認
- 4.5 試験・校正の下請負契約
- 4.6 サービス及び供給品の購買
- 4.7 依頼者へのサービス
- 4.8 苦情
- 4.9 不適合の試験・校正業務の管理
- 4.10 是正処置
- 4.11 予防処置
- 4.12 記録の管理
- 4.13 内部監査
- 4.14 マネジメント・レビュー

5 技術的要求事項

- 5.1 一般
- 5.2 要員
- 5.3 施設及び環境条件
- 5.4 試験・校正の方法及び方法の妥当性確認
- 5.5 設備
- 5.6 測定トレーサビリティ
- 5.7 サンプルング
- 5.8 試験・校正品目の取扱い
- 5.9 試験・校正結果の品質の保証
- 5.10 結果の報告

また、上記要求事項のうち、「4 管理上の要求事項」（4.1 項～4.14 項）については、ISO9001:2000 の要求事項と一致するため、分析機関が、生物分析の分野で ISO9001:2000 を取得・維持されていれば、既に満足されているものと考えられる。ISO9001:2000 を取得していない試験分析機関については、「4 管理上の要求事項」（4.1 項～4.14 項）について文書された品質管理計画書を作成する必要がある。

なお、「5 技術的要求事項」については、ISO/IEC17025 固有の要求事項のため、5.1 項から 5.10 項について、文書された品質管理計画書を作成する必要がある。

作成にあつては、添付 ISO/IEC17025（試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項 仮和訳）を参照されたい。

○品質保証プロジェクト計画書（QAPP）

本生物分析方法マニュアルが品質保証プロジェクト計画書（QAPP）の一例であるので適宜活用されたい。

なお、生物分析方法に因らない試験分析方法で分析を行う試験分析機関にあつては、別途品質保証プロジェクト計画書（QAPP）の作成が要求される。

1.2 細菌分析に関する品質管理

細菌分析等の微生物試験では、肉眼では見えない大きさの生物を対象とするため、不用意に試料を扱うと汚染や感染の危険が生ずるだけでなく、分析結果にも大きな誤りを招くことがある。また、本試験で計数対象としている細菌のうち D-2 基準の指標細菌は、病原体のバイオセーフティーレベル（BS）分類に従うと、全て BS2 に相当する。このため、WHO の Laboratory Biosafety Manual や国立感染症研究所病原体等安全管理規定等、国内外で公表されているバイオセーフティー指針、または各機関で定められているバイオセーフティーのための指針に従って試験を行うべきである。病原体の感染や汚染は、当該実験者のみならず、他の実験者や周囲の社会に対しても危険を及ぼす可能性があり、絶対に避けなければならない。

微生物試験は微生物実験室（実験室）で行い、BS2 の細菌を扱うために必要な器機類が整備された施設で行なうことが必要である。その施設は、ISO9001 または ISO/IEC17025 を微生物の分析分野で取得しているか、BS2 以上の病原体実験の許可を所属機関から承認されていることが望ましい。

また、実験者および補助作業者は、病原菌に関する知識と技術に習熟しているとともに、接種時から廃棄にいたるまで十分に安全対策に配慮しなければならない。試験実施の際には、病原体危険度を正しく理解し、病原体の取扱いの訓練を充分受けている責任者をおく。責任者は取扱者に適切な助言を与え、取扱者が病原体の取扱いに熟知していない場合は事前に教育と訓練期間を設けなければならない。

2. サンプリングの準備

本章の記載は、G8 船上試験の漲水時と排水時サンプリング、同陸上試験の全てのサンプリングを対象にしている。記載の中に試料容器の個数などが記されている場合、例えば5ℓポリビン6個といった記載は、サンプリング機会1回当たりの個数の量を示したものである。なお、準備すべき機材に関して、IV附属資料にサンプリング機材、L及びSサイズグループ分析機材、細菌分析機材の例を示したので参考として欲しい。

2.1 サンプリング設備の準備

バラスト水管理システムの一部として設置されるサンプリング設備を使用可能な状態とする。なお、サンプリング設備の設計基準に関しては別途定められる予定であるが、バラスト水漲水・排水ラインとサンプリングライン内の流速が同じになる（等速分流）ように留意しなければならない。船上における作業の場合には、必要に応じて乗組員に準備を依頼する。また、サンプリング前には、関連設備を含めて清水等で洗浄した後、乾燥状態にしておく。

2.2 サンプル用容器の準備

サンプル容器の大きさと必要個数は、3回繰り返してサンプリングと分析をしなければならないことに留意して必要総試水量を計算し、予備容器も含めて準備する。Lサイズグループ用としては1m³強タンク（陸上試験の流入水は40ℓ）3個（船上試験の漲水時は1個）、Sサイズグループ用としては1ℓポリビン（陸上試験の処理水は10ℓ）6個（内3本は予備）、細菌用としては3ℓ滅菌容器を6個（内、3個は予備）、水質サンプル用としては5ℓポリビン6個（内3個は予備、船上試験の漲水時は2個内1個は予備）、他水質等の観測用として5ℓ以上のバケツ等を準備する。なお、サンプル容器は、全て洗浄・乾燥されたものを用いる。また、細菌に関する容器は、滅菌済みのものを用いる。

3. サンプリング

本章におけるサンプリング方法は、G8 船上試験の漲水時と排水時サンプリング、同陸上試験の全てのサンプリングを対象としている。よって、サンプリング場所は全てバラスト水の漲・排水ライン上となり、バラスト水管理システムの前後及び排水地点で実施することになる。なお、等速分流機能を備えたサンプリング設備にサンプル濃縮装置を組み込み、サンプリングと水生生物の濃縮を同時に行っても良い。サンプリング設備は書類審査時に認められる必要がある。

以下には、サンプリング 1 回当たりの手順を示す。

3.1 予備排水

ポンプ稼働後に 1 分以上の予備排水を行い、流量が安定した後に以降のサンプリングを行う。

3.2 細菌のサンプリング

サンプリング設備の採水口から細菌分析用サンプルを滅菌した容器 2 個（内、1 個は予備）に 3ℓ ずつ採水し（写真Ⅱ.3.2-1）、サンプルは冷暗保存状態（5℃）で直ちに実験室に運搬して培養作業を開始する。なお、G8 では 500ml 以上採水することになっているが、水域によって細菌の種類と数は異なることを考慮して採水量を決定する必要があり、本書の手法では 3ℓ とした。



写真Ⅱ.3.2-1 細菌サンプルの採水



写真Ⅱ.3.3-1 S サイズグループ用
サンプルの採水

3.3 S サイズグループのサンプリング

3.3.1 サンプリング設備の採水口からから S サイズグループ用サンプルを 1ℓ（陸上試験の処理水は 10ℓ）ポリビン各 2 個（内、1 個は予備）に採水（写真Ⅱ.3.3-1）

3.3.2 サンプルの濃縮

S サイズグループの水生生物の濃縮は、以降の手順で行う。

- (1) 採水した S サイズグループ用サンプルは、開口径（対角線長）10 μ m 未満のフルイあるいはプランクトンネット²⁶を用いて緩やかに濃縮（濃縮容量は 40ml を目安、写真Ⅱ.3.3-2）。なお、陸上試験において、最小サイズが 10 μ m 未満になる可能性がある培養種を添加する場合には、その最小サイズに配慮した開口径のフルイあるいはプランクトンネットを使用すること。



写真Ⅱ.3.3-2 S サイズグループ用サンプルの濃縮

- (2) 濃縮は、顕微鏡下における試験水中の生物の観察を容易にするためにおこなう。また、生物への損傷を避けるため、フルイやプランクトンネットの表面が常に水中になるように、かつ、気泡を立てないようにできるだけ緩やかにこなう。
- (3) 濃縮作業の終了直前に、あらかじめ作成して洗瓶に入れておいたろ過海水及びピペット等を用い、メッシュ上に捕集された粒子を丁寧に容器に移し、定容する（写真Ⅱ.3.3-3）。



写真Ⅱ.3.3-3 S サイズグループ用サンプルの定容

²⁶ 参考品：Sefar 社（スイス）製、NY7-HD Super

- (4) 濃縮後の粒子の密度が処理後の生物遺骸などによって高くなった場合は、生物の活性への影響をできるだけ避けるためにろ過海水で適宜希釈する。
- (5) サンプル量は 10 ml の単位まで、濃縮したサンプル量も 1 ml の単位までできるだけ正確に計測しておく。
- (6) 濃縮サンプルは、船内の分析室で速やかに動植物プランクトン等の水生生物の分析を開始する。

3.4 参考情報としての目視観察

サンプリング設備の採水口から目視観察用サンプル各 1ℓ をビーカー等の透明容器に採水し、目視により遊泳個体の有無及び確認個体数を記録する(写真Ⅱ.3.4-1)。



写真Ⅱ.3.4-1 目視による遊泳個体の有無及び個体数の観察

3.5 水質分析用サンプルのサンプリング

サンプリング設備の採水口から水質 (TSS、DOC、POC) 分析用サンプルを 5ℓ ポリビン 2 本 (内、1 本は予備) に採水する。採水したサンプルは、冷暗状態で速やかに実験室に運搬し、分析を行う。

3.6 水質計測用サンプルのサンプリング

サンプリング設備の採水口から水温、塩分、pH、DO、NTU 計測用サンプル約 5ℓ を予め洗浄したバケツに採水し、速やかに測定を行う。

3.7 水質計測項目のクロスチェック用サンプルのサンプリング

3.6 で採水したバケツサンプルから、塩分クロスチェック用サンプルを 100ml ポリビン、pH クロスチェック用サンプルを 500ml ポリビン、DO クロスチェック用サンプルを 100ml DO ビンにそれぞれに分取（DO サンプルは固定処理）する。なお、クロスチェックの実施は、計測データの安定状況やキャリブレーションの実施状況によって適切に判断することとする。

3.8 水質計測

3.6 のバケツに水質メータのセンサーを投入し、水温、塩分、pH、DO、NTU を測定する（写真Ⅱ.3.8-1）。



写真Ⅱ.3.8-1 水質メータによる水温、塩分、pH、DO、NTU の測定

3.9 L サイズグループのサンプリング

3.9.1 サンプリング設備の採水口から L サイズグループ用 1m³ 強タンク（陸上試験の流入水は 50ℓ タンク）に採水する（写真Ⅱ.3.9-1）。



写真Ⅱ.3.9-1 L サイズグループ用サンプルの採水

3.9.2 サンプルの濃縮

以降の手順で L サイズグループの水生生物を濃縮する。なお、サンプリング設備にサンプル濃縮装置が組み込まれている場合には、その操作手順に従って濃縮しても良い。

(1) 1m³（陸上試験の流入水は 20ℓ）を緩やかに放水し、大型のゴミ等の排除のためメッシュ開口径 1mm のプレフィルターを通して、メッシュ開口径（対角

線長) 50 μ m 未満のフルイあるいはプランクトンネット²⁷を用いて緩やかに濃縮(濃縮後の推量は 100ml を目安、写真 II.3.9-1)する。なお、50 μ m メッシュを通過した余剰水は、排水処理施設あるいは開口径 20 μ m のネット等でろ過した後には排水し、メッシュ上の残渣物は陸上処理する。

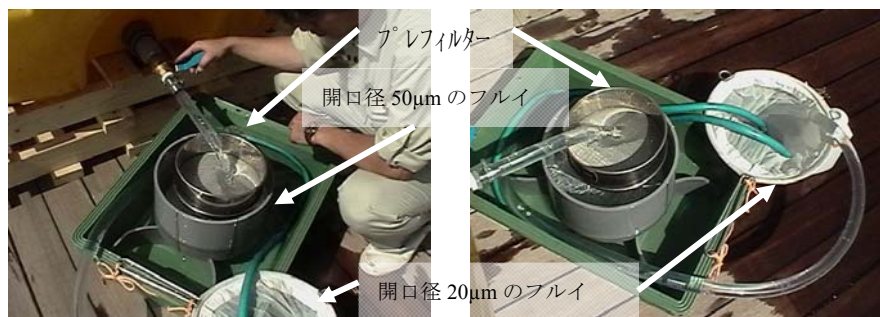


写真 II.3.9-1 L サイズグループの濃縮

- (2) 濃縮は、顕微鏡下における試験水中の生物の観察を容易にするためにおこなう。また、生物への損傷を避けるため、フルイやプランクトンネットの表面が常に水中になるように、かつ、気泡を立てないようにできるだけ緩やかにおこなう。
- (3) 濃縮作業の終了直前に、あらかじめ作成して洗瓶に入れておいたろ過海水を用いて、メッシュ上に捕集された生物等の粒子を丁寧にビーカー等の口の広い容器に移し、定容する(写真 II.3.9-2)。



写真 II.3.9-2 L サイズグループの濃縮とサンプルの定容

²⁷ 参考品 : Sefar 社 (スイス) 製、TIXX-35

- (4) 濃縮後の粒子の密度が処理後の生物遺骸などによって高くなった場合は、生物の生理状態に影響しないようにろ過海水で適宜希釈する。
- (5) サンプル量は 100ml の単位まで、濃縮したサンプル量も 10ml の単位まで、できるだけ正確に計測しておく。
- (6) 濃縮サンプルは、実験室で速やかに動植物プランクトン等水生生物の分析を開始する。

3.10 サンプルング後の整理（次のサンプルングに向けて）

サンプルング及び濃縮作業終了後は、サンプルング設備及び機材全てを清水等で洗淨し、乾燥させる。

4. 分析方法

以下に記す分析は、水生生物及び細菌の生きた生物数への影響をできるだけ避けるため、基本的にサンプリング後6時間以内に終了するか、“4.1.4 生きた (viability) 生物の判断基準” に記す生死判定が適切に行われる状態にする。

4.1 L サイズグループ

4.1.1 計数方法

- (1) 濃縮した試料を、ピペットで大型の動物プランクトン用計数盤にとり、実体顕微鏡で観察する。
- (2) 試料中の運動している個体、形態及び内容物が正常な個体の最小サイズ (4.1.2 章、参照) を接眼マイクロメーターを用いて計測し、最小サイズが $50\ \mu\text{m}$ 以上の個体を計数する。表 II.4.1.1-1 及び-2 のように、同一種であっても最小サイズは出現個体ごとに差があり、2 つ以上の異なるサイズ画分にまたがる例も見られる。そのため、ある種がどの画分と一義的に決めることはできず、その都度計測しなければならない。なお、計数の際には生物の種名あるいは属名を記録する。
- (3) 複数回観察をして、合計の検鏡量が濃縮作業前の原試水量で $1\ \text{m}^3$ 以上となるようにする。

4.1.2 最小サイズ (minimum dimension) の決定

- (1) 最小サイズは、水生生物の幅、長さ、厚みのうちもっとも小さいものをさす。また、幅と厚みについては、その大きさの最大の部位を計測する (図 II 4.1.-1 参照)。触角をもつ動物プランクトンや刺毛をもつ植物プランクトンについては、それらを省いて計測する (図 II 4.1.-2、II 4.1.-3 参照)。

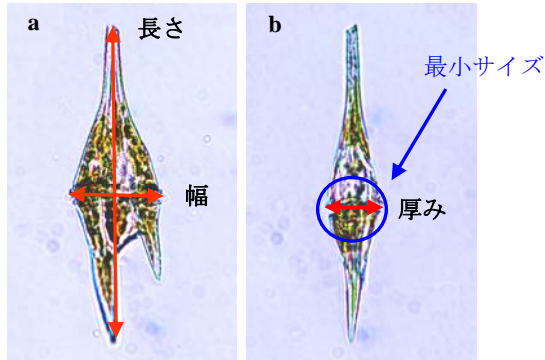


図 II 4.1.-1 最小サイズの決定例 (渦鞭毛藻類)
(a: 腹面、b: 側面)

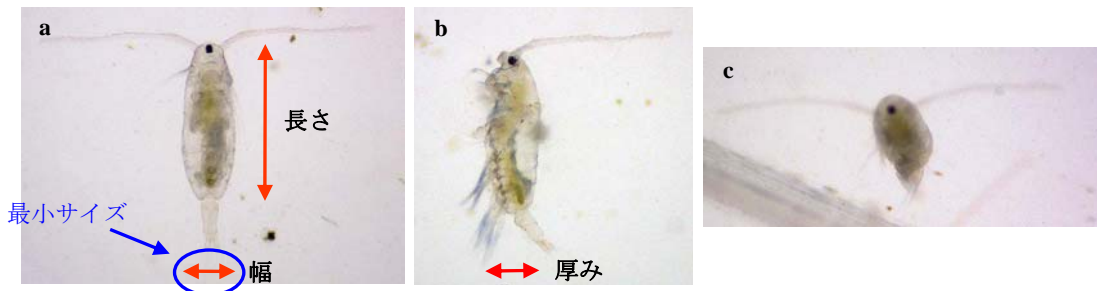


図 II 4.1.-2 最小サイズの決定例 (カイアシ類) (a: 上面、b: 側面、c: 頭部)

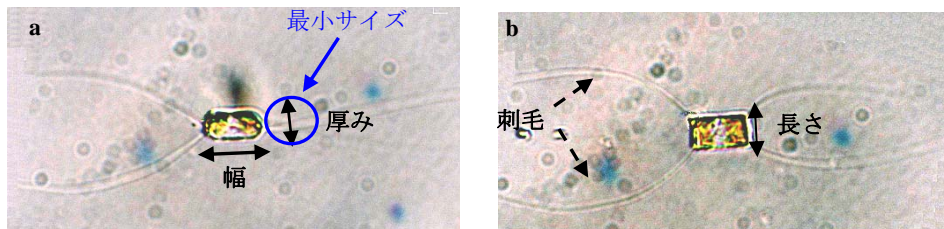


図 II 4.1.-3 最小サイズの決定例 (珪藻類)
(a: 上面、b: 側面)

4.1.3 群体を形成する水生生物の最小サイズ (minimum dimension) の決定

- (1) 群体を形成する水生生物の最小サイズは、その構成細胞あるいは個体を 1 個体として扱い、構成個体毎の最小サイズとする。(図 II.4.1.-4 参照、図 II.4.1-5 及び図 II.4.1.-6 参照)。

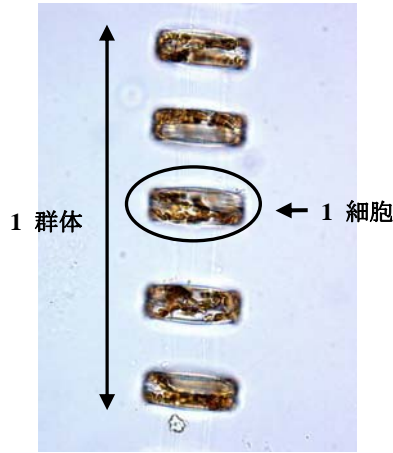


図 II.4.1.-4 1 細胞と 1 群体の関係 (珪藻類)

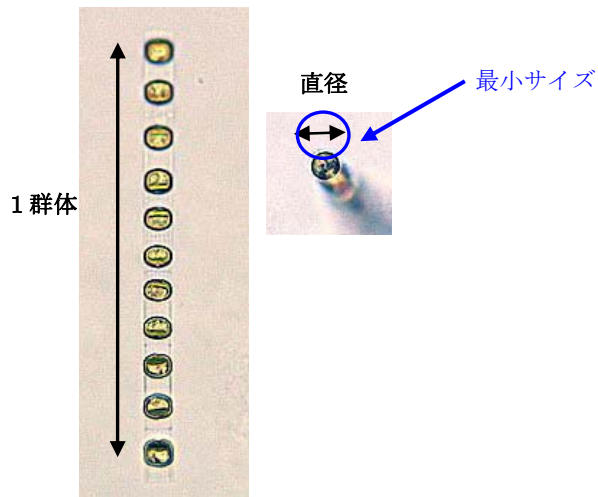


図 II.4.1.-5 群体の最小サイズの決定例 - 1 (珪藻類)

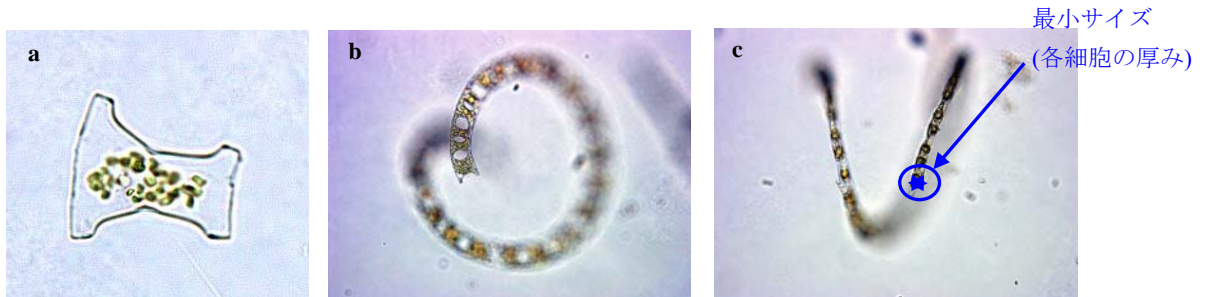


図 II.4.1.-6 群体の最小サイズの決定例 - 2 (珪藻類)
(a: 1 細胞、b, c: 群体)

4.1.4 生きて (viability) 生物の判断基準

- (1) 生物の viability の判断基準は、形態の変化、運動性、染色法による細胞内活性の変化、再成長試験のいずれかによる。このうち、染色法による viability の判断を採用する場合には、試験実施者が使用染色剤と方法および判断基準に関する説明資料を作成しなければならない。なお、参考となる染色法として、Calcein-AM 及びニュートラルレッドを用いた方法を附属資料 6 に収録した。

1) 形態の変化

個体の一部の破損、鞭毛の消失、個体内色素の脱色がみられる生物は viability なしと判断する (図 II.4.1.-7 参照)。

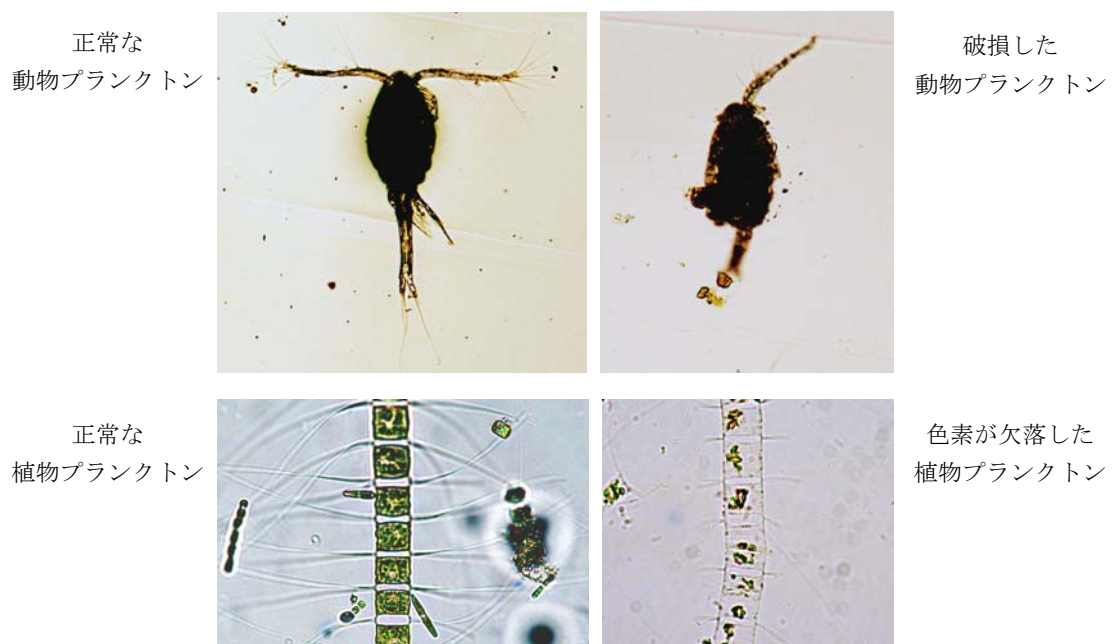


図 II.4.1.-7 形態の変化例 (上: カイアシ類、下: 珪藻類)

2) 運動性

遊泳する能力のある生物に適用でき、遊泳運動がみられない個体は viability なしと判断する。

3) 再成長試験

viability の判断が困難な個体は、下記の方法で一定期間 1 個体のみを単離して培養し、正常な形態および運動性の回復がみられた場合のみ viability ありと判断する。この単離作業は当該計数盤上の計数が終了した後に行なう。再成長試験の方法は以下のとおりである。

- ① あらかじめ保存海水をベースとする栄養強化型の海水培地を作成しておく。推奨する培地は次の 2 つである。この際ベースに用いる海水は、80%海水、20%純水の割合で希釈したものを用いる。

a. 改変 T1 培地組成²⁸

硝酸ナトリウム	NaNO ₃	1 × 10 ⁻³
リン酸二水素ナトリウム	NaH ₂ PO ₄	1 × 10 ⁻⁴
エチレンジアミン四酢酸鉄(Ⅲ)ナトリウム塩三水和物	Fe-EDTA · 3H ₂ O	5 × 10 ⁻⁶
硫酸亜鉛七水和物	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1 × 10 ⁻⁶
塩化マンガン四水和物	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1 × 10 ⁻⁵
モリブデン酸二ナトリウム二水和物	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	5 × 10 ⁻⁷
塩化コバルト六水和物	CoCl ₂ · 6H ₂ O	2 × 10 ⁻⁷
硫酸銅五水和物	CuSO ₄ · 5H ₂ O	1 × 10 ⁻⁸
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩二水和物	Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O	2.4 × 10 ⁻⁵
亜セレン酸	H ₂ SeO ₃	2 × 10 ⁻⁹
チアミン塩酸塩	Thiamin HCl	5.93 × 10 ⁻⁷
ビオチン	Biotin	4.1 × 10 ⁻⁹
シアノコバラミン	Cyanocobalamin	7.38 × 10 ⁻¹⁰

(単位は全て mol ℓ⁻¹)

b. f/2 培地組成²⁹

硝酸ナトリウム	NaNO ₃	8.83 × 10 ⁻⁴
リン酸二水素ナトリウム	NaH ₂ PO ₄	3.63 × 10 ⁻⁴
メタけい酸ナトリウム九水和物	Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	1.07 × 10 ⁻⁴
塩化鉄六水和物	FeCl ₃ · 6H ₂ O	1 × 10 ⁻⁵
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩二水和物	Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O	1 × 10 ⁻⁵
硫酸銅五水和物	CuSO ₄ · 5H ₂ O	4 × 10 ⁻⁸
モリブデン酸二ナトリウム二水和物	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3 × 10 ⁻⁸
硫酸亜鉛七水和物	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8 × 10 ⁻⁸
塩化コバルト六水和物	CoCl ₂ · 6H ₂ O	5 × 10 ⁻⁸
塩化マンガン四水和物	MnCl ₂ · 4H ₂ O	9 × 10 ⁻⁷
チアミン塩酸塩	Thiamin HCl	3 × 10 ⁻⁷
ビオチン	Biotin	2 × 10 ⁻⁹
シアノコバラミン	Cyanocobalamin	1 × 10 ⁻¹⁰

(単位は全て mol ℓ⁻¹)

- ② 培地を滅菌済みの 24 well カルチャープレートに分注する (1 well の培地の容量は約 1 ml)。
- ③ パスツールピペットの先端を火で加熱して、目標生物のサイズに合わせて細長く伸ばしたキャピラリーピペットを作成する (図 II.4.1.-8-a)。

²⁸ Omura et al. (2003) : La mar, 41, 86-93

²⁹ Guillard. In Smith, W.L. and Chanley, M.H. (eds.) (1975) : Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA.

- ④ 観察中に viability の判断ができなかった個体を、キャピラリーピペットを用いて単離し、培地に接種する (図 II.4.1.-8-b, c)。このとき、1つの well に1個体ずつ接種する。

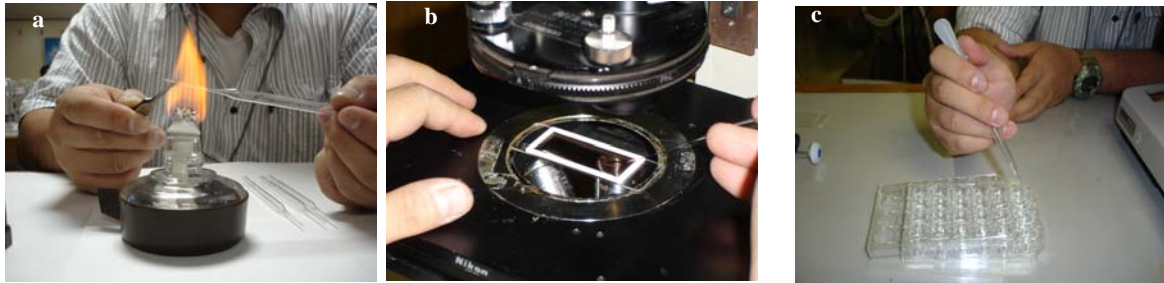


図 II.4.1.-8 再成長試験の作業例

- ⑤ 培地の蒸発を防ぐため、カルチャープレートの底と蓋をビニールテープでとめ、試験時の温度条件と12時間明暗条件 (明条件時 $60-90 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) を保ったインキュベーターで5日間培養する。この間、培養している個体の運動能力の回復や増殖の有無を観察する。
- ⑥ 『Viability の判断が困難な生物』が10個体未満の場合には、その全ての個体について再成長試験をおこない、多数みられた場合は、同一と思われる種につき10個体を単離培養し再成長試験をおこなう。個体数は原試水に含まれる『viability の判断が困難な生物』に対する『viability ありの生物』の割合より求める。すなわち、原試水に含まれる『viability の判断が困難な生物』の生物量が $1000 \text{ 個体}/1 \text{ m}^3$ であり、再成長試験の結果10個体のうち5個体が再成長した場合には、『viability ありの生物』の個体数は $500 \text{ 個体}/1 \text{ m}^3$ とする。

4.1.5 試料の固定・保存

- (1) 計数が終了した試料は、試料の2%相当のホルマリン原液を添加し固定する。すなわち、ホルマリンの添加量は、試料1ℓに対し20 mlである。添加後は、ゆっくりと十分に攪拌する。また、必要に応じてボラックスを加えて中性にしたホルマリンを用いても良い。
- (2) 固定した試料は、冷暗所にて保存する。

4.2 S サイズグループ

4.2.1 計数方法

- (1) 濃縮した試料 1 ml を、ピペットで界線入り枠付き計数盤（図Ⅱ.4.2.1-1）にとり、生物顕微鏡で観察する。



図Ⅱ.4.2.-1 プランクトン計数盤の例

- (2) 試験水中の運動している個体、形態が正常な個体の最小サイズを接眼マイクロメーターを用いて計測し、最小サイズが 10 μm 以上 50 μm 未満の個体を計数する。陸上試験において、培養種を添加した場合には、培養種及び天然に存在する同一種に関しては、最小サイズが 10 μm 未満であっても計数の対象とする。なお、このとき 50 μm 以上の個体が混入していても、50 μm 以上の水生生物（L サイズグループ）計数用の試験水は別途採取するので、計数の必要はない。
- (3) 複数回観察をして、合計の検鏡量が濃縮作業前の原試水量で 100 ml 以上となるようにする（原試水 1 l を 15-35 ml に濃縮すると、検鏡試水 1 ml は原試水 45-70 ml に相当する。すなわち 3 回の検鏡により原試水 135-210 ml 分を検鏡することになる）。
- (4) 上述のプランクトン計数盤および生物顕微鏡を用いた検鏡では、20 倍までの対物レンズを用いた観察はできるが、それ以上の倍率になると対物レンズが計数盤の水面に触れてしまい観察できない。すなわち、大部分の植物プランクトンの大きさが 10 μm 程度と小さい場合には、同定・計数だけでなく、単離作業を行うことが非常に困難になる。そのため、高い倍率による観察が必要な場合は、倒立顕微鏡を使用したほうがよい。

4.2.2 最小サイズ（minimum dimension）の決定

.1.2 を参照

4.2.3 群体を構成する水生生物の最小サイズ（minimum dimension）の決定

4.1.3 を参照

4.2.4 生きた生物（viability）の判断基準

4.1.4 を参照

4.2.5 試料の固定・保存

4.1.5 を参照

表 II.4.1.-1 種内の多くの個体が L サイズグループの種とその最小サイズの最大値と最小値 (単位: μm)

種 名	最小値	最大値
渦鞭毛藻類		
<i>Noctiluca scintillans</i>	150	2000
有鐘絨毛虫類		
<i>Tintinnopsis</i> spp.	15	167
<i>Tintinnidium mucicola</i>	50	160
<i>Favella taraikaensis</i>	70	90
<i>Favella ehrenbergii</i>	80	95
絨毛虫類		
<i>Vorticella</i> sp.	38	200
<i>Didinium balbianii</i>	60	96
<i>Didinium gargantua</i>	125	130
輪虫類		
<i>Keratella cruciformis</i>	40	100
<i>Synchaeta</i> sp.	95	145
<i>Brachionus plicatilis</i>	110	176
橈脚類		
<i>Oithona davisae</i>	140	140
放散虫類		
<i>Sticholonche zancelea</i>	200	300
尾虫類		
<i>Oikopleura</i> sp.	300	5000
<i>Oikopleura dioica</i>	500	1300
枝角類		
<i>Podon polyphemoides</i>	500	700
肉質虫類		
<i>Arcella discoides</i>	90	146
<i>Arcella</i> sp.	90	216
<i>Arcella vulgaris</i>	100	152

表 II.4.1.-2 種内の多くの個体が S サイズグループの種と
その最小サイズの最大値と最小値 (単位 : μm)

種 名	最小値	最大値
珪藻類		
<i>Chaetoceros compressum</i>	3	40
<i>Rhizosolenia setigera</i>	3	87
<i>Aulacoseira distans</i>	4	20
<i>Chaetoceros sociale</i>	4	15
<i>Aulacoseira granulata</i>	5	20
<i>Chaetoceros radicans</i>	6	25
<i>Leptocylindrus danicus</i>	6	12
<i>Skeletonema costatum</i>	6	22
<i>Cerataulina pelagica</i>	7	56
<i>Chaetoceros danicum</i>	8	20
<i>Rhizosolenia fragilissima</i>	8	70
<i>Chaetoceros affine</i>	9	30
<i>Chaetoceros debile</i>	9	40
<i>Chaetoceros didymum</i>	10	40
<i>Chaetoceros lorenzianum</i>	10	80
<i>Leptocylindrus mediterraneus</i>	10	35
<i>Detonula pumila</i>	12	55
<i>Chaetoceros constrictum</i>	14	35
<i>Actinoptychus senarius</i>	20	105
<i>Eucampia zodiacus</i>	20	100
<i>Thalassiosira rotula</i>	20	60
渦鞭毛藻類		
<i>Prorocentrum minimum</i>	15	23
<i>Protoperdinium bipes</i>	15	20
<i>Heterocapsa triquetra</i>	17	29
<i>Gonyaulax verior</i>	26	32
<i>Ceratium furca</i>	30	50
黄金色藻類		
<i>Distephanus speculum</i>	15	35
<i>Ebria tripartita</i>	34	40
ラフィド藻類		
<i>Heterosigma akashiwo</i>	6	15

種 名	最小値	最大値
有鐘繊毛虫類		
<i>Eutintinnus</i> spp.	18	53
<i>Helicostomella longa</i>	17	18
<i>Stenosemella parvicollis</i>	19	25
<i>Stenosemella</i> sp.	19	47
<i>Helicostomella subulata</i>	20	24
<i>Tintinnopsis aperta</i>	25	25
<i>Tintinnopsis beroidea</i>	25	40
<i>Tintinnopsis corniger</i>	28	33
<i>Tintinnopsis radix</i>	30	43
<i>Salpingella</i> sp.	30	50
<i>Tintinnopsis kofoidi</i>	35	38
<i>Amphorella quadrilineata</i>	40	46
<i>Tintinnopsis directa</i>	40	47
<i>Tintinnopsis lohmanni</i>	40	62
繊毛虫類		
<i>Mesodinium rubrum</i>	23	30
<i>Tiarina fusus</i>	30	35
輪虫類		
<i>Trichocerca</i> sp.	28	50
肉質虫類		
<i>Euglypha</i> sp.	30	60

4.3 細菌

G8 の 2.3.5 項では、バラスト水管理システムの承認基準を、バラスト水排出時の水生生物濃度が本書 I 部 1.3 章に示した D-2 基準未満であることと定めている。しかし同時に G8 ではこれら指標微生物の計数が経費的時間的に困難であることも考慮されており、陸上試験の詳細を記した中の 2.3.20 項で、指標微生物を含む大きな細菌グループで、計数が比較的容易なコレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、大腸菌群 (Coliform)、腸球菌グループ (Enterococcus group) を代用細菌として計数することと定めている。すなわち、代用細菌の計数値が D-2 基準以下である場合には、当然指標微生物数も D-2 基準以下であるので、これら代用細菌の計数のみで作業をやめてよいことになる。しかし、D-2 基準を上回る場合には、指標微生物数も D-2 基準を超える可能性があるため、D-2 基準に定められているコレラ毒素産生性コレラ菌 (toxigenic *Vibrio cholerae* O1 及び O139)、大腸菌 (*Escherichia coli*) 及び腸球菌 (Intestinal Enterococci) の計数を行なわなければならない。

そのため本書では、代用細菌と指標微生物の両者の計数方法を記した。また、G8 陸上試験では従属栄養細菌も計数対象となっている (2.3.20 項) ので、その計数方法も記した。なお、本書では培地や溶液に関してそれぞれ 1 つずつしか掲載していないが、推奨培地・溶液以外のものを用いてよい。また、培地組成が推奨培地と同じものに関しては、スタンプ法、乾式培地法、試験紙法によるキット類を利用しても良い。一連の試験は同一方法で行なうこと。市販の培地を用いても良いが、製造業者の取扱説明書に従って使用する。培地組成やメーカーにより検出感度は異なるので推奨方法との差を充分認識して用いること。

4.3.1 従属栄養細菌 (Heterotrophic bacteria) の計数方法

- (1) 従属栄養細菌の計数³⁰⁻³¹には、塗抹平板法³²を用いる。
- (2) 培地

清水主成分の場合は R2A 寒天培地 (R2A Agar)³³ を、海水主成分では Marine Agar 2216³⁴ (DSMZ³⁵Medium604) を推奨する。従属栄養細菌の検出には、海水主成分と清水主成分の双方の寒天培地で行う。

R2A Agar :

酵母エキス	Yeast Extract	0.5g
カザミノ酸	Acid hydrolysate of casein	0.5g
ブドウ糖	Glucose	0.5g
可溶性デンプン	Soluble starch	0.5g
リン酸水素二カリウム	K ₂ HPO ₄	0.3g
ピルビン酸ナトリウム	Sodium pyruvate	0.3g
カゼインペプトン	Pancreatic digest of casein	0.25g
獣肉ペプトン	Peptic digest of animal tissue	0.25g
無水硫酸マグネシウム	MgSO ₄ , anhydrous	0.024g
寒天	Agar	15.0g
精製水	Purified water	1000ml

pH7.2±0.2 121±1°Cで15分間高圧蒸気滅菌して用いる。

Marine Agar 2216 :

ペプトン	Peptone	5.0g
酵母エキス	Yeast Extract	1.0g
クエン酸鉄	Ferric citrate	0.1g
寒天	Agar	15.0g
海水または人工海水	Seawater or artificial seawater	1000 ml

pH 7.6±0.2 121±1°Cで15分間高圧蒸気滅菌して用いる。

30-31

³⁰ American Public Health Association (2005) Standard methods for examination of water and wastewater, 21th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

³¹ American Public Health Association (2001) Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

³² Colony forming unit として計数出来る方法であれば、各研究室の状況に応じて、混釈法やスパイラル・プレーティング法 (Spiral Plate Method) 等を用いてもよい。

³³ Reasoner, D.J. and E.E. Geldreich. (1955). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Applied and Environmental Microbiology 49: 1 – 7

³⁴ Zobell, C.E. (1941). Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. Journal of Marine Research 4: 42 – 75

³⁵ German Collection of Microorganisms

(3) 希釈液

pH7.2-7.5 に調整したりん酸塩緩衝液を推奨するが、現場の試水を滅菌して用いてもよい。なお、希釈液は汽水域や海水域の試料には塩分が試料水と同等になるように塩化ナトリウムで調整した物を用いる。

りん酸塩緩衝液 (Phosphate buffer solution) ³⁶⁻⁴⁰

リン酸二水素カリウム	KH_2PO_4	42.5mg
塩化マグネシウム六水和物	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	190mg
精製水	Purified water	1000 ml

①各成分の調整

a. りん酸塩溶液

リン酸二水素カリウム 34g を蒸留水 500ml に溶かし、1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.2 ± 0.5 に調整する。

b. 塩化マグネシウム溶液

塩化マグネシウム六水和物 38g を蒸留水 1000ml に溶かす。

② 各成分の混合

りん酸塩溶液 1.25ml と塩化マグネシウム溶液 5.0ml を蒸留水 1000ml に加える。121±1℃で 15 分間高圧蒸気滅菌して用いる。

(4) 試験操作

試料水を適当な段階まで希釈した後、それぞれの希釈段階について 5 枚以上の寒天平板に塗抹する (図 II.4.3.-1)。培養温度は、試料水採水時の水温に応じて 20-28℃の範囲内で任意に決定してよいが、設定温度に対して ±0.5℃以内で培養する。培養期間は 5-7 日間の範囲で任意に設定する。なお、一連の試験は同一条件で行うこと。



図 II.4.3.-1 塗抹培養法の作業例

36-40

36 JIS K 0430-72-30. 2000. 水質—生菌数の計数—栄養寒天培地中 (上) への接種による集落の計数 (りん酸塩緩衝液) = ISO 6222 1988

37 ISO 6222. (1988). Water quality - Enumeration of viable micro-organisms-Colony count by inoculation in or on a nutrient culture medium.

38 ISO 9308-1. (1990). Water quality – Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria – Part 1: Membrane filtration method. (Phosphate buffer solution)

39 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th edition. (2005). American Public Health Association, Washington, D.C. (Buffered water)

40 Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th edition. (2004). American Public Health Association, Washington, D.C.

(5) 計数

培養後、拡散集落がなく、一平板に 20-200 個の集落がみられる平板 (図 II.4.3.-2) を選び、集落数を計数する。得られた一平板あたりの集落数と希釈段階から、試料水 1ml あたりの菌数を算出する。

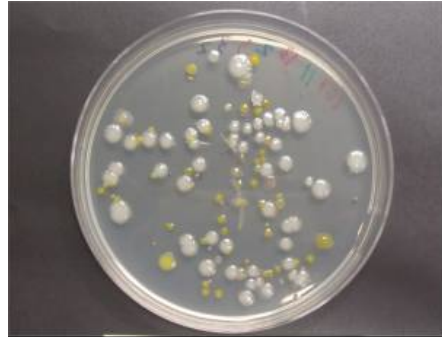


図 II.4.3.-2 計数に用いる非選択培地の例

4.3.2 大腸菌群 (Coliform) および大腸菌 (*Escherichia coli*) の計数方法

大腸菌群及び大腸菌の計数は、同じ培地で行うことができるため、下記の方法で行えば一連の操作で両者の計数が可能である。

- (1) 大腸菌群および大腸菌の計数⁴¹⁻⁴⁶には、予想される菌数に応じて塗抹平板法もしくはメンブレンフィルター法⁴⁷を用いる。
- (2) 培地
MI medium⁴⁸⁻⁴⁹を推奨する。

41-46

41 American Public Health Association (2001) Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

42 American Public Health Association (2005) Standard methods for examination of water and wastewater, 21th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

43 U.S. Food and Drug Administration (2000). Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, Md.

44 日本薬学会編 (2005) 衛生試験法・注解 2005 金原出版株式会社

45 厚生労働省監修 (2004) 食品衛生指針 微生物編 社団法人 日本食品衛生協会

46 上水試験方法 (2001) 日本水道協会

⁴⁷ 塗抹平板法と同様に国内外の試験方法を参照
48-49

48 Bernner, K.P., C.C. Rankin, Y.R. Roybal, G.N. Stelma, Jr., P.V. Scarpino and A.P. Dufour. (1993). New medium for simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water. Applied and Environmental Microbiology 59: 3534 – 3544.

49 U.S. Environmental Protection Agency. (2002). Method 1604: Total coliforms and *Escherichia coli* in water by membrane filtration using a simultaneous detection technique (MI medium). Publication EPA-821-R-02-024. USEPA Official of Water (4303T), Washington, DC.

MI medium :

プロテオースペプトン No.3	Proteose peptone No.3	5.0 g
酵母エキス	Yeast eExtract	3.0 g
β -D-乳糖	β -D-lactose	1.0 g
4-メチルウンベリフェリル β -D-ガラクトピラノシド-6-サルフェイト	4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactopyranoside (MUGal)	0.1g
インドキシル- β -D-グルクロニド	Indoxyl- β -D-Glucuronide (IBDG)	0.32 g
塩化ナトリウム	NaCl	7.5 g
リン酸水素二カリウム	K ₂ HPO ₄	3.3 g
リン酸二水素カリウム	KH ₂ PO ₄	1.0 g
ラウリル硫酸ナトリウム	Sodium lauryl sulfate	0.2 g
デソキシコール酸ナトリウム	Sodium desoxycholate	0.1 g
寒天	Agar	15.0 g
精製水	Purified water	1000ml

pH 6.95±0.2 121±1°Cで15分間高圧蒸気滅菌して用いる。

(3) 希釈液

4.3.1 (3) と同じ

(4) メンブレンフィルター法の装置の滅菌

フィルターホルダーの上にメンブレンフィルター(孔径0.2 μ m、直径47mm)を置き、ファンネルを固定し、高圧蒸気滅菌する。市販のメンブレンフィルターとろ過装置がセットになった滅菌済みのデイスポーザブルのものを利用してよい。

(5) 試験操作

塗抹平板法は 4.3.1 (4) と同様に行なう。メンブレンフィルター法(図 II.4.3-3)は、よく混合した試験液をファンネル内に注いで吸引ろ過し、さらに、滅菌した希釈液でファンネル内を洗浄、ろ過する。寒天培地の上にフィルターを速やかに置き、培養する。試験液の接種量はフィルター上に20 - 200の集落が形成されるようにろ過する。試料液100mlろ過したフィルター上に細菌が検出されない場合は、検出不可(N.D., Not detectable)とする。35±2°Cで18 - 24時間培養を行なう。



図 II.4.3-3 メンブレンフィルター法の作業例

(6) 計数

大腸菌群は UV 照射 (366nm) で蛍光の集落を形成し、大腸菌は青色の集落を形成する。これらを計数後、得られた一平板当たりの平均集落数と希釈段階あるいはろ過量から、試水1mlあたりの菌数を算出する。

4.3.3 腸球菌グループ (Enterococcus group) 及び腸球菌 (Intestinal Enterococci) の計数方法

- (1) 腸球菌グループの計数⁵⁰⁻⁵¹
4.3.2 (1) と同様に、予想される菌数に応じて塗抹平板法もしくはメンブレンフィルター法を用いる。
- (2) 培地
M-エンテロコッカス寒天培地 (Enterococcus Agar, m Enterococcus Agar, Azide Agar)⁵² を推奨する。

M-エンテロコッカス寒天培地：

カゼインペプトン	Pancreatic digest of casein	15.0g
大豆ペプトン	Papaic digest of soybean meal	5.0g
酵母エキス	Yeast extract	5.0g
リン酸二水素カリウム	KH ₂ PO ₄	4.0g
ブドウ糖	Glucose	2.0g
アジ化ナトリウム	NaN ₃	0.4g
塩化トリフェニルテトラゾリウム	Triphenyltetrazolium chloride	0.1g
寒天	Agar	10.0g
精製水	Purified water	1000ml

pH 7.2±0.2 加温溶解して用いる。

- (3) 希釈液
4.3.1 (3) と同じ
- (4) 試験操作
塗沫法およびメンブレンフィルター法は 4.3.1 (4) および 4.3.2 (5) と同様に行なう。37±2℃で 48±3 時間培養する。
- (5) 計数
薄桃色から赤色の集落を形成したものを腸球菌グループとして計数する (図 II.4.3.-5)。これらを計数後、得られた一平板当たりの平均集落数と希釈段階あるいはろ過量から、試水 1ml あたりの菌数を算出する。
- (6) 腸球菌の計数
 - 1) 腸球菌グループの計数で形成された各集落を 6.5%塩化ナトリウム濃度のブレインハートインフュージョン培地を用いて 45±0.5℃で 48 時間静置培養する。各試験水毎に、可能な限り釣菌し試験に供する (形成集落数が 100 以下であればすべての集落を釣菌し、100 より多い場合は 100 を超える集落を釣

50-51

50 American Public Health Association (2005) Standard methods for examination of water and wastewater, 21th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

51 U.S. Environmental Protection Agency. (2002) . Method 1600: Enterococci in water by membrane filtration using membrane-enterococcus indoxyl-β-D-glucoside agar (mEI) . Publication EPA-821-R-02-022. USEPA Office of water, Office of Science and technology, USEPA, Washington, DC.

52 Slanetz, L. W. and C.H. Bartley. (1957) . Number of enterococci in water, sewage and feces determined by the membrane filter technique with an improved media. Journal of Bacteriology 74: 591-595

菌すること)。この培養法で検出されたものを腸球菌として計数する（図 II.4.3.-6）。

ブレインハートインフュージョン培地（Brain Heart Infusion Broth）：

ゼラチンペプトン	Pancreatic digest of gelatin	14.5g
脳及び心筋浸出物	Brain heart, solids from infusion	6.0g
獣肉ペプトン	Peptic digest of animal tissue	6.0g
塩化ナトリウム	NaCl	5.0g
リン酸水素二ナトリウム	Na ₂ HPO ₄	2.5g
精製水	Purified water	1000ml

pH 7.4±0.2 121±1°Cで15分間高圧蒸気滅菌して用いる。

4.3.4 コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) 及び毒素産生性コレラ菌 (toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139) の計数方法

下記の計数方法は、水のサンプルを対象にしたものである。D-2 基準には、動物プランクトンのサンプルも規定されているが、動物プランクトンだけを1g収集する労力は膨大であり、実際には不可能な作業であると予想されることから、本書では記載を割愛した。

(1) コレラ菌の計数⁵³⁻⁵⁵

4.3.2 (1) と同様に、予想される菌数に応じて塗抹平板法もしくはメンブレンフィルター法を用いる。

1) 培地

チオ硫酸-クエン酸-胆汁酸-白糖 (TCBS) 寒天培地 (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar)⁵⁶ を推奨する。

TCBS 寒天培地：

ペプトン	Peptone	10.0g
酵母エキス	Yeast extract	5.0g
クエン酸ナトリウム	Sodium citrate	10.0g
チオ硫酸ナトリウム	Na ₂ S ₂ O ₃	10.0g
塩化ナトリウム	NaCl	10.0g
クエン酸鉄	Ferric citrate	1.0g
牛胆汁末	Oxgall	5.0g
コール酸ナトリウム	Sodium cholate	3.0g
白糖	Sucrose	10.0g

53-55

53 American Public Health Association (2005) Standard methods for examination of water and wastewater, 21th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

54 U.S. Food and Drug Administration (2000) . Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, Md.

55 厚生労働省監修 (2004) 食品衛生指針 微生物編 社団法人 日本食品衛生協会

56 小林俊一、榎本省二、坂崎利一、桑原章吾 (1963) 病原ビブリオの新しい選択分離培地 - 変法中西の培地 (TCBS カンテン培地) - について 日本細菌学会誌 18: 387 - 391

0.2%チモールブルー	0.2%Thymol Blue	20ml
0.2%ブロムチモールブルー	0.2%Bromothymol Blue	20ml
寒天	Agar	15.0g
精製水	Purified water	1000ml

pH 8.6±0.2 加温溶解して用いる。

- 2) 希釈液
4.3.1 (3) と同じ。
- 3) 試験操作
塗沫法およびメンブランフィルター法は 4.3.1 (4) および 4.3.2 (5) と同様に行なう。36±1℃、24±2 時間培養する。
- 4) 計数
黄色の集落を形成したものをコレラ菌として計数する (図 II.4.3.-4)。以下 4.3.2 (6) と同じ。



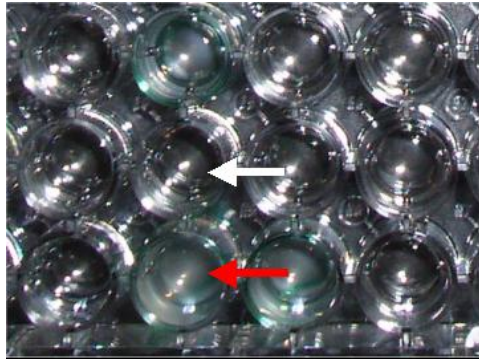
図 II.4.3.-4 コレラ菌の検出例
(黄色い集落をコレラ菌として計数)

- (2) 毒素産生性コレラ菌の計数
 - 1) コレラ菌の計数で検出された各集落を無塩アルカリ性ペプトン水で 36±1℃で 6-18 時間静置培養する。各試験水毎に、可能な限り釣菌し試験に供する (形成集落数が 100 以下であればすべての集落を釣菌し、100 より多い場合は 100 を超える集落を釣菌すること)。この増菌培養法は、海洋性の *Vibrio* 属の増殖が阻害されるため、培養されたものだけを試験対象とし、これらを浮遊抗原液とする (図 II.4.3.-5)。

無塩アルカリ性ペプトン水：

ペプトン	Peptone	10.0g
精製水	Purified water	1000ml

pH 8.6±0.2 121±1℃で 15 分間高圧蒸気滅菌して用いる。



図Ⅱ.4.3.-5 浮遊抗原液としての判定例
(赤矢印が陽性例、白抜き矢印は陰性例)

- 2) 毒素産生性コレラ菌 O1 および O139 の抗血清によるスライド凝集反応を実施する。1) の浮遊抗原液と各抗血清及び生理的食塩水をそれぞれスライドガラス上で混和する。肉眼で明らかに凝集が認められるものを陽性と判断する。

なお、市販抗血清およびモノクローナル抗体を用いて良いが、製造業者の取扱説明書に従って使用する。

4.4 水質

G8 では、試験時の環境パラメータの把握を目的として水質項目の観測を規定している。そのうち、船上試験ではバラスト水の漲水、保管、排出、及びバラスト水処理時で、それぞれ水温、塩分、TSS と POC を観測することになっている。また、陸上試験では各サンプリング時に水温、塩分、pH、DO、NTU、TSS、DOC と POC を観測しなければならない。

ただし、G8 では、これら水質項目の観測方法に関して規定されていない。よって、本生物分析方法では、可能な限り機器による計測を認めることとした。以下には、機器による計測を認める水質計測項目と分析を必要とする水質分析項目に分けてそれらの方法を示した。

4.4.1 水質計測項目（機器による計測項目）

計測項目は、水温、塩分、pH、DO、NTU とする。

使用する計測機器は規定しない。ただし、使用する機器は、次の精度以上で測定可能なものとし、測定結果の直線性、再現性、校正の間隔などに関しては、JIS または海洋観測指針の規定を参考に実施すること。

計器の必要精度：

水温：0.1℃

塩分：1PSU

pH：0.1

DO：0.1mg/l

NTU：0.1

なお、計測精度の向上のためには、キャリブレーションやクロスチェック（DO でのウインクラー法等）を頻繁に行うことが望ましい。

4.4.2 水質分析項目

水質観測項目のうち、機器による計測ができない TSS、DOC 及び POC の分析方法を以下に記す。

(1) TSS

- 1) 粒子保持能 $0.4\mu\text{m}$ のメンブランフィルターを予め 60°C の蒸留水で 1 時間洗浄する操作を 3 回繰り返す。
- 2) 洗浄したフィルターを自然乾燥させた後、 $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ で約 2 時間乾燥させ、デシケーターに数日間入れた後、フィルターの重量を感度 0.1mg 程度の天秤で秤量する。秤量は数回繰り返し、恒量値を得る。
- 3) 採水したサンプルを、2) で秤量したフィルターを用いてできるだけ速やかに（12 時間以内）でろ過する。ろ過法は吸引ろ過でも良く、ろ過量は粒子の捕集状況を見極めて決定ししても良い。なお、ろ過量の記録は必須である。
- 4) ろ過終了後、直ちにフィルターをろ過器から外し、大きめのガラスろ過器にのせる。

- 5) ガラスろ過器にのせたフィルターは、炭酸アンモニウム水溶液（炭酸アンモニウム 35g を蒸留水 1ℓ に溶解した 3.5%水溶液）10～20ml を 3～4 回に分けて吹き付けながら吸引し、海塩等を洗浄する。なお、ブランク用のフィルターも同じ作業を行う。
- 6) 洗浄が終了したフィルターを保存する場合は、折りたたんで保存容器に入れ、冷凍または冷蔵保存とする。
- 7) フィルターの秤量は、乾燥機を用いて 60℃で 2 時間乾燥させた後に行う。秤量は、数回繰り返し、恒量値を得る。
- 8) TSS は、次式で求める。

$$\text{TSS (mg/l)} = (\text{W}_2 - \text{W}_1 - \text{B}) / \text{V}$$

$$\text{W}_1: \text{サンプルろ過前のフィルター重量 (mg)、W}_2: \text{サンプルろ過後のフィルター重量 (mg)、B: ブランク補正值、V: 海水ろ過量 (ℓ)}$$

(2) DOC

- 1) ろ過による前処理を行う。ろ過に使用するフィルターは、450℃で数時間加熱処理を行った粒子保持能 0.7 μm の GF/F か、あるいは沸騰再蒸留水により繰り返し洗浄した粒子保持能 0.45 μm のメンブランフィルターを用いる。ただし、使用したフィルターを POC 分析用に用いる場合は、メンブランフィルターを使用することはできない。
- 2) 上記 1) でろ過処理したろ液は、ポリビンに収納して DOC の分析サンプルとする。フィルター（捕集された懸濁物）は POC の分析サンプルとしてアルミホイルに包み、-20℃以下の冷凍庫で保存する。
- 3) DOC の分析は、燃焼酸化-赤外線式 TOC 自動計測法の他、乾式灰化法、ベルオキシ二硫酸カリウム参加法紫外線酸化法のいずれを用いても良い。なお、燃焼酸化-赤外線式 TOC 自動計測法は、計測器に連続的に供給した試料に酸を加え pH を 2 以下にし、通気して無機態炭素を除去した後、その一定量をキャリーヤーガスと共に高温の全炭素測定管に送り込み、有機物中の炭素を二酸化炭素とし、その濃度を非分散形赤外線ガス分析計で測定して濃度を求める方法である。

(3) POC

- 1) 上記 (2) DOC の 2) のフィルター（捕集された懸濁物）をサンプルにして分析する。
- 2) 分析は、フィルターを乾燥機を用いて 60℃で 4 時間以上乾燥させた後に行う。
- 3) 乾燥させた懸濁物付きのフィルターは、CHN 分析計に入れて高温で燃焼させて得られる二酸化炭素濃度を測定して炭素量を求める。
- 4) なお、ブランク値として、燃焼処理し試水をろ過していない GF/F の炭素量を CHN 分析計で測定し恒量値を求め、3) の測定値から差し引いて DOC 量とする。
- 5) 有孔虫やサンゴ由来等の無機懸濁態炭素が試水中に含まれている可能性がある場合は、ろ過後のフィルターを酸処理し、無機態炭素を除去した後に測定する必要がある。

III 附属資料

資料1

ISO /IEC 17025 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項（仮和訳）

- 1 適用範囲
- 2 引用規格
- 3 定義

- 4 管理上の要求事項
 - 4.1 組織
 - 4.2 品質システム
 - 4.3 文書管理
 - 4.4 依頼、見積仕様書及び契約の内容の確認
 - 4.5 試験・校正の下請負契約
 - 4.6 サービス及び供給品の購買
 - 4.7 依頼者へのサービス
 - 4.8 苦情
 - 4.9 不適合の試験・校正業務の管理
 - 4.10 是正処置
 - 4.11 予防処置
 - 4.12 記録の管理
 - 4.13 内部監査
 - 4.14 マネジメント・レビュー

- 5 技術的要求事項
 - 5.1 一般
 - 5.2 要員
 - 5.3 施設及び環境条件
 - 5.4 試験・校正の方法及び方法の妥当性確認
 - 5.5 設備
 - 5.6 測定の特異性
 - 5.7 サンプルング
 - 5.8 試験・校正品目の取扱い
 - 5.9 試験・校正結果の品質の保証
 - 5.10 結果の報告

- 1 適用範囲
 - 1.1 この規格は、サンプルングを含め、試験又は校正を行う能力に関する一般要求事項を規定する。この規格は、規格に規定された方法、規格外の方法、及び試験所・校正機関が開発した方法を用いて実施される試験及び校正を含む。

1.2 この規格は、試験又は校正を実施するすべての組織に適用できる。これらの組織は、例者、第二者及び第三者の試験所・校正機関を含み、また、検査及び製品認証の一部として試験又は校正を行う試験所・校正機関を含む。

この規格は、職員の数又は試験・校正活動の範囲の大小に関係なくすべての試験所・校正機関に適用できる。ある試験所・校正機関がこの規格に含まれる活動の一つ又はいくつか、例えばサンプリング、新規の方法の設計・開発のような活動を請け負わない場合には、それらの項目の要求事項は適用されない。

1.3 示された参考は、本文の明確化、事例及び指針を与えるものである。参考は要求事項を含んでおらず、この規格の実質部分を構成するものではない。

1.4 この規格は、試験所・校正機関が自身の運営を管理する品質上、管理上及び技術上のシステムを開発するに当たって使用するためのものである。試験所・校正機関の依頼者、規制当局及び認定機関が、試験所・校正機関の能力を確認又は承認するに当たってこの規格を使用してもよい。

1.5 試験所・校正機関の運営に関する法令上及び安全上の要求事項への適合は、この規格には含まれていない。

1.6 試験所及び校正機関がこの規格の要求事項に適合している場合、その試験・校正活動について、新規の方法の設計・開発又は規格に規定された試験・校正方法と規格外の方法とを組み合わせた試験プログラムの開発に従事する場合には JIS Z 9901:1998 の要求事項をも満たす品質システム、また、規格の方法だけを使用する場合には JIS Z 9902:1998 の要求事項をも満たす品質システムを運営するであろう。附属書Aは、この規格と JIS Z 9901:1998 及び JIS Z 9902:1998 との項目対照表を示す。この規格は、JIS Z 9901:1998 及び JIS Z 9902:1998 には含まれていない技術的能力に関するいくつかの要求事項を含んでいる。

備考この規格の対応国際規格を次に示す。

なお、対応の程度を表す記号は、ISO/IEC Guide 21 に基づき、IDT（一致している）、MOD（修正している。）、NEQ（同等でない）とする。

ISO/IEC 17025:1999 General requirements for the competence of testing and calibration

laboratories (IDT)

参考

1. 整合化された方法で要求事項を適用することを確実にするため、この規格のいくつかの要求事項を説明し又は解釈することが必要であろう。特定分野に対する適用を確立するための指針が、特に認定機関（JIS Z 9358、4.1.3 参照）に対して附属書Bに示されている。

2. 試験所・校正機関が自身の試験・校正活動の一部又は全部について認定を希望する場合には、JIS Z 9358 に従って運営している認定機関を選択することが望ましい。

4 管理上の要求事項

4.1 組織

4.1.1 試験所・校正機関又はそれを一部分として包含する組織は、法律上の責任を維持できる存在であるものとする。

4.1.2 この規格の要求事項に適合し、かつ依頼者、規制当局又は承認を与える機関のニーズを満たすような方法で試験・校正活動を行うことは、試験所・校正機関の責任である。

4.1.3 試験所・校正機関の管理システムは、試験所・校正機関の恒久的施設、恒久的施設以外の場所又は関連の一時的若しくは移動式の施設において行われる業務を対象範囲に含める。

4.1.4 試験所・校正機関が試験又は校正以外の活動を行う組織の一部である場合には、潜在的な利害の衝突を特定するため、その試験所・校正機関の試験・校正活動に関与する又は影響する組織内の主要な要員の責任を明確に規定する。

参考

1. 試験所・校正機関が大きな組織の一部である場合、その組織配置は、製造、販売促進又は財務のような利害の衝突がある部門が、この規格の要求事項に対する試験所・校正機関の適合性に悪影響を及ぼさないようなものであることが望ましい。

2. もし試験所・校正機関が第三者機関であると承認されることを望むならば、公正であること

並びにその機関及び機関の要員が技術的判断に影響し得る不当な営利的、財務的又はその他の圧力を受けないことを実証できることが望ましい。第三者の試験所又は校正機関は、その機関が行う試験・校正活動に関する判断の独立性及び誠実性に対する信用を傷つけるおそれのある活動に従事しないことが望ましい。

4.1.5 試験所・校正機関は、次の事項を満たす。

a) 職務を実施するため、及び品質システム又は試験・校正の実施手順からの逸脱の発生を特定し、その防止又は最小化の処置を指揮するために必要な権限及び経営資源をもつ管理要員及び技術要員をもつ (5.2を参照)。

参考経営資源とは、人、もの、財のことをいう。

b) 管理主体及び要員が、業務の品質に悪影響を与えるおそれがある何らかの営利上、財務上又はその他の内部的及び外部的な圧力を受けないことを確実にするための取決めをもつ。

c) 結果の電子的手段による保管及び伝送を保護する手順を含め、依頼者の機密情報及び所有権の保護を確実にするための方針及び手順をもつ。

d) 試験所・校正機関の能力、公平性、判断又は業務上の誠実性に対する信頼を損なうおそれのある何らかの活動に試験所・校正機関が関与することを避けるための方針及び手順をもつ。

e) 試験所・校正機関の組織及び管理構造、親組織における位置、並びに品質管理、技術的業務及び支援サービスの間関係を明確に規定する。

f) 試験・校正の品質に影響する業務の管理、実施又は検証に当たるすべての要員の責任、権限及び相互関係を明確に規定する。

g) 訓練中の者を含め、試験・校正に当たる職員に対し、方法及び手順、個々の試験・校正の目的及び試験・校正結果の評価に精通した人物によって十分な監督を行う。

h) 試験所・校正機関の業務の要求品質を確保するために必要な技術的業務及び経営資源の支給に総合的な責任をもつ技術管理主体を有する。

i) 他の職務及び責任のいかにかわからず、品質システムが常に実施され遵守されて

いることを確実にするため明確な責任及び権限を付与される職員1名を品質管理者（いかなる名称でもよい）に指名する。品質管理者は、試験所・校正機関の方針又は経営資源について決定を行う管理の最高レベルに直接接触できる。主要な管理要員の代理者を指名する（参考を参照）。

参考 個人が複数の職能を受けもつことがあり、それぞれの職能に代理者を指名するのは実際的でないことがある。

4.2 品質システム

4.2.1 試験所・校正機関は、その活動の範囲に対して適切な品質システムを構築し、実施し、維持する。試験所・校正機関は、試験・校正結果の品質を保証するために必要な範囲まで、試験所・校正機関の方針、システム、プログラム、手順及び指示を文書化する。このシステムの文書は、担当の要員に周知され、理解され、いつでも利用できる状態に置かれ、かつ実施されている。

4.2.2 試験所・校正機関の品質システムの方針及び目標は、品質マニュアル（いかなる名称でもよい）の中に明確に規定する。総合的な目標は、品質マニュアル中の品質方針表明として文書化する。品質方針表明は、上級経営管理者の権限によって発行する。この文書は少なくとも次の事項を含む。

- a) 依頼者へのサービス提供に際し、良好な業務習慣及び試験・校正の品質を守るという試験所・校正機関の管理主体の公約。
- b) 試験所・校正機関のサービスの水準に関する管理主体の表明。
- c) 品質システムの目的。
- d) 試験所・校正機関における試験・校正活動に関係するすべての要員に対し、品質文書に精通し、業務において方針及び手順を実施することの要求。
- e) この規格への適合性を守るという試験所・校正機関の管理主体の公約。

参考品質方針表明は簡潔であることが望ましく、常に試験又は校正を決められた方法及び依頼者の要求事項に従って行うという要求を含んでもよい。試験所・校正機関が大きな組織の一部分である場合には、品質方針のいくつかの要素が他の文書に含まれることがある。

4.2.3 品質マニュアルには、技術的手順書を含めて支援の手順書を含めるか、又はその引用を示す。品質マニュアルは、品質システムにおいて使用する文書の構成の概要を示す。

4.2.4 この規格への適合性を確実にする責任を含め、技術管理主体及び品質管理者の役割及び責任を品質マニュアルの中に明確に規定する。

4.3 文書管理

4.3.1 一般

試験所・校正機関は、法令、規格、その他の基準文書、試験・校正方法、並びに図面、ソフトウェア、仕様書、指示書及びマニュアルのような、品質システムの一部を構成するすべての文書（内部で作成した文書及び外部で発行された文書）を管理する手順を確立し、維持する。

参考

1. ここでいう「文書」は、方針表明文、手順書、仕様書、校正值表、チャート、教科書、ポスター、通知、覚書き、ソフトウェア、図面、図解その他であり得る。それらはハードコピー又は電子的記録など様々な媒体によってもよく、また、デジタル、アナロ

グ、写真又は手書きによるものでもよい。

2. 試験及び校正に関係するデータの管理は 5.4.7 に規定されている。記録の管理は 4.12 に規定されている。

4.3.2 文書の承認及び発行

4.3.2.1 品質システムの一部として試験所・校正機関の要員に向けて発行されるすべての文書は、発行に先立って権限をもった要員が確認し、使用の承認を与えること。品質システムの中の文書について現在の改訂状況及び配布状況を識別するためのマスターリスト又は同等の文書管理手順を確立し、無効文書及び/又は廃止文書の使用を排除するため、このリストなどをいつでも利用できる状態にしておく。

4.3.2.2 採用された手順は、次の事項を確実にする。

a) 試験所・校正機関の効果的な機能遂行に不可欠な業務を行うすべての場所で、適切な文書の公式版がいつでも利用できる。

b) 適用される要求事項に対する継続的な適切さと適合性を確実にするため、文書を定期的に見直し、必要に応じて改訂する。

c) 無効文書又は廃止文書は、すべての発行場所又は使用場所から速やかに撤去するか、若しくは他の方法によって誤使用を確実に防止する。

d) 法令上の目的又は知識保存の目的で保持する廃止文書は、適切にその旨を表示する。

4.3.2.3 試験所・校正機関が作成した品質システム文書を明確に識別する。この識別には、発行の日付及び/又は改訂の識別、ページ番号付け、全ページ数又は文書の終わりを示す何らかの記号及び発行権限をもつ者の名を含める。

4.3.3 文書の変更

4.3.3.1 文書に対する変更は、他の特別の指定がない限り、その文書の初版の確認を行った部局が承認及び承認を行う。指定された要員は、承認及び承認の根拠となる関連の背景情報に接触できる。

4.3.3.2 実行可能な場合、変更された記述又は新しい記述をその文書の中又は適切な附属文書の中で識別する。

4.3.3.3 試験所・校正機関の文書管理システムが、文書の再発行までの期間に手書きによる文書の修正を認める場合には、そのような修正の手順及び権限を明確に規定する。修正箇所は明りょうに表示し、署名 (initial) 及び日付を付ける。実行可能な限り、早期に改訂文書を正式に再発行する。

4.3.3.4 コンピュータ化されたシステム中に保持されている文書の変更をどのように行い、管理するかを規定する手順を確立する。

4.4 依頼、見積仕様書及び契約の内容の確認

試験所・校正機関は、依頼、見積仕様書又は契約の内容を確認するための手順を確立し、維持する。

4.4.1 試験・校正の契約に至るこの確認の方針及び手順は、次の事項を確実にする。

a) 使用すべき方法を含め、要求事項が十分に確定され、文書化され、理解されている (5.4.2 参照)。

b) 試験所・校正機関が、要求事項を満たす業務能力及び経営資源をもつ。

c) 適切な試験・校正方法が選定され、依頼者の要求事項を満たすことができる (5.4.2 参照)。依頼又は見積仕様書と契約との間での何らかの相違は、業務に取りかかる前に解決する。個々の契約は、試験所・校正機関及び依頼者の双方にとって受入れ可能である。

参考

1. 依頼、見積仕様書又は契約の内容の確認は実際的かつ能率的な方法で行い、財務上、法令上及び時間的スケジュールの側面の影響を考慮に入れることが望ましい。内部の依頼者に対しては、依頼、見積仕様書及び契約の内容の確認は簡素化された方法で行ってもよい。

2. 業務能力の確認においては、試験所・校正機関が必要な物理的、人的及び情動的資源をもち、かつ試験所・校正機関の要員がその試験・校正の実施に必要な技量及び専門知識をもつことを確認することが望ましい。業務能力の確認は、過去に参加した試験所間比較又は技能試験の結果、及び/又は測定の不確かさ、検出限界、信頼限界その他を確定するための既知のサンプル又は品目をを用いた試行試験又は校正プログラムの実行の結果を含むことがある。

3. 契約は、依頼者に対して試験・校正業務を提供することを示す何らかの書面又は口頭による取決めであってよい。

4.4.2 重要な変更の記録を含め、確認の記録を維持する。契約の実施期間中に依頼者の要求事項又は業務の結果について依頼者と交わした関連の討論についても記録を維持する。

参考定型的業務及びその他の簡単な業務に関する確認は、確認の日付及び契約業務の実施に責任をもつ試験所・校正機関の要員の識別（例えばイニシャル）で十分であると考えられる。繰り返し行う定型的業務に関する確認は、依頼者の要求事項に変更がない限り、最初の照会の段階でだけ行うか、又は依頼者との一般的な取決めに基づいて継続的に行う定型的業務の契約を結ぶ段階でだけ行えばよい。新規の、複雑な又は先進的な試験・校正業務については、更に包括的な記録を維持することが望ましい。

4.4.3 確認には、試験所・校正機関が下請負契約するいかなる業務も含める。

4.4.4 契約からの何らかの逸脱を依頼者に通知する。

4.4.5 業務開始後に契約の修正が必要となった場合には、前回と同じ契約内容確認のプロセスを繰り返し、修正内容は影響を受ける要員すべてに周知する。

4.5 試験・校正の下請負契約

4.5.1 試験所・校正機関が、予期しなかった理由（例えば、業務負担、追加的専門技術の必要性又は一時的な業務能力不足）によって、又は継続的に（例えば、無期限の下請負契約、業務代行又はフランチャイズ契約によって）業務を下請負契約する場合には、この業務を適格な能力をもつ下請負契約者に行わせる。適格な能力をもつ下請負契約者とは、例えば、当該業務についてこの規格に適合する者である。

4.5.2 試験所・校正機関は、依頼者に対して書面によって取決めを通知し、適切な場合には、なるべく書面によって依頼者の承認を得る。

4.5.3 試験所・校正機関は、依頼者又は規制当局がどの下請負契約者を用いるべきかを指定する場合を除き、依頼者に対して下請負契約者の業務に関する責任を負う。

4.5.4 試験所・校正機関は、試験又は校正のために用いるすべての下請負契約者の登録簿及び当該業務に関するこの規格への適合性の証拠の記録を維持する。

4.6 サービス及び供給品の購買

4.6.1 試験所・校正機関は、自身が使用するサービス及び供給品で試験・校正の品質に影響するものの選定及び購買について方針及び手順をもつ。試験及び校正に係る試薬及び消耗品の購買、受入れ及び保管についても手順をもつ。

4.6.2 試験所・校正機関は、購入された供給品、試薬及び消耗品で試験・校正の品質に影響を与えるものは、関係する試験・校正方法で規定された標準仕様又は要求事項に適

合することを検査又は別の方法で検証が済むまでは使用しないことを確実にする。使用するサービス及び供給品は、規定された要求事項を満たす。適合性をチェックするために取った処置の記録を維持する。

4.6.3 試験所・校正機関の結果(output)の品質に影響する品目に関する購買文書には、発注するサービス及び供給品を記述するデータを含める。これらの購買文書は、発行に先立ってその技術的内容に関する確認及び承認を行う。参考記述には、型式(type)、分類(class)、等級(grade)、詳細な識別、仕様、図面、検査指示書、試験結果の承認を含むその他の技術データ、要求品質及びその製造に関与した品質システム規格などが含まれることがある。

4.6.4 試験所・校正機関は、試験・校正の品質に影響する重要な消耗品、供給品及びサービスの供給者の評価を行い、これらの評価の記録及び承認された供給者のリストを維持する。

4.7 依頼者へのサービス

試験所・校正機関は、依頼者又はその代理者に対し、実施業務に関する依頼者の要求の明確化及び他の依頼者に対する守秘義務を守るという条件で、試験所・校正機関の実行状況の監視のための協力を提供する。

参考

1. この協力には次の事項が含まれることがある。

- a) 依頼者又はその代理者が、依頼者のために実施される試験・校正に立ち会う目的で試験所・校正機関の関連場所に正当な理由で立ち入れるようにする。
- b) 検証の目的で依頼者が必要とする、試験・校正品目の準備、包装及び輸送。

2. 依頼者は、良好な情報伝達の維持、技術的事項に関する助言及び指導並びに結果に基づく意見及び解釈を価値あるものと見なしている。依頼者との情報伝達は、特に大規模な業務の場合、業務期間全体を通じて維持することが望ましい。試験所・校正機関は、試験・校正の実施における何らかの遅延又は重大な逸脱について依頼者に知らせることが望ましい。

3. 試験所・校正機関は、依頼者からその他のフィードバック（例えば依頼者調査による）を、肯定的なもの及び否定的なもの両方取得することが推奨される。フィードバック情報は、品質システム、試験・校正活動及び依頼者へのサービスの改良に用いることが望ましい。

4.8 苦情

試験所・校正機関は、依頼者又はその他の利害関係者から受けた苦情を解決するための方針及び手順をもつ。すべての苦情の記録並びに試験所・校正機関が行った調査及び是正処置の記録を維持する（4.10 参照）。

4.9 不適合の試験・校正業務の管理

試験所・校正機関は、自身の試験・校正業務又はその結果が何らかの側面で自身の手順
4.9.1 又は依頼者と合意した要求事項に適合していない場合に実施すべき方針及び手順をもつ。この方針及び手順は、次の事項を確実にする。

- a) 不適合業務の管理に関する責任者及び権限者を指名し、不適合業務が特定された場合、処置（必要に応じ、業務の中止並びに試験報告書及び校正証明書の発行保留を含む）

を確定し、実施する。

- b) 不適合業務の重大さの評価を行う。
- c) 不適合業務の容認に関する何らかの決定と共に、是正処置を直ちに取る。
- d) 必要な場合、依頼者に通知して業務結果を回収する。
- e) 業務の再開を認める責任を明確に規定する。

参考

不適合業務の特定又は品質システム若しくは試験・校正活動に関する問題の特定は、品質システム及び技術的運営のいろいろな場面で起こり得る。事例として、顧客の苦情、品質管理、機器の校正、消耗品のチェック、職員の監視及び監督、試験報告書・校正証明書のチェック、マネジメント・レビュー及び内部監査又は外部監査がある。

4.9.2 評価によって、不適合業務が再発し得ること又は試験所・校正機関の方針及び手順に対する自身の運営の適合性に疑いがあることが示された場合、4.10 に規定する是正処置の手順を速やかに実施する。

4.10 是正処置

4.10.1 一般

試験所・校正機関は、不適合業務が特定された場合又は品質システム及び技術的運営の方針及び手順からの逸脱が特定された場合、是正処置を実施するための方針及び手順を確立し、適切な権限者を指名する。

参考

試験所・校正機関の品質システム又は技術的運営に関する問題は、例えば、不適合業務の管理、内部監査又は外部監査、マネジメント・レビュー、依頼者からのフィードバック又は職員の観察などの種々の活動を通じて特定されることがある。

4.10.2 原因分析

是正処置の手順は、問題の根本原因を特定するための検討から始める。

参考

原因分析は是正処置の最も重要な部分であり、時には最も困難な部分である。しばしば根本原因は明白ではなく、したがって問題のすべての潜在的原因を注意深く分析することが要求される。潜在的原因には、依頼者の要求事項、試料、試料の仕様、方法及び手順、職員の技量及び教育・訓練、消耗品又は設備及びその校正が含まれ得る。

4.10.3 是正処置の選定及び実施

是正処置が必要な場合、試験所・校正機関は可能性のある是正処置を特定する。試験所・校正機関は、問題を除去し再発を防止する可能性が最も高い処置を選定し、実施する。是正処置は、その問題の重大さ及びリスクに比べて適切な程度である。試験所・校正機関は、是正処置の検討から生じた必要な変更をすべて文書化し、実施する。

4.10.4 是正処置の監視

試験所・校正機関は、取られた是正処置が効果的であったことを確認するため、結果を監視する。

4.10.5 追加監査

不適合又は逸脱の特定が、試験所・校正機関の方針及び手順又はこの規格に対する適合性に疑問を投げかける場合、試験所・校正機関は該当活動範囲に対する追加監査を 4.13

の規定に従ってできるだけ速やかに実施することを確実にする。

このような追加監査は、是正処置の実施に引き続いてその有効性を確かめるために行われ参考れることが多い。追加監査は、営業上の重大な問題又はリスクが特定された場合にだけ必要とされるべきである。

4.11 予防処置

4.11.1 技術面及び品質システムに関して、必要とされる改良及び不適合の潜在的原因を特定する。

予防処置を取る必要がある場合には、そのような不適合が起こる可能性を減らし改良の機会を活用す

るため、行動計画を作成し、実施し、かつ監視する。

4.11.2 予防処置の手順には、そのような処置の開始及びそれらの有効性を確認するための管理の適用を含める。

参考 1

予防処置は、問題の特定又は苦情に対する対応処置ではなく、むしろ改良の機会を特定するための先行的プロセスの一つである。

参考 2

予防処置には、運営上の手順の見直しのほか、傾向分析及びリスク分析並びに技能試験結果の分析を含め、データの分析が関与することがある。

4.12 記録の管理

4.12.1 一般

4.12.1.1 試験所・校正機関は、品質記録及び技術的記録の識別、収集、見出し付け、利用、ファイリング、保管、維持及び廃棄の手順を確立し、維持する。品質記録には、是正処置及び予防処置の記録と同時に内部監査及びマネジメント・レビューの報告を含める。

4.12.1.2 防止に適した環境を備えた施設中において、容易に検索できるような方法で保管し、維持する。記録を維持する期間を確定する。

参考

記録は、ハードコピー又は電子的媒体など、いかなる媒体によってもよい。

4.12.1.3 すべての記録は、機密保持の下で安全に保管する。

4.12.1.4 試験所・校正機関は、電子的に保存されている記録のバックアップ及び保護の手順、及びそのような記録への無許可のアクセス又は修正を防止する手順をもつ。

4.12.2 技術的記録

4.12.2.1 試験所・校正機関は、観測原本の記録、監査の追跡を確保するための誘導データ及び十分

な情報、校正の記録、職員の記録、並びに発行された個々の試験報告書又は校正証明書のコピーを、

規定された期間維持する。個々の試験・校正に関する記録は十分な情報を含み、可能な場合、不確かさに影響する因子の特定を容易にし、元の条件にできるだけ近い条件での試験又は校正の繰返しを可能とするものである。記録は、サンプリング、個々の試験・校正の実施及び結果のチェックに責任をもつ要員の識別を含む。

参考 1.

ある分野では、すべての観測原本の記録を保管することが（原理的に）不可能な場合又は実際的でない場合があるであろう。

2. 技術的記録は、試験又は校正を実施することによって得られ、また規定された品質パラメータ又はプロセス・パラメータが達成されたかどうかを示すデータ（5.4.7参照）と情報の集積である。そこには、書式、契約書、作業票、作業基準書、チェック票、作業ノート、管理グラフ、外部及び内部の試験報告書及び校正証明書、依頼者の注意書・書類・フィードバックが含まれるであろう。

4.12.2.2 観測結果、データ及び計算は、それらが作成される時点において記録され、特定の業務において識別可能にする。

4.12.2.3 記録に誤りが発生した場合には、それらを抹消したり見えなくしたり削除したりせず、個々の誤りに訂正線を施し、その側に正しい値を記入する。記録に対する訂正のすべてに、その訂正を行った人物の署名又はイニシャルを付ける。電子的に保管されている記録の場合にも、元のデータの消失又は変更を防止するために同等の手段を講じる。

4.13 内部監査

4.13.1 試験所・校正機関は、その運営が品質システムの要求事項及びこの規格の要求事項に継続して適合していることを検証するため、定期的に、かつ予め定められたスケジュール及び手順にしたがって、自身の活動の内部監査を実施する。内部監査のプログラムは、試験・校正活動を含め、すべての品質システムの要素を対象とする。スケジュールの要求及び管理主体の要望に沿うように監査を計画し、実施することは品質管理者の責任である。このような監査は、訓練を受け資格認定された要員で、経営資源が許す限り、監査される活動から独立した要員が行う。

参考

内部監査の1サイクルは、通常、一年以内に完了することが望ましい。

4.13.2 監査の所見が試験所・校正機関の運営の有効性又は試験・校正結果の正確さ又は妥当性に疑問を投げかける場合には、試験所・校正機関は時機を失することなく是正処置を取り、もし試験・校正結果が影響を受けた可能性を検討結果が示すならば依頼者にこの旨を書面で通知する。

4.13.3 監査された活動分野、監査の所見及びそれらから生じた是正処置を記録する。

4.13.4 フォローアップ監査活動では、取られた是正処置の実施内容と効果とを検証し、記録する。

4.14 マネジメント・レビュー

4.14.1 予め決定されたスケジュール及び手順に従って、試験所・校正機関の経営管理主体は、試験所・校正機関の品質システム及び試験・校正活動が継続して適切かつ有効であることを確実にするため、及び必要な変更又は改良を導入するために、品質システム及び試験・校正活動のレビューを定期的実施する。レビューは次の事項を考慮する。

- － 方針及び手順の適切さ
- － 管理要員及び監督要員からの報告
- － 最近の内部監査の結果
- － 是正処置及び予防処置
- － 外部機関による審査

- － 試験所間比較又は技能試験の結果
- － 業務の量及び種類の変化
- － 依頼者からのフィードバック
- － 苦情
- － 品質管理活動、経営資源、職員の訓練など、その他の関係要因

マネジメント・レビューを行う典型的な周期は、12 参考 1. か月に 1 回である。

2. 結果を試験所・校正機関の企画システムに導入し、そこに次年度の目的、達成目標及び行動

計画を含めることが望ましい。

3. マネジメント・レビューは、定例的な経営会議における関連問題の検討を含む。

4. 14.2 マネジメント・レビューの所見及びそれらから生じた処置を記録する。管理主体は、それらの処置が適切かつ取決めによる期間内に実行されることを確実にする。

5 技術的要求事項

5.1 一般

5.1.1 多くの要因が、試験所・校正機関によって実施された試験・校正の正確さ及び信頼性を決定する。これらの要因には次の事項からの寄与が含まれる。

- － 人間の要因 (5.2)
- － 施設及び環境条件 (5.3)
- － 試験・校正方法及び方法の妥当性確認 (5.4)
- － 設備 (5.5)
- － 測定のトレーサビリティ (5.6)
- － サンプルング (5.7)
- － 試験・校正品目の取扱い (5.8)

5.1.2 要因が総合的な測定の不確かさに寄与する程度は、個々の試験（の種類）及び個々の校正（の種類）によってかなり異なる。試験所・校正機関は、試験・校正方法及び手順の開発において、要員の教育・訓練及び資格認定において、並びに使用する設備の選定及び校正において、これらの要因を考慮する。

5.2 要員

5.2.1 試験所・校正機関の管理主体は、特定の設備の操作、試験又は校正の実施、結果の評価及び試験報告書並びに校正証明書への署名を行うすべての要員が適格であることを確実にする。教育・訓練中の職員を使用するときは、適切な監督を行うこと。特定の業務を行う要員は、必要に応じて適切な教育、訓練、経験及び/又は技量の実証に基づいて資格付与される。

参考

1. ある技術分野（例えば非破壊試験）では、特定の業務を実施する要員は、要員認証を保持する必要があるだろう。試験所・校正機関は、規定の要員認証に関する要求事項を満たす責任がある。要員認証に関する要求事項は、法令に含まれていたり、特定の技術分野の規格に含まれていたり、依頼者から要求されたりすることがある。

2. 試験報告書に含まれる意見及び解釈に責任をもつ要員は、実施された試験に関する適切な資格付与、教育・訓練、経験及び十分な知識に加えて、次の知識及び理解をもつことが望ましい。

- － 試験された品目、材料、製品等の製造に用いられた技術に関する必要な知識、又はそれらが使用される方法若しくは使用を意図する方法、それらの使用中若しくは使用期間中に生じ得る欠陥又は劣化に関する必要な知識。
- － 法令及び規格に述べられている一般要求事項に関する知識。
- － その品目、材料、製品等の通常の用途について見られる逸脱の重大さに関する理解。

5.2.2 試験所・校正機関の管理主体は、試験所・校正機関の要員の教育、訓練及び技量に関する目標を設定する。試験所・校正機関は、教育・訓練のニーズを特定し、要員に教育・訓練を提供するための方針及び手順をもつ。教育・訓練プログラムは、試験所・校正機関の現在の業務及び予期される業務に対して適切である。

5.2.3 試験所・校正機関は、試験所・校正機関に雇用された要員又は試験所・校正機関と契約を結んだ要員を使用する。契約による要員並びに追加の技術要員及び主要な役割の支援要員を使用する場合、試験所・校正機関は、それらの要員が監督下に置かれ、適格であり、試験所・校正機関の品質システムに従って業務を行うことを確実にする。

5.2.4 試験所・校正機関は、試験・校正に関与する管理要員、技術要員及び主要な役割の支援要員に対する現行の職務規定を維持する。

参考

職務規定は、種々の方法で規定され得る。少なくとも次の事項を規定することが望ましい。

- － 試験・校正の実施に関する責任
- － 試験・校正の計画立案及び結果の評価に関する責任
- － 意見及び解釈を報告する責任
- － 方法の変更及び開発並びに新規の方法の妥当性確認に関する責任
- － 専門知識及び経験
- － 資格付与及び教育・訓練プログラム
- － 管理上の職務

5.2.5 管理主体は、特定のタイプのサンプリング・試験・校正の実施、試験報告書及び校正証明書の発行、意見及び解釈の提供並びに特定のタイプの設備の操作を行うため、特定の要員に権限を与えること。試験所・校正機関は、契約による要員を含め、すべての技術要員に対し、該当する権限付与、適格性、教育上及び職業上の資格付与、教育・訓練、技能及び経験に関する記録を維持する。この情報はいつでも利用できる状態に置かれ、権限授与及び/又は適格性確認の日付を含む。

5.3 施設及び環境条件

5.3.1 試験所・校正機関の試験・校正のための施設は、エネルギー源、照明、環境条件等（これらに限定されない）を含め、試験・校正の適正な実施を容易にするようなものである。試験所・校正機関は、すべての測定の実施品質に対して環境条件が結果を無効にしたり悪影響を及ぼしたりしないことを確実にする。サンプリング、試験又は校正が試験所・校正機関の恒久的な施設以外の場所で行われる場合には、特別の注意を払うこ

と。試験・校正の結果に影響する施設及び環境条件に関する技術的要求事項を文書化する。

5.3.2 試験所・校正機関は、該当する仕様、方法及び手順の要求に応じて、又は環境条件が結果の品質に影響する場合、環境条件を監視し、制御し、記録する。関係する技術的活動に合わせて、例えば、生物学的無菌状態、ほこり、電磁障害、放射、湿度、電力供給、温度及び音響・振動レベルなどに対して相応の注意を払う。環境条件が試験又は校正の結果を危うくする場合には試験又は校正を中止する。

5.3.3 両立不可能な活動が行われている隣接区域との間に効果的な分離を施す。混入汚染を防止する手段を講じる。

5.3.4 試験・校正の品質に影響する区域への立入り及び使用を管理する。試験所・校正機関は、特有の状況に応じて管理の範囲・程度を定める。

5.3.5 試験所・校正機関内の良好な整理・整頓・衛生を確実にするための手段を講じる。必要な場合には、特別の手順を準備する。

5.4 試験・校正の方法及び方法の妥当性確認

5.4.1 一般

試験所・校正機関は、業務範囲内のすべての試験・校正について適切な方法及び手順を用いる。それらの方法には、試験又は校正を行うべき品目のサンプリング、取扱い、輸送、保管及び準備が含まれ、また、適切な場合、測定の不確かさの推定及び試験・校正データの分析のための統計的手法が含まれる。試験所・校正機関は、指示書なしでは試験・校正の結果が危ぶまれる場合には、すべての関連設備の使用及び操作並びに試験又は校正を行う品目の取扱い及び準備について指示書をもつ。試験所・校正機関の業務に関係するすべての指示書、規格、マニュアル及び参照データは最新の状態に維持し、要員がいつでも利用できる状態にしておく（4.3 参照）。試験・校正方法からの逸脱は、その逸脱が予め文書化され、技術的に正当な根拠が示され、正式に許可され、かつ依頼者によって受け入れられている場合にだけ生じる。

参考

試験・校正の実施方法について十分かつ簡潔な情報を含む国際規格、地域規格若しくは国家規格又はその他の広く認められている仕様書が発行されていて、そのまま試験所・校正機関の実施要員が使用できるような方法で記述されている場合には、内部手順書として補足したり、書き直したりする必要はない。その方法の中の選択的な手段又は補足的詳細について、追加の文書を与える必要があり得る。

5.4.2 方法の選定

試験所・校正機関は、サンプリングの方法を含め、依頼者のニーズを満たし、かつ請け負う試験又は校正に対して適切な試験又は校正方法を使用する。国際規格、地域規格又は国家規格として発行されている方法を優先的に使用する。試験所・校正機関は、実施が不適當又は不可能な場合を除き、規格の最新版の使用を確実にする。必要な場合には、規格の整合した適用を確実にするため、詳細事項の追加によって規格を補足する。依頼者が使用すべき方法を指定しない場合、試験所・校正機関は、国際規格、地域規格若しくは国家規格、定評ある技術機関の出版物、又は該当する科学文献若しくは定期刊行物として公表されている適切な方法、又は設備の製造者が指定する方法のいずれかを

選定する。試験所・校正機関が開発した方法又は採用した方法も、それらが意図する用途に適切であり、かつ妥当性確認が行われている場合は使用することができる。選定した方法を依頼者に通知する。試験所・校正機関は、規格に規定された方法を試験又は校正に導入する前に、自身がその方法を適切に実施できることを確認する。規格に規定された方法が変更された場合には、再度確認する。依頼者から提案された方法が不相当又は旧式と考えられる場合には、試験所・校正機関はその旨を依頼者に通知する。

5.4.3 試験所・校正機関が開発した方法

試験所・校正機関が自身の使用のために開発した試験・校正方法の導入は計画に基づいた活動であり、かつ、十分な経営資源をもち資格を付与された要員に割り当てる。計画は開発の進行につれて更新し、すべての関係要員の間で効果的な情報交換を確実にする。

5.4.4 規格外の方法

規格に規定された方法に含まれない方法を使用する必要がある場合、これらの方法は、依頼者の同意に基づいて採用し、依頼者の要求事項及び試験・校正の目的の明確な規定を含む。開発された方法は、使用前に適切な妥当性確認を行う。新規の試験・校正方法については、試験又は校正を実施する前に手順書を作成し、それ参考には少なくとも次の情報を含めることが望ましい。

- a) 適切な識別
- b) 適用範囲
- c) 試験又は校正を行うべき品目の種類 (type) の記述
- d) 決定すべきパラメータ又は量及び範囲
- e) 装置及び設備、技術的機能に関する要求事項
- f) 要求される参照標準及び標準物質
- g) 要求される環境条件及び必要な安定化期間
- h) 次の事項を含む手順の記述
 - － 試験・校正品目の識別表示、取扱い、輸送、保管及び準備
 - － 業務開始前に行うべきチェック
 - － 設備が適正に作動していることのチェック、及び、要求される場合、毎回の使用前の設備の校正及び調整
 - － 観測及び結果を記録する方法
 - － 遵守すべき何らかの安全対策
- i) 承認・不承認に関する基準及び/又は要求事項
- j) 記録すべきデータ並びに分析及び提示の方法
- k) 不確かさ又は不確かさの推定に関する手順

5.4.5 方法の妥当性確認

5.4.5.1 妥当性確認とは、意図する特定の用途に対して個々の要求事項が満たされていることを調査によって確認し、客観的な証拠を用意することである。

5.4.5.2 試験所・校正機関は、規格外の方法、試験所・校正機関が設計・開発した方法、意図された適用範囲の外で使用する規格に規定された方法、並びに規格に規定された方法の拡張及び変更について、それらの方法が意図する用途に適することを確認するために妥当性確認を行う。妥当性確認は、当該適用対象又は適用分野のニーズを満たすために必要な程度まで幅広く行う。試験所・校正機関は、得られた結果、妥当性確認に用いた手順及びその方法が意図する用途に適するか否かの表明を記録する。

参考

1. 妥当性確認は、サンプリング、取扱い及び輸送の手順を含むことがある。
2. 方法の良否の確定に用いる手法は、次の事項のうちの一つ又はそれらの組合せであることが望ましい。
 - － 参照標準又は標準物質を用いた校正
 - － 他の方法で得られた結果との比較
 - － 試験所間比較
 - － 結果に影響する要因の系統的な評価
 - － 方法の原理の科学的理解及び実際の経験に基づいた、結果の不確かさの評価妥当性が確認された規格外の方法を変更する場合は、そのような変更の影響を文書化³し、適切ならば新規の妥当性確認を行うことが望ましい。

5.4.5.3 妥当性が確認された方法によって得られる値の範囲及び正確さ {例えば、結果の不確かさ、検出限界、方法の選択性、直線性、繰返し性及び/又は再現性の限界、外部影響に対する頑健性又は試料・試験対象の母材からの干渉に対する相関感度 (cross-sensitivity)} は、意図する用途に対する評価において依頼者のニーズに適する。

参考1. 妥当性確認は、要求事項の明確化、方法の特性の確定、その方法によって要求事項が満たされるかどうかのチェック、及び有効性に関する表明を含む。

2. 方法の開発の進行につれて、依頼者のニーズが依然として満たされていることを検証するため、定期的な見直しを実施することが望ましい。開発計画の修正を必要とする要求事項の何らかの変更は、承認され、権限付与されることが望ましい。

3. 妥当性確認は、常にコスト、リスク及び技術的可能性のバランスによる。情報の不足によ

って、値の範囲及び不確かさ {例えば、正確さ、検出限界、選択性、直線性、繰返し性、再

現性、頑健性及び相関感度 (cross-sensitivity)} を簡略化された方法でしか示し得ない場合が

多く存在する。

5.4.6 測定の不確かさの推定

5.4.6.1 校正機関又は自身の校正を実施する試験所は、すべての校正及びすべてのタイプの校正について測定の不確かさを推定する手順をもち、適用する。

5.4.6.2 試験所は、測定の不確かさを推定する手順をもち、適用する。ある場合には、試験方法の性質から厳密で計量学的及び統計学的に有効な測定の不確かさの計算ができないことがある。このような場合には、試験所は少なくとも不確かさのすべての要因の特定を試み、合理的な推定を行い、報告の形態が不確かさについて誤った印象を与えないことを確実にする。合理的な推定は、方法の実績に関する知識及び測定の有効範囲 (scope) に基づくものであり、例えば以前の経験又は妥当性確認のデータを活用したものである。

参考

1. 測定の不確かさの推定において必要とされる厳密さの程度は、次のような要因に依存する。
 - － 試験方法の要求事項
 - － 依頼者の要求事項

ー 仕様への適合性を決定する根拠としての狭い限界値の存在

広く認められた試験方法が測定の不確かさの主要な要因の値に限界を定め、計2. 算結果の表現形式を規定している場合には、試験所はその試験方法及び報告方法の指示に従うことによってこの項目を満足すると考えられる (5.10 参照)。

5.4.6.3 測定の不確かさを推定する場合には、適切な分析方法を用いて当該状況下で重要なすべての不確かさの成分を考慮する。

参考

1. 不確かさに寄与する源には、用いた参照標準及び標準物質、用いた方法及び設備、環境条件、試験・校正される品目の性質及び状態並びに試験・校正実施者が含まれるが、これらに限定されない。

2. 予想されている試験・校正品目の長期の挙動は、通常、測定の不確かさを推定する際に考慮に入れない。

3. この問題について更に情報を得るには、JIS Z 8402 及び「測定の不確かさの表現の指針

(GUM)」を参照する (参考文献参照)。

5.4.7 データの管理

5.4.7.1 計算及びデータ転送は、系統的な方法で適切なチェックを行う。

5.4.7.2 コンピュータ又は自動設備を試験・校正データの集録、処理、記録、報告、保管又は検索

に使用する場合には、試験所・校正機関は次の事項を確実にする。

a) 使用者が開発したコンピュータ・ソフトウェアは、十分な詳しさと文書化され、用途に対して十分であることが適切に妥当性確認されている。

b) データを保護するための手順が確立され、実施されている。この手順は、データ入力又は収集、データ保存、データ伝達及びデータ処理の完全性並びに機密保持を含まなければならないが、これらに限定されない。

c) コンピュータ及び自動設備は適正な機能を確保するように保全管理され、試験・校正データの完全性を維持するために必要な環境条件及び運転条件が与えられている。

参考一般的に使用されている市販の既製品のソフトウェア (例えば、ワードプロセッサ、データベース及び統計プログラム) は、設計上の適用範囲内においては、十分に妥当性確認されたものと考えてよい。しかし、試験所・校正機関におけるソフトウェアの構成 (configuration)・修正は、5.4.7.2a) に規定されている妥当性確認を行うことが望ましい。

5.5 設備

試験所・校正機関は、試験・校正の適正な実施 (サンプリング、試験・校正 5.5.1 品目の準備、試験・校正データの処理及び分析を含む) のために要求されるすべてのサンプリング、測定及び試験の設備の各品目を保有する。試験所・校正機関が恒久的に管理している設備以外の設備を使用する必要がある場合には、この規格の要求事項が満たされていることを確実にする。

5.5.2 試験、校正及びサンプリングに使用する設備並びにそのソフトウェアは、要求される正確さを達成する能力をもち、かつ、当該試験又は校正に適用される仕様に適合する。機器の特性が結果に重大な影響をもつ場合には、機器の主要な量又は値に対する校正プログラムを確立する。設備 (サンプリング用の設備を含む) は、業務使用に導入する前に、それらが試験所・校正機関の仕様の要求事項を満たし、かつ該当する標準仕様

に適合することを確実にするために校正又はチェックを行う。それらは使用前にもチェック及び/又は校正を行う（5.6 参照）。

5.5.3 設備は、権限を付与された要員が操作する。（設備の製造者が用意した該当する使用説明書を含め）設備の使用及び保安全管理に関する最新の指示書を、試験所・校正機関の担当要員がいつでも利用できる状態にしておく。

5.5.4 試験及び校正に使用され結果にとって重要な設備の品目及びそのソフトウェアは、実行可能な場合、それぞれ個々に識別しておく。

5.5.5 実施された試験又は校正にとって重要な設備の個々の品目及びそのソフトウェアの記録を維持する。記録には少なくとも次の事項を含める。

- a) 設備の品目及びそのソフトウェアの個体識別
- b) 製造業者の名称、型式の識別、及び一連番号又はその他の識別
- c) 設備が仕様に適合することのチェック（5.5.2 参照）
- d) 適切な場合、現在の所在場所
- e) 利用できるときは、製造業者の指示書、又はその所在場所
- f) すべての校正、調整、受入基準の日付、結果及び報告書と証明書のコピー、及び次回に校正を行うべき期日
- g) 現在までに行われた保安全管理及び適切な場合は保全計画
- h) 設備の損傷、機能不良、改造又は修理

5.5.6 試験所・校正機関は、測定設備の適正な機能を確保し、汚染又は劣化を防止するため、測定設備の安全な取扱い、輸送、保管、使用及び保全計画の手順をもつ。

参考

測定設備を試験所・校正機関の恒久施設の外で試験、校正又はサンプリングに使用する場合には、追加の手順が必要な場合がある。

5.5.6 試験所・校正機関は、測定設備の適正な機能を確保し、汚染又は劣化を防止するため、測定設備の安全な取扱い、輸送、保管、使用及び保全計画の手順をもつ。

参考

測定設備を試験所・校正機関の恒久施設の外で試験、校正又はサンプリングに使用する場合には、追加の手順が必要な場合がある。

5.5.7 過負荷又は誤った取扱いを受けた設備、疑わしい結果を生じる設備、若しくは欠陥をもつ又は規定の限界外と認められる設備は、業務使用から取り外す。その設備は、それが修理されて正常に機能することが校正又は試験によって示されるまで、使用を防止するため隔離するか、業務使用外であることを示す明りょうなラベル付け又はマーク付けを行う。試験所・校正機関は、この欠陥又は規定の限界からの逸脱が以前に行った試験又は校正に及ぼした影響を調査し、「不適合業務の管理」の手順を開始する（4.9 参照）。

5.5.8 実行可能な場合、試験所・校正機関の管理下において校正を必要とするすべての設備に対し、最後に校正された日付及び再校正を行うべき期日又は有効期間満了の基準を含め、校正の状態を示すためのラベル付け、コード付け又はその他の識別を施す。

いかなる理由であろうと設備が試験所・校正機関の直接の 5.5.9 管理下からある期間離脱した場合には、試験所・校正機関は、その設備が業務使用に戻される前に機能及び校正状態がチェックされ、満足であると認められたことを確実にする。

5.5.10 設備の校正状態について信頼を維持するために中間チェックが必要な場合には、これらのチェックは規定された手順に従って実施する。

5.5.11 校正によって一連の補正因子が必要となった場合には、試験所・校正機関はそのすべての複製物（例えばコンピュータ・ソフトウェア中の）を正しく更新することを確実にする手順をもつ。

5.5.12 ハードウェア及びソフトウェアの両者を含め、試験・校正設備は、試験・校正結果を無効にするおそれのある調節を受けないように防護する。

5.6 測定のトレーサビリティ

5.6.1 一般

試験、校正又はサンプリングの結果の正確さ若しくは有効性に重大な影響をもつすべての試験・校正用設備は、補助的測定用（例えば、環境条件の測定用）の設備も含め、業務使用に導入する前に校正する。試験所・校正機関は、自身の設備の校正のための確立されたプログラム及び手順をもつ。

参考

このようなプログラムは、測定標準、測定標準として用いる標準物質、並びに試験及び校正に用いる測定設備並びに試験設備の選定、使用、校正、チェック、管理及び保全のためのシステムを含むことが望ましい。

5.6.2 特定要求事項

5.6.2.1 校正

5.6.2.1.1 校正機関においては、設備の校正のためのプログラムは、その校正機関が行った校正及び測定が国際単位系（以下、S I という。）に対してトレーサブルであることを確実にするように設計し運用する。

校正機関は、自身の測定標準及び測定機器の S I に対するトレーサビリティを、それらの標準及び機器と、該当する S I 単位の一次標準とをつなぐ切れ目のない校正又は比較の連鎖によって確立している。S I 単位へのつながりは、国家計量標準への参照によって達成されるであろう。国家計量標準は、S I 単位の一次実現又は基礎物理定数に基づく S I 単位の合意された代表値による一次標準であるか、又は他国の国家計量機関によって校正された二次標準であってよい。外部の校正サービスを利用する場合には、業務の適格性、測定能力及びトレーサビリティを実証できる校正機関の校正サービスを利用することによって測定のトレーサビリティを確実にする。これらの機関が発行する校正証明書は、測定の不確かさ及び/又は特定された計量仕様への適合性の表明を含め、測定結果をもつ（5.10.4.2 を参照）。

参考

1. この規格の要求事項を満たす校正機関は適格であると見なされる。その校正に関してこの規格に基づく認定を受けた校正機関から発行される認定ロゴ付きの校正証明書は、報告された校正データのトレーサビリティの十分な証拠である。

2. S I 単位へのトレーサビリティは、適切な一次標準 (VIM:1993, 6.4 参照) を参照するか、又は該当する S I 単位による値が知られており国際度量衡総会 (CGPM) 及び国際度量衡委員会 (CIPM) によって推奨されている自然定数を参照することによって達成できる。

3. 自身で一次標準又は基礎物理定数に基づく S I 単位の代表値を維持する校正機関は、これら

の標準が直接的又は間接的に国家計量機関の同種の標準と比較された後においてだけ、S I へのトレーサビリティを主張できる。

4. 「特定された計量仕様」という用語は、校正証明書にその仕様を含めるか又は仕様の明確な引用を示すことによって、測定がどの仕様と比較されたかが校正証明書によって明確にされるべきことを意味している。

5. トレーサビリティに関連して「国際標準」又は「国家標準」という用語が使われる場合、これらの標準は S I 単位を実現するための一次標準の特性を満たすものと見なされる。

6. 国家計量標準へのトレーサビリティは、必ずしもその校正機関が所在する国の国家計量機関の利用を必要としない。

7. 校正機関が自国以外の国家計量機関からトレーサビリティを得ることを望む又は必要とする

場合には、その校正機関は、直接又は地域グループを通して BIPM の活動に積極的に参加している国家計量機関を選ぶことが望ましい。

8. 切れ目のない校正又は比較の連鎖は、トレーサビリティを実証できる別々の校正機関で行われたいくつかの段階によって達成されることもある。

5.6.2.1.2 現状では厳密に S I 単位によって行うことができないある種の校正が存在する。この場合には、次のような適切な測定標準へのトレーサビリティを確立することによって測定への信頼を与える。

— 物質の信頼できる物理的又は化学的特性を与えるために適格な供給者から供給された認証標準物質の使用

— 明確に記述され、すべての関係者によって合意されている規定された方法及び/又は合意標準の使用可能な場合、適切な試験所間比較プログラムへの参加が要求される。

5.6.2.2 試験

5.6.2.2.1 試験所においては、試験結果の不確かさの全体に対する校正の寄与分がごくわずかであると確認されていない限り、測定設備及び測定機能を利用する試験設備に対して 5.6.2.1 に規定する要求事項が適用される。この状況において、試験所は使用する設備が必要とされる水準の測定の不確かさを与え得ることを確実にする。

参考

5.6.2.1 の要求事項にどの程度まで従うべきかは、全体の不確かさに対する校正の不確か

さの寄与の割合に依存している。校正が主要な要因である場合には要求事項に厳密に従うことが望ましい。

5.6.2.2.2 S I 単位へのトレーサビリティが不可能な場合及び/又は当てはまらない場合には、校正機関に対する要求事項 (5.6.2.1.2 参照) と同様に、例えば認証標準物質、

合意された方法及び/又は合意標準へのトレーサビリティが要求される。

5.6.3 参照標準及び標準物質

5.6.3.1 参照標準

試験所・校正機関は、自身の参照標準の校正のためのプログラム及び手順をもつ。参照標準は、5.6.2.1 に規定されたトレーサビリティを与え得る機関によって校正されなければならない。試験所・校正機関が保有する参照標準は校正の目的だけに使用し、参照標準としての機能が無効にならないことを示し得る場合を除き、その他の目的には使用しない。参照標準は、何らかの調整の前及び後に校正する。

5.6.3.2 標準物質

標準物質は、可能な場合、S I 単位又は認証標準物質に対してトレーサブルである。内部標準物質は、技術的及び経 internal 済的に実行可能な程度までチェックする。

5.6.3.3 中間チェック

参照標準、一次標準、仲介標準又は実用標準、及び標準物質の校正状態の信頼を維持するために必要な中間チェックは、規定された手順及びスケジュールに従って実施する。

5.6.3.4 輸送及び保管

試験所・校正機関は、参照標準及び標準物質の汚染又は劣化を防止するため、及びそれらの完全性を保護するため、参照標準及び標準物質の安全な取扱い、輸送、保管及び使用のための手順をもつ。

参考

参照標準及び標準物質を試験、校正又はサンプリングのために試験所・校正機関の恒久施設以外の場所で使用する場合には、追加の手順が必要な場合がある。

5.7 サンプリング

5.7.1 試験所・校正機関は、試験・校正を行う予定の物質、材料又は製品のサンプリングを実施する場合、サンプリング計画及びサンプリング手順をもつ。サンプリング計画及びサンプリング手順は、サンプリングが行われる場所で利用できなければならない。サンプリング計画は、合理的である限り適切な統計的方法に基づかなければならない。サンプリングのプロセスは、試験・校正結果の有効性を確実にするために管理すべき要因を記述する。

参考

1. サンプリングとは、試験又は校正のために全体を代表するサンプルを用意するため、物質、材料又は製品の一部を取り出すための規定された手順である。サンプリングは、物質、材料又は製品の試験・校正に対して適用される仕様によっても要求されることがある。ある場合（例えば法廷用の分析）では、サンプルは規定された代表性をもたないことがあり、入手可能性によって決定されることがある。

2. サンプリング手順は、要求される情報を得るために、物質、材料又は製品からのサンプルの選定、サンプリング計画、抽出及び準備を記述することが望ましい。

5.7.2 依頼者が文書化されたサンプリング手順からの逸脱、追加又は除外を要求する場

合には、これらを適切なサンプリング・データと共に詳細に記録し、試験・校正結果を包含するすべての文書に記入し、関係要員に連絡する。

5.7.3 試験所・校正機関は、請け負った試験・校正の一部を構成するサンプリングに関係する該当データ及び操作を記録する手順をもつ。これらの記録は、用いたサンプリング手順、サンプリング実施者の識別、環境条件（該当する場合）及び必要に応じてサンプリング場所を特定するための図面又はその他の同等な手段、並びに、適切な場合、サンプリング手順の基準とされた統計手法を含む。

5.8 試験・校正品目の取扱い

5.8.1 試験所・校正機関は、試験・校正品目の完全性並びに試験所・校正機関及び依頼者の利益を保護するために必要なすべての規定を含め、試験・校正品目の輸送、受領、取扱い、保護、保管、保留及び/又は処分のための手順をもつ。

5.8.2 試験所・校正機関は、試験・校正品目を識別するためのシステムをもつ。この識別は、当該品目が試験所・校正機関において有効である期間の全体を通じて維持されていなければならない。識別システムは、品目の物理的な混同、又は記録若しくはその他の文書で引用する際の混同が起り得ないことを確保するように設計し運用する。識別システムは、適切ならば品目のグループの小分類並びに品目の試験所・校正機関内での輸送及び試験所・校正機関からの輸送を含む。

5.8.3 試験・校正品目を受領した際、何らかの異常、又は正常状態からの、若しくは該当の試験・校正方法に規定された状態からの逸脱を記録する。品目の試験・校正に対する適性に何らかの疑義がある場合、品目が添えられた記述に適合しない場合、若しくは要求される試験又は校正が十分詳細に規定されていない場合には、試験所・校正機関は、業務を進める前に更なる指示を求めて依頼者に相談し、討論の内容を記録する。

試験所・校正機関は、保管、取扱い及び準備の間に試験・校正品目が劣化、損失又は損傷を受けることを防止するための手順及び適切な施設をもつ。この場合、試験・校正品目に添えられた取扱いの指示に従う。品目が規定された環境条件の下での保管又は条件付けを必要とする場合には、これらの条件を維持し、監視し、記録する。試験・校正品目又はその一部分を、セキュリティの下に置かなければならない場合には、試験所・校正機関は、そのセキュリティ対象品目又はその一部分の状態及び完全性を保護するための、保管及びセキュリティに関する取決めをもつ。

参考

1. 試験品目が試験後に使用状態に復帰しなければならない場合には、取扱い、試験又は保管・待機のプロセスにおいて損害又は損傷を受けないことを確実にするための特別の注意が要求される。

2. 試験・校正結果に影響し得るサンプリング因子に関する情報を含め、サンプリング手順並びにサンプルの保管及び輸送に関する情報を、サンプルの取出し及び輸送に責任をもつ者に提供することが望ましい。

3. 試験・校正品目をセキュリティの下に置く理由は、記録のため、安全性若しくは高価値のため、又は後日に補足的な試験又は校正の実施を可能にするためであり得る。

5.9 試験・校正結果の品質の保証

試験所・校正機関は、請け負った試験・校正の有効性の監視のため品質管理手順をもつ。結果のデータは、傾向が検出できるような方法で記録し、実行可能な場合、結果の検討に統計的手法を適用する。この監視は計画化と見直しを行う。次の事項を含むのが良いが、これらに限定されない。

- a) 認証標準物質の定期的な使用及び/又は二次標準物質を用いた内部品質管理
- b) 試験所間比較又は技能 b) 試験プログラムへの参加
- c) 同じ方法又は異なる方法を用いた試験又は校正の反復
- d) 保留された品目の再試験又は再校正
- e) 一つの品目の異なる特性に関する結果の相関

参考

選択された方法は、請け負った業務の種類及び量に対して適切であることが望ましい。

5.10 結果の報告

5.10.1 一般

試験所・校正機関が実施した個々の試験・校正の結果又は一連の試験・校正の結果は、正確に、明瞭に、曖昧でなく、客観的に、及び試験・校正方法に特定の指示があれば、それに従って報告する。

結果は、通常、試験報告書又は校正証明書（参考 1 参照）の形で報告し、依頼者から要望され、かつ試験・校正結果の解釈に必要なすべての情報、及び用いた試験・校正方法が要求するすべての情報を含める。この情報は、通常、5.10.2、及び 5.10.3 又は 5.10.4 が要求するものである。試験・校正が内部の依頼者のために行われる場合、又は依頼者との間に書面による合意がある場合には、簡略化された方法で結果を報告してもよい。

5.10.2 から 5.10.4 までに規定されているが依頼者に報告されなかった何らかの情報は、試験又は校正を実施した試験所・校正機関においていつでも利用できる。試験報告書及び校正証明書は、時にはそれぞれ試験証明書及び校正報告書とも参考 1. 呼ばれる。

2. 試験報告書又は校正証明書は、この規格の要求事項が満たされている限り、ハードコピーとして又は電子的データ転送によって発行してよい。

5.10.2 試験報告書及び校正証明書

試験所・校正機関が正当な除外の理由をもつ場合を除き、個々の試験報告書又は校正証明書は少なくとも次の情報を含む。

- a) 題目（例えば「試験報告書」又は「校正証明書」）
- b) 試験所・校正機関の名称及び住所、並びに試験・校正がその住所以外で行われた場合はその場所
- c) 試験報告書又は校正証明書の識別（例えば、一連番号）、各ページ上にそのページが試験報告書又は校正証明書の一部であると確実に認められるための識別、及び試験報告書又は校正証明書の終わりを示す明りょうな識別
- d) 依頼者の名称及び住所
- e) 用いた方法の識別
- f) 試験・校正された品目の記述、状態及び明確な識別
- g) 結果の有効性及び利用にとって重要な場合には、試験・校正品目の受領の日付及び試験・校正を実施した日付
- h) サンプル計画及び手順が結果の有効性又は利用に関係する場合には、試験所・校正機関又はその他の機関が用いたサンプル計画及び手順の引用
- i) 試験・校正結果、適切な場合、測定単位を伴う
- j) 試験報告書又は校正証明書に発行権限をもつ人物の氏名、職能及び署名又は同等の識別
- k) 該当する場合、結果がその試験・校正品目だけに関するものであるという旨の表明

参考

1. 試験報告書及び校正証明書のハードコピーは、ページ番号及び全ページ数を表示することが望ましい。
2. 試験所・校正機関の書面による承認がない限り、試験報告書又は校正証明書の一部だけを複製してはならないと規定する試験所・校正機関の表明を含めることが推奨される。

5.10.3 試験報告書

5.10.2 の要求事項に加え、試験結果の解釈のために必要な 5.10.3.1 場合、試験報告書は次の事項を

含む。

- a) 試験方法からの逸脱、追加又は除外、及び環境条件など特定の試験条件に関する情報
- b) 該当する場合、要求事項及び/又は仕様に対する適合・不適合の表明
- c) 適用可能な場合、推定された測定の不確かさに関する表明。試験報告書中の不確かさに関する情報は、試験結果の有効性又は利用に関係する場合、依頼者の指示が要求する場合、若しくは不確かさが仕様の限界への適合性に影響する場合に必要とされる。

d) 適切かつ必要な場合、意見及び解釈 (5.10.5 参照)

e) 特定の方法、依頼者又は依頼者のグループによって要求されることがある追加の情報

5.10.3.2 5.10.2 及び 5.10.3.1 の要求事項に加え、試験結果の解釈に必要な場合、サンプリングの結果

を含む試験報告書は次の事項を含む。

- a) サンプリングの実施日
- b) サンプリングされた物質、材料又は製品の曖昧でない識別 (適切な場合、製造者の名称、指定されたモデル又は型式、及び一連番号)
- c) 何らかの図面、スケッチ又は写真を含め、サンプリングの場所
- d) 用いたサンプリング計画及び手順の引用
- e) 試験結果の解釈に影響するおそれがあるサンプリング中の環境条件の詳細
- f) サンプリングの方法又は手順に関する規格若しくはその他の仕様、及び関係する仕様からの逸脱、追加又は除外

5.10.4 校正証明書

5.10.4.1 5.10.2 の要求事項に加え、校正結果の解釈に必要な場合、校正証明書は次の事項を含む。

- a) 測定結果に影響をもつ、校正が実施された際の条件 (例えば環境条件)
- b) 測定の不確かさ及び/又は特定された計量仕様若しくはその項目に対する適合性の表明
- c) 測定がトレーサブルであることの証拠 (5.6.2.1.1、参考 2 参照)

5.10.4.2 校正証明書は、数量及び機能試験の結果だけに関するものとする。仕様に対する適合性が表明される場合には、この表明は、仕様のどの項目に適合又は不適合であるかを特定の示す。測定結果及び付帯する不確かさを省略した形で仕様への適合性を表明する場合には、校正機関は、これらの結果を記録し、将来起こり得る引用に備えて維持する。適合性の表明を行う場合には、測定の不確かさを考慮する。

5.10.4.3 校正すべき機器が調整又は修理された場合、入手可能ならば調整又は修理の前及び後の校正結果を報告する。

5.10.4.4 依頼者との合意がある場合を除き、校正証明書（又は校正ラベル）は校正周期に関する推奨を含んではならない。この要求事項は、法令の規定によって置き換えられることがある。

5.10.5 意見及び解釈

意見及び解釈を含める場合には、試験所は、意見及び解釈が形成された根拠を文書化する。意見及び解釈は、試験報告書においてその旨を明確に表示する。意見及び解釈を、ISO/IEC 17020 及び JIS Q 0065 が意図している検査及び製品認証参考 1. と混同しないことが望ましい。

2. 試験報告書に含まれる意見及び解釈は、次の事項を含むことがあるが、これらに限定されない。

- － 要求事項に対する結果の適合・不適合の表明に関する意見
- － 契約上の要求事項の充足
- － 結果の使用方法に関する勧告
- － 改良のために用いるべき指針

3. 多くの場合、意見及び解釈は依頼者との直接対話で伝えることが適切であろう。そのような対話は書き留めておくことが望ましい。

5.10.6 下請負契約者から得た試験・校正結果

試験報告書が下請負契約者によって実施された試験の結果を含む場合には、これらの結果を明りょうに識別する。下請負契約者は、書面又は電子的手段で結果を報告する。校正を下請負契約した場合には、その業務を実施した機関は、契約主である試験所・校正機関に対

して校正証明書を発行する。

5.10.7 電子的手段による結果の伝送試験・校正結果を、電話、テレックス、ファクシミリ又はその他の電子的若しくは電磁的手段で伝送する場合には、この規格の要求事項を満たしている（5.4.7を参照）。

5.10.8 報告書及び証明書の書式

書式は、実施する各タイプの試験・校正に適するように、かつ誤解又は誤用の可能性を最小化するように設計することが望ましい。

参考

1. 特に試験・校正データの体裁及び読者の理解し易さに関して、試験報告書又は校正証明書のレイアウトに注意を払うことが望ましい。

2. 可能な限り、表題を標準化することが望ましい。

5.10.9 試験報告書及び校正証明書の修正

発行後における試験報告書又は校正証明書への実質的な修正は、”試験報告書（又は校正証明書）、一連番号――（又は他の識別）に対する補足”若しくは同等の文言による表明を含む追加文書又はデータ転送という形態によってのみ行う。そのような修正は、この規格のすべての要求事項を満たす。完全な新規の試験報告書又は校正証明書を発行することが必要な場合には、この新規の試験報告書・校正証明書に独自の識別を与え、それが置き換わる元の試験報告書・校正証明書の引用を含める。

資料2 サンプリングノート及び機材リストの参考例

サンプリングノート

サンプル名：排水初期、中期、末期		調査日：	メンバー：
開始時刻：	開始時天候：	開始時気温：	
終了時刻：	終了時天候：	終了時気温：	
1m ³ 貯水タンクの清浄度及び乾燥状態のチェック：タンク①□、タンク②□、タンク③□			
バラスト水容量：	バラスト水の水深：	ポンプ設置水深：	
ポンプ予備排水量：	タンク①採水量：	タンク②採水量：	タンク③採水量：
バクテリア用サンプル採水時刻： ～			
バクテリア用サンプル（10ℓ滅菌ボトル）のサンプリング及び冷暗保存のチェック： タンク①2本□、タンク②2本□、タンク③2本□			
10-50μm生物用サンプル採水及び濃縮時刻： ～			
10-50μm生物用サンプル（1ℓポリビン）のサンプリング及び濃縮後の容量 タンク①2本□、タンク②2本□、タンク③2本□ タンク①濃縮後容量： 、タンク②濃縮後容量： 、タンク③濃縮容量：			
目視観察用サンプル採水及び観察時刻： ～			
目視観察確認遊泳個体数：タンク①： 、タンク② タンク③			
水質計測用サンプル採水及び計測時刻： ～			
タンク①：水温： 、塩分： 、pH： 、DO： NTU： タンク②：水温： 、塩分： 、pH： 、DO： NTU： タンク③：水温： 、塩分： 、pH： 、DO： NTU：			
水質クロスチェック用サンプルのチェック及び対象タンク： タンク No.： 、塩分□、pH□、DO（固定処理）□			
DOC及びPOC用サンプル（1ℓポリビン）のサンプリング及び冷暗保存のチェック： タンク①1本□、タンク②1本□、タンク③1本□			
50μm以上生物用サンプル採水及び濃縮時刻： ～			
50μm以上生物用サンプルの採水容量及び濃縮後の容量 タンク①採水容量： 、タンク②採水容量： 、タンク③採水容量： タンク①濃縮後容量： 、タンク②濃縮後容量： 、タンク③濃縮容量：			
1m ³ 貯水タンクの清浄及び乾燥作業のチェック：タンク①□、タンク②□、タンク③□			
特記事項：			

サンプリング機材リスト

区分	名 称	個数	備考
サンプリング 主 機 材	1m ³ 貯水タンク	3 個	
	1m ³ 貯水タンク設置用木枠	2 本	
	採水ポンプ (60Hz、100V)	2 台	
	1m ³ 貯水タンク附属ホース (30m)	1 本	
サン プ ル ビ ン	バクテリア用 10ℓ 滅菌ロテナー	20 本	
	10-50 μm 生物、DOC/POC 用 1ℓ ポリビン	25 本	
	目視観察用 1ℓ ビーカー	5 個	
	塩分クロスチェック用 100ml ポリビン	5 個	
	pH クロスチェック用 500ml ポリビン	5 個	
	DO クロスチェック用 DO ビン	5 個	
	10-50 μm 生物濃縮後サンプル用沈殿管	20 本	
	50 μm 以上生物濃縮後サンプル用 200ml ビーカー	10 個	
濃 縮 機材	開口径 50 μm (一辺上) フルイ大	3 個	
	開口径 50 μm (一辺上) フルイ小	3 個	
	開口径 10 μm (一辺上) フルイ小	2 個	
	開口径 1mm フルイ大	3 個	
	開口径 20 μm メッシュ大	2 個	
	大型バット	3 個	
	小型バット	2 個	
	洗ビン	3 個	
	ろ過海水	20ℓ	
	47mm ろ過キット	2 セット	
	47mm ろ過ビン	2 個	
	47mmGF/F フィルター	50 枚	
	ピンセット	2 個	
	小型ロート	2 個	
	大型ロート	2 個	
吸引ろ過器 (or アスピレーター)	1 個		
そ の 他	バケツ (10~20ℓ)	3 個	
	水質チェッカー	1 台	
	温度計	2 本	
	アイスボックス	2 個	
	アルミホイール	適	
	ラップ	適	
	筆記具	1 式	
	ガムテープ	適	
	ビニールテープ	適	
	サンプリングノート	1 式	
	カメラ	1 台	
	ビデオカメラ	1 台	
	残渣バラスト水殺菌用さらし粉	適	
	廃液用 20ℓ ポリタンク	3 個	
	液体窒素保存機器	1 式	
	延長コード	適	
	生物顕微鏡	4 台	
実体顕微鏡	4 台		
再培養試験機器	一式		

資料3 分析ノート及び分析機材リストの参考例

動物プランクトン分析ノート

No.

調査実施船名：	分析日：	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： サウンディングパイプ・マンホール・排水ライン（初期・中期・末期）			
原試水量：	濃縮サンプル量：	検鏡量：	
サイズ区分： S・L グループ	サンプル名：		
開始時刻：			
種名	生物数	〔 Minimum dimension 〕	備考
備考			

植物プランクトン分析ノート

No.

調査実施船名：		分析日：		分析担当者：	
サンプリング場所・時期：サウンディングパイプ・マンホール・排水ライン（初期・中期・末期）					
原試水量：		濃縮サンプル量：		検鏡量：	
サイズ区分： S・L グループ			サンプル名：		
開始時刻：			終了時刻：		
種名	生物数	〔 Minimum dimension 〕	群体	群体構成 細胞数	
備考					

L 及び S サイズグループ分析機材リスト

No.	品名	数	備考
1	実体顕微鏡	2	
2	生物顕微鏡	2	
3	接眼マイクロメーター	4	
4	撮影装置		
5	シャーレ	2	
6	駒込ピペット	2	
7	界線入り枠付き計数板	適宜	
8	オートピペット (1000 μl)	2	
9	カウンター	8	
10	パスツールピペット	適宜	
11	ピンセット	2	
12	アルコールランプ	1	
13	ライター	1	
14	使用済みパスいれ	1	
15	シリンジ	2	
16	ディスクフィルター	5	
17	24 well カルチャープレート	5	
18	培地作成年ポリカーボネイトボトル (500 ml)	1	
19	各種培地 (各 0.5 ml)		
20	ビニールテープ	2	
21	油性ペン	2	

細菌類計数ノート

No. _____

調査実施船名と対象バラストタンク：	接種日：	担当者：
サンプリング場所・時期：サウンディングパイプ・マンホール・排水ライン（初期・中期・末期）		
採水時刻：	接種開始時刻：	接種終了時刻：
従属栄養細菌（清水）		
培地名：	培養温度と培養期間：	培養開始時刻：
希釈段階・接種量・接種枚数：		
従属栄養細菌（海水）		
培地名：	培養温度と培養期間：	培養開始時刻：
希釈段階・接種量・接種枚数：		
大腸菌群と大腸菌		
培地名：	培養温度と培養期間：	培養開始時刻：
希釈段階・接種量・接種枚数：		
腸球菌グループ（一次スクリーニング）		
培地名：	培養温度と培養期間：	培養開始時刻：
希釈段階・接種量・接種枚数：		
コレラ菌（一次スクリーニング）		
培地名：	培養温度と培養期間：	培養開始時刻：
希釈段階・接種量・接種枚数：		
特記事項：		

調査実施船名と対象バラストタンク：		
サンプリング場所・時期：サウンディングパイプ・マンホール・排水ライン（初期・中期・末期）		
腸球菌（二次スクリーニング）	接種日：	担当者：
接種開始時刻：		接種終了時刻：
培地名：	培養温度と培養期間：	培養開始時刻：
プレート毎の集落数と釣菌数：		
特記事項：		
コレラ菌（二次スクリーニング）	接種日：	メンバー：
接種開始時刻：		接種終了時刻：
培地名：	培養温度と培養期間：	培養開始時刻：
プレート毎の集落数と釣菌数：		
特記事項：		
毒素産生性コレラ菌（鑑別試験）	試験日：	メンバー：
試験開始時刻：		試験終了時刻：
使用血清名：		
共試集落数：		
特記事項：		

細菌分析機材リスト

以下の装置・器具の他、本微生物試験に使用する装置・器具。

補足：必要量を各自揃え、器具の滅菌を予めしておく。培地・希釈液は必要に応じて接種前に予め作成しておく。

区分	名称	備考
装置	乾熱滅菌器（必要に応じて） 高圧蒸気滅菌器 安全キャビネット インキュベーター 温度計 pH計 はかり スターラーとスターラーバー	
接種準備	滅菌済みシャーレ 塗抹平板法の希釈液用の試験管 培地・希釈液を入れる容器（必要に応じて）	
塗抹平板法・メンブレンフィルター法（一次スクリーニング）	マイクロピペッター及びチップ 5 ml マイクロピペッター及びチップ 1 ml マイクロピペッター及びチップ 200 μl コーンラージ棒 直径47mm用ろ過セット 直径47mm・孔径0.2 μmのメンブレンフィルター アスピレーター メスシリンダー 100 ml ビーカー等の容器 ミキサー ターンテーブル（必要に応じて） ピンセット ピペット（必要に応じて） コロニーカウンター（必要に応じて） 補足：必要に応じて、以下のものを準備する。 1. 塗抹平板法接種時に用いる試料水を入れる滅菌済みの容器と滅菌済みの希釈液。 2. メンブレンフィルター法接種時に用いる洗浄用の滅菌溶液。	
二次スクリーニング	白金耳 液体培養用の試験管	
鑑別試験	凝集試験用のスライドグラス グラスペン アイスバケット 補足：血清を予め購入しておく。	
その他	ガスバーナー（必要に応じて） 70%エタノール入りスプレー シール用テープ 各種マジック等	

資料4 分析参考データ

以下には、本生物分析方法策定のための方法検証作業のために実施した、試験調査船及び一般商船における試験分析結果等を参考までに収録した。なお、以下の分析のうち、SサイズあるいはLサイズグループの分析は、群体を構成する細胞及び個体を1個体とせず、群体を1個体として扱い、群体の最小サイズで所属サイズグループを決定している。

1. 試験調査船試験結果

1.1 Sサイズグループ分析結果

1.1.1 漲水時

調査実施船名：試験調査船			分析日：			分析担当者：			
サンプリング時期：漲水初期			タンク No.：						
原試水量：1 L		濃縮サンプル量：60 ml		検鏡量：1 ml					
サイズ区分：S・Lグループ			分析対象：植物プランクトン・動物プランクトン						
サンプル名：初期			開始時刻：			終了時刻：			
種名	生物数			群体			群体構成細胞数		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
sグループ									
<i>Bacteriastrium furcatum</i>	1			1			3		
<i>Bacteriastrium</i> sp.	3			2			9		
<i>Chaetoceros</i> sp.	2			2			5		
<i>Guinardia</i> sp.	1								
Nauplius	4								
<i>Odontella</i> sp.	3			1			2		
<i>Protoperdinium</i> sp.	2								
<i>Tintinnopsis lobiancoi</i>	1								
Total	17			6			19		

調査実施船名：試験調査船			分析日：			分析担当者：			
サンプリング時期：漲水中期			タンク No.：						
原試水量：1 L		濃縮サンプル量：50 ml		検鏡量：1 ml					
サイズ区分：S・Lグループ			分析対象：植物プランクトン・動物プランクトン						
サンプル名：初期			開始時刻：			終了時刻：			
種名	生物数			群体			群体構成細胞数		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
sグループ									
<i>Asterionellopsis glacilis</i>	1			1			2		
<i>Bacteriastrium</i> sp.	7			4			10		
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	2			2			6		
<i>Chaetoceros</i> sp.	14			11			31		
<i>Guinardia</i> sp.	1								
Larva	1								
Nauplius	1								
<i>Odontella aurita</i>	2			1			2		
<i>Protoperdinium</i> sp.	2								
<i>Thalassiosira</i> sp.	3			2			4		
<i>Tintinnopsis</i> sp.	1								
unknown	2								
Total	37			21			55		

調査実施船名：試験調査船			分析日：			分析担当者：			
サンプリング時期：漲水末期			タンク No.：						
原試水量：1 L		濃縮サンプル量：50 ml		検鏡量：1 ml					
サイズ区分：S・Lグループ			分析対象：植物プランクトン・動物プランクトン						
サンプル名：初期			開始時刻：			終了時刻：			
種名	生物数			群体			群体構成細胞数		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
sグループ									
<i>Asterionellopsis glacilis</i>	1			1			2		
<i>Bacteriastrium</i> sp.	8			7			23		
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	6			6			25		
<i>Chaetoceros</i> sp.	11			9			32		
<i>Coscinodiscus</i> sp.	1								
<i>Guinardia</i> sp.	3			3			6		
Nauplius	8								
<i>Odontella aurita</i>	5			2			4		
<i>Thalassiosira</i> sp.	3			1			2		
<i>Tintinnopsis</i> sp.	2								
unknown	2								
Total	50			29			94		

1.1.2 排水時

調査実施船名： 試験調査船		分析日： 50916		分析担当者：					
サンプリング時期： 排出末期 (表層)		タンク No.： 1							
原試水量： 1 L	濃縮サンプル量： 20 ml	検鏡量： 1 ml×3							
サイズ区分： Sグループ	分析対象： 植物プランクトン・動物プランクトン								
サンプル名： S050916-1	開始時刻： 濃10:04, 検10:25		終了時刻： 11:45						
種名	生物数			群体			群体構成細胞数		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
unknown	1			←regrowth なし(9/27)					
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0

調査実施船名： 試験調査船		分析日： 50916		分析担当者：					
サンプリング時期： 排出末期		タンク No.： 2							
原試水量： 1 L	濃縮サンプル量： 20 ml	検鏡量： 1 ml×3							
サイズ区分： Sグループ	分析対象： 植物プランクトン・動物プランクトン								
サンプル名： S050916-2	開始時刻： 濃11:15, 検13:00		終了時刻：						
種名	生物数			群体			群体構成細胞数		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
HNF	1								
egg	2			←regrowth なし(9/27)					
Total	0	1	0	0	0	0	0	0	0

調査実施船名： 試験調査船		分析日： 50916		分析担当者：					
サンプリング時期： 排出末期		タンク No.： 3							
原試水量： 1 L	濃縮サンプル量： 20 ml	検鏡量： 1 ml×3							
サイズ区分： Sグループ	分析対象： 植物プランクトン・動物プランクトン								
サンプル名： S050916-3	開始時刻：		終了時刻：						
種名	生物数			群体			群体構成細胞数		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
egg	1			←regrowth なし(9/27)					
<i>Campylodiscus</i> sp.	1								
<i>Vorticella</i> sp.	1								
Total	0	2	0	0	0	0	0	0	0

調査実施船名： 試験調査船		分析日： 50917		分析担当者：					
サンプリング時期： 排出中期 (中層)		タンク No.： 4							
原試水量： 1 L	濃縮サンプル量： 35 ml	検鏡量： 1 ml×3							
サイズ区分： Sグループ	分析対象： 植物プランクトン・動物プランクトン								
サンプル名： S050917-4	開始時刻： 濃09:15, 検09:28		終了時刻：						
種名	生物数			群体			群体構成細胞数		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
<i>Umbilicosphera</i> sp.	1	1	3						
egg	4								
<i>Vorticella</i> sp.	1								
Total	1	1	4	0	0	0	0	0	0

調査実施船名： 試験調査船		分析日： 50917		分析担当者：					
サンプリング時期： 排出中期 (中層)		タンク No.： 5							
原試水量： 1 L	濃縮サンプル量： 20 ml	検鏡量： 1 ml×3							
サイズ区分： Sグループ	分析対象： 植物プランクトン・動物プランクトン								
サンプル名： S050917-5	開始時刻： 濃10:00, 検10:36		終了時刻：						
種名	生物数			群体			群体構成細胞数		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
<i>Umbilicosphera</i> sp.	2	1	←regrowth なし(9/27)						
<i>Actinophrys</i> sp.	1			←regrowth あり(9/27)					
unknown	2			←regrowth なし(9/27)					
Total	2	1	0	0	0	0	0	0	0

調査実施船名： 試験調査船		分析日： 50917		分析担当者：					
サンプリング時期： 排出中期 (中層)		タンク No.： 6							
原試水量： 1 L	濃縮サンプル量： 20 ml	検鏡量： 1 ml×3							
サイズ区分： Sグループ	分析対象： 植物プランクトン・動物プランクトン								
サンプル名： S050917-6	開始時刻： 検10:50		終了時刻：						
種名	生物数			群体			群体構成細胞数		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
<i>Actinophrys</i> sp.	1								
Total	1	0	0	0	0	0	0	0	0

調査実施船名： 試験調査船			分析日： 50918			分析担当者：			
サンプリング時期： 排出初期（底層）			タンク No.： 7						
原試水量： 1 L		濃縮サンプル量： 15 ml		検鏡量： 1 ml×3					
サイズ区分： Sグループ			分析対象： 植物プランクトン・動物プランクトン						
サンプル名： S050918-7			開始時刻： 検09:16			終了時刻：			
種名	生物数			群体			群体構成細胞数		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
egg	1	2	1	←すべてregrowth なし(9/27)					
unknown	1								
unknown-2		1	1	←すべてregrowth なし(9/27)					
<i>Cyclotella</i> sp.		2	3						
Nematoda			1						
HNF		1	1						
Total	1	3	5	0	0	0	0	0	0

調査実施船名： 試験調査船			分析日： 50918			分析担当者：			
サンプリング時期： 排出初期（底層）			タンク No.： 8						
原試水量： 1 L		濃縮サンプル量： 25 ml		検鏡量： 1 ml×3					
サイズ区分： Sグループ			分析対象： 植物プランクトン・動物プランクトン						
サンプル名： S050918-8			開始時刻：			終了時刻：			
種名	生物数			群体			群体構成細胞数		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
egg	1	2	1	←すべてregrowth なし(9/27)					
unknown	1								
unknown-2		1	1	←すべてregrowth なし(9/27)					
<i>Cyclotella</i> sp.		2	3						
Nematoda			1						
HNF		1	1						
Total	1	3	5	0	0	0	0	0	0

調査実施船名： 試験調査船			分析日： 50918			分析担当者：			
サンプリング時期： 排出初期（底層）			タンク No.： 9						
原試水量： 1 L		濃縮サンプル量： 20 ml		検鏡量： 1 ml×3					
サイズ区分： Sグループ			分析対象： 植物プランクトン・動物プランクトン						
サンプル名： S050918-9			開始時刻：			終了時刻：			
種名	生物数			群体			群体構成細胞数		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
unknown		1		←regrowth なし(9/27)					
unknown-2		1		←regrowth なし(9/27)					
unknown-3	1		1						
<i>Gymnodinium</i> sp.	1								
Total	2	0	1	0	0	0	0	0	0

1.2 Lサイズグループ分析結果

1.2.1 漲水時

調査実施船名：試験調査船	分析日：050920	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：F.T.P・漲水初期			
原試水量：20L	濃縮サンプル量：10ml	検鏡量：10ml	
サイズ区分：Lグループ	サンプル名：漲水初期、ホルマリン固定サンプル		
開始時刻：10:00		終了時刻：12:00	
種名	生物数	群体	群体構成 細胞数
<i>Protoperisinium</i> sp., 50µm	1000		
<i>Coscinodiscus granii</i> , 50µm	7000		
<i>Coscinodiscus</i> sp., 50µm	1000		
Scyphozoa polyp, 80-1000µm	4		
Polychaeta larva, 80µm	15		
Pelecypoda larva, 60-200µm	60		
<i>Podon schmackeri</i> , 120µm	1		
<i>Paracalanus</i> sp., 300µm	30		
<i>Oithona davisae</i> , 150µm	285		
<i>Corycaeus</i> sp., 130µm	2		
<i>Paracalanus</i> copepodite, 250µm	150		
<i>Acartia</i> copepodite, 250µm	1		
<i>Oithona</i> copepodite, 100-140µm	195		
Harpacticoida copepodite, 200µm	15		
Cirripedia nauplius, 200µm	15		
Cirripedia cypris, 200µm	1		
Total	9774		
Total (個体/m ³)	9774		

調査実施船名：試験調査船	分析日：050920	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：F.T.P・漲水中期			
原試水量：20L	濃縮サンプル量：10ml	検鏡量：10ml	
サイズ区分：Lグループ	サンプル名：漲水中期、ホルマリン固定サンプル		
開始時刻：13:00		終了時刻：15:00	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Protoperisinium oblongum</i> ,50μm	1000		
<i>Protoperisinium</i> sp.,50μm	1000		
<i>Coscinodiscus granii</i> , 50μm	5000		
<i>Coscinodiscus</i> sp.,50μm	6000		
<i>Tintinnopsis</i> sp.80μm	1000		
Scyphozoa polyp,80-1000μm	1		
Polychaeta larva,60μm	75		
Pelecypoda larva,60-200μm	90		
<i>Podon schmackeri</i> ,120μm	2		
<i>Paracalanus</i> sp.,300μm	15		
<i>Oithona davisae</i> , 150μm	375		
<i>Corycaeus</i> sp., 130μm	2		
<i>Paracalanus</i> copepodite, 250μm	195		
<i>Oithona</i> copepodite, 100-140μm	495		
Copepoda nauplius,55μm	15		
Cirripedia nauplius,200μm	3		
Cirripedia cypris,200μm	1		
Brachyura zoea,300μm	1		
Total	15270		
Total (個体/m ³)	15270		

調査実施船名：試験調査船	分析日：050920	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：F.T.P・漲水末期			
原試水量：20L	濃縮サンプル量：10ml	検鏡量：10ml	
サイズ区分：Lグループ	サンプル名：漲水末期、ホルマリン固定サンプル		
開始時刻：15:00		終了時刻：17:00	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Coscinodiscus granii</i> , 50μm	11000		
<i>Coscinodiscus</i> sp., 50μm	3000		
Scyphozoa polyp, 80-1000μm	1		
Polychaeta larva, 60μm	75		
Pelecypoda larva, 60-200μm	75		
<i>Podon schmackeri</i> , 120μm	15		
<i>Paracalanus</i> sp., 300μm	15		
<i>Oithona davisae</i> , 150μm	525		
<i>Paracalanus</i> copepodite, 250μm	105		
<i>Oithona</i> copepodite, 100-140μm	165		
Copepoda nauplius, 55μm	15		
Cirripedia nauplius, 200μm	1		
Fish larva, 400μm	1		
Total	14993		
Total (個体/m ³)	14993		

1. 2. 2 排水時

No. 1

調査実施船名：試験調査船	分析日：050918	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：F.T.P (底層)・排出初期			
原試水量：1m ³	濃縮サンプル量：150ml	検鏡量：150ml	
サイズ区分：L グループ	サンプル名：S.050918⑦		
開始時刻：10:15		終了時刻：11:30	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Coscinodiscus granii</i> ,50-60μm	5		
Total	5		
Total (個体/m ³)	5		

No. 2

調査実施船名：試験調査船	分析日：050918	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：F.T.P (底層)・排出初期			
原試水量：1m ³	濃縮サンプル量：25ml	検鏡量：25ml	
サイズ区分：L グループ	サンプル名：S.050918⑧		
開始時刻：11:20		終了時刻：13:10	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Coscinodiscus granii</i> ,60-90μm	3		
Copepoda nauplius,60μm	1		
Total	4		
Total (個体/m ³)	4		

No. 3

調査実施船名：試験調査船	分析日：050918	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：F.T.P (底層)・排出初期			
原試水量：1m ³	濃縮サンプル量：20ml	検鏡量：20ml	
サイズ区分：L グループ	サンプル名：S.050918⑨		
開始時刻：11:45		終了時刻：13:55	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Coscinodiscus granii</i> ,50μm	1		
Total	1		
Total (個体/m ³)	1		

No. 1

調査実施船名：試験調査船	分析日：050917	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：F.T.P（中層）・排出中期			
原試水量：1m ³	濃縮サンプル量：120ml	検鏡量：120ml	
サイズ区分：L グループ	サンプル名：S.050917④		
開始時刻：10:20		終了時刻：12:00	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
Ciliophora,150μm	1		
Cyclopoida copepodite,80-150μm	2		
Total	3		
Total(個体/m ³)	3		

No. 2

調査実施船名：試験調査船	分析日：050917	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：F.T.P（中層）・排出中期			
原試水量：1m ³	濃縮サンプル量：100ml	検鏡量：100ml	
サイズ区分：L グループ	サンプル名：S.050917⑤		
開始時刻：11:30		終了時刻：13:00	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
Ciliophora,100μm	1		
Harpacticoida copepodite,200μm	1		
Total	2		
Total(個体/m ³)	2		

No. 3

調査実施船名：試験調査船	分析日：050917	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：F.T.P（中層）・排出中期			
原試水量：1m ³	濃縮サンプル量：120ml	検鏡量：120ml	
サイズ区分：L グループ	サンプル名：S.050917⑥		
開始時刻：13:10		終了時刻：13:40	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
Harpacticoida,100μm	1		
Total	1		
Total(個体/m ³)	1		

No. 1

調査実施船名：試験調査船	分析日：050916	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：F.T.P（表層）・排出末期			
原試水量：1m ³	濃縮サンプル量：150ml	検鏡量：150ml	
サイズ区分：Lグループ	サンプル名：S.050916①		
開始時刻：13:35		終了時刻：15:00	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
なし			
Total	ND		

No. 2

調査実施船名：試験調査船	分析日：050916	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：F.T.P（表層）・排出末期			
原試水量：1m ³	濃縮サンプル量：150ml	検鏡量：150ml	
サイズ区分：Lグループ	サンプル名：S.050916②		
開始時刻：15:10		終了時刻：15:30	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
なし			
Total	ND		

No. 3

調査実施船名：試験調査船	分析日：050916	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：F.T.P（表層）・排出末期			
原試水量：1m ³	濃縮サンプル量：150ml	検鏡量：150ml	
サイズ区分：Lグループ	サンプル名：S.050916③		
開始時刻：15:20		終了時刻：16:00	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
Harpacticoida,100μm	2		
Total	2		
Total(個体/m ³)	2		

1.3 細菌類計数結果

海域		東京港排水時								
時期		排出初期(底層,05.09.18)			排出中期(中層,05.09.17)			排出初期(表層,05.09.16)		
サンプルNO.		①	②	③	①	②	③	①	②	③
従属栄養細菌(海水性,cfu/ml)	Marine agar:23°C,6日間培養	74,600	74,800	61,000	4,520	5,080	5,760	20,950	2,086	1,984
従属栄養細菌(陸水性,cfu/ml)	R2A agar:23°C,6日間培養	236	130	128	88	224	124	1,120	900	214
Vibrio cholerae group(cfu/100ml)	TCBS agar:23°C,6日間培養	3.0	3.7	2.3	1.3	10.0	9.3	ND	ND	252.0
腸球菌 group(cfu/100ml)	mEnterococcus agar:23°C,6日間培養	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
大腸菌群(cfu/100ml)	XM-G agar:23°C,6日間培養	ND	ND	ND	0.6	8.0	4.0	ND	ND	120.0
大腸菌(cfu/100ml)	XM-G agar:23°C,6日間培養	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	120.0

ND:検出不可

1.4 水質観測・分析結果

対象船・タンク 採取場所・ 時期		F.P.T.								
		水中ポンプ揚水								
		2005/9/16			2005/9/17			2005/9/18		
		初期	中期	末期	初期	中期	末期	初期	中期	末期
水温	°C	25.7	26.0	26.3	25.9	25.7	25.8	25.8	25.8	26.0
pH		7.9	7.9	7.9	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8
塩分	PSU	29.7	30.7	30.7	29.7	29.7	29.7	29.7	29.7	29.7
溶存酸素(DO)	mg/L	9.3	9.3	9.3	9.9	9.3	9.0	9.8	9.7	9.4
濁度(Turbidity)	NTU	0	0	0	0	0	0	0	0	0
クロロフィルa	µg/L	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
溶解性有機炭素(DOC)	mg/L	1.3	1.3	1.3	1.2	1.3	1.2	1.2	1.3	1.3
懸濁性有機炭素(POC)	mg/L	0.04	0.03	0.08	0.05	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05

2. 一般商船試験結果

2.1 Sサイズグループ分析結果

(1) サウンディングパイプから採水したサンプル

No. 1

調査実施船名：	分析日： 051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： サウンディングパイプ			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 37.5 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： S-1		
開始時刻： 22:30		終了時刻： 22:55	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Chaetoceros curvisetus</i>		1	12
<i>Ditylum brightwellii</i>	2		
Total	3		

No. 2

調査実施船名：	分析日： 051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： サウンディングパイプ			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 37.5 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： S-2		
開始時刻： 22:45		終了時刻： 23:45	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Dinophysis rotundata</i>	1		
<i>Ditylum brightwellii</i>	1		
<i>Skeletonema costatum</i>		1	5
<i>Surirella</i> sp.	1		
<i>Thalassiosira</i> spp.	6		
Total	10		

No. 3

調査実施船名：	分析日： 051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： サウンディングパイプ			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 37.5 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： S-3		
開始時刻： 23:00		終了時刻：	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Skeletonema costatum</i>		1	5
Total	1		

No. 4

調査実施船名：	分析日： 051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： マンホール			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 37.5 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： M-1		
開始時刻： 23:15		終了時刻： 00:00	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Alexandrium</i> sp.	1		
<i>Cochlodinium</i> sp.	2		
<i>Ditylum brightwellii</i>	4		
<i>Skeletonema costatum</i>		3	10
<i>Thalassiosira</i> sp.	4		
Total	14		

No. 5

調査実施船名：	分析日： 051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： マンホール			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 37.5 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： M-2		
開始時刻：		終了時刻：	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Ditylum brightwellii</i>	2		
<i>Skeletonema costatum</i>		1	14
Total	3		

No. 6

調査実施船名：	分析日： 051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： マンホール			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 37.5 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： M-3		
開始時刻： 23:50		終了時刻： 00:50	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Cochlodinium</i> sp.	8		
<i>Ditylum brightwellii</i>	1		
<i>Protooperidinium</i> sp.	1		
<i>Surirella</i> sp.	1		
Protozoa	3		
Total	14		

(2) マンホールの表層から採水したサンプル

(3) 排出ラインから採水したサンプル (初期)

No. 10

調査実施船名：	分析日： 051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： 排出ライン (初期)			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 17.5 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： P-1-1		
開始時刻： 00:51		終了時刻： 01:57	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Ditylum braightwellii</i>	1		
<i>Skeletonema costatum</i>		8	
<i>Thalassiosira</i> sp.	13		
Total	22		

No. 11

調査実施船名：	分析日： 051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： 排出ライン (初期)			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 17.5 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： P-1-2		
開始時刻：		終了時刻：	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Cochlodinium</i> sp.	1		
<i>Ditylum braightwellii</i>	3		
<i>Surirella</i> sp.	1		
Total	5		
備考			
10 μm 以下の珪藻 (<i>Cyclotella</i> sp.) 4 <i>Scenedesmus</i> sp.			

No. 12

調査実施船名：	分析日： 051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： 排出ライン (初期)			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 17.5 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： P-1-3		
開始時刻： 00:50		終了時刻： 01:45	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Ditylum braightwellii</i>	2		
<i>Planktoniella blanda</i>	1		
<i>Protoperdinium</i> sp.	1		
<i>Thalassiosira</i> sp.	5		
<i>Westella</i> sp.	1		
Total	10		

(4) 排出ラインから採水したサンプル (中期)

No. 13

調査実施船名：	分析日： 051112	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： 排出ライン (中期)			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 27.5 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： P-2-1		
開始時刻： 00:50		終了時刻： 01:45	
種名	生物数	群体	群体構成 細胞数
<i>Bacteriastrium</i> sp.	1		
<i>Ceratium furca</i>	1		
<i>Chaetoceros affinis</i>		5	4
<i>Chaetoceros curvisetus</i>		19	8
<i>Chaetoceros</i> spp.		218	4
<i>Coscinodiscus</i> spp.	69		
<i>Ditylum brightwellii</i>	1		
<i>Oxyphysis oxytoxoides</i>	2		
<i>Protoperdinium</i> spp.	3		
<i>Scrippsiella</i> sp.	1		
<i>Thalassiosira</i> sp.	16		
Total	336		

No. 14

調査実施船名：	分析日： 051112	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： 排出ライン (中期)			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 27.5 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： P-2-2		
開始時刻：		終了時刻：	
種名	生物数	群体	群体構成 細胞数
<i>Chaetoceros affinis</i>		4	
<i>Chaetoceros curvisetus</i>		8	
<i>Chaetoceros</i> sp.		92	
<i>Ceratium fusus</i>	3		
<i>Cochlodinium</i> sp.	1		
<i>Coscinodiscus</i> sp.	2		
<i>Skeletonema costatum</i>		1	
Total	111		
備考 <i>Prorocentrum</i> がたくさん (ビデオあり)			

No. 15

調査実施船名：	分析日： 051112	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： 排出ライン (中期)			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 27.5 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： P-2-3		
開始時刻： 03:40		終了時刻：	
種名	生物数	群体	群体構成 細胞数
<i>Ceratium furca</i>	2		
<i>Ceratium fusus</i>	3		
<i>Chaetoceros affinis</i>		5	
<i>Chaetoceros curvisetus</i>		19	
<i>Chaetoceros</i> sp.		108	
<i>Cochlodinium</i> sp.	1		
<i>Corethron</i> sp.	1		
<i>Ditylum brightwellii</i>	3		
<i>Protoperdinium</i> sp.	1		
Total	143		
備考 <i>Prorocentrum</i> 多い			

(5) 排出ラインから採水したサンプル (末期)

No. 17

調査実施船名：	分析日： 051112	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： 排出ライン (末期)			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 80 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： P-3-1		
開始時刻： 04:40		終了時刻： 05:50	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Chaetoceros affinis</i>		2	16-6
<i>Chaetoceros</i> sp.		95	3-6
<i>Cochlodinium</i> sp.	4		
<i>Dactyliosolen</i> sp.		1	14
<i>Protoperdinium</i> spp.	2		
<i>Skeletonema costatum</i>		4	20
<i>Thalassiosira</i> sp.	10		
Ciliata	1		
<i>Tintinnopsis</i> sp.	3		
Total	122		
備考			
Prorocentrum 多い			

No. 18

調査実施船名：	分析日： 051112	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： 排出ライン (末期)			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 80 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： P-3-2		
開始時刻：		終了時刻：	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Chaetoceros affinis</i>		2	
<i>Chaetoceros curvisetus</i>		6	
<i>Chaetoceros</i> sp.		71	
<i>Ceratium furca</i>	4		
<i>Skeletonema costatum</i>		2	
Total	85		

No. 19

調査実施船名：	分析日： 051112	分析担当者：	
サンプリング場所・時期： 排出ライン (末期)			
原試水量： 1000 ml	濃縮サンプル量： 80 ml	検鏡量： 1 ml	
サイズ区分： S グループ	サンプル名： P-3-3		
開始時刻：		終了時刻： 05:20	
種名	生物数	群体	群体構成細胞数
<i>Actinoptychus senarius</i>	4		
<i>Ceratium furca</i>	1		
<i>Chaetoceros curvisetus</i>		4	
<i>Chaetoceros</i> spp.		94	
<i>Cochlodinium</i> sp.	2		
<i>Coscinodiscus</i> sp.	12		
<i>Ditylum brightwellii</i>	1		
<i>Skeletonema costatum</i>	6	2	
<i>Thalassiosira</i> sp.	14		
Total	140		

2.2 Lサイズグループ分析結果

(1) サウンディングパイプから採水したサンプル

調査実施船名：一般商船	分析日：051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：A.P.T. サウンディングパイプ			
原試水量：100L	濃縮サンプル量：100ml	検鏡量：30ml	
サイズ区分：Lグループ	サンプル名：S		
開始時刻：10:30		終了時刻：11:30	
種名	生物数	群体数	minimum dimension
<i>Protoperidinium pentagonum</i>	3		60µm
<i>Coscinodiscus</i> sp.	9		50µm
Ciliophora	3		100µm
Coelenterata planula	2		200µm
<i>Calanus</i> sp.	52		300µm
<i>Paracalanus aculeatus</i>	20		200-300µm
<i>Paracalanus parvus</i>	8		200µm
<i>Centropages</i> sp.	20		300µm
<i>Pseudodiaptomus</i> sp.	42		300µm
<i>Labidocera</i> sp.	3		300µm
<i>Temora discaudata</i>	3		300µm
<i>Oithina brevicornis</i>	4		120µm
<i>Oithina simplex</i>	1		140µm
<i>Oithona</i> sp.	50		100-200µm
<i>Microsetella norvegica</i>	16		100-160µm
<i>Saphirella</i> like copepods	65		60-120µm
Harpacticoida	3		300µm
<i>Calanoida copepodite</i>	18		100-200µm
<i>Paracalanus</i> copepodite	47		50-300µm
<i>Centropages</i> copepodite	11		200µm
<i>Pseudodiaptomus</i> copepodite	35		200µm
<i>Labidocera</i> copepodite	1		300µm
<i>Oithona</i> copepodite	43		100µm
<i>Corycaeus</i> copepodite	3		120µm
<i>Microsetella</i> copepodite	2		50µm
Copepoda nauplius	376		100µm
Isopoda	1		200µm
Brachyura zoea	1		300µm
Total	842		
Total (個体/m ³)	27786		

(2) マンホールの表層から採水したサンプル

調査実施船名：一般商船	分析日：051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：A.P.T. マンホール（表層）			
原試水量：100L	濃縮サンプル量：100ml	検鏡量：10ml	
サイズ区分：Lグループ	サンプル名：M		
開始時刻：11:40		終了時刻：01:10	
種名	生物数	群体数	minimum dimension
<i>Coscinodiscus</i> sp.	2		50μm
<i>Tintinnopsis</i> sp.	1		100μm
<i>Paracalanus crassirostris</i>	3		120μm
<i>Paracalanus parvus</i>	3		200μm
<i>Pseudodiaptomus</i> sp.	1		200μm
Calanoida	2		250μm
<i>Oncaea</i> sp.	2		250μm
<i>Microsetella norvegica</i>	5		80-100μm
<i>Saphirella</i> like copepods	1		100μm
<i>Calanoida copepodite</i>	1		100μm
<i>Paracalanus</i> copepodite	4		100μm
<i>Microsetella</i> copepodite	5		80μm
Copepoda nauplius	81		80-100μm
Polychaeta larva	5		100-150μm
Pelecypoda umbo	4		50-120μm
Cirripedia nauplius	5		100-150μm
Total	125		
Total (個体/m ³)	12500		

(3) 排出ラインから採水したサンプル (初期)

調査実施船名：一般商船	分析日：051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：A.P.T. 排出ライン (エア抜き) ・初期			
原試水量：100L	濃縮サンプル量：100ml	検鏡量：20ml	
サイズ区分：L グループ	サンプル名：P-1		
開始時刻：01:10		終了時刻：02:05	
種名	生物数	群体数	minimum dimension
<i>Coscinodiscus</i> sp.	2		50µm
<i>Tintinnopsis</i> sp.	2		50µm
<i>Paracalanus aculeatus</i>	6		200-300µm
<i>Paracalanus crassirostris</i>	1		120µm
<i>Paracalanus parvus</i>	1		200µm
<i>Acartia</i> sp.	1		250µm
<i>Oithina simplex</i>	1		140µm
<i>Saphirella</i> like copepods	11		60-120µm
<i>Paracalanus</i> copepodite	15		50-300µm
<i>Acartia</i> copepodite	1		200µm
<i>Oithona</i> copepodite	5		100µm
<i>Microsetella</i> copepodite	1		50µm
Copepoda nauplius	78		100µm
Total	125		
Total (個体/m ³)	6250		

(4) 排出ラインから採水したサンプル (中期)

調査実施船名：一般商船	分析日：051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：A.P.T. 排出ライン (エア抜き) ・中期			
原試水量：100L	濃縮サンプル量：40ml	検鏡量：5ml	
サイズ区分：L グループ	サンプル名：P-2		
開始時刻：02:05		終了時刻：03:20	
種名	生物数	群数	minimum dimension
<i>Coscinodiscus</i> sp.	145		50μm
<i>Synchaeta</i> sp.	1		50μm
<i>Calanus</i> sp.	9		160-220μm
<i>Oithona</i> sp.	23		120-140μm
<i>Saphirella</i> like copepods	3		60-120μm
<i>Calanus</i> copepodite	1		60μm
<i>Oithona</i> copepodite	2		100μm
Copepoda nauplius	32		100μm
Polychaeta larva	11		80-120μm
Polychaeta trochophora	7		120μm
Pelecypoda umbo	6		50-60μm
Total	240		
Total (個体/m ³)	19200		

(5) 排出ラインから採水したサンプル (末期)

調査実施船名：一般商船	分析日：051111	分析担当者：	
サンプリング場所・時期：A.P.T. 排出ライン (エアー抜き) ・末期			
原試水量：100L	濃縮サンプル量：40ml	検鏡量：2ml	
サイズ区分：L グループ	サンプル名：P-3		
開始時刻：02:45		終了時刻：03:20	
種名	生物数	群体数	minimum dimension
<i>Protoperidinium</i> sp.	44		60µm
<i>Coscinodiscus</i> sp.	662		50µm
<i>Tintinnopsis radix</i>	4		60µm
<i>Tintinnidium</i> sp.	4		80µm
Verticellidae	1	1	200µm
<i>Synchaeta</i> sp.	2		60µm
Siphonophora	2		500-800µm
<i>Paracalanus aculeatus</i>	1		200-300µm
<i>Paracalanus parvus</i>	12		200µm
<i>Temora discaudata</i>	1		300µm
<i>Oithona</i> sp.	82		100-200µm
<i>Oncaea</i> sp.	2		100-120µm
<i>Corycaeus</i> sp.	1		150µm
<i>Microsetella norvegica</i>	1		100-160µm
<i>Saphirella</i> like copepods	1		60-120µm
<i>Paracalanus</i> copepodite	70		50-300µm
<i>Acartia</i> copepodite	1		180µm
<i>Oithona</i> copepodite	49		100µm
<i>Corycaeus</i> copepodite	1		120µm
<i>Microsetella</i> copepodite	1		50µm
Copepoda nauplius	1		100µm
Polychaeta trochophora	30		80-200µm
Polychaeta larva	38		100-250µm
Pelecypoda umbo	8		60-100µm
Cirripedia nauplius	2		100µm
Cirripedia cypris	1		200µm
Brachyura zoea	1		300µm
Total	1023		
Total (個体/m ³)	204600		

2.3 細菌類の計数結果

海域		東京港排水時				
時期		サイウンディングパイプ採水	マンホール採水	排水ライン採水		
サンプルNO.		排水前	排水前	排水初期	排水中期	排水末期
従属栄養細菌(海水性,cfu/ml)	Marine agar;23°C,6日間培養	11700	30800	16220	39800	61000
従属栄養細菌(陸水性,cfu/ml)	R2A agar;23°C,6日間培養	2684	5760	4240	2290	1060
Vibrio cholerae group(cfup/100ml)	TCBS agar;23°C,6日間培養	42.8	1180.0	50.4	53.4	860.0
	二次スクリーニング、0%NaCl, AP水 最終判断、O1, O139抗血清検査	ND	340.0	4.4	1.0	ND
腸球菌group(cfup/100ml)	mEnterococcus agar;23°C,6日間培養	6.2	4.0	2.8	3.6	38.0
	二次スクリーニング、6.5%NaCl broth	4.6	2.6	2.6	3.2	30.0
大腸菌群(cfup/100ml)	XM-G agar;23°C,6日間培養	346.0	248.0	4400.0	446.0	1960.0
大腸菌(cfup/100ml)	XM-G agar;23°C,6日間培養	16	12	4	8	20

ND:検出不可

2.4 水質観測・分析結果

対象船・タンク 採取場所・時期		A.P.T.							
		マンホール	サイウンディングパイプ	排出ライン					
				2005/11/11			2006/1/20(予定)		
		2005/11/11	初期	中期	末期	初期	中期	末期	
水温	°C	22.7	20.5	22.4	23.0	22.0	14.3	14.3	14.3
pH		8.2	8.2	8.2	8.2	8.1	8.0	8.0	8.0
塩分	PSU	32.5	32.5	32.5	31.5	32.5	2.3	2.3	2.3
溶存酸素(DO)	mg/L	9.4	8.3	10.0	10.0	10.5	11.0	10.7	11.0
濁度(Turbidity)	NTU	5.2	10.2	5.5	6.3	172.0	41.7	48.9	112.0
浮遊物質(SS)	mg/L	3	6	4	6	13	10	9	15
クロロフィルa	µg/L	<0.1	<0.1	<0.1	0.4	0.9	<0.1	<0.1	0.1
溶解性有機炭素(DOC)	mg/L	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.5	1.4
懸濁性有機炭素(POC)	mg/L	0.13	0.60	0.15	0.51	0.40	0.13	0.20	0.53

資料5 本生物分析方法に関する良くある質問と回答例

本生物分析方法を作成中に、多くの方からさまざまな質問をいただいた。そのうちの代表的な質問と、委員会として考えた解答を以下に集めた。

I章の2.3項、ガイドラインの要求事項に関連した質問

Q1: Lサイズ、Sサイズのそれぞれのプランクトンを濃縮する際に用いる網地は、対角線の長さで50 μ m未満と10 μ m未満とされている。前者には、一辺35 μ mの網地があるので、我々はそれを用いている。しかし、後者は10 μ mの下が5 μ mになっているように理解している。7 μ m程度のネット地は入手可能か？（現状では、5 μ mメッシュのものを用いているが、濾過に時間がかかるので、なるべく大きいオープニングのもので作業したい。）

A: 入手可能です。マニュアルの17と20ページを見てください。

Q2: 排水時期にはサンプル数が多くなるが、船上でタンクの数を増やさないために、濃縮した試料の形で保管（6時間以内に分析するとしても）せざるを得ないと思われる。濃縮試料をすぐ分析できなくてもよいのか？

A: サンプルは、収集後速やかに分析しなければならず、プランクトンの場合には6時間以内に分析できるように、細菌については6時間以内に寒天培地などに接種が終わるように計画をしてください。

Q3: 陸上試験の試験水をタンクに準備しても、例えばSSが50mg/Lもある試水は攪拌をやめたらすぐ懸濁物が沈降するような状態になると思われる。このような場合、環境パラメーター（水質）を測定する時間と時期については決まっているのか。

A: G8には測定の時期までは記載されておりません。よって、マニュアルではあえて記載せず、各事業所で設定して頂くのが適切と考えます。

I章の3.3項、定義に関連した質問

Q4: ダメージを受けてピクピク程度に動く動物プランクトン、あるいは動きを停止した鞭毛藻などは、Viable organismsの定義からはずれると考えてよいのか？（例えば鞭毛藻は物理処理で一時的に動きをやめることがあるし、かなりなダメージを受けた動物プランクトンが長く生存する例がある。）

A: 4.1.4 生きた生物(viability)の判断基準を参考にして下さい。

処理方法によって、水生生物のダメージの現れ方が異なります。ただし、基本的な判定基準を決める必要がありますので、4.1.4で規定しました。なお、判断しかねる場合は、再成長試験を実施して対応することになります。

Q5:

A: 4.1.3

II 章の 1.1 項、品質管理計画書に関連する質問

Q6: ISO17025 については分析のための装置と従事者の技量が認定対象となると聞いている。例えば、大学の一部を委託したり、協力を依頼するような形は可能となるのか？

A: ISO17025 に従った品質管理計画書 QMP の 4.5 項 試験・校正の下請負契約の手順書を満足していれば、大学の一部を委託したり、協力を依頼するような形は可能です。

II 章の 2 項、サンプリングの準備に関連する質問

Q7: 試験に使う試験水は、どうしても人工的につくる必要があるが、添加する物質に関して標準的な物質を示していただくとありがたい。例えば、SS を増やすためのカオリンなどの他に、DOC や POC も濃度を上げる必要がでると思われるので、標準的な試薬を示していただきたい。

A: G8 では添加する物質までは記載されておられません。よって、マニュアルではあえて記載せず、各事業所でご計画されている処理装置を考慮の上、設定して頂くのが適切と考えます。本書では使用する活性物質等の効果との兼ね合いもありますので、あえて物質を明記しておられません。最終的には、試験者及び申請者が適切と考えられる物質を選定するのが良いと考えます。

Q8: 試験水の事前の攪拌(特に SS が高い場合にはすぐ粒子が沈降することが予測される)が必要ではないか？

A: 生物への影響を考えると、SS は速やかに沈降した方が良いとも考えられます。また、SS 物質の注入方式ですが、試験前のタンクに投入するのが良いのか、ポンプのところで注入方式が良いのかといった試験設備のデザインにも関係します。それらは、試験者及び申請者の設備・試験デザインで融通が利くところですので、あえて記載しないでおきます。

Q9: タンク内の試水を濃縮する際に、水中ポンプによって試水を移動させ、ネットに注ぐやり方をとっているが、水中ポンプの使用について問題はあるか？(当初ポンプによる動物プランクトンのダメージを心配したが、検鏡してもダメージが見られなかったので用いている。)

A: サンプルを収集する際、水中ポンプしない方法があるならばその方法を使用して下さい。G8 上の各種要件、例えば流入試験水の要件、及び排出時の対照水の生物濃度要件が満たされる方法であれば構いません。なお、各種ポンプにおいては、強い剪断応力等が生じないものであるならば良いと思います。本書に記載している採水及び濃縮法は、本書作成グループが、生物への影響等をも確認した推奨する標準的な方法と考えて下さい。

II 章の 3.9.1 項、サンプルの濃縮に関連する質問

Q10: 濃縮に関して、私たちは 2 段階濃縮をしている。すなわち、L サイズの場合 1 m³の水をまず、35 μm メッシュ (対角線 50 μm) で数百 ml へバルにして実験室に持ち込み、そこでさらに小さいネット地 (メッシュは小さくしています) で 30ml 以下ぐらいに再濃縮して全量計数 (処理水の場合) している。本書の方法と少し違うのですが問題がありますか？

A: 生物量によって、必要な濃縮段階が異なりますので、本書には濃縮段階数をあえて記載しておられません。2 段階でも問題ありません。

II 章の 4.1 項、L サイズグループの計数に関連する質問

Q11: 計数して記録に残すのは 50 μm 以上の生物だけでよいか？小さいものはバックグラ

ウンドとしても計数しなくてよいのか？

A: LサイズとSサイズのサンプルは別々に採集しますので、基本的に計数はそれぞれ別なサンプルで行います。よって、4.1.1ではLサイズだけで構いません。なお、実施者の参考情報としてSサイズのものも計数することは良いことと思います。

II章の4.1.3項、群体を形成する生物の最小サイズに関連する質問

Q12: 群体を形成する生物の場合、前述 Q5 のように、チェーンが物理処理でちぎれて単細胞になった場合がよく見られた。その場合、単体の場合に $10\mu\text{m}$ 以下になるものは問題がないが、*Eucampia* では単体でも $10\mu\text{m}$ 以上となる場合が多い。同種でも計測部位が異なることになるがかまわないか？また、*Nitzschia* のように斜めに重なりあまり長くない場合には群体の幅を最小サイズとしてよいのか？

A: 群体が処理前はLサイズだったのが、処理してバラバラになってSサイズになった場合は、当然Sサイズの生物として計数することになります。*Nitzschia* の群体も当然、群体の minimum dimension が最小サイズになります。

II章の4.1.4項、生きた生物の判断基準に関連する質問

Q13: 鞭毛藻は運動を停止したり、形状が変化しても時間経過とともに戻ることが往々にしてある。鞭毛藻が多い場合には、1回計数しても数時間後に再度確認する必要がある。(マニュアル化する必要はないと思われる。)

A: 前記したように、判断が難しい場合には、再成長試験を実施してください。

Q14: 珪藻の生死判定が本当に出来るか？

A: 珪藻の色素は正常な場合は、緑色から褐色です。これら色素が存在しない、あるいは、明らかに脱色していかで判断することになります。また、強調しますが、処理装置が明らかに効果を発揮している場合は、これら判断基準で十分に生死判定が可能です。ただし、処理効果が弱い場合などでは、確かに判断に困るケースがあります。このような場合は、生きてると判断するのが適切と考えます。また、本書では、このような場合再成長試験を評価基準としております。

その他の質問

Q15: 群体と単細胞が混在している時の存在量の表示は、個体/ml (ind./ml) でよいのか？

A: 構いません。

Q16: 5日間保管試料の扱い方へのコメントが必要ではないか？(例えば、懸濁物はほぼ完全に沈降していると思われるが、対照区共々完全に混ぜてから比較するのか？船中のタンクを想定すると、攪拌することは不可能と思われる。)

A: 本書は、サンプリングと分析を対象にしており、試験全体の方法は対象にしておりません。懸濁物(SS)に関しては、II-2の対処方針に示した通りです。

Q17: POC,DOC などとともに、試験水として 10 から $50\mu\text{m}$ の生物の密度を増加させることが必要になると思われるが、数百 m^3 の海水に ml あたり 10 の3乗以上の細胞を与えるようなプランクトン種、培養装置に関してアイデアを示していただけるとありがたい。(餌料生物を購入することを想定していたが、いずれも現状では Minimum Dimension が $10\mu\text{m}$ 以下の生物とのことであった。)

A: これはわが国だけでなく、世界中で頭を抱えている問題です。適当な生物種は今のところ見つかっていません。

Q18: 処理直後に D-2 基準をクリアしても、5日後に卵から孵化して生物が増加することもあり得ると思われる。あるいは基準以下のサイズが大きくなるなどの現象も考えられる。例えば、線虫は物理処理、化学処理に対して非常に強く、数日後に育つことがあった。また、試水を検鏡まで保管しておく時間にワムシが増加したこともあった。

A: この点に関しては、処理システムの問題であると考えます。

Q19: 実際の陸上試験を想定したとき、試験水を準備するために、どのような種類のプランクトンを数百立米も高密度でどのように培養を行うのか、適切な方法があるのか。

A: G8で定められておりますので、生物密度は変更出来ません。培養で準備する場合として、株・種類の選定と方法を継続して検討し情報を提供するつもりです。培養以外の方法としては、10の3乗以上生物が存在する自然水もありますので、そのような生物の多い時期に試験を実施する方法が考えられます。

Q20: Minimum Dimension を計測しながら、一定時間内にプランクトン数を計数出来るか？

A: G8 で定められておりますのでできるように体制を整えるというのが回答になります。なお、サイズ区分が明らかな生物については、いちいちマイクロメータで計測しなくても良いと考えております。

資料6 染色法と viability 判定法 (参考)

1. Calcein-AM を用いた方法

1.1 適用可能生物 (試験に適用した生物/生物群)

L サイズ: 動物プランクトン (カイアシ類・二枚貝類の幼生・アルテミア・ワムシ等) および植物プランクトン (珪藻類等)

S サイズ: 動物プランクトンおよび植物プランクトン (珪藻類・渦鞭毛藻類・テトラセルミス等)

1.2 使用試薬

Calcein-AM ($C_{46}H_{46}N_2O_{23}=994.86$)

CAS No. : 148504-34-1 (同仁化学)

1.3 必要機材

蛍光顕微鏡 (蛍光特性: $\lambda_{ex}=490\text{ nm}$, $\lambda_{em}=515\text{ nm}$)

1.4 作業手順

1) Working solution の作成

Calcein-AM solution 200 μl を濾過海水 10 ml に添加 (最終濃度: 20 μmol)

2) 染色サンプルの調整

a) 作成した Working solution 1 ml を遠心管等に取り移す。

b) 5%の Pluronic を 0.3 ml を a)に加える (溶液 A)。

c) 試料 2 ml を溶液 Aに加える。

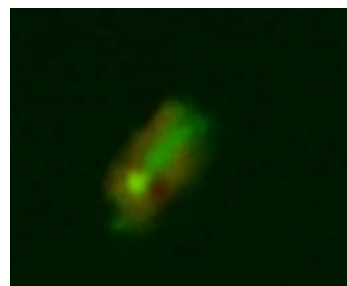
d) 染色反応は、室温 (約 20 °C) で行い、1 時間後蛍光顕微鏡を用いて、外部形態および蛍光観察を行う。

1.5 viability 判定規準例 (写真等)

生きている個体は、黄緑色の蛍光を発色するので、蛍光を発する個体は生きていると判断する。以下に薬剤処理 (例として PERACLEAN®Ocean を使用) した試料の例を挿入する。

S サイズグループ

未処理 (5 日後): *Tetraselmis* sp. (左: 明視野観察、右: 蛍光観察)



(右図中の黄緑蛍光は Calcein-AM による蛍光、赤色蛍光はクロロフィルの自家蛍光)

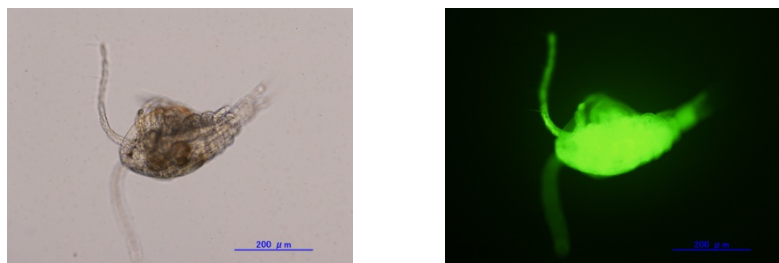
処理（5日後）：*Tetraselmis* sp.（左：明視野観察、右：蛍光観察）



（右図において Calcein-AM による蛍光は観察されない）

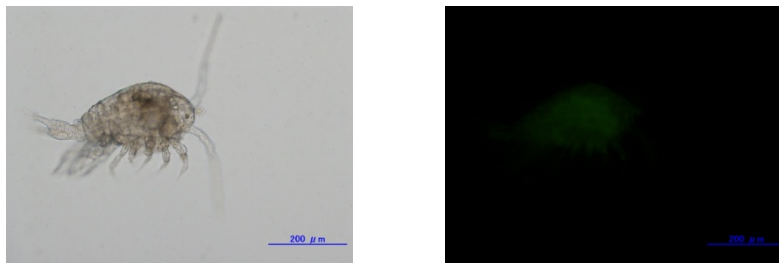
L サイズグループ

未処理（5日後）：カイアシ類（左：明視野観察、右：蛍光観察）



（右図中の黄緑蛍光は Calcein-AM による蛍光）

処理（5日後）：カイアシ類（左：明視野観察、右：蛍光観察）



（右図において Calcein-AM による蛍光は観察されない）

1.6 留意事項

染色に関する染色時間と温度および試薬の濃度は、処理法によって大きく異なる場合があるので、よく検討すること。

1.7 参考文献

MEPC 58/INF.10 (2008)

1.8 問合せ先

東京大学 アジア生物資源環境研究センター 特任助教 大村卓朗
aomura@ecc.mail.u-tokyo.ac.jp

2. ニュートラルレッドを用いた方法

2.1 適用可能生物（試験に適用した生物/生物群）

L サイズ： カイアシ類、ゴカイ幼生、シオミズツボワムシを含む多くの動物プランクトン（※ただしアルテミアは全く染色されない。二枚貝幼生への染色性が悪い場合もある）、珪藻類等

S サイズ： 原生動物や植物プランクトン（珪藻類、渦鞭毛藻類、テトラセルミス等）（※染色可能な植物プランクトンは鋤崎&韓 2006 に詳しい）

2.2 使用試薬

neutral red (C₁₅H₁₆ClN₄=228.78)

CAS No. : 553-24-2

2.3 必要機材

光学顕微鏡（実体顕微鏡においても透過光源が必要）、マイクロピペット等

2.4 作業手順

1) Working solution の作成

蒸留水を用いて 1%(w/v)溶液を作成。遮光室温保存。

2) 染色サンプルの調整

a) プランクトンを含む試水 10 ml に対して Working solution 5 μl を加え、静かに転倒混和。

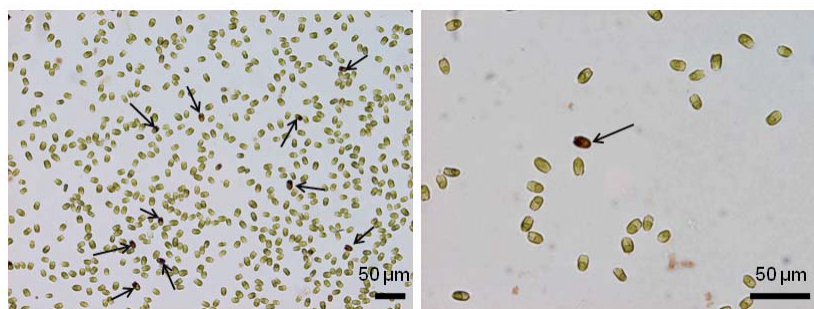
b) 環境水温下で 30~60 分間インキュベート。

c) 光学顕微鏡（透過光下）で染色性を確認。

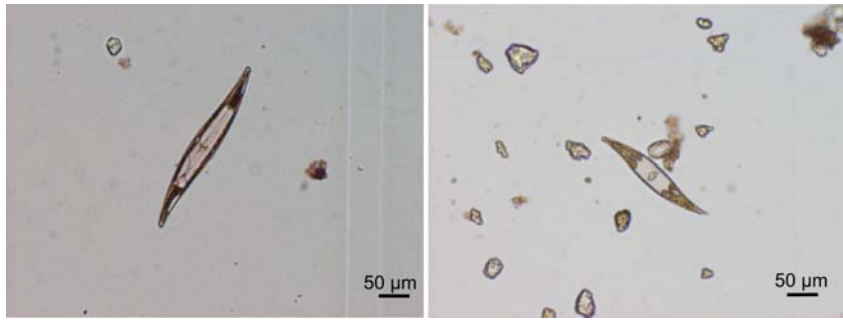
2.5 viability 判定規準例（写真等）

生存個体はニュートラルレッドに染色される鮮赤色部位を持つ。（細胞・組織全体が染まるのではなく、細胞内のリソソーム顆粒が染色される。）以下に加熱処理によるラボラトリー実験結果および加熱処理型システムに応用した例を示す。

S サイズグループ



上図、テトラセルミスの死細胞（加熱処理）に生細胞を加えニュートラルレッド染色した結果。生細胞のみが染色されている（矢印）。



上図、加熱型処理システムによる珪藻 *Pleurosigma* sp. の処理前（左）と処理直後（右）。処理後の細胞は染色されない。

L サイズグループ



上図、シオミズツボムシ (a)、カイアシ類 (b; *Paracalanus parvus*)、珪藻 *Coscinodiscus wailesii* (c) の染色例。何れも生個体・生細胞である。

2.6 留意事項

- 一部のプランクトン種に対して染色性が悪い場合がある。必ずポジティブコントロールを取る。
- 試水中に染色剤を吸着するような浮遊物が多い場合は、染色液の添加濃度を適宜増やす。3 倍程度増やしても死亡個体は染色されない。
- ニュートラルレッドの溶解性と赤色色調は pH に大きく依存する。一般的な海水 (pH 8.0) では溶解性を保ち淡黄色を呈する。生体内の酸性細胞内器官に取り込まれた後は鮮やかな赤色を呈する。試水の pH が高い場合 (例えば pH 8.5 程度) はニュートラルレッドの溶解性が低くなり、生体への取り込みが妨害される。pH が低い場合 (例えば pH 7.0 を下回る場合) は海水自体が鮮赤色を呈し、検鏡が困難となる。
- 処理水に残存する様々な化学物質がニュートラルレッド発色団の退色を引き起こすことが予想される。適切な方法で「偽陰性」を与えないという証明が必要である。

2.7 参考文献

- Crippen and Perrier (1974) The use of neutral red and evans blue for live-dead determinations of marine plankton. *Stain Technology* 49: 97–104.

- 鋤崎 俊二・韓 東勲 (2006) 植物プランクトン細胞の生死判別ー自然海水中に存在する植物プランクトンへの生体染色法の適用可能性ー. 日本海洋生物研究所年報 2006 年版: 50-54.
- Koike et al. (2010) Thermal Aqua-Filtration (TAF) System: A New Concept of Environment-Friendly BWMS Applying “Retrieved Heat” to Eliminate Living Organisms, WMU Journal of Maritime Affairs, in press.

2.8 問合せ先

広島大学大学院生物圏科学研究科 准教授 小池一彦
kazkoike@hiroshima-u.ac.jp