

MIURA Technical Report

生菌分離装置 GF-1A

三浦工業株式会社 三浦環境科学研究所

【既報】日本防菌防黴学会誌, Vol.52, No.4, pp.141-146 (2024)

連続フロー式誘電泳動法システムと定量 PCR を 組み合わせたレジオネラ属菌の迅速検出法

宮内 佑子¹, 池内保菜美¹, 高井 政貴¹, 川嶋 文人², 森田 智士³, 佐藤 優成³, 円城寺隆治³

¹ 三浦工業株式会社 三浦環境科学研究所 (〒799-2430 愛媛県松山市北条辻 864 番地 1)

² 愛媛大学大学院 農学研究科 (〒790-8566 愛媛県松山市樽味 3-5-7)

³ (株)AFI テクノロジー (〒606-8397 京都市左京区聖護院川原町 53 京都大学 医学研究科
メディカルイノベーションセンター2 階)

Rapid Detection Method of Viable *Legionella* Species by the Combination of Continuous-Flow Dielectrophoresis System and Quantitative PCR

Yuko MIYAUCHI¹, Honami IKEUCHI¹, Masaki TAKAI¹, Ayato KAWASHIMA²,
Satoshi MORITA³, Yusei SATO³, and Takaharu ENJOJI³

¹ MIURA CO., LTD., 864-1 Hojotsuji, Matsuyama, Ehime 799-2430, Japan

² Graduate School of Agriculture, Ehime University, 3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566, Japan

³ AFI Corporation, 2nd Flr., Medical Innovation Center, Kyoto University,
53 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8397, Japan

Summary

In this study, we investigated the method of separating and quantifying only viable *Legionella* by combining the Continuous-Flow Dielectrophoresis System (CFDS) and quantitative PCR (qPCR). The CFDS is equipped with a particulate filtration system that combines the dielectrophoresis (DEP) principle and microfluidic control technology. The DEP force has a frequency dependence, and when the separation state of viable and dead

Legionella by CFDS was confirmed with a CCD camera, the capture of viable *Legionella* was observed significantly in a specific frequency range (3.0 MHz to 6.0 MHz). So, the trapped rate of viable *Legionella* at an applied voltage of 22.0 Vpp and frequency of 6.0 MHz was determined. Furthermore, the number of copies of 16S rRNA gene per 1 CFU was calculated as a conversion factor based on the number of colonies by the plate culture method and the number of copies by qPCR from *Legionella* recovered samples captured by CFDS (22.0 Vpp, 6.0 MHz). The conversion formula was then established to determine the number of *Legionella* by this method. Samples prepared at nine different bacteria concentrations were then analyzed for the number of *Legionella* by this method and compared with the plate culture method. As a result, $R^2 = 0.9353$ was obtained, indicating a high correlation between this method and the plate culture method.

Key words: Dielectrophoresis (誘電泳動) / *Legionella* Species (レジオネラ属菌) / Rapid detection method (迅速検出法) / Quantitative PCR (qPCR)

【緒言】

レジオネラ属菌 (以下, レジオネラ) は自然界の水系や土壌に広く存在し, 入浴施設や空調設備の冷却塔, 給湯設備等の水を使用する設備で繁殖しやすく, レジオネラに汚染されたエアロゾルの吸入によってレジオネラ肺炎を引き起こす。そのため, これら施設の水の管理は不可欠である。

レジオネラの検査法は平板培養法を主とするが, 判定に約2週間を要することがしばしば課題として挙げられる。一方, 迅速検査法として PCR 法や定量 PCR 法 (以下, qPCR 法), LAMP 法などの遺伝子検査法が検討・実施されているが, これら手法は生菌のみならず死菌であっても該当する DNA を検出するため, 培養検査の結果と必ずしも一致しない^{1, 2)}。そこで, 生菌由来の DNA を選択的に検出する方法として EMA-qPCR 法がある。この方法は, 検体を qPCR 測定する前に選択的膜透過性色素 EMA (ethidium monoazide) によって死菌由来の DNA を修飾し, PCR 増幅できない状態にすることを利用して, 生菌由来 DNA を選択的に検出する方法である³⁾。さらに, EMA-qPCR 法に液体培養 (Liquid Culture: LC) による生菌の選択的増殖を組み合わせた LC EMA-qPCR 法は, より高感度な生菌検出法として令和元年に厚生労働省医薬・生活衛生局生活

衛生課長通知「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」(薬生衛発 0919 第 1 号)⁴⁾に収載された。ただし, EMA 処理は検体が比較的夾雑物の少ない浴槽水には有効だが, 夾雑物の多い冷却塔水には十分な効果が得られず適用できない^{1, 5)}。

そこで, レジオネラ生菌と死菌を分離する手法として誘電泳動 (Dielectrophoresis: DEP) の原理を利用することに着目した。DEP とは不均一電界中に置かれた誘電微粒子において, 形成された電界強度に応じて誘起双極子に及ぼす力に差が生じ, 微粒子が泳動する現象である⁶⁻⁸⁾。DEP 力は電界強度, 周波数, 粒子および懸濁液の複素誘電率, 粒子体積に強い依存性を示す。これらのパラメータを制御することによって, 多層膜構造の誘電微粒子とみなせる微生物を選択的に分離・濃縮および生死菌判別することが可能である⁹⁻¹¹⁾。

本研究では連続フロー式誘電泳動法を搭載したシステム (Continuous-Flow Dielectrophoresis System: CFDS) により試料中の生菌を分離・濃縮し, その回収液から qPCR 法によってレジオネラ由来の遺伝子量を測定する生菌検出法を検討したので報告する。

【実験方法】

1. レジオネラ標準菌液の調製

Legionella pneumophila subsp. *pneumophila* JCM7571 を BCYE α 寒天培地(日水製薬)に塗抹して 36°C, 72 h 培養後, 白金耳で採取し, 0.3 mM リン酸緩衝液 (pH7.2) に懸濁したものを標準菌液として調製した (10^{10} CFU/mL)。これを適宜リン酸緩衝液で希釈して濃度調整を行い生菌試料として用いた。また, 死菌試料として用いる際は, この調製菌液をウォーターバスで 95°C, 10 min 加熱して用いた。

2. レジオネラの平板培養法による菌数測定

試験に用いた調製菌液 100 μ L を BCYE α 寒天培地へ塗抹し, 36°C で 5-7 d 培養して菌数を計測した。

3. qPCR 法によるレジオネラの測定

3-1. DNA 抽出

試料を 15,000 rpm, 4°C で 5 min 遠心し, 上清を除去した沈渣に Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) を 50 μ L 添加してボルテックスミキサーで混合後, 95°C で 10 min インキュベートした。これをボルテックスミキサーで軽く混合後, 15,000 rpm, 4°C で 10 min 遠心し, 氷上で 5 min 静置後, 上清 25 μ L を DNA 溶液として回収した。

3-2. qPCR の手順と反応条件

qPCR には CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) を用いた。検量線にはキット添付のレジオネラ 16S rRNA 遺伝子標的領域を組み込んだプラスミド溶液 (16S Positive Control 10^6 copies/ μ L) 5 μ L に 45 μ L の Easy Dilution を加えて 10^0 copies/ μ L まで 10 倍希釈した 7 点の希釈系列を作製した。そして, 容量 100 μ L の PCR チューブに 1 検体あたりマスターミックスを 20 μ L, 検量線または鋳型 DNA を 5 μ L 加え, 全量を 25 μ L として qPCR 装置 Thermal Cycler Dice[®] Real Time System III (タ

カラバイオ) にセットした。qPCR 条件は 95°C 10 sec の後, 95°C 5 sec, 55°C 20 sec, 72°C 20 sec を 45 サイクルとした。

4. 連続フロー式誘電泳動法システム (CFDS) による生死菌分離

4-1. 基本原理およびシステム説明

本研究では, 検体中レジオネラの生死菌分離工程に対して微生物迅速検査装置 ELESTA[®] PixeeMo[®] (ELS-004, 以下, 装置, AFI テクノロジー) を採用した (Fig. 1A)。本装置は DEP 原理による電気計測およびマイクロ流体制御の複合技術である微粒子ろ過原理^{12, 13)}を搭載した CFDS であり, 主に不均一電界を形成するために必要な正弦波電圧および周波数を印加する制御部, 検体を送液するためのシリンジポンプ部および菌の捕捉状況を CCD カメラでリアルタイム計測するための観察部で構成されている (Fig. 1B-a, b)。同システムによる生死菌分離を実施するためには専用の ELESTA チップ (ELC121N, 以下, チップ, 同社) (Fig. 1B-c) および ELESTA バッファ (ELB100N, 以下, バッファ, 同社) を使用する。前者は DEP による分離効率を向上させるために設計されたマイクロ流路チップであり, シリンジ接続部 (入口), 電極を搭載したマイクロ流路, 排液部 (出口) から構成され (Fig. 1C), CCD カメラで観察すると電極間に作用する DEP 力によって細菌が捕捉される様子が観察できる (Fig. 1D)。後者は検体の導電率の制御および生理活性状態の維持を目的として調製された溶液である。既報¹²⁾のシステム運用では試料はシリンジからチップ入口側へ送液するが, 本研究におけるバッファおよび試料の流入は, シリンジポンプに 10 mL シリンジ (テルモ) を取り付け (Fig. 1B-d), チップ出口側に装着した PTFE チューブ (ID: 1 mm $\times$ OD: 2 mm $\times$ 150 mm, 以下, チューブ, Fig. 1B-e) から逆送液ユニット (Fig. 1B-f) を用いて実施した。

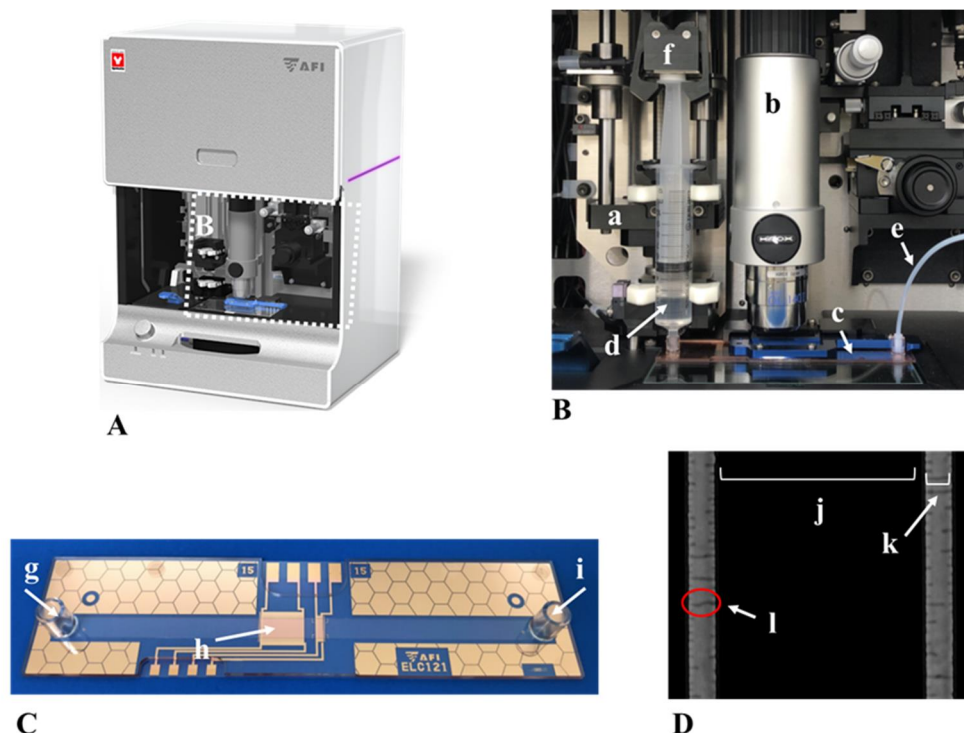


Fig. 1. Setting up for analysis using Continuous-Flow Dielectrophoresis System (CFDS).

A: Hardware of CFDS “ELESTA PixeeMo”, B: Component parts – a) Syringe pump unit, b) Digital Microscope, c) “ELESTA Chip” for separating viable and dead bacteria, d) Syringe for pumping or reverse pumping liquid, e) PFA tube, f) Reverse liquid flow unit, C: Configuration of “ELESTA Chip” – g) Inlet, h) Electrodes for DEP, i) Outlet, D: Magnified image of electrodes by CCD camera – j) Electrode, k) Slit between electrodes, l) Bacteria trapped by CFDS.

4-2. 生菌および死菌の捕捉状態の観察

菌濃度が 10^6 CFU/mL の生菌試料または 10^6 CFU/mL 相当の死菌試料を用いて、周波数変化におけるチップ電極への菌の捕捉の状態を装置 CCD カメラで観察した。あらかじめチップ流路内にバッファを充填した状態で電極への印加を開始し、試料を流速 $50 \mu\text{L}/\text{min}$ で 3 min 送液した時点での電極を撮影した。印加条件は、電圧を 22.0 Vpp に固定し、周波数は生菌試料の場合は 0.050, 0.10, 0.50, 1.0, 1.5, 3.0 および 6.0 MHz, 死菌試料の場合は 0.050, 0.10, 0.50, 1.0, 1.5 および 3.0 MHz の範囲で変化させた。

4-3. 生菌捕捉率および死菌残留率の測定

菌濃度が 10^3 CFU/mL の生菌試料または 10^6

CFU/mL 相当の死菌試料を用いて、3.0 MHz および 6.0 MHz における CFDS 処理後の回収割合を調べた(以下、生菌の場合を捕捉率、死菌の場合を残留率と表記する)。あらかじめチップ流路内にバッファを充填した状態で電極への印加を 22.0 Vpp, 3.0 MHz または 6.0 MHz に設定し、試料 1 mL を流速 $50 \mu\text{L}/\text{min}$ で 20 min かけて送液した。次に、印加状態を保ったままバッファ 3 mL を流速 $50 \mu\text{L}/\text{min}$ で 60 min かけて送液して流路内を洗浄した。入口側のシリンジを新品に交換し、印加を停止して電極に捕捉されていた菌を遊離させ、バッファ 1 mL を $500 \mu\text{L}/\text{min}$ で 2 min かけて送液し、電極から遊離した菌を回収した。そして、CFDS 処理前の調製菌液と CFDS 処理後の回収液について、生菌試料は平板培養法による菌数を、死菌試料は qPCR 法でレジオ

ネラ由来のコピー数を測定し、それぞれ捕捉率と残留率を算出した。なお、生菌試料は CFDS 処理前の調製菌液中に死菌も混ざっている可能性があるため平板培養法による測定とし、死菌試料はコロニーが形成できないため qPCR 法による測定とした。各試験は 3 回ずつ実施し、捕捉率および残留率の平均値を求めた。

4-4. 回収液の平板培養法および qPCR 法による測定
菌濃度が 10^2 CFU/mL または 10^3 CFU/mL の生菌試料に対して、印加条件 22.0 Vpp, 6.0 MHz で 4-3. の手順に従い CFDS 処理した後の回収液から 100 μ L $\times$ 6 検体を分取した。そのうち 3 検体は平板培養法により菌数を測定し、残り 3 検体は qPCR 法によってレジオネラ由来のコピー数を測定した。また、菌濃度を 10^1 から 10^5 CFU/mL の範囲で調製した 9 種の生菌試料を準備し、同条件で CFDS 処理を行った回収液について、全量を DNA 抽出し、qPCR 法によってレジオネラ由来のコピー数を測定した。

【実験結果ならびに考察】

1. CFDS によるレジオネラの捕捉状態の観察結果

生菌試料または死菌試料の周波数変化における電極への菌の捕捉状態を装置 CCD カメラで観察した画像から (Fig. 2), 生菌試料の場合は周波数 0.050 MHz では菌の捕捉が確認されなかったが、0.10 MHz から 6.0 MHz までの周波数領域では菌の捕捉が確認された。特に 0.50 MHz から 3.0 MHz の範囲では、捕捉量の多さから電極間に菌が連なる様子が観察された。一方、死菌試料の場合は、0.10 MHz から 1.5 MHz の範囲において菌の捕捉が確認されたが、いずれの周波数領域においても電極間に菌が連なることはなく、生菌試料の場合に比べて捕捉量が顕著に少ないことが目視確認できた。また、3.0 MHz では菌の捕捉は確認されなかった。生菌は、

高導電性の細胞内物質が低導電性の細胞膜あるいは細胞壁によって被覆された無損傷の球体構造である。一方で死菌は損傷した細胞膜の部位から細胞内物質が流出することによって、生菌と比較して電気特性(細菌に作用する DEP 力)は変化することが知られている^{14, 15)}。本結果は、3.0 MHz から 6.0 MHz において正の DEP 力(電極への引力)が生菌に対してより強く作用したことを示唆し、生菌と死菌の分離は、3.0 MHz から 6.0 MHz の周波数領域において有効であるといえた。

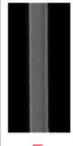
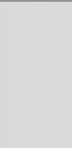
	Frequency (MHz)						
	0.050	0.10	0.50	1.0	1.5	3.0	6.0
Viable <i>Legionella</i>							
	-	+	++	++	++	++	+
Dead <i>Legionella</i>							
	-	+	+	+	+	-	-

Fig. 2. Images of viable or dead *Legionella* trapped by CFDS at each frequency. Quantity level of trapped bacteria: (++) high, (+) middle, (-) low.

2. CFDS による生菌捕捉率および死菌残留率の結果

3.0 MHz および 6.0 MHz における生菌の捕捉率の平均値は、それぞれ $42 \pm 2.5\%$ (3.0 MHz), $31 \pm 2.3\%$ (6.0 MHz) となり、3.0 MHz 時の方が約 1.4 倍高い捕捉率であった (Table 1)。また、死菌の残留率の平均はそれぞれ $0.096 \pm 0.055\%$ (3.0 MHz), $0.015 \pm 0.0034\%$ (6.0 MHz) となり、3.0 MHz 時の方が残留しやすく、ばらつきやすい傾向が見られた (Table 2)。

浴槽水や冷却塔水などの実試料の場合、レジオネラを含む多くの細菌等の死骸が含まれることが想定される。理論上は生菌と死菌の分離が顕著であっ

でも、実試料においては夾雑物や流路内の流体の澱みなどの影響で、死菌であっても残留しやすくなる可能性は十分にある。このことから、出来る限り死菌を排除するためにはより高い周波数の方が好ましく、レジオネラの生死菌分離条件としては6.0 MHzが適していると考え、以降はこの条件で検討を行った。また、その際の捕捉率を30%とした。CFDS システムでは同周波数において流速を下げると捕捉率は向上するが、同時に死菌も残留しやすくなり、生死菌分離効率が低下するため、本条件(周波数 6.0 MHz, 流速 50 $\mu\text{L}/\text{min}$)における捕捉率を最適値とした。

Table 1. Trapped rate of viable *Legionella* by CFDS at 3.0 MHz or 6.0 MHz (N=3).

Frequency (MHz)	3.0	6.0
Trapped rate of viable <i>Legionella</i> (%)	42 $\pm$ 2.5	31 $\pm$ 2.3

Table 2. Residual rate of dead *Legionella* by CFDS at 3.0 MHz or 6.0 MHz (N=3).

Frequency (MHz)	3.0	6.0
Residual rate of dead <i>Legionella</i> (%)	0.096 $\pm$ 0.055	0.015 $\pm$ 0.0034

3. CFDS 分離処理による回収液の平板培養法および qPCR 法による測定値の比較

CFDS 処理後の回収液中の等量の試料を、平板培養法または qPCR 法により測定した場合において、1 CFU 当たりのレジオネラ 16S rRNA 遺伝子のコピー

数を換算係数 [copies/CFU]とすると、菌数とコピー数の間に式(a)が成り立つ。

$$\text{換算係数} = \frac{\text{コピー数 [copies]}}{\text{菌数 [CFU]}} \quad (\text{a})$$

従って、菌濃度が 10^2 CFU/mL または 10^3 CFU/mL の生菌試料を用いた場合の回収液から 100 μL ずつ分取した 6 検体のうち、3 検体の平板培養法による測定結果と、残り 3 検体の qPCR 法による測定結果を組み合わせる 9 通りの換算係数を算出した (Table 3)。いずれの菌濃度の場合も、100 μL 中の培養菌数 (CFU/100 μL) とコピー数 (copies/100 μL) に大きなばらつきはなく、各培養菌数の結果と qPCR のコピー数の結果を組み合わせる 9 通りから算出される換算係数の平均値も、それぞれ 5.6 (SD = 0.71, CV (%) = 13) および 5.9 (SD = 0.60, CV (%) = 10) と近い値となった。そこで、本手法によって得られたコピー数から菌数へ換算する係数を暫定的に 6 とした。

4. CFDS と qPCR 法を組み合わせる調製菌液中のレジオネラの検出結果

菌濃度を 10^1 から 10^5 CFU/mL の範囲で調製した 9 種の生菌試料に対して CFDS 処理後の回収液全量から得たコピー数を、換算係数 6、捕捉率 30% とし て式(b)に当てはめ、元試料のレジオネラ菌数を算出した。

Table 3. Detection results of *Legionella* by the plate culture or qPCR in each 100 μL of recovery sample by CFDS and the conversion factor calculated from 9 combinations.

Initial bacteria concentration (CFU/mL)	Plate culture method (CFU/100 μL)		qPCR (copies/100 μL)		Conversion factor (copies/CFU)					
10^2	Sample1 (S1)	11	Sample4 (S4)	75.1	S4/S1	6.8	S5/S1	5.9	S6/S1	6.0
	Sample2 (S2)	12	Sample5 (S5)	64.9	S4/S2	6.3	S5/S2	5.4	S6/S2	5.5
	Sample3 (S3)	14	Sample6 (S6)	65.9	S4/S3	5.4	S5/S3	4.6	S6/S3	4.7
					Avg.=5.6 SD=0.71 CV(%)=13					
10^3	Sample7 (S7)	101	Sample10 (S10)	514	S10/S7	5.1	S11/S7	5.8	S12/S7	6.3
	Sample8 (S8)	93	Sample11 (S11)	585	S10/S8	5.5	S11/S8	6.3	S12/S8	6.8
	Sample9 (S9)	102	Sample12 (S12)	635	S10/S9	5.0	S11/S9	5.7	S12/S9	6.2
					Avg.=5.9 SD=0.60 CV(%)=10					

$$\text{元試料菌数 [CFU/mL]} = \frac{\text{定量コピー数 [copies/回収液]}}{6} \div 0.3 \quad (\text{b})$$

この方法によって算出された元試料の定量値 (CFU/mL) と同試料を平板培養法で測定した菌数 (CFU/mL) を比較したところ、高い相関を示し、 $R^2 = 0.9353$ となった (Fig. 3)。本手法は原理として VBNC (viable but non-culturable) 状態の菌も検出する可能性はあるが、本実験で用いた試料が培養間もない標準菌株の調製液であったため、VBNC はほとんど検出されなかったことも高い相関の理由と考えられる。今後、VBNC の影響も踏まえた実試料での評価も行っていきたいと考える。

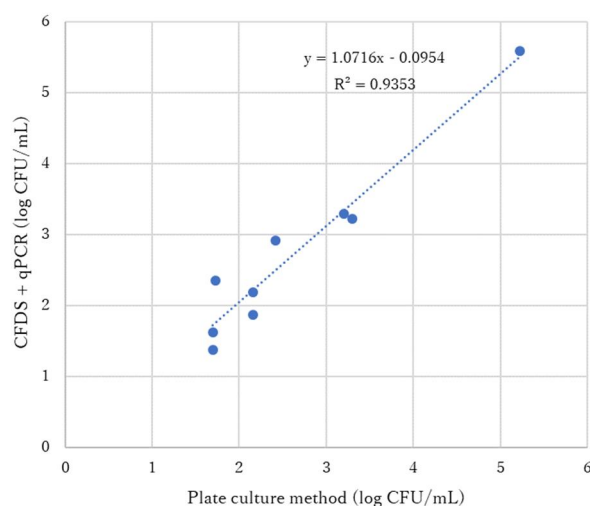


Fig. 3. Comparison of the detection results of *Legionella* by the plate culture and CFDS + qPCR. The result of CFDS + qPCR is applied to the conversion formula.

【結論】

DEP の原理により試料中の生菌を分離・濃縮し、その回収液から qPCR 法によってレジオネラの遺伝子のみを特異的に増幅するという手法で、レジオネラ生菌の定量を試みた。標準菌液を用いて、生死菌分離に適した印加条件を決定し、測定したコピー数から菌数へ換算する係数を求めて算出した換算値は、平板培養法による測定結果との高い相関を示し

た。本手法は浴槽水や冷却塔水を対象としたレジオネラの迅速検出法としても応用できる可能性が示唆される。今後は、これら実試料に対しての定量性を評価していきたいと考える。

利益相反

宮内佑子, 池内保菜美, 高井政貴 (三浦工業㈱の社員)

川嶋文人 (開示すべき利益相反はない)

森田智士, 佐藤優成 (㈱AFI テクノロジーの社員)

円城寺隆治 (㈱AFI テクノロジーの役員)

【文献】

- 1) 公益財団法人日本建築衛生管理教育センター (2017) 第4版レジオネラ症防止指針.
- 2) レジオネラ研究者の会 (2023) 第4版レジオネラ属菌を知る.
- 3) タカラバイオ株式会社 (2023) レジオネラ属菌の遺伝子検査 ～生菌検査法 (EMA-qPCR) ～: https://www.takara-bio.co.jp/research/kensa/pdfs/book_7-1.pdf, (2024 年 1 月 15 日閲覧).
- 4) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知 (令和元年 9 月 19 日) 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について. 薬生衛発 0919 第1号.
- 5) Inoue, H., Takama, T., Yoshizaki, M., and Agata, K. (2015) Detection of *Legionella* Species in Environmental Water by the Quantitative PCR Method in Combination with Ethidium Monoazide Treatment. *Biocontrol Science*, 20, (1), 71–74.
- 6) Pohl, H. A. (1951) The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields. *J. Appl. Phys.*, 22, (7), 869–871.
- 7) Pohl, H. A., Hawk, I. (1966) Separation of Living and Dead Cells by Dielectrophoresis. *Science*, 152, (3722), 647–649.

- 8) Pohl, H. A. (1978) *Dielectrophoresis*, p. 350, Cambridge Univ. Press, New York.
- 9) 高瀬亜希, 圓城寺隆治, 内田 諭 (2013) 泳動濃縮および画像解析を併用した飲料混入菌の定量計測. 日本食品工学会誌, **14**, (2), 97–106.
- 10) Li, H., Bashir, R. (2002) Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of *Listeria* on microfabricated devices with interdigitated electrodes. *Sensors and Actuators B*, **86**, 215–221.
- 11) 鈴木雅登, 安川智之, 珠玖 仁, 末永智一 (2005) 誘電泳動法による微小流体中での微生物の生死分離. 分析化学, **54**, (12), 1189–1195.
- 12) 森田智士 (2020) 電気計測・流体制御技術を用いた微生物のリアルタイムモニタリング. 防菌防黴, **48**, (5), 221–226.
- 13) 円城寺隆治 (2018) 新しい微生物迅速検査装置「エレスタTM」の紹介. 月刊 HACCP 1月号, 32–36.
- 14) 圓城寺隆治, 内田 諭, 朽久保文嘉 (2011) 誘電泳動インピーダンス計測法による細菌誘電特性と細胞膜活性状態及び流量依存性の相関検証. 静電気学会誌, **35**, (3), 139–144.
- 15) 中野道彦, 稲葉優文, 末廣純也 (2020) ライフサイエンス分野における誘電泳動の最新成果. 電気泳動, **64**, (1), 15–18.



グリーンテクノロジーを創成する
三浦環境科学研究所

愛媛県松山市北条辻864番地1 〒799-2430
TEL 089-960-2350 FAX 089-960-2351

三浦工業株式会社
<http://www.miuraz.co.jp>