

小川培地斜面と渦巻白金耳接種を用いる結核菌生菌数の測定

(第2報) 稀釈誤差と稀釈液について

東村道雄・野田用・中村栄一

国立療養所大府荘(荘長 勝沼六郎博士)

受付 昭和32年7月31日

小川培地斜面(Ogawa medium slant)と渦巻白金耳接種を用いる結核菌生菌数の測定法について第1報で説明した。生菌数測定の際に必要なことは測定誤差を明らかにすることである。しかしながら、測定誤差の問題は米国の少数の研究者¹⁾¹³⁾によつて論じられただけであつて、欧州およびわが国ではほとんどかえりみられていない現状である。このため実験成績の信頼性が著しく疑わしいことも少なくないようである。一体、生菌数測定に伴う誤差は、分布誤差(distribution error)と稀釈誤差(dilution error)とに分けられる。このうち分布誤差の測定は比較的容易であるが、稀釈誤差を実験の度に測定することは極めて困難である。このため米国の研究者も Jennison and Wadsworth¹³⁾が理論的に算出した稀釈誤差(標準偏差の平均値にたいする百分率で示されている)を代入することによつて総誤差(total error)を計算している(例えば、Fenner¹⁾, Sever and Youmans¹⁴⁾)。しかしながら、この理論的に算出された稀釈誤差は、菌が常に均等に分散しているものとして取扱われている。したがつて、菌浮游液を常に溶液のように均等に分散しているものと考えてよいかどうか問題である。実際の稀釈誤差が果して理論値に近似するかどうかを検討してみる必要があると思われる。したがつて、この研究の目的は、(1) 稀釈誤差を実測して総誤差測定のための基礎資料とすること、(2) 稀釈液の種類について検討することにある。

稀釈誤差の実測の詳細、稀釈誤差測定の理論、生菌数計算式算出の基礎については、紙面の都合上別に報告する。

実験材料および方法

Mycobacterium tuberculosis var. hominis 青山B株を用い、第1報に述べた方法で生菌数測定を行った。

(I) 稀釈誤差の検討

例えば、湿菌量 1.0mg/cc の結核菌浮游液 0.02cc を INAH 1γ 培地 n_0 本に接種して、平均集落数 \bar{x}_0 、標準偏差 S_0 を得、同時にその菌液を 10^{-m} に生理的食塩水で稀釈して、薬剤を含まない培地(以下試験管という) n 本に接種して平均集落数 \bar{x} 、標準偏差 s を得たとする。この場合、総生菌数に含まれる INAH 1γ 耐性菌の比

率は、一応 $\bar{x}_0/\bar{x} \times 10^m$ となる。しかし、この \bar{x}_0 の測定には分布誤差が含まれ、 $\bar{x} \times 10^m$ の測定には分布誤差と稀釈誤差が含まれている。これを考慮すると、 \bar{x}_0 および \bar{x} の $(1-a)\%$ 信頼限界は次のとおりとなる。

$$\bar{x}_0 \pm s_0 \times t(n_0 - 1, a) \times \frac{1}{\sqrt{n_0}} \quad \text{および}$$

$$\left\{ \bar{x} \pm t(n-1, a) \sqrt{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)^2 + S_{dil}^2} \right\} \times 10^m \quad \dots (1)$$

(注1参照)

ただし、 t は Student の " t " である。誤差 $\sqrt{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)^2} \times S_{dil}$ は、Jennison and Wadsworth¹³⁾ によつて、

(総誤差) = $\sqrt{(\text{分布差誤})^2 + (\text{稀釈誤差})^2}$ から導いた。 S_{dil} は稀釈標準偏差であるが、この場合は、稀釈列1組(列)であるから、稀釈標準誤差は S_{dil} に等しくなる。式(1)は次のようにかきえらる。

$$\left\{ \bar{x} \pm t(n-1, a) \times \frac{1}{\sqrt{n}} \times \sqrt{s^2 + (\sqrt{n} S_{dil})^2} \right\} \times 10^m \quad \dots (1a)$$

式(1a)は t 分布を用いて、任意の2つの平均値の差を比較するのに便利である。

更に式(1a)は次のようにかきえられる。 $D = S_{dil}/\bar{x}$ とすれば、 $S_{dil} = D\bar{x}$ 、これを式(1a)に代入して、

$$\left\{ \bar{x} \pm t(n-1, a) \times \frac{1}{\sqrt{n}} \times \sqrt{s^2 + (\sqrt{n} D\bar{x})^2} \right\} \times 10^m \quad \dots (1b)$$

この式は、予め S_{dil} を実測して D を算定してある場合、 D を任意の場合に代用するのに便利である。

分布誤差と稀釈誤差とを、このように合成する方法は米国の研究者¹³⁾によつて用いられた方法であるが、総生菌数の信頼限界の出し方は、次のように考えることもできる。原菌液から 10^{-m} までの稀釈の誤差を問題としなかつたら、 \bar{x} の信頼限界は分布誤差だけを考慮して、次のように表わすことができる。

$$\bar{x} \pm s \times \frac{1}{\sqrt{n}} \times t(n-1, a)$$

これに 10^m を乗じるに当つての稀釈誤差を、 $(1 \pm D)$ で表わすと次のようになる。

$$\left(\bar{x} \pm s \times \frac{1}{\sqrt{n}} \times t(n-1, a) \right) \times 10^m (1 \pm D) \quad \dots (2)$$

ただし、Dは稀釈誤差の平均値にたいする比であつて、稀釈列1組の場合には、 $D = Sdil/\bar{x}$ である。

以下これらの式に代入すべき稀釈誤差——この場合、稀釈標準偏差に等しい——およびDを測定する。この測定は次の目的をもっている。稀釈誤差を実験の度に毎回実測することは困難なので、予め測定した稀釈誤差を平均値にたいする百分率で表わしておいて、これを1列の稀釈列を用いる任意の測定の際に代入して総誤差を求めることにある。このような方法は決して完全なものではないが、稀釈誤差を考えないよりは、はるかに正確な推定を行うことができる。

稀釈の方法

第1法で述べた方法で菌液を作り、これを生理的食塩水で10進法で稀釈した。

(1) 駒込ピペット法。2 cc駒込ピペット(標準偏差約0.03cc)で2 cc 4回と1 cc 1回を計つて作る9 ccと、他の1 ccとを用いる10進法。

(2) メスピベット法。10ccメスピベット(標準偏差0.1 cc)による9 ccと、1 ccメスピベット(標準偏差0.01cc)によつて計る1 ccとを用いる10進法。

接種される最終稀釈液(10^{-m}液)は、接種により分離集落を作ることが必要であるので、10⁻¹稀釈誤差測定のための原菌液は稀薄なもの、10⁻⁶稀釈誤差測定のための原菌液は濃厚なものが用いられた。

稀釈誤差測定の計算式

同一の原菌液を10^{-m}に稀釈する際に、i組の稀釈列を作つたとする。このi組の10^{-m}液から一定等量をj本の試験管に接種培養して、i×j個の測定値(集落数)x_{ij}を得たとすれば、

$$\text{各組の平均値: } \bar{x}_i = \frac{\sum_{j=1}^j x_{ij}}{j}$$

$$\text{総平均値: } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^i \bar{x}_i}{i}$$

この時、稀釈標準偏差 Sdil は次の式によつて与えられる(東村, 野田, 中村, 別報)。

$$Sdil = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^i j \sum_{j=1}^j (\bar{x}_i - \bar{x}_i)^2 \dots (3)}{i(j-1)}}$$

(例) 駒込ピペット法による10⁻⁶稀釈の場合。

i=20組。j=10本。 $\bar{x}=21.54$ 。

$$\sum (\bar{x}_i - \bar{x}_i)^2 = 1473$$

$$Sdil = 9.04$$

Sdilの総平均値 \bar{x} にたいする百分率は、

$$\% Sdil = (9.04/21.54) \times 100\% = 42.1\%$$

すなわち、D=0.421

駒込ピペット法では、稀釈標準偏差の総平均値にたいする比Dは次のとおりとなる。

$$10^{-6} \text{稀釈} \dots D_6 = 0.421$$

$$10^{-5} \text{稀釈} \dots D_5 = 0.386$$

$$10^{-4} \text{稀釈} \dots D_4 = 0.360 (*)$$

$$10^{-3} \text{稀釈} \dots D_3 = 0.331$$

$$10^{-2} \text{稀釈} \dots D_2 = 0.298 (*)$$

$$10^{-1} \text{稀釈} \dots D_1 = 0.266$$

ただし、(*)印は作図によつて得た推測値である。D₆, D₅, D₃, D₁の4つの実測値はほぼ直線にならぶので、これによりD₄およびD₂を求めた。

メスピベット法では、Dは次のとおりとなる。

$$10^{-6} \text{稀釈} \dots D_6 = 0.768$$

$$10^{-5} \text{稀釈} \dots D_5 = 0.755 (*)$$

$$10^{-4} \text{稀釈} \dots D_4 = 0.702$$

$$10^{-3} \text{稀釈} \dots D_3 = 0.685$$

$$10^{-2} \text{稀釈} \dots D_2 = 0.526$$

$$10^{-1} \text{稀釈} \dots D_1 = 0.271$$

(*) 作図による推定値

ただし、駒込ピペット法では、i=20, j=10, メスピベット法では、i=10, j=10。

これらの結果で注目されることは、意外にも、メスピベット法の方が駒込ピペット法よりも稀釈標準偏差が大きいことである。また、これらの実測値がJennison and Wadsworth¹³⁾の理論値よりも、はるかに大きいことである。特に10⁻¹稀釈の場合の偏差が大きい。このことは、稀釈のために菌液1 ccを採取する時に、分布誤差が介入していることを考えさせる。なぜなら、10⁻¹稀釈に際して、このように大きい容量計測のバラつきをきたすことは到底考えられないからである。すなわち、稀釈誤差として表われてくる誤差の大部分が、容量計測のバラつきよりも、菌の分布のバラつきであることが考えられる。換言すれば、稀釈誤差として表われてくる誤差の大部分は、実は分布誤差にほかならぬことが想像される。このように考えれば計量が、より正確であるはずのメスピベット法がかえつて誤差が大きいということもありうると思われる。すなわち、実際にメスピベットを用いる時の菌の混和は不十分ではないかと思われる。私たちの実験でも、菌液を約10回上下させることによつたが、メスピベットから流出する液の速度が遅いために混和不十分の恐れが十分あるように思われた。駒込ピペットによる稀釈がより小さい稀釈標準偏差をもたらした理由は、容量計測の正確度で劣つても、パンピングによつて十分な混和をもたらしたためと思われる。稀釈誤差の本体が、大部分分布誤差にあると考えれば(10ccから1ccを採取する時、1cc中に含まれる菌量のバラつきが主であつて、1ccの計測のバラつきだけではない)、駒込ピペット法がメスピベット法にまさっていることも根拠のあることと思われる。

ここに実測したように稀釈誤差が意外に大きいという

ことは、実験計画をたてるに当つて次のことを考えさせる。

population分析の場合のように、同一菌液から等量を種々の培地に接種して、各培地の平均集落数を数える場合には、誤差として分布誤差だけを考えればよいから、各培地10~20本の試験管を使用すると、信頼度の高い推定を行うことができる。

これに反して、濃厚な菌液の総生菌数を算定する場合のように、希釈を必要とする実験では、希釈列を増加することが必要である。1希釈列では集落数測定試験管数だけを多数にしても信頼度を有効にたかめることはできない。

i組の希釈列、各組j本の試験管を用いた場合の総平均値 \bar{x} の (1-a)% 信頼限界。

もし十分な試験管を用意して、各組j本の試験管、i組の希釈列を用いれば、次のとおりとなる。

$$(\bar{x} \pm \sqrt{A^2 + B^2}) \times 10^n \dots (4)$$

ただし、

$$A = t(ij-1, a) \times \sqrt{\frac{\sum S_i^2}{i}} \times \frac{1}{\sqrt{ij}}$$

(S_i は各組の標準偏差) (Aは分布誤差)

$$B = t(i-1, a) \times S_{dil} \times \frac{1}{\sqrt{i}} \quad (Bは希釈誤差)$$

これを t 分布を用いる平均値の比較に便利のように改めると、 $t(ij-1, a) \approx t(i-1, a)$ として、次のとおりとなる。

$$\left(\bar{x} \pm t(i-1, a) \times \frac{1}{\sqrt{i}} \times \sqrt{\frac{\sum S_i^2}{ij} + S_{dil}^2} \right) \times 10^n \dots (4a)$$

または、

$$\left(\bar{x} \pm t(i-1, a) \times \frac{1}{\sqrt{i}} \times \sqrt{\left(\frac{S_{dis}}{\sqrt{ij}}\right)^2 + S_{dil}^2} \right) \times 10^n \dots (4b)$$

ただし、 S_{dis} は平均分布標準偏差。

(II) 希釈液(diluents)の検討

Fenner¹⁾は結核菌生菌数の測定にあたって希釈液の種類が重要であることを強調し、0.1% bovine albumin 液の使用をすすめている。そこで私たちは次の4種の希釈液を検討してみた。

- (1) 生理的食塩水 (0.9% NaCl)
- (2) M/15 Na₂HPO₄ · 12H₂O
- (3) M/15 NaHCO₃
- (4) 0.1% bovine albumin (Difco)

ただし、Fenner の用いた結核菌は Dubos 培地に生育したものであり、私たちの用いたものは、小川培地に生育したものであるから、多少ちがった結果がでて一般におしひろめることはできないかもしれない。ともかく、ここでは、私たちの方法に適する希釈液を求めることを目的とする。

原液を生理的食塩水でつくり、直ちに上の4種の希釈液で 10⁻⁶まで、駒込ピペット法で希釈して室温 (20°C) に3時間放置した後、10⁻⁵および10⁻⁶液をおのの試験管20本に等量 (0.02cc) 接種し、37°C 3週後に集落数を算えた。もし、分散状態の悪いもの、または発育を阻止するものがあれば、平均集落数が減るのであろうから、平均集落数の多いほど、よい希釈液であるといえるはずである。

Number of viable cells per tube obtained by inoculating the same quantity (0.02 ml.) of 10⁻⁶-and 10⁻⁵-dilutions prepared by various diluents.

Diluent*	10 ⁻⁶ -dilution			10 ⁻⁵ -dilution		
	Mean	No. of Standard replic.	Standard Deviation	Mean	No. of Standard replic.	Standard Deviation
1	41.5	20	12.06	155.5	10	21.0
2	49.0	20	15.70	261.1	20	58.2
3	25.2	20	8.27	110.3	20	19.7
4	23.8	20	10.45	89.6	20	21.7

1: 0.9 per cent NaCl. 2: M/15 Na₂HPO₄ · 12H₂O. 3: M/15 NaHCO₃. 4: 0.1 per cent bovine albumin (Difco).

その結果は表のとおりである。10⁻⁶希釈の場合を前述の式(2)によつて95%信頼限界を求めると(この場合10⁶は共通であるので省略する)。

- (1) (28.42~56.93) × (1±0.42) = 16.4~81.0
- (2) (32.50~68.87) × (1±0.42) = 18.8~93.0
- (3) (16.89~35.00) × (1±0.42) = 9.80~49.7
- (4) (15.03~34.59) × (1±0.42) = 8.73~49.2

もし、式(1a)を用いて95%信頼限界を求めれば、

- (1) 41.5 ± 35.6 = 5.9~77.1
- (2) 49.0 ± 41.7 = 7.3~80.7
- (3) 25.2 ± 21.6 = 3.6~46.8
- (4) 23.8 ± 20.7 = 3.1~44.5

これを式(2)によつた前述の限界と比較すると、若干のずれはあるが大差はない。

次に式(1b)から t 分布を用いる方法で、各平均値間の差の有意性を検定してみる。

式(1b)で、2つの平均値を \bar{x}_1 および \bar{x}_2 、試験管数を n_1 および n_2 、標準偏差を s_1 および s_2 とする。ただし $D = 0.42$ (10⁻⁶希釈の場合)。

$$\{s_1^2 + (\sqrt{n_1} D_0 \bar{x}_1)^2\} = A_1^2, \{s_2^2 + (\sqrt{n_2} D_0 \bar{x}_2)^2\} = A_2^2$$

とせば (いずれも分散である)。

$$s^2 = \frac{n_1 A_1^2 + n_2 A_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

これから、標準偏差 s を得れば、次の式によつて、 \bar{x}_1 と \bar{x}_2 の差の有意性を検定できる。

$$t(n_1 + n_2 - 2, a) = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

4種の稀釈液の場合に、この式を用いると、

$$(1) A_1^2=6235, A_1=79.0$$

$$(2) A_2^2=8624, A_2=92.7$$

$$(3) A_3^2=2308, A_3=48.0$$

$$(4) A_4^2=2119, A_4=46.0$$

$$n_1=n_2=20,$$

例えば(2)と(4)を比較すると、

$$s^2=5372, s=73.2$$

したがって、 $t=1.09$

また(1)と(4)を比較すると、

$$s^2=4177, s=64.6, t=0.87$$

$$t_{38}, 0.05=2.02, t_{38}, 0.10=1.68,$$

$$t_{38}, 0.25=1.16, t_{38}, 0.50=0.68$$

したがって、上述の t はいずれも危険率25%と50%の間にあるので、有意の差はない。

すなわち、私たちの条件では、生理的食塩水または $M/15 Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ と 0.1% bovine albumin の間に有意の差はなかつたが、前2者を用いた場合の生菌数平均値の方が、かえつて多い結果を得た。したがって、少なくとも私たちの条件では、0.1% bovine albumin を用いる積極的な理由はみあたらない。生理的食塩水または $M/15 Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ を用いて十分ことたりと思われる。

(注1) 式(1) (1a) (1b) では、本来分布誤差に乗じられるべき $t(n-1, a)$ が稀釈誤差にも乗じられている。しかし、稀釈列1列の場合、稀釈誤差を大きくみる方が安全であるので、稀釈誤差に $t(n-1, a)$ が乗じられる形のままであることが、かえつて望ましいことである。

総括

(1) 分布誤差と稀釈誤差を考慮した、結核菌生菌数測定値の信頼限界算出式を提出した。すなわち、稀釈列1組を用いた場合には、式(1, 1a, 1b) または (2), 稀釈列 i 組を用いた場合には、式(4, 4a, 4b) である。また t 分布を用いる平均値の差の有意性検定方法を示した。

(2) 稀釈誤差を実測して、これを稀釈標準偏差の平均値にたいする比として掲げた。

(3) 稀釈誤差の実測値は、理論値よりはるかに大きいので、Jennison and Wadsworthの理論値を稀釈誤差と

して代用することは適当でない。実際に起る稀釈誤差の大部分は、容量計算のバラつきよりも、むしろ稀釈時の菌の分散の不均一に由来するものと想像される。

(4) 私たちの実験条件では、稀釈液として 0.1% bovine albumin の使用を支持する積極的な理由は見当らず、生理的食塩水または $M/15 Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ を使用してこと足りると思われる。

(勝沼六郎君ならびに日比野進教授の御校閲を感謝する)

文 献

- 1) Fenner, F.: Am. Rev. Tuberc., 64: 353~380, 1951.
- 2) Stearman, R.L.: Bact. Revs., 19: 160~215, 1955.
- 3) Bennett, C.A. and Franklin, N.L.: Statistical Analysis in Chemistry and the Chemical Industry, 1945, New York, John Wiley and Sons. (奥津恭訳, 丸善).
- 4) Davies, O.L.: Statistical Methods in Research and Production, 1949, London, Imperial Chemical Industries.
- 5) 岡松正泰: 推計学ノート, 1953, 東京, オーム社.
- 6) 東村道雄・三浦幸二: Chemotherapy, 4: 103~106, 1956.
- 7) 植田三郎: 結核, 24: 185~195, 1949.
- 8) 小川政敏・芝賀敏彦: 結核, 27: 522~523, 1952.
- 9) Drummond, M.C., Lewis, G.T., and Cummings, M.M.: Dis. of Chest, 19: 158~164, 1951.
- 10) 土屋一之進: 第32回結核病学会総会演説.
- 11) 東村道雄: 医学と生物学, 38: 11~14, 1956.
- 12) 東村道雄・野田用・三浦幸二: 結核, 31: 107~110, 1956.
- 13) Jennison, M.W., and Wadsworth, G.P.: J. Bact., 39: 389~397, 1940.
- 14) Sever, J.L., and Youmans, G.P.: Am. Rev. Tuberc., 75: 280~294, 1957.