

集落計数による結核菌薬剤耐性検査方式への提言

伊 東 恒 夫

国立霞ヶ浦病院

受付 昭和 37 年 12 月 25 日

緒 言

ある濃度以上の薬剤に対する結核菌の耐性の有無を知ることは、治療方針を樹立するうえに重要な目安とされている。そして、耐性のある場合には、その程度を表わすために、集落数を基礎にして区分した発育程度を対照培地と耐性培地との間で比較して、対照培地の集落数が数えられぬときには、同等の場合を完全耐性（不確実）、それ以下の場合を不完全耐性とよび、発育菌数が少なく、25コ以上の集落を得てその数を計数しうる場合については、対照培地数の75%以上をもつて完全耐性とするように衛生検査指針¹⁾では決められている。すなわち後者の場合には耐性菌が全菌数のほぼ、3/4以上を占めるか否かをもつて判定するわけである。このことは数字のうえからはともかく、発育量のおおよその比較をもつてするという考え方からすれば、すでに相当多数の耐性菌が存在することを意味するから、実際的にはこの程度の大まかな取り決めでもよいと思われる。

しかし一方、計数しえぬ程度に菌の生えた場合に、発育量のおおよその比較をもつてしては必ずしも正しくは耐性の程度をつかむことが出来ないとの立場から、計数可能な集落数を得るように希釈培養して、その数値の比較によつて耐性の完全、不完全を判別しようとする考え方もある。このように、集落実数値の比較において耐性の限界を決めようということになると、希釈培養によつて両培地上の集落数に顕著な差を生ずる場合には容易であるが、その値の接近している場合の判定限界を決めることは問題であろう。そしてこのような耐性限界のつかみ方が臨床の実際とはいかに関連するかは別としても、発育量の比較という観点に立つ上述の判定方式をそのまま集落数値の比較に適用することは合理的とは思われない。何となれば、培地に接種培養される材料中の菌の分散にはある大きさがあるから、同一希釈度、同一量の接種によつてさえも発生集落数にはかなりの変動が当然期待されるはずである。したがつて、もしその方式をとるとすれば、この点を十分考慮に入れる必要があり、した

がつて発育量の比較のために決められた限界に対して、多少の修正を加えなくてはならないと思われる。そこでこの方式をとる場合に考慮すべき諸点を検討し、合理的に成績を判定しうる方式を考えることにした。

その考えの一つとして、材料中の菌の分散に基づいて算定される兩種培地上の落集数の上、下限値をしらべ、その重りの有無をもつて判定する方式を既報^{2)~5)}において述べたが、さらに検定図表を用いる方式の設定を試みたので、その成績を述べる。

実験材料ならびに方法

すべて間接法によつて実験を行なつた。

1. 使用培地 1%小川斜面培地を用いた。衛生検査指針¹⁾記載の方法で耐性培地を作り、SMおよびPASは1, 10および100 mcg/mlを、INHは0.1, 1および5 mcg/mlをそれぞれ含むようにした。各濃度ごとに培地5本宛用いた。
2. 使用菌液 結核患者分離菌 K 74, K 79, K 80, K 83 および K 84 を Dubos 寒天培地に移植、1週間培養菌からそれぞれ適当にかき取り、秤量せずに水晶球入りコルベンに入れ、手振法で菌液を作り、これを原液とした。
3. 生菌推定法および培養法 室橋ら⁶⁾の方法によつた。すなわち原液1白金耳を直径約12 mmの円形に塗抹して Malachitegreen-fuchsin 染色⁷⁾を施し、20視野中の緑染単個菌およびこれを含む菌塊を数え、1視野平均緑染菌数 n_0 を算出し、推定式 $N=2.10^n n_0$ を用いて、原液 0.1 ml 中の生菌数をほぼ推定した。次に発生集落数が2桁になるように原液を希釈して、培地当たり 0.1 ml を接種し、37°C に4週間培養後、発生集落数を数えた。

成 績

1. 実験成績 菌液ごとの生菌数推定値、対照および耐性培地上の実測集落数、同一種類培地5本間の集落数平均値を表1に示した。

推定値を参考として希釈培養して得た実測集落数が推

Table 1. Number of Colonies Developed on the Egg Slant

St- rain	V. U. estimated	Drug conc. (mcg/ml)	Number of colonies						
			I	II	III	IV	V	mean (\bar{X})	U^2
K 80	$96/10^4$ ($n_0=4.8$)	Control	58	63	53	63	66	60.6	0.11
		SM 1	55	63	39	67	61	57.0	0.67
		10	63	62	57	41	52	55.0	0.37
		100	63	66	51	41	49	54.0	0.50
		PAS 1	64	43	68	43	51	53.8	0.60
		10	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0
		INH 0.1	72	62	76	53	45	61.6	0.73
		1	65	43	74	61	65	61.6	0.58
		5	0	0	0	0	0	0	0
K 83	$117/10^5$ ($n_0=58.5$)	Control	61	41	67	42	63	54.8	0.73
		SM 1	45	46	53	60	53	51.4	0.18
		10	12	8	7	11	3	8.2	0.61
		100	10	4	7	10	3	6.8	0.68
		PAS 1	57	48	58	55	43	52.2	0.47
		10	2	1	1	0	2	1.2	0.10
		100	0	0	0	0	0	0	0
		INH 0.1	58	44	48	65	63	55.6	0.40
		1	6	9	11	10	4	8.0	0.30
		5	0	0	0	0	0	0	0
K 79	$15/10^5$ ($n_0=7.5$)	Control	43	35	27	27	22	30.8	0.50
		SM 1	26	31	40	25	38	32.0	0.36
		10	27	13	37	32	22	26.2	0.92
		100	27	25	25	23	29	25.8	0.26
		PAS 1	26	15	19	45	22	25.4	1.17
		10	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0
		INH 0.1	28	43	26	30	22	29.8	0.49
		1	27	34	21	30	26	27.6	0.22
		5	0	0	0	0	0	0	0
K 84	$42/10^4$ ($n_0=2.1$)	Control	32	21	27	27	21	25.6	0.19
		SM 1	21	25	21	19	27	22.6	0.12
		10	5	2	5	3	3	3.6	0.13
		100	4	3	8	3	4	4.4	0.20
		PAS 1	26	22	10	25	7	18.0	1.29
		10	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0
		INH 0.1	13	10	27	23	18	18.2	0.70
		1	1	5	3	1	4	2.8	0.33
		5	0	0	0	0	0	0	0
K 74	$42/10^4$ ($n_0=2.1$)	Control	15	22	15	10	13	15.0	0.31
		SM 1	13	12	10	14	9	11.6	0.10
		10	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0
		PAS 1	12	13	18	10	13	13.2	0.16
		10	6	2	0	0	2	2.0	0.55
		100	0	0	0	0	0	0	0
		INH 0.1	21	7	9	8	15	12.0	0.70
		1	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0

Note. Number of colonies: Per 0.1 ml of 10^6 dilution.
 V. U. estimated: Viable unit per 0.1 ml of 10^6 dilution.
 I, II, III, IV, V: Number of test tube.
 n_0 : Number of green stained cells per field.

定値とかなりの差を示すものもあるが、いずれの場合にも計数しうる範囲にあつた。同一種類の培地5本の集落数にはかなり変動があり、上、下限値の隔りは相当大きい。しかし不偏分散 u^2 は、集落数の大小にかかわらず小さく、ほとんどの場合1.0以下であつた。

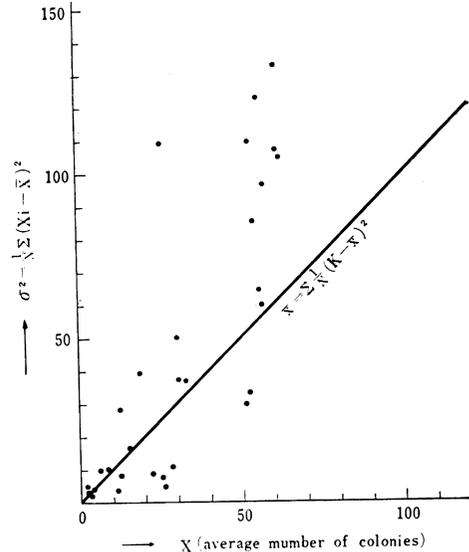
2. 成績の推計学的吟味

1) 集落数の分散: 培地 I ~ V の集落数 (表1) がいかなる分散を示すかをみるために、集落数平均値 \bar{X} と分散 σ^2 との関係を調べた。菌液中の菌の分散が均一であると仮定すると、その一部をとつて培養するとき、菌濃度が十分小さければ発生集落数は Poisson 型分布に従うはずである。その場合、集落数を K 、母集団での平均集落数を m とすれば次の関係が成り立ち、分散と平均値とは一致し

$$E(K) = m \quad E(K-m)^2 = m$$

したがつて各点は図1の $\bar{X} = \sum \frac{1}{n} (K - \bar{X})^2$ の線におよそ集まるはずである⁸⁾。しかし実際にプロットしてみると、図1のように左辺に広く分布するので、Poisson 型としては分散が大きすぎるようは思われる。したがつて

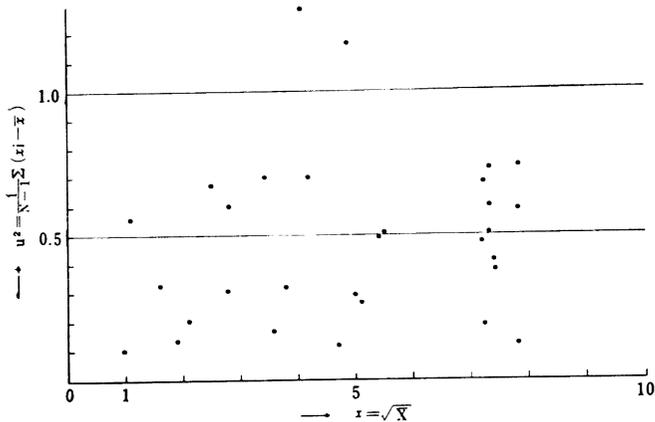
Fig. 1. Correlation between the Average Number of Colonies on the Slant and Standard Deviation



Poisson 型とは考えがたい。しかれば正規型かという、図1の試料では平均値と分散との間の標本相関係数が $r=0.82$ で、この値では危険率5% ($n=34$) で母相関係数 $\rho=0$ が棄却されるから、平均値と分散との間には相関が認められることになり、したがつて菌液中の菌分布をこのままでは正規型と考えるわけにはゆかない。そこで適当な変数変換を行なつて、分布を正規型に近づけようと考え、集落数の平方根をとり、それと分散との関係を調べた。その結果、相関係数は $r=-0.139$ となり、危険率5%で $\rho=0$ が棄却されない。したがつて、変換後の分布が正規型とはただちに云えないが、相関係数がこの程度なので一応正規型と仮定して扱つてもさしたる誤差を生じないと考えられる。そこで以後、集落数の平方根 ($\sqrt{X} \equiv x$) を用いて計算を進めることにした。

各試料の対照および耐性培地上の集落数 X の平方根 $\sqrt{X} \equiv x$ を変数とし、正規型を利用して、培地5本 (I

Fig. 2. Correlation between the Square root of the Average Number of Colonies and the Unbiased Variance



～V) で得られた実測値から、 $\sum_{i=1}^n x_i$ および $U^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$ を求め、集落の上、下限値を計数した。ただし $\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n x_i$, N は使用培地数である。培地 I ～ V の集落がかなり接近している場合でも、上、下限値には相当の開きがあつた。これは、同一接種量に含まれる菌の分散のみならず、菌の質的な不均一性、培地ならびに培養条件による誤差などに基づくものであろう。

2) 新しい検定方式の設定。耐性の完全、不完全の判定を集落数の面からみる場合は、対照培地上の集落数平均値と薬剤含有培地上のそれとの間に有意の差があるか否かを検定できればよいわけである。すなわち対照培地上の集落数の平方根の平均値を x_1 、薬剤含有培地上のそれを x_2 (ただし $\sqrt{X} \equiv x$) として、次の検定式を適用すれば、これを満足するところで、 x_1 と x_2 との間に有意の差があるといえることになる。

$$\frac{(x_1 - \bar{x}_2)^2}{u^2/N} > \frac{N-1}{1} F_1^{-1}(\alpha) \quad \alpha=0.05 \dots \dots (1)$$

図1のごとく、実測集落数 X にかんがりの変動があつても不偏分散 u^2 はほとんど 0.1～1.0 の間にある。そこで u^2 を 1.0, 0.5 および 0.2 とおき、仮定された x_1 に対して (1) 式を満足させる x_2 の値を計算して表2を得た。この表をもとにして検定線を作れば、その線を用いて成績の検定が容易にできる。すなわち、まず対照培地上の集落数の平方根の平均値を Y 軸に、薬剤含有培地上のそれを X 軸にとり、 Y 軸上の x_1 からみた X 軸上の値 x'_2 を求める。次に x'_2 と薬剤含有培地実測集落数の平方根の平均値 x_2 を比較し、 $x'_2 > x_2$ であれば不完全耐性 (r)、 $x'_2 < x_2$ であれば完全耐性 (R) と判定するのである。

Table 2. Calculation of x_2 by the Use of the Formula

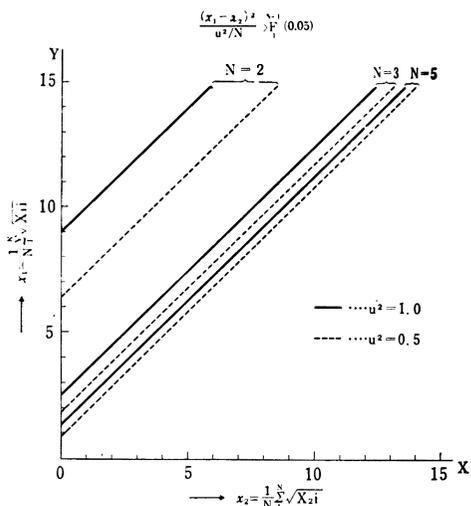
$$\frac{(x_1 - \bar{x}_2)^2}{u^2/N} > \frac{N-1}{1} F_1^{-1}(\alpha) \quad \alpha=0.05$$

x_1	x_2					
	$N=5$		$N=3$		$N=2$	
	$u^2=1.0$	$u^2=0.5$	$u^2=1.0$	$u^2=0.5$	$u^2=1.0$	$u^2=0.5$
15	13.76	14.12	12.52	13.25	6.02	8.65
14	12.76	13.12	11.52	12.25	5.02	7.65
13	11.76	12.12	10.52	11.25	4.02	6.65
12	10.76	11.12	9.52	10.25	3.02	5.65
11	9.76	10.12	8.52	9.25	2.02	4.65
10	8.76	9.12	7.52	8.25	1.02	3.65
9	7.76	8.12	6.52	7.25	0.02	2.65
8	6.76	7.12	5.52	6.25		1.65
7	5.76	6.12	4.52	5.25		0.65
6	4.76	5.12	3.52	4.25		
5	3.76	4.12	2.52	3.25		
4	2.76	3.12	1.52	2.25		
3	1.76	2.12	0.52	1.25		
2	0.76	1.12		0.25		
1		0.12				

x_1 : Mean of the square root of the number of colonies on the control slant.
 x_2 : That of the drug containing slant.
 N : Number of slant used.
 U^2 : Unbiased variance.

菌液中の菌の分散は材料によりそれぞれ異なるが、實際上 $u^2 > 1.0$ となることはほとんどなく、また u^2 を高く見積れば判定を誤る危険が少ないから一応 $u^2 = 1.0$ の線を用いれば大きな誤りを犯すことはないと思う。

Fig. 3. Assay Diagram for the Distinction of the Complete and Incomplete Resistance



3) 使用培地数の検討。多数の検体を扱う日常の検査においては、1 剤 1 濃度につき多くの培地を用いることは手数のうえからも経済的な面からも困難を増すに相違ない。そこで上述の方式を用いる場合に最少限度何本の培地を用うべきかを調べた。

表1の成績は無作為的に並んでいるからはじめの2本

Table 3. Comparison of the Test Results Using Various Number of Slant

St- rain	Drug concent- ration (mcg/ml)	N=5			N=3			N=2		
		$\sqrt{\bar{X}}$	u^2	Ju- dge	$\sqrt{\bar{X}}$	u^2	Ju- dge	$\sqrt{\bar{X}}$	u^2	Ju- dge
K 80	Control	7.78	0.11		7.61	0.28		7.78	0.06	
	SM 1	7.21	0.67	R	7.20	0.75	R	7.68	0.14	R
	10	7.39	0.37	R	7.79	0.04	R	7.91	0.003	R
	100	7.32	0.50	R	8.07	0.44	R	8.03	0.005	R
	PAS 1	7.30	0.60	R	7.60	0.85	R	7.28	1.02	?
	10	0	0	S	0	0	S	0	0	S
	100	0	0	S	0	0	S	0	0	S
	INH 0.1	7.81	0.73	R	8.36	0.19	R	8.18	0.20	R
	1	7.82	0.58	R	7.74	1.11	R	7.31	1.12	?
	5	0	0	S	0	0	S	0	0	S
K 83	Control	7.37	0.73		7.47	0.89		7.11	0.74	
	SM 1	7.16	0.18	R	6.92	0.09	R	6.75	0.002	R
	10	2.80	0.61	r	2.98	0.18	r	3.15	0.02	R
	100	2.54	0.68	r	3.07	0.67	r	2.58	0.78	?
	PAS 1	7.21	0.47	R	7.37	0.14	R	7.24	0.02	R
	10	0.97	0.10	r	1.14	0.06	r	1.21	0.08	R
	100	0	0	S	0	0	S	0	0	S
	INH 0	7.44	0.40	R	7.06	0.26	R	7.13	0.45	R
	1	2.79	0.30	R	2.93	0.25	r	2.73	0.16	R
	5	0	0	S	0	0	S	0	0	S
K 79	Control	5.51	0.50		5.89	0.54		6.24	0.20	
	SM 1	5.63	0.36	R	5.67	0.39	R	5.34	0.07	R
	10	5.05	0.92	R	4.96	1.67	R	4.41	1.26	R
	100	5.08	0.26	R	5.07	0.02	R	5.10	0.02	R
	PAS 1	4.95	1.17	R	4.44	0.32	R	4.49	0.75	R
	10	0	0	S	0	0	S	0	0	S
	100	0	0	S	0	0	S	0	0	S
	INH 0.1	5.42	0.49	R	5.65	0.63	R	5.93	0.80	R
	1	5.23	0.22	R	5.20	0.40	R	5.52	0.20	R
	5	0	0	S	0	0	S	0	0	S
K 84	Control	5.03	0.19		5.15	0.29		5.21	0.58	
	SM 1	4.74	0.12	R	4.72	0.06	R	4.79	0.08	?
	10	1.87	0.13	r	2.03	0.29	r	1.88	0.53	?
	100	2.06	0.20	r	2.19	0.33	r	1.96	0.11	?
	PAS 1	4.12	1.29	R	4.32	1.05	R	4.89	0.09	?
	10	0	0	S	0	0	S	0	0	S
	100	0	0	S	0	0	S	0	0	S
	INH 0.1	4.20	0.70	R	3.99	1.13	R	3.39	0.10	?
	1	1.59	0.33	r	1.66	0.39	r	1.62	0.76	?
	5	0	0	S	0	0	S	0	0	S
K 74	Control	3.84	0.31		4.14	0.88		4.28	0.34	
	SM 1	3.40	0.17	R	3.41	0.05	R	3.53	0.02	?
	10	0	0	S	0	0	S	0	0	S
	100	0	0	S	0	0	S	0	0	S
	PAS 1	3.62	0.16	R	3.77	0.17	R	3.53	0.02	?
	10	1.56	0.55	r	1.29	0.51	r	1.93	0.54	?
	100	0	0	S	0	0	S	0	0	S
	INH 0.1	3.39	0.70	R	3.41	0.56	R	3.61	1.86	?
	1	0	0	S	0	0	S	0	0	S

R: Completely resistant.
 r: Incompletely resistant.
 ?: Undecidable.
 N: Number of slant.

$$\sqrt{\bar{X}} = \frac{\sum \sqrt{x}}{N}$$

(N=2)あるいは3本(N=3)の成績を抽出し、集落数の平方根の平均値、不偏分散(U²)を計算し、図3の検定図表を用いて検定した。培地5本(N=5)の場合と比較すると表3のごとくである。培地3本の場合には5本の場合と平均集落数において差がない。不偏分散にはかなり変動があるがほとんど1.0以下で検定に支障がない。この図から明らかのようにN=5、N=3の場合には対照培地に10コ以上の平均集落を生ずれば一応検定は可能である。これに対して培地2本の場合にはu²=0.5とすれば対照培地集落49コ以上(x₁=7, x₂=0.65)の場合には検定しうるが、u²=1.0とすると検定線が左方に大きくずれ、対照培地集落が平均81コ以上(x₁=9,

x₂=0.02)でないと検定ができず、かつまた81コの場合にも耐性培地上に1コ以上集落数を生ずれば完全耐性と云わざるをえなくなる。しかも実際的にはよほど均等な菌液にしないかぎり、u²=0.5をすべての場合に当てはめえない。菌の分散をu²=1.0とおさえるかぎりにおいては、N=2の検定線は不適当である。したがってu²=1.0を用いて、使用培地数は3本を最少限とし、しかも平均集落数13コ以上を得るよう培養すべきであるということになる。

考 察

結核菌の均等な浮遊液を作るとはきわめてむずかしい。また均等化しえたとしても、菌の分散はある程度の大きさをもつから、同一量を同一種類の培地何本かに接種すれば、発育集落数にかなりの変動を生ずることは当然である。したがって、菌液中の生菌数を測る場合に、1本の培地で実測された値そのままをもつて一定量中の生菌数を代表させることは危険である。そこで、本実験では、菌の分布型を考慮に入れて集落数の平均値を求め、これについて推計学的検討を加えた。その結果、5本の培地の集落数に一見大差がないように見える場合にも、その上、下限値にはかなりの開きのあることが分かったが、均等度が低くなればその開きはさらに大きくなり、1 order を越すことさえありうる。したがって実際的にはともかく理論的に考えると、集落数を数える場合に単に培地1本宛の集落実数を用いて、その25%以上の差をもつて、耐性の程度を判定しようとするのは、判定の過誤を犯す危険を多分に蔵するといえよう。完全耐性と判定する場合には耐性培地と対照培地との間において、少なくとも集落数平均値に有意の差が認められなくてはならない。

上述の新方式によれば、あらかじめ同一種類の培地3~5本から得られる集落数に基づいて不偏分散u²を計算しておき、もつとも適した検定線を用いて両種培地上の集落数の比較検定を行えばよいのであるから簡単である。しかも著者の経験上、u²>1.0となることはまれで、通常0.8≥u²≥0.3である。したがって実験ごとにu²を計算しなくても、u²=1.0の検定線を用いればほとんど常に集落計数による場合の耐性の限界の判定を大きな誤りなしに行ないうるわけである。

次に使用培地本数についても一考を要する。本実験の当初、検定図表作成のためにF表の値を参照し、N=5(n₁=1, n₂=4)以上では1本の培地差はさしたる影響を与えないと考えられたので、培地5本(N=5)を用いた。しかし日常検査業務の繁忙さを考えると、1剤1濃度につき5本宛用いることには難があらう。

そこで、N=2、N=3 および N=5 の場合を比較し

た結果、精度をあまり下げずにしかも満足すべき検定を行なおうとするためには、培地3本以上を用うべきであるとの結果を得た。すなわち、1剤1濃度につき3本以上の培地を用い、計数しやすい30~150程度の集落数が得られる場合には、直接法、間接法を問わず、図3の検定線 ($N=3$, $u^2=1.0$) を用いて、耐性の完全、不完全の境を簡単に判定できるわけである。このようにすると培地本数がふえるので、手技上複雑化することは免れないが、成績判定そのものに過誤が少なくなる利点がある。1剤1濃度につき培地2本を用いても菌液中の菌の分散さえ小さければ、ある程度検定が可能であることはいうまでもない。

菌数未知の材料の培養によつて計数しやすい集落数を得ようとする目的から、著者は室橋ら⁷⁾の方法を用いたが、これによれば、ほぼ推定値に近い集落数を得ることが可能である。また直接法の場合に小型モータ付き homogenizer (約1,500 rpm) を用いれば、材料の均等化に要する時間を節約でき、均等化も十分なので、推定値に近い集落数を期待するうえに都合がよい。

多数の検体と、多種類の薬剤とを扱わねばならない検査業務の立場からすれば、上述の方式では煩雑すぎるとの譏もあろう。また耐性検査本来の目的はある大まかな限界を知れば事足りるのであり、このように集落数の差の有意性にまで言及して耐性度の限界を調べる必要は少しもないとする批判も当然起こりうるであろう。これに対しては著者も同意したい。

治療にもかかわらず依然として多数の菌が排出されること自体が、そり薬効のないことを示唆するものであり、また臨床的には薬剤効果の判定を下すことが必ずしも容易でないことを考えればこれは当然である。しかし一方、耐性の限度を知るためには、発育面積や濁度の比較では必ずしも正当な判定が行なわれず、したがって得心がゆかないという考えや、集落計数によつて定量的かつ精細に耐性の限度を知っておきたいとする場合もあろう。しかもこの場合、現実には1本ずつの培地上の集落数実数値の比較によつて簡単に判定を下しているわけである。しかし、実測集落数を直接問題とする以上は、少なくとも上述の程度にまで菌の分散を考慮に入れて検定を行なうのでなければ意味をなさぬといいたいのである。

このような細かい検討は実際的には不必要であるとか、あるいは手技の煩雑さのゆえに用いがたいということであれば、兩種培地1本宛を用いて、対照培地に計数しえ

ぬ程度 (卅~十) に菌の生えた場合のみについて、発育面積ないし程度の比較を行なうという大まかながら簡便な方式によつて判定する以外に方法はないであろう。そうなれば、直接法で対照培地に計数しうる程度の集落数しか得られぬ場合には、そのままでは判定することを保留し、増菌後間接法によつて再試験を行ない、発育量の比較によつて判定するようにすればよいわけである。

総 括

結核菌の薬剤耐性検査にあたり、計数しうる集落数水準において耐性の完全、不完全を判定しようとする目的に対して接種される菌液中の菌の分散を考慮すべきことを述べ、推計学的検討の下に設定された検定図表を用いる新検定方式を提案し、さらに耐性検査の実際の意義について考察を加えた。

この提案によれば使用培地数を1剤1濃度につき3本以上とし、発生集落数の平方根平均値を求めて、検定図表に当てはめ、完全耐性なりや否やを判定するのである。この場合 $u^2=1.0$ の検定線を用いれば、完全耐性を不完全耐性と誤つて判定する惧れはほとんどないと考えられる。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲いただいた国立予防衛生研究所結核部長室橋豊穂博士、実験上種々御便宜を与えられた国立霞ヶ浦病院石渡院長、成績の推計学的処理に貴重な御助言いただいた国立労働衛生研究所興重治博士に深謝する。

本稿の要旨は第36回日本結核病学会総会(昭和36年)、第16回国立病院・療養所総合医学会(昭和36年)においてそれぞれ報告した。↓

文 献

- 1) 厚生省編纂：衛生検査指針 I，細菌・血清学的検査指針 (VI)，改訂版，昭 33。
- 2) 伊東恒夫：胸部疾患，4：231，昭 35。
- 3) 伊東恒夫：同誌，4：235，昭 35。
- 4) 伊東恒夫：同誌，4：336，昭 35。
- 5) 伊東恒夫：同誌，4：341，昭 35。
- 6) 室橋豊穂・吉田幸之助：結核，33，95，昭 33。
- 7) 室橋豊穂・吉田幸之助：結核研究の進歩，17：160，昭 32。
- 8) 興重治：胸部疾患，2，昭 33。

A Proposition of a New Method of Drug Sensitivity Test of Tubercle Bacilli by Colony Counting

Although the knowledge of the degree of drug resistance of tubercle bacilli is an important factor

in the choice of the therapeutic regimen, an accurate determination of complete or incomplete drug resistance is actually a matter of great difficulty. Here, the present author proposes a new method of

determining complete or incomplete drug resistance by using a random sampling method in colony counting.

Methods: Several series of test media were prepared by adding 1, 10 and 100 mcg/ml of SM or PAS and 0.1, 1 and 5 mcg/ml of INH, respectively, to 1% Ogawa's egg medium.

Cell suspension for the inoculation was prepared from organisms cultured on Dubos' agar plant. The number of viable unit in this suspension was estimated by Murohashi's malachite-green-fuchsin staining method, and based on this estimation the cell suspension was diluted so as to give a number of two figures in the anticipated colony count.

On five series of the above test media containing the drugs together with the controls was inoculated 0.1 ml each of the above cell suspension.

Results: As shown in Table 1, fairly large difference was observed between the number of colonies on 5 slants of the same series. However, unbiased variance, u^2 , was rather small in most cases, ranging from 0.1 to 1.0. Statistical analysis of the distribution of the colony number on five slants revealed that the Poisson distribution was not adoptable owing to the too great deviation. However, when the analysis was carried out on the square root of the colony number, the distribution resembled to the normal distribution. Therefore, the square root of the colony number on every slant ($\sqrt{X} \equiv x$) was used as the variance.

On the other hand, since complete or incomplete resistance means about the same or obviously lesser colony number on the drug containing tube as compared with that of the control, examination of the significant difference between the mean colony numbers of both kinds of the slant seems to be indispensable for the determination of the degree of resistance.

Therefore, the formula

$$\frac{(x_1 - x_2)^2}{u^2/N} > F_1^{N-1}(\alpha), \quad \alpha = 0.05 \dots \dots (1)$$

was adopted for the examination. Here, x_1 stands for the mean value of the sum of the square root of

colony number on control tubes and x_2 for that of the drug-containing tubes. If the formula (1) holds good, x_1 and x_2 are accepted as significantly different. Then, values of x_2 were calculated against the assumed values of x_1 employing formula (1) in the cases of the unbiased variance of 1.0, 0.5 and 0.2, respectively and the results were presented in Table 2 and Fig. 3.

By the use of the assay diagram shown in Fig. 3, the distinction between the complete and the incomplete resistance becomes very easy. Namely, if the mean of the square root of colony number on drug containing media (x_2) on X axis is less than x_2' , i. e. $x_2 < x_2'$, the result is decided as incomplete resistance, *r* and if x_2 is bigger than x_2' , i. e. $x_2 > x_2'$, complete resistance, *R*.

Number of the slant to be used: As the colony numbers on 5 slants listed in Table 1 were obtained from a randomly selected sample, colony number on the first 2 or 3 slants were used for the analysis. Results examined by employing the assay diagram (Fig. 3) revealed that if more than 3 slants were used in the sensitivity test, the results would be available, without big errors, for deciding whether the degree of resistance was complete or incomplete. However, if 1 or 2 slants were used, it was impossible to make correct decision of the results, unless the bacterial suspension was so homogeneous that the unbiased variance, u^2 , was less than 0.5.

Summary: It seems very difficult in the daily practice to carry out the drug sensitivity test of tubercle bacilli quantitatively as precisely as possible. So long as the results of sensitivity test are used only as the reference for the treatment of the patients, this purpose will be sufficiently attained by the comparison of the degree of growth on the media, and too detailed examination as related in the present paper may be unnecessary. However, in order to see the degree of the resistance as precisely as possible by the comparison of countable colony number, the present author wishes to propose a new stochastic method related above employing more than 3 slants in one series in the test.