

直立拡散法の基礎的研究

第3報 培地ならびに信頼度について

楊 維垣・田島 洋・飯尾正明・菅沼昭男
谷崎雄彦・川瀬留吉・馬場治賢

国立中野療養所

受付 昭和40年7月1日

FUNDAMENTAL STUDY ON THE VERTICAL DIFFUSION METHOD*

III Report. Culture Media and Reliability of the Vertical Diffusion Method

Ikan YO, Yo TAJIMA, Masaaki IIO, Akio SUGANUMA,
Katsuhiko TANIZAKI, Tomekichi KAWASE
and Harukata BABA

(Received for publication July 1, 1965)

In the present report, studies were made on the various physical states of the media and their influence on the inhibition zone and further on the reliability of this method itself.

1) We have compared the inhibition zone of INH, using two kinds of test tubes, 695 ordinary slant tubes and 608 crook-necked tubes, each with 3% Ogawa medium. The only difference of these two groups of medium was that the latter had the same thickness all over.

After 2 days' incubation of the media inoculated with BCG, INH was poured on them. The reading was made after 3 weeks' incubation thereafter. The inhibition zone was measured from the bottom of the test tube.

With regard to all of the doses tested, there was no difference between the length of the inhibition zone of two groups. But among the culture media of one INH dose, it was varied in wide range, although it was almost the same in average in two groups (Table 1, Fig. 1, 2).

2) Among the 695 slant tubes above mentioned, there was no difference in the length and the distribution of the inhibition zone between the 160 tubes whose media were from 8.2 cm to 9.9 cm long and the 157 tubes whose media were from 12 cm to 17.2 cm (Fig. 3).

3) Into the groups of 10 tubes, each containing 8, 6, 4 and 2 ml of 3% Ogawa medium, 0.27 of INH was poured immediately after the inoculation of 0.05 mg of BCG. The length of the inhibition zone was in average 3.9, 4.0, 4.6 and 5.1 cm.

The growth of bacilli was similar between the tubes containing 8 ml of media and 6 ml of media, but revealed the decreasing trend in the order of tubes containing 4 and 2 ml of the media (Fig. 4).

In the next experiment, *M. phlei* was inoculated on two groups of 10 tubes of 1% Ogawa medium, one group containing 8 ml and the other 2 ml. After 4 days, there was 9 times as many bacilli propagation in 8 ml of medium as that in 2 ml of medium when inoculated with 10^{-5} mg, and 4 times more in the former when inoculated with 10^{-7} mg (Table 2). We consider that there is a difference of about 10 times between 8 ml and 2 ml of media concerning the propagation of bacilli, but the difference of 1 cm of the inhibition zone seems to be too large

* From National Nakano Sanatorium, 14-2, 3-chome Egota, Nakano-ku, Tokyo, Japan.

even if this difference of the bacilli number is taken into consideration. However, the decrease of the bacilli number will certainly be one of the causes of the elongation of inhibition zone in 2 ml media.

4) Into 40 tubes of 3% Ogawa media and 1% Ogawa media, INH was poured in 5 different doses from 2γ to 0.05γ immediately after the inoculation of 0.05 mg of BCG. There was no difference in the length of the inhibition zone between 2 groups after 3 weeks' incubation (Fig. 5).

But when *M. phlei* was inoculated and Ethambutol was poured in the doses of 12.5γ , 2.5γ and 0.5γ , the length of the inhibition zone was about 0.5 cm longer in 1% Ogawa media than in 3% media (Fig. 6). In other words the influence of pH of media on the length of inhibition zone was different according to the differences of the species of the bacilli and the drugs.

5) Immediately after the inoculation of 0.05 mg of BCG, 0.5γ of INH was poured into the 3% Ogawa media preserved for 6, 28 and 65 days in room temperature in winter. The length of the inhibition zone was in average of 12 tubes 5.2, 5.1 and 5.2 cm (Table 3). Thus the media are preservable at least for 2 months.

6) Finally examinations were made on the reliability of the vertical diffusion method as to the results of 695 slant tubes (Table 1, Fig. 1). Statistically, the dimensions of the two times of the standard deviation occupy 95.45% of total area of normal distribution. Fig. 7 shows the standard curve of slant tube media with \pm two times of standard deviation. As seen in the figure, INH dose from 0.28γ to 0.8γ can be estimated by 5 cm of the inhibition zone. Also the inhibition zone of 6 cm will signify from 0.47γ to 1.45γ of INH.

Accordingly, to decide that the difference measured by vertical diffusion method between two drugs is significant, there must be a difference of more than three times of the amount with 5% risk.

Next, the standard curve of Ethambutol has a sharper slope than that of INH. When *M. phlei* was inoculated on 90 tubes of 1% Ogawa media, and incubated for 4 days after pouring of 0.5γ of Ethambutol, the inhibition zone was in average 2.21 cm and its standard deviation was 0.16 cm. In the same way, when BCG was inoculated on 109 tubes of 3% Ogawa media and incubated for 3 weeks after the instillation of 0.5γ of INH, the standard deviation was 0.34 cm. Two times of the each standard deviation showed almost the same distribution (Fig. 8).

In the case of Ethambutol, if 0.5γ was poured, the inhibition zone showed the distribution ranging from 0.3γ to 0.8γ . In the same way when 1γ was poured the inhibition zone showed the distribution ranging from 0.6γ to 1.6γ . (in this case the inhibition zone was in average 2.66 cm in 90 tubes and the standard deviation was 0.20 cm).

From these facts we consider that three times of the difference of the amount of drug is required in order to find a significant difference in the vertical diffusion method. This relation indicates the limitation of reliability of the method itself, regardless of the kinds of the inoculated bacilli and the drugs.

われわれは直立拡散法の測定方法、注入薬剤の重量と容量（濃度）との関係および菌接種から薬剤注入までの期間などを第1報¹⁾で報告した。第2報²⁾では接種菌ならびに注入薬剤の問題について接種菌量、菌の種類、NaOHの菌液および薬液に対する影響、注入薬剤の培地との接触時間の長短における阻止帯の変動などを検討し

た。今回は培地に関するいろいろの因子と阻止帯との関係ならびに直立拡散法の信頼度についての検討を報告する。

I. 斜面培地と平面培地の比較

普通の中試験管に3%小川培地8mlを分注斜面に凝

固させた斜面培地ならびに小川の首曲り試験管に3%小川培地 5ml を分注し培地の厚さを一定にして凝固させた平面培地との2種類の培地で、直立拡散法における阻止帯の高さを比較した。0.5 mg/ml BCG 菌液 0.1 ml ずつ接種、37°C 2 日間培地を水平に静置後、0.1 γ /ml より 8 γ /ml までの10段階のINH水溶液を0.5ml ずつ管底に注入、直立に保つて37°C 3 週間培養した。阻止帯は管底より測定した。以上の比較実験を7回施行し、その培地総数は斜面培地 695 本、平面培地 608 本である。

斜面培地平面培地ともに、阻止帯の高さと注入INH量の対数との間には直線関係が成立していることは表1、図1のとおりであり、かつINHのどの段階にも阻止

帯の分布はかなり広範であつてその分布の大きさも両者ほとんど同じであつた。INHの各段階の平均値(表1)を図にとり両方の培地の阻止帯を比較してみると両者の間には差がない(図2)。なお平均値の代りに中央値をとつても両者の関係はまったく同じであつた。

II. 培地の高さ

斜面培地と平面培地との比較実験で使用した培地のうち平面培地は試験管の構造上培地の高さはほぼ一定であるが、斜面培地ではとくに規定せずに培地を作製したため、8.2 cm から 17.2 cm までの種々の高さのものが含まれていた。培地の高さの阻止帯に及ぼす影響を検討するために、前記の斜面培地 695 本のうち培地の高さ 9.9 cm 以下の 160 本と 12 cm 以上の 157 本について阻止帯を比較した。図3のごとく両者の間に差を認めない。すなわち日常培養に使われる培地程度の高さの差異では阻止帯の高さに影響しない。

III. 培地の量

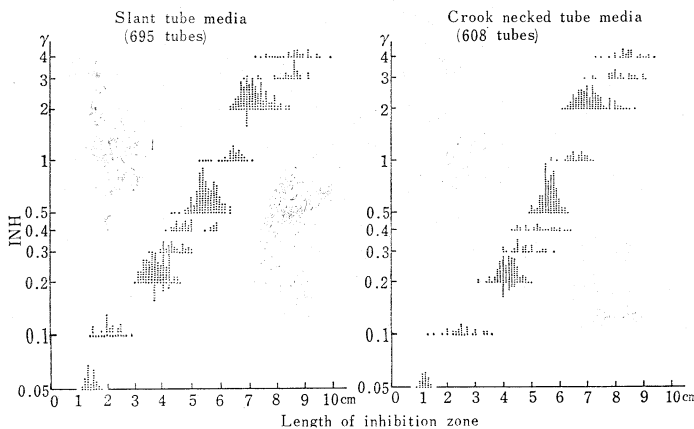
使用培地の量と阻止帯との関係について次の実験を行なつた。培地量 8 ml, 6 ml, 4 ml, 2 ml の4種類の3%小川培地(斜面)に0.5 mg/ml BCG 菌液 0.1 ml を各培地 10 本ずつそれぞれ接種、直後に0.4 γ /ml INH 液 0.5 ml を管底に注入した。37°C 3 週間直立に培養した阻止帯の高さは各組平均 3.9, 4.0, 4.6, 5.1 cm であつた。すなわち 8 ml 培地と 6 ml 培地には差を認めないが、4 ml 培地、2 ml 培地の順に阻止帯は高くなつている(図4)。さらにこの実験では菌の繁殖状態の差が注目した。8 ml 培地と 6 ml 培地の間には肉眼的に菌数の差はほとんど感じられないが、4 ml 培地になると菌の減少は明瞭であり、2 ml 培地ではさらに繁殖菌数は減少していた。すなわち繁殖菌数の少ない培地ほど阻止帯は高くなつている。

以上の培地量による阻止帯の差と繁殖菌数との関係をみるためにさらに次のごとく菌数測定を行なつた。10⁻⁴ mg/ml および 10⁻⁶ mg/ml に希釈した2種類の M. Phlei 菌液を培地量 8 ml ならびに 2 ml の1%小川培地にそれぞれ 0.1 ml ずつ接種、37°C 4 日間培

Table 1. Comparison between 695 Slant Tube Media and 608 Crook Necked Tube Media
INH was poured on 3% Ogawa medium two days after inoculation with 0.05 mg of BCG.
Reading ; after 3 weeks, M ; mean, Med ; median, S ; standard deviation

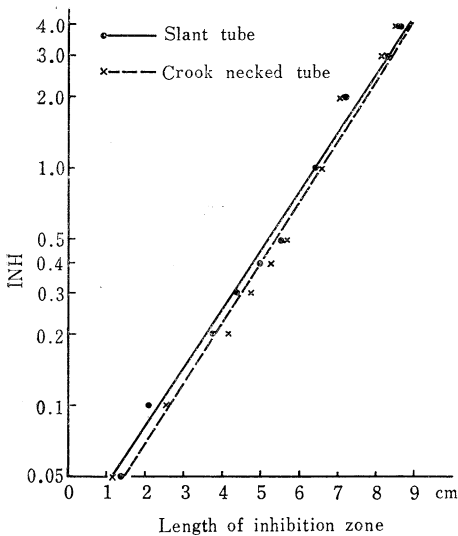
INH (γ)	Slant tube media				Crook necked tube media			
	Number of media	Inhibition zone (cm)			Number of media	Inhibition zone (cm)		
		M	Med	S		M	Med	S
4.0	35	8.66	8.69	0.63	31	8.51	8.44	0.54
3.0	36	8.39	8.60	0.62	32	8.19	8.10	0.56
2.0	147	7.25	7.13	0.46	124	7.13	6.99	0.53
1.0	38	6.42	6.46	0.44	32	6.59	6.60	0.37
0.5	147	5.52	5.44	0.38	136	5.63	5.59	0.27
0.4	38	4.97	4.76	0.56	32	5.27	5.18	0.60
0.3	39	4.38	4.28	0.36	33	4.76	4.67	0.46
0.2	140	3.74	3.67	0.36	125	4.16	4.13	0.34
0.1	38	2.09	2.00	0.37	33	2.55	2.46	0.53
0.05	37	1.40	1.32	0.17	30	1.17	1.12	0.13

Fig. 1. Comparison between Slant Tube Media and Crook Necked Tube Media



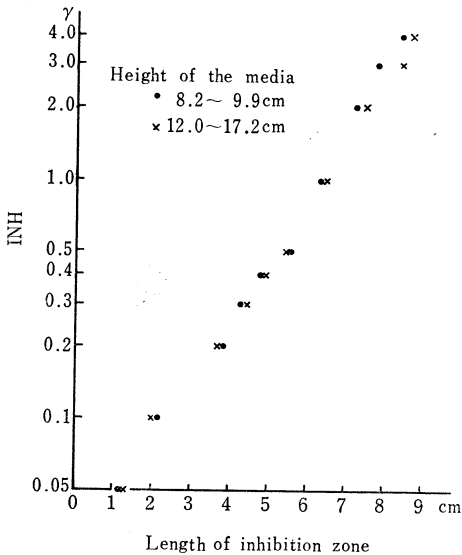
After two days of inoculation on 3% Ogawa media, inoculated with 0.05mg BCG INH was poured.
Reading ; After 3 weeks.

Fig. 2. Comparison between Slant Tube Media and Crook Necked Tube Media



● × Mean value from Table 1.
Results were also the same when median value was taken.

Fig. 3. Height of the Media in the Slant Tube and Inhibition Zone (from Table 1)



160 media whose height is under 9.9cm and 157 media whose height is over 12cm.

養した。各培地 10 本平均の集落数は 10^{-5} mg 接種群では、8 ml 培地で 1090 コロニー、2 ml 培地では 122.9 コロニーであつた。すなわち両方の培地の繁殖菌数の差は約 9 倍である。 10^{-7} mg 接種群ではそれぞれ 16.3 コロニーおよび 4.2 コロニーで両者の差は約 4 倍である。(表 2)

以上の実験は BCG でなく M. Phlei を 1% 小川培地に接種したものであるためいくぶん条件の違いはある

Fig. 4. Quantity of Media and Inhibition Zone

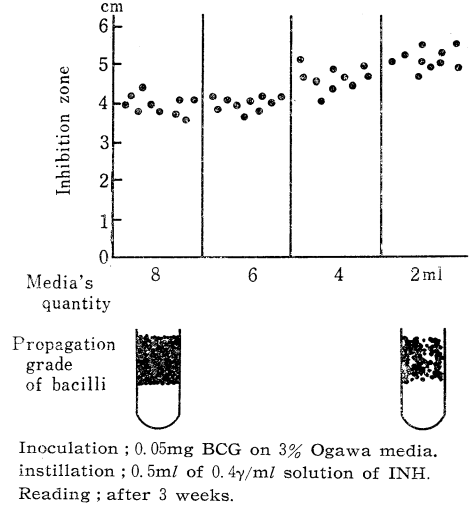


Table 2. Colony Number on 8 ml Media and 2 ml Media

1% Ogawa media. Inoculation ; M. Phlei.
Reading ; after 4 days

Inoculum quantity (mg)	Media	
	8ml	2ml
10^{-5}	1090	122.9
10^{-7}	16.3	4.2

Note : Colony number is an average of 10 tubes.

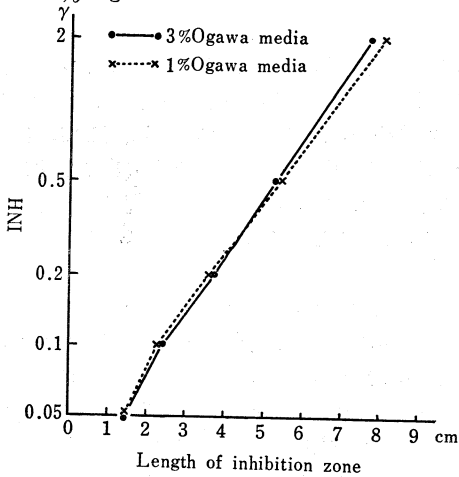
が、8 ml 培地と 2 ml 培地とでは繁殖菌数に差があることは明らかであり、その差は大體 10 倍以内とみなしてもよいと思う。接種菌量が少ないほど阻止帯は長くなる傾向を示すが(第 2 報²⁾、INH 0.2 r の注入で菌量の差 10 倍における阻止帯としては図 4 の示す差はいささか大きいようにも思われる。したがつて 8 ml 培地と 2 ml 培地における阻止帯の差は繁殖菌量の影響も一つの大きい要因ではあるが、その関係の程度は上記の実験では明確にしなかつた。

IV. 3% 小川培地と 1% 小川培地の比較

培地の pH が阻止帯に与える影響を 3% 小川培地と 1% 小川培地について検討した。0.5 mg/ml BCG 菌液を 0.1 ml ずつ接種、直後に 2, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05 r/0.5ml の 5 段階の INH 液を 0.5 ml ずつ各段階ともに培地 8 本ずつ両方の培地にそれぞれ注入した。直立に保つて 37°C 3 週間培養した。阻止帯の高さは 3% 小川培地で 7.7, 5.3, 3.7, 2.4, 1.5 cm であり、1% 小川培地では 8.1, 5.4, 3.6, 2.3, 1.5 cm であつた。すなわち両方の培地の間には阻止帯の高さになんら差を認めなかつた。(図 5)

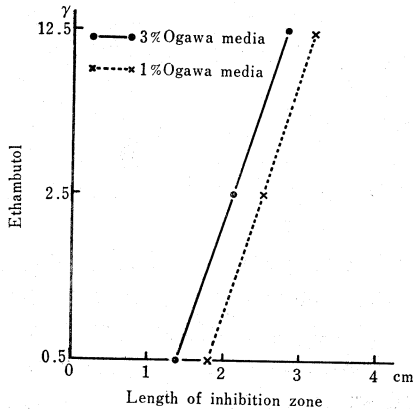
次に E. B. を対照として上記と同じように培地による阻止帯の比較を行なつた。0.5 mg/ml M. Phlei 菌液

Fig. 5. Comparison between 3% Ogawa Media and 1% Ogawa Media in the Case of INH



Immediately after inoculation of 0.05mg of BCG, INH solution was poured.
Reading ; after 3 weeks. ● × average of 8 media.

Fig. 6. Comparison between 3% Ogawa Media and 1% Ogawa Media in the Case of Ethambutol



Immediately after inoculation of 0.05mg of M. Phlei, Ethambutol solution was poured.
Reading ; after 4 days. ● × average of 16 media.

0.1 ml を接種、直後に 12.5, 2.5, 0.5 r/0.5ml の3段階の E.B. 水溶液を 0.5 ml ずつ各段階とも培地 16 本ずつ両方の培地に注入、37°C 4 日間直立に培養した。阻止帯の高さは 3% 小川培地で 2.8, 2.1, 1.4 cm であり、1% 小川培地で 3.2, 2.5, 1.8 cm であつた。(図6)

以上の実験成績から BCG を接種し INH を注入した場合は 3% 小川培地でも 1% 小川培地でも阻止帯に差はないが、M. Phlei を接種した E.B. の場合は明らかに 1% 小川培地で阻止帯が高くなつている。すなわち培地の pH による阻止帯への影響は接種菌の種類、注入薬剤の種類によつて異なり一定していない。

V. 培地の保存可能期間

培地作製後 6, 28, 65 日間室温 (冬期) に保存した 3

Table 3. Preservable Days of Media
Inoculation of 0.05 mg of BCG on 3%Ogawa media.
Instillation of 0.05 ml of 1 r/ml of INH solution.
Reading ; after 3 weeks

Interval between preparation of media and inoculation (days)	Inhibition zone (cm)
6	5.15
28	5.12
65	5.19

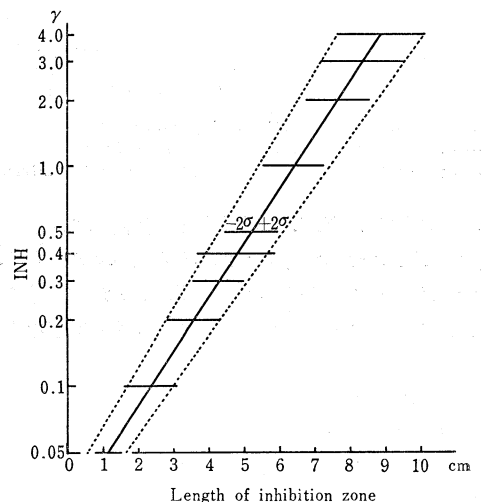
Note : 1. Media was kept in room temperature (winter).
2. Average of 12 media.

種類の 3% 小川培地を使用した。BCG 菌液 0.05 mg (0.1 ml) を上記培地各 12 本に接種、直後 1 r/ml INH 液 0.5 ml を管底に注入、37°C 3 週間培養した。BCG 菌液および INH 液は実験当日調整したものを使用した。阻止帯の高さは各 12 本平均で 5.15, 5.12, 5.19 cm と 3 種類の培地ともまったく同じ高さを示した(表3)。すなわち 3% 小川培地では 2 か月間は室温 (冬期) 保存で阻止帯に影響を与えない。

IV. 直立拡散法の信頼度

直立拡散法は生物学的測定法であるから相当の誤差を伴っていることは容易に推察されることである。事実図1にみられるように同じ INH 量を注入してもその阻止帯の分布はかなり大きい。表1, 図1に示した斜面培地 695 本を例にとつて直立拡散法の信頼度を検討した。統計上標準偏差 (σ) の 2 倍で示される正規分布の面積は全分布面積の 95.45% を占める。したがつて上記 INH の標準曲線にそれぞれ $\pm(2 \times \text{標準偏差})$ を書き込むと図7のようになる。すなわち図でみられるとおり INH 0.28 r から 0.8 r までは阻止帯 5 cm となる可能性があり、阻止帯 6 cm は INH 0.47 r である場合も 1.45 r である場合もありうる。0.8 r は 0.28 r の約 3 倍であ

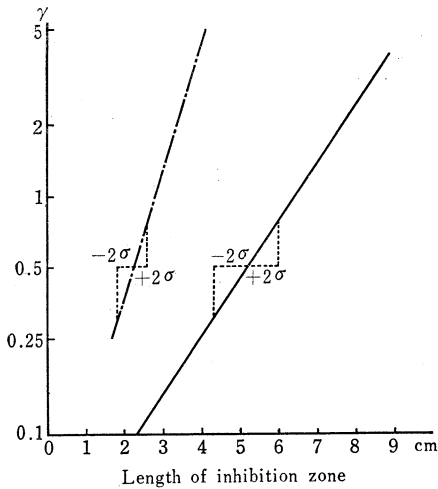
Fig. 7. Reliability of Vertical Diffusion Method



り、 $1.45r$ は $0.47r$ の大体3倍に当たる。すなわち直立拡散法の測定で得られた2つの未知のINH量を有意の差とみなすには5%の危険率で3倍以上の差が必要であることを示している。

以上はBCGを接種してINHを測定した場合であるが、M. Phleiを接種しE.B.を注入した標準曲線は第2報²⁾に示したとおりINHの標準曲線よりははなはだ傾斜が急である。この場合の精度検討の目的で次の実験を行なった。M. Phleiを1%小川培地(斜面)90本に同時に接種、直後 $1r/ml$ E.B.水溶液 $0.5ml$ ずつ注入(すなわちE.B. $0.5r$ 注入)、直立に $37^{\circ}C$ 4日間培養した阻止帯の高さは平均 $2.21cm$ 、標準偏差 $0.16cm$ である。また $2r/ml$ E.B. $0.5ml$ (E.B. $1r$)を同じく培地90本に注入したのも平均 $2.66cm$ 、標準偏差 $0.20cm$ であつた。一方BCGを3%小川培地(斜面)109本に同時に接種、 $1r/ml$ INH液 $0.5ml$ (すなわちINH $0.5r$)を注入、直立に $37^{\circ}C$ 3週間培養した阻止帯の標準偏差は $0.34cm$ である。INH・E.B.各 $0.5r$ 注入した群の標準偏差の2倍をそれぞれの標準曲線に書き込むと図8にみられるように阻止帯の分布によつて

Fig. 8. Reliability of Vertical Diffusion Method



Comparison between INH and Ethambutol.
 — : Inoculation of BCG, Instillation of INH.
 - - - : Inoculation of M. Phlei, Instillation of Ethambutol.

影響される範囲はE.B.もINHと大体同じである。すなわちE.B.についても $0.5r$ 注入分は $0.3r$ から $0.8r$ までの約3倍差の分布があり、E.B. $1r$ 注入分でも $0.6r$ から $1.6r$ までの約3倍差に相当する範囲を占めている。

したがつて2つの薬剤量を有意差とみなすには3倍以上の差を要することは接種菌の種類および注入薬剤に関係なく、直立拡散法そのもののもつ性質であつて、この検査法の信頼度を示すものと考えられる。

総括考察

直立拡散法の使用培地として培地の厚さを一定にする平面培地はSchmiedel³⁾⁴⁾⁵⁾、小川⁶⁾⁷⁾⁸⁾によつて報告され現在広く使われている。一方斜面培地はTinne⁹⁾、Grosset^ら¹⁰⁾¹¹⁾、飯尾¹²⁾、工藤¹³⁾が使用しており、平峰¹⁴⁾¹⁵⁾は両者の耐性を希釈法と比較して3法とも耐性値に有意差はないが斜面培地が平面培地よりも希釈法との一致率が劣ると報告している。しかしわれわれの斜面培地と平面培地とのおのおの600本以上の比較実験では両者の阻止帯は完全に一致しており(図2)、しかも斜面培地の高さによる阻止帯への影響は考慮しなくてもよい成績(図3)を得ている。すなわち培地の作製、操作取扱いの不便な平面培地をわざわざ使わなくても、日常培養に使用する斜面培地そのまま十分である。

阻止帯に影響すると思われる培地の諸因子のうち培地の量については $8ml$ と $6ml$ とでは差はないが、 $4ml$ 以下になると阻止帯は長くなる(図4)。これは繁殖菌数の減少による影響も一つの大きい要因となつている。この培地量による阻止帯の差を利用して $2ml$ 培地を使えば薬剤の測定可能限界を引き下げの都合のよい場合がある。次に3%小川培地と1%小川培地との阻止帯の差は接種菌種、注入薬剤によつて異なり、BCG接種INH注入では差はなく(図5)、M. Phlei接種E.B.測定では明らかに差が認められた(図6)。培地の保存期間については3%小川培地では冬期室温で2カ月間保存では阻止帯に差はなかつた。

直立拡散法と従来の希釈法による耐性の比較報告は多いが、直立拡散法そのものの信頼度に関する検討は見当たらない。われわれは斜面培地695本のINHの阻止帯の分布状態から2つの測定値を有意差とみなすには5%の危険率で3倍以上の薬剤量の差が必要であることを認めた。この関係はM. Phleiを接種しE.B.を測定した場合も同様である。すなわち接種菌種、測定薬剤に関係なく直立拡散法そのもののもつ信頼度であることを確認した。(図7, 8)

結語

(1) 直立拡散法における培地のいろいろの因子と阻止帯との関係、ならびに直立拡散法の信頼度について検討した。

(2) 斜面培地695本と平面培地608本とを対比して両培地間に差のないことを認めた。すなわち使用培地としては、取扱いなどで不便な平面培地でなくても日常培養に使用する斜面培地でよいとの結論を得た。

(3) 日常使用する斜面培地にみられる程度の高さの差異では阻止帯は影響されない。

(4) 培地の量は $8ml$ と $6ml$ とでは差はないが、

4 ml 以下になると順に阻止帯は長くなる。これは繁殖菌量の減少も一つの大きい因子として影響している。

(5) 3% 小川培地と 1% 小川培地の阻止帯への影響は接種菌種、注入薬剤の種類によつて異なり、一定してはいない。

(6) 培地は冬期室温で2カ月間は保存可能である。

(7) 直立拡散法の信頼度は、2つの測定値を有意差とみなすには5%の危険率で3倍以上の薬量差が必要である。

本研究の数学的な検討は立教大学理学部豊田利幸教授にご指導ご校閲をいただいた。厚く謝意を表します。

本論文の要旨の一部は第 38 回結核病学会総会(結核 38:374)で報告した。

文 献

- 1) 楊維垣・田島洋・飯尾正明他：結核, 40:207, 1965.
- 2) 楊維垣・田島洋・飯尾正明他：結核, 40:289, 1965.
- 3) Schmiedel, A.: Beitr. Klin. Tbk., 112:475, 1954.
- 4) Schmiedel, A.: Z. Tbk., 112:48, 1958.
- 5) Schmiedel, A.: Beitr. Klin. Tbk., 119:206, 1958.
- 6) 小川政敏：日結, 16:417, 1957.
- 7) Ogawa, M.: A. R. J. A. T., 3:117, 1958.
- 8) 小川政敏：結核, 36:475, 1961.
- 9) Tinne, J. E.・Henderson, J. C.: Lancet., 30:901, 1950.
- 10) Grosset, J.・Cannetti, G.: Rev. de la Tbk., 22:1077, 1958.
- 11) Grosset, J.・Cannetti, G.: Rev. Tbk. Pneum., 24:633, 1960.
- 12) 飯尾正明：結核研究の進歩, 27:221, 1959.
- 13) 工藤祐是：結核, 38:374, 1963 (第38回結核病学会総会演説).
- 14) 平峰繁：臨床検査, 7:461, 1963.
- 15) 平峰繁：臨床検査, 7:527, 1963.