

喀痰中結核菌薬剤耐性の定量的分析 第6報

喀痰中結核菌の薬剤耐性検査の信頼限界

東村道雄・山本昌邦・林 光男・中村栄一

国立療養所大府荘

(昭和32年8月3日受付)

臨床的に常用される喀痰中結核菌の耐性検査には、1種の培地には1本の試験管が用いられることが多い。私たちの研究室では、薬剤を含まぬ対照培地、SM 10mcg, 100mcg, 1,000mcg, INAH 0.1mcg, 1mcg, 10mcg, PAS 1mcg, 10mcg, 100mcg の各培地を1本ずつ、計10本を1組として枠に入れて使用している。このような場合、対照培地で100 colonies, SM 10mcg 培地で50 colonies を得た場合、簡単に SM 10mcg 耐性菌数が総生菌数の50% であると言えないのは勿論である。更に試験管の本数を増やして検査すれば、対照培地の平均集落数が70, SM 10mcg 培地のそれが70で、総生菌数の100% が SM 10mcg 耐性であるかもしれないからである。このような点を考えて、今までの研究では相当数の患者についての動的観察と統計的処理に重点をおいてきた。

しかし、耐性菌の総生菌数中に含まれる割合をみたい場合に、試験管1本で得た結果がどこまで信用してよいか見当づけることができれば非常に便利である。

このような推定を行う方法の原理は、予め同じ条件下で生菌単位の標準偏差を測定し、これを平均値にたいする百分率で表わしておいて、任意の測定値に適用することにある。

実験方法

上述の目的のためには、実験誤差の少ない方法をえらぶ必要がある。従つて私たちが別報した渦巻白金耳接種法を用いた^(1,2)。多数の結核菌を含む喀痰をとりこれに等量の5% KOH 加えて、20分間駒込ピペットでpumpingでして均等にする。これを 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} に生理的食塩水で希釈し、更に各希釈液を1/10~8/10に段階的に希釈した。出来上つた各種の希釈液を試験管20本ずつに渦巻白金耳で0.02ccずつ接種し、37°C 3週後に集落数(各生菌単位が各集落を形成するので、集落数は生菌単位数を示す)を計算した。

実験成績及び考察

結果を表1に総括した。試験管当りの集落数、すなわち接種量0.02cc中の生菌単位数の平均値は、13.05~127.9で、この平均値についての標準偏差は3.72から24.9となつた。標準偏差の大きさを、平均値の大きさから一応無関係にするために、標準偏差の平均値にたい

Table 1. Standard deviations of distribution occurring in the estimation of the number of viable tubercle bacilli in sputum by the method described by us.

Mean ($\bar{x}$)	No. of replicates	Standard deviation (s)	$(s/\bar{x}) \times 100\%$ (1*)
13.05	20	3.72	28.5%
13.90	20	5.18	37.4
16.55	20	4.47	28.7
21.05	20	5.88	27.9
22.05	20	6.60	29.9
40.25	20	9.25	23.0
96.50	20	12.40	13.0
100.50	20	20.50	20.4
124.00	20	24.90	20.1
127.90	20	22.20	17.4

(1*) Percentage standard deviation.

Statistical: Mean of percentage standard deviations: 24.68%. $s^2=51.22$ (%)². $s=7.15\%$. Degree of freedom=9. 95% Confidence limits of the mean: $24.68 \pm 5.05\%$. (21.63~31.73%). Maximal value of the confidence limits: $31.73\% \approx 32\%$. Thus, average standard deviation for a given case to postulate its standard deviation has been calculated as 32%. For example, when a given estimate of colonies (viable cells) in sputum is 100, the mean of viable cells in the sputum would be postulated to be between $100 \pm 100 \times 0.32 = 100 \pm 32$ at 70% confidence rate and to be between $100 \pm 100 \times 0.32 \times 2 = 100 \pm 64$ at 95% confidence rate.

する百分率(%標準偏差)をとると、表のように最低13.0%から最高37.4%となつた。

測定が常に同条件で行われると仮定して、私たちが知りたいのは、任意の測定値にたいする%標準偏差の推定値である。今、上述の結果をみると、%標準偏差はそれ自身正規分布をなしているの、%標準偏差の平均値の信頼限界を求めてみる。

%標準偏差の平均値=24.68%

分散=51.22. 標準偏差=7.15%.

従つて、平均値24.68%の95%信頼限界は、

$$24.68\% \pm 7.15\% \times t(9, 0.05) \times \frac{1}{\sqrt{10}} \\ = 24.68\% \pm 5.05\%.$$

=21.63~31.73% (tはStudentのt)

私たちの目的は、この値を任意の場合に適用することにあるので、95% 信頼限界の最高値 $31.73 \approx 32\%$ を採用する。すなわち、同条件で任意の測定を行つた場合の% 標準偏差の推定最高値 (95% 信頼度) として 32% を得たわけである。

一般に、細菌の試験管への分布は Poisson 分布をすることが知られているが、平均値が大きくなると正規分布に近似してくる。表 1 の結果では、平均値の最低は 13.05 であつて、事実確率紙にその各測定値を打点すれば、略正規分布をしている。他の場合も、いずれも各測定群は正規分布をしている。従つて、今少くとも平均値 10~130 の場合に限局すれば、得られた結果に、正規分布について行い得る推定を行つてよいと思われる。

すなわち、平均値 $\bar{x}$ 、及び標準偏差 s を得れば、測定値の $68\% \approx 70\%$ は $(\bar{x} \pm s)$ の区間に含まれ、95% は $(\bar{x} \pm 1.96s) \approx (\bar{x} \pm 2s)$ の区間に含まれる。これを換言すれば、任意の測定値 x をとつて、その両側に s をとれば、すなわち $(\bar{x} \pm s)$ の区間に平均値 $\bar{x}$ が含まれる確率は 70% であり、 $(\bar{x} \pm 2s)$ の区間に $\bar{x}$ が含まれる確率は 95% であるといえる。従つて、 s が既知であれば、任意の 1 測定値 x を知れば、平均値 (未知であるが、もし測定値を増加すれば得られるはずの値) を 70% または 95% の確率で含む区間を示すことができる。

話を前にかえて、私たちは % 標準偏差の最高推定値として、32% を得たので、これを任意の場合に適用すれば、その場合の標準偏差の推定値を得ることができる。

従つて、或る喀痰液を試験管 1 本に接種して、集落数 x を得れば、

$$s/x = 0.32 \quad \therefore s = 0.32x$$

従つて、この喀痰液の生菌単位平均値は、 $(x \pm 0.32x)$ の区間に 70% の確率で含まれ、 $(x \pm 2 \times 0.32x) = (x \pm 0.64x)$ の区間には 95% の確率で含まれることになる。

応 用 例

(1) 或る喀痰液を渦巻白金耳法で、薬剤を含みぬ対照培地 1 本と、INAH 1mcg 培地 1 本に接種して、それぞれ集落数 100 及び 50 を得た。この場合、INAH 1mcg 耐性菌含有率はどのように推定されるだろうか。

更に実験回数を増加したら得られるはずの、この喀痰液が対照培地で与える集落数平均値は、信頼度 70% で、 $100 \pm 100 \times 0.32 = 68 \sim 132$ の区間に含まれる。一方、INAH 1mcg 培地で与える平均値は、信頼度 70% で、 $50 \pm 50 \times 0.32 = 34 \sim 66$ の区間に含まれる。従つて、危険率 30% では両者の平均値に差があると推定される。しかし、信頼度を 95% にとると、対照培地上で与える平均値は、次の区間に含まれることになる。

$$100 \pm 0.64 \times 100 = 36 \sim 164.$$

一方、INAH 1mcg 培地上の平均値は次の区間に含まれることになる。

$$50 \pm 0.64 \times 50 = 18 \sim 82.$$

従つて、両培地上での平均値に差があるとは言えなくなる。

換言すれば、信頼度 95% では、INAH 1mcg 耐性菌含有率は、次の間にあることが想像される。

$$18/164 \sim 82/36 = 11\% \sim 100\%$$

(ただし、INAH 依存菌の存在は、今までの経験から査定した。)

(2) 或る喀痰液を対照培地 1 本と SM 100mcg 培地 1 本に等量接種して、それぞれ集落数 50 及び 150 を得た。この場合、SM 100mcg 培地の生菌数が対照培地より多いと言えるだろうか。すなわち SM 依存菌の存在が想像できるだろうか。

95% 信頼度では、対照培地の平均集落数は $50 \pm 0.64 \times 50 = 18 \sim 82$ の区間に含まれ、SM 100mcg 培地のそれは、 $150 \pm 0.64 \times 150 = 54 \sim 246$ の区間にある。すなわち、95% 信頼度では、この成績から SM 依存菌の存在を断定することはできない。

(3) それでは、一体どの位の差があれば、A 培地と B 培地で平均値の差があると言えるだろうか。

信頼度を 95% にすれば、そして対照培地の集落数を 100% とすれば、

$$(100 \times -0.64 \times 100\%) - (x + 0.64x) > 0$$

をとり、 $x < 22\%$ となる。

もし、信頼度を 70% にすれば、同様に、 $x < 51\%$ 。

従つて、B 培地の集落数 (任意の 1 測定値) が、A 培地の集落数 (任意の 1 測定値) の 22% 以下であれば、95% 信頼度で、51% 以下であれば、70% 信頼度で両者の平均値に差があることを推定してよい。

(4) 以上は、試験管 1 本を用いた場合であるが、A, B, C など各培地 2 本または 3 本の試験管を用いて、その平均値をとつた場合にはどうなるであろうか。

もし、予め標準偏差が測定しなれば、信頼限界の計算及び平均値の比較に Student の t を用いることになる。この場合には t は大きい値になるので、余程大きい差がないと有意の差とは言えない。従つて、予め測定した % 標準偏差からの標準偏差最高値を代入する方が有利であることが多い。

各培地に使用した試験管が n 本であれば、95% 信頼度で、(更に試験管を増やして測定した時に与えられる) 平均値は次の区間に含まれることになる。

$$\left(x \pm 0.64x \times \frac{1}{\sqrt{n}} \right)$$

もし、A, B 両培地とも 2 本の試験管を用いて集落数を数えて、2 本の平均をとった場合、B 培地の平均値（2 本の平均値）が A 培地の平均値（2 本の平均値）の何%以下であれば、B 培地の平均値（多数の試験管で測定したときに得られるはずの平均値）が A 培地のそれより小さいと言えるだろうか。この場合、

$$\left(100\% - 0.64 \times 100 \times \frac{1}{\sqrt{2}}\%\right) - \left(x + 0.64x \times \frac{1}{\sqrt{2}}\right) > 0$$

をといて、 $x < 30.3\%$ 。すなわち、一方が 30% 以下であれば、差があると言える。

同様にして、試験管 3 本を用いた場合は、 $x < 46.0\%$ 。もし、信頼度を 70% にすれば、 $x < 69.9 \approx 70\%$ 。

総 括

小川培地と渦巻白金耳接種を用いる方法で喀痰中結核菌生菌単位数を測定した場合の標準偏差を実測し、これを平均値にたいする百分率、すなわち、%標準偏差で表した。この % 標準偏差の最高値（95% 信頼度）を推定して、32% の値を得た。

この値を用いて、集落数 10 以上の場合には、次の推定を行い得ることを示した。

今、私たちが或る喀痰液の一定等量（0.02cc）を 1~3 本の試験管に接種して、1 本の試験管の集落数 x 、または、2~3 本の平均集落数 x を得たとすれば、その喀痰液の一定等量に含まれる平均生菌単位数（もし、多数の試験管を用いて測定したとしたら、与えられるはずの正確な平均値）は次の区間に含まれることが推定できる。

試験管 1 本で任意の測定値 x を得た場合、70% 信頼度で、 $(x \pm 0.32x)$

95% 信頼度で、 $(x \pm 0.64x)$ 。

試験管 2 本で測定した平均値 x をとすれば、

70% 信頼度で、 $(x \pm 0.23x)$ 、

95% 信頼度で、 $(x \pm 0.46x)$ 、

試験管 3 本で測定した平均値を x とすれば、

70% 信頼度で、 $(x \pm 0.19x)$ 、

95% 信頼度で、 $(x \pm 0.37x)$ 。

勝沼六郎院長と日比野教授の御校閲を謝する。

文 献

- (1) 東村道雄, 野田用: 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 1 報, 結核, 掲載予定。
- (2) 東村道雄, 野田用, 中村栄一: 同, 第 2 報, 結核, 掲載予定。
- (3) BENNETT, C. A. & FRANKLIN, N. L.: Statistical Analysis in Chemistry and the Chemical Industry, 1954, New York, John Wiley & Sons. (奥津恭訳, 丸善, 東京)
- (4) DAVIES, O. L.: Statistical Methods in Research and Production, 1949, Oliver & Boyd, London.
- (5) 岡松正泰: 推計学ノート, 1953, オーム社, 東京。