

## 1 濃度ディスク法における発育阻止円直径測定値の変動

長 田 富 香

東京女子医科大学病院

金 沢 裕

豊栄病院

大 沢 伸 孝

北里大学

河 喜 多 龍 祥

東海大学病院

田 波 洋

群馬大学病院

原 田 賢 治

群馬公衆保健協会

小 林 章 男

千葉大学病院

向 島 達

国立がんセンター病院

徐 慶 一 郎

デンカ生研株式会社

中 村 正 夫

聖マリアンナ医科大学

吉 田 孝 人

浜松医科大学

青 木 義 雄

国立小児病院

小 酒 井 望

順天堂大学

永 井 龍 夫

札幌医科大学

鷲 津 良 道

京都府立医科大学

笠 原 和 恵

岡山済生会総合病院

(ディスク測定法研究会 主任研究員 三 橋 進)

(昭和 57 年 1 月 8 日受付)

ディスク測定法研究会において、日本における臨床分離菌のディスク法による耐性菌情報を得るための第一段階として、1濃度ディスク法による成績の信頼性（測定値のバラツキ）について検討した。

ディスク法の精度管理の報告は、これまで使用培地、使用ディスク、測定法などが各施設によりまちまちであるために、その結果は満足すべきものは得られていない。

今回われわれは使用培地およびディスクの同一 Lot No. のものを配布し、標準菌株はゲラチンディスクとし、1濃度法に規定された方法に準拠したうえで、阻止円直径読みとりのバラツキ（標準偏差, S. D.）について検討を行なった結果、上記のような条件が満たされた場合には、以下のよう

1) 標準株として *Staphylococcus aureus* 209 P と、*Escherichia coli* NIHJ において、前者においては、不完全発育阻止帯に多少の幅があり、感受性境界点 (end-point) 設定の位置が施設により異なるために、9施設、9種薬剤の繰返し測定について計算した標準偏差の値  $u$  は 1.76~3.19 mm と大きくバラツキを示したが、後者では、完全発育阻止点が明瞭なために、その標準偏差の値  $u$  は 1.26~1.97 mm と小さい値を示し、満足すべき精度を示した。

2) *Serratia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* 各2株の reference 株について、同一施設で測定規準の一定している6名の技師による繰返し実験の結果は、菌種間では *Pseudomonas* のバラツキがやや大きく、薬剤間では Tetracycline, Chloramphenicol, Nalidixic acid, Gentamicin などやや大きなバラツキを示した。

3) 16施設のそれぞれにおいて、同一人による 17~50 回の繰返し実験における  $u$  の値の平均値  $\bar{u}$  を求め、これからその標準偏差  $w_u$  を計算すると、それは 0.35~0.72 mm とほぼ満足すべき値を示した。

さらに同一施設内の6名の技師による 40 回の測定値から計算した標準偏差  $u$  の平均値  $\bar{u}$  から計算した  $w_u$  は、0.09~0.3 mm の間に分布し、測定規準が一定している同一施設内での各個人の測定誤差は、極めて小さいことが示された。

4) 同一施設の7名の技師が、同一平板を2回ずつ測定したバラツキ（その差、範囲  $R$ ）について、薬剤間、菌種間、技師間の差の有意性を要因分析法により検定した結果、薬剤間、菌種間の差は5%の危険率で有意であるが、技師間の差は有意とは認められないことが統計的にも証明された。

5) 以上のように菌株、培地、ディスクの品質を一定にし、検査技師間の読みとり技術を習練によって安定化したうえでもなおかつ測定値のバラツキがある程度大きいのは、菌株の不完全発育阻止帯の幅が広いことに起因する避けがたいものである。

一般細菌の化学療法剤感受性試験法としては、ディスク法が日常検査として広く行なわれている。昭和52年7月、三橋は臨床分離株の薬剤感受性度の実態をいち早く把握して、直ちに臨床側に還元し、合理的な化学療法を行なう指針とすることを計画した。

さらにその成績を集計し、各種細菌の各薬剤に対する耐性の疫学的情報をまとめて医療に資し、同じ情報を新薬開発にあたる製薬研究機関に提供して、その方向づけに役立たせるよう、耐性菌測定法研究会を発足させた。

上記の目的達成のためには、ディスク法による耐性情報は常に精度のよいものでなければならない。

臨床検査室ごとの臨床検査データの精度管理には、平均値を対象とする方法とバラツキを対象とする方法とがある。

ディスク法による一般細菌の化学療法剤に対する感受性試験法は、感受性用培地およびディスクの製造が規格化されている場合には検査室ごとにそれぞれの実験条件のもとで標準曲線がつけられているなら、同一の検査材料を異なる検査室において検査しても、測定値が検査室間で平均として大きな差を生じている可能性は著しく小さいものとなってくる。

それがどの程度のものであるかは測定値の平均値  $\bar{x}$  管理の問題として検討されなければならないことである。

一方、これとは別に同一の臨床検査室において同一の菌株に対する同一の薬剤ディスクの力価を多数回測定したときに、どの程度の測定値のバラツキが起こりうるかは、測定値の標準偏差  $u$  の管理の問題として検討されなければならないことになる。

このような標準偏差  $u$  の値は、菌の感受性の特質（感受性曲線の立ち上りの急峻度）の差および検査技師による読みとりのバラツキの程度によるものと考えられるが、同一菌株による測定値の標準偏差における検査室間の差は、主として検査技師間の読みとりの技術誤差に対応するものと考えられる。

ここではルチーンにおける 1 濃度法の精度を検討するため、全国各地より選ばれた 16 施設において、同一の菌株と同一のディスクを使用したうえのディスク阻止円直径測定値の読みとりの精度を標準偏差  $u$  の値として検討を行なった結果を報告する。

I. 実験材料と研究方法

供試菌株：日本化学療法学会 MIC 測定標準法<sup>1)</sup>における標準株とされている *Staphylococcus aureus* 209 P JC-1 と、*Escherichia coli* NIHJ C-2 を含む後述の菌株が用いられ、ゲラチンディスクとして配布された。

使用培地：感受性ディスク用培地（Mueller Hinton 変法、日水）が使用され、同一実験には同一 Lot の生培地が配布された。

感受性ディスク：1 濃度ディスク（昭和）が使用され、同一実験には同一 Lot のものが配布された。

ディスク法実施方法：昭和ディスク使用便覧に従い、1 濃度法指定の白金耳により菌液を作成し、これを一定

量平板培地に接種後、滅菌ガラス玉でぬり広げたのちディスクを置いて、直ちに 37°C に 16~20 時間培養し、現われた発育阻止円を、各施設ごとに日常行なっている判定基準で測定した。

参加施設：16 の実験参加施設のうち、実験 1 には 9 施設が、実験 2 には 1 施設の 6 名の技師が、実験 3 には、日常検査には 1 濃度法を採用していない施設も含めて、16 の全施設が参加した。

統計解析の方法：同一条件での  $N$  回の測定値  $x_1, x_2, \dots, x_N$  から計算された平均値を  $\bar{X}$ 、標準偏差を  $u$  とし、 $u$  を測定手技のバラツキの指標とした。

なお、 $k$  個の施設または  $k$  人の技師について計算された  $u_1, u_2, \dots, u_k$  のある場合には、その平均を  $\bar{u}$ 、その標準偏差を  $w_u$  とし、 $\bar{u} \pm w_u$  および  $\bar{u} \pm 2w_u$  をもって施設間または技師間のバラツキの管理限界とした。

なお 2 回の繰返し測定値のあるときには、両者の差（範囲  $R$ ）が標準偏差と一定の関係があるので、これを解析の対象とした。

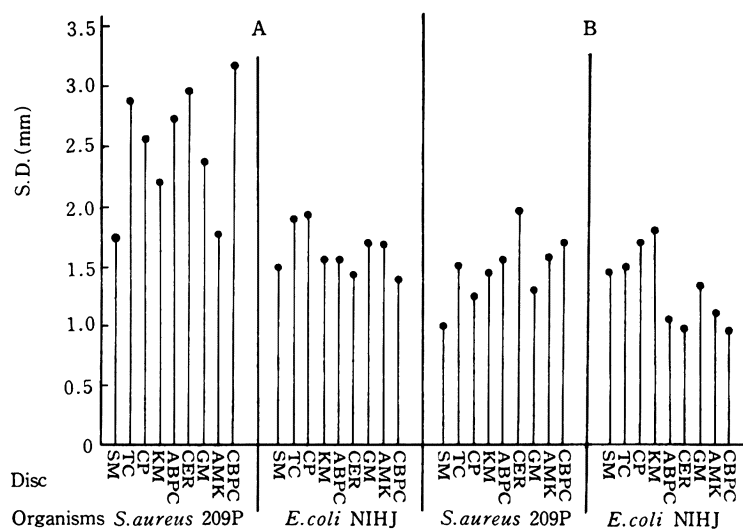
一般的には  $\bar{X}$  のバラツキの幅が大きき場合には変異係数  $CV = u/\bar{X} \times 100$  が用いられるが、本研究ではある程度精度管理されている集団を対象としているので、 $\bar{X}$  のバラツキはそれほど小さくなく、したがってこれを用いず、バラツキの指標として標準偏差  $u$  を取り上げ、こ

Table 1 The values of standard deviation  $u$  of inhibition zone diameters obtained by repeated examinations

Strains	Discs	A (total of 9 laboratories)						B (at one laboratory)					
		Sample	$u$ (S.D.)	Mean	Max.	Min.	Range	Sample	$u$ (S.D.)	Mean	Max.	Min.	Range
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	SM	62	1.76	27.1	32	22	10	15	0.10	26.1	28	24	4
	TC	60	2.90	35.8	43	27	16	15	1.50	35.4	38	33	5
	CP	62	2.56	32.5	38	26	12	15	1.26	32.6	35	31	4
	KM	61	2.19	30.0	35	24	11	15	1.45	29.9	32	28	4
	ABPC	58	2.60	42.2	49	37	12	15	1.55	40.5	43	38	5
	CER	57	2.95	45.8	53	38	15	15	1.96	45.4	49	43	6
	GM	61	2.37	33.6	40	29	11	15	1.30	32.3	34	30	4
	AMK	60	1.78	29.0	33	24	9	15	1.58	28.7	31	25	6
	CBPC	50	3.19	43.5	52	35	17	15	1.69	42.1	46	40	6
<i>Escherichia coli</i> NIHJ C-2	SM	68	1.53	24.3	28	19	9	16	1.47	24.2	25	19	6
	TC	68	1.90	28.8	32	25	7	16	1.50	27.4	30	25	5
	CP	68	1.97	29.3	33	25	8	16	1.70	27.5	31	25	6
	KM	68	1.59	24.8	28	20	8	16	1.80	24.9	28	21	7
	ABPC	67	1.53	25.6	29	22	7	16	1.05	25.1	27	23	4
	CER	68	1.40	24.9	28	22	6	16	0.97	25.9	28	24	4
	GM	68	1.57	27.6	31	24	7	16	1.33	27.6	30	26	4
	AMK	68	1.55	24.3	28	21	7	16	1.11	24.1	26	22	4
	CBPC	67	1.26	22.1	25	19	6	16	0.94	21.5	23	20	3

Fig. 1 The values of standard deviation  $u$  of inhibition zone diameters (mm).

A: total results at 9 laboratories, B: five technicians at one laboratory.



れに影響を及ぼす因子を分析の対象とした。

## II. 実験成績

1. *Staphylococcus aureus* 209 P JC-1 株および *Escherichia coli* NIHJ C-2 株における阻止円直径の測定値のバラツキ (Table 1, Fig. 1)

Table 1 の A には 9 施設における約 60 回の測定値のバラツキ (S. D.) を, Table 1 の B には 1 施設の 5 名の技師による約 15 回の繰返し測定の結果を示した。

*Staphylococcus aureus* においては, 9 施設 (A) では測定値の最大と最小の差 (範囲, range) が, 9 種薬剤において 9~17 mm の幅を示し, 標準偏差 (S. D.) は 1.76~3.19 mm を示したが, 1 施設 (B) においては最大と最小の幅 (範囲, range) は 4~6 mm, S. D. は 0.10~1.96 mm と小さい値を示した。

しかしながら *Escherichia coli* においては, 測定値の最大と最小の差が 9 施設の場合は 6~9 mm, 1 施設の場合は 3~7 mm で, その S. D. は 1.26~1.97 mm および 0.94~1.80 mm とともに小さい値を示した。このことは *Staphylococcus aureus* 209 P 株においては, *Escherichia coli* に比べ不完全発育阻止帯の幅が広くすそを引いているために, end-point の取り方が施設間で一定しないためにバラツキの幅が大きくなったものと考えられ, *E. coli* NIHJ C-2 株の場合は阻止円がクリヤカットに生ずるために施設間の測定誤差が少ないものと推定された。

2. *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* 各 2 株における阻止円直径

Table 2 The values of standard deviation  $u$  of inhibition zone diameters (mm) produced by the reference strains

Disc tested	Bacteria					
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	L-83	7092907	J-13	J-14	1	2
SM	1.55	1.28	1.34	1.15	1.06	1.28
TC	1.15	2.58	1.71	1.77	2.41	1.30
CP	1.21	2.25	0.81	1.77	—	—
KM	1.86	0.99	1.25	1.21	1.61	1.88
ABPC	1.28	—	1.27	1.51	—	—
CER	—	—	1.11	0.97	—	—
NA	3.04	1.30	0.95	1.79	—	2.29
GM	3.09	1.38	1.21	0.48	2.08	1.95
AMK	1.48	0.83	0.53	0.81	1.70	1.64
CBPC	1.64	—	1.11	—	1.46	—

— : No inhibition zone

の読みとりのバラツキ (Table 2)

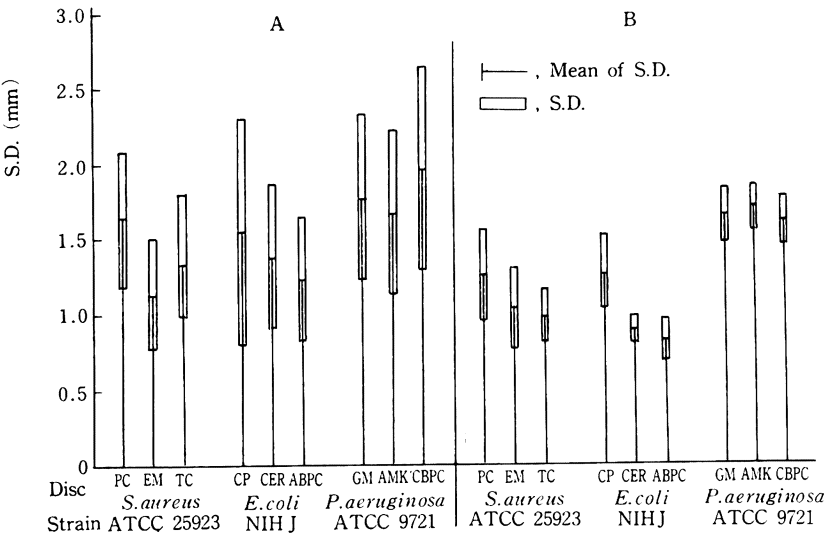
*Serratia marcescens* L-83 株および 7092907 株, *Klebsiella pneumoniae* J-13 および J-14 株, *Pseudomonas aeruginosa* No. 1 および No. 2 株について, 1 施設の 6 名の技師が, 各株ごとに 7 回ずつ 10 種薬剤について感受性検査を行なった結果は, Table 2 に見るように, 阻止円直径測定値のバラツキの S. D. は, 特に大きい値を示したものは, *Serratia marcescens* L-83 株の Nalidixic acid の S. D. 3.04 mm と, Gentamicin の S. D. 3.09 mm であった。

Table 3 The values of standard deviation  $u$  of inhibition zone diameters (mm) obtained by the repeated examinations at 16 laboratories

Code No. of facilities	No. of repeated examinations	Strains and disc tested								
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923			<i>E. coli</i> NIHJ			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721		
		PC	EM	TC	CP	CER	ABPC	GM	AMK	CBPC
1	25	1.55	1.48	1.45	1.24	1.12	1.74	1.78	1.85	2.20
2	17	1.75	1.69	1.06	2.20	1.45	1.33	3.08	3.00	2.82
3	20	1.88	0.99	1.45	2.07	1.50	2.16	2.70	1.50	2.26
4	38	1.51	1.09	1.08	1.48	1.34	0.99	1.22	1.16	1.58
5	50	2.35	1.43	2.00	1.41	1.39	1.42	2.07	2.20	1.93
6	42	—	0.74	1.27	0.87	1.03	1.25	1.09	0.81	1.15
7	40	1.56	0.92	1.62	1.60	2.62	1.58	1.88	1.64	2.97
8	50	0.90	0.83	0.94	0.93	0.95	0.70	1.37	1.45	1.43
9	27	2.01	1.59	1.58	1.14	1.17	0.80	1.93	1.94	1.59
10	32	1.85	1.36	1.90	1.05	1.16	1.14	2.03	2.43	3.18
11	30	1.71	0.41	0.71	1.72	1.52	0.58	1.74	1.61	1.88
12	50	1.31	0.93	1.36	1.13	0.82	0.97	1.27	1.39	1.48
13	42	0.85	1.23	1.36	1.36	1.02	1.08	1.19	1.02	0.97
14	50	1.26	0.97	0.86	1.09	1.20	1.07	1.27	1.23	1.50
15	32	2.41	5.33†	5.79†	3.85	2.27	1.68	1.83	1.76	2.67
16	50	1.55	1.36	1.39	1.32	1.50	1.15	1.90	1.74	1.83
Mean ( $\bar{u}$ )		1.63	1.40 1.13†	1.61 1.34†	1.53	1.38	1.23	1.77	1.67	1.97
S.D. of $u(w_u)$		0.45	1.10 0.35†	1.17 0.36†	0.72	0.47	0.41	0.55	0.55	0.66

†: reject by SMIRNOFF's test

Fig. 2 The values of standard deviation  $u$  of inhibition zone diameters (mm).  
A: total results of 17~50 times repeated assays by one technician at 16 laboratories.  
B: results of 40 times repeated assays by 6 technicians at one laboratory (No. 8).



これに対し S. D. が最も小さい値を示したものは、*Klebsiella pneumoniae* J-14 株の Gentamicin の S. D. 0.48 であった。各菌株ごとに各種薬剤の阻止円直径の S. D. は、*Klebsiella* に比べ *Serratia* および *Pseudomonas* はバラツキが大きく、また薬剤ごとに各菌株の S. D. をみると、Tetracycline, Chloramphenicol, Nalidixic acid, Gentamicin において大きい傾向のあるものがみられた。

この実験は同一施設内で end-point のとり方が一致するよう習練を積んだ 6 名の技師が繰返し測定したものであるため、ここに現われたバラツキは個人間の測定誤差というより、菌株によりあるいはディスクの種類により阻止円直径にバラツキの生じやすいものがあることを示しているものと考えられる。

3. 16 施設における 3 菌種、各 3 薬剤の読みとり値のバラツキ (Table 3, Fig. 2)

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* NIHJ, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9721 の 3 菌株について、各々異なる 3 種ずつの薬剤ディスクを使用し、Table 3 に見るように各施設において同一人が 1 日 1 回ずつ 50 回 (少ない施設は 17 回) にわたり感受性度の測定を行なった。

1) 16 施設における 9 種薬剤の測定値の標準偏差  $u$  と、それらの標準偏差  $u$  の標準偏差  $w_u$  (Fig. 2・A)

各施設の繰返し測定における各薬剤ごとの測定値の平均値に対する S. D. ( $u$ ) は Table 3 のとおりであるが、ここに示された 16 施設の S. D. の平均値( $\bar{u}$ )をみると、最小 1.23 mm, 最大 1.97 mm と極めて小さいバラツキを示した。

次にこの  $\bar{u}$  に対する各 S. D. の S. D. ( $w_u$ ) を求めると 0.41~1.17 mm の間に分布した。

さらにこの表中の No. 15 施設における Erythromycin および Tetracycline の S. D. はそれぞれ 5.33 mm および 5.79 mm と、他に比べ著しくかけ離れた大きい値を示したため、同一集団に属するとは考え難い値として、SMIRNOFF の棄却検定法によりこの 2 件を除外して計算することにした。その結果、S. D. の平均 ( $\bar{u}$ ) は 1.13 mm および 1.34 mm となり、S. D. の S. D. ( $w_u$ ) は 0.35 mm および 0.36 mm と極めて小さい値を示した。

2) 1 施設における 6 名の技師の 40 回の読みとり値のバラツキ (Table 4, Fig. 2・B)

同一の感受性測定平板を 6 名の技師が測定し、各薬剤について 40 組 (1 日に 1 組実施) の測定値の S. D. ( $u$ ) を各人について求め、上記と同様に S. D. ( $u$ ) の平均 ( $\bar{u}$ ) と、これに対する S. D. ( $w_u$ ) を求めて 16 施設の場合と比較 (Fig. 2 の A と B) すると、S. D. ( $u$ ) の平均値 ( $\bar{u}$ ) は 0.82~1.70 mm, S. D. ( $u$ ) の S. D. ( $w_u$ ) は、0.09~0.30 mm と小さい値を示した。したがって阻止円直径の読みのバラツキは同一施設内で判定規準が一定である 6 名がダブルチェックした場合には極めて小さいものであることが示された。

3) 測定値 S. D. の 2 シグマ管理図 (Fig. 3)  
一つの施設での日または月を追っての精度管理あるいは一定地域内に分布する多数の施設の精度管理のために、標準偏差  $u$  の平均値  $\bar{u}$  と、その標準偏差  $w_u$  を利用して 2 シグマ管理図が用いられることがあるので、Fig. 3 以下ではそれに準じた図示をした。

各菌株ごとに、各薬剤について S. D. ( $u$ ) の平均値 ( $\bar{u}$ ) を中心に 16 施設の S. D. の値 (166 個) をプロットすると、2 シグマ線を超えるものは、さきに指摘した No. 15 施設の 2 件 (十) のほかに、No. 15 施設の Chlo-

Table 4 The values of standard deviation  $u$  of inhibition zone diameters (mm) and S. D. value  $w_u$  of  $u$  obtained by 40 times repeated examinations by every 6 technician at one laboratory

Technician	No. of repeated examinations	Strains and discs tested								
		S. aureus ATCC 25923			E. coli NIHJ			P. aeruginosa ATCC 9721		
		PC	EM	TC	CP	CER	ABPC	GM	AMK	CBPC
A	40	0.94	0.75	0.79	0.89	0.83	0.70	1.38	1.44	1.39
B	40	1.20	0.93	0.77	1.41	0.93	1.01	1.79	1.80	1.64
C	40	0.87	1.18	1.10	1.05	1.02	0.86	1.47	1.78	1.84
D	40	1.43	0.87	0.98	1.41	0.77	0.64	1.68	1.64	1.47
E	40	1.53	0.98	1.06	1.46	0.93	0.93	1.72	1.82	1.66
F	40	1.57	1.48	1.24	1.39	0.94	0.80	1.79	1.74	1.66
Mean ( $\bar{u}$ )		1.26	1.03	0.99	1.27	0.90	0.82	1.64	1.70	1.61
S. D. of $u$ ( $w_u$ )		0.30	0.26	0.18	0.24	0.09	0.14	0.17	0.14	0.16

Fig. 3 Control chart of  $\bar{X} \pm 2\sigma$  for S.D. of inhibition zone diameters(mm) obtained at 16 laboratories

*S.aureus* ATCC 25923

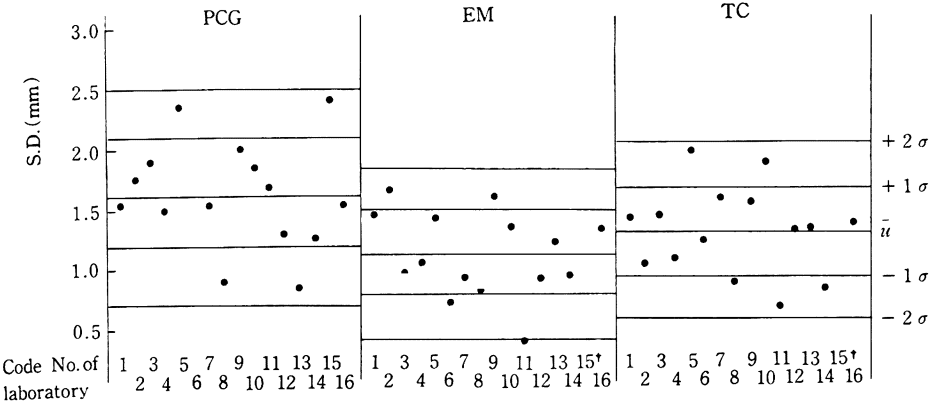


Fig. 3-1  
(†: reject by  
SMIRNOFF'S test)

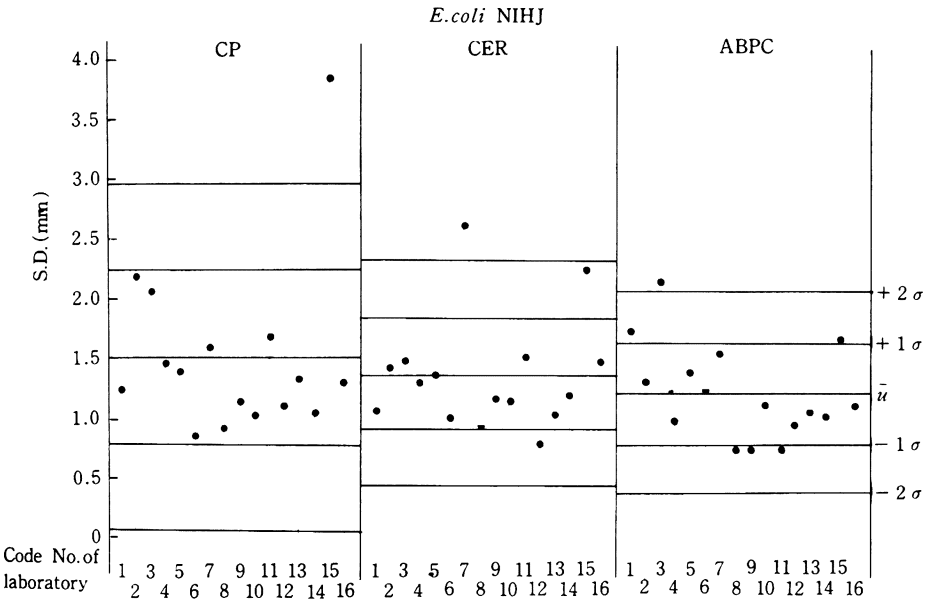


Fig. 3-2

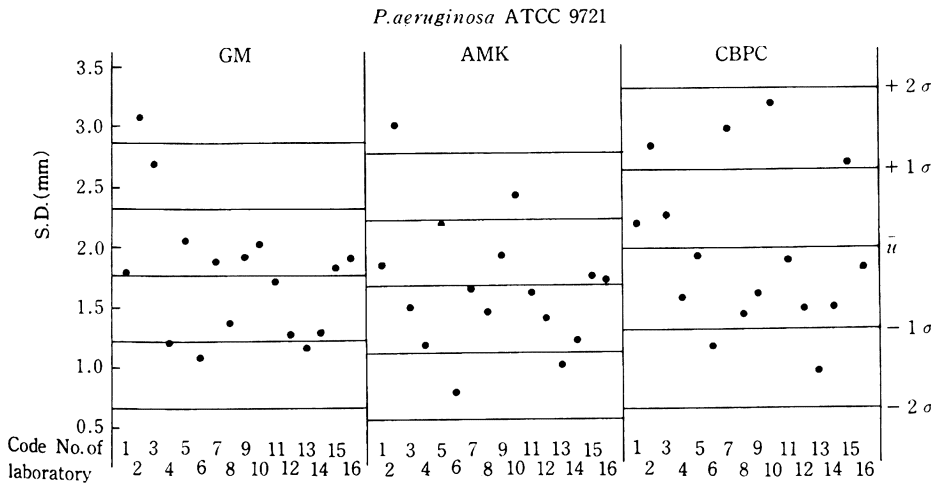
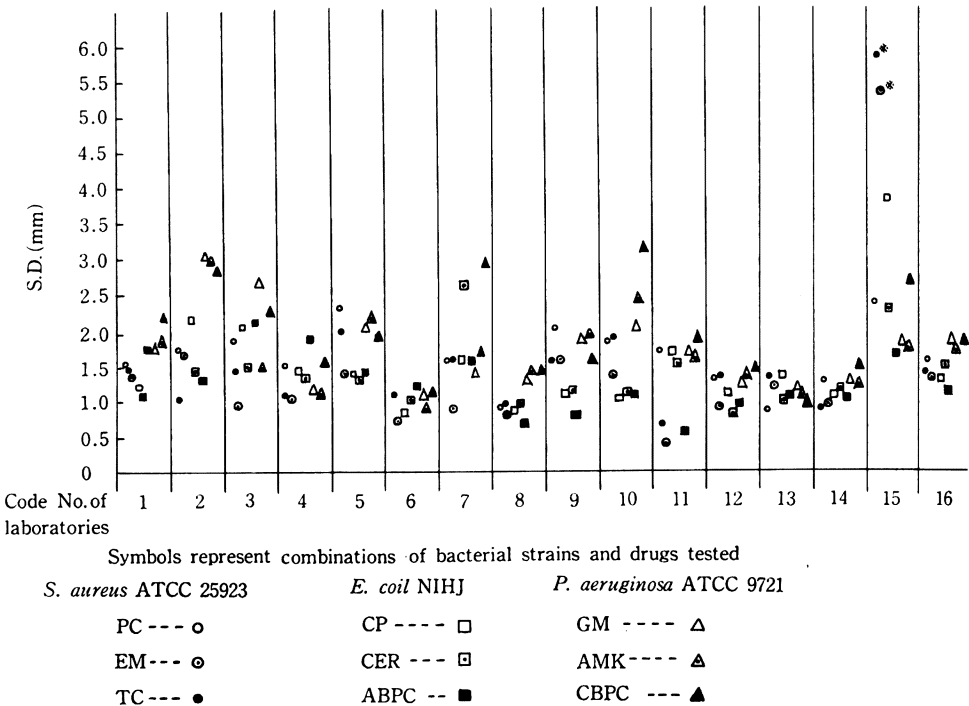


Fig. 3-3

Fig. 4 distribution of S.D. of inhibition zone diameters (mm) at every 16 laboratory



\* Excluded by SMIRNOFF's rejection-test formula

Table 5 Factorial analysis of the differences between 2-times repeated zone-readings, the range R

Factor		S. S.	D. F.	V.	$F_s$	$F_o$
Drug	A	12. 6931	9-1= 8	1. 5866	2. 6697*	$F_{9,6} = 2.12$
Strain	B	4. 6931	3-1= 2	2. 3466	3. 9485*	$F_{9,6} = 3.15$
Technician	C	7. 3968	7-1= 6	1. 2328	2. 0744	$F_{9,6} = 3.12$
A × B		9. 5450	8×2=16	0. 5303	<1	
B × C		8. 7143	2×6=12	0. 7262	1. 2219	
C × A		32. 2699	6×8=48	0. 6723	1. 1313	
A × B × C		57. 0476	8×2×6=96	0. 5943		
A · B · C		132. 3598				

ramphenicol, No. 7 施設の Cephaloridine, No. 3 施設の Ampicillin, No. 2 施設の Gentamicin および Amikacin の計 5 件のみであった。バラツキの幅は *Staphylococcus aureus* の Penicillin G, *E. coli* の Chloramphenicol および *Pseudomonas* の Gentamicin, Amikacin, Carbenicillin で広く、一般に *Pseudomonas* においては測定値のバラツキが大きいことが推定された。

4) 16 施設間における標準偏差  $u$  の分布 (Fig. 4)

Fig. 4 は横軸に各施設 No. を示し、縦軸に各施設にお

ける 9 種薬剤について測定された S.D. ( $u$ ) の値を示した。この図を見ると、S.D. の小さい施設は 9 種薬剤のすべてに S.D. は小さい値を示し、S.D. の大きい施設は 9 種薬剤ともに各 S.D. は幅広く分布した。したがって施設間における測定規準, end-point のとりかたが一定になるような対策を講ずる必要があると考えられた。

4. 7 名の技師による同一平板の 2 回ずつの測定値の差に関する要因分析 (Table 5)

*E. coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* の臨床分離新鮮株について、9 種薬剤につき感受性検査



を行ない、同一平板を7名の技師が測定し、さらに2時間後に同じ7名が再び測定し、各人の2回の読みとり間の差について要因分析を行なった。

その結果、薬剤による差および菌株による差は5%の危険率で有意であり、技師間の差は有意とはいえない。またそれぞれの交互作用はいずれも有意とは認められなかった。

次いで薬剤の水準差の有意限界の検定を行なった結果、Nalidixic acid, Chloramphenicol, Amikacin, Carbenicillin において2回の読みとりの差が大きく、Gentamicin, Tetracycline, Kanamycin, Ampicillin においては小さく、統計的には Nalidixic acid における差に比べて Gentamicin, Tetracycline, Kanamycin の差は有意に小さいということができた。また菌種間の差の有意性の検定においては、*Proteus* における差は他の菌よりも有意に大きいという成績であった。

### III. 考 察

日本における感染症の原因菌の各種抗生剤に対する耐性度の変遷を、年次推移として記録に残すためには、臨床検査室で一般に広く行なわれている感受性ディスクによる感受性検査の成績はできるだけ精度の良いものでなければならない。

ディスク法の精度管理については日本医師会主催で昭和48年以来毎年行なわれてきたが、昭和56年度臨床検査精度管理調査結果の概要<sup>3)</sup>によれば、1濃度ディスクを使用した615施設の成績が、同一菌株における同一薬剤の耐性度において、(卅)44.7%、(廿)49.7%、(+)と(-)が12.1%と大きなバラツキを示したのも認められた。

また臨床病理学会微生物専門委員会報告<sup>4)</sup>によれば、委員会より配布された菌株の阻止円直径測定値が、Kirby-Bauerの最大許容標準偏差を超えた値を示したものは、全測定数89のうち49で55%を超えるという結果を示したという。しかし、これらの精度管理においては誤差要因としてあげられる使用培地およびディスク、接種菌量などが各施設によりまちまちであり、さらに $\beta$ -lactam 剤に二重リングを示す傾向のある標準菌株が使用されているなどのために、阻止円直径読みとりの誤差については明らかでない。これらの要因をできる限り一定にしようとして各施設間の阻止円直径の読みの誤差を検討することは、ディスク法の精度の向上および信頼度を高める一助になるものと考え、本研究会においては、同一Lotの培地およびディスクを用いて、接種菌量を一定にし、ゲラチンディスクの標準菌株を用いて、阻止円直径読みとりの誤差について検討を行なった。

実験1においては、*Staphylococcus aureus* 209Pと

*E. coli* NIHJを使用し、参加9施設の阻止円直径測定値と、1施設の5名の技師の各繰返し測定値を比較した場合に、*E. coli* では各薬剤における測定値の最大と最小の差が9施設間では6~9mm、1施設間では3~7mmと大差は認められないにもかかわらず、*Staphylococcus aureus* 209Pでは前者では9~17mm、後者4~6mmと両者間の精度に大きな開きが認められた。これは *Staphylococcus aureus* 209P 株は阻止円の境界がやや不明瞭で、不完全阻止帯が生ずるため施設により end-point の位置の定め方が一定していないために生ずる誤差と考えられ、*E. coli* の場合のように阻止円境界が明瞭な場合には施設間の測定誤差は極めて小さく満足すべき精度を示した。

また実験3において、16の施設において60回の繰返し実験を行なった場合に、1濃度法に慣れていない1施設において S.D. 5.79mm と著しくかけ離れた大きな値を示したが、これは end-point のとり方が一定していないためと考えられ、臨床分離株においても、往々にして不完全阻止帯を示す株に遭遇するため、阻止円直径の測定については十分な注意と習練が必要であるとともに、施設間においても測定点が一致するような措置がとられなければならない。

不完全阻止帯を示す場合の end-point は、金沢<sup>5,6)</sup>が示しているように、100% 発育阻止の一步外側の点で、集落形成により明らかにリングとしてとどれる内側点を測定点とするという方法をさらに周知徹底しなければならない。

ディスク法における阻止円直径の測定基準は必ずしも国際的に統一されていないが、WHO グループで ERICSSON & SHERRIS<sup>7)</sup> は、発育阻止境界に幅のある場合は、ごく薄い菌の発育を無視した80% 発育阻止を end-point とすると述べているので、金沢による1濃度法の測定規準はこれらの意見にもほぼ一致するものと考えられる。

実験2においては、同一施設内で測定規準が同じになるよう習練された6名の技師が、*Serratia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* の標準株を用いて、数種薬剤につき7回行なった繰返し測定の結果、菌株により、また薬剤ディスクの種類により、特にバラツキが大きくなるものがあることが推定された。

実験3においては、日本各地の16施設(1濃度法を日常検査としては採用していない施設も含む)が参加し、1施設1名の技師が、特に精度管理のために選定された標準株について、1日1回ずつ約50回測定した結果について、その標準偏差を検討した。その結果は、16施設の S.D. の平均が9種薬剤において1.23~1.97mm

の間に分布し、良好な成績を示した。

しかし 16 施設間の S.D. の幅を比較すると、9 種薬剤すべてに対して S.D. の小さい施設は小さく、大きい施設は大きい値を示している (Fig. 4) ということは、1 濃度法に慣れていない施設も習練を積むことによりさらに S.D. は小さくなることが予想され、end-point のとり方を一定にすることにより、1 濃度法の薬剤感受性測定結果は、充分信頼するに値する結果が得られるであろうことを知った。

さらに実験 4 では、臨床分離株を用いて、同一施設の 6 名の技師が 2 回ずつ測定した 2 回の読みとり間の差より、要因分析法により有意性の検定を行なった結果、薬剤間、菌株間の差は 5% の危険率で有意であるが、技師間の差は有意とは認められないことが統計的にも証明された。

従来 1 濃度ディスク法による薬剤感受性結果の信頼性については、創始者金沢らの検討<sup>9)</sup>では、ある程度希釈法に代用される可能性がある精度を示すとの結果が報告されているにもかかわらず、各施設間の精度管理データの集計では良好な精度を示しているとはいえない状況である。今回 1 濃度法を 25 年以上実施している施設から、日常検査としてはこれを採用していない施設まで、さまざまな経験年数の施設により、阻止円直径測定のバラツキを検討した結果、使用培地およびディスクの品質が一定で、接種菌量などの実施法を正しく行なうことにより、阻止円直径測定の読みとり誤差の S.D. は極めて小さいものとなしうるものであり、日常の臨床検査における 1 濃度法の結果は充分信頼しうるにたるものとなるはずであるといえることができる。

なお、今回の共同実験のように、菌株、培地、ディス

クの品質を一定にし、検査技師間の読みとり技術を習練によって安定化したうえでなおかつ測定値のバラツキがある程度大きいのは、菌株により不完全発育阻止帯の幅が広いものがあることに起因する避けがたいものである。

終りに臨み、統計的処理に関し、御懇切な御指導をいただいた高橋正博士に深甚の謝意を表します。

本実験に際し、感受性ディスク用培地および感受性ディスク“昭和”の提供を受けた日本製薬株式会社に感謝します。

#### 文 献

- 1) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 (日本化学療法学会標準法)。Chemotherapy 16 : 98, 1968
- 2) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29 : 76~79, 1981
- 3) 昭和 56 年度 (第 15 回) 臨床検査精度管理調査結果の概要。日本医師会雑誌, 87 : 1491~1497, 1982
- 4) 日本臨床病理学会微生物部門標準委員会：ディスク法感受性検査の精度管理。臨床病理 29 : 379~386, 1981
- 5) 金沢 裕：感受性ディスク法の基礎と臨床。メデイヤサークル 19 : 217~222, 1974
- 6) 金沢 裕：ディスクによる細菌感受性試験、特に阻止円形成とその形状をめぐって。検査と技術 5 : 337~340, 1977
- 7) ERICSSON, H. M. & J. C. SHERRIS : Antibiotic sensitivity testing (Report of an international collaborative study). Acta Pathologica et Microbiologica, Scandinavia, Section B 1971, Supplement No. 219, Munksgaard, Copenhagen 1971
- 8) 金沢 裕, 倉又利夫：感受性ディスク法の測定精度について。Chemotherapy 16 : 847~857, 1968

## A STUDY ON VARIATION OF DIAMETERS OF INHIBITION ZONE IN SINGLE-DISC METHOD

FUKA OSADA

Tokyo Women's Medical College Hospital

YUTAKA KANAZAWA

Toyosaka Hospital

NOBUTAKA OSAWA

Kitazato University

TATSUYOSHI KAWAKITA

Tokai University Hospital

HIROSHI TANAMI

Gunma University Hospital

KENJI HARADA

Gunma Prefectural Association of Public Health

AKIO KOBAYASI

Chiba University Hospital

TATSU MUKOJIMA

National Cancer Center Research Institute

KEIICHIRO JYO

Denka Institute of Biological Science

MASAO NAKAMURA

St. Marianna University School of Medicine

TAKATO YOSHIDA

Hamamatsu University School of Medicine

YOSHIO AOKI

National Children's Hospital

NOZOMU KOSAKAI

Juntendo University School of Medicine

TATSUO NAGAI

Sapporo Medical College Hospital

RYODO WASHIZU

Kyoto Prefectural University of Medicine

KAZUE KASAHARA

Okayama Saiseikai General Hospital

(Commission on Drug-sensitivity Test, Chief: SUSUMU MITSUHASHI)

The variation in inhibition zone diameters was investigated when measured by the disc method using the same strain, disc and lot delivered to various laboratories.

1) Repeated experiments on *Staphylococcus aureus* 209 P and *Escherichia coli* NIHJ as the standard strains were performed using 9 drugs in 9 laboratories ording to the results obtained, width of variation shown as S.D., was 1.76~3.19 mm for *Staphylococcus aureus* 209 P and 1.26~1.97 mm for *Escherichia coli* NIHJ.

According to the results of measurement carried out by 5 persons in one laboratory, S.D. was 0.10~1.96 mm for *Staphylococcus aureus* 209 P and 0.94~1.80 mm for *Escherichia coli* NIHJ, indicating a narrower width than the above results.

2. In the experiments on 2 strains each of *Serratia*, *Klebsiella* and *Pseudomonas* as the standard strains, *Pseudomonas* in species and tetracycline, chloramphenicol, nalidixic acid and gentamicin in drugs showed a wide range of S.D..

3) Variation in 16 means obtained in about 50 each experiments repeated by one person each in 16 laboratories was almost reasonable. S.D. 1.13~1.97 mm. In addition, variation in the mean obtained by 6 persons in one facility was S.D. 0.09~0.30 mm. The results indicate that measurement error was extremely small in highly trained individuals under defined criteria of measurement.

4) As to the values obtained by measuring the inhibition zone. diameters on the same agar plate twice each by 7 persons in one laboratory significance of difference among drugs, strains or individuals was analyzed by the factor analysis. As a result, it was proved statistically that difference among drugs or strains was significant at 5% risk, but difference among individuals was not considered significant.