Viable Bacterial Numbers 算定の際に起る 稀釈誤差の評価について

東 村 道 雄 中 村 栄 一

国立療養所大府荘

[受付：4月30日・1958年]

緒 言

任意の菌液に含まれる生菌数(生育可能菌数)を算定するには、(1) 先ずその菌液を適当な濃度に稀釈し、(2) 次にその稀釈液の一定量を所定の培地に等量接種して培養し、一定時間後に集落数を算える操作がなされる。従つて、この方法で得られた生菌数の平均値に関する測定誤差は(1) よりする稀釈誤差と(2) よりする分布誤差の2要素からなり、総誤差は、これら2要素の平方の和の平方根として与えられる¹⁾²⁾。後者の分布誤差は一定量を接種する際に起る集落数の変動であつて、各観測値(各平板または各試験管の集落数)の標準偏差として容易に直接計算できる。しかし前者の稀釈誤差は実際に測定されることなく、Jennison & Wadsworth¹⁾の理論値を以て代えるのが普通である(例えば文献3)。しかし、このJennison & Wadsworthの値(稀釈標準偏差として掲げてある)を以て、直ちに稀釈標準偏差として用いて総偏差を計算することは妥当ではない。何故なら、この場合の稀釈誤差とは菌液を稀釈する際に起る生菌数の変動であるから、稀釈誤差自体が既に容量の変動と生菌数分布の変動と云う2要素から成る筈である*。単に pipetting の際の容量の変動だけによるものではない。しかるに Jennison & Wadsworth の値は稀釈誤差を単に pipetting の際に容量変動だけによるとみなして計算されているから、明かに実際よりも過少な値であり、従つて此を用いて計算した総誤差も実際に起る総誤差より過少なものとならざるを得ないであろう。

従つて、稀釈誤差を実測して Jennison & Wadsworth の値と比較することが必要と考えられる。そのためには先ず稀釈誤差測定の計算式を導くことが必要なので、ここではそれを行うことにした。

稀釈誤差の計算式

今任意の菌液を 10^{-m} まで稀釈することとし、 10^{-m} 稀釈液を*i*組作つたとする。そして各組の 10^{-m} 稀釈液の一定量(*a* cc)を*j*本の試験管(または平板培地)に接種し、一定時間培養して集落数を算定したとする。得られる観測値の数は*i*×*j*であつて、その各々を x_{ij} で表わすことにする。

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

$$\text{全組の観測値の総平均値 } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^i \bar{x}_i}{i}$$

従つて、もとの菌液の一定量(*a* cc)に含まれる生菌数の平均値は、 $\bar{x} \times 10^m$ となる。この際、各組の平均値 $\bar{x}_i$ を求める際の誤差は分布誤差だけに関与しているが、総平均値 $\bar{x}$ を求める際の誤差は分布誤差と稀釈誤差の両方から成る。従つて、 $\bar{x}$ 測定の際の総標準偏差を*S*と仮定すれば、次式が成り立つ(Jennison & Wadsworth¹⁾)。但し*S*_{dis}は分布標準偏差、*S*_{dil}は稀釈標準偏差である。

$$S^2 = (S_{dis})^2 + (S_{dil})^2 \dots \dots \dots (1)$$

この内、分布標準偏差*S*_{dis}は次の式(2)によつて与えられる。

各組の平均値 $\bar{x}_i$ を得るためには、同一稀釈液の一定量を*j*本の試験管に接種したので、 $\bar{x}_i$ についての標準偏差*s*_iは分布標準偏差であつて次式により与えられる。

$$(s_i)^2 = \frac{\sum_{j=1}^j (\bar{x}_i - x_{ij})^2}{j-1}$$

TSUKAMURA Michio & NAKAMURA Eiichi: Evaluation of the dilution error involved in estimating viable bacterial numbers. The Obuso National Sanatorium, Obu, Chita, Aichi.—Jap. J. of Bact., 13(10), 916-918, 1958.

S_{dis} は i 個の全標本からの分散の同時不偏推定値に他ならないから次式により与えられる。

$$(S_{dis})^2 = \frac{(j-1) \sum_{i=1}^j (s_i)^2}{ij-i} = \frac{\sum_{i=1}^j (s_i)^2}{i} \dots\dots\dots (2)$$

次に、分散 $(S_i)^2$ を任意の稀釈列 i の各測定値、 $x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ij}$ にたいする総平均値 $\bar{x}$ の分散と仮定すれば、

$$(S_i)^2 = \frac{\sum_{j=1}^j (\bar{x} - x_{ij})^2}{j-1} \dots\dots\dots (3)$$

次に、 S^2 は i 個の全標本からの分散の同時不偏推定値に他ならないから、 S^2 は次式により与えられる。

$$S^2 = \frac{(j-1) \sum_{i=1}^j (S_i)^2}{ij-i} = \frac{\sum_{i=1}^j (S_i)^2}{i} \dots\dots (4)$$

式(3)の S_i を式(4)に代入するに当つて、式(3)を次のように書き換えて計算を容易にする。すなわち、 $\bar{x} - x_{ij} = d_i$ とおけば、 $\bar{x} = x_{ij} + d_i$ となる。この $\bar{x} = x_{ij} + d_i$ を式(3)に代入すると次の如くなる。

$$(S_i)^2 = \frac{\sum_{j=1}^j (\bar{x} + d_i - x_{ij})^2}{j-1} = \frac{\sum_{j=1}^j \{(\bar{x} - x_{ij}) + d_i\}^2}{j-1}$$

$$= \frac{\sum_{j=1}^j (\bar{x} - x_{ij})^2}{j-1} + \frac{2d_i \sum_{j=1}^j (\bar{x} - x_{ij})}{j-1} + \frac{j(d_i)^2}{j-1}$$

ここに、

$$\frac{\sum_{j=1}^j (\bar{x} - x_{ij})^2}{j-1} - (s_i)^2, \quad \sum_{j=1}^j (\bar{x} - x_{ij}) = 0$$

であるから、上式は次のようになる。

$$(S_i)^2 = (s_i)^2 + \frac{j(d_i)^2}{j-1} = (s_i)^2 + \frac{j(\bar{x} - \bar{x}_i)^2}{j-1} \dots (5)$$

式(5)の $(S_i)^2$ を式(4)に代入すれば、

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^j (s_i)^2}{i} + \frac{j \sum_{i=1}^j (\bar{x} - \bar{x}_i)^2}{i(j-1)} \dots\dots\dots (6)$$

式(6)の右項の左は $(S_{dis})^2$ に他ならない。従つて、式(6)と(2)を式(1)に代入すれば、稀釈標準偏差 S_{dil} は次式(7)によつて与えられる。

$$S_{dil} = \sqrt{\frac{j \sum_{i=1}^j (\bar{x} - \bar{x}_i)^2}{i(j-1)}} \dots\dots\dots (7)$$

従つて、総平均値 $\bar{x}$ と各組の平均値 $\bar{x}_i$ とを求めれば、稀釈標準偏差 S_{dil} を計算できる。

生菌数の信頼限界の計算式。

(1) 多数の稀釈列を作る場合。

この場合は上記の計算式の場合に他ならないから、稀釈標準偏差を上述の式(7)により計算し、 $(1-\alpha) \times 100\%$ 信頼限界を次式によつて得る。

$$(\bar{x} \pm \sqrt{(A)^2 + (B)^2} \times 10^m.$$

但し、

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

$$B = t(i-1, \alpha) \times (S_{dil}) \times \frac{1}{\sqrt{i}}$$

t は Student の t で、実際的には $t(ij-1, \alpha)$ と $t(i-1, \alpha)$ とは近似であるから、上式は次の如くかき換えられる。

$$\left\{ \bar{x} \pm t(i-1, \alpha) \times \frac{1}{\sqrt{i}} \times \sqrt{\frac{\sum (s_i)^2}{ij} + (S_{dil})^2} \right\} \times 10^m.$$

(2) 唯一つの稀釈列を用いる場合。

実際的には多数の稀釈列を作つて毎回 S_{dil} を実測することは困難であるから、予め測定した S_{dil} の平均値 $\bar{x}$ にたいする比 D を算出して置いて、これを稀釈標準偏差の代りに用いることが便利である。

今任意の菌液を 10^{-m} まで稀釈し(稀釈列は1組)、 10^{-m} 稀釈液の一定量 (a cc) を n 本の培地に接種し、平均集落数 $\bar{x}$ を得たとすれば、原菌液 a cc 中に含まれる生菌数の平均値は、 $\bar{x} \times 10^m$ であつて、その $(1-\alpha) \times 100\%$ 信頼限界は次式により与えられる。

$$(\bar{x} \pm s \times t(n-1, \alpha) / \sqrt{n}) \times 10^m \times (1 \pm 1.96D)$$

ここで、 $(\bar{x} \pm s \times t(n-1, \alpha) / \sqrt{n})$ は、 n 本の培地から得た観察値(集落数)から平均値 $\bar{x}$ を得る際の分布誤差に関する $(1-\alpha) \times 100\%$ 信頼限界である。 s は標準偏差、 t は Student の t である。 $(1 \pm 1.96D)$ は 10^m を乗じるに当つての稀釈誤差に関する信頼限界を与えるために乗じたものである。 D は前述のとおり、 $D = S_{dil} / \bar{x}$ によつて与えられる数値で予め測定した値を用いる。 D に 1.96 を乗じたのは D に 95% 信頼限界を与えるために乗じたのである。従つて t も $t(n-1, 0.05)$ を取ると都合がよい。

実 測 例

D の実測値を参考として表にあげておく。この D は次の条件で測定した。培地として 1% 小川培地斜面、被検株として人型結核菌青山 B 株、稀釈液として生理的食塩水を用い、渦巻白金耳接種法によつた(文献 7, 8 参照)。稀釈列の数は駒込ピペット法で 20 組 ($i=20$)、メスピペット法で 10 組 ($i=10$) である。

稀釈標準偏差の実測値と理論値の比較
(稀釈標準偏差は平均値にたいする比 (本文の
 $D=Sdii/\bar{x}$ として表わした)

稀釈度	駒込ピペット法		メスピペット法	
	実測値	理論値*	実測値	理論値*
10^{-1}	0.266	0.032	0.271	0.014
10^{-2}	0.298*	0.063	0.526	0.028
10^{-3}	0.331	0.095	0.685	0.042
10^{-4}	0.360*	0.127	0.702	0.057
10^{-5}	0.386	0.158	0.755*	0.071
10^{-6}	0.420	0.190	0.768	0.085

* Jennison and Wadsworth による (本文参照)。

* 実測によらずに、他の測定値からの作図によつて得た値。

(A) 駒込ピペット法。

標準偏差約0.08ccの2 cc駒込ピペットを用いて、2 cc 4回と1 cc 1回の計量により9 cc blank を、1 cc 1回の計量により1 cc採取を行つた。従つて9 cc計量の際の標準偏差は、 $0.08 \text{ cc} \times \sqrt{5} \approx 0.07 \text{ cc}$ と推定され、先ず0.1ccを越えないと考えられる。比較のために掲げた値は Jennison & Wadsworth の表の9 cc blank にたいして標準偏差0.1cc、1 ccにたいして標準偏差0.08ccの場合の理論値を掲げた。表のように実測値は理想値よりはるかに大きいと云う予想通りの結果が得られた。

(B) メスピペット法。

標準偏差0.1ccの10ccメスピペットにより9 cc blank を作り、標準偏差0.01ccの1 ccメスピペットによつて1 ccを取つた。この10進法を行つた場合の実測値は Jennison & Wadsworth の理論値より遙かに大きいことは予想の通りである。注目されることは、(A)の駒込ピペット法の方が(B)のメスピペット法よりも容量計測の変動が大きい筈であるにもかかわらず、稀釈標準偏差の実測値が逆に小さくなったことである。これは稀釈誤差が単に容量計測の変動によるよりも、むしろ菌の分布の変動に由来する処が大きいことを裏書きするものであると解される。駒込ピペット法で却つて小さい稀釈標準偏差が得られたことは、より攪拌が容易なために菌の分散をより均一ならしめ得たためではないかと想像される。

(* 補) 細菌細胞の分散状態が理想的均一なものであれば、単に容量の誤差だけが稀釈に際して起ると考えてよいから、Jennison & Wadsworth の理論値をそのまま稀釈誤差として用いて総誤差を計算しても適正な値が得られる筈である。しかし実際には菌液が理想的な分散状

態にあることは考え得ないので、実際の稀釈誤差は単に容量計測の変動だけでなく、菌分布の変動をも含む筈である。従つて Jennison & Wadsworth の表に示された値をそのまま稀釈標準偏差として用いれば、実際に稀釈に際して起る誤差よりも小さい誤差を代入することになる。例をあげれば、もし標準偏差0の理想的メスピペットを用い得たとしても、 $10^3/\text{cc}$ の生菌数を含む10ccの菌液から1 ccをとる場合に、とりあげた1 cc中に正確に 10^2 の生菌が分布することは考え得ないだろうと云うことである。この例を考えれば、容量計測の誤差だけを以て稀釈誤差とすることが不当であることが考えられよう。

総 括

生菌数算定に際して起る稀釈誤差測定 of 計算式を提出した。任意の菌液から 10^{-m} 稀釈列を i 組作り、各稀釈液の一定量 (a cc) を j 個の培地に接種して、各組の集落数平均値を $\bar{x}_i$ 、全部の培地の集落数平均値を $\bar{x}$ とすれば、稀釈標準偏差 $Sdii$ は次式によつて与えられる。

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

(御校閲を受けた勝沼六郎君に感謝の意を表する)。

文 献

- 1) Jennison, M. W., and Wadsworth, G. P.: Evaluation of the errors involved in estimating bacterial numbers by the plating method. J. Bact., 39: 389-397, 1940.
- 2) Fenner, F.: The enumeration of viable tubercle bacilli by surface plate counts. Am. Rev. Tuberc., 64: 353-380, 1951.
- 3) Sever, J. L., and Youmans, G. P.: The enumeration of nonpathogenic viable tubercle bacilli from the organs of mice. Am. Rev. Tuberc., 280-294, 1957.
- 4) Bennett, C. A., and Franklin, N. L.: Statistical Analysis in Chemistry and the Chemical Industry. New York, 1954, John Wiley and Sons. (丸善)。
- 5) Davies, O. L.: Statistical Methods in Research and Production. London, 1949, Oliver and Boyd.
- 6) Stearman, R. L.: Statistical concepts in microbiology, Bact. Rev., 19: 160-215, 1955.
- 7) 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, 32: 639-642, 1957.
- 8) 東村道雄, 野田用, 中村栄一: 同第2報, 結核, 33: 43-46, 1958.