

URISYS 2400 尿自動分析装置の 反射率レンジの検討

三浦 雅史*¹, 天野 千夏*¹, 木村 正弘*²,
仁井 忠*³, 藤村 和代*⁴, 高橋 勝幸*²

*1 シスメックス株式会社 学術本部：神戸市西区室谷 1-3-2 (〒 651-2241)

*2 日本大学医学部附属板橋病院 臨床検査部

*3 奈良社会保険病院 中央検査部

*4 奈良社会保険病院 健康管理センター

SUMMARY

URISYS 2400 尿自動分析装置（以下、URISYS 2400；シスメックス社）は、尿化学定性分析あるいは半定量分析のための尿自動分析装置である。今回、日本臨床検査標準協議会（JCCLS）尿試験紙検討委員会により進められている試験紙標準化への適応を目的とし、URISYS 2400 の蛋白項目について現在の反射率レンジの検証、および再検討を実施した。その結果より、ロット間差や溶媒間差の影響を考慮し、(±)、および(1+)の反射率閾値を現状より1.5%上方に修正することで、定量値との相関性が向上した。

Key Words URISYS 2400, 反射率レンジ, 尿蛋白, 尿定性試験紙

はじめに

尿定性・半定量試験紙法は、簡便かつ迅速に多項目の生化学検査情報を得ることができ、腎疾患や感染症などのスクリーニング検査として大きな役割を果たしている。しかし試験紙の目視による判定においては、①個人差が生じやすい、②判定する環境により結果が異なる、③判定時間を規定通りに厳守しなければ結果が異なる、などの誤差要因が存在する¹⁾。

URISYS 2400 尿自動分析装置（以下、URISYS 2400；シスメックス社）は、尿化学定性分析あるいは半定量分析のための尿自動分析装置であり、主に病院の検査室や健診センターなどで広く使用されている。尿定性検査の自動化では上記のような目視の際に生じる誤差要因を縮小し、常に客観的な測定結果を提供することが可能である。

しかしながら、従来は使用する試験紙について判定結果の表示方法に一定の基準がなく、そのため項

目によっては表示値に大きなメーカー間差が生じていた²⁾。そこで、日本臨床検査標準協議会（JCCLS）尿試験紙検討委員会により試験紙の表示方法の統一化について検討がなされ、結果の表示方法は濃度表示が望ましいとの指針が示された³⁾。そして定性値と濃度表示の関係は、尿蛋白は30mg/dL、尿ブドウ糖は100mg/dL、尿潜血は0.06 mg/dLを(1+)とするよう提言され、現在ではすべての試験紙、自動分析装置が(1+)の標準化に対応している。今後さらに、(±)についてもJCCLSにより標準化が進められる予定であり、それと同時に試験紙の表示結果と実際の濃度の統一性についても検討が必要と考えられる。

そこで、URISYS 2400 について、(±)の試験紙標準化の方法を試み、蛋白項目における現在の反射率レンジを検証した。そして試験紙のロットや溶媒の違いにより反射率が異なる傾向を示すことを踏まえ、反射率レンジの再検討を実施したので報告する。

材料および方法

1. 試験紙のロット間差の検証

複数ロットの試験紙を用いて URISYS 2400 にて蛋白添加試料を測定し、反射率を比較した。各種濃度試料 (15, 30, 50 mg/dL) は、TP 標準液 (Lot: S7001; シスメックス社) を生理食塩水に添加し調整した。この TP 標準液中に存在する蛋白はアルブミンのみである。試験紙は、URISYS 2400 専用試験紙 (URISYS 2400 カセット Lot: 23002101, 23004301, 23009001, 23011201, 23013401; シスメックス社) を使用した。各濃度を3重測定し、反射率の平均値を求めた。

2. 添加試料間差の検証

添加試料に m-ALB 標準物質 (Lot: 061222; シスメックス社) を用いた蛋白添加試料を URISYS 2400 にて測定し、1. の反射率結果と比較した。各種濃度試料 (0, 15, 30 mg/dL) は m-ALB 標準物質を生理食塩水に添加して調整した。試験紙は、URISYS 2400 専用試験紙 (URISYS 2400 カセット Lot: 23002101, 23004301, 23009001, 23011201, 23013401) を使用した。各濃度を2重測定し、反射率の平均値を求めた。

3. 溶媒間差の検証

プール尿を溶媒とした蛋白添加試料を URISYS 2400 にて測定し、1. の反射率結果と比較した。健常男女6名の尿検体よりプール尿を作製し、生化学装置で蛋白定量測定を行った。測定結果より、既存蛋白濃度を考慮して最終理論濃度が2~500 mg/dLとなるよう TP 標準液 (Lot: S7001) を添加し試料を調整した。試験紙は、URISYS 2400 専用試験紙 (URISYS 2400 カセット Lot: 23009001, 23011201, 23013401) を使用した。各濃度を2重測定し、反射率の平均値を求めた。

4. 患者尿を用いた反射率レンジの再検討

日本大学医学部附属板橋病院で採尿された患者尿641検体を対象とし、URISYS 2400 にて測定を行った。その後、同検体について生化学装置による蛋白定量検査を行い、得られた反射率データと定量結果より反射率レンジの閾値を検証した。試験紙は、URISYS 2400 専用試験紙 (URISYS 2400 カセット Lot: 23021501) を使用した。定量検査では、生化学分析装置に7170形日立自動分析装置 (日立ハイテクフィールディング社)、試薬に自動分析装置用試薬-AR ワコー マイクロ TP-AR: ピロガロールレッド-Mo 錯体色素法 (和光純薬工業社) を使用した。

5. 健診検体を用いた反射率レンジの検証

奈良社会保険病院で採尿された健康診断受診者尿186検体を対象とし、URISYS 2400 にて測定を行った。その後、同検体について蛋白定量検査を実施し、得られた反射率データ、および定量結果より、4. の再検討後に仮設定した反射率レンジの閾値を検証した。試験紙は、URISYS 2400 専用試験紙 (URISYS 2400 カセット Lot: 23017701) を使用した。定量検査では、生化学分析装置に ARCHITECT c8000 (東芝メディカルシステムズ社)、試薬に TP 試薬・K「コクサイ」: ピテカテコールバイオレット-Mo 錯体色素法 (シスメックス社) を使用した。

結果

1. ロット間差の検証

反射率は、15mg/dL では55.5~58.2%、30mg/dL では51.4~53.9%、50mg/dL では46.6~50.0%の値を示し、最大ロット間差は15mg/dLで2.7%、30mg/dLで2.5%、50mg/dLで3.4%であった (表1)。

表1. URISYS 2400 試験紙カセットにおけるロット間差

Lot No.	蛋白濃度		
	15mg/dL	30mg/dL	50mg/dL
23002101	55.5	51.4	46.6
23004301	58.1	53.9	50.0
23009001	56.6	52.6	49.0
23011201	58.2	52.7	48.1
23013401	57.7	52.7	47.7

2. 添加試料間差の検証

反射率は、15mg/dLではTP標準液：55.8～58.2%，m-ALB標準物質：55.5～58.2%，30mg/dLではTP標準液：50.7～53.4%，m-ALB標準物質：51.4～53.9%の値を示した。最大試料間差は15mg/dLで1.4%，30mg/dLで0.7%であった(表2)。

3. 溶媒間差の検証

プール尿を溶媒とした蛋白添加試料における蛋白濃度と反射率の相関を表3、および図1-a, bに示す。生理食塩水、およびプール尿における反射率の溶媒間差は、15mg/dLで2.4～3.9%，30mg/dLで1.6～2.3%，50mg/dLで0.2～1.2%となった(表4)。

表2. TP標準液とm-ALB標準物質の添加物質間差

Lot No.	蛋白濃度			
	15mg/dL		30mg/dL	
	TP標準液	m-ALB標準物質	TP標準液	m-ALB標準物質
23002101	55.8	55.5	50.7	51.4
23004301	58.2	58.1	53.4	53.9
23009001	56.6	56.6	52.5	52.6
23011201	56.8	58.2	52.0	52.7
23013401	57.3	57.7	52.7	52.7

表3. プール尿における蛋白濃度と反射率の相関

Lot No.	蛋白濃度 (mg/dL)													
	2	5	10	15	20	25	30	40	50	70	100	200	300	500
23009001	58.6	56.7	55.6	54.2	52.5	51.8	50.9	49.3	48.0	44.7	42.0	36.3	33.1	29.7
23011201	58.5	58.0	56.6	54.3	52.6	51.4	50.4	48.7	46.9	42.8	41.4	35.1	31.7	28.5
23013401	60.3	58.5	56.8	55.0	53.8	52.1	51.1	48.9	47.5	44.3	41.4	35.2	32.1	28.4

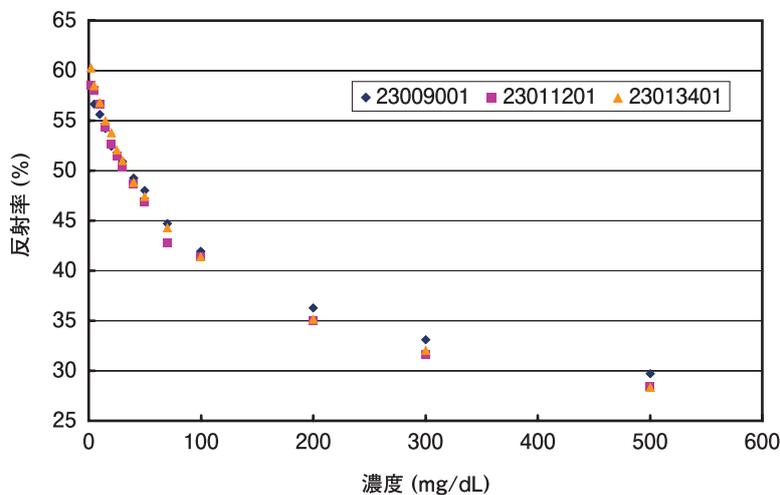


図1-a. プール尿における蛋白濃度と反射率の相関(高濃度領域)

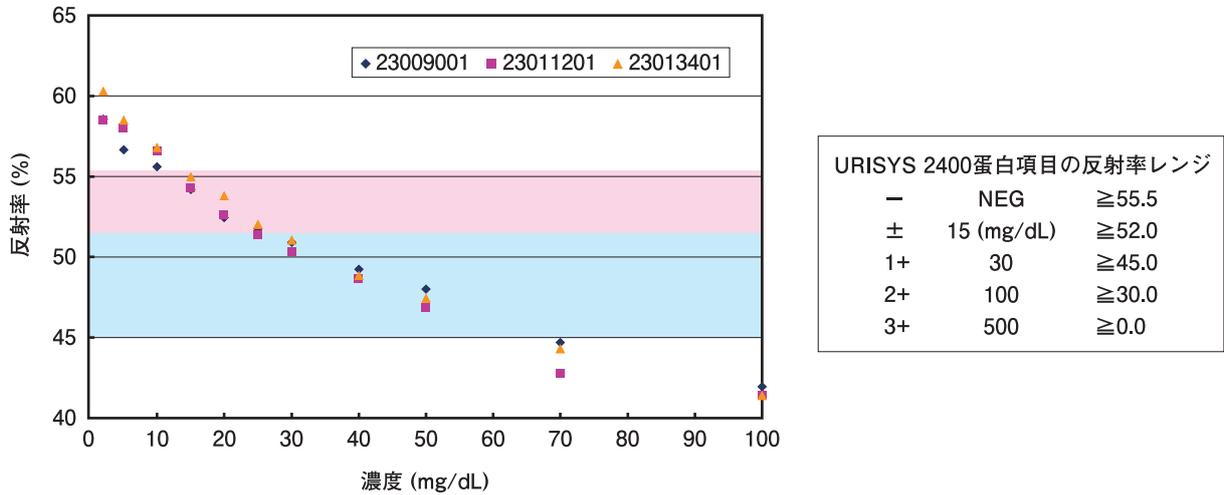


図 1 -b. プール尿における蛋白濃度と反射率の相関 (低濃度領域)

表 4. 生理食塩水とプール尿の溶媒間差

Lot No.	蛋白濃度					
	15mg/dL		30mg/dL		50mg/dL	
	生食	プール尿	生食	プール尿	生食	プール尿
23009001	56.6	54.2	52.6	50.9	49.0	48.0
23011201	58.2	54.3	52.7	50.4	48.1	46.9
23013401	57.7	55.0	52.7	51.1	47.7	47.5

4. 反射率レンジの再検討

患者尿検体を用いて尿蛋白定量値と URISYS 2400 の反射率を対比させた結果を示す (図 2-a, b)。蛋白定量値と URISYS 2400 における半定量値との一致

率は, URISYS 2400 表示値 (-): 0 ~ 14mg/dL のレンジで 97.3%, (±): 15 ~ 29mg/dL で 37.5%, (1+): 30 ~ 99mg/dL で 60.5%であった (表 5)。さらに, (-) と (±) の境界 (15mg/dL), (±) と (1+) の境界

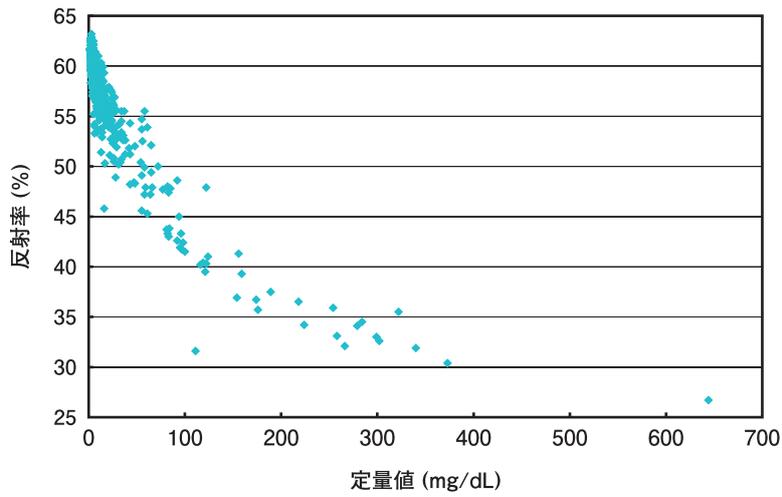


図2-a. 患者検体における蛋白定量値と URISYS 2400 反射率との相関（高濃度領域）

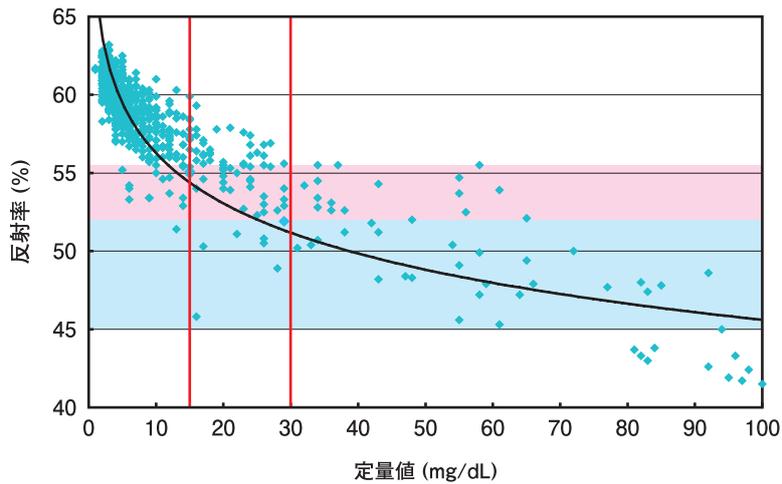


図2-b. 患者検体における蛋白定量値と URISYS 2400 反射率との相関（低濃度領域）

表5. 患者検体における蛋白定量値と URISYS 2400 半定量値との一致率

URISYS 2400表示値	蛋白定量値 (mg/mL)		
	0~14	15~29	30~99
— (0~14) mg/dL	503	38	3
± (15~29)	13	27	14
1+ (30~99)	1	7	26
2+ (100~499)			9

各蛋白濃度 (mg/mL) における一致率；

全体 86.7%
 0~14 (mg/mL) 97.3%
 15~29 (mg/mL) 37.5%
 30~99 (mg/mL) 60.5%

(30mg/dL)の両反射率閾値について、現状の閾値を0.5% 間隔で上方に変更した場合の陽性一致率と陰性一致率をそれぞれ算出し、ROC 曲線を作成した(図3, 4)。ROC 曲線より最適と考えられる反射率

閾値は、15mg/dL, 30mg/dLともに現状より1.5%上方の値となった。閾値を変更した場合の一致率は、(-)のレンジで90.3%, (±)で61.1%, (1+)で79.1%であった(表6)。

反射率	感度	特異度	1-特異度
55.5	0.925	0.895	0.105
56.0	0.946	0.848	0.152
56.5	0.96	0.794	0.206
57.0	0.971	0.733	0.267
57.5	0.98	0.645	0.355
58.0	0.99	0.568	0.432
58.5	0.992	0.51	0.49

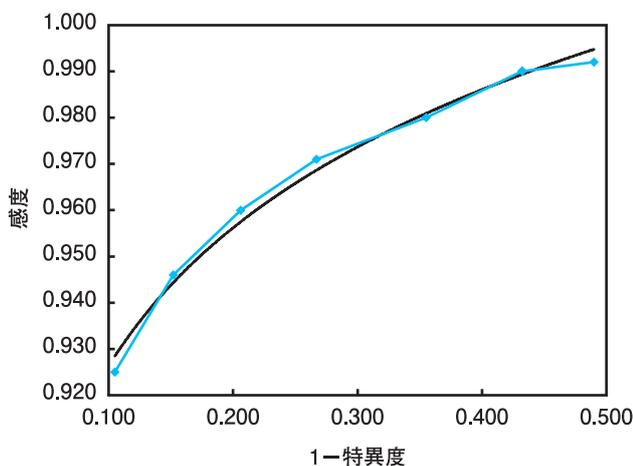


図3. 15mg/dL をカットオフ値とした際のROC 曲線

反射率	感度	特異度	1-特異度
52.0	0.972	0.886	0.114
52.5	0.975	0.877	0.123
53.0	0.983	0.829	0.171
53.5	0.984	0.777	0.223
54.0	0.988	0.758	0.242
54.5	0.991	0.712	0.288
55.0	0.995	0.673	0.327

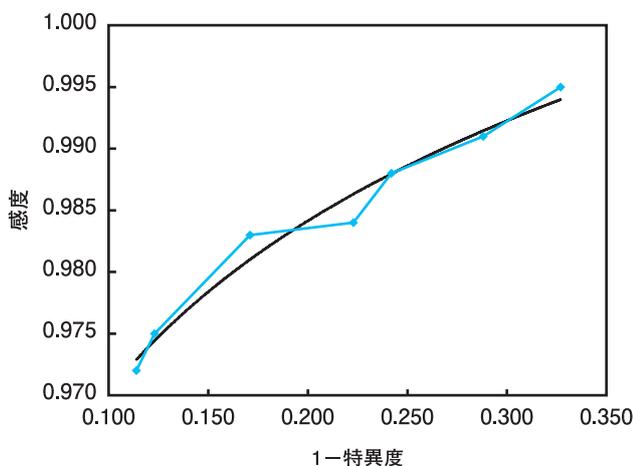


図4. 30mg/dL をカットオフ値とした際のROC 曲線

表6. 患者検体における蛋白定量値と URISYS 2400 半定量値との一致率(反射率修正後)

URISYS 2400表示値	蛋白定量値 (mg/mL)		
	0~14	15~29	30~99
- (0~14) mg/dL	467	14	0
± (15~29)	44	44	9
1+ (30~99)	6	14	34
2+ (100~499)			9

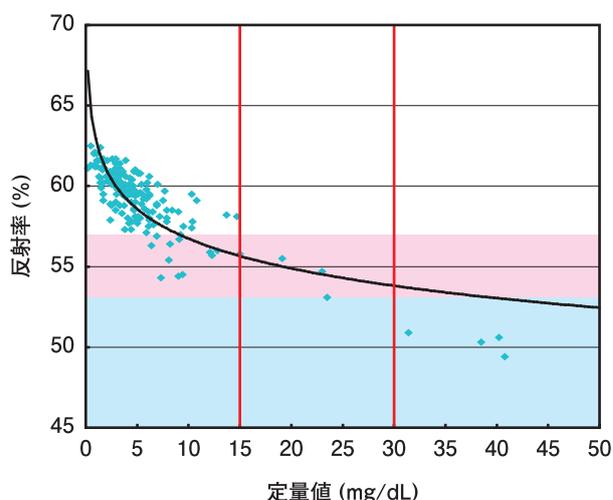
各蛋白濃度 (mg/mL) における一致率 ;

全体 85.0%
 0~14 (mg/mL) 90.3%
 15~29 (mg/mL) 61.1%
 30~99 (mg/mL) 79.1%

5. 変更後反射率レンジの検証

尿蛋白定量値と URISYS 2400 における反射率を対比させた結果 (図5), 一致率は URISYS 2400 表示値 (-): 0 ~ 14mg/dL のレンジで 97.7%, (±): 15 ~ 29mg/dL で 50.0%, (1+): 30 ~ 99mg/dL で 80.0%

であった (表7)。さらに 4. の再検討結果を踏まえ, 閾値を 1.5% 上方に変更した場合の一致率についても算出した (表8)。その場合の一致率は, (-) で 93.8%, (±) で 75.0%, (1+) で 80.0% であった。



-	NEG	≧57.0
±	15 (mg/dL)	≧53.5
1+	30	≧45.0
2+	100	≧30.0
3+	500	≧0.0

図5. 健診検体における蛋白定量値と URISYS 2400 反射率との相関 (低濃度領域)

表7. 健診検体における蛋白定量値と URISYS 2400 半定量値との一致率

URISYS 2400表示値	蛋白定量値 (mg/mL)		
	0~14	15~29	30~99
- (0~14) mg/dL	173	2	
± (15~29)	4	2	
1+ (30~99)			4
2+ (100~499)			1

各蛋白濃度 (mg/mL) における一致率 ;
 全体 96.2%
 0 ~ 14 (mg/mL) 97.7%
 15 ~ 29 (mg/mL) 50.0%
 30 ~ 99 (mg/mL) 80.0%

表8. 健診検体における蛋白定量値と URISYS 2400 半定量値との一致率 (反射率修正後)

URISYS 2400表示値	蛋白定量値 (mg/mL)		
	0~14	15~29	30~99
- (0~14) mg/dL	166	1	
± (15~29)	11	3	
1+ (30~99)			4
2+ (100~499)			1

各蛋白濃度 (mg/mL) における一致率 ;
 全体 93.0%
 0 ~ 14 (mg/mL) 93.8%
 15 ~ 29 (mg/mL) 75.0%
 30 ~ 99 (mg/mL) 80.0%

考 察

URISYS 2400 の蛋白項目について(±)の標準化への対応のため、各種検証により現在の反射率レンジの整合性を確認した。

試験紙のロット間差について検証した結果、ロットの違いにより反射率が異なる場合もあることが確認された。今回の検証において、同一試料における最大ロット間差は3.4%であった。試験紙のロット間差は以前より各メーカーで危惧されていたが⁴⁾、この結果はそれを証明するものとなった。そのため今回の反射率レンジの再検討では、ロット間差の問題も考慮し検討を実施した。

添加試料間差による検証では、分子量分布の異なるアルブミンの反応について検証した。試験紙法による蛋白測定ではアルブミンに対して特異性が高い²⁾。そこでアルブミンを主成分とするTP標準液とm-ALB標準物質を添加試料として用い、測定結果を比較した。m-ALB標準物質は、分子量や純度がJCCLS尿検査標準化委員会尿総蛋白測定作業部会の規格により定められており、両者の分子量分布は異なると考えられる。しかし結果に大きな差は認められなかったため、アルブミンの違いによる測定結果の変動は微小であると考えられた。

同様に、溶媒にプール尿、および生理食塩水を使用した場合の溶媒間差について検証を行った。プール尿では蛋白添加前に微量の蛋白が存在していることを考慮し、添加前に生化学装置による定量測定を行い、既存蛋白濃度を考慮したうえで試料の調整を行った。その結果、溶媒にプール尿を使用した場合は生理食塩水を使用した結果と比較して反射率は低値を示す傾向がみられ、溶媒の違いにより動態が異なることが示唆された。試験紙法による尿蛋白定性検査ではpH変化、共存陰イオン濃度の影響を受け、色素発色強度はpHの上昇に比例し、共存陰イオン濃度に反比例する^{5,6)}。今回の結果ではプール尿を使用した場合の方が反射率は低値を示しており、色素発色反応は促進している。この結果はpHの影響によるものと考えられ、事実、生理食塩水のpHは5.0であったのに対し、プール尿のpHは6.5～7.0であった。さらに報告によるとpHの影響は低蛋白

濃度領域の方がより大きいとされている。今回の結果も蛋白濃度が50mg/dLのときより15mg/dLにおける溶媒間差の方が大きいため、これに合致している。

以上の結果より、試験紙のロット間差、さらには溶媒間差の影響により、蛋白における反射率は異なる動態を示すことが認められた。現在のURISYS 2400反射率レンジは、従来機種であったSuper UA(製造元:日立製作所)の反射率との相関により設定されている⁷⁾。そのため上記の要素を考慮し、現状の反射率レンジを見直すことで、試験紙の表示結果と実際の濃度範囲の統一性を得る必要がある。そこで、尿検体を用いて現在の反射率レンジの再検討を行った。試験紙については事前に検証を行い、複数ロットの中で反射率がおよそ中間値を示すロットを使用した。これによりロット間差も包括した検討になると考えた。反射率と定量値を比較した結果、低濃度領域(0～99mg/dL)における尿蛋白定量値とURISYS 2400の定性値との一致率は、(-)では97.3%と良好な一致率を示しているのに対し、(±)では37.5%、(1+)では60.5%と低値傾向を示した。これは(±)から(1+)の領域においては、定量値と比較しURISYS 2400の反射率が低値を示したためである。

これを踏まえて、(-)と(±)の境界(15mg/dL)、(±)と(1+)の境界(30mg/dL)における最適な反射率閾値をROC曲線により求めた。その結果、それぞれの閾値を現状より1.5%上方に変更することで最も良好な一致率が得られ、(±)では37.5%から61.1%、(1+)では60.5%から79.1%へと大きく改善された。スクリーニング検査においては尿蛋白陽性検体を正確に検出することが重要であるため、変更後の反射率閾値の方がよりこの概念に合致していると考えられた。

以上より、患者検体群では現状の反射率を1.5%上方に変更することで一致率の改善が認められた。そこでさらに、健常検体における反射率閾値変更の影響を確認するため、奈良社会保険病院で健診尿検体を使用して同様の検証を行った。その結果、反射率閾値変更により(-)における一致率は97.3%から93.8%に低下した。さらに、閾値の変更前と変更後において陽性率(全検体中で±以上の検体が占める割合)を算出したところ、陽性率は変更前で6.42%

であったのに対し、変更後で11.23%となった。この陽性率の上昇は、(-)の結果であった検体が反射率レンジの上方修正により(±)の領域にシフトしたことに起因するものである。一般的に(±)の結果は陰性に近いものと判断し、経過観察とすることが多いため、反射率閾値変更による影響は少ないと考えられた。一方で、(±)から(1+)にシフトする検体は1検体のみであった。

今回は蛋白についてのみ検討を実施したが、これは蛋白とブドウ糖では濃度当たりの反応性が異なり、蛋白の方が小さい濃度変化でもより鋭敏にランクが変動するためである。そのため蛋白について優先的に実施したが、今後は必要性に応じてブドウ糖や潜血についても検討予定である。

結 語

今回我々はURISYS 2400の蛋白項目について、ロット間差や溶媒間差について検証し、さらに現状の反射率レンジの再検討を実施した。その結果、(±)、および(1+)の反射率閾値を現状より1.5%上方に修正することで、定量値とのより良い相関が得られた。

JCCLSの進める試験紙標準化において表示値の統一化のみでなく、表示結果と実際の濃度範囲の統一性も重要課題である。したがって今回の検討は、試験紙法の標準化対応にとって有意義であった。

参考文献

- 1) 伊藤機一. 尿試験紙による検査—なにを測るか, その測定原理, 診断的役割は—. 日本臨牀. 秋季臨時増刊号. 1985; 43: 581-606.
- 2) JCCLS尿検査標準化委員会 尿試験紙検討委員会(作業部会). 「尿試験紙検査法」JCCLS提案指針. 日本臨床検査標準協議会会誌. 2001; 16(2): 33-55.
- 3) JCCLS尿検査標準化委員会 尿試験紙検討委員会(作業部会). 「尿試験紙検査法」JCCLS提案指針(追補版)尿蛋白, 尿ブドウ糖, 尿潜血試験部分表示の統一化. 日本臨床検査標準協議会会誌. 2004; 19(1): 53-65.
- 4) 高橋勝幸. 現代の臨床検査に必要な基礎知識・技術(6): 尿・便一般検査. 医療と検査機器・試薬. 2008; 31(6): 665-676.
- 5) 鈴木優治. 試験紙法による尿タンパク質定性検査におけるpH変化による測定誤差. BUNSEKI KAGAKU. 2008; 57(9): 755-762.
- 6) Suzuki Y. Characteristics of a Protein Error in Determination of Serum Protein in the Presence of Inorganic Salt. Anal Sci. 2006; 22(2): 269-274.
- 7) 高橋勝幸 他. URISYS 2400 尿自動分析装置の検討—日本国内標準反射率レンジ設定の試み—. Sysmex J. 2003; 25: 81-94.

Evaluation of URISYS 2400 Automated Urine Analyzer for Japan Standard Range

Masashi MIURA^{*1}, Chinatsu AMANO^{*1}, Masahiro KIMURA^{*2}, Tadashi NII^{*3},
Kazuyo FUJIMURA^{*4} and Katsuyuki TAKAHASHI^{*2}

^{*1}Scientific Affairs, Sysmex Corporation, 1-3-2, Murotani Nishi-ku, Kobe 651-2241

^{*2}Department of Clinical Laboratory, Nihon University Itabashi Hospital

^{*3}Department of Clinical Laboratory, Nara Social Insurance Hospital

^{*4}Health Management Center, Nara Social Insurance Hospital

SUMMARY

URISYS 2400 (Sysmex) is an automated urine analyzer for semi-quantitative urine chemical analysis. In this study, we performed the verification and the reevaluation of present Japan standard range about protein parameter in URISYS 2400 for adjusting the reagent strip standardization progressing by Committee on Urinary Reagent Paper Testing, Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards (JCCLS).

We verified the difference of reflectance due to change of reagent strip lots and the solvent. And the modification of the cut off value in (\pm) and (1+) of Japan standard range above 1.5% in consideration of these result improved the concordance rate between results of URISYS 2400 and protein concentration.

Key Words URISYS 2400, Standard Range, Urine Protein, Urine Test Strip
