

# 尿路感染症患者由来尿を用いた 全自動尿中有形成分分析装置 UF-1000*i* による細菌種推定の可能性の検討

村谷 哲郎<sup>\*1, 2</sup>, 小林 とも子<sup>\*1, 2</sup>, 美那元 勇希<sup>\*1, 2</sup>, 生野 陽子<sup>\*2</sup>, 右田 忍<sup>\*2</sup>

\*1 株式会社キューリン 検査部：北九州市八幡西区森下町 27-25 (〒806-0046)

\*2 ひびき臨床微生物研究会

## SUMMARY

患者尿 208 検体を用いて、全自動尿中有形成分分析装置 UF-1000*i* (以下、UF-1000*i*; シスメックス社) による細菌数および細菌種の推定を培養同定試験と比較検討した。ドルガルスキー寒天培地または血液寒天培地による定量培養の結果と UF-1000*i* による細菌数測定の結果はほぼよい相関を認めたが、UF-1000*i* の方が 10 倍高い傾向を認めた。また、UF-1000*i* で  $10^4$  cfu/mL 以上と判定され、定量培養で菌の発育を認めなかった 16 例中 5 検体はグラム染色鏡検では陽性であり、この理由として抗菌薬の投与や使用した培地に発育しにくい細菌の存在が推定された。

UF-1000*i* の細菌チャンネルのスキャッタグラムの X 軸からの角度を、同定済み菌株の懸濁液を用いて測定したところ、グラム陽性球菌の角度は  $40^\circ$  前後、グラム陽性桿菌である *Corynebacterium* の角度は  $43^\circ$ 、グラム陰性球菌である *Neisseria gonorrhoeae* の角度は  $11^\circ$ 、グラム陰性桿菌は  $20^\circ$  前後に分布しており、桿菌と球菌の差は認めず、グラム陽性、陰性で違いが認められるという結果となった。患者検体を用いた場合のグラム陽性菌、グラム陰性菌の鑑別に関しては、スキャッタグラムの角度  $30^\circ$  以下であれば、グラム陰性桿菌である感度が 89.2% と高率に一致していたが、角度  $30^\circ$  以上で、少なくともグラム陽性菌が検出される感度は 55.8% と低かった。また、グラム陽性菌だけが分離された検体の 83.3% が  $30^\circ$  以上を示したことを考えると、抗菌薬選択時のある程度の目安となる可能性があると考えられた。

**Key Words** 尿路感染症, 起炎菌, グラム染色, UF-1000*i*

## はじめに

通常尿路感染症とは、非特異的感染症のうち腎盂腎炎と膀胱炎のことをいう。ほとんどの場合、尿路感染症の起炎菌の進入門戸は尿道であり、自己の腸管内の細菌が上行性に感染する。起炎菌の種類は腎盂腎炎と膀胱炎では違いは認められないが、単純性尿路感染症と複雑性尿路感染症では大きく異なる。単純性膀胱炎は、尿流に影響を与える基礎疾患を有しない膀胱炎

であり、20 代および 30 代の女性に好発する感染症である。図 1 に示すように、起炎菌は *Escherichia coli* が約 3/4 占めており、*Staphylococcus saprophyticus* のほか *Proteus mirabilis* をはじめとする腸内細菌科の菌種が占めている<sup>1)</sup>。一方、複雑性尿路感染症では、*Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* が主要起炎菌であり、これらに *Enterococcus faecium* および *Staphylococcus* 属を含めると約 2/3 となる。

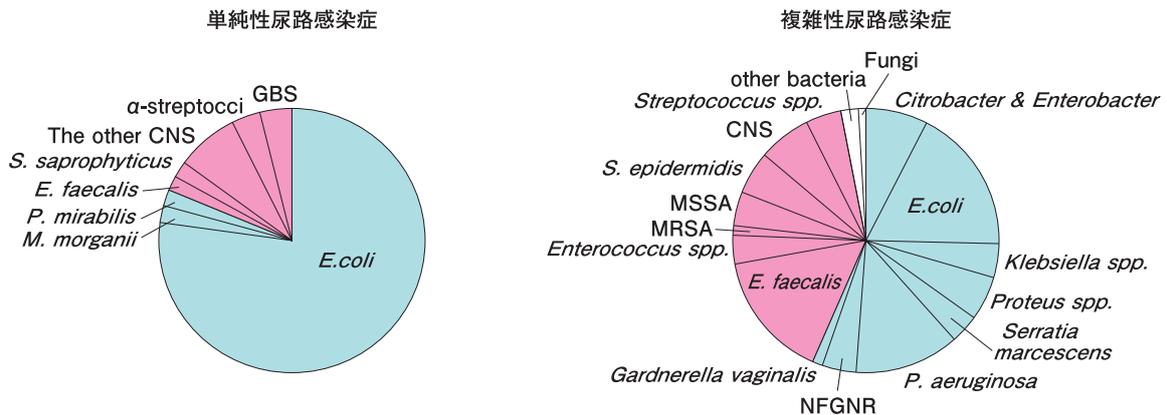


図1. 尿路感染症における病態別起炎菌 (文献1)

単純性尿路感染症では大腸菌が70～80%を占めるが、尿流に影響を与える基礎疾患を有する複雑性尿路感染症では、大腸菌の他に緑膿菌、腸球菌属、ブドウ球菌属など様々な細菌が起炎菌となる。  
 ■：グラム陰性菌， ■：グラム陽性菌

この他に *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* などの腸内細菌科の菌種や *Acinetobacter* spp. などのいわゆる弱毒菌とみられるブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌等、多くの種類の細菌が認められる。また起炎菌の種類だけではなく、抗菌薬に対する耐性率も異なるため、単純性と複雑性では抗菌薬選択において、分けて考える必要がある。診断のためには臨床症状および尿中白血球数が重要であり、塗抹鏡検により細菌が捉えられれば確定できる。特に単純性尿路感染症患者の発症初期には細菌数が少ない場合も多く、鏡検に加えて培養も陰性の場合も稀ではない。複雑性尿路感染症患者の場合、細菌陽性、尿中白血球陽性の場合でも、臨床症状を認めない場合は、抗菌薬治療の対象とはならないが、頻尿、下腹部痛などの膀胱炎に起因する症状を認める場合には急性増悪と考え、抗菌薬投与が必要となる。複雑性尿路感染症の起炎菌はグラム陰性菌からグラム陽性菌まで多岐にわたるため、グラム染色鏡検などにより、起炎菌を推定して抗菌薬を選択することになる。

尿中有形成成分分析装置 UF シリーズ (シスメックス社) は、フローサイトメトリーを原理とし、赤血球、白血球、上皮細胞、円柱を定量できるシステムである。さらに全自動尿中有形成成分分析装置 UF-1000i (以下、

UF-1000i) は、ポリメチン系の蛍光染色で細菌の核酸を特異的に染色し、細菌用独立チャンネルの採用により、細菌の定量を可能とした機種である。したがって、本機種により、尿採取から短時間で尿中白血球数、尿中細菌数を測定可能であり、尿路感染症の診断に有用であると考えられる。しかしながら、抗菌薬選択の参考とするためには、グラム陽性菌かグラム陰性菌かの区別までが重要である。UF-1000i は、菌種をある程度鑑別可能であることを示唆するデータも報告されている<sup>2)</sup>。尿中白血球数については、十分なデータが報告されている<sup>3,4)</sup>が、細菌数、菌種の鑑別の可能性については、菌株を用いた検討が多く、臨床検体を用いた報告は少ないため、これらについて臨床検体を用いて検討したので報告する。

## 材料および方法

2008年7月および8月に細菌定量培養検査の依頼があった尿208検体を対象とした。

UF-1000i による細菌数および細菌のスキヤッタグラム解析、尿沈渣グラム染色鏡検、ドルガルスキー寒天培地、血液寒天培地ならびにチョコレート寒天培地を用いた定量培養および同定を行った。

UF-1000i の細菌チャンネルのスキヤッタグラムは

X軸に側方蛍光強度，Y軸に前方散乱光強度で描かれるドットの集まりのグラフであり，ドットの集まりの中央に原点を通る直線を引き，X軸からの角度を分度器にて測定した。

また，*E. coli* ATCC25922 に piperacillin を作用させ，鏡検と UF-1000i のスキヤッタグラム解析を行った。

## 結果

### 1. 細菌数

図2に患者尿検体で菌量の異なる3検体の細菌チャンネルのスキヤッタグラムを示す。スキヤッタグラムの目視にて菌量の違いは明らかであり，

UF-1000iによる細菌数が分離培養結果よりも10倍程度高い傾向を認めた。

図3にドルガルスキー寒天培地または血液寒天培地による定量培養の結果と UF-1000iによる細菌数測定の結果の相関を示す。ほぼよい相関を認めたが，UF-1000iの方が10倍高い傾向を認めた。また，UF-1000iで $10^4$ cfu/mL以上と判定され，定量培養で菌の発育を認めなかった16例中5検体はグラム染色鏡検では陽性であった。定量培養で $10^4$ cfu/mL以上であった144例中143例は，UF-1000iでも $10^4$ cfu/mL以上であった。1例は $4.6 \times 10^3$ cfu/mLであった。

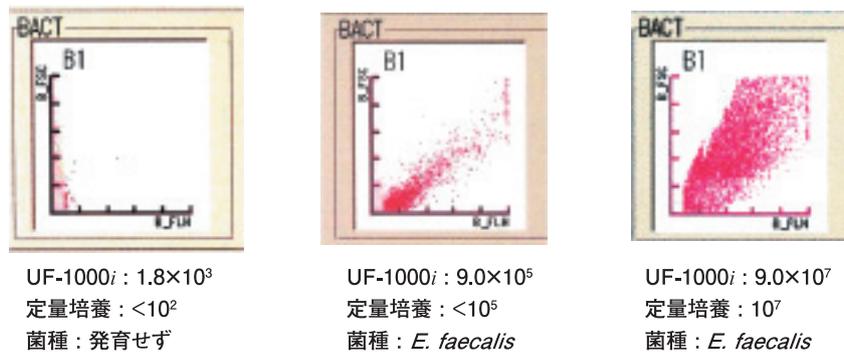


図2. 菌量の異なるスキヤッタグラム

X軸は側方蛍光強度，Y軸は前方散乱光強度を示す。  
いずれも患者尿検体，菌量はcfu/mL

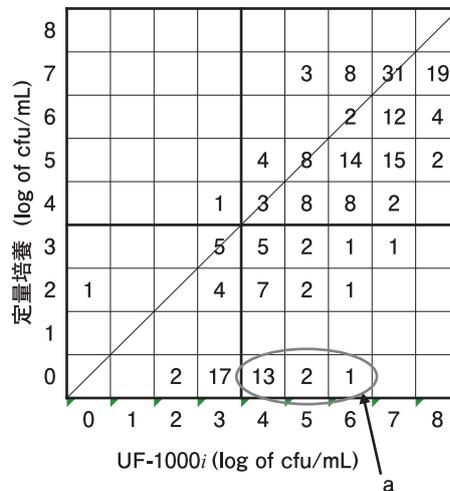


図3. 定量培養法と UF-1000i による細菌数の相関

a : 16例中5検体は塗抹陽性

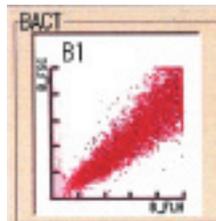
## 2. 同定菌種とUF-1000iの細菌チャンネルスキヤッタグラムとの関係

図4にスキヤッタグラムの典型例を示す。グラム陽性球菌の角度は40°前後、グラム陰性桿菌は20°前後に分布しており、グラム陽性桿菌である *Corynebacterium* の角度は43°、グラム陰性球菌である *Neisseria gonorrhoeae* の角度は11°であり、桿菌と球菌の差は認めず、グラム陽性、陰性で違いが認められた(図4-a, b)。また、グラム陽性菌とグラム陰性菌の両方が分離された検体のうち、ドットの分布が2方向に認められたものを図4-cに示す。判別は必ずしも容易ではないが、図4-a, bのパターンとは明らかに異なる。

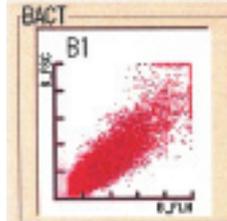
スキヤッタグラムでのドットの数少なく角度が判定不能であった40検体のUF-1000iによる細菌数は、 $10^3$ cfu/mL未満が4検体、 $10^3$ cfu/mL以上 $10^4$ cfu/mL未満が25検体、 $1.0 \sim 3.9 \times 10^4$ cfu/mLが11検体であった。これら40検体の培養結果は $10^3$ cfu/mL未満が31検体、 $10^3$ cfu/mL以上 $10^4$ cfu/mL未満が6検体、 $10^4$ cfu/mLが1検体であった。

### a. グラム陽性菌

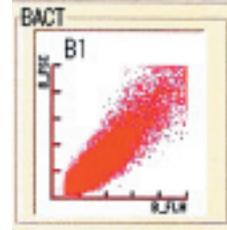
*Staphylococcus sp.* (球菌)



$\alpha$ -streptococci (球菌)

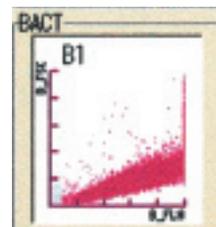


*Corynebacterium sp.* (桿菌)

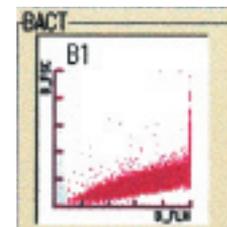


### b. グラム陰性菌

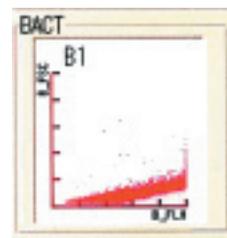
*E. coli* (桿菌)



*K. pneumoniae* (桿菌)



*Neisseria gonorrhoeae* (球菌)



### c. グラム陽性菌, 陰性菌混合パターン

*E. faecalis*

*E. faecalis*

*C. koseri, A. faecalis*

*K. oxytoca*

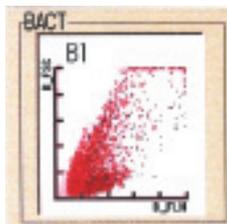
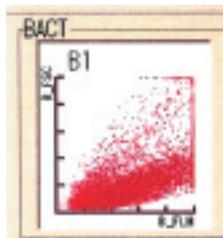


図4. UF-1000iの細菌用チャンネルのスキヤッタグラムと分離された菌種  
*Corynebacterium sp.* と *Neisseria gonorrhoeae* は液体培地での培養検体, その他は患者尿

スキヤッタグラムでのドット分布が1方向であった140検体について、X軸との角度と分離培養により同定された菌群の関係を表1-a, bに示す。菌群は腸内細菌科 (EC; グラム陰性), ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌 (NFGNR; グラム陰性), ブドウ球菌属 (SA; グラム陽性), 腸球菌属 (EF; グラム陽性), レンサ球菌属 (St; グラム陽性), *Corynebacterium* 属 (Cor; グラム陽性) に分類した。腸内細菌科の菌種単独分離の場合は82.8% (53/64) が角度30°未満であり, 複数菌

が分離され, かつ腸内細菌科の菌種が含まれている検体では, 角度30°未満の検体が75.0% (21/28) を占めた。NFGNR単独分離4検体は10~18°を示した。グラム陰性桿菌 (NFGNRを含む) のみが分離された検体は84.3% (59/70) が角度30°未満であった。グラム陽性菌だけが分離された検体の82.8% (24/29) が30°以上を示した。グラム陰性菌とグラム陽性菌の両方が分離された検体のスキヤッタグラムの角度が30°以上を示した検体は30.0% (9/30) に過ぎなかった。

表1. X軸との角度と分離同定された菌群の関係

a. スキヤッタグラムの分布が1方向であった検体の詳細

	分離された菌群						細菌チャンネルスキヤッタグラムのX軸を基準とした角度										<30°の検体数と グラム陰性菌の率	
	EC	NFGNR	SA	EF	St	Cor	不明	<10°	10°-<20°	20°-<30°	30°-<35°	35°-<40°	40°-<50°	50°≦	Total			
単 独 菌 群	+						4	3	40	10				5	6	64	53	82.8%
		+						1	3							4	4	100%
			+				2			2						11	2	18.2%
				+			1		2			1		5	3	13	2	15.4%
					+				1			3		2	3	3	3	1
複 数 菌 群														1		1		
	+	+							2							2	2	100%
	+		+						2		1					3	2	66.7%
	+			+			1		4	2	1	2			2	11	6	54.5%
	+				+				4	3						7	7	100%
	+					+	1		1							1	1	100%
	+		+	+			1		1	1				1		3	2	66.7%
	+		+		+				1							1	1	100%
			+		+					1		1				1	1	100%
			+		+					1		1				1	1	100%
不明						31		3	2		1			3	2	11	6	54.5%
不明合計							40								合計		140	

b. 検体に関するまとめ

	グラム陰性菌		グラム陽性菌	スキヤッタグラム角度*1		計
	腸内細菌科	NFGNR		30°未満	30°以上	
単 独 菌 群			+	5	23	28
	+			53	11	64
		+		4		4
複 数 菌 群	+	+		2		2
	+		+	19	7	26
		+	+	2	2	4
			+		1	1
不明				5	6	11
合計				90	50	140

A  
B  
C  
D  
E  
F  
G

グラム陽性菌のみ; 29 (A+G)  
グラム陰性菌のみ; 70 (B+C+D)  
グラム陰性、陽性菌; 30 (E+F)  
複数菌で腸内細菌+; 28 (D+E)

\*1 UF-1000iの細菌チャンネルスキヤッタグラムのX軸を基準とした角度

スキヤッタグラムでのドットの分布が2方向に認められた28検体について、グラム陰性菌またはグラム陽性菌のみが分離された18検体を図5-aに、グラム陰性菌、グラム陽性菌の両方が分離された10検体を図5-bに示す。図5-aの18検体は、いずれも角度30°未満と40°以上の2方向を有していた。図5-bの10検体中9検体は角度30°未満と30°以上の2方向を有していた。*E. coli* 10<sup>7</sup>cfu/mL, *E. faecalis*

10<sup>4</sup>cfu/mLが分離された1検体は、18°と28°であった。

これらの1方向性検体と2方向性検体の結果を総合すると、30°未満の角度を示した検体の中で、少なくともグラム陰性菌が分離された検体は89.2% (81/91)であり、30°以上の角度を示した検体の中で、少なくともグラム陽性菌が分離された検体は55.8% (43/77)であった。

a. グラム陰性菌またはグラム陽性菌のみが分離された検体 (18検体)

		8	5	
≥50		(①①①①①①①①) (①①②③)	(①①①①) (①④)	
<50		3 (①①③)	2 (①③)	
<40				
<30				
	<10	<20	<30	40≤

- ①腸内細菌科単独 13検体
- ②NFGNR単独 1検体
- ③腸内細菌科およびNFGNR 3検体
- ④腸球菌属単独 1検体

b. グラム陰性菌およびグラム陽性菌の両方が分離された検体 (10検体)

		2	2	
≥50		(②⑤)	(③⑤)	
<50		4 (①①④⑥)		
<40		1 (②)		
<30		1 (①)		
	<10	<20	<30	40≤

- ①腸内細菌科と腸球菌属 3検体
- ②腸内細菌科とブドウ球菌属 2検体
- ③腸内細菌科と腸球菌属とブドウ球菌属 1検体
- ④腸内細菌科とレンサ球菌属 1検体
- ⑤ブドウ糖非発酵菌とレンサ球菌属 2検体
- ⑥*Haemophilus parainfluenzae*とレンサ球菌属 1検体

図5. 細菌チャンネルスキヤッタグラムの分布が2方向認められた検体の角度

### 3. *E. coli* ATCC25922 に piperacillin を作用させた時の UF-1000i スキャッタグラムの変化

図 6 に *E. coli* ATCC25922 を Mueller Hinton Broth で培養し, piperacillin を各種濃度で 3 時間作用させた時の UF-1000i のスキャッタグラムおよびグラム染色像を示す。薬剤なしおよび 1/2MIC 作用時のスキャッタグラムの角度は 17°であったが, 1~8MIC

のパターンはいずれもほぼ同じパターンを示し, 前方散乱光強度が大きい領域, つまり角度が大きい領域にドットが多く存在した。この検体を 1,000 倍で鏡検したところ, 1/2MIC までは通常の桿菌の形態を保っていたが, 1MIC ではフィラメント化した形態を認め, それ以上の濃度では視野一杯にフィラメント化した菌体を認めた。

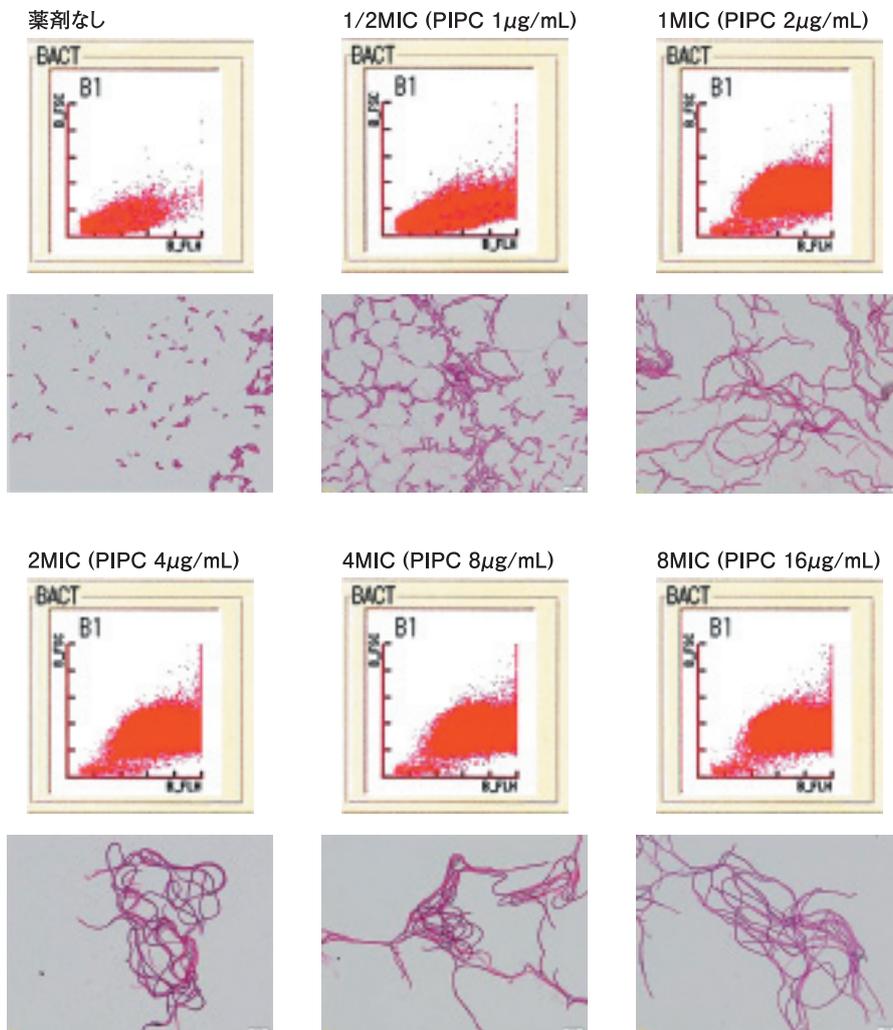


図 6. *Escherichia coli* ATCC25922 株に piperacillin を作用させた時の細菌用チャンネルのスキャッタグラム  
Mueller Hinton Broth にて培養し, piperacillin 添加3時間後にグラム染色および UF-1000i に供した。

## 考 察

今回、UF-1000*i* およびグラム染色鏡検において細菌陽性で、培養陰性の検体が存在した。偏性嫌気性菌や *Gardnerella vaginalis* などの使用した培地に発育しない菌種であった可能性が考えられる。また、本検討では抗菌薬の投与の有無や基礎疾患の有無などの臨床背景を調査していないため、抗菌薬投与の影響なども考えられる。細菌数がUF-1000*i* で培養結果よりも高い傾向を示したのも同様の理由が考えられるが、機器の調整の問題もあったかもしれない。

スキヤッタグラムの角度と菌群の関係についても学会報告などがなされているが、今回の検討では、グラム陽性球菌、グラム陽性桿菌ともに前方散乱光強度が大きく、角度も大きい、グラム陰性桿菌およびグラム陰性球菌は前方散乱光強度が小さく、角度も小さい傾向を認めた。これらの理論的根拠については今後の検討課題であるが、今回の検討では、カットオフ値は30°が適当と考えられた。角度30°未満でグラム陽性菌のみが分離された検体は5例存在し、*Streptococcus agalactiae* 18° 1例、*E. faecalis* 19° 1例、*E. faecium* 20° 1例、*S. aureus* 24° 1例、Coagulase-negative Staphylococci 28° 1例であった。また、データは示していないが、*Enterococcus faecalis* を Brain Heart Infusion Broth で培養後のスキヤッタグラムも30°未満を示す株が多かったことから、必ずしもこのカットオフ値が当てはまるわけではない。

角度30°以上でグラム陰性菌のみが分離された検体は11検体あり、これらの角度は43～54°と高角度に分布していた。菌種は *E. coli* 単独6検体、*E. coli* と *Citrobacter farmeri* 1検体、*Citrobacter koseri*、*K. pneumoniae*、*K. oxytoca* 単独がそれぞれ1検体、*C. koseri* と *Providencia rettgeri* が分離された検体が1検体であった。また、グラム陰性菌のみが分離され、30°未満の分布と40°以上の分布の2方向分布を示した検体が17検体(図5-a ①～③)存在した。これらの結果から、グラム陰性菌のみが分離されているにもかかわらず、スキヤッタグラムの角度が高くなる可能性として、検体にはグラム陽性菌も含まれていたがグラム陽性菌に有効な薬剤が投与されていたためにグラム陽性菌が培養では検出できなかったこと、

あるいは、ある程度抗菌力を有する  $\beta$ -lactam が投与されていたためにグラム陰性桿菌がフィラメント化していたことが考えられる。

UF-1000*i* の細菌数に関しては、患者尿を用いての検討をさらに実施することも必要であると考えられるが、少なくとも分離培養と相関するデータが得られており、尿路感染症診断の目安となりうると考えられる。グラム陽性菌、グラム陰性菌の鑑別に関しては、スキヤッタグラムの角度30°以下であれば、グラム陰性桿菌である確率が89.2%と高率に一致していたが、角度30°以上で、少なくともグラム陽性菌が分離された検体は55.8%と低かった。また、グラム陽性菌だけが分離された検体(1方向性および2方向性)の83.3%(25/30)が30°以上を示したことを考えると、抗菌薬選択時のある程度の目安となる可能性があると考えられる。さらに、フィラメント化したグラム陰性桿菌の角度は高くなるという実験結果を踏まえ、グラム陰性菌に有効な抗菌薬の投与、グラム陽性菌に有効な抗菌薬の投与などの抗菌薬投与情報を含め検討することにより、今後、詳細な評価ができるようになる。

もちろん、尿路感染症の診断には尿中白血球数に加えて、尿沈渣鏡検、グラム染色が優先されるべきである。UF-1000*i* による細菌数のデータについても患者尿を用いた検討がまだまだ足りないと思われる。さらに、細菌の種類についてはグラム染色鏡検が第一義的であり、UF-1000*i* でのデータはまだまだ足りない。しかしながら、リアルタイムでグラム染色鏡検ができない施設は多く存在すると考えられる。短時間で尿中白血球数および尿中細菌数のデータが得られ、細菌種の推定まで可能となり得るUF-1000*i* は、このような施設において有用であると考えられ、今後の検討が期待される。

## 謝 辞

*E. coli* に対する piperacillin 作用時の形態変化ならびにUF-1000*i* のスキヤッタグラム解析に関する実験について、多大なご助力をいただきましたシスメックス社学術本部和田淳博士に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 村谷哲郎. 性感染症: 尿路感染症における薬剤耐性菌の現状と耐性メカニズム. *Urology View*. 2005; **3**(1): 28-34.
- 2) 生野陽子 他. 尿中有形成分分析装置 UF-1000i による細菌検出パターンを用いた菌種推定に関する検討. 第20回日本臨床微生物学会総会. 2009. 抄録 No. O-0062 仙台.
- 3) Koken T et al. Determination of cut-off values for leucocytes and bacteria for urine flow cytometer (UF-100) in urinary tract infections. *Int Urol Nephrol*. 2002; **34**(2): 175-178.
- 4) Ozdem S et al. The prevalence of asymptomatic pyuria in diabetic patients: comparison of the Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer with Fuchs-Rosenthal hemacytometer. *Clin Biochem*. 2006; **39**(9): 873-878.

---

# The Possibility of the Bacterial Class Estimate Using Urine from Patients with the Urinary Tract Infection by the Fully Automated Urine Particle Analyzer UF-1000i

Tetsuro MURATANI<sup>\*1,2</sup>, Tomoko KOBAYASHI<sup>\*1,2</sup>, Yuki MINAMOTO<sup>\*1,2</sup>,  
Yoko IKUNO<sup>\*2</sup> and Shinobu MIGITA<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> Kyurin Corporation, 27-25 morishitachou, Yahatanishi-ku, Kitakyuushuu-shi 806-0046

<sup>\*2</sup> Hibiki Research Group for Clinical Microbiology

---

## SUMMARY

We investigated bacterial counts and bacterial discrimination in urine sample from patients with urinary tract infection, and compared Sysmex UF-1000i with standard culture method. This study was investigated in 208 urine samples from different patients. Regarding bacterial counts in urine, these two methods had good correlation, however, the results of UF-1000i showed 10 times higher than the results of culture method generally. Five of 15 samples that showed the result of no growth by culture method and more than 10<sup>4</sup>cfu/mL by UF-1000i were bacterial positive results by microscopy. It considered that using antibiotics or exiting bacteria that being not able to growth on using medium (blood agar and Drigalski agar) .

Scattergram in bacterial channel of UF-1000i was a graph drawn at Y-axis front airlight width, X-axis front airlight strength, and I pulled a straight line centrally and measured the angle from this X-axis by a protractor.

In the study using bacterial suspensions of identified organisms, the angle of the gram-positive cocci and rods were distributed around 40 degrees, and it of the gram-negative cocci and rods were distributed around 20 degrees. Therefore these results suggest the possibility that can distinguish gram-negative bacteria from gram-positive bacteria by an angle with the X-axis of scattergram of UF-1000i.

In the results using clinical specimen, when the angle of the scattergram of a sample was less than 30 degrees, the probability that was a gram-negative bacterium was 89.2%. In contrast, when the angle of the scattergram of a sample was more than 30 degrees, the probability that was a gram-positive bacterium was 55.8%. Considering that the samples with angle of scattergram more than 30 degrees were accounted for 83.3% when isolating only gram-positive bacteria, it is considered that scattergram analysis of UF-1000i might be useful for choice of antibiotics.

### Key Words

Urinary Tract Infection, Causative Organisms, Gram-stain, UF-1000i

---