

# 水酸化ナトリウムドデシル硫酸ナトリウム溶液を用いた全自動尿中有形成分分析装置 UF-1000i による、液体試料中の細菌のグラム染色性を判定する迅速法の創案

和田 淳, 河野 麻理, 高木 由里, 河内 佐和子, 森川 隆

シスメックス株式会社 学術本部 学術部 セルアナリシスセンター：神戸市西区室谷 1-3-2 (〒651-2241)

## 要 旨

**背景：**細菌性の尿路感染症 (UTI) の治療に用いる抗菌薬は、尿中に存在する細菌のグラム染色性を知ることにより適切に処方できる。そこで、UTI 治療に有用な、液体試料中に存在する細菌を簡便かつ迅速にグラム判定する方法の考案を試みた。

**方法／主要な発見：**細菌細胞壁の厚さや構造の差は、ある種の化学物質に対する耐性にも反映される。今回我々は、水酸化ナトリウムドデシル硫酸ナトリウム水溶液 (NaOH-SDS 溶液) を細菌の細胞壁構造の識別のために、また全自動尿中有形成分分析装置 UF-1000i (以下、UF-1000i；シスメックス社) を定量的な細菌計数に使用して、尿などの液体中に存在する細菌のグラム染色性を判定することを試みた。まず *Escherichia coli* (大腸菌) の培養液に NaOH-SDS 溶液を直接添加することで、NaOH-SDS 溶液が液体培地中のグラム陰性菌を溶解できることを示した。また、同じ培地中で培養したグラム陽性菌 *Enterococcus faecalis* (腸球菌) は同じ条件では完全には溶解されないことも示した。次に、3 種のグラム陽性菌株と 4 種のグラム陰性菌株を用いて、NaOH-SDS 処理の反応時間の最適化を試み、室温での至適反応時間が 5 分間であることを明らかにした。最後に、この方法が一般化できるかどうかを評価するために、培養液中で培養したグラム陽性菌およびグラム陰性菌 8 種ずつ、または健常人ボランティア尿中で培養したグラム陽性菌およびグラム陰性菌 4 種を同じ方法で処理し、実験に使用したすべてのグラム陽性菌が、この方法で定量的にグラム陰性菌と識別できることを実証した。

**結論／重要性：**本法を用いることにより、液体培地中の細菌のグラム染色性を、UF-1000i による試薬処理前後の細菌計数値の比較だけで 10 分以内に容易に識別することができた。本法は、UTI の既往歴がなく起炎菌の推定が容易でない UTI 患者へ処方する抗菌薬を選択する際に、特に有用であると考えられた。

**キーワード** UF-1000i, 尿路感染症, 細菌, グラム染色

## 序 論

尿路感染症 (UTI) などの感染症の初期治療においては、原因となる病原体の情報が不足している。そのため、医師はほとんどの場合、抗菌剤を経験的に処方することになる。基礎疾患のない患者にとっては、UTI は通常それほど重篤な病気ではない。しかし、乳幼児や高齢者・妊婦などのような抵抗力の

低い患者にとっては、診断と治療の遅れが菌の組織侵入あるいは敗血症のような重篤な転帰につながるため、迅速な診断と治療が重要となる<sup>1-3)</sup>。

感染症患者の初期治療において抗菌剤を適正に使用するためには、起炎菌についての情報が有用である。UTI の確定診断は一般に、中間尿中の病原微生物の存在に基づいてなされる<sup>1-3)</sup>。病原細菌の検出と計数のゴールデンスタンダードは半定量的尿培養法

であるが、この方法では菌の検出と計数のための培養には少なくとも一晩を要し、細菌の同定や感受性試験の結果を得るにはさらに24時間から48時間を要する。これらの理由から、UTI患者の初診時には培養検査による病原体の情報は利用できない。さらに、多くの検査室で実施されている標準好気培養法では、UTIの起炎菌すべてが増殖しえないため、実際の起炎菌を見逃す危険性もある<sup>4,5)</sup>。

尿定性試験紙や顕微鏡検査も、UTI診断のための尿検査として実施される。これらの方法は培養検査ほど時間がかからない。しかし、尿定性試験紙で細菌検査の項目として用いられる硝酸還元酵素分析は、迅速かつ安価な診断法として実施されているものの、正確性は低い<sup>6)</sup>。細菌の検出という点では、顕微鏡検査による分析の方が、尿定性試験紙より信頼性が高い。さらに尿沈渣のグラム染色による顕微鏡検査は、細菌尿からの菌の検出にはより信頼性が高く、迅速に検査され報告されるならば、抗菌剤処方への非常に有用な情報となる<sup>7)</sup>。しかし顕微鏡検査法には、担当する技師の経験や技術に左右されるという問題がある<sup>8)</sup>。また近年、病原体の核酸あるいはタンパク質を検出するいくつかの手法も開発されているが<sup>9-12)</sup>、それらの手法にはまだ、外来患者のための日常的な検査としては、定量性が十分ではない、操作が複雑である、高価である、などの問題点を抱えている。したがって、細菌検出および菌種判別のための迅速かつ容易で、また経験に左右されない方法は、尿路感染症の診断に非常に有用と考えられる。

近年、自動尿中有形成分分析装置が、尿検査の新しいスクリーニング法として確立されてきた<sup>13,14)</sup>。フローサイトメトリー (FCM) を用いた全自動尿中有形成分分析装置 UF-1000i (以下、UF-1000i; シスメックス社) は、専用試薬系を用いて尿中細菌の検出と計数を行う分析チャンネル (BACT チャンネル) を有しており、尿検体中に存在する  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  個/mL の範囲の細菌を短時間のうちに計数できる<sup>15,16)</sup>。UF-1000i は多くの施設で評価され、その細菌検出能力には高い評価が得られている<sup>17-26)</sup>。しかし、UF-1000i には細菌のグラム染色性を判定する機能はない。

UF-1000i を用いたグラム染色の代替法があれば、

UTI の診断と処方のための重要な手掛かりを簡単に得られる可能性がある。細菌のグラム染色性とは、その細菌のグラム染色液に対する反応性を示しているが、これは、細菌細胞壁の構造の違いに基づいている<sup>27)</sup>。グラム陽性菌にはペプチドグリカン細胞壁の厚い層があり、グラム染色液第一試薬を細胞壁中で保持することができる。グラム陰性菌も薄いペプチドグリカン細胞壁を持つが、グラム陽性菌の細胞壁とは構造が少し異なり、かつ薄いため、グラム染色第一試薬を効果的に保持することができない。一方、ペプチドグリカン細胞壁は細菌細胞を保護するための機械的・化学的な耐性を付与するため、グラム陽性菌の厚い細胞壁はグラム陰性菌の薄い細胞壁よりも機械的・化学的ストレスへの耐性が高いことが知られている。そこで我々は、化学物質に対する細菌細胞壁の耐性の違いを利用した前処理と UF-1000i 測定を組み合わせる方法が、グラム染色性の判別に利用できるのではないかと考えた。

本論文では、尿のような液体の検体に直接適用できる可能性のある、単純な生化学処理と UF-1000i による細菌計数を組み合わせる、液体試料中の細菌の新しいグラム染色性判定法について報告する。

## 材料と方法

### 1. 菌株と培地

16種の標準細菌株、*Escherichia coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, *Proteus mirabilis* ATCC25933, *Serratia marcescens* ATCC13880, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Citrobacter freundii* ATCC8090, *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, *Enterobacter cloacae* ATCC23355, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC15305, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus sciuri* JCM2425, *Bacillus cereus* ATCC14579, *Corynebacterium striatum* ATCC BAA1293, および *Streptococcus pyogenes* ATCC BAA946 を使用した。細菌のストックはすべてハートインフュージョン寒天培地 (51047, 日水製薬社) 上で一晩以上培養した後、生じたコロニーを釣菌し、

前培養のために16時間以上ハートインフュージョン培地(05505, 日水製薬社)中で培養した。前培養液の一部をハートインフュージョン培地中に希釈し、4時間程度培養して対数増殖期中期として用いた。また、ハートインフュージョン培地に塩酸を加えてpHを2, 3, 4, 5, 6に調整した培地を調製し、0.2  $\mu\text{m}$  フィルターにて滅菌して用いた。培養はすべて35°Cで行った。

## 2. 試薬

NaOH, ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20), polyoxyethylene octyl phenyl ether (Triton X-100), 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), およびアガロース-LEはナカライテスク社から購入した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS, 16219321), cetylpyridinium chloride monohydrate (CPC), およびDodecyltrimethylammonium Chloride (DTAC)は和光純薬工業社から購入した。水はdirect-Q(ミリポア社)で調製した超純水を用いた。NaOH-SDS溶液(0.2 N NaOH, 1% SDS)<sup>28)</sup>は、10 NのNaOHおよび10%のSDS保存溶液から毎日調製した。他のバッファーあるいは界面活性剤はいずれもそれぞれ終濃度が0.2 N, 1%となるよう調製した。さらに、pH 10と11の緩衝液としてCAPS-NaOH緩衝液を、pH 12と13の緩衝液としてNaOH-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>緩衝液を用いた。

## 3. 尿中培養

6名の健常人ボランティア(男性3名, 女性3名)より随意尿を取得し、よく混和した後に適量ずつ試験管に分注した。この尿中に、ハートインフュージョン培地で前培養した4種の細菌株(*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*)の培養液を希釈し、4時間程度培養して対数増殖期中期の培養液を調製した。培養はすべて35°Cで行った。なお、この研究はシスメックス社倫理委員会の承認を得ており、すべてのボランティアからは研究プロトコルに従ってインフォームド・コンセントを得ている。

## 4. NaOH-SDS 溶液との反応

0.5 mLの対数増殖期中期の培養液を1.5 mL遠心管へ分注した後、0.5 mLのNaOH-SDS溶液または陰性対照としてPBSを加えた。試験管は6回転倒混和した後、室温(20~25°C)で静置して反応させた。標準的な反応時間は5分間とした。反応時間の検討の実験では、**図3**および**図4**の説明に述べられているように、反応時間は1分から60分まで変更した。反応時間の終了直後に、反応液をUF-1000iで測定した。

## 5. フローサイトメトリー

UF-1000i(シスメックス)をフローサイトメーターとして使用し、すべての試薬はシスメックスから購入した。UF-1000iはメーカーの使用説明に沿って使用し、UF-1000iのBACTチャンネルを細菌数の計数に用いた。また、汎用フローサイトメーターによる検討では、FACSCalibur(BDバイオサイエンス社)を用い、試験管内でUF-1000i装置内と同様にBACTチャンネル試薬と検体を反応させた後に測定を行った。

## 6. 顕微鏡観察

液体培地で培養した*E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*にNaOH-SDS溶液、もしくはPBSを加えて5分間反応させ、0.1 N塩酸を等量加えて反応を停止させたものを試料とし、既報の文献の方法<sup>38)</sup>を少し修正した方法を用いて、アガロースゲルをコートしたスライドガラスを使用して観察した。すなわち、スライドガラス(S024410, 松浪硝子工業社)上に溶解した2%(w/v)のアガロースゲルを積載した後、室温で一日以上乾燥させて室温で保存した。10  $\mu\text{L}$ の細菌培養液をアガロースコートしたスライドガラスに載せ、カバーガラス(C218181, 松浪硝子工業社)で覆い、数分後に顕微鏡(BX-60顕微鏡, UPLAPO100XO対物レンズ, オリンパス社)で観察した。顕微鏡写真はデジタルCCDカメラ(DP25, オリンパス社)で取得した。

## 結果

### 液体培地中の大腸菌 (*Escherichia coli*) は、水酸化ナトリウムドデシル硫酸ナトリウム溶液を培養液に直接追加することで容易に溶解できる

液体試料中に存在する細菌のグラム染色性を判別するために、界面活性剤および塩基性 pH に対する細胞壁の耐性の差が利用できる可能性を考案した。そこで、細胞壁の構造を化学的に検出するための試薬として、*Escherichia coli* (大腸菌) からのプラスミド抽出方法で用いられている水酸化ナトリウムドデシル硫酸ナトリウム水溶液 (NaOH-SDS 溶液)<sup>28, 29)</sup> の利用を検討した。NaOH-SDS 溶液は、DNA 調製の緩衝剤中に懸濁されている *E. coli* を容易に溶解することができることが知られている。しかし、細菌培養液中へ直接添加した際に、この溶液が細菌を溶解できるかどうかの知見は、経験的にも文献的にも見出せなかった。

そこで、培養液中に直接添加した NaOH-SDS 溶液が、培養液中の *E. coli* を溶解可能か、また、添加によって生じた違いを UF-1000i が検出可能か、の2点

について以下の通り検討した。まず、対数増殖期中期の *E. coli* を、新鮮培地中に  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$  個/mL の濃度になるよう再懸濁し、等量の NaOH-SDS 溶液を加え、室温で5分間反応させた後、反応混合物を UF-1000i で測定したところ、培地中の *E. coli* は完全に溶解された (図1)。

### NaOH-SDS 溶液は、液体培地中の大腸菌の溶解に最適な試薬である

NaOH-SDS 溶液の pH の最適化を試みた。  $4 \times 10^6$  個/mL の対数増殖期中期の *E. coli* 培養液に、pH 10 ~ 13 の水酸化ナトリウム緩衝液および SDS からなる溶液を等量添加し、室温で5分間反応させた後、UF-1000i で菌数を計数した。また、同じ *E. coli* 培養液に等量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加えた陰性対照中の菌数も UF-1000i で計数し、計数値を比較した。その結果、アルカリ SDS 溶液の pH が 12 以上ならば *E. coli* はほぼ完全に溶菌されること、また pH が 11 以下だと処理後の菌数が陰性対照の 40% 以上と十分に溶菌できないこと、が判明した (図2A, 図2B)。

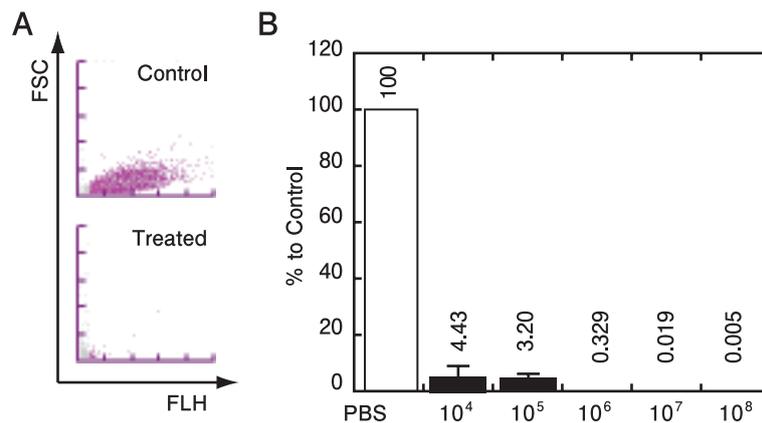


図1. 大腸菌培養液に対する NaOH-SDS 溶菌液の影響の検討

- (A) 典型的な BACT スキャットグラム。培養した *E. coli* ( $2 \times 10^8$  個/mL) を、等量の PBS (Control) あるいは NaOH-SDS 溶液 (Treated) と混和した後、5分間反応させ、UF-1000i で測定した。  
 (B) 希釈した *E. coli* 培養液 ( $1 \times 10^4 \sim 10^8$  個/mL) を用いた、菌濃度と NaOH-SDS 可溶性の関係。それぞれ、バーの高さと数字は3回の独立した実験の平均値の陰性対照の平均値に対する百分率を、エラーバーは標準偏差を表す。

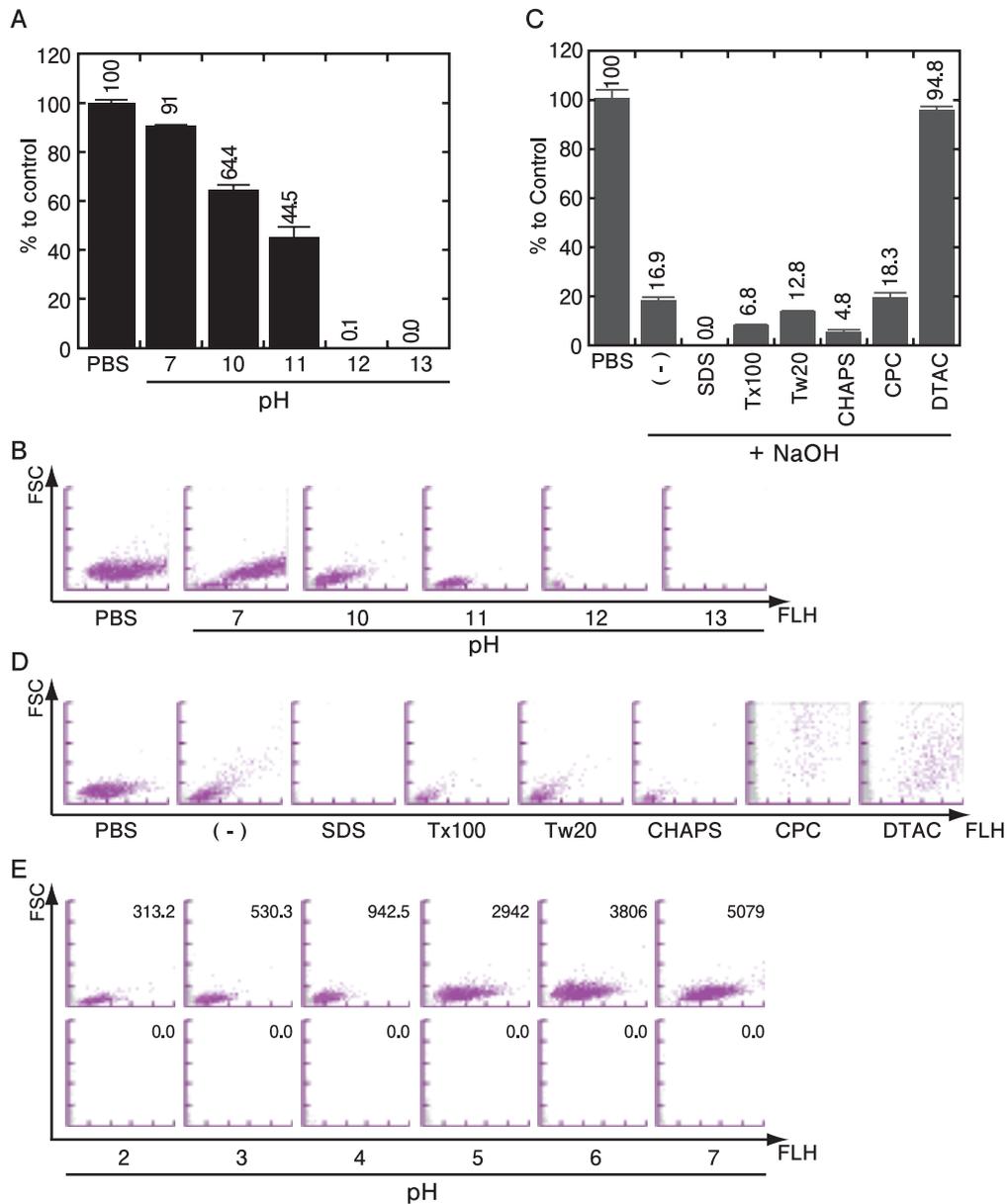


図2. NaOH-SDS 溶液は液体培地中の *E.coli* の溶菌に適している

(A, B) アルカリ-SDS 溶液の pH と *E. coli* の溶解性の関係。

(A) それぞれ、バーの高さと数字は 3 回の独立した実験の平均値の陰性対照に対する百分率を、エラーバーは標準偏差を表す。

(B) 典型的な BACT スキャットグラム。 *E. coli* 培養液 ( $4 \times 10^6$  個/mL) を等量のアルカリ-SDS 溶液または PBS と混和し、5 分間静置した後に UF-1000i で測定した。

(C, D) NaOH-界面活性剤溶液中の、界面活性剤の種類と *E. coli* の溶解性の関係。

(C) それぞれ、バーの高さと数字は 3 回の独立した実験の平均値の陰性対照の平均値に対する百分率を、エラーバーは標準偏差を表す。または界面活性剤なし (NaOH のみ) を示している。

(D) 典型的な BACT スキャットグラム。 *E. coli* 培養液 ( $2 \times 10^6$  個/mL) を等量のアルカリ-SDS 溶液または PBS と混和し、5 分間静置した後に UF-1000i で測定した。

(E) 培地の pH の影響を検討した実験の典型的な BACT スキャットグラム。4 時間培養した大腸菌培養液を NaOH-SDS 溶液と反応させ、その前後の菌数を UF-1000i で測定した。図中の数字は、独立に測定した菌数の 3 回の平均値 (個/ $\mu$ L) を示している。

次に、界面活性剤の種類について検討するために、非イオン性界面活性剤（ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（Tween 20）およびポリオキシエチレンオクタシルフェニルエーテル（Triton X-100））、両性界面活性剤（CHAPS）、陽イオン性界面活性剤（塩化セチルピリジニウム（CPC）および塩化ドデシルトリメチルアンモニウム（DTAC））について、SDSと比較検討した。4 × 10<sup>6</sup> 個/mLの対数増殖期中期の*E. coli*に等量の水酸化ナトリウム-界面活性剤溶液を加えて室温で5分間反応させた後、PBSを加えた陰性対照と菌数を比較した結果、至適な界面活性剤はSDSであることが判明した（図2C, 図2D）。

さらに、ヒトの尿はpHが通常4から8の間であり、尿の酸性がNaOH-SDS反応を阻害する可能性が考えられることから、培地のpHの影響についても検討した。塩酸でpHを2から7までに調整したハートインフュージョン培地中で*E. coli*を培養し、上と同様に等量のNaOH-SDS溶液またはPBSと反応させた後に、UF-1000iで菌数を計数した。その結果、培地のpHはNaOH-SDS溶液による溶菌活性にはほ

んど影響しないことが示された（図2E）。

以上の結果から、NaOH-SDS溶液が液体培地中の*E. coli*を溶菌するのに最適な溶菌液であると結論した。

**グラム陽性菌である腸球菌（*Enterococcus faecalis*）はNaOH-SDS溶液によって完全には溶解できなかった**

NaOH-SDS溶液を液中の細菌のグラム染色性判定に使用するためには、グラム陽性菌を溶かさないと必要がある。そこで、UTIの起炎菌となるグラム陽性菌を溶菌しない可能性について検討した。*Enterococcus faecalis*（腸球菌）は*Staphylococcus saprophyticus*（腐性ブドウ球菌）と並んで<sup>32, 33</sup>、尿検体から最も頻繁に検出されるグラム陽性菌の一つである。

そこで、対数増殖期中期の*E. faecalis*培養液に、上述の*E. coli*の実験と同様に、等量のNaOH-SDS溶液を加えて5分間反応させた後UF-1000iで菌数を計数したところ、計数値はPBSを加えた陰性対照の半分以上となり、*E. coli*とは明瞭な差が見られた（図3）。

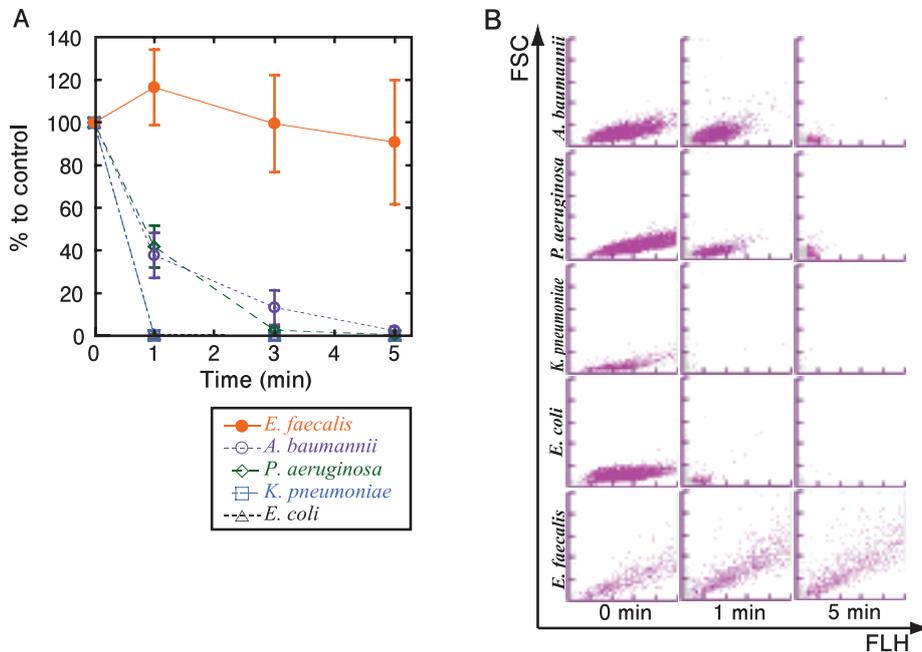


図3. NaOH-SDS 処理は、5分以内にグラム陰性細菌を溶菌した

(A) 対数増殖期中期の、4種のグラム陰性菌株 (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* と *A. baumannii*) および *E. faecalis* (陰性対照としてのグラム陽性菌) に NaOH-SDS 溶液を加え、図に示す時間反応させた。UF-1000i によって測定した細菌数を、等量の PBS を加えた陰性対照に対するパーセンテージに変換した。シンボルはそれぞれ、3回の独立した実験の平均値を、エラーバーは標準誤差を表す。

(B) NaOH-SDS 処理した細菌の代表的な BACT スキャットグラム。3分あるいは5分間反応後の細菌培養液、または陰性対照を示す。

**グラム陽性・グラム陰性を識別する NaOH-SDS 処理の至適反応時間は、室温で5分間であった**

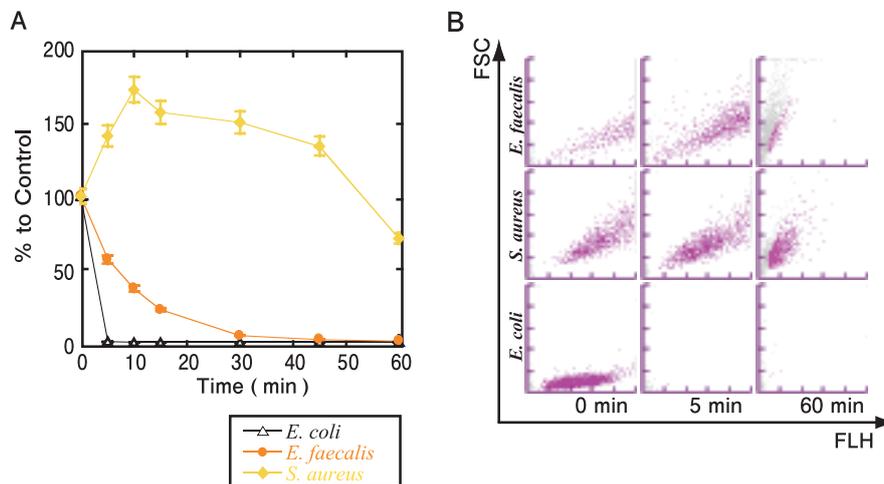
NaOH-SDS 溶液と菌液の反応時間の最適化を試みた。上に示した通り、*E. coli* は室温5分間の NaOH-SDS 処理によって容易に溶解されたが、*E. faecalis* は同じ処理で完全には溶解されなかった。我々は一般に、グラム陰性菌は NaOH-SDS 処理によって容易に溶解されるが、グラム陽性菌は溶解されにくいと考えて、次の二つの方法で至適反応時間を検討した。

まず、グラム陰性菌 (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌), *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌), *Acinetobacter baumannii* (アシネトバクター・バウマニ)) の4菌株を用いて、グラム陰性菌を溶解する最短反応時間を検討した。対数増殖期中期の菌を、室温で1, 3, 5分間 NaOH-SDS 処理し、菌数を UF-1000i によって計数して、元の培養液に等量の PBS を添加した陰性対照の菌数と比較した。その結果、4種の

グラム陰性菌すべてで、3分間および5分間の反応によって、それぞれ陰性対照の30%未満・10%未満に菌数が減少した(図3)。

次に、グラム陽性菌の二つの菌株 (*E. faecalis*, および *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)) の使用により、グラム陽性菌の最大の反応時間を決定しようとした。対数増殖期中期のこれらの菌培養液を、室温で5, 10, 15, 30, 45 および 60分間 NaOH-SDS 溶液と反応させた。菌数は UF-1000i によって計数し、PBS による陰性対照の菌数と比較した。その結果、グラム陽性菌の菌数は、それぞれ陰性対照の50%, 20%以上保持されていた(図4)。

これらの結果から、NaOH-SDS 溶液によるグラム判定の室温での至適反応時間は5分間であることが判明した。さらに、*E. faecalis* は *S. aureus* よりも NaOH-SDS 溶液に溶解されやすいことも示された(図4)。



**図4. 5分間の NaOH-SDS 溶液との反応はグラム陽性細菌を溶菌しなかった**

(A) 対数増殖期中期の、2種のグラム陽性菌株 (*S. aureus* と *E. faecalis*) および *E. coli* (陰性対照としてのグラム陰性菌) に NaOH-SDS 溶液を加え、図に示す時間反応させた。UF-1000i によって測定された細菌数は、陰性対照に対する百分率に変換した。それぞれ3回の独立した実験の平均値を、エラーバーは平均値の標準誤差を表す。

(B) NaOH-SDS 処理した細菌の代表的な BACT スキャットグラム。5分あるいは60分間反応後の細菌培養液、または陰性対照を示す。

### グラム陽性菌の菌塊は NaOH-SDS 処理で分割されていた

NaOH-SDS 処理直後の *S. aureus* は、一時的な見かけの菌数増加を示した (図4)。この理由を検討するために、グラム陽性菌である *S. aureus* と *B. cereus* (セレウス菌) およびグラム陰性菌である *E. coli* の、NaOH-SDS 処理前後における顕微鏡観察を行なった。処理前の *S. aureus* と *B. cereus* は、多くの細菌細胞からできている大きな菌塊を形成していた (図5, 左中・左下)。対照的に *E. coli* は、1個あるいは分裂しかけている2個の細胞 (図5, 左上) であり、菌塊を形成しているものは観察されなかった。NaOH-SDS 処理後には、*S. aureus* と *B. cereus* の菌塊は多くの小片へと分割されていた (図5, 右中・右下)。一方、*E. coli* は完全に消失していた (図5, 右上)。

### グラム陽性菌とグラム陰性菌は NaOH-SDS 処理に対する耐性によって識別できた

本法が、ここまでで実験に用いたもの以外の細菌についても適用できるかどうかを検討するために、臨床的に重要な8種のグラム陽性菌株および8種のグラム陰性菌株をハートインフュージョン培地中で培養し、本法でこれらの菌のグラム染色性が判定できるかどうかを検討した。その結果、使用したすべてのグラム陽性菌は、グラム陰性菌よりも NaOH-SDS 処理に耐性があることが明らかとなった。また、グラム陽性菌と陰性菌との境界は、陰性対照の菌数の約25%だった (図6)。

最後に、ヒト尿中の潜在的な阻害物質の影響を確認するために、男女各3名の健常人ボランティア随意尿を培地として2種のグラム陽性菌 (*S. aureus*, *E. faecalis*) と2種のグラム陰性菌 (*E. coli*, *P. aeruginosa*) を培養し、同様の実験を行った。その結果、尿中培養の条件下でも、NaOH-SDS 溶液はグラム陰性菌を選択的に溶解することが判明した (図7)。

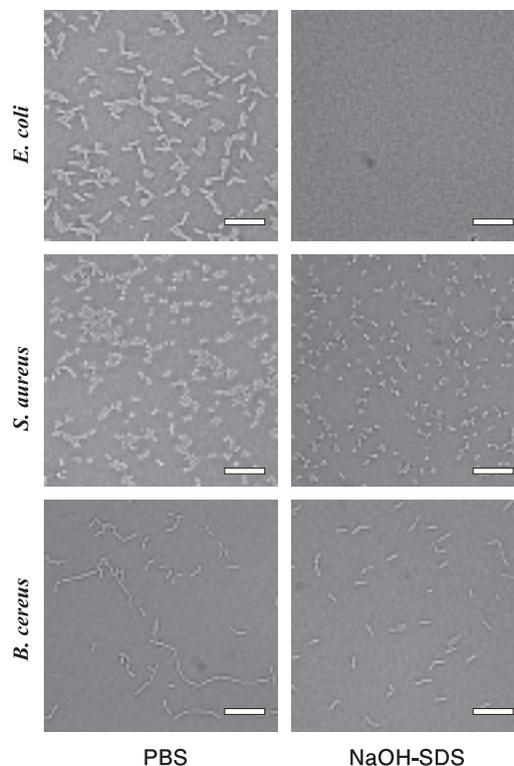


図5. NaOH-SDS 溶液の処理前後の細菌の顕微鏡観察

上段は *E. coli* を、中段は *S. aureus* を、下段は *B. cereus* を示す。左のパネルは陰性対照を、右パネルは NaOH-SDS 溶液と5分間反応させた試料をそれぞれ示す。Bar = 10  $\mu$ m。

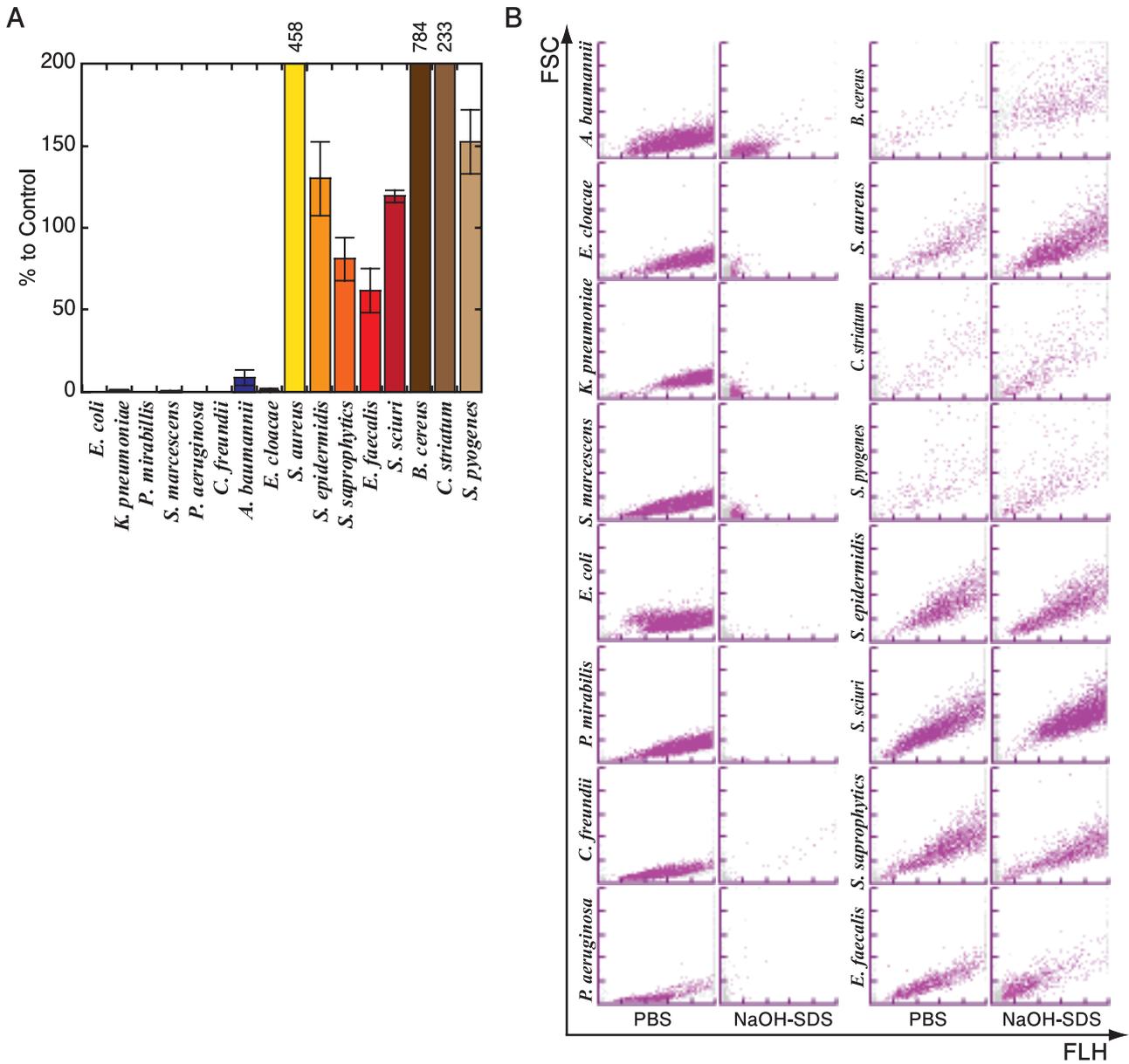


図6. NaOH-SDS 溶液への反応性は、細菌のグラム染色性を反映する

- (A) 対数増殖期中期の、8種のグラム陽性菌 (*B. cereus*, *S. aureus*, *C. striatum*, *S. pyogenes*, *S. epidermidis*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus* と *E. faecalis*) および8種のグラム陰性菌 (*A. baumannii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. freundii* と *P. mirabilis*) を、5分間 NaOH-SDS 溶液と反応させた後、UF-1000i によって菌数を計数し、等量の PBS を加えた陰性対照に対するパーセンテージに変換した。それぞれバーの高さは、3回の独立した実験の平均値の陰性対照の平均値に対する百分率を、エラーバーは平均値の標準誤差を表す。なお、一部図中に収まらないバーには平均値を数字で図上に示している。
- (B) NaOH-SDS 反応前後の代表的な BACT スキャットグラム。5分間反応後の細菌培養液、または陰性対照を示す。

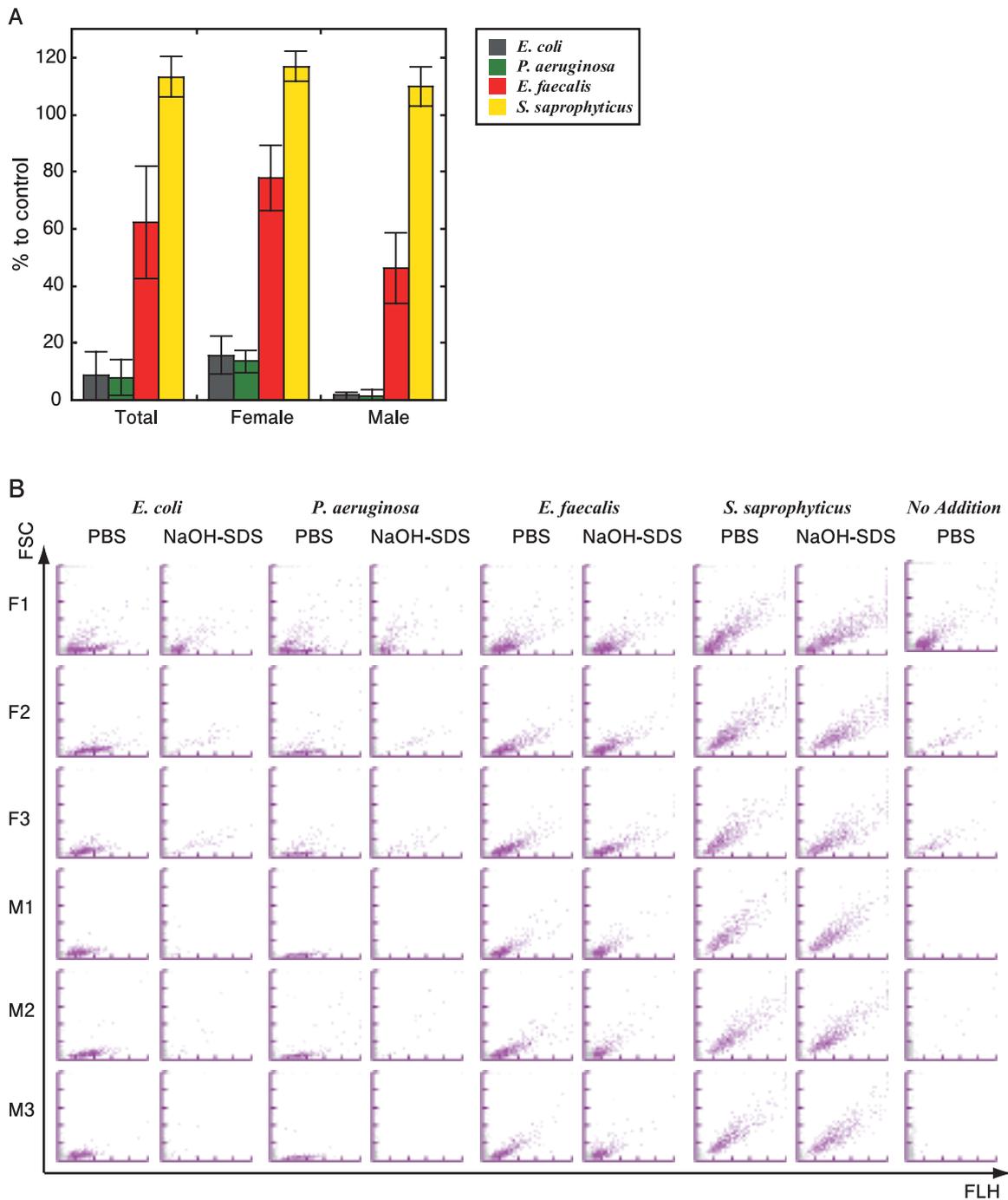


図7. 尿中培養した細菌も NaOH-SDS に対して同様の反応性を示す

- (A) グラム陽性菌 (*S. aureus*, *E. faecalis*) とグラム陰性菌 (*E. coli*, *P. aeruginosa*) を 6 名のボランティア (男性 3 名, 女性 3 名) より採取した随意尿中で対数増殖期中期まで培養し, NaOH-SDS 試薬, または陰性対照の PBS と反応させた. 数値は陰性対照を 100 としたパーセンテージに換算し, 平均値と標準偏差をグラフに示している.
- (B) NaOH-SDS 反応前後の代表的な BACT スキャットグラム. 5 分間反応後の細菌培養液, または陰性対照を示す. 図中左の F1-F3 は女性の尿, M1-M3 は男性の尿を示す.

## 考 察

本研究では、液体培地中のグラム陽性菌およびグラム陰性菌を識別する、迅速で単純な方法を考案し、この方法の妥当性について培養した標準菌株を用いて検討した。本法は二つの要素技術に基づいている。一つは、グラム判定のためにプラスミド抽出方法のNaOH-SDS溶菌液を用いたことである。NaOH-SDS溶菌液は30年以上前に*E. coli*からのプラスミド抽出法（いわゆる「アルカリ法」）のために開発された<sup>27, 34)</sup>。アルカリ法は、操作が簡単なこと、コストが低いこと、および再現性が良いことから、現在に至るまで最も一般的なプラスミド抽出法となっている。しかし、*E. coli*用に考案されたプラスミド抽出法のNaOH-SDS溶菌液が、グラム陽性菌を溶解するには十分でないこと<sup>35, 36)</sup>は、グラム陽性菌を研究した経験のある分子生物学者の間ではよく知られている。もう一つは、細菌細胞を数えるためのフローサイトメーターとしてUF-1000iを用いたことである。UF-1000iは細菌専用流路を有しており、細菌は其中で核酸を染色する蛍光染料で染色されて細胞残屑と明確に区別されるため、UF-1000iは1分以内に尿検体中の細菌数を計数できる<sup>13)</sup>。測定の結果はUF-1000i解析ソフトウェアのメイン画面に表示され、操作者は尿中の細菌数と細菌スキャッタグラムのパターンをひと目で確認できる（**図8**）。

本研究では、日常的な臨床検査に適用可能な新しい方法の考案を目標としている。そのため、操作方法はできるだけ単純なことが望ましい。本法の要素技術のもとになった*E. coli*からのプラスミド抽出法では、培養液中の菌はまず遠心によって集められ、反応溶液のpHを調節するためにトリス緩衝液（pH 8.0）、糖（グルコースまたはショ糖）およびキレート化剤（EDTAまたはCDTA）を含んでいる専用溶液の中で再懸濁された後にNaOH-SDS溶液で溶菌を行うが<sup>28, 29, 34)</sup>、本研究では単純化のために、検体と同じ体積のNaOH-SDS溶液を、検体モデルとして用いた*E. coli*培養液へ直接加えるように変更可能かどうかを検討した。その結果、NaOH-SDS溶液は培養液への直接添加でも容易に培養液中の*E. coli*を溶解できることが判明した（**図1**）。また、UF-1000i

の細菌計測（BACT）チャンネルでは、尿中の血球細胞の溶血と細菌染色のために、酸性の専用試薬（pH 2.5）が使われる。一方NaOH-SDS溶液には200 mMの水酸化ナトリウムが含まれるが、水酸化ナトリウムは強塩基なので、NaOH-SDS溶液による前処理はUF-1000iによる細菌計数に影響する可能性が懸念された。そこで、NaOH-SDS溶液処理後のアルカリ性溶液を直接、UF-1000iを用いた細菌計数に使えるかどうかについても確認した。その結果、反応液中の菌数は、反応液のpH調節を行わなくてもUF-1000iを用いて計数できることも示された（**図1**、**図2**）。日常検査で使用できる単純な方法を開発するという点で、これらの二つの成功は重要であった。さらに、実際の尿検体はpHが3から8の間であることから、pHが酸性の液体培地を用いて培養した*E. coli*がNaOH-SDS溶液で溶菌できるかどうかを確認したところ、問題なく溶菌できた（**図2**）。この結果から、pHの低い尿中に存在する細菌に対しても、NaOH-SDS溶液は適切な試薬であることが改めて確認できた（**図2**）。

グラム陽性菌に対するNaOH-SDS溶液の反応性を検討するために、細菌尿から最も頻繁に検出されるグラム陽性菌の一つである*E. faecalis*<sup>22, 30, 31)</sup>について、NaOH-SDS溶液による前処理を行った。その結果、本法では*E. faecalis*は完全には溶解されないことを確認した（**図3**）。この実験の結果はまた、*E. coli*と*E. faecalis*のNaOH-SDS溶液への反応性の違いはUF-1000iを用いて定量的に検出できることを示していた。したがって、本法を用いて、液体培養液中のグラム陰性菌とグラム陽性菌とが判別できる可能性があるかと結論づけた（**図3**）。

次にNaOH-SDS溶液によるグラム判定のための至適反応時間について検討した。まず、グラム陰性菌を溶解する最短の反応時間を検討し、5分間が、我々が用いたグラム陰性菌を溶解するのに十分な反応時間であることを見出した（**図3**）。検討に用いた4種のグラム陰性菌株の中で、NaOH-SDS溶液に対する抵抗性が最も強かったのは*A. baumannii*（アシネトバクター・バウマニ）であったが、この結果は、*A. baumannii*にはグラム不定性の性質があること<sup>39)</sup>と一致していた。さらに、グラム陽性菌を溶解しない



図8. 全自動尿中有形成分分析装置 UF-1000i のメインウィンドウ

(A) 陰性対照として4℃で保存した女性ボランティア尿

(B) Aと同じ女性ボランティア尿中で *E. faecalis* を4時間培養した後、等量のPBSで希釈したもの。

(C) Aと同じ女性ボランティア尿中で *E. faecalis* を4時間培養した後、NaOH-SDS溶液と反応させたもの、をそれぞれ測定したUF-1000i制御ソフトウェアのメインウィンドウ。

パネルA中の赤枠はBACTスキャットグラムとそこで計数した菌数を、BとCの▲は尿中に存在した赤血球の出現位置を示す。

最長の反応時間を検討したところ、5分間の反応では実験に使用したグラム陽性菌は全て陰性対照の50%以上の計数値を示したが、反応時間が10分を超えると *E. faecalis* の計数値は顕著に減少したことから、グラム陽性菌に最適な反応時間も5分間であることを見出した(図4)。以上の結果から、我々は、室温での至適反応時間は5分間であると結論づけた。

ここまでの実験を通じて、グラム陽性菌である *S. aureus* の計数値が、NaOH-SDS 溶液との反応直後に一時的に増加することが判明した。対照的に、グラム陰性菌を処理した際には、菌数の増加は見られなかった。NaOH-SDS 溶液反応によるグラム陽性菌数計数値が一時的に増加する理由を解明するために、我々は、NaOH-SDS 溶液との反応前後の *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* の顕微鏡観察を行なった。その結果、グラム陰性菌である *E. coli* は NaOH-SDS との反応によって完全に溶菌し消失したが、グラム陽性菌である *S. aureus*, *B. cereus* は未処理時には複数の菌が結合した塊(菌塊)を形成しており、この菌塊が NaOH-SDS 溶液との反応後に小片に分割されることを見出した(図5)。これらの結果は、NaOH-SDS 処理によるグラム陽性菌の一時的な増加は菌塊が分割されたためであること、UF-1000i が菌塊を個々の粒子として検知していること、を示していた。一方、寒天培地を用いた半量の細菌培養の場合でも、菌塊中の細菌はその細胞壁によって強固に結合しているために<sup>37)</sup>、培養の過程で菌塊は容易には壊れないことが予想される。この仮説は、UF-1000i と半定量的培養との菌数の希釈直線性の一致が *E. coli* および *S. aureus* の両方で観察されたという以前の報告と一致している。以上の結果より我々は、NaOH-SDS 溶液との反応直後におけるグラム陽性菌数の一時的な増加は、主として NaOH-SDS 処理による菌塊の分割によると結論づけた。

なお、これを確認するために、我々は NaOH-SDS 溶液と反応させた細菌数を半定量的培養法で計数することも試みた。細菌培養液を NaOH-SDS 溶液と室温で5分間反応させた後にそのまま、あるいは希塩酸または酢酸で中和した後にハートインフュージョン寒天培地上に殖菌したが、コロニーの出現は認められなかった。この結果は、NaOH-SDS 溶液との反応そのもの、もしくは NaOH-SDS 試薬との反応とそ

の後の寒天培地への植菌という物理的な刺激とが、細菌を殺してしまった可能性を示すと考えられた。

また一連の実験の過程で、同様の実験条件下で同一の細菌でもスキヤッタグラムのパターンがやや異なる場合があった(図2Bと図2D, など)。これは、UF-1000i で用いられる染色試薬の染色性が細菌の増殖状態によって変化するという以前の実験結果と一致すると考えられた<sup>40)</sup>。

これらの実験に加えて、我々は、UF-1000i の代わりに汎用のフローサイトメーターを用いても、同様の判定ができるかどうかを検討した。未処理あるいは陰性対照として PBS と混合した細菌培養液を用いると、UF-1000i の BACT スキヤッタグラムを再現することができたが、NaOH-SDS 溶液と反応させた菌を用いると、UF-1000i BACT スキヤッタグラムを再現することができなかった(図9)。

続いて、ハートインフュージョン液体培地で培養した8種のグラム陽性菌株および8種のグラム陰性菌株を用いて、本法がより多種の菌に対して使えるかどうかを検討した。その結果、使用したすべての菌株について、NaOH-SDS 処理に対する反応性の違いによってグラム陽性菌とグラム陰性菌が明白に識別されることを示すことができた(図6)。このことは、本法が細菌細胞壁の構造的差異を検出しているという可能性を支持していると考えられた。

最後に、複数の健常人ボランティア尿中で培養した2種のグラム陽性菌株および2種のグラム陰性菌株を用いて、本法が尿中細菌に適用できるかどうかを検討した。その結果、健常人ボランティア尿中の細菌に対しても、NaOH-SDS 処理に対する反応性の違いによってグラム陽性菌とグラム陰性菌が明白に識別されることを示すことができた(図7)。なお、健常人ボランティア尿中、特に女性の尿中には、採尿時に混入したと思われる有意な数の細菌が存在しており、結果には若干の影響を与えていた。また、赤血球や白血球、あるいは円柱などの、細菌以外の尿沈渣成分が多数存在している尿も見られたが、このような混入物の存在にもかかわらず、グラム陽性菌と陰性菌の陰性対照との比には明確な境界が存在することが、この実験から示された(図7)。これらの結果は、本法が尿検体に直接適用できる可能性を

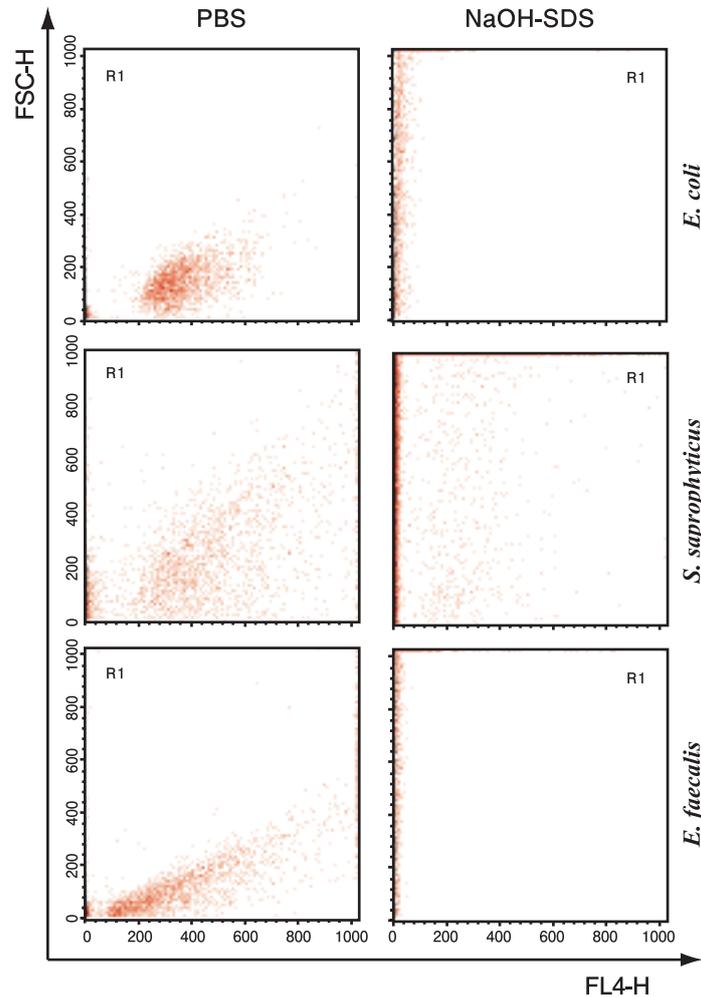


図9. 汎用のフローサイトメーターで再現した BACT スキャットグラム

陰性対照 (Control, 左列) または NaOH-SDS 溶液と反応させた (NaOH-SDS, 右列) 細菌培養液 (上段: *E. coli*, 中段: *S. saprophyticus*, 下段: *E. faecalis*) を FACSCalibur で解析したものの。

強く示唆する。さらに、UF-1000i は前処理なしで 1 分以内に尿中の細菌数を計数できるので、特殊な技能、あるいは十分な経験のない医療スタッフであっても、本法を使用することで、10 分以内に液中の細菌のグラム染色性を推定できると考えられた。

以上の結果から、NaOH-SDS 処理と UF-1000i による菌数測定を組み合わせた本法は、液体試料中に存在する細菌のグラム染色性を推定するための、迅速で、単純で、有効な技術であると結論づけた。本法は、特に UTI の既往歴がなく起炎菌の推定が容易でない UTI 患者の治療方針策定に有用である可能性がある。本法で用いる 200 mM の水酸化ナトリウムは

劇物取締法上の劇物にはあらず、また SDS も非常にありふれた界面活性剤であるので、輸送・保管にも大きな問題は考えにくい。さらに我々の試算では、労務費を除いた UF-1000i 測定の一回あたりの単純コストはグラム染色と同程度であり、また NaOH-SDS 溶液のコストは非常に小さいので、我々の方法はコスト的にも見合うものであると考えられる。ただし、NaOH-SDS 溶液の機器本体に与える長期的な影響については、検討が必要な可能性がある。今後は、本法の細菌尿中細菌のグラム判定への応用可能性について、実際の臨床検体を用いて検証していきたい。

## 注 釈

この論文は、査読付き英文論文誌 PLOS ONE 誌上で2012年10月に公開された論文(Wada A, Kono M, Kawauchi S, Takagi Y, Morikawa T, et al. (2012) Rapid Discrimination of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria in Liquid Samples by Using NaOH-Sodium Dodecyl Sulfate Solution and Flow Cytometry. PLOS ONE 7 (10) : e47093. doi:10.1371/journal.pone.0047093) を日本語訳し、一部改変したものです。なお、元になった論文は PLOS ONE 誌の Web ページ (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0047093>) から無料で閲覧・ダウンロード可能です。

## 謝 辞

村谷哲郎先生(株式会社キューリン)と安田満先生(岐阜大学医学部)には、研究に関する重要なディスカッションと、元になった論文の原稿への適切なコメントを頂きました。

## 参考文献

- 1) Grabe M et al. (2011) Guidelines on Urological Infections. EAU European Association of Urology.
- 2) SUBCOMMITTEE ON URINARY TRACT INFECTION, STEERING COMMITTEE ON QUALITY IMPROVEMENT AND MANAGEMENT. Urinary Tract Infection : Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of the Initial UTI in Febrile Infants and Children 2 to 24 Months. Pediatrics 2011 ; **128** (3) : 595-610
- 3) Gupta K et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women : A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. Clin Infect Dis 2011 ; **52** : e103-20
- 4) Imirzalioglu C et al. Hidden pathogens uncovered : metagenomic analysis of urinary tract infections. Andrologia 2008 ; **40** : 66-71
- 5) Brook I. Urinary tract and genito-urinary suppurative infections due to anaerobic bacteria. Int J Urol 2004 ; **11** : 133-141
- 6) Palmqvist E et al. Difficulties for primary health care staff in interpreting bacterial findings on a device for simplified urinary culture. Scand J Clin Lab Invest 2008 ; **68** : 312-316
- 7) Williams GJ et al. Absolute and relative accuracy of rapid urine tests for urinary tract infection in children : a meta-analysis. Lancet Infect Dis 2010 ; **10** : 240-250
- 8) Whiting P et al. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of tests for the diagnosis and investigation of urinary tract infection in children : a systematic review and economic model. Health Technol Assess 2006 ; **10** : iii-iv, xi-xiii, 1-154
- 9) Nanda N et al. Novel biomarkers for the diagnosis of urinary tract infection-a systematic review. Biomark Insights 2009 ; **4** : 111-121
- 10) Nagy E et al. Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 2009 ; **15** : 796-802
- 11) Lehmann LE et al. Rapid qualitative urinary tract infection pathogen identification by SeptiFast real-time PCR. PLoS One 2011 ; **6** : e17146
- 12) Mohan R et al. Clinical validation of integrated nucleic acid and protein detection on an electrochemical biosensor array for urinary tract infection diagnosis. PLoS One 2011 ; **6** : e26846
- 13) Saito T et al. Feasibility of flow cytometry for the detection of bacteria from body fluid samples. J Infect Chemother 2005 ; **11** (5) : 220-225
- 14) Hauss O. Bringing Urinalysis into the 21st Century : From Uroscopy to Automated Flow Cytometry. Sysmex J Int. 2008 ; **18** : 38-43
- 15) Okada H et al. Enumeration of bacterial cell numbers and detection of significant bacteriuria by use of a new flow cytometry-based device. J Clin Microbiol 2006 ; **44** (10) : 3596-3599
- 16) 岡田浩 他. 全自動尿中有形成分分析装置 UF-1000i を用いた尿中細菌検出の基礎的検討. Sysmex J.

- 2007 ; **30** : 95-101
- 17) Nanos NE, Delanghe JR. Evaluation of Sysmex UF-1000i for use in cerebrospinal fluid analysis. Clin Chim Acta 2008 ; **392** (1-2) : 30-33
- 18) Manoni F et al. Cutoff values for bacteria and leukocytes for urine flow cytometer Sysmex UF-1000i in urinary tract infections. Diagn Microbiol Infect Dis 2009 ; **65** (2) : 103-107.
- 19) Wang J, et al. Evaluation of the Sysmex UF-1000i for the diagnosis of urinary tract infection. Am J Clin Pathol 2010 ; **133** (4) : 577-582
- 20) Xiaozhou Hu, Jic Zhang, Xiaowei Zhang. Evaluation of the Sysmex UF-1000i Urine Analyzer as a Screening Test to Reduce the Need for Urine Cultures for Urinary Tract Infection. Labmedicine 2010 ; **41** (6) : 349-352
- 21) van der Zwet WC et al. Evaluation of the Sysmex UF-1000i (R) urine flow cytometer in the diagnostic work-up of suspected urinary tract infection in a Dutch general hospital. Clin Chemlab Med 2010 ; **48** (12) : 1765-1771
- 22) Pieretti B et al. Diagnosis of bacteriuria and leukocyturia by automated flow cytometry compared with urine culture. J Clin Microbiol 2010 ; **48** (11) : 3990-3996
- 23) Jiang T et al. Urine particles analysis : performance evaluation of Sysmex UF-1000i and comparison among urine flow cytometer, dipstick, and visual microscopic examination. Scand J Clin Lab Invest 2011 ; **71** (1) : 30-37
- 24) De Rosa R et al. Evaluation of the Sysmex UF1000i flow cytometer for ruling out bacterial urinary tract infection. Clin Chim Acta 2010 ; **411** (15-16) : 1137-1142
- 25) Kadkhoda K et al. UF-1000i flow cytometry is an effective screening method for urine specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2011 ; **69** (2) : 130-136
- 26) Manoni F et al. Urine particle evaluation : a comparison between the UF-1000i and quantitative microscopy. Clin Chemlab Med 2010 ; **48** : 1107-1111
- 27) Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010 ; **2** (5) : a000414
- 28) Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979 ; **7** : 1513-1523
- 29) Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning : A Laboratory Manual Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 30) Kau AL et al. Enterococcus faecalis tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J mice. Infect Immun 2005 ; **73** : 2461-2468
- 31) Vebo HC et al. Comparative genomic analysis of pathogenic and probiotic Enterococcus faecalis isolates, and their transcriptional responses to growth in human urine. PLoS One 2010 ; **5** : e12489
- 32) Hovelius B, Mardh PA. Staphylococcus saprophyticus as a common cause of urinary tract infections. . Rev Infect Dis 1984 ; **6** : 328-337
- 33) Saadeh SA, Mattoo TK. Managing urinary tract infections. . Pediatr Nephrol 2011 ; **26** : 1967-1976.
- 34) Ish-Horowicz D, Burke JF Rapid and efficient cosmid cloning. Nucleic Acids Res 1981 ; **9** : 2989-2998
- 35) Schwarz S, Cardoso M, Blobel H. Plasmid-mediated chloramphenicol resistance in Staphylococcus hyicus. J Gen Microbiol 1989 ; **135** : 3329-3336
- 36) Voskuil MI, Chambliss GH. Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from Bacillus subtilis. Appl Environ Microbiol 1993 ; **59** : 1138-1142
- 37) Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol Mol Biol Rev 1999 ; **63** : 174-229
- 38) Tanji Y et al. *Escherichia coli* detection by GFP-labeled lysozyme-inactivated T4 bacteriophage. J Biotechnol 2004 ; **114** : 11-20
- 39) Mason DJ et al. A fluorescent Gram stain for flow cytometry and epifluorescence microscopy. Appl Environ Microbiol **64** : 2681-2685
- 40) 和田淳 他. 全自動尿中有形成分分析装置 UF-1000i における, 細菌の増殖状態と BACT スキャットグラム上の出現位置との関係. Sysmex J. 2011 ; **34** (Suppl.1) : 53-62

# Rapid Discrimination of Gram-positive and Gram-negative Bacteria in Liquid Samples by Using NaOH-Sodium Dodecyl Sulfate Solution and Flow Cytometry

Atsushi WADA, Mari KONO, Sawako KAWAUCHI, Yuri TAKAGI and Takashi MORIKAWA

Cell Analysis Center, Scientific Affairs, Sysmex Corporation, 1-3-2 Murotani, Nishi-ku, Kobe, 651-2241

## SUMMARY

---

**Background:** For precise diagnosis of urinary tract infections ( UTI ), and selection of the appropriate prescriptions for their treatment, we explored a simple and rapid method of discriminating gram-positive and gram-negative bacteria in liquid samples.

**Methodology/Principal Findings:** We employed the NaOH-sodium dodecyl sulfate ( SDS ) solution conventionally used for plasmid extraction from *Escherichia coli* and the automated urine particle analyzer UF-1000i ( Sysmex Corporation ) for our novel method. The NaOH-SDS solution was used to determine differences in the cell wall structures between gram-positive and gram-negative bacteria, since the tolerance to such chemicals reflects the thickness and structural differences of bacterial cell walls. The UF-1000i instrument was used as a quantitative bacterial counter. We found that gram-negative bacteria, including *E. coli*, in liquid culture could easily be lysed by direct addition of equal volumes of NaOH-SDS solution. In contrast, *Enterococcus faecalis*, which is a gram-positive bacterium, could not be completely lysed by the solution. We then optimized the reaction time of the NaOH-SDS treatment at room temperature by using 3 gram-positive and 4 gram-negative bacterial strains and determined that the optimum reaction time was 5 min. Finally, in order to evaluate the generalizability of this method, we treated 8 gram-positive strains and 8 gram-negative strains, or 2 gram-positive and 2 gram-negative strains incubated in voluntary urine from healthy volunteers in the same way and demonstrated that all the gram-positive bacteria were discriminated quantitatively from gram negative bacteria using this method.

**Conclusions/Significance:** Using our new method, we could easily discriminate gram-positive and gram-negative bacteria in liquid culture media within 10 min. This simple and rapid method may be useful for determining the treatment course of patients with UTIs, especially for those without a prior history of UTIs. The method may be easily applied in order to obtain additional information for clinical prescriptions from bacteriuria.

**Key Words** UF-1000i, Urinary Tract Infections, Bacteria, Gram Stain

---