

全自動尿中有形成分分析装置 UF-1000*i*による細菌スキャッタグラムと 尿培養による細菌同定結果の比較

小澤 秀夫^{*1}, 矢島 尚子^{*2}, 小林 秀行^{*3}

*1 川崎医科大学附属川崎病院 泌尿器科：岡山市北区中山下 2-1-80 (〒700-8505)

*2 川崎医科大学附属川崎病院 検査部

*3 シスメックス株式会社 学術部

要 旨

尿中有形成分分析装置 UF-1000*i* (UF-1000*i*; シスメックス社)における細菌スキャッタグラムのドットパターンによる細菌菌種推定の可能性について検討した。UF 計測を施行し WBC10 個/μL 以上、かつ同検体の尿培養細菌同定検査または淋菌 RNA 増幅法にて細菌菌種が判明した 81 例の尿検体を用いた。細菌スキャッタグラムにおいて、ドットのパターンは原点を通り X 軸と 30 度をなす線より明らかに下に分布する“下方パターン”, 30 度の線近傍より上に分布する“上方パターン”, 下方から上方まで幅広く分布する“幅広パターン”の 3 種類に分けた。分類内訳は, “下方パターン”57%, 上方パターン 20%, 幅広パターン 23%であった。“下方パターン”の菌種は, グラム陰性桿菌類が多数 (89%) を占めたが, グラム陰性球菌類に属する淋菌も認めた。“上方パターン”では, 逆にグラム陽性球菌類を多く (69%) 認めた。“幅広パターン”では, 複数菌が検出されることが多く, メチシリン耐性球菌類 (MRS), ESBL 産生大腸菌など多剤耐性を示す細菌が 32%において検出された。“幅広パターン”以外で多剤耐性菌が 5%しか検出されなかったのと比較し, “幅広パターン”では多剤耐性菌検出頻度が有意に高かった ($p=0.02$)。

UF-1000*i*の細菌チャンネルのスキャッタグラムのドットパターンから, 尿培養結果を待つことなく, 受診当日に尿路感染の起炎菌が桿菌であるか球菌であるかを推測することが可能であると思われた。この方法は, 尿路感染症症例の抗菌薬選択における目安になる可能性が示唆された。

キーワード 尿路感染症, 起炎菌, UF-1000*i*, 抗菌薬

はじめに

尿路感染症は腎, 尿管, 膀胱, 尿道に起こった非特異的炎症を指し, 大部分は腸内細菌の感染による。多くの場合, 細菌は外尿道口から侵入し, 尿路を上行し, 膀胱や腎に感染を起こす¹⁾。尿路感染症は尿路に感染症を起こしやすい基礎疾患を有する場合と有さない場合に分類される。全身性または局所性の基礎疾患を有さない場合を単純性尿路感染症といい, 有する場合を複雑性尿路感染症と呼んでいる。単純性と複雑性では, 病型や起炎菌の種類, 症状, 治療

方針, 治療に対する反応などに違いがあり, 分けて論じられる。臨床の現場では, 外来初診時に検尿により尿路感染症を診断しつつ, 尿細菌培養および抗生剤感受性検査をオーダーする。尿細菌培養の結果が出るまでには数日間かかるため, 初診時より抗生剤によるエンピリックな治療を開始せざるをえないが, 複雑性尿路感染症であれば最初のエンピリック抗生剤治療は無効であることが多く, 尿細菌培養結果が出たときに初診時から数日遅れて原因疾患を検索しなければならないのが現状である。

非遠心尿のフローサイトメトリー法による尿中有形成分測定は、2006年4月の診療報酬改訂により尿沈渣顕微鏡検査(区分D002, 25点)から独立して、新規に保険収載(区分D002-2, 30点)され、尿中有形成分分析装置は一般病院でも普及しつつある。尿中有形成分分析装置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て、非遠心尿中の赤血球、白血球、上皮細胞、円柱、細菌を72秒で定量できるシステムである。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)は、赤色半導体レーザー(波長λ=635nm)を採用し、従来機種より小型化、省電力化されている。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(以下、BACTチャンネル)で高精度な細菌定量測定を行うとともにそのスキャッタグラムを画像表示することが可能である²⁾。

UF-1000iの細菌スキャッタグラムのドット分布とX軸のなす角度で細菌菌種が大まかに推測できることは、学会や論文などですでにある程度報告がなされている。角度30度未満ではグラム陰性桿菌が検出される頻度が高く、30度以上では球菌類が検出される頻度が高いことは、村谷や中川らが報告している^{3,4)}。ただし、実際の泌尿器科外来受診患者群のみを用いて、細菌スキャッタグラムのドット分布とX軸となす角度で、細菌菌種を推定することが可能かどうかを論じた報告は未だに発表されていない。

今回、我々は初回来院時に抗菌薬選択の参照とするために、実際の患者検体においてUF-1000iにおける細菌スキャッタグラムのドットパターンによる桿菌か球菌かの大まかな細菌菌種推定の可能性について検討したので報告する。

材料および方法

2010年2月から6月までの期間、川崎医科大学附属川崎病院泌尿器科を受診し、UF-1000iによる計測を実施し、WBC10個/μL以上、かつ同検体の尿培養細菌同定検査にて細菌種が判明した78例の検体と、同時期に淋菌(*Neisseria Gonorrhoeae*)に対するTranscription-Mediated amplification法を用いたRNA増幅による検査にて淋菌陽性であった3例、合計81例(男性23例、女性58例)(平均年齢59.6歳:17~89歳)の尿検体を用いた。対象の内訳を図1に示す。年齢では70歳代が33%と3分の1を占め一番多く、ついで60歳代と80歳以上が18%で、若年になるにしたがって頻度は下がるが、20歳代は30歳代よりも多く、若年層の単純性膀胱炎のピークに一致していた。また、基礎疾患では、急性膀胱炎が多く48%を占め、前立腺炎、前立腺肥大症、間歇導尿感染における感染尿などの順であった。尿細菌培養で検出された細菌菌種を図2に示す。桿菌類が78%、球菌類が22%と桿菌類多く、その中でも大腸菌が43%と多数を占めていた。

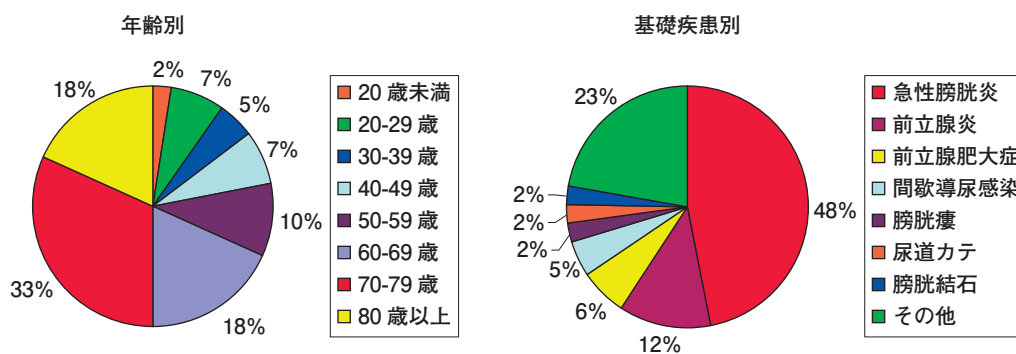


図1. 症例の分布

UF-1000i の BACT チャンネルにおけるドット分布パターンに注目した。尿中沈渣成分のドット分布パターンの全体像を把握できる Sediment チャンネルのスカッタグラムを示す(図3)。Sediment チャンネルと BACT チャンネルはいずれも、前方散乱光(FSC: Forward scattered light intensity)と蛍光信号強度(FL: Fluorescent light intensity)の組み合わせで2次元

スカッタグラムを作成している。縦軸(Y軸)の前方散乱光は粒子あるいは細菌集塊などの大きさを反映しており、横軸(X軸)の蛍光信号強度はそれらの粒子や集塊の細胞核染色度を反映している。白血球、上皮細胞、精子などは細菌に比べて粒子が圧倒的に大きく、細菌集塊の分布する付近には、Y軸に近い領域に赤血球が分布しているのみである。

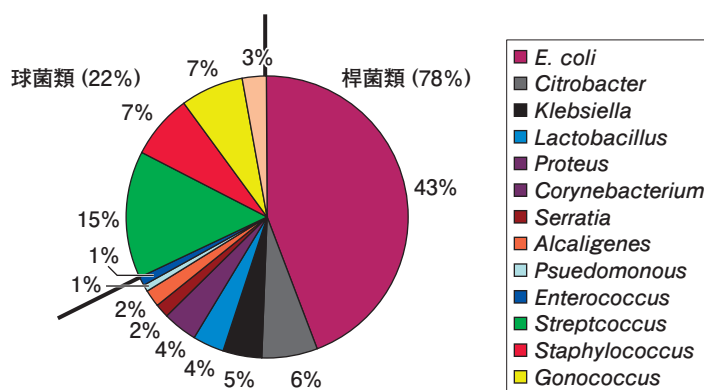


図2. 尿培養で検出された細菌の菌種

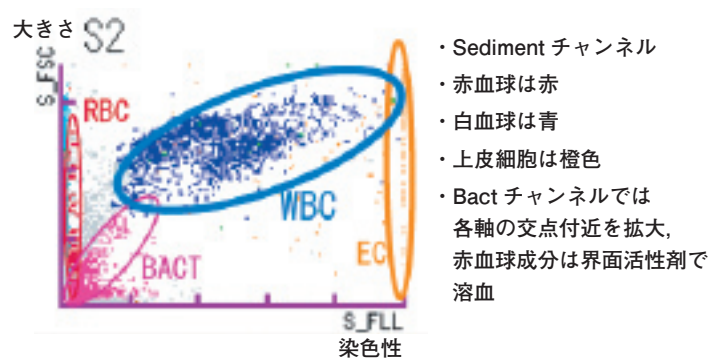


図3. スカッタグラム (Sediment チャンネル) の表示例

S_FSC: Forward scattered light intensity (大きさ)
 S_FLL: Fluorescent light intensity (low) (染色性)
 RBC: 赤血球 (赤色)
 WBC: 白血球 (青色)
 BACT: 細菌 (ピンク色)
 EC: 上皮細胞 (橙色)

これに対して、BACT チャンネルは、細菌などの比較的小さな粒子が分布する領域である Sediment チャンネルにおける XY 各軸の交点付近を拡大表示している。BACT チャンネル用の染色液 UF II サーチ BAC は、細菌の核酸を特異的に染色するポリメチン系色素を使用しており、細菌以外で同様の大きさを呈する尿中細胞の微小断片などは染色されない。さらに、希釈液の UF II パック BAC には、カチオン系界面活性剤が含まれており、血球成分を溶血させることができる。これら染色液、希釈液の応用により、細菌以外の細胞成分やその微小断片は染色されない原理となっている。

UF-1000i の解析画面 (22 歳女性: 急性単純性膀胱炎) を図 4 に示す。画面左にパラメーターの一覧が示され

ており、白血球と細菌が多数存在していることがわかる。BACT チャンネルは画面右下に 2 次元スクッタグラムで示されている。本症例では細菌のドット分布が X 軸となす角度が明らかに 30 度以下である。

今回の解析では、BACT チャンネルにおける細菌ドットの分布パターンは、原点を通る X 軸から 30 度の線より明らかに下に分布する“下方パターン”、30 度の線の近傍あるいはそれより上に分布する“上方パターン”、下方から上方まで幅広く分布する“幅広パターン”の 3 種類に分類した。

なお、有意差の検定には StatMate III (アトムズ社) を用い、2 群間の差の検定では Wilcoxon 検定、Mann-Whitney U 検定、 χ^2 検定を使用した。いずれも、 $p < 0.05$ をもって有意の差とした。

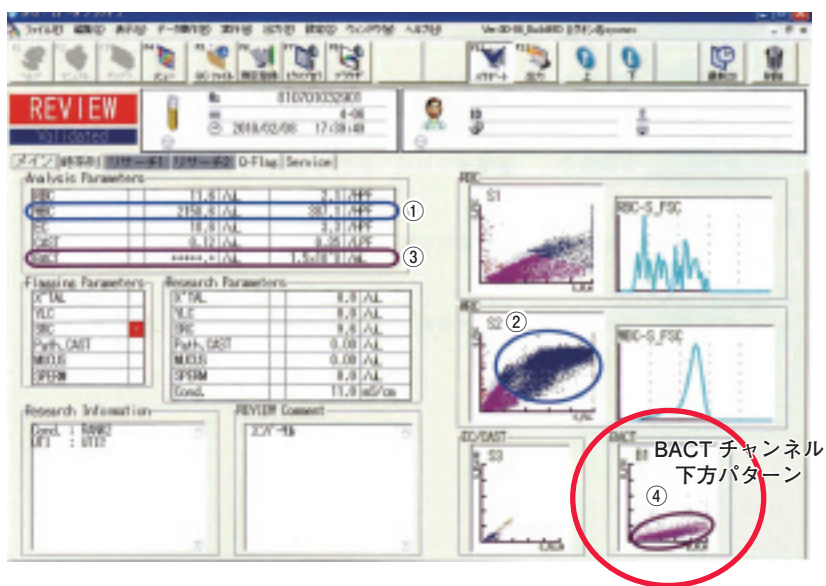


図 4. UF-1000i 解析画面 (急性単純性膀胱炎)

- 本法では、右下の BACT チャンネルのグラフに注目する。
 X 軸からの角度が 30 度よりも低い領域に細菌のドットが分布している (下方パターン)。
 ①左の下から 3 段目の表: WBC (白血球数) 387.1/HPF と尿中白血球増加あり。
 ② Sediment チャンネルの白血球強調画像 (右から 2 列目, 下から 2 段目のグラフ) では青色のドットが多数認められる。
 ③左の下から 3 段目の表: BACT (細菌数) $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ と尿中細菌増加あり。
 ④ BACT チャンネル

結果

図5-Aに“下方パターン”のBACTチャンネルのグラフを示す。下方パターンには46例(全体の57%)が分類された。その菌種の内訳は、大腸菌32例(70%)、*Citrobacter*属4例(9%)、*Klebsiella*属3例(7%)、*Gonococcus*属3例(7%)などの順であり、41例(89%)がグラム陰性桿菌であった。

図5-Bに“上方パターン”のBACTチャンネルのグラフを示す。上方パターンには16例(全体の20%)が分類された。その菌種の内訳は、*Enterococcus*属5例(31%)、*Staphylococcus*属3例(19%)、*Streptococcus*属2例(13%)、大腸菌2例(13%)などの順であり、11例(69%)がグラム陽性

球菌であった。

図5-Cに“幅広パターン”のBACTチャンネルのグラフを示す。“幅広パターン”には19例(23%)が分類された。尿培養で2種類以上の菌が同定された複数菌感染症例14例のうち11例(79%)が“幅広パターン”を示した。個々の検体において同定された菌種を表1に示す。複数菌感染のパターンでは、グラム陰性桿菌とグラム陽性球菌がそれぞれ1菌種以上は検出されることが多かった。メチシリン耐性球菌(MRSA)、ESBL産生大腸菌など多剤耐性を示す細菌が6例(32%)において検出された。“幅広パターン”以外の症例でこれらの多剤耐性菌が3例(5%)のみに検出されたのと比較して、“幅広パターン”での多剤耐性菌検出頻度が有意に高かった(p=0.02)。

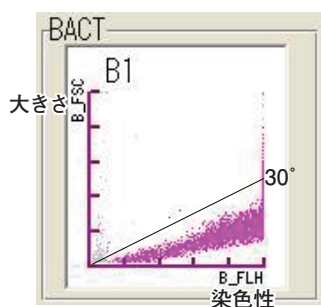


図5-A. 下方パターン
30度よりも低い角度に細菌集塊がドット分布している。

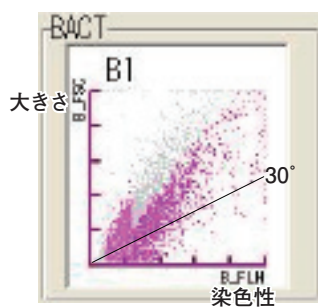


図5-B. 上方パターン
30度よりも高い角度に細菌のドットが分布している。

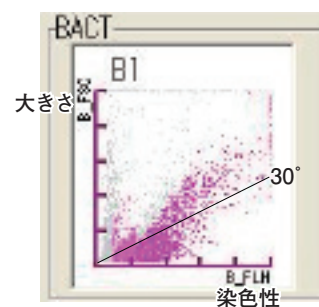


図5-C. 幅広パターン
30度よりも高い角度にも低い角度にも細菌のドットが分布している。

表1. 幅広パターン症例における尿細菌培養での検出細菌の菌種一覧
左から、検出量の多い細菌名を表示している。

86 F	<i>E. faecalis</i>		
84 F	<i>E. coli</i>	<i>S. haemolyticus</i> MRS *	
82 F	<i>E. coli</i> ESBL *		
81 M	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i>	
79 F	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. faecalis</i>	
79 F	MRSA *		
75 F	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>S. haemolyticus</i> MRS *
74 M	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i>	
73 F	<i>E. coli</i>	<i>S. agalactiae</i>	
72 F	<i>E. coli</i> ESBL *	<i>S. salivarius</i>	
72 M	<i>E. coli</i>		
72 M	<i>E. coli</i>		
70 F	<i>Streptococcus</i> spp.		
66 F	<i>E. faecalis</i>	<i>Lactbacillu</i> spp.	
44 F	<i>S. epidermidis</i>		
39 M	<i>M. morgani</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
36 M	<i>E. coli</i>	<i>Alcaligene</i> spp.	<i>E. faecalis</i>
23 F	<i>E. coli</i>		
22 F	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i> MRS *	

*多剤耐性菌

考 察

尿路感染症患者では、外来初診時に検尿により診断を行う。この時、何らかの方法で球菌と桿菌の判別が可能であれば、特にグラム陽性球菌に感染した患者においては、複雑性尿路感染症の可能性が早期に明らかとなり、QOLの向上が得られる。さらに、グラム陰性桿菌に感染した症例では適正な抗菌薬を短期間投与で治療することができる。しかし、尿細菌培養検査では、定量白金耳を用いコロニー数確認用の寒天培地に一定量の尿を塗布し一昼夜またはその翌日まで培養した結果から判定がなされる。このため、初診時に培養検査結果は出ず、確定診断に日数を要するのが現状である。この点で、グラム染色によるグラム陽性菌と陰性菌の鑑別は有用な方法である。しかし、操作者の技術に結果が左右されたり、細菌菌体を見逃したりする可能性もある⁵⁾。これに対して、UF-1000iは、本来の機能である細胞分析機能により、尿中赤血球数、白血球数、細菌数を表示することにより、尿路感染症の診断に寄与する⁶⁻⁸⁾。さらに、余分な処理を追加することなく、細菌スキヤッタグラムを表示させることが可能である²⁾。今回、この細菌スキヤッタグラムのドットパターンの角度計測により、実際の臨床検体に対して球菌と桿菌との大まかな判別が迅速(約1分)に可能であった。この方法により、通常検査法に余分な処理を追加することなく、迅速に起炎菌が球菌か桿菌かの鑑別が可能と思われ、きわめて有用な方法と思われた。

村谷らは、UF-1000iの細菌チャンネルのスキヤッタグラムのX軸からの角度を同定済みの菌株の懸濁液を用いて測定している。その結果、グラム陽性球菌の角度は40度前後、グラム陽性桿菌である*Corynebacterium*は43度であった。一方、グラム陰性桿菌の角度は20度前後、グラム陰性球菌である*Neisseria Gonorrhoeae*の角度は11度であったと報告している。すなわち、スキヤッタグラムのドット分布の角度の違いは、桿菌、球菌の違いによる細菌の形態よりもグラム染色の陽性、陰性で規定される結果が出たという³⁾。我々の検討でも、同様の結果が得られた。このことは、UF-1000iのフローサイトメトリーでは、一個一個の細菌菌体を個別にドットと

して表示し、球菌、桿菌の鑑別をしているのではなく、ある程度の菌体集団をまとめて1つのドットとして表示しているようである。すなわち、グラム陽性球菌群と*Corynebacterium*属(グラム陽性桿菌)はブドウの房状に2ないし3平面内で不規則に分裂しながら増殖するため、染色性の強い比較的大きなドットとして表示されるのに対して、グラム陰性桿菌群や*Neisseria Gonorrhoeae*属(グラム陰性桿菌:双球菌)は一定以上の大きさになると分裂し、個々の菌体は離散し単独で存在するために、菌1個当たりの染色性がほぼ一定となり、フローサイトメトリーにおける細菌核の染色度が球菌の集塊より弱い小さなドットとして表示され、分布がまとまる傾向があるようである⁴⁾。これらのことより、ドット分布の角度の違いは、細菌増殖の性状の違いを2次元スキヤッタグラム上で示している結果であり、このことにより菌種の推測が可能となっている可能性が示唆された。

村谷らの検討では、BACTチャンネルにおけるスキヤッタグラムのドットパターンを30度以上のものと、以下のもので分類している³⁾。一方、我々の検討では“上方パターン”(30度以上のもの)、“下方パターン”(30度に満たないもの)に加えて“幅広パターン”(30度以上にも30度以下にも幅広くドットが分布するパターン)に区分した群も少なからず存在した。これは、我々の対象症例が、泌尿器科外来を受診し、検尿中に白血球が異常数(10個/ μ L以上)あり、尿培養が陽性を示したものすべてを含んでいたからであろう。特に、尿培養検査で複数菌感染が明らかとなった検体の79%が“幅広パターン”を示しており、桿菌と球菌の混合感染の頻度が高かった。また、メチシリン耐性球菌(MRS)、ESBL産生大腸菌などの多剤耐性菌が、有意にこの群に多いことも明らかとなった。先行して抗生剤の投与を受けフィラメント化したグラム陰性桿菌のドットパターンは、角度が高くなるという報告もあり、“幅広パターン”は、抗生剤先行投与を受けても完治することのできなかった複雑性尿路感染症の可能性を疑う所見であると思われた。

スキヤッタグラムのドットパターンによる診断法を尿路感染症治療へ、いかに応用するかは重要な課

題である。抗生剤先行投与のない単純性尿路感染症は、グラム陰性桿菌が起炎菌であることが圧倒的に多いとされているため、“下方パターン”の症例は、*Neisseria Gonorrhoeae*の感染が疑われる男性尿道炎症例を除外すれば、抗生剤先行投与のない単純性尿路感染症が示唆される所見である。すなわち、典型的な“下方パターン”は、通常の広域抗生剤内服薬を短期間投与することで十分治癒しうると考えられる。これに対し、“上方パターン”と“幅広パターン”は複雑性尿路感染症の可能性が疑われるので、初診時すでに高熱や敗血症を合併して緊急を要する症例以外は、エンピリックな抗生剤投与を避け、その原因となる尿路疾患の検索を優先させることが重要と思われた。

単純性尿路感染症と複雑性尿路感染症の症例を分けてドットパターンの出現頻度を検討したり、“下方パターン”は広域抗生剤の短期間投与で全例治癒しうるか、抗生剤の先行投与の有無によりドットパターンがどう変化するか、などに関しては、これからの検討課題であると思われた。

UF-1000iの細菌スキャッタグラムのドットパターン分類の臨床現場での有用性を述べてきたが、もちろん、尿路感染症の診断には、尿中の血球数に加えて、尿沈渣の鏡検、グラム染色が優先されるべきであることは言うまでもない。グラム染色法は所用時間10分程度で、迅速報告も可能であり、起炎菌の推定や抗生剤投与の影響による細菌の形態変化、好中球の細菌貪食の有無など多くの情報を得ることができる。しかし、細菌数が少数の場合は鏡検下で細菌を確認できないこともある。さらに、リアルタイムでグラム染色鏡検ができない施設は少なからず存在するため、尿培養検査に頼らざるをえないのが現状である。UF-1000iでは、フローサイトメトリー法により白血球数、細菌数の表示が短時間で可能であり、既存の報告でその信頼性は十分に証明されている^{2,8)}。さらに、今回我々の検討で、コンピュータ解析画面で自動表示されるBACTチャンネルのス

キャッタグラムのドットパターンから、30度より“下方パターン”は桿菌感染、“上方パターン”は球菌感染、“幅広パターン”は複数菌による複雑性尿路感染症の場合が多数を占めた。この方法は、受診当日に約1分で、尿培養結果を待つことなく、尿路感染の起炎菌が桿菌か球菌か複数菌感染であるかを推定することが可能となるため、尿路感染症症例の抗生剤選択の目安となると思われた。

参考文献

- 1) 松本哲朗, 香川征 監修. 標準泌尿器科学: 第II章 尿路・性器の主要疾患: 尿路・性器の感染症. 第8版. 東京: 医学書院; 2010. 195-199
- 2) 岡田弘 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検討. *Sysmex J.* 2007; 30: 95-103
- 3) 村谷哲郎 他. 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-1000iによる細菌種推定の可能性の検討. *Sysmex J.* 2010; 33: 87-96
- 4) 中川弘子, 油野友二, 伊藤機一. 尿中細菌検出における核酸染色を用いたフローサイトメトリー法による尿中有形成分情報の有用性. *臨床病理.* 2009; 57(3): 221-227
- 5) 小栗豊子 編. 臨床微生物検査ハンドブック. 第2版. 東京: 三輪書店; 2000. 286p.
- 6) 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
- 7) Manoni F et al. Urine particle evaluation : a comparison between the UF-1000i and quantitative microscopy. *Clin Chem Lab Med.* 2010; 48(8): 1107-1111
- 8) 小澤秀夫, 那須良次. 全自動尿中有形成分分析装置 UF-1000iによる尿中細菌数計測値の検討 - 尿培養による細菌実測値の比較 -. *日本化学療法学会雑誌.* 2009; 57 S-A: 189

Causative Bacterial Group Prediction by Bacterial Scattergram Using the Fully Automated Urine Particle Analyzer UF-1000i

Hideo OZAWA*¹, Naoko YAJIMA*² and Hideyuki KOBAYASHI*³

*1 Department of Urology, Kawasaki Hospital, Kawasaki Medical School, 2-1-80 Nakasange, Kita-ku, Okayama 700-8505

*2 Clinical Laboratory, Kawasaki Hospital, Kawasaki Medical School

*3 Scientific Research Division, Scientific Affairs, Sysmex Corporation

SUMMARY

We analyzed bacterial scattergrams of the Sysmex UF-1000i for estimation of causative micro-organism whether bacilli and/or cocci.

We classified dot patterns of the scattergram, on 81 urine samples of bacterial positive by the culture, submitted flow cytometric urinalysis to our laboratory. The separation line between "upper pattern" and "lower pattern" has a slope of 30 degree from x-axis in the bacterial scattergram. The case with widely distributed dots with regardless of 30 degree line is defined as "wide pattern". The incidence of "lower pattern", "upper pattern" and "wide pattern" were 57%, 20% and 23%, respectively. Although most of urine samples in "lower pattern" grow bacilli in culture (89%), those in "upper pattern" grow cocci (69%). In "wide pattern", multi-drug resistant bacteria (e.g. methicillin resistant staphylococcus, extended spectrum β -lactamase producing bacteria) were high incidence (32%). Diagnosis of urinary tract infection (UTI) is primarily done by microbiologic culture, which takes few days for the results. Since the slope of the bacterial scattergram can predict group of the causative bacteria, complicated UTI can be diagnosed promptly and the patient with simple UTI can discontinue the antibiotic agent earlier.

Key Words

Urinary Tract Infection, Causative Organisms, UF-1000i, Antibiotic Agents
