

尿路感染症診断に用いる 尿沈渣作成時の遠心力の違いが 血球および細菌に与える影響

小林 とも子, 村谷 哲郎, 高橋 綾, 美那元 勇希, 小野 文誠

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)

要 旨

尿沈渣鏡検は、さまざまな腎・泌尿器系疾患の推定のために、赤血球、白血球、上皮細胞、円柱、細菌、真菌、原虫、結晶を観察することにより行われる。日本臨床検査標準協議会の「尿沈渣検査法 2000」では、500g × 5min 遠心後の沈渣を使用すると定められている。この遠心力では細菌の集菌のためには十分ではない。細菌検査室ではグラム染色鏡検を実施するが、この際の沈渣作成については特に決められた方法はない。細菌検査で塗抹グラム染色を実施するにあたり、単純性尿路感染症の有意菌数である 10^3 cfu/mL を捉える必要があるため、沈渣作成時の遠心力の検討を行った。細菌検査室では細菌、真菌および白血球が観察可能であればよいので、通常の尿沈渣よりも高速、長時間遠心が可能である。本検討は、細菌検査に最適な遠心時間検討のための予備実験として、沈渣ではなく、遠心後の上清の残存数で評価した。今回検討した結果においても、500g × 5min では細菌の集菌は不十分であることが示され、少なくとも 1,400g × 10min の遠心が必要であることが示された。

キーワード 尿沈渣, グラム染色, 遠心力, 尿路感染症, 細菌検査

はじめに

尿沈渣鏡検は、さまざまな腎・泌尿器系疾患の推定のために、赤血球、白血球、上皮細胞、円柱、細菌、真菌、原虫、結晶を観察することにより行われる。一般的には、尿定性試験で陽性であった場合や尿路感染症が疑われる場合に実施される。日本臨床衛生検査技師会の尿沈渣検査法 2000¹⁾では、中間尿 10mL をスピッツ管へ採取し、500g × 5min の遠心後の沈渣を 0.2mL とし、その 15 μ L に 18mm × 18mm のカバーガラスを掛け、視野数 20 の顕微鏡で 400 倍で観察するとされている。尿路感染症が強く疑われる場合には、通常の尿沈渣鏡検とは別に、細菌検査室用として無菌容器へ採取した中間尿またはカテーテル尿が提出される。細菌検査室ではグラム

染色鏡検を実施するが、この際の沈渣作成方法については特に決められた方法はない。乾燥させる時間を考慮し、通常 10 μ L を用いることが多いと考えられる。細菌を捉えるためには最低 400 倍での鏡検が必要であり、通常 1,000 倍で観察する。表 1-a に光学顕微鏡の視野面積に関するデータを、表 1-b にカバーガラスの半分の面積に 10 μ L 塗抹したとした場合の理論上の 1 視野あたりの細菌個数を示す。左から 20 視野の顕微鏡で接眼レンズ 10 倍、対物レンズ 40 倍、同対物レンズ 100 倍、22 視野の顕微鏡で対物レンズ 100 倍を使用した場合を示す。原尿 10 μ L を塗抹した場合、単純性尿路感染症の有意菌数とされる 10^3 cfu/mL は、400 倍 100 視野で 1 個、1,000 倍 500 視野で 1 個となる。しかし、沈渣を用

いた場合は理論上 50 倍濃縮されるので、現実的に観察可能な数字となる。したがって、単純性尿路感染症の有意な細菌数である 10^3 cfu/mL を捉えるためには尿沈渣鏡検を行うべきと考える。

そこで、細菌室で行う尿沈渣作成に有用な遠心力および遠心時間を検討する目的で、種々の遠心力で細菌数についての検討を行った。

材料および方法

尿路感染症疑いで提出された A から E の尿 5 検体を用いた。1mL ずつ 5 本のマイクロ遠心管に分注し、原尿および $500g \times 5min$, $1,400g \times 10min$, $3,000g \times 10min$, $10,000g \times 5min$ 遠心後の上清を尿中有形成分分析装置 UF-1000*i* (UF-1000*i*; シスメックス社) を用いて白血球, 赤血球, 細菌数を測定し, 合わせて血液寒天培地 (極東製薬社) を用いた培養による細菌数を測定した。

表 1-a. 光学顕微鏡の視野面積

接眼レンズ (10 倍) の視野数	20	20	22
対物レンズ倍率	40	100	100
半径 (mm)	0.25	0.1	0.11
面積 (mm ²)	0.196	0.031	0.038
カバーガラス (mm ²)	324	324	324
1/2 Cover glass 面積の視野数	825	5157	4262

表 1-b. 顕微鏡および倍率の違いによる 1 視野あたりの細菌数

菌量 (CFU/mL)	1 視野あたりの細菌数		
	20 視野顕微鏡 10×40 倍	20 視野顕微鏡 10×100 倍	22 視野顕微鏡 10×100 倍
原尿			
10^3	0.012	0.002	0.002
10^4	0.121	0.019	0.023
10^5	1.21	0.19	0.23
沈渣			
10^3	0.61	0.10	0.12
10^4	6.06	0.97	1.17
10^5	60.60	9.70	11.73

結果

図1-aに白血球, 図1-bに赤血球の結果を示す。白血球数は500g×5minで上清中に3~26%残存し, 1,400gでは0~5%まで減少, 3,000gおよび10,000gでは, 1%未満であった。赤血球は500g×5minでは7.7~44%残存しており, 残存の多いものがあった。1,400g以上では0~12%に減少した。

図2-aにUF-1000iで測定した細菌数, 図2-bに

培養法による細菌数を示す。5検体のうち, Eは原尿を用いた場合でも, 培養にて細菌 $\leq 10^2$ cfu/mLであった。500g×5minでは遠心上清中にUF-1000iで15~83%の細菌の残存が認められ, 培養では非遠心尿で検出限界以下であった1例を除くと21~82%の残存が認められた。1,400g×10minではUF-1000iで0~10%, 培養では同様に0~10%残存していた。3,000gおよび10,000gではいずれの方法でも0~6%の残存が認められたのみであった。

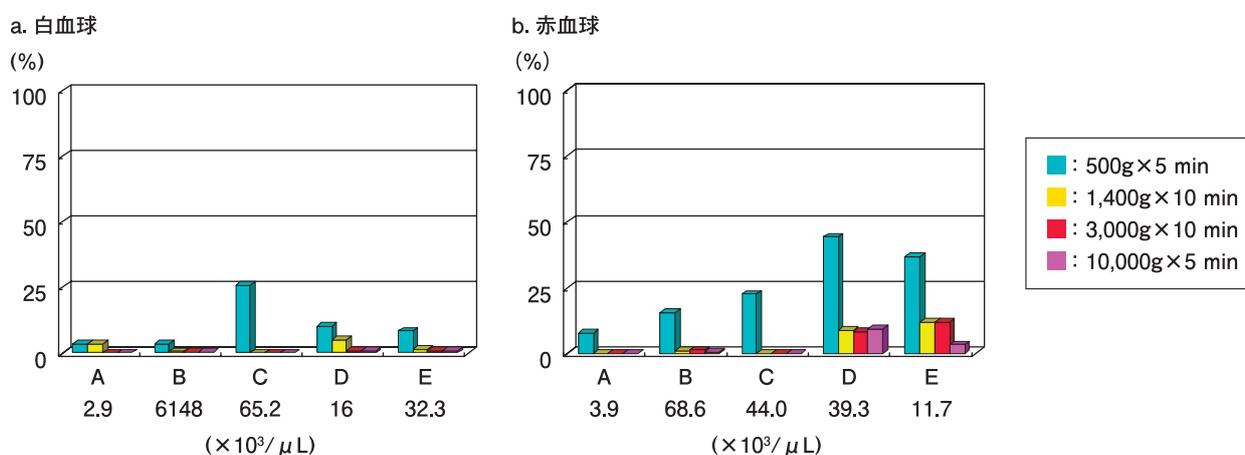


図1. UF-1000iを用いた遠心後上清の白血球および赤血球の残存率(非遠心尿を100%とした)
数値は非遠心尿中の血球数

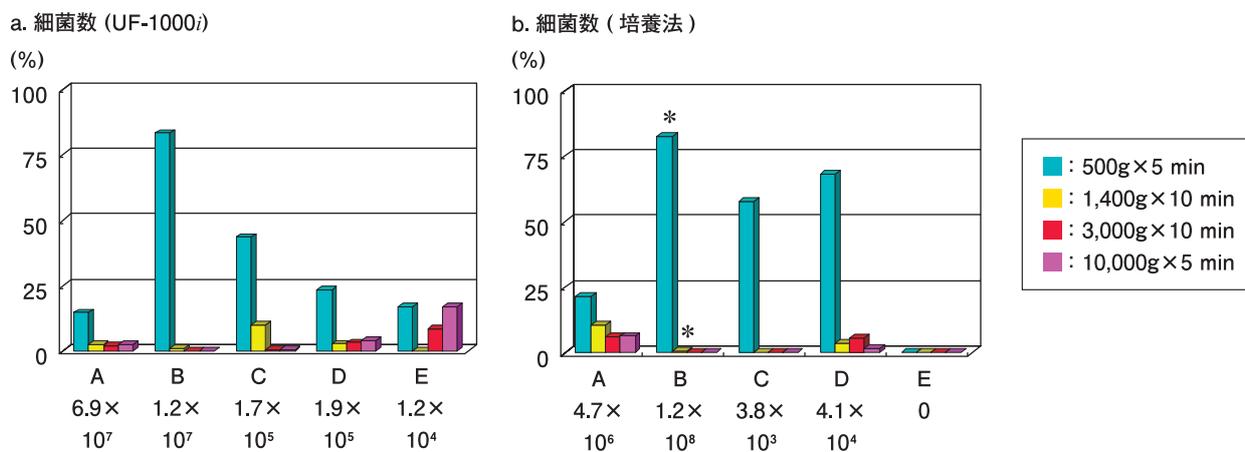


図2. 遠心上清中のUF-1000iおよび培養法での細菌残存率(非遠心尿を100%とした)
数値は非遠心尿中の細菌数
*は正確にカウントできなかったため概算値

考 察

尿沈渣作成においては、結晶や円柱の破損がないように 500g × 5min による遠心を行うことが推奨されている。また、American Society for Microbiology (ASM) では 400g × 5min が推奨されている²⁾。この遠心力では細菌の集菌は不十分であり、抗酸菌の集菌については、3,000g × 20min が推奨されている³⁾。一方抗菌剤臨床試験の際、症例登録時には膿尿の有無の他に細菌尿の確認も必要である。河田らは 1,500rpm × 10 分間の遠心沈殿条件で細菌尿の鏡検検査を行った場合、細菌が 1×10^5 cfu/mL であれば各視野に少なくとも 1 個の細菌が確認できると報告している⁴⁾。Jenkins らの review では 1×10^5 cfu/mL 以上の細菌尿を検査した場合 2,500 ~ 3,000rpm × 5 分間の遠心条件で無染色 400 倍において各視野 1 個以上を有意とすると Sensitivity 93 ~ 97%, Specificity 88% 以下、染色標本 1,000 倍で Sensitivity 98%, Specificity 89% と報告している⁵⁾。日本で汎用されている回転半径 15cm の遠心器であれば 3,000rpm は 1,500G に相当する。さらに ASM のマニュアルにおいても細菌が 1×10^5 cfu/mL であれば各視野に少なくとも 1 個の細菌が確認できると記載されている⁶⁾。

今回細菌検査で塗抹グラム染色を実施するにあたり、単純性尿路感染症の有意菌数である 10^3 cfu/mL を捉える必要があるため、沈渣作成時の遠心力の検討を行った。細菌検査室では細菌、真菌および白血球が観察可能であればよいので、通常の尿沈渣よりも高速、長時間遠心が可能である。本検討は、細菌

検査に最適な遠心時間検討のための予備実験として、沈渣ではなく、遠心後の上清の残存数で評価した。1,400g × 10min の遠心であっても、貪食像を含む白血球の形状に影響ないことは確認しているが、実際の沈渣を使用して、菌数の評価も行う必要があると考えている。また、1,400g は日本の検査室で汎用されている遠心器で十分達成可能な遠心力であり、10min という時間も実行可能な時間と考えられる。

今回検討した結果においても、500g × 5min では細菌の集菌は不十分であることが示され、少なくとも 1,400g × 10min の遠心が必要であることが示された。

参考文献

- 1) 日本臨床衛生検査技師会 尿沈渣法編集委員会 編. 尿沈渣検査法 2000. 東京 : 3
- 2) CLSI. GP16-A3 : Urinalysis ; approved guideline. 3rd ed. Wayne : 2009. 52p.
- 3) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会. 結核菌検査指針 2007. 東京 : 結核予防会 ; 182p.
- 4) 河田幸道 他. 尿路感染症に対する化学療法剤の臨床効果判定と尿沈渣検査法について. 日泌尿会誌. 1970 ; 61 : 633-638
- 5) Jenkins RD et al. Review of urine microscopy for bacteriuria. JAMA. 1986 ; 255 : 3397-3403
- 6) Murray PR et al. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington, D.C. : American society for Microbiology ; 2007. 323-325

Effect of the Centrifugal Force for making Urinary Sediment in the Patients with Urinary Tract Infection on Blood Cells and Bacterial Counts

Tomoko KOBAYASHI, Tetsuro MURATANI, Aya TAKAHASHI,
Yuki MINAMOTO and Bunsei ONO

Kyurin Corporation, 27-25 morishitachou, Yahatanishi-ku, Kitakyuushuu-shi 806-0046

SUMMARY

The urinary sediment microscopy are performed to predict various renal and urological diseases by observing erythrocytes, leucocytes, epithelium cells, casts, bacteria, fungi, a protozoan, crystallization.

In accordance with "urinary sediment examination procedure 2000" edited by the Japanese clinical laboratory standard meeting, it is provided that urinary sediment microscopy have performed using sediment of 10mL urine after centrifuging of $500g \times 5min$. This centrifugal force is not enough for the bacterial collection.

There is no defined method to make urinary sediment when we perform gram-stain microscopy to detect bacteria, fungi, and leucocytes.

When we perform gram-stain microscopic test, we examined the suitable centrifugal force at the time of the urinary sediment making to detect $10^3cfu/mL$ which was the number of the meaningful bacteria of the uncomplicated urinary tract infection.

Because it is necessary to observe bacteria, fungi and leucocytes in the examination of urinary tract infection, centrifugal force in the urinary sediment making is able to set higher speed and longer time than the normal urinary sediment making.

We evaluated suitable centrifugal force by counting bacteria in the supernatant after centrifuging at various centrifugal forces. The bacterial counting were performed with culture method and UF-1000*i* that is flow cytometer.

It has been shown in this study that the centrifugal force of $500g \times 5min$ was insufficient to collect bacteria, and the centrifugal force of $1,400g \times 10min$ was at least necessary.

Key Words

Urinary Sediment, Gram-stain, Centrifugal Force, Urinary Tract Infection, Bacteriological Examination
