

全自動尿統合分析装置 UX-2000 の 細菌スキャッタグラムとグラム染色所見との比較

安武 由美^{*1}, 樋口 美紀^{*1}, 小田 新太郎^{*1},
田村 優樹^{*1}, 嶋津 禎三^{*1}, 小林 秀行^{*2}, 花岡 栄治^{*1}

*1 済生会八幡総合病院 中央検査部：福岡県北九州市八幡東区春の町 5-9-27 (〒 805-0050)

*2 シスメックス株式会社 学術部

要 旨

全自動尿統合分析装置 UX-2000 (UX-2000; シスメックス社) は尿定性検査装置と尿中有形成分分析装置を一体化した装置である。

この装置の大きな特徴の一つに尿中有形成分分析において細菌専用の測定部を持ち定量測定を行えることが挙げられる。

今回我々は、この細菌スキャッタグラムのドットパターンとグラム染色所見の比較を行った。その結果、グラム陰性菌は下方型のドットパターンが多数認められ、またドットパターンの角度と幅を使った比較検討では、幅広いドットパターンは、グラム陽性菌とグラム陰性菌の混在が多数認められた。これらによりグラム陰性菌とグラム陽性菌の推測が可能であると思われる。

キーワード UX-2000, 細菌スキャッタグラム, グラム染色, 幅広ドットパターン

背景と目的

尿路感染症は、尿路に細菌などの病原体が侵入して感染を起こす病態である。尿路感染症の検査には、尿定性試験での亜硝酸塩反応と白血球反応や尿沈渣検査及び、細菌検査でのグラム染色、培養検査などがある。その中で尿沈渣検査は、短時間で速やかに尿中の白血球や上皮の増加、細菌の有無を目視で確認できる利点がある。しかし目視による尿沈渣検査では多量の塩類で細菌を見落とす可能性がある。

当院で導入された全自動尿統合分析装置 UX-2000 (UX-2000; シスメックス社) は尿定性検査と尿中有形成分定量測定 (以下、FCM) を全自動で行う装置である。FCM においては、赤色半導体レーザー (波長 $\lambda = 635\text{nm}$) を採用したフローサイトメトリー法を測定原理とし、赤血球、白血球、円柱、上皮細胞、細菌の定量を行い¹⁾、尿路感染症の診断に必要な白血球や細菌が即時に定量測定される (図 1)。特にそ

の細菌測定には、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 (以下、BACT チャンネル) で高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できる²⁾ (図 2, 3)。今回 BACT チャンネルで得られたスキャッタグラムのドット分布と X 軸のなす角度から、グラム陽性球菌やグラム陰性桿菌などの尿路感染の起因菌推定が可能かどうか検討する機会を得たのでその結果を報告する。

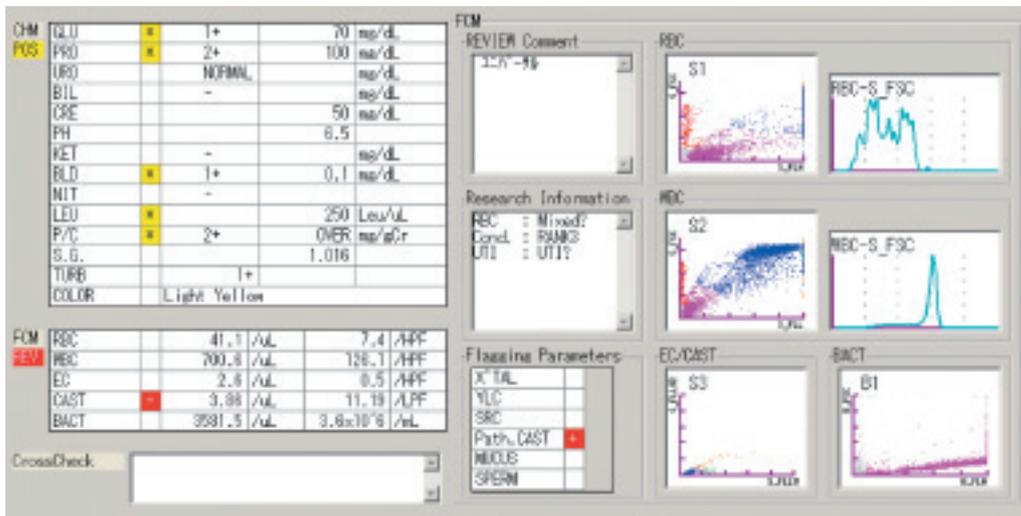


図1. UX-2000 解析画面

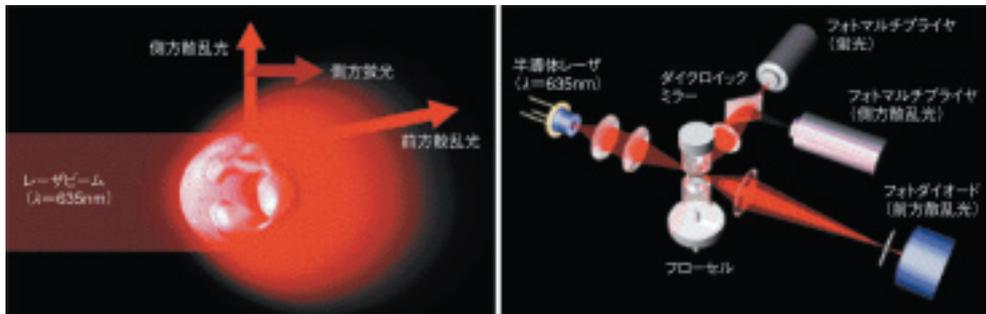


図2. 赤色半導体を用いたフローサイトメトリー法

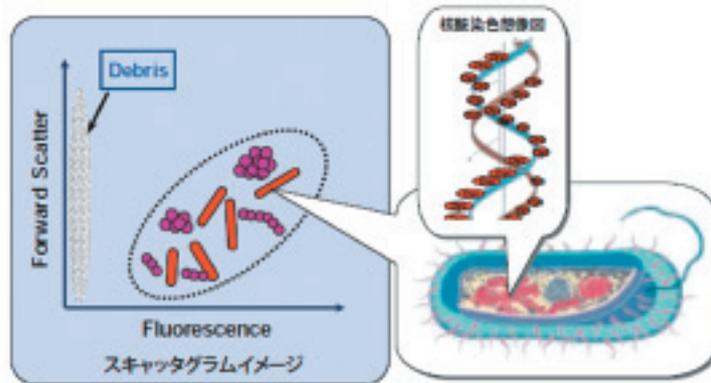


図3. 細菌染色イメージとスキヤッタグラム (文献3)

対象および方法

2011年9月1日より11月18日の79日間で、外来及び入院患者から提出された尿検体をUX-2000にて測定した結果、細菌の存在が確認された検体を連結不可能匿名化して、無作為に抽出し、グラム染色（フェイバーG「ニッスイ」；日水製薬社）を実施するとともに培養検査も行い菌種を同定した。UX-2000より得られたBACTスキヤッタグラムを、村谷や小澤らの基準に従って^{3,4)}、ドット分布パターンがX軸と30度をなす角度を基準にし、30度より高い角度に細菌のドットが分布しているものを上方パターン、30度よりも低い角度に細菌が分布しているものを下方パターンとし、また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ものを幅広パターンとして分類し、グラム染色結果および培養結果と比較検討を行った。

使用した培地はトリプケースソイ5%ヒツジ血液寒天培地、マッコンキー寒天培地（シスメックス・ビオメリュー社）、菌の同定にはバイテック及びバイテック2（シスメックス・ビオメリュー社）を使用した。

結果

検体総数は男性55検体、女性123検体、計178検体であり、このうち細菌培養で菌種の同定がされなかったものを除外し、160検体を検討した。

細菌培養で同定された菌種はグラム陰性桿菌が69.2%、グラム陽性球菌29.8%であり、わずかであるがグラム陽性桿菌も検出された（図4）。培養、グラム染色のいずれかまたは両方が複数菌であった検体は38例であった。同定された菌種の種類は、グラム陰性桿菌の*Escherichia coli* (*E.coli*) が最も多く、次にグラム陽性球菌の*Enterococcus* spp. が多く検出された。まずは同定され純培養された細菌を使用し得られたスキヤッタグラムを図に示す（図5）。グラム陰性菌7種とグラム陽性菌4種である。図のようにグラム陰性菌は下方パターンのスキヤッタグラムを示した。また、グラム陽性菌のスキヤッタグラムのパターンは多様であったが、その中で*Enterococcus* spp. はグラム陰性菌に近いスキヤッタグラムを示した。

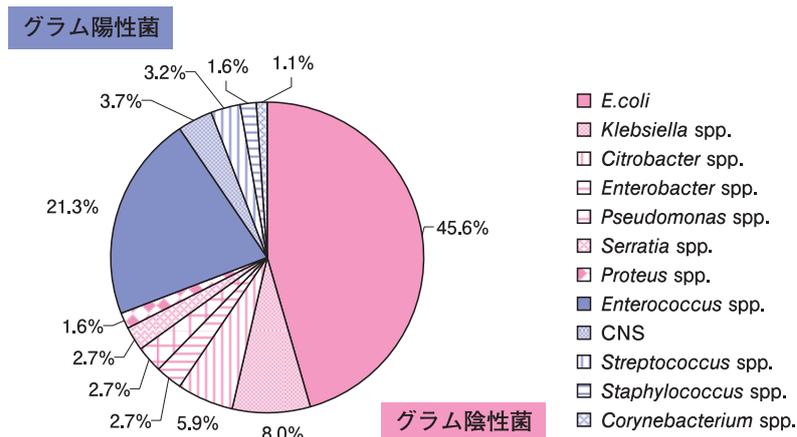


図4. 細菌培養で同定された検体の出現菌種

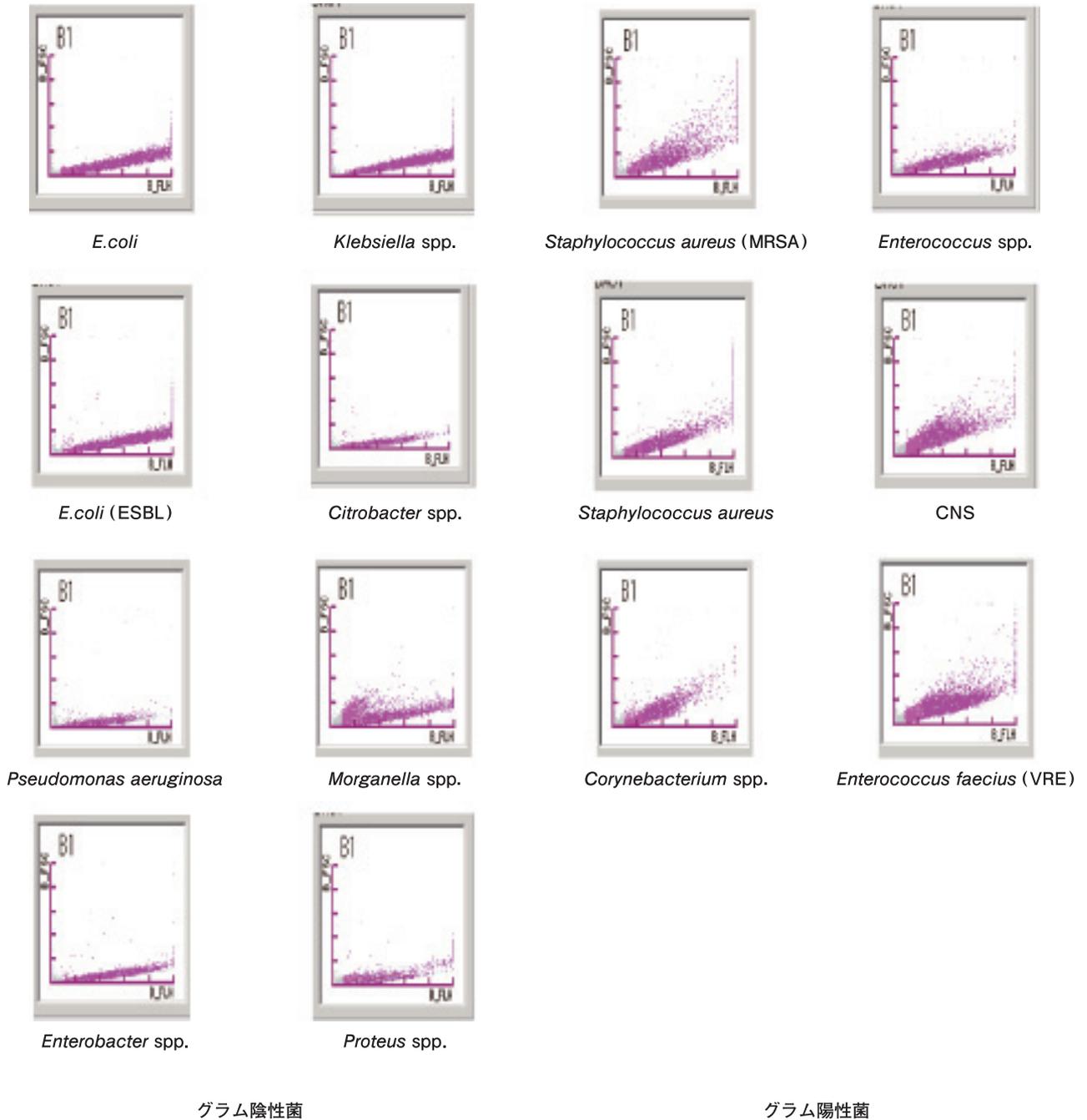


図5. 同定され純培養された菌種のスキャッタグラム

次に尿検体のスキヤッタグラム（ドットパターン）の角度を調べ、グラム染色と比較し、同時に菌の同定も行った。160 検体中グラム染色が単一菌であった 140 検体を 30 度の角度で分類したものと、グラム染色、培養のいずれもが単一菌であった 122 検体を 30 度の角度で分類したものを、表と図に示す

（表 1, 2, 図 6）。その結果 30 度未満の菌種の多くはグラム陰性菌であり、30 度以上ではグラム陰性菌とグラム陽性菌に差は認められなかった。但し、グラム陽性菌は 30 度以上となる場合が多く、30 度以下の菌種はすべて *Enterococcus* spp. であった。

表 1. グラム染色結果が単一菌であった検体の角度別分類

	30度未満	30度以上	合計
グラム陽性菌	6	30	36
グラム陰性菌	71	33	104
合計	77	63	140

表 2. グラム染色、培養結果の両方で単一菌であった検体の角度別分類

	30度未満	30度以上	合計
グラム陽性菌	5	25	30
グラム陰性菌	65	27	92
合計	70	52	122

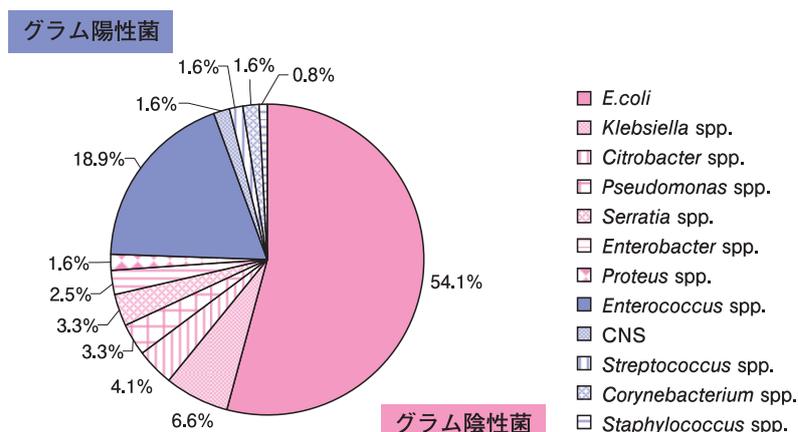


図 6. 培養・グラム染色のいずれもが単一菌であった検体の出現菌種

グラム染色，培養のいずれかまたは両方が複数菌であった38検体の菌種を円グラフに示す（図7）。複数菌が存在する検体の菌種はグラム陽性菌とグラム陰性菌に差は見られない。この複数菌の存在する検体を，グラム陽性菌を含む複数菌と含まない複数菌に分け，30度の角度で分類したものを表に示すと，グラム陽性菌を含む複数菌の検体は30度以上で

96%と高率に認められた（表3）。またスキヤッタグラム上ではグラム陽性菌とグラム陰性菌の複数菌の検体では，鋭角で角度の低いスキヤッタグラムと30度を超える幅広いスキヤッタグラムが認められ，2種類以上の菌種の存在が示唆された。これらの菌種を同定すると，グラム陽性菌とグラム陰性菌が認められた。

表3. 複数菌が出現した検体の角度別分類

	30° 未満	30° 以上	合計
グラム陽性菌を含む	7	27 (96.4%)	34
グラム陽性菌を含まない	3 (30.0%)	1	4
合計	10	28	38

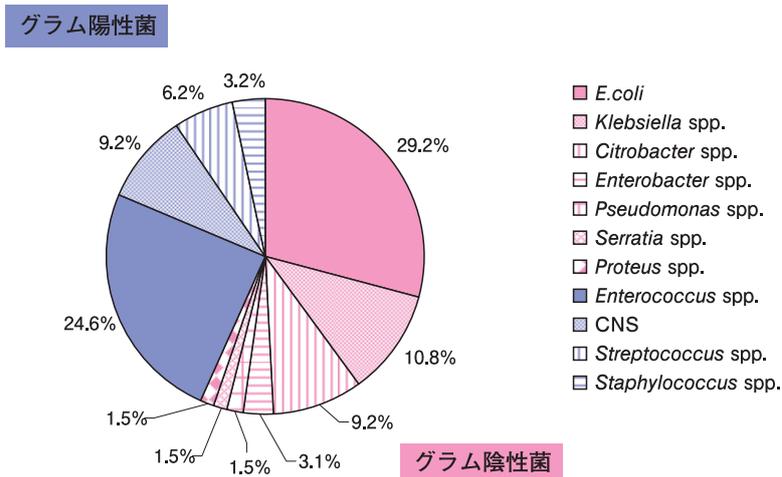


図7. 培養・グラム染色のどちらかもしくは両方が複数菌であった検体の出現菌種

スキヤッタグラムを検証すると、下方パターンが110検体認められ、そのほとんどがグラム陰性桿菌であった。幅広パターンが47検体、上方パターンは3検体とわずかであり、上方パターンの菌種は *Corynebacterium* spp. と *Staphylococcus* spp. であった。幅広パターンの47検体のうちグラム染色、培養のいずれか、または両方が複数菌であった検体は23検体であった。グラム陽性菌とグラム陰性菌の混在は15検体であり、グラム陽性菌の複数菌が3検体認められた。

考 察

感染症は高度技術が発達した現代医療のなかでも重要な疾病であり、救急医療においても、迅速な感

染菌種の推定は迅速な治療開始につながる。培養による判定にはいまだ48時間以上を要し、緊急な抗生剤投与に際しては医師の経験による、いわゆる empiric therapy にたよることが多い。

また尿沈渣結果では、細菌の半定量値にはっきりとした基準を設けることができず、検査者による差が出てくるのがこれまで問題であった。

当院に導入されたUX-2000は尿定性検査と尿中有形成分測定を全自動で行う分析装置である。尿中の細菌数や白血球数を短時間に定量でき、多数の塩類と細菌が混在した検体においても細菌の存在が確認できる(図8)。また、今回検証したようにBACTスキヤッタグラムのパターンを用いて、短時間にグラム陽性・陰性をかなりの確率で推定できる点で、緊急現場での有用性が期待される。

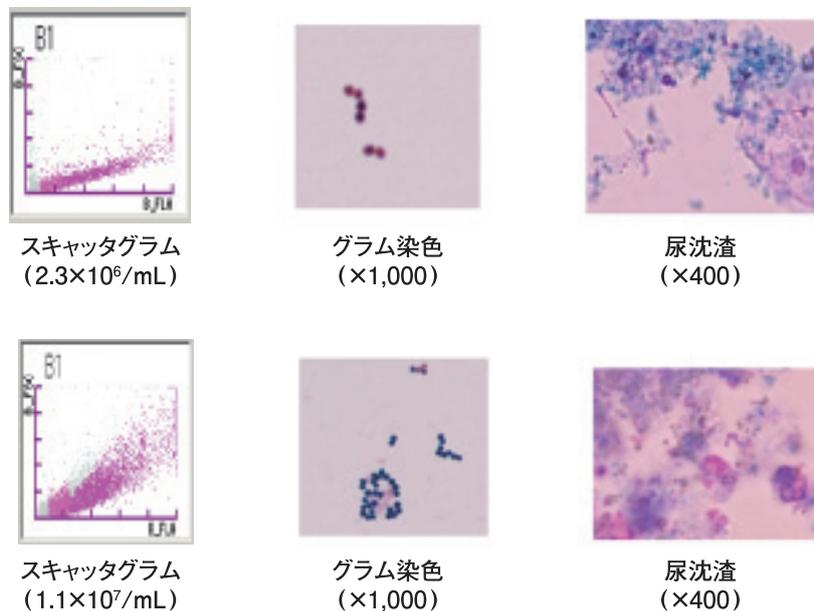


図8. 塩類と細菌が混在した検体のスキヤッタグラムとグラム染色

今回の検体のスキヤッタグラムを検証すると、単一菌においては、下方パターンが多数を占め、そのほとんどがグラム陰性菌であり、グラム陽性菌は *Enterococcus spp.* のみであった。細菌専用スキヤッタグラムの横軸は核酸含有量情報である蛍光強度による粒子の大きさを、縦軸は大きさ情報である散乱光強度による粒子の染まり具合を表している (図9)。一般的に桿菌はその性質上、一定以上の大きさになると、分裂し、単独で存在するため核酸量がほぼ一定となりスキヤッタグラム上での分布がまとまる傾向がある。ブドウ球菌は2~3平面内で不規則に分裂増殖し、連鎖球菌は1平面内で分裂増殖するため核酸量が増加することからスキヤッタグラムの分布が大きく分散すると推定される⁵⁾。 *Enterococcus spp.* が4~8連鎖の短い連鎖で観察されることが多く、スキヤッタグラムがグラム陰性菌に近いドット分布を示すと思われる (図10)。

複数菌においては、グラム陽性菌が存在するスキヤッタグラムのほとんどが、30度を超えるドットパターンを示し、グラム陽性菌の存在を推測する可能性が示唆される。

また、幅広なドットパターンの検体で出現した複数菌は、グラム陽性菌の存在が78.3%と高率に認められた (表4, 図11)。また、グラム陰性菌が単独に検出された幅広なドットパターンでは、抗生剤の影響が考えられる菌糸の伸びた菌体が確認された (図12)。

これらの結果から角度の低い下方パターンではグラム陰性菌の存在が示唆され、複数菌においてはグラム陽性菌の存在が示唆された。また幅広ドットパターンではグラム陽性菌の存在や抗生剤の影響など興味深い例がみられたが、幅広なドットパターンは47検体と少ない為、今後この幅広なドットパターン検体の症例数を増やし、グラム陽性菌の存在や、抗生剤による菌糸の変化が、患者の尿検体でスキヤッタグラムをどの様に変化させるのか検証を続けていきたい。

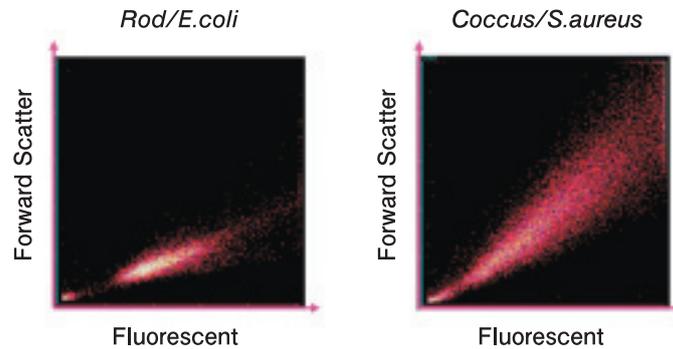


図9. 細菌の検出例

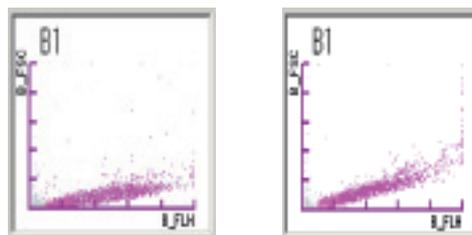


図10. *E.coli* と *Enterococcus* のスキヤッタグラム

表 4. 複数菌が検出された幅広スキャッタグラムでのグラム染色分類

複数菌パターン	件数
グラム陽性菌+グラム陽性菌	3
グラム陽性菌+グラム陰性菌	15
グラム陰性菌+グラム陰性菌	5
合計	23

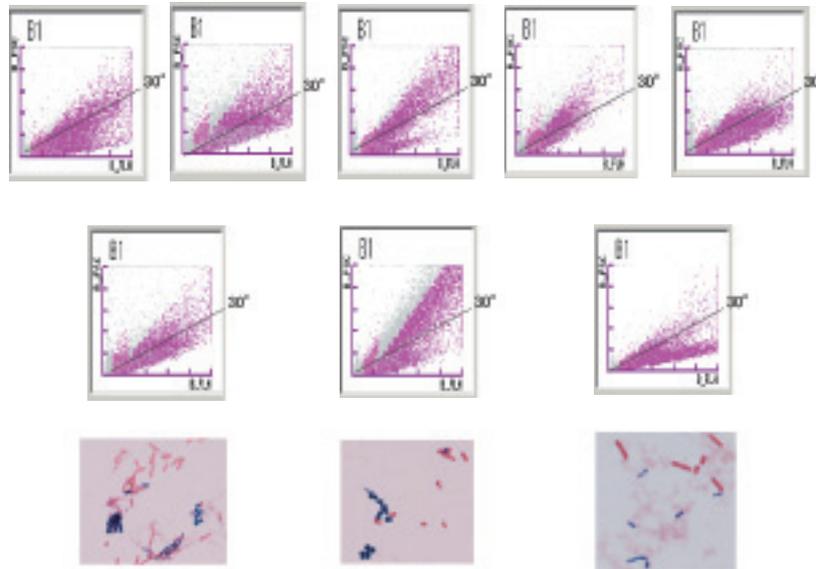


図 11. 複数菌のスキャッタグラム (いずれもグラム陽性菌、グラム陰性菌の混合検体)

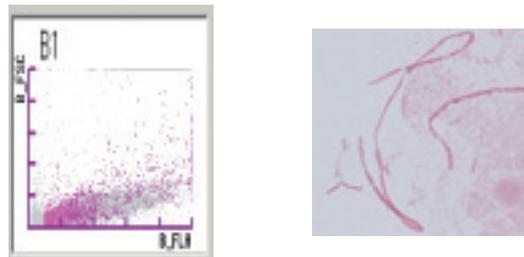


図 12. 抗生剤の影響が考えられる菌体のスキャッタグラムとグラム染色

結 語

今回の検討でスキヤッタグラムパターンを利用して、グラム陰性菌とグラム陽性菌の鑑別を行うことは、尿路感染症の早期診断を可能とし抗菌剤の適正使用にもつながる可能性が示唆された。

また幅広いスキヤッタグラムは検体数を増やし、検討を行うことが必要であり、今後の課題となった。

参考文献

- 1) 梶栗由美子 他. 尿中有形成成分分析装置 UF-1000i の基礎的検討. *Sysmex J.* 2006 ; 29 : 54-64
- 2) 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
- 3) 小澤秀夫 他. 全自動尿中有形成成分分析装置 UF-1000i による細菌スキヤッタグラムと尿培養による細菌同定結果の比較. *Sysmex J.* 2011 ; 34, suppl.1 : 19-25
- 4) 岡田弘 他. 全自動尿中有形成成分分析装置 UF-1000i を用いた尿中細菌検出の基礎的検討. *Sysmex J.* 2007 ; 30 : 95-103
- 5) 中川弘子 他. 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成分情報の有用性. *臨床病理.* 2009 ; 57 (3) : 221-227

Comparisons of the Bact Scattergram Pattern by Fully Automated Integrated Urine Analyzer UX-2000 and Microscopic Examination Results Using Gram Stain

Yumi YASUTAKE^{*1}, Miki HIGUCHI^{*1}, Shintaro ODA^{*1},

Yuki TAMURA^{*1}, Teizou SHIMADU^{*1}, Hideyuki KOBAYASHI^{*2}, Eiji HANAOKA^{*1}

*1 Saiseikai Yahata General Hospital, 5-9-27 Harunomachi, Yahatahigashi-ku, Kitakyushu, Fukuoka 805-0050

*2 Scientific Reserch Division, Scientific Affairs, Sysmex Corporation

SUMMARY

UX-2000 (Sysmex) is fully automated integrated urine analyzer, combining the automated urine cell analyzer and the urine chemistry (urine test strips) analyzer.

One of the major advantages of this instrument is quantitative bacteria analysis by the specifically optimized detection unit for the bacteria.

Here, we have examined the relation between bacteria scattergram pattern by UX-2000 and microscopic examination results using gram stain then we found that location of dots on the scattergram of UX-2000 tends to be lower part when gram negative bacteria is measured.

By analyzing the shape of the cluster of dots on the scattergram (bact cluster) with measuring the slope and width, the bact cluster with broad shape was found in the case of the mixture of gram positive and negative bacteria. Accordingly it was suggested to be possible to make an assumption to discriminate between gram positive and negative bacteria by using bact cluster analysis.

Key Words UX-2000, Bact Scattergram, Gram Stain, Broad Shaped Bact Cluster