

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

岡田 弘^{*1}, 堀江 重郎^{*1}, 井上 淳也^{*2}, 河島 康之^{*2}

^{*1} 帝京大学医学部 泌尿器科学教室：東京都板橋区加賀2-11-1 (〒173-8606)

^{*2} シスメックス株式会社 診断薬開発本部

SUMMARY

尿検査の自動化の普及に伴い、検査の質的向上や迅速化がますます要望されている。また2005年に「臨床検査のガイドライン2005/2006」が発刊され、臨床検査の標準化が進みつつある。今回新たに発売された全自動尿中有形成分分析装置UF-1000iは尿検査の自動化を推進するだけでなく、先に示したガイドラインの中の一つである尿路感染症(UTI)診断のためのガイドラインに対応した診断支援志向の装置となっている。

今回我々はUF-1000iを用いて、泌尿器科受診者の尿検体中の白血球ならびに細菌検出の基本性能を評価検討した。UF-1000iは白血球数と細菌数の迅速な計数により尿路感染症診断の指標として臨床に有効活用できる装置である。

Key Words UF-1000i, フローサイトメトリー, FCM, 膿尿, 細菌尿, 尿路感染症, UTI

はじめに

尿路感染症(Urinary Tract Infection; UTI)は、臨床によく経験する疾患の一つであるが、診断が遅れると敗血症に至る場合もあり、迅速な診断・治療が重要である。近年、検査の標準化や医療費抑制を目的とした包括医療の考え方が導入され、適正な検査を推進するための「臨床検査のガイドライン」が発刊されている。この中でUTIの診断は排尿痛、頻尿などの臨床所見を契機とし、検尿により有意の膿尿[非遠心尿の計算盤法(chamber method)により白血球数(WBC) $10/\mu\text{L}$ または沈渣法によりWBC $5\text{WBCs}/400$ 倍視野]および有意の細菌[尿培養により細菌数 10^4CFU/mL]の存在が証明される必要がある¹⁾。

尿中の細菌数の確認は、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されるため、迅速診断できないのが現状である²⁾。顕微鏡下にて細菌の存在を確認するグラム染色は培養操作が

なく、起炎菌の有無について迅速な結果が得られるために有用であるが、操作者の技術レベルに左右される点や試料中の菌数が少ない場合に見逃しが発生するなどの課題を有する^{2,3)}。今回我々は、シスメックス株式会社が新たに開発した尿中有形成分分析装置UF-1000i(以下、UF-1000i)の性能を評価する機会を得た。UF-1000iは、尿中の赤血球、白血球、細菌などの細胞成分を蛍光染色し、迅速に計測するフローサイトメーターである。特筆すべき点は、UF-1000i内に細菌検出用の専用チャンネルを設けた事により、微小な細菌を精度よく検出し、計数できるようにした事である。具体的には細菌を特異的に染色するために以下のような工夫が加えられている。染色液には、菌体内の核酸成分と結合するシスメックス独自の蛍光色素が使われている。希釈液は、従来、微小な細菌と弁別が困難であった尿中の微小粘液成分や尿中細胞の微小断片等の、いわゆる夾雑物の影響を最小限に抑えるように試薬組成が改良されている。

そこで我々は、UF-1000iがUTIの迅速判定におい

で臨床的に有用であるかどうかを評価するため、当院の泌尿器科受診検体を用い、測定性能の評価を中心に基礎的検討を行ったので、その結果を報告する。

測定原理

UF-1000iの基本原理は、既存の「UF-100」「UF-110i」「UF-50」と同じくフローサイトメトリーを用いている。

既存装置の代表となるUF-100はアルゴンイオンレーザー（波長 =488nm）を使用しているが、UF-1000iではさらなる小型化・省電力化を目的に赤色半導体レーザー（波長 =635nm）を採用している（図1）。サンプル吸引ノズルから吸引された尿は、自動的に専用の希釈液および染色液と一定の割合で混合され、測定試料となる。この測定試料をシースフローを形成したフローセルに導き、一定量の測定試料を1列に配し、押し流す。フローセルを通過する測定試料の流れに対して垂直方向からレーザー光を照射し、有形成分1個1個の散乱光と蛍光を受光素子で信号として検出する。散乱光信号は光の散乱方向によって異なる2つの散乱光、すなわち前方散乱光（FSC）成分と側方散乱光（SSC）成分として各フォトダイオードによって電気信号に変換される。蛍光はフォトマルチプライヤによって蛍光信号（FL）として電気信号に変換される。この電気信号を専用の信号処理回路で波形処理解析し、各有形成分のパルス波

高値やパルス幅値などの特徴パラメーターをCPU内に記憶保存する。これらのパラメーターの組み合わせにより2次元スキャッタグラムを自動作成する。

最後に装置独自のアルゴリズムを用いてスキャッタグラムを自動解析し、尿中有形成分を分画・定量する。

対象および方法

1. 対象

1) 再現性ならびに希釈直線性

(1) 細菌数の検出性能確認には以下のATCC株を用いた。

再現性：3菌種

- ・ *Escherichia coli* (ATCC11775)
- ・ *Staphylococcus aureus* (ATCC29213)
- ・ *Enterococcus faecalis* (ATCC29212)

直線性：2菌種

- ・ *E.coli* (ATCC11775)
- ・ *S.aureus* (ATCC29213)

(2) 白血球数の直線性については泌尿器科受診尿のうち、膿尿を選別し評価に用いた。

2) 相関性

(1) UF-1000iでの細菌数と定量培養法との相関性評価には泌尿器科受診尿81検体を用いた。

ただし、ウロテスト陽性かつ寒天培養が陰性となった7検体は、抗菌剤等の発育阻害物質の影響が疑われたため、本評価からは

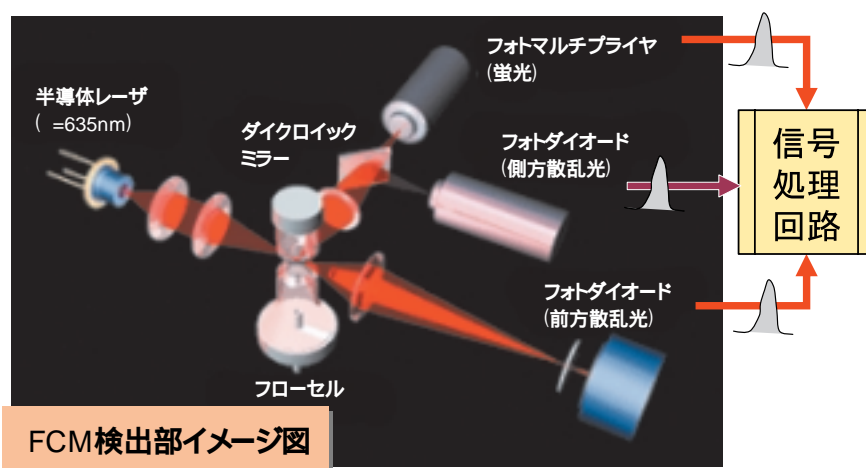


図1. 赤色半導体を用いたフローサイトメトリー法

除外した⁴⁾。

- (2) UF-1000iでの白血球数と顕微鏡による対照法との相関性評価には泌尿器科受診尿128検体を用いた。

2. 方法

1) ATCC株を用いたUF-1000iならびに定量培養法の同時再現性比較

あらかじめATCC株をハートインフュージョン液体培地(日水製薬社)で前培養(35℃, 静置)し, 濃厚菌液(10⁷CFU/mL以上)とした。この濃厚菌液を用いて所定の濃度(10⁴ ~ 10⁶CFU/mL)となるよう生理食塩水(大塚製薬社)で試料を希釈調製した。調製した試料は10回同時測定を行い, その測定結果から平均値と標準偏差を求めCV(%)を算出した。

対照法はルーチンで利用される定量培養法のひとつである定量白金耳法を採用した。上述のとおり調製した菌液を用いてコロニー数が計数できる濃度まであらかじめ生理食塩水で希釈し, 1μL定量白金耳を用いて, 異なる10枚のCLED寒天培地(日水製薬社)に塗布後, 1昼夜(約18~24時間, 35℃環境下)静置培養した。なお, 寒天培地の塗布のタイミングは, UF-1000iでの測定時になるべくあわせるようにした。塗布の翌日に, CLED培地上に観察されたコロニー数を目視計数した。プレート上のコロニー数と塗布量から菌数を換算し, 合計10枚の算定結果から平均値, 標準偏差を求めCV(%)を算出した。

2) ATCC株を用いた細菌の希釈直線性ならびに泌尿器科受診尿を用いた白血球の希釈直線性

*E.coli*株および*S.aureus*株をハートインフュージョン液体培地で前培養し, 濃厚菌液(10⁷ ~ 10⁸CFU/mL)

とした。この濃厚菌液を用いて, 生理食塩水で10倍希釈系列を作製し, 10万倍希釈までの6段階の希釈試料を調製した。測定結果は2回測定の平均値を採用した。比較対照となる細菌数の理論値の基準点は, 装置の直線性保証範囲上限10⁷/mLに最も近い測定結果とし, 希釈倍率より理論値を算出した。

白血球数の直線性については, 臨床検体から膿尿(白血球濃度で約2,000/μL)を選別し, 生理食塩水で2倍希釈系列を作製した。測定結果は2回測定の平均値を採用した。

3) 尿検体を用いた対照法とUF-1000iとの相関性

(1) 細菌定量培養法

定量培養用の寒天培地は, 一部の細菌種の遊走を阻止できるCLED寒天培地とした。試料塗布後のコロニー数が約100~1,000個未満となるように, マイクロピペット(エッペンドルフ社製)を用いてあらかじめ生理食塩水で適宜希釈系列を作製した。前記希釈系列試料のうち, 100μLを寒天培地にまんべんなく塗布した。なお, UF-1000iの測定結果を参考として, 塗布する試料を適宜2濃度選択した。培養条件は35℃, 好気条件下18~24時間とした。寒天培地上のコロニー数を目視計数し, 得られたコロニー数と希釈倍率から原尿中の菌数を換算した。

(2) 白血球数の目視算定(KOVA直接法: 非遠心尿の計算盤法)

白血球数の対照法として, 非遠心尿をKOVAスライド(バイエルメディカル社)上で確認する方法を採用した。KOVAスライドは図2のようにスライド上にチェンバーおよび

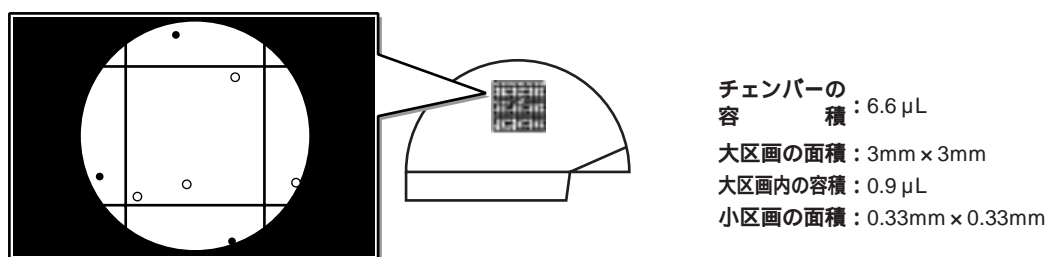


図2: KOVA スライドの大区画と小区画

算定用区画（グリッド）が刻まれている。この全算定区画は0.9 μL に相当する。顕微鏡の弱拡大または強拡大にて観察し、有形成分のカウント数とその区画数から、尿1 μL 当たりの個数に換算することができる⁵⁾。このKOVAスライドを用いて算定した値を相関性試験のデータとして用いた。なお、顕微鏡観察は無染色状態とし、位相差顕微鏡（OLYMPUS社製BX-51）を用いた。

(3) UF-1000iでの血球数ならびに細菌数測定

UF-1000iは赤血球、白血球などの有形成分測定用と尿中細菌測定用の2系統の専用試薬を持つ。これら専用試薬による測定を実現することで、白血球および尿中細菌の検出精度を従来機より向上させている。血球系細胞測定と尿中細菌測定は1度の尿試料の吸引で行われ、試料は2系統の試薬を用いて装置内の各専用反応槽で自動的に希釈・混合される。

まず血球系細胞測定においては、尿試料約1mLが吸引ノズルから装置内に吸引され、約35 に保たれた反応槽内で、尿150 μL に

希釈液435 μL および染色液15 μL が自動的に添加・混合され、尿中有形成分の細胞内構成成分と細胞膜が蛍光染色される。染色試料はフローサイトメトリーにより、有形成分の1個1個にレーザー光が照射される。そこから得られる散乱光信号と蛍光信号は、各有形成分の特徴を表すパラメーターとして分類・計数に利用する。

次に尿中細菌測定においては、上述のとおり吸引された尿試料のうち62.5 μL が、約42 に保たれた別の反応槽内で希釈液425 μL と混合される。これに続いて染色液12.5 μL が自動的に添加・混合される。専用希釈液は細菌の細胞膜の透過性を亢進させる作用があり、続いて蛍光色素を添加・混合することにより菌体内の核酸成分が特異的に染色される（図3）。染色試料は検出部へ送液され、フローサイトメトリーにより散乱光信号および蛍光信号が検出されたのち、専用解析アルゴリズムを用いて細菌を分類・計数する。

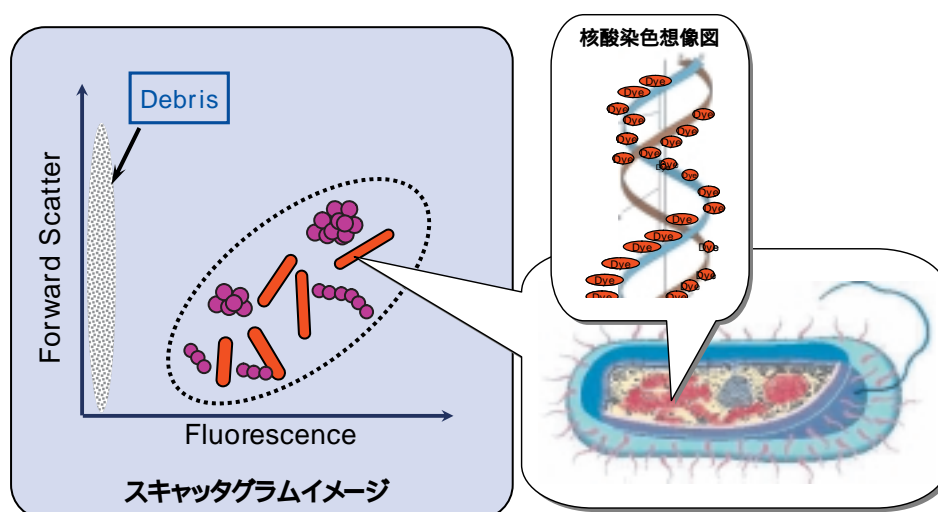


図3 . UF-1000iの細菌染色イメージとスキヤッタグラム

結果

1. 再現性

異なる3種の菌(菌濃度 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL)での定量培養法のCV 27.8 ~ 50.8%に対して, UF-1000iはCV 7.6 ~ 11.2%であった(表1)。

2. 希釈直線性

E.coli (ATCC株)等を用いた細菌の希釈直線性は, $10^3 \sim 10^7$ /mLの範囲で理論値に対して良好な結果を得た(表2, 図4-1, 4-2)。白血球数の希釈直線性は, およそ $3 \sim 2,500/\mu\text{L}$ の範囲で理論値に対して良好な

表1. 細菌測定のための対照法(培養法)とUF-1000iの同時再現性

菌株	<i>E.coli</i> (ATCC11775)		<i>S.aureus</i> (ATCC29213)		<i>E.faecalis</i> (ATCC29212)	
	培養法	UF-1000i	培養法	UF-1000i	培養法	UF-1000i
AVE. (/mL)	1.2×10^4	1.6×10^4	1.2×10^5	5.2×10^4	2.5×10^4	1.2×10^4
SD (/mL)	6.0×10^3	1.2×10^3	3.7×10^4	5.8×10^3	6.9×10^3	1.0×10^3
CV (%)	50.8%	7.6%	30.4%	11.2%	27.8%	8.9%

表2. 細菌測定の直線性

<i>E.coli</i> (ATCC11775) [/mL]			<i>S.aureus</i> (ATCC29213) [/mL]		
理論値	6 μL 分析	1 μL 分析	理論値	6 μL 分析	1 μL 分析
6.9×10^2	1.3×10^3	2.5×10^3	1.1×10^3	1.4×10^3	1.0×10^3
6.9×10^3	5.5×10^3	6.0×10^3	1.1×10^4	1.1×10^4	1.5×10^4
6.9×10^4	6.7×10^4	6.2×10^4	1.1×10^5	1.0×10^5	0.9×10^5
6.9×10^5	6.5×10^5	6.4×10^5	1.1×10^6	1.1×10^6	1.0×10^6
6.9×10^6	6.9×10^6	6.7×10^6	1.1×10^7	1.1×10^7	1.1×10^7
6.9×10^7	5.7×10^7	5.5×10^7	1.1×10^8	7.8×10^7	7.6×10^7

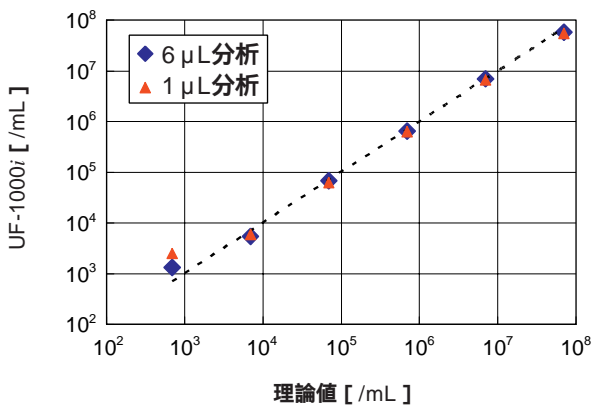


図4-1. 希釈直線性 (*E.coli*)

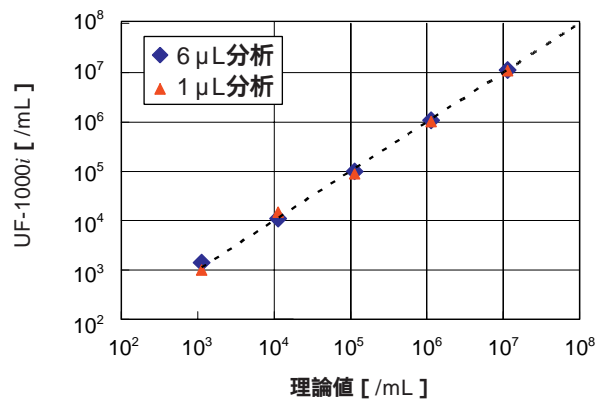


図4-2. 希釈直線性 (*S.aureus*)

結果を得た(図4-3, 4-4)。

3. 相関性

細菌定量培養法を対照とし, UF-1000iの細菌測定結果との一致率を2×2テーブルで評価した。その結果, n = 74でカットオフ 10^4 CFU/mLとしたとき, 感度96.4% (27/28), 特異度89.1% (41/46), 一致率

91.9% (68/74), PPV84.4% (27/32), NPV97.6% (41/42)であった(表3)。定量培養法とUF-1000iとの相関図を図5-1に示す。

また, 白血球数での対照法(KOVA直接法)に対する相関は, n = 128で $y = 1.01x + 8.88$, $r = 0.9592$ であった(図5-2)。

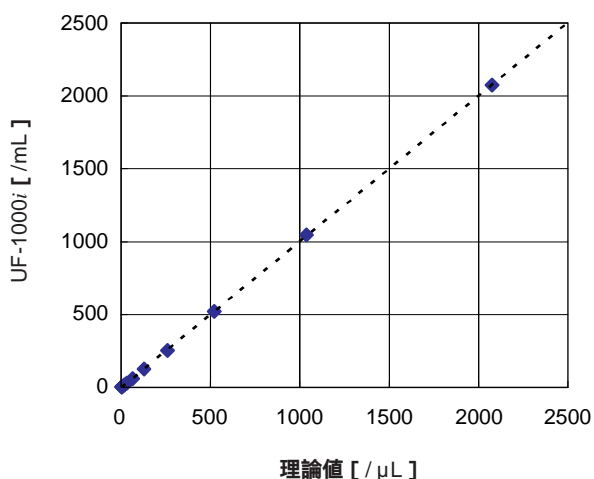


図4-3 . 希釈直線性(白血球)

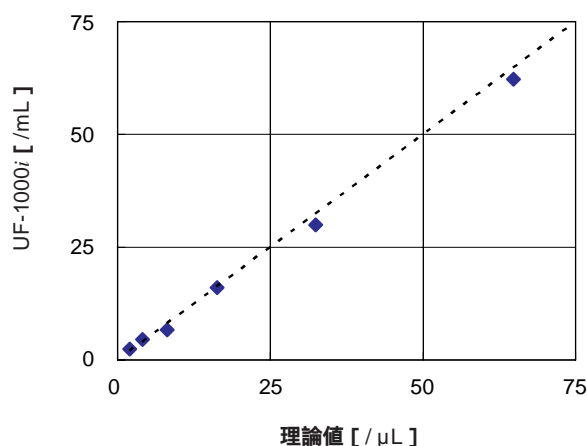


図4-4 . 希釈直線性(白血球 低値拡大)

表3 . 細菌検出の2×2 Tableによる評価結果

		Reference culture		
		Positive	Negative	Total
UF-1000i	Positive	27	5	32
	Negative	1	41	42
	Total	28	46	74

陽性判定基準 Reference culture : 10^4 CFU/mL, UF-1000i : 10^4 /mL

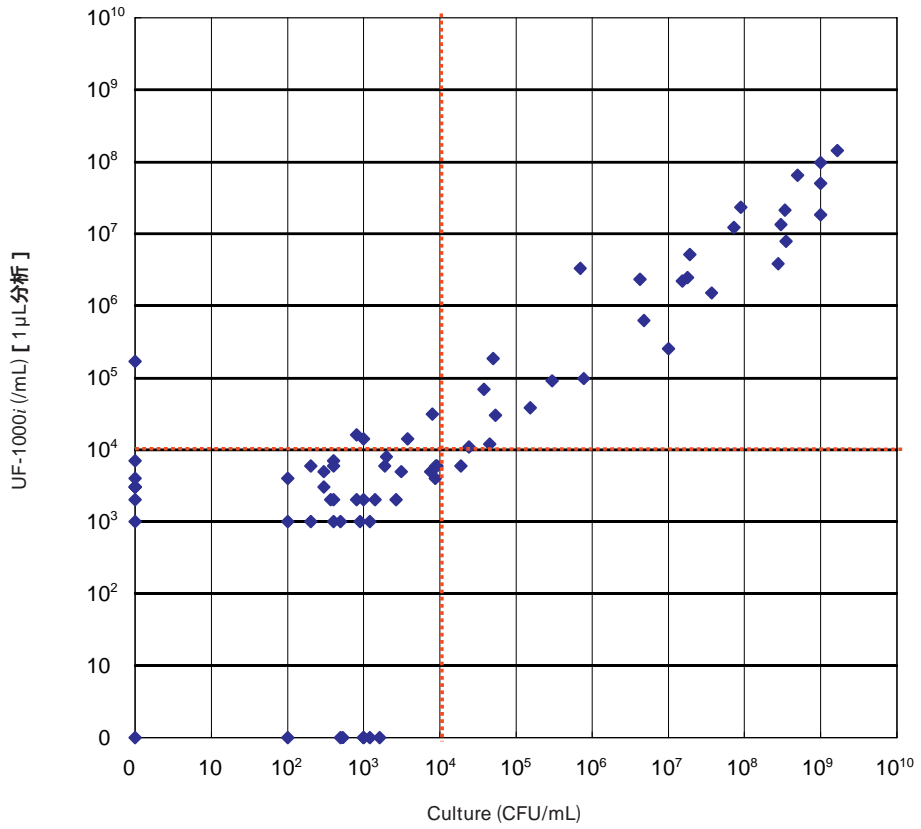


図 5 - 1 . 相関図 (細菌)

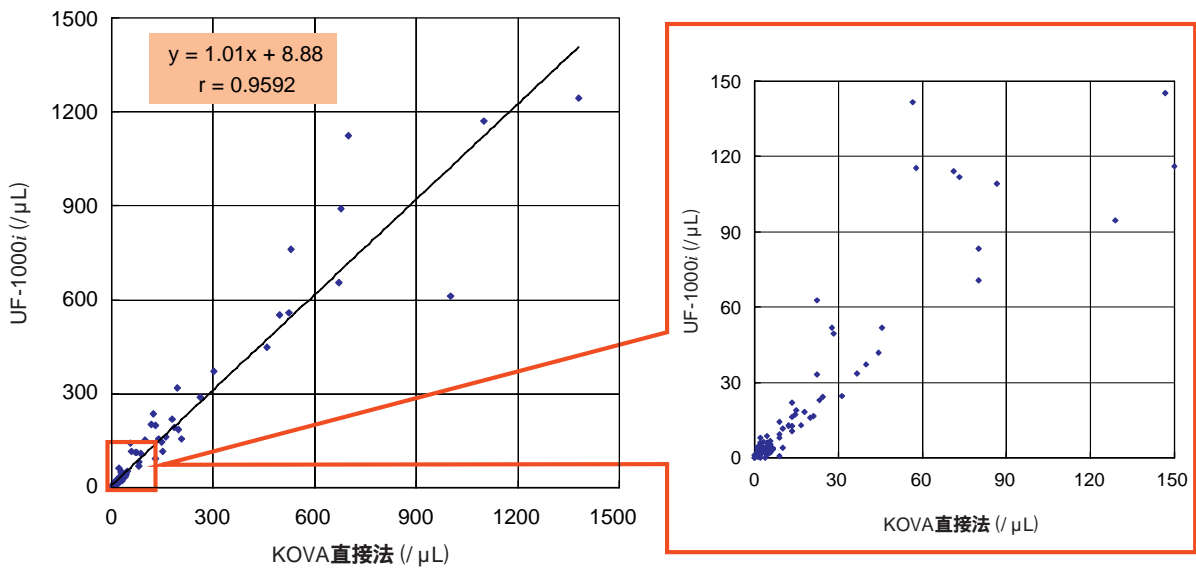


図 5 - 2 . 相関図 (白血球)

考 察

再現性の検討では、1 μ L 定量白金耳法を評価対照法としたが、UF-1000*i*で分析するサンプル量の違いや、評価に用いる試料群により再現性の精度が変わるものと考えた。そこで、UF-1000*i*の分析容量モード間差を調べる目的で1 μ L 定量白金耳法を対照とし、1 μ L 分析モードと6 μ L 分析モードの時のそれぞれの再現性を追加評価した。*S.aureus* 菌株を用いて約 10^4 CFU/mLとなるように菌液を調製し、この調製菌液を評価試料とした場合の10回同時再現性結果は、対照法のCV約30%に対して、1 μ L 分析モードで約25%、6 μ L 分析モードで約11%であった。また菌株*E.faecalis*を用いた場合のCVはそれぞれ約63%、約32%および約8%であった。さらに菌を含む実検体を用いた10回同時再現性においても、1 μ L 定量白金耳法に対してUF-1000*i*のほうがいずれの分析モードにおいても優れていた。

以上の事から定量白金耳法には、いくつかの誤差要因が考えられた。一つめは試料を定量白金耳で採取する際のサンプル量のばらつき、二つめは寒天培地への試料塗布時の手技によるばらつきなどが誤差要因と考えられた。このように寒天培養法はいくつかの誤差要因を含んでいる事をよく認識した上で、低濃度の菌を検出計数する際は極力誤差要因を排除するように手技上の注意が必要である。一方でUF-1000*i*の測定系は、検体の吸引から希釈・染色・測定までが全て自動化されているため、人為的な誤差要因は排除できる。また、オプションのサンプラーを用いることで試料の攪拌から吸引までの動作が全て自動化可能である。

白血球の再現性に関する評価は、今回の検討から除外しているが、約10/ μ Lの低濃度白血球が出現したサンプルのUF-1000*i*による同時再現性はCV約15%と良好な結果を示し、KOVAスライドによる直接法に対して精度良く測定できる事が確認されている⁶⁾。

相関性の検討結果から、UF-1000*i*は 10^3 CFU/mLオーダーの低濃度菌から精度よく菌を検出できる事が示唆された。しかしながら、定量培養法で細菌が全く生えず陰性判定となった10例の中に、UF-1000*i*が細菌の存在を示唆する検体群 ($n=9$) が見られ、UF-1000*i*および対照法の双方に乖離の原因が考えられた。主な要

因として以下の二つが考えられた。一つめの要因は、生菌と死菌の検出計数である。UF-1000*i*は試薬の特性上、生菌と死菌の区別なく尿中に含まれる全菌数を計数する。一方、対照法である寒天培養法は、生菌のみが寒天培地上でコロニーを形成するため、コロニーカウント数(生菌数)とUF-1000*i*が測定する細菌数(生菌ならびに死菌)とに乖離が生じることが一因として挙げられる。また、二つめの要因は、検討に用いた菌が寒天培地上では静菌的に発育しない、いわゆる培養不能状態(VBNC状態: viable but nonculturable)となっている可能性である⁷⁾。残念ながら今回の検討では乖離した検体群の原因を特定するには至らなかった。今後、乖離した検体の確認には、グラム染色を施すなど、別途、細菌の存在を確認する手段が必要である。また細菌数の評価に関しては評価対象とする母集団が非常に重要であり、治療歴や投与薬剤等の臨床情報を考慮し、評価に用いる事が必要であると考えられる。

まとめ

基礎検討結果から、UF-1000*i*は目視鏡検法および定量培養法よりも優れた再現性を有し、菌濃度 $10^3 \sim 10^7$ /mLの範囲で十分な菌計数性能を有していることが示された。また、白血球数は目視鏡検法以上の測定性能を有し、自動化が可能であった。細菌数においては、培養法自体の再現性精度の課題などが明らかとなったが、全般的な尿中細菌数の計数能力では培養法と良好な相関性が得られた。

UF-1000*i*による白血球数と細菌数の迅速な計数は、UTI診断の指標として利用できる。今後、UF-1000*i*を用いたEBMに基づく感染症治療薬剤の投与支援、さらに薬剤投与後の効果判定(患者モニタリングへの応用)など、診断・治療支援への応用が期待できる。

参考文献

- 1) 日本臨床検査医学会・厚生労働省 編. 臨床検査のガイドライン2005/2006 - 症候編・疾患編・検査編 -. 東京: 宇宙堂八木書店; 2005.
- 2) 小栗豊子. 臨床微生物検査ハンドブック 第2版. 東京:

- 三輪書店 ; 2000. 286p.
- 3) Eisenstadt J, Washington JA. Diagnostic microbiology for bacteria and yeasts causing urinary tract infections. In : Mobley HLT, Warren JW eds. Urinary tract infections : molecular pathogenesis and clinical management. Washington, D.C. : American Society for Microbiology ; 1996 : 43-44.
 - 4) Blondeau JM, et al. Evaluation of the Urotest AB antibacterial substance detection test. J Clin Pathol.1994 ; 47 (11) : 1047-1048.
 - 5) Saito A, Kawada Y. Reliability of pyuria detection method. Infection. 1994 ; 22 Suppl 1 : S36-37.
 - 6) Cornelia O, Andreas H. Quantitative Urine Particle Analysis : Integrative Approach for the Optimal Combination of Automation with UF-100 and Microscopic Review with KOVA Cell Chamber. Clin Chem. 2003 ; 49 (4) : 617-623.
 - 7) Anderson M, et al. Viable but Nonculturable Bacteria are Present in Mouse and Human Urine Specimens. J Clin Microbiol. 2004 ; 42 (2) : 753-758.

The Basic Performance of Bacteria Counting for Diagnosis of Urinary Tract Infection Using the Fully Automated Urine Particle Analyzer UF-1000i

Hiroshi OKADA^{*1}, Shigeo HORIE^{*1}, Junya INOUE^{*2} and Yasuyuki KAWASHIMA^{*2}

^{*1}Department of Urology, Teikyo University School of Medicine, Kaga 2-11-1, Itabashi-ku, Tokyo 173-8606

^{*2}Diagnostic Reagent Development Div., Sysmex Corporation

SUMMARY

Improvement in the quality and the rapidity of laboratory testing are getting more and more significant in accordance with laboratory automation in urinalysis. In 2005, the Guideline of clinical laboratory test was published by Japanese Society of Laboratory Medicine.

The new instrument UF-1000i can be possessed of not only automation for testing, but also assistance for diagnosis of above guidelines. We had evaluated the basic performance of bacteria counting and/or white blood cell counting especially for diagnosis of urinary tract infection (UTI). Finally, we conclude that the UF-1000i was useful for clinical diagnosis of UTI.

Key Words UF-1000i, Flow Cytometry, FCM, Pyuria, Bacteriuria, Urinary Tract Infection, UTI
