



フローサイトメトリーを用いた微生物検査

さ さ き ま さ か ず
佐々木 雅 一
Masakazu SASAKI

はじめに

フローサイトメトリーは、蛍光染色色素を用いて核酸・抗原などの成分を特異的に染色したものにレーザーを照射し、得られる信号強度や粒子の大きさなどの情報をもとに、有形成分の分類等に利用されている。臨床検査分野では自動血球計測装置における血球数算定、リンパ球や白血病／悪性リンパ腫の解析にも利用され、現代医療に欠かせない重要な検査技術となっている。

尿中細胞成分の解析にもフローサイトメトリーが導入され、細菌のグラム染色性についての解析技術が研究用として開発されており、尿路感染症診断と治療薬の選択など今後の臨床応用に期待されている。

本稿では、フローサイトメトリーを用いた微生物検査として尿路感染症を中心に説明し、その技術を応用した薬剤感受性検査の可能性、そして近年のトピックであるマラリア検査についても紹介したい。

I. フローサイトメトリーの原理

フローサイトメトリーに用いる機器はフローサイトメーターと呼ばれ、流路系・光学系・データ処理系に分かれている。流路系では細胞浮遊液とそれを円筒状に包むシース液を高速で通過させて、細胞を1個ずつ流出させる。細胞がフローセル内を通過する際にレーザーを照射（光学系）して、発生する散乱光と蛍光輝度を検出する。レーザー光の軸に対し前方へ散乱する光は前方散乱光 (forward scatter: FS) と呼ばれ、細胞成分の大きさの情報が得られる。また、レーザー光の軸に対し90度の角度で散乱する光

は側方散乱光 (side scatter: SS) と呼ばれ、細胞内の顆粒成分や核についての情報が得られる。これらのパラメーターを組み合わせると白血球など細胞成分の分類に応用されてきた（データ処理系）。現在は尿中有形成分弁別にも利用され、顕微鏡による目視で実施していた尿沈渣検査の自動化が進んでいる。

II. フローサイトメトリーの微生物検査への応用

1. 尿路感染症

フローサイトメトリーを測定原理とした全自動尿中有形成成分分析装置 UF-5000 (UF-5000) は、赤血球・白血球・上皮細胞・円柱成分・細菌などを定量的に検出し、尿中有形成成分の自動化機器として普及している検査機器である。検体サンプルが機器内部のフローセルを通過する粒子にレーザーを照射して発せられる前方散乱光、側方散乱光、偏光解消側方散乱光、側方蛍光をそれぞれ受光素子で受光し電気パルスに変換した情報をもとに、独自のアルゴリズムに基づいてパターン認識し分類を行っている。細菌については従来機種では細菌のカウントのみであったが、UF-5000 ではグラム陽性・グラム陰性を判定する機能を研究情報として搭載している。成分の大きさ、核酸量により細菌、酵母／精子、白血球／上皮細胞の3領域に分けて2次元座標軸散布図が作成される。細菌領域の BACT スキャットグラムは、Y軸が成分の大きさを反映する前方散乱光強度 (forward scatter light intensity; FSC)、X軸が核酸染色強度を反映する側方蛍光強度 (side fluorescence intensity; FL) で描かれる。測定に際して、希釈液で

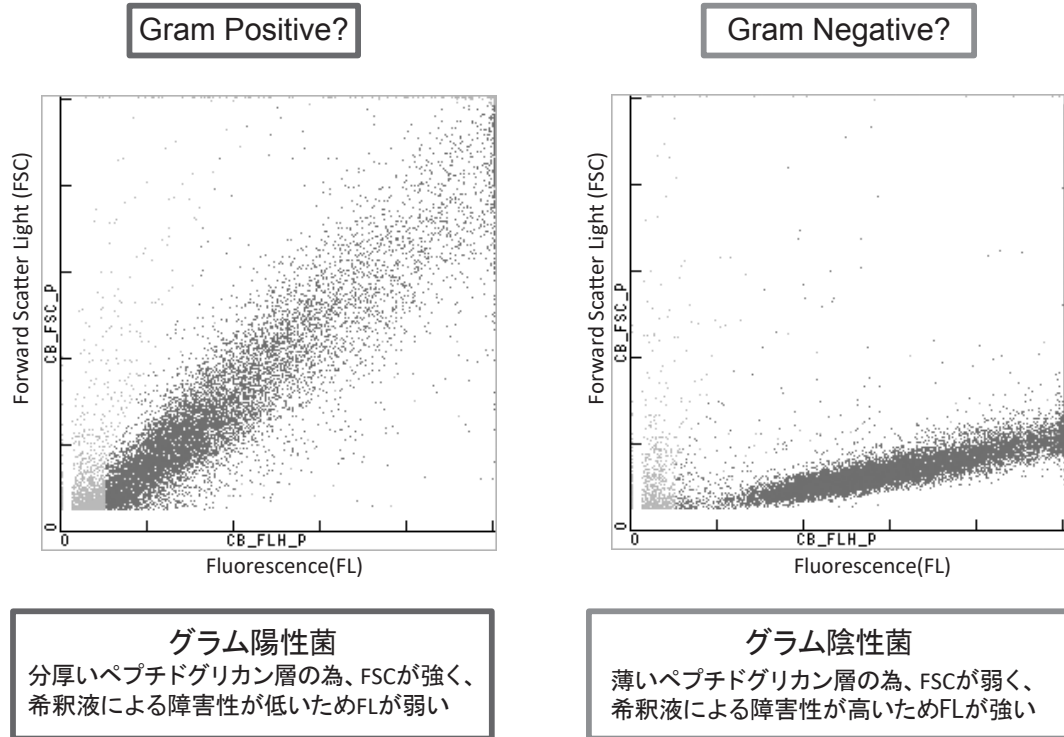


図1 UF-5000のBACT スキャッタグラム

細菌の細胞壁に孔を開けて染色を行うが、グラム陽性菌とグラム陰性菌ではその細胞壁構造により差が出る。実際のグラム陽性菌、陰性菌のスキャッタグラムを提示する(図1)。グラム陽性菌は、分厚いペプチドグリカン層のためFSCが強く、希釈液による障害性が低いことから、蛍光色素による染色が弱いため蛍光強度が低くなり(図1左)のようなスキャッタグラムを示す。グラム陰性菌は、薄いペプチドグリカン層のためFSCが弱く、希釈液による障害性が強いから、蛍光色素による染色が強くなり蛍光強度が高くなることから(図1右)のようなスキャッタグラムを示す。混在例の場合にはそれぞれの細胞集団がプロットされたスキャッタグラムとなる(図2)。機器としては、細胞集団の角度が大きい場合にはグラム陽性菌を疑い「Gram Positive?」、角度が小さくX軸に近いクラスターを形成する場合にはグラム陰性菌を疑い「Gram Negative?」、どちらの存在も疑われる場合には「Gram Pos/Neg?」の判定となる。

UF-5000における細菌のグラム陽性・陰性についての弁別性能に関して、河村らの検討では179検体

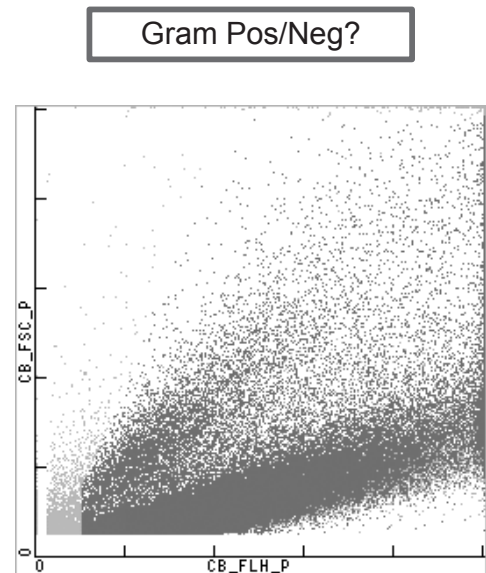


図2 グラム陽性菌、陰性菌の混在例

を対象とし、グラム染色、培養同定検査とUF-5000の一致率はそれぞれ83.2%、81.0%とグラム染色と培養同定の一致率85.1%と近い結果となり、さらにグラム染色性それぞれの結果では、グラム陽性菌の一致率は75.0%、グラム陰性菌の一致率は93.3%と



高く「グラム染色と近似した性能を有し、原因菌検索のスクリーニング検査として、迅速報告ができる有用な検査法と言える。」と述べている¹⁾。Kimらの報告²⁾では 10^5 CFU/mL以上のグラム陰性菌の単一菌の場合には、感度・特異度は91.7%、90.0%と良好な成績であるが、グラム陽性菌については感度・特異度はそれぞれ81.3%、80.0%と河村らの報告と同様にグラム陰性菌に劣る成績であった²⁾。

しかし、どちらの報告もグラム陰性菌のスクリーニングについては有用である結果だった。また、Kimらの報告ではカットオフを細菌15個/ μ Lとした場合に、培養結果が $<10^5$ CFU/mLとなる陰性的中率が99.5%と報告している。フローサイトメトリーによる尿中細菌数に関しては、全自動尿統合分析装置UX-2000を用いたGehringlerらの報告において、ルールアウトのカットオフを細菌50個/ μ Lに設定した場合、培養で 10^5 CFU/mLを細菌尿とした場合には98%の陰性的中率と報告している³⁾。これらの結果からフローサイトメトリーによる細菌数カウントは、細菌尿の除外診断への有用性が高いと考えられる。

これらのフローサイトメトリーの細菌尿に対する検討結果から、①グラム陰性菌の弁別性能の高さ、②細菌尿の除外診断能力の高さという特徴を生かして尿路感染症診断に役立てることがポイントとなる。通常、単純性尿路感染症の多くは腸管内常在菌による上行性尿路感染であり、その原因菌の多くが

大腸菌をはじめとする腸内細菌目細菌、つまりグラム陰性菌であることから、フローサイトメトリーで細菌尿の判定とグラム染色性の情報は抗菌薬投与の判断に大きな役割を果たすと思われる。急性単純性膀胱炎の場合、初回の抗菌薬投与前には尿培養は必須と考えられていないため、一般的にはエンピリックに抗菌薬投与を行うことが多い。「JAID/JSC 感染症治療ガイドライン 2015 ー尿路感染症・男性性器感染症ー」では、*Escherichia coli* (大腸菌) の18%がキノロン耐性であることから、グラム陰性菌による単純性尿路感染症の場合にはキノロンを控え、セフェム系薬、または β -ラクタマーゼ阻害剤配合ペニシリン系薬剤を推奨している。また、閉経前の女性における急性膀胱炎の分離菌として、*Staphylococcus saprophyticus* の分離頻度が17%と高いことから、グラム陽性菌の存在が疑われる場合にはキノロン系薬剤を第一選択にすることを可能としている⁴⁾。つまり、フローサイトメトリーにより細菌尿のグラム染色性の情報が得られることで、ガイドラインに沿った抗菌薬選択の後押しとなるものと考えられる。複雑性尿路感染症の場合にはより多くの細菌が原因となり、さらに薬剤耐性菌のリスクも高まることから尿培養検査は必須と考えられるが、フローサイトメトリーによる細菌尿の除外は十分に役立つものと考えられる。これは不要な抗菌薬投与を抑制することに繋がり、AMR対策にも寄与するものと思われる。

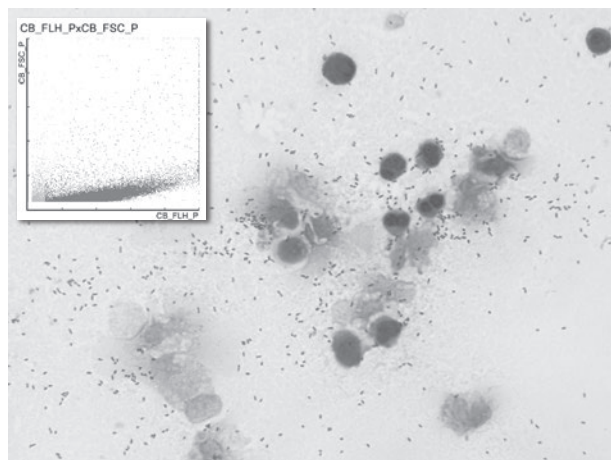


図3 尿グラム染色と UF-5000 のスキャットグラム
培養では *Citrobacter koseri* を検出

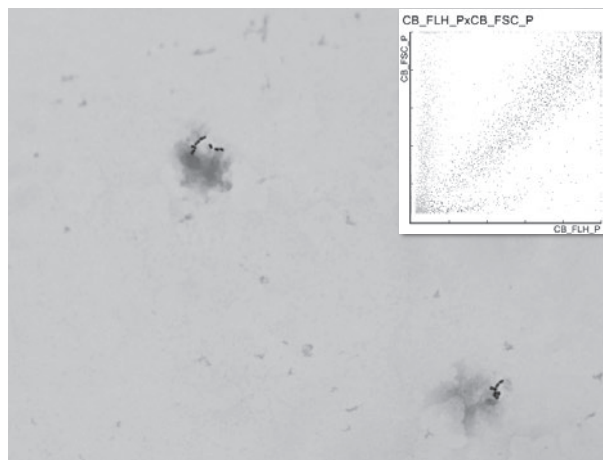


図4 グラム染色と UF-5000 のスキャットグラム
培養では *Enterococcus faecium* を検出

2. 薬剤感受性検査

現在、様々な方法で薬剤感受性検査の迅速化に向けて研究開発が進んでいるが、UF-5000では細菌数を定量データとして得ることができることから、この特徴を利用した薬剤感受性検査への応用も報告されている。大田らは、抗菌薬を含む Mueller-Hinton broth と含まないもので菌液濃度を調整し、一定時間浸透培養を行った後に、菌数の相対比から判定を行った検討を報告している。1.5時間浸透培養におけるカットオフ値を相対比 0.6 に設定した場合に、対象としたすべての大腸菌の LVFX、ABPC に対する感性株、耐性株の判定が可能であり迅速薬剤感受性検査としての可能性を報告している⁵⁾。

3. 血液培養における薬剤耐性菌の判定

山下らは人工的に作成した血液培養陽性検体を用いて、Cefpodoxime と Cefpodoxime/clavulanic acid のディスクをそれぞれ添加した Trypticase soy broth に調整した大腸菌の疑似陽性検体を接種し、2時間培養後に UF-5000 で菌数測定したものを比較することで ESBL 迅速判定が可能だったと報告している。質量分析装置による血液培養陽性検体の菌種同定と組み合わせることで、薬剤耐性菌を考慮した適切な抗菌薬投与の可能性を報告している⁶⁾。

4. マラリア原虫検出

コロナ禍により人類は大きな危機を経験し入国制限など多くの措置がとられた。しかし、アフターコロナが見えてくるなか、実施されてきた行動規制は緩和に向かい、減少していた輸入感染症は増えてくると考えられる。マラリアは重要な輸入感染症の一つであり、特に熱帯熱マラリアは発症から 24 時間以内に治療しなければ重症化するため、迅速で正確な診断が求められる感染症である。国内ではイムノクロマトグラフィーによる迅速診断検査 (RDT)、血液塗抹ギムザ染色、PCR などの遺伝子増幅検査が行われてきたが、RDT や PCR では薬事承認された製品はなかったため、検査が実施できる施設は限られていた。2021 年にフローサイトメトリー法によるマラリア原虫等感染赤血球の検出に対して保険適

用が認められたことから、対応した機器を導入した施設ではルーチン検査としての実施が可能となる。

Ⅲ. フローサイトメトリー法のマラリア検査の特徴

1. 迅速性と検体処理能力

特徴の一つは迅速性である。血液塗抹ギムザ染色の顕微鏡による観察は 30～60 分程度の時間を要し、RDT でも約 20 分の時間を要するが、フローサイトメトリーは測定時間 1 分であり、自動機器による測定であり大量検体処理も可能である。

2. 検出感度

検出感度についても顕微鏡検査と比較し同等以上の検出感度を有する。マラウイでの献血マラリアスクリーニングにおける前向き観察研究では、多項目自動血球分析装置 XN-31 (XN-31) によるフローサイトメトリー法では 5281 検体中 614 検体 (11.6%) で検出したのに対し、顕微鏡検査では 341 検体 (6.5%) の検出だった。PCR を基準とした場合、エキスパートによる顕微鏡検査の感度・特異度はそれぞれ 75%、100% だったのに対しフローサイトメトリー法は 100%、99.9% であり顕微鏡検査と比較して高い感度を示す結果であった⁷⁾。「フローサイトメトリー法は血液 1 μ L あたりの原虫数 20 の検出感度があり PCR 法の 1-20/ μ L、LAMP 法の 1/ μ L には劣るものの、顕微鏡検査法の 50/ μ L、RDT の >100/ μ L を上回る感度を有する」⁸⁾ (モダンメディア . 2022; 68 (6): 198-205)。

3. その他

マラリア感染赤血球はその大きさと核酸量が通常の赤血球と異なることから、XN-31 でのスキャットグラムでのマラリア原虫等感染赤血球数 (MI-RBC) は含まれる Ring form の数により、側方蛍光強度が異なるクラスターを形成する。その他に研究用項目としてマラリア原虫種・発育ステージに関する情報が得られ、熱帯熱マラリアとその他のマラリアを示唆することが可能となっている (ただし原虫種の診

断はできない)。原虫種の確定は他の検査を行う必要があるが、高い精度でスクリーニングできることは患者の見落とし防止に繋がるため、マラリア患者の診断に大きな威力を発揮するものと思われる。

おわりに

フローサイトメトリーは測定機器が必須となるが、様々な応用が可能な検査方法であり、安価でかつ迅速そして大量処理ができることから、今後も微生物検査への研究が進んでくるとと思われる。尿路感染症診断だけではなく、髄液や胸水、関節液などの体腔液への検討が進むことで、感染症診療にさらなる有益な情報をもたらすことが可能となるかもしれない。

文 献

- 1) 河村佳江, 飯沼由嗣, 薄田大輔, 橋本綾, 松本正美, 田中佳. 全自動尿中有形成分分析装置UF-5000による尿中グラム陽性菌/陰性菌弁別判定の評価. 医学検査. 2017; **66**(5): 516-523.
- 2) Kim SY, Park Y, Kim H, Kim J, Koo SH, Kwon GC. Rapid screening of urinary tract infection and discrimination of gram-positive and gram-negative bacteria by automated flow cytometric analysis using sysmex UF-5000. J Clin Microbiol. 2018 8月 1; **56**(8).
- 3) Gehringer C, Regeniter A, Rentsch K, Tschudin-Sutter S, Bassetti S, Egli A. Accuracy of urine flow cytometry and urine test strip in predicting relevant bacteriuria in different patient populations. BMC Infect Dis. 2021 12月 1; **21**(1).
- 4) 山本新吾, 石川清仁, 速見浩士, 中村匡宏, 宮入烈, 星野直, ほか. JAID/JSC 感染症治療ガイドライン2015 —尿路感染症・男性性器感染症—. 感染症学雑誌. 2016; **90**(1): 1-30.
- 5) Ota Y, Furuhashi K, Nagao Y, Yamanaka K, Hamada E, Maekawa M. A Rapid Detection Method for Antimicrobial Resistance in Escherichia coli by the Fully Automated Urine Particle Analyzer UF-5000.
- 6) Yamashita T. [Rapid Decision of ESBL from Blood Culture Positive Bottles (Using MALDI-TOF MS and Sysmex UF-5000)]. Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi. 2018 3月 25; **28**(1): 9-13.
- 7) M' baya B, Mfuno T, Samon A, Hwandih T, Münster M. Evaluation of the Sysmex XN-31 automated analyser for blood donor malaria screening at Malawi Blood Transfusion Services. Vox Sang. 2022 3月 1; **117**(3): 346-353.
- 8) 狩野繁之. モダンメディア. 2022; **68**(6): 198-205.