

〔原著〕 松本歯学 16 : 44~50, 1990

key words : 尿中白血球検出試験紙 — エステラーゼ活性 — 尿 pH — 尿比重 — 共存物質

エステラーゼ活性を利用した尿中白血球検出試験紙の検討

半戸茂友

松本歯科大学病院 臨床検査室

山岸眞弓美, 北村 豊

松本歯科大学 口腔外科第1講座 (主任 千野武廣 教授)

Evaluation of a Urine Leukocyte Reagent Strip Which Utilizes Esterase Activity

SHIGETOMO HANDO

Clinical Laboratory, Matsumoto Dental College Hospital

MAYUMI YAMAGISHI and YUTAKA KITAMURA

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery I, Matsumoto Dental College
(Chief : Prof. T. Chino)*

Summary

An evaluation of a reagent strip (BM Test 6L: Boehringer-Mannheim Japan) for detecting leukocytes in urine (pyuria) is described. Detection is based on the esterase activity of leukocytes. Upon contact between the reagent matrix and leukocytes in urine, the substrate (indoxyl ester) is hydrolyzed by the esterase to indoxyl, which then couples with a diazonium salt to produce a purple azo dye.

A total of 418 urine specimens were analyzed with the reagent strip, and by sediment microscopic examination for comparison. Using ten or more cells per high-power field as denoting significant pyuria, sensitivity and specificity of the strip were 85.5 % and 83.4 %, respectively. From these results, this reagent strip is considered a useful method for detecting leukocytes in urine. According to the results of interference studies, however, esterase activity was slightly affected by urinary pH, specific gravity, protein, and ascorbic acid.

結 言

尿検査は各種疾患のスクリーニング検査あるい

は治療のモニタリングとして従来より広く使用されており、特に蛋白、糖、潜血などの定性検査は迅速、簡便な試験紙法が普及している。しかし、

白血球の確認は尿沈渣に頼っているのが現状であるが、尿沈渣による検査は遠心分離や鏡検など多くの時間と労力を要し、その判定にはある程度の経験が必要とされるなど、いくつかの問題点を有している。

近年、尿沈渣の鏡検に代わる方法として、尿中白血球の存在を化学的に検出する方法が注目されてきている。1979年に初めて尿中白血球検出試験紙(以下、試験紙)開発の報告¹⁾がなされ、その有用性が認められた^{2,3)}ものの、当初は反応時間が15分間と長く、また測定可能な濃度範囲が狭いなど^{4,5,6)}の点で日常検査としては実用的でなかった。しかしながら最近では所要判定時間が2分程度に短縮され、また複数の項目を同時に測定できるように改良された試験紙が数社から市販されるようになり、日常検査として活用されつつあるのが現状である。

今回、ベーリンガー・マンハイム社の多項目尿検査試験紙BMテスト6Lを用いて、尿中白血球検査の有用性について検討を行ったので報告する。

材料および方法

検体には検査室に提出された外来あるいは入院患者の随時尿を対象とした。試験紙は添付説明書に従って、瞬時尿中に浸したのち余剰尿を取り除き、一定時間経過後に色調表と比較した。なお、尿中白血球量の判定は添付説明書の判定の解釈を参考にして、便宜的に0個/ μ lを(-)、約10~25個/ μ lを(+), 約75個/ μ lを(++)、約500個/ μ lを(+++), (+)に至らないわずかな着色を(±)として表現した。尿比重はN-マルティスティックスSG(エームス)で判定した。

尿中白血球数算定のための尿沈渣標本の作製に当たり、まず十分に攪拌した尿10mlを遠沈用スピット(セラピット沈渣, 小野薬品)に採り、懸垂型遠心機により1500rpmで5分間遠心分離した後、スピット内の残渣が100~200 μ lとなるように上清を除去した。次に、十分に残渣を混和してからそれらの10~15 μ lをスライドグラスに採り、カバーグラス(18×18mm)をかぶせて標本を作成した。算定方法は標本(18×18mm)を縦と横にそれぞれ3等分の9画分とし、その4隅と中央の計5画分を400倍顕微鏡下(HPF)でそれぞれ5視

野ずつ(合計25視野)観察し、各画分の平均値の総和を1/5倍して1視野当りの白血球数⁷⁾とした。

1. 反応の経時的変化

呈色反応の異なる13検体について、試験紙を尿に浸した直後から6分後までの経時的変化を1分間隔で調べた。

2. 同時再現性

試験紙の同時再現性については呈色反応の異なる3検体を用い、それぞれを10回連続測定して求めた。なお、便宜的に(±)~(+)を示すものを低濃度、(++)を中濃度、(+++)を高濃度検体とした。

3. 白血球数と試験紙反応との相関性

患者尿418例について、沈渣中白血球数を1視野当り(/HPF)4個以下、5~9個、10~29個、30~99個、100個以上の5群に分け、それぞれの群における白血球数と試験紙の反応性との相関性を検討した。

4. 尿PHおよび尿比重の影響

尿PHは7未満と7以上の2群に、尿比重は1.010以下、1.015~1.020、1.025以上の3群に分けて調べた。

5. 共存物質の影響

蛋白、ブドウ糖およびアスコルビン酸のいずれもが試験紙反応で陰性を示した患者検体にウシアルブミン(シグマ社)、ブドウ糖(無水特級, 和光純薬)、L-アスコルビン酸(特級, 和光純薬)のそれぞれを添加して影響の有無を検討した。

結 果

1. 反応の経時的変化

検体No.13のような高濃度の検体は約1分で(+++)に達したが、低あるいは中濃度では2分以後でも反応が進行しており、完了するまでにはほぼ4分を要した(表1)。添付説明書によると判定時間は1分から2分の間とされているが、大半の検体はこの時間内で一定した成績が得られず、2分後に判定した方が呈色反応の変化も比較的少なく、成績が安定していることから、以後の検討はすべて2分後に判定することにした。

2. 同時再現性

いずれも1ランクを超えるようなばらつきもなく、良好な成績であった(表2)。

3. 白血球数と試験紙反応との相関性

沈渣中の白血球数が5個/HPF以上を陽性とし

た場合、試験紙の感度は72.9%，特異度91.3%，一致率83.5%，見落し率11.5%であり，10個/HPF以上とした場合はそれぞれ85.5%，83.4%，84.0%，4.1%となり，前者に比べ特異度は若干低下したが，感度は高くなり，見落し率は減少した（表3）。また，偽陰性および偽陽性の出現は前者

ではそれぞれ48例（27.1%）と21例（8.7%），後者では17例（14.5%）と51例（16.9%）であった。

4. 尿 pH および尿比重の影響

pH 7 未満では偽陰性率が28.0%と pH 7 以上に比べ若干高値となったが，pH が高くなるほど偽陽性率も高くなり，沈渣中に白血球が見られない場合でも試験紙反応は陽性となる傾向が示唆された（表4）。

一方，尿比重が低いほど偽陽性率は高く，それ

表1：反応の経時的変化

検体 No.	反応時間（分）					
	1	2	3	4	5	6
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	±	±	+
3	-	-	-	±	+	+
4	-	-	-	+	+	+
5	-	-	+	+	+	++
6	-	+	+	++	++	++
7	+	+	++	++	++	++
8	+	+	++	++~+++	++~+++	++~+++
9	+	++~+++	+++	+++	+++	+++
10	++	+++	+++	+++	+++	+++
11	+	++	++	++~+++	++~+++	++~+++
12	++	++	++~+++	++~+++	++~+++	++~+++
13	+++	+++	+++	+++	+++	+++

表2：試験紙反応の同時再現性

No.	低濃度	中濃度	高濃度
1	+	++	+++
2	+	++	+++
3	+	++	+++
4	+	++	+++
5	+	++~+++	+++
6	+	++	+++
7	±	++	++~+++
8	±	++	+++
9	+	++~+++	+++
10	+	++	++~+++

表3：白血球数と試験紙反応との相関性

試験紙の判定値 (個/ μ l)	沈渣中白血球数 WBC/HPF					
	~4	~9	~29	~99	100~	Total
0	220	31	12	4	1	268
10~25	10	18	14	5		47
75	6	7	25	9	1	48
500	5	4	17	17	12	55
Total	241	60	68	35	14	418

	≥ 5 /HPF の場合	≥ 10 /HPF の場合
感 度	72.9%	85.5%
特 異 度	91.3%	83.4%
一 致 率	83.5%	84.0%
見落し率	11.5%	4.1%

表4：尿 pH と白血球反応性との関係

pH	n=418			
	< 7		≥ 7	
WBC/HPF	< 5	≥ 5	< 5	≥ 5
(-)	121	35	99	13
(+)	7	90	14	39
偽陰性率	28.0%		25.0%	
偽陽性率	5.5%		12.4%	

表5：尿比重と白血球反応性との関係

比重	n=418					
	~1.010		1.015~1.020		1.025~	
WBC/HPF	< 5	≥ 5	< 5	≥ 5	< 5	≥ 5
(-)	39	2	126	23	55	23
(+)	8	18	9	63	4	48
偽陰性率	10.0%		26.7%		32.4%	
偽陽性率	17.0%		6.7%		6.8%	

とは逆に尿比重が高くなるほど偽陰性率が高くなる傾向にあった(表5)。

5. 共存物質の影響

(1) 蛋白

尿中蛋白としてはウシアルブミンを使用し、患者尿10検体に最終濃度が0, 50, 125, 250, 500, 1000 mg/dlとなるように調製したものを添加して、その影響を調べた(表6)。検体によって判定に及ぼす蛋白の影響はやや異なったが、125 mg/dl以下のアルブミン濃度ではいずれの検体においても判定に及ぼす影響は認められなかった。しかし、500 mg/dlでは1ランク程度の反応抑制が1検体に認められ、1000 mg/dl以上ではその影響

が強く、4検体において反応抑制が認められた。

(2) ブドウ糖

ブドウ糖の最終濃度が0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000 mg/dlとなるように添加して、その影響を調べた(表7)。検体 No.2のみ最終濃度400 mg/dlで影響を受けたほかは高濃度であっても明らかな反応の変化は見られなかった。

(3) アスコルビン酸

アスコルビン酸の最終濃度を0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 mg/dlとして、その影響を調べた(表8)。最終濃度100 mg/dlから反応の低下傾向を認め、250 mg/dl以上ではその影響が強く見られた。

表6：蛋白の影響

最終濃度 (mg/dl)	検体 No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	++	##	-	##	++	++~##	##	++~##	##	##
25	++	##	-	##	++	++~##	##	++~##	##	##
50	++	##	-	##	++	++~##	##	++~##	##	##
125	++	##	-	##	++	++~##	##	++~##	##	##
250	+~++	##	-	##	++	++~##	##	++	##	##
500	+	##	-	##	++	++~##	##	++	##	##
1000	+	++	-	++~##	+	++	##	++	##	##

表7：ブドウ糖の影響

最終濃度 (mg/dl)	検体 No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	##	++	++~##	##	++~##	##	##	##	++	##
100	##	++	++~##	##	++~##	##	##	##	++	##
200	##	++	++~##	##	++~##	##	##	##	++	##
400	##	+	++~##	##	++~##	##	##	##	++	##
600	##	+	++	##	++	##	##	##	++	##
800	##	+	++	##	++	##	##	##	++	##
1000	##	+	++	##	++	##	##	##	++	##
2000	++~##	+	++	##	++	##	##	##	++	##

表8：アスコルビン酸の影響

最終濃度 (mg/dl)	検体 No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	+	++	-	##	##	++	++~##	##	++~##	##
10	+	++~##	-	##	++~##	++	++	##	++~##	##
25	+	++~##	-	##	++~##	++	++	##	++~##	##
50	+	++	-	++~##	++~##	++	++	##	++~##	##
100	+	++	-	++~##	++	++	++	##	++~##	##
250	+	+	-	++~##	++	+	++	##	++	++~##
500	+	+	-	++~##	++	+	++	##	+~++	++~##

考 察

尿中に出現する白血球の約95%は好中球で占められている。好中球は顆粒内にエステラーゼ酵素を有し、尿中ではこれを放出するため、尿中エステラーゼ活性を測定することにより尿中白血球量を推定することができる⁹⁾。近年、この酵素反応を利用して尿中白血球量を間接的に知る Dip and Read 方式の試験紙が開発され、従来より広く行われている尿沈渣の鏡検に代わるものとして注目を集めており、日常検査にも活用されつつある。尿中白血球検出試験紙の測定原理は、試薬中のインドキシルエステルがエステラーゼによって加水分解され、その反応によって遊離したインドキシルと試験紙含有試薬のジアゾニウム塩とが速やかにカップリング反応し、生成した縮合物による色調の変化を応用したものであり、それにより尿中白血球量の推定が可能となる⁹⁾。

試験紙の改良に伴い、発色色調は従来の青色から紫色に変わり見やすくなっている。しかし、尿中白血球が低濃度になるほどその色調は淡く、反応変化も微妙であり、また検体が尿中のビリルビンなどの内因性物質や薬剤などによって着色している場合には判定を誤ったり、偽陽性反応を起こす可能性もありうる。われわれの経験でも、血尿あるいは薬剤による試験紙の着色のため判定できない症例も見られた。そのため、判定には若干の経験を要し、誤認を避けるためにはあらかじめ尿色を観察しておくことも重要であると考えられた。陽性色調についてはさらに改良が望まれる。

本試験紙の判定時間については、添付説明書には1~2分とあいまいな表現で記載されており、この時間内であればいつでも判定可能と受けとれ変動の少ない成績が得られるものと解釈できる。しかし、試験紙を尿に浸した直後からほぼ4分後まで経時的に反応は進行しており、特に中~高濃度の場合には1分間に1ランク程度の変化が認められた。試験紙の呈色反応は前述のようにエステラーゼによる酵素反応を応用したものである。酵素反応の速度は濃度因子（基質濃度、酵素濃度など）や環境因子（pH、温度など）などによって大きく支配されていることは周知の事実である。試験紙反応では、試験紙中に含まれている基質の濃度はほぼ一定であるのに対し、検体中の酵素濃度

は白血球数に相関して千差万別である。このことは酵素反応を応用した本試験紙法では呈色反応が安定するまでの時間も検体によって一定しないことを意味する。しかし、尿中白血球数と試験紙法の判定成績とは判定時間2分のときに最も一致率が高く¹⁰⁾、さらに呈色反応の安定性を考慮すると、尿に試験紙を浸してから2分以内に(++)となるような検体以外は判定時間を正確に2分として判定することが必要と思われた。

白血球数と試験紙反応との相関性では、尿沈渣中に白血球が5個/HPF以上出現した場合を陽性とする感度は72.9%と低かったが、10個/HPF以上とした場合には感度および一致率が上昇し、見落し率も前者より少なくなりほぼ満足できる成績であった。尿中に白血球が何個出現した場合に試験紙反応を陽性とするかは施設によって異なると思われるが、試験紙による判定は半定量的であり、試験紙の感度や一致率などを考慮すると10個/HPF以上出現した場合を陽性とした方が良いと考えられた。

強酸性あるいは強アルカリ尿で陰性化率が高いとの報告⁶⁾があるが、自験例ではアルカリ側より酸性側で偽陰性となる傾向にあった。おそらく、酸性側に傾くほどエステラーゼの至適pHから遊離するため酵素反応が遅くなり、白血球数を反映できなくなると考えられ、尿pHの影響を避けるため試験紙中に緩衝剤を混在させることでこの問題が解決可能とも思われた。一方、アルカリ尿では試験紙反応が陽性であっても沈渣中に白血球をほとんど認めない検体に多く遭遇した。これはアルカリ尿中では白血球が変形あるいは破壊されやすいこと、また白血球が破壊あるいは溶解されることによって好中球のエステラーゼ活性が上昇¹⁰⁾したことによる現象と解釈した。低比重尿でも同様の傾向であったが、低比重尿におけるこの現象は、尿中に存在する白血球が低浸透圧の影響で破壊された¹²⁾ことによるものとも考えられた。高比重尿では酸性尿と同様に偽陰性率が高く、試験紙上で白血球が崩壊されにくい、あるいは試験紙への浸透力や高浸透圧による白血球反応への直接的な干渉¹³⁾によるものと考えられた。このようにpHが高く、比重が低いほど偽陽性化が起り、またpHが低く、比重が高い検体では偽陰性化が助長される傾向にあった。

尿中白血球の形態は採尿直後から経時的に変化し、その変化の状態は尿 pH や尿比重によって異なる。多くの検体では長時間放置すると白血球数は崩壊により減少するが、尿中に遊離したエステラーゼ活性は4時間程度持続する⁹⁾ことから、経時的に試験紙反応と沈渣中白血球数とに解離が生じてくることも考えられる。このため、尿 pH や尿比重が正常範囲を超えるような場合には尿沈渣と試験紙検査との併用により、さらに精度を高めることが望ましいと思われた。また、検査には他の項目への影響、あるいは沈渣中有形成分の変化も考慮して新鮮尿を用いることが好ましいが、検査は遅くとも採尿後4時間以内に実施すべきである¹³⁾。

尿中のブドウ糖¹²⁾あるいはアスコルビン酸^{12,13,14)}などの共存物質で影響を受けるとの報告があるが、自験例ではブドウ糖による影響はほとんどなく、蛋白あるいはアスコルビン酸による影響がみられた。とくにアスコルビン酸は強力な還元作用をもち、当病院においても入院あるいは外来患者で同薬剤の経口あるいは静脈内投与が高率にみられることから、現状ではアスコルビン酸の検査を並行して行うことが必要であり、今後はアスコルビン酸に影響されないように試験紙を改善することが望まれる。

結 論

多項目尿検査試験紙BMテスト6L(ベーリンガー・マンハイム社)による尿中白血球検出試験紙の有用性について検討を行い、以下の結果を得た。

1. 試験紙の反応はほぼ4分後まで経時的に進行するが、判定時間は比較的呈色反応が安定しており、また尿中白血球数との相関性が高い2分としたほうが好ましいと思われた。
2. 試験紙反応の同時再現性は大きなばらつきもなく良好であったが、低濃度検体や着色尿では注意して判定する必要がある。また、低濃度域の発色が弱いことから、判定にはある程度の経験が必要とした。
3. 試験紙の感度および一致率などを考慮すると、沈渣中に白血球が10個/HPF以上出現した場合に試験紙反応は陽性となると考えるのが望ましいと思われた。

4. 偽陰性の出現は酸性あるいは高比重の検体ほど多く認められ、白血球が変形や崩壊しやすいアルカリあるいは低比重では偽陽性率が高くなり、とくに高 pH と低比重の条件下ではその出現率が高かった。

5. 尿中の共存物質ではとくに蛋白とアスコルビン酸による影響が認められた。

6. 試験紙はスクリーニング用として有用であったが、尿 pH, 尿比重あるいは一部の共存物質により影響されることもあり、尿沈渣を併用することで尿中白血球の出現が正確に報告できると思われた。

稿を終るに臨み、終始ご指導頂きました信州大学医学部附属病院中央検査部仙名清次郎医師に深謝致しますとともにご懇篤なるご校閲を賜った松本歯科大学口腔外科第1講座千野武廣教授に心から謝意を表します。また、本試験紙を提供して頂いたベーリンガー・マンハイム東宝株式会社に感謝致します。

文 献

- 1) Banauch, D (1979) Leukozyten-Nachweis im Urin mit einem Teststreifen. Dtsch. med. Wschr. 104: 1236-1240.
- 2) Chan, L. K. and Oliver, D. O (1979) Simple method for early detection of pritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Lancet. 2: 1336-1337.
- 3) Kusumi, R. K., Grover, P. J. and Kunin, G. M. (1981) Rapid Detection of Pyuria by Leukocyte Esterase Activity. J. Amer. med. Ass. 245: 1653-1655.
- 4) 男沢聖子, 中村伸子, 佐々木禎一, 黒川一郎(1980) 試験紙法による尿中白血球検出に関する諸検討. 臨床病理, 28(補): 269.
- 5) 田上実千代, 西村尚夫, 稲垣勇夫(1981)尿沈渣の研究XII Cytur Testの基礎的検討と尿中白血球染色法について. 衛生検査, 30: 455.
- 6) 吉川俊夫, 羽根靖之, 吉池章夫(1983)簡易尿中白血球試験紙(Cytur test)に関する2,3の検討成績. 機器・試薬, 6: 57-62.
- 7) 村山範行, 北林吉彦, 山口光雄, 半戸茂友, 仙名清次郎(1989)尿沈渣鏡検法について. 第20回長野県臨床衛生検査学会講演集, 20.
- 8) 伊藤機一(1987)尿中白血球検査. Medical Way, 4: 106-110.
- 9) 島田 勇(1986)尿中白血球検出試験紙. 検査と技術, 14: 760-764.
- 10) 竹広妙子, 根本啓子, 桂 秀昭, 西本陽治, 寺谷一男, 村山勝義(1985)エステラーゼ活性を利用し

- た尿中白血球測定法の基礎的検討。機器・試薬，**8**：305-315.
- 11) Scheer, W. D(1987) The detection of leukocyte esterase activity in urine with a new reagent strip. *Am. J. Clin. Pathol.* **87**：86-93.
- 12) 稲垣清剛(1987)尿試験紙BMテストの性能とその有用性。機器・試薬，**10**：219-235.
- 13) 竹広妙子，根本啓子，桂 秀昭，寺西一男(1984) エステラーゼ活性を利用した尿中白血球測定法の日常検査への応用。機器・試薬，**7**：243-256.
- 14) 荒井満恵，伊瀬恵子，加藤真裕美，長崎牧美，榎本由美，大澤 進，降矢 震(1986)多項目尿試験紙「Combur-9」の使用経験とその評価。機器・試薬，**9**：245-256.