

ISSN 2186 – 3989

標本の精度管理から考える尿沈渣検査の課題
－標本作製における相対的遠心力の影響－

油野 友二、神田 七瀬、澤井 咲月、得能 友実
松尾 奈留美、松下 愛、吉川 葵

An Issue in Urinary Sediment Examination from the Perspective of
Quality Control of Samples

－ The Effect of Relative Centrifugal Force in Sample Preparing －

Tomoji Yunou, Nanase Kanda, Satsuki Sawai, Yumi Tokunou,
Narumi Matsuo, Ai Matsushita and Aoi Yoshikawa

北 陸 大 学 紀 要
第51号(2021年9月)抜刷

標本の精度管理から考える尿沈渣検査の課題 — 標本作製における相対的遠心力の影響 —

油野 友二*、神田 七瀬**、澤井 咲月**、得能 友実**

松尾 奈留美**、松下 愛**、吉川 葵**

An Issue in Urinary Sediment Examination from the Perspective of
Quality Control of Samples

— The Effect of Relative Centrifugal Force in Sample Preparing —

Tomoji Yuno*, Nanase Kanda**, Satsuki Sawai**, Yumi Tokunou**,
Narumi Matsuo**, Ai Matsushita** and Aoi Yoshikawa**

Received August 2, 2021

Accepted September 7, 2021

Abstract

Quality control in the process of preparation for urinary sediment samples is important for accurate diagnosis. In Japan, hematuria is defined as the presence of occult blood and five or more red blood cells per high power field in urinary sediment examination. The Japanese guidelines on urinary sediment examination procedures state that a urine sample should be centrifuged for 5 minutes at 500×g in the preparation process. Consequently, remaining components in the supernatant after centrifugation, especially suspended red blood cells, have been reported. However, changes in remaining red blood cells have not been investigated under different centrifugal conditions. We have investigated the percentage of remaining red blood cells in the supernatant, an issue in the guidelines on urinary sediment examination procedures, using artificial hematuria.

Experiment 1: To investigate the percentage of remaining red blood cells with different centrifugal forces, we prepared two types of artificial hematuria with pseudo-urine made of saline and that made of 5% dextrose in acetated Ringer's solution and examined the percentage of remaining red blood cells in the supernatant after centrifugation at 400 to 900×g. Although 3%-5% of the red blood cells remained at 500 ×g specified by the standard guideline, the percentage decreased to 2.0% or less at 700 ×g or higher.

*北陸大学医療保健学部 Faculty of Health and Medical Sciences, Hokuriku University

**北陸大学医療保健学部 2020年度油野研究室学部生

2020 YUNO laboratory, Faculty of Health and Medical Sciences, Hokuriku University

Experiment 2: Regarding the percentage of remaining red blood cells at different hours, the percentage was 6.87% for 5 minutes, 0.38% for 10 minutes, and 0.23% for 15 minutes at 500×g in artificial hematuria with pseudo-urine made of saline.

This study suggests that a certain percentage of red blood cells is suspended in the supernatant by following the current Japanese guidelines on urinary sediment examination procedures, which could affect the number of red blood cells in urinary sediment examination.

Key Words : Urinary sediment examination, Hematuria, Red blood cells

はじめに

尿沈渣検査は、腎臓・尿路系疾患の病態情報として有用な検査である。本邦における血尿の定義は、潜血反応陽性および尿沈渣検査において赤血球が 5 個/HPF 以上と定義¹⁾されている。そのため、正確に診断するためには尿沈渣標本の作製過程における精度管理が重要である。作製過程における尿検体の遠心操作は、遠心力 500xg で 5 分間と本邦の尿沈渣検査法 (JCCLS GP1-P4)²⁾で決められているが、遠心後の上清中に残存成分、特に赤血球の浮遊があることはこれまでも報告^{3,4)}がなされている。しかし、種々の遠心条件下による残存赤血球の変動についての詳細な検討は未だされていない。この研究では上清中の赤血球の残存率について人工的血尿を用いて検討し、本邦の尿沈渣検査法の一つの課題について検討した。本研究は、北陸大学臨床教育・研究倫理審査委員会の承認 (2020-13) を得て実施した。

対象と方法

I. 対象

生理食塩水 (生理食塩液 PLフソー、扶桑薬品工業) とブドウ糖加酢酸リンゲル液 (ブドウ糖 5g/dL、比重 1.025 : アクメインD輸液、光製薬) の 2 種類を疑似尿とした。疑似尿に同意を得た協力学生 4 名の静脈採血による血液を浮遊させ、低濃度域 4 試料と高濃度域 4 試料の人工的血尿を作製し対象とした。

II. 方法

1. 遠心力の変化による赤血球残存率の検討

作成した低濃度域・高濃度域の人工的血尿を尿スピッツに各々 10mL ずつ分注し、フローサイトメトリー法 (以下 FCM 法 : 全自動尿中有形成分分析装置 UF-5000 シスメックス株式会社) により無遠心状態における赤血球数を算定した (無遠心尿中赤血球数)。次に算定後、5 分間遠心を行い、沈渣成分 200 μ L を残し、上清を別の尿スピッツにピペッティングにて移し FCM 法にて赤血球数を算定した (遠心上清中赤血球数)。最後に算定した赤血球数から以下の式に従い残存率を算出した。

$$\text{残存率(\%)} = (\text{遠心上清中赤血球 (個/\mu L)} / \text{無遠心尿中赤血球 (個/\mu L)}) \times 100$$

遠心力を 400～900xg まで 100xg 刻みで変化させた系列で同様の検討を実施した。参考調査として各遠心力にて作成した尿沈渣より標本を作製し、光学顕微鏡 x400 にて赤血球形態の観察を行った。

2. 遠心時間の違いによる赤血球残存率の検討

生理食塩水による低濃度域の人工的血尿を用いて、無遠心状態における赤血球数を算定後、遠心力を 500xg でそれぞれ 5 分間、10 分間、15 分間遠心し、沈渣成分 200 μ L を残し、上清を別の尿スピッツに静かに移し、FCM 法にて残存赤血球数を算定した。また、参考調査として遠心時間ごとに尿沈渣より標本を作製し、光学顕微鏡 x400 にて赤血球形態の観察を行った。

結果

1. 遠心力の変化による残存率の検討

4 名の静脈採血による血液を試料 A～D とし、試料の血液検査結果を表 1 に示す。この試料 A～D を用いて、生理食塩水を用いて作製した低濃度の人工的血尿を A-1 群、高濃度の人工的血尿を A-2 群とした。また、ブドウ糖加乳酸リンゲル液による低濃度の人工的血尿を B-1 群、高濃度の人工的血尿を B-2 群とした。

表 1. 血球試料 A～D の血液検査値

	試料 A	試料 B	試料 C	試料 D
Hb (g/dL)	12.7	13.1	14.0	12.3
RBC ($\times 10^4/\mu$ L)	429	470	463	425
MCV (fL)	86.2	84.5	88.6	87.8
MHC (pg)	29.6	27.9	30.2	28.9
MCHC (g/dL)	34.3	33.0	34.1	33.0

遠心後の上清中赤血球数（残存率）は、A-1 群および A-2 群ともに遠心力が高くなるほど赤血球残存率は低下し、遠心力 700xg 以上では残存率 2.0%以下に低下した。また、A-1 群、A-2 群と同様に B-1 群、B-2 群ともに遠心力が高くなるほど赤血球残存率は低下し、遠心力 700xg を境に赤血球残存率が大幅に減少した。（表 2，図 1）

表 2. 人工的血尿における尿沈渣上清成分の平均赤血球残存率

遠心力 (xg)	残存率% (平均±sd)			
	A-1 群	A-1 群	B-1 群	B-2 群
400	8.05±3.97	8.11±3.77	8.29±3.81	8.08±3.31
500	5.55±1.87	3.95±2.03	3.79±0.24	3.83±1.82
600	6.11±0.58	3.66±1.86	4.56±2.28	1.63±0.28
700	1.40±0.45	1.89±0.48	2.07±0.98	1.45±0.65
800	1.41±0.69	1.23±0.67	1.16±0.65	0.60±0.23
900	1.24±1.03	0.20±0.08	1.09±0.18	0.54±0.24

* 無遠心状態の人工尿中赤血球数は、A-1 群: 1816.1±419.7 個/μL (mean±sd)、A-2 群: 4448.4±773.3 個/μL (同)、B-1 群: 2126.3±425.1 個/μL (同)、B-2 群: 5034.0±659.3 個/μL (同)

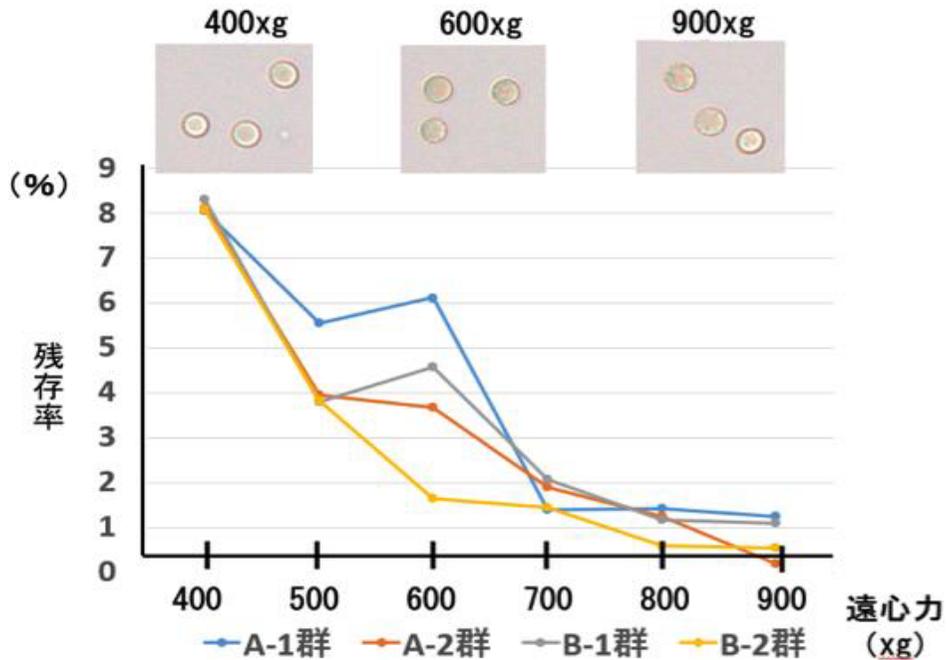


図 1. 遠心力による赤血球残存率の変化と鏡検による赤血球形態の変化 (A-1 群の一部遠心力についてのみ表示)

遠心後の上清中赤血球数は生理食塩水によるA系列とブドウ糖加乳酸リンゲル液によるB系列では、結果に差を認めなかった。参考調査として実施した尿沈渣標本における赤血球形態は、遠心力の変化に伴った変化を認めなかった。(図1)

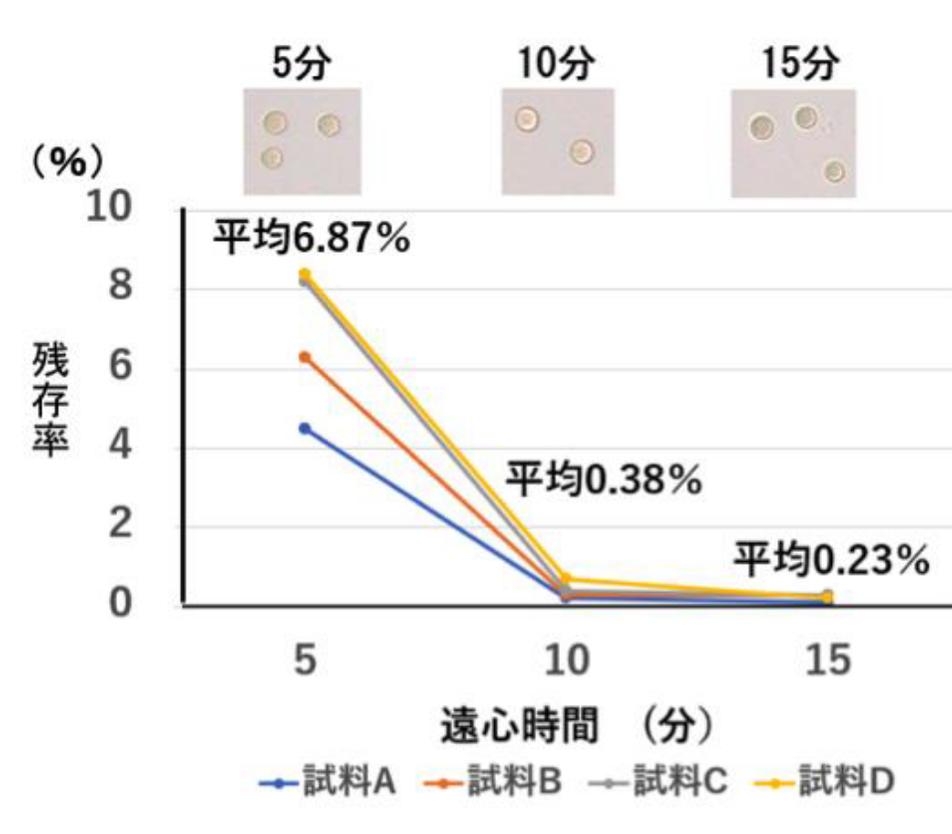


図2. 遠心時間による赤血球残存率の変化と鏡検による赤血球形態の変化

2. 遠心時間の違いによる残存率の検討

生理食塩水を用いて作製した人工的血尿を用いて遠心力 500xg での遠心時間 5 分、10 分、15 分での赤血球残存率を検討した。本邦の尿沈渣検査法の指定条件である遠心時間 5 分の時では残存率が約 7%あるのに対して、10 分遠心すると約 0.4%まで残存率が低下した。参考調査として実施した尿沈渣標本における赤血球形態は、遠心時間の変化に伴った変化を認めなかった。(図2)

考察

尿沈渣検査は尿中の有形成分である上皮細胞類、血球類、円柱類などについて正確に出現有形成分の鑑別分類と、血球類および細菌類ではその概数計測をすることで尿定性所見と組み合わせる尿異常を示す病態の推定情報として広く用いられている。特に血尿は尿に赤血球が混入した状態であり、腎・泌尿器系疾患の診断のための重要な症候である。本邦

における血尿の定義は、潜血反応陽性および尿沈渣検査において赤血球が 5 個/HPF 以上または無遠心尿においては 20 個/ μ L 以上と定義されている。しかし、尿沈渣検査の標本作成過程には尿量、尿沈渣量、積載量、鏡検における 1 視野あたり算定法など多くの誤差要因がある。そのなかでも遠心後の上清中に残存成分、特に赤血球の浮遊があることはこれまでも報告がなされているが、遠心時の浮遊成分の量的検討についての報告は少ない。種々の遠心条件下における上清中の赤血球の残存率について人工的血尿を用いた検討の結果、400xg では平均 8.1%、500xg では同 4.3%であり、遠心力が高くなるほど赤血球残存率は低下し、遠心力 700xg 以上では残存率 2.0%以下に低下した。また、遠心時間の検討では遠心時間 5 分の時では残存率が約 7%あるのに対して、10 分遠心すると約 0.4%まで残存率が低下した。

現在、尿沈渣検査法指針提案 JCCLS GP1-P4²⁾では遠心力 500xg、5 分と定義されている。今回の人工的血尿による残存率の検討より仮に顕微鏡による尿沈渣検査 HPF 1 視野に理論上 10 個あるべき場合、400xg では約 9.2 個、500xg では約 9.5 個となり、この程度では尿沈渣鏡検査においてはその影響を評価することは困難と思われる。しかし、筆者らの外来血尿患者 676 例の随時尿における検討⁷⁾では、上清の残存赤血球率は今回の検討よりかなり高値であり、かつ検体による差が大きかった。中には残存率が 50%以上の検体も存在し、残存率の高い検体は尿中赤血球数が 50 個/ μ L 以下の例に多く認められ、日常検査においては大きな課題と考える。この原因として尿中に含まれるアルブミンや薬剤、粘液糸など種々の成分が沈降状況に関係が影響していると考えられ、患者尿への赤血球の添加による検討が必要と考えられた。

そのうえで、より正確な尿沈渣検査法のあり方も考える必要があるかもしれないが、現在、NCCLS の米国ガイドライン GP16-A2⁵⁾および EU のガイドライン⁶⁾では遠心力 400xg と本邦より低く定められている。(表 3) また、臨床的評価基準においても前述のように本邦における血尿の定義は、尿中赤血球が 5 個/HPF 以上としているのに対し、米国泌尿器科学会ガイドラインによる Asymptomatic Microhematuria (AMH)の定義⁸⁾は 3 個/HPF 以上となっており、検査法の変更には十分な臨床とのコンセンサスが必要である。

表 3. 各ガイドラインの概要と血尿基準

	血尿基準赤血球数 (個/HPF)	尿量 (mL) (スピッツ)	遠心力 (xg) 時間 (分)
EU ⁶⁾	N/A	5~12	400 5
NCCLS ⁵⁾	3	10, 12, 15	400 5
JCCLS ¹⁾	5 または 20 (個/ μ L)・無遠心	10	500 5

今回の検討より精度の高い有用な尿沈渣検査のあり方について考察した。本実験では使用した赤血球は健常人のものであった。臨床検体においては様々な病態が背景にあり、例えば貧血など赤血球膜の虚弱な血液に強い遠心力・時間をかけると赤血球の変形や破壊が推定され、赤血球形態情報の鑑別が困難となることも危惧される。尿沈渣検査は尿中の出

現有形成分を鑑別し、血球類や細菌類ではその定量値の算出が病態の把握に必要とされている。しかし、その標本作成過程においては種々の誤差要因を含んでいる。近年、FCM法などによる尿沈渣検査の自動化が検討される中で、無遠心尿を用いた個数/ μL の算定が高精度で可能となったが、機器の赤血球誤判定要因についての注意が必要であり、一般的に誤判定要因としては酵母様真菌、脂肪滴、蔭酸カルシウム、細菌などが知られている。

そこで無遠心検体でFCM法をまず行い、血球類(RBC、WBCなど)、細菌などの数を測定する。次に、尿沈渣法で血球類の量の確認と上皮細胞、円柱、結晶などの測定を行う。また、体調や季節的影響によっては希釈尿・濃縮尿となっている場合もある。より正確に赤血球数を測定する際には、尿蛋白と同様に赤血球もクレアチニン補正をしたら良いのではないだろうか。この方法により全赤血球数の把握のみならず円柱や結晶などの見落としが少なく、高精度の検査結果を得られると考えられる。

おわりに

今回の検討により、本邦における遠心力 500xg、5分とした日常検査での尿沈渣検査では赤血球数が低値に算定されている可能性が示唆された。遠心力や遠心時間を変化させることにより赤血球残存率を大幅に低下させられることが確認できたが、今後、赤血球以外の成分に関して検討することにより、より高い精度の結果を得られる検査法について考えていきたい。

引用文献

- 1) 血尿診断ガイドライン編集委員会(編):血尿診断ガイドライン 2013, ライフサイエンス出版株式会社, 東京, 2013.
- 2) 日本臨床衛生検査技師会 JCCLS 尿沈渣検査法編集委員会(編):「尿沈渣検査法 GP1-P4」, 尿沈渣検査法 2010, 社団法人日本臨床衛生検査技師会, 東京, 2011.
- 3) 長谷部 友香, 他:尿中赤血球形態別にみた遠心上清中残存率の比較検討, 医学検査, 2009; 58: 1317-1321.
- 4) 寺岡 千織, 他:尿沈渣標本作成後の上清中の赤血球残存率と赤血球形態, 医学検査, 2016; 65: 350-353.
- 5) NCCLS. Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens; Approved Guideline-Second Edition. NCCLS document GP16-A2 (ISBN 1-56238-448-1). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2001.
- 6) European Confederation of Laboratory Medicine. European urinalysis guidelines. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 2000; 231:1-86.
- 7) 油野 友二, 他:検査部に必要な血尿診断ガイドライン 2013 のポイント, 生物試料分析, 2015; 38: 227-234.
- 8) The American Urological Association: American Urological Association (AUA) Guideline. Diagnosis, Evaluation and Follow-up of Asymptomatic Microhematuria (AMH) in Adults. 2016.