

尿中赤血球形態による出血起源鑑別法の位相差および光学顕微鏡での比較

大久典子*¹ 吉田克己*² 賀来満夫*³ 佐藤 博*⁴

Comparison between optical microscopic examination and phase contrast microscopic examination for diagnosing the origin of urinary bleeding

Noriko OHISA*¹, Katsumi YOSHIDA*², Mitsuo KAKU*³, and Hiroshi SATO*⁴

*¹Department of Clinical Laboratory, Tohoku University Hospital,

*²Department of Medical Technology, Tohoku University of Health Sciences,

*³Department of Infection Control and Laboratory Diagnostics, Internal Medicine,
Tohoku University Graduate School of Medicine,

*⁴Department of Nephrology, Endocrinology, and Hypertension, Tohoku University Hospital, Miyagi, Japan

要 旨

目 的：顕微鏡の血尿を呈した症例を対象に、位相差顕微鏡法および光学顕微鏡での無染色法と染色法を用いて、尿沈渣赤血球の形態所見から出血部位の鑑別を試みた。

方 法：臨床的あるいは組織学的に診断が確定している症例のうち、顕微鏡の血尿(5/HPF以上)を認めた腎疾患118例、下部尿路疾患42例の計160例を対象とした。観察した赤血球のうち、有棘状、標的状、指環状の3形態のいずれかが3%以上出現した場合を腎起源の出血、それ未満を下部尿路起源として検討を行った。

成 績：赤血球形態による比較では、感度は有棘状50.9%<標的状69.6%<指環状88.4%の順に有意に高く、特異度はそれぞれ94.9%、89.1%、89.1%で差を認めなかった。顕微鏡による比較では、位相差顕微鏡法の感度は88.1%で光学顕微鏡無染色法74.6%、光学顕微鏡染色法74.6%に比較して有意に高く、特異度はそれぞれ81.0%、90.9%、88.6%で差を認めなかった。腎起源の判定、下部尿路起源の判定では、ともに1視野の赤血球数が少ない場合に誤った評価は増加した。

結 論：有棘状赤血球のみならず、指環状、標的状形態は糸球体起源評価に有用であり、光学顕微鏡法は出血起源鑑別に十分有用な検査法であることが示唆された。

Purpose : Phase contrast microscopy method is useful in the examination of urine sediment to differentiate glomerular(G1) hematuria from non-glomerular(nonG1) hematuria. In this study, we compared the diagnostic value of optical microscopy with that of phase contrast microscopy.

Method : One hundred and sixty fresh urine samples of microscopic hematuria(5/HPF or more) from 118 patients with renal disease and 42 patients with urologic disease were analyzed. The erythrocytes referred to as G1, are defined to have acanthocytes, target configuration, or finger ring shape, and a G1 cell/total erythrocyte ratio greater than 3% is defined as reliable marker for G1 bleeding.

Result : Sensitivity and specificity of this criteria for G1 bleeding were 50.9% and 94.9% in acanthocytes, 69.6% and 89.1% in the target configuration, and 88.4% and 89.1% in the finger ring, respectively. As for

*¹ 東北大学病院診療技術部検査部門, *² 同 医学部保健学科, *³ 同 大学院医学系研究科感染制御・検査診断学分野, *⁴ 同 病院腎・高血圧・内分泌科 (平成18年3月28日受理)

the microscopic observation methods, the sensitivity and specificity of this criteria for GI bleeding were 88.1 % and 81.0 % with phase contrast microscopy, 74.6 % and 90.9 % with optical microscopy with no dyeing, and 74.6 % and 88.6 % with optical microscopy with dyeing, respectively.

Conclusion : GI and nonGI hematuria were correctly diagnosed by counting the urinary GI cells not only by phase contrast microscopy, but also by optical microscopy. This method seems to have important clinical usefulness by offering information on urinary bleeding.

Jpn J Nephrol 2006 ; 48 : 401-406.

Key words : hematuria, erythrocyte shape, phase contrast microscopy, optical microscopy

はじめに

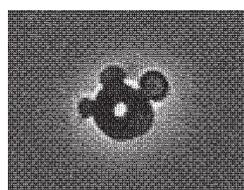
位相差顕微鏡による尿沈渣標本中の赤血球の形態観察は、尿路における出血部位の推定に役立つ重要な所見であると報告されている¹⁻³⁾。しかし、日常業務では尿沈渣検査は光学顕微鏡による無染色、あるいは Sternheimer 染色法で実施されている。光学顕微鏡を用いる日常業務の中で出血起源鑑別に直結する情報を提供することができればより理想的である。

生駒⁴⁾が肉眼的血尿を認めた症例を対象として走査電子顕微鏡と光学顕微鏡で比較検討を行った研究では、従来報告されているような位相差顕微鏡や走査電子顕微鏡による観察を行わなくても、光学顕微鏡により尿中赤血球が単一性であるか多様性に富んでいるかを確認することにより、糸球体性と非糸球体性の出血起源の鑑別が十分可能であると報告されている。肉眼的血尿症例よりも頻度が高い顕微鏡的血尿症例においても、生駒の報告のように、光学顕微鏡による赤血球形態観察から出血起源の鑑別が可能であれば、臨床的にきわめて有用である。

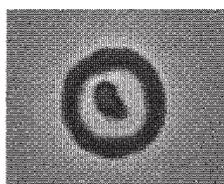
今回われわれは、臨床的に診断が確定している顕微鏡的血尿症例を対象とし、位相差顕微鏡法および光学顕微鏡無染色法、染色法を用いて尿沈渣赤血球の形態を評価し、その出血起源鑑別における有用性の差について検討を試みた。

対象と方法

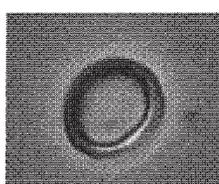
東北大学病院腎・高血圧・内分泌科および泌尿器科を受診し、臨床的あるいは組織診断学的に確定診断された症例のうち、5/HPF (high power field) 以上の顕微鏡的血尿を認めた腎疾患 118 例(男性 55 例, 女性 63 例, 年齢 7~84 歳, 平均 50±18 歳), および腎盂以下の下部尿路疾患 42 例(男性 19 例, 女性 23 例, 年齢 6~80 歳, 平均 53±20 歳)の計 160 例を対象とした。腎疾患の内訳は、IgA 腎症 46 例, IgA 腎症以外の糸球体腎炎 22 例, ネフローゼ症候群 15 例, 糖尿病性腎症 15 例, 腎硬化症 8 例, ループス腎炎 4 例, 紫斑病性腎炎 2 例, 骨髄移植 1 例, ANCA 関連腎炎 1 例, その他 4 例。下部尿路疾患の内訳は、尿路感染症 20 例, 腫瘍 7 例, 結石 6 例, 水腎症 2 例, 術後血尿症 2 例, その他 5 例である。当院検査室に提出された新鮮随時尿検体を用い、Japanese committee for clinical laboratory standards (JCCLS) 法⁵⁾に準じて尿沈渣を作製し、事前に診断の情報なしで、位相差顕微鏡法、光学顕微鏡無染色法、光学顕微鏡染色法 (Sternheimer 染色) の順に尿沈渣検査に熟練した 3 人で鏡検した。われわれの一人である三浦ら⁶⁾の報告に基づき、赤血球が有棘状、標的状、指環状の 3 形態 (Fig.)⁶⁾を呈した場合に糸球体起源の変形赤血球とした。また、事前に鏡検者間での評価を一致させ、これらの形態のいずれかが 3 % 以上出現したときに腎起源の出血とし、2 % 以下の場合には下部尿路起源とした。検討内容は下記の項目である。



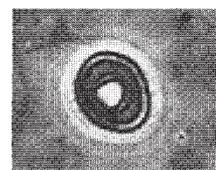
Acanthocytes



Target
glomerular red cells



Finger ring



Donut-like
non-glomerular red cell

Fig. The shapes of glomerular and non-glomerular red cells in the urine

Table 1. Clinical characteristics

	Glomerular disease (n=118)	Urological disease (n=42)	Significant difference
Age(years)	50.2±18.3	52.8±20.5	n. s.
Male/Female	55/63	19/23	
Urine pH	6.12±0.69	6.14±0.66	n. s.
Urine specific gravity	1.014±0.006	1.017±0.007	0.005
Osmotic pressure(mOsm)	527±208	627±182	0.004
Serum TP(g/dl)	6.83±0.72	7.12±0.54	0.03
Serum UN(mg/dl)	20.3±12.7	19.1±15.2	n. s.
Serum Cr(mg/dl)	1.38±1.55	1.09±1.08	n. s.

Data are expressed as mean±SD. n. s. : not significant

TP : total protein, UN : urea nitrogen, Cr : creatinine

Table 2. Sensitivity and specificity of glomerular red cells in the diagnosis of glomerular disease

Microscopic methods	sensitivity specificity		Red cells					
			Acanthocytes		Target		Finger ring	
	sensitivity	specificity	sensitivity	specificity	sensitivity	specificity	sensitivity	specificity
Phase contrast(%)	88.1	81.0	58.9 [§]	92.8	67.9 ^{¶§}	81.0	86.7 [¶]	81.0
Optical with no dyeing(%)	74.6 [†]	90.9	48.9 [§]	91.8	72.7 ^{¶§}	93.2	89.8 [¶]	95.5
Optical with dyeing(%)	74.6 [†]	88.6	44.9 [§]	100.0	68.2 ^{¶§}	93.2	88.6 [¶]	90.9
Average of the three methods(%)	79.1	86.8	50.9 [§]	94.6	69.6 ^{¶§}	89.1	88.4 [¶]	89.1

[†] p<0.05 vs. phase contrast microscopy, [¶] p<0.05 vs. acanthocytes red cell, [§] p<0.05 vs. finger ring red cell

1) 有棘状, 標的状, 指環状赤血球それぞれの腎疾患診断における感度, 特異度を求める。

2) 位相差顕微鏡法, 光学顕微鏡無染色法, 光学顕微鏡染色法による上記3形態赤血球出現時の腎疾患診断における感度, 特異度を求める。

3) 症例の1視野当たりの赤血球数について, 5~9/HPF, 10~19/HPF, 20~29/HPF, 30~49/HPF, 50/HPF以上の5群に分類し, 誤った評価例数(比率)を求める。

尿試料は匿名化して個人情報保護に配慮した。各パラメータは平均値±標準偏差で表示した。統計学的検討は χ^2 検定, t検定およびスピアマン順位相関で行い, 危険率5%以下を有意とした。

結 果

対象とした腎疾患および下部尿路疾患症例の一般検査データをTable 1に示した。血清総蛋白および尿浸透圧, 比重は腎疾患群で有意に低値であった。次に, 位相差顕微鏡法, 光学顕微鏡無染色法, 染色法の3方法を用い, 上記

3種の変形赤血球が出現したときに腎起源の出血と診断した際の感度, 特異度をTable 2に示す。3方法による感度, 特異度それぞれの平均では有棘状で50.9%, 94.9%, 標的状で69.6%, 89.1%, 指環状で88.4%, 89.1%であったが, 感度は指環状で最も高く, 次いで標的状, 有棘状の順であり, 特異度に差はなかった。

次に, 3形態のいずれかの変形赤血球が認められたときに腎からの出血と診断した場合の感度, 特異度は, 位相差顕微鏡法で88.1%, 81.0%, 光学顕微鏡無染色法で74.6%, 90.9%, および光学顕微鏡染色法で74.6%, 88.6%であり, 感度は位相差顕微鏡法が光学顕微鏡法に比較して有意に高く, 特異度に差はなかった。

赤血球数がこれらの感度, 特異度に及ぼす影響について検討するため, 1視野当たりの赤血球数により5群に分類して検討した(Table 3)。腎疾患にもかかわらず, 変形赤血球陰性と誤って評価した症例と1視野当たりの赤血球数による分類との間には有意な相関を有し(p<0.001), 赤血球数が少ないと誤評価率は増加し, 1視野当たりの赤血球数が5~9/HPFの症例群での誤評価率は3方法の平均では29.4%であった。その一方, 1視野当たりの赤血球数が

Table 3. Number of cases with a mistake in the evaluation in glomerular disease

Microscopic methods	Mistake total	Class of mistake				
		5~9/HPF	10~19/HPF	20~29/HPF	30~49/HPF	50/HPF over
Phase contrast	14/118	7/49	4/34	1/11	1/10	1/14
Optical with no dyeing	30†/118	17/49	7/29	1/14	1/14	4/12
Optical with dyeing	30†/118	20/51	6/29	1/16	0/10	3/12
Average of the three methods(%)	20.9	29.4	18.9	7.5	5.7	21.8

† p<0.05 vs. phase contrast microscopy

upper/lower : mistake number/total number

Table 4. Number of cases with a mistake in the evaluation in urological disease

Microscopic methods	Mistake total	Class of mistake				
		5~9/HPF	10~19/HPF	20~29/HPF	30~49/HPF	50/HPF over
Phase contrast	8/42	6/14	0/4	1/8	1/7	0/9
Optical with no dyeing	4†/42	2/13	1/7	1/6	0/6	0/10
Optical with dyeing	5†/42	3/12	1/8	1/7	0/5	0/10
Average of the three methods(%)	13.5	27.8	8.5	14.5	4.8	0.0

† p<0.05 vs. phase contrast microscopy

upper/lower : mistake number/total number

多くなると誤評価が少なくなるが, 50/HPF 以上での誤評価は位相差顕微鏡法で1例, 光学顕微鏡法では3~4例であった。次に, 下部尿路疾患についても腎疾患と同様に検討したところ(Table 4), 誤って変形赤血球陽性と評価した症例数と1視野当たりの赤血球数による分類との間には有意な相関を有し($p<0.001$), 赤血球数が5~9/HPFの症例群における誤評価率は3方法の平均が27.8%であり, 他の4群に比較して有意に高かった。

考 察

Birchら¹⁾, Fairleyら²⁾, Fassettら³⁾は, 位相差顕微鏡や走査電子顕微鏡を用いて尿中赤血球形態観察により糸球体出血と非糸球体出血の鑑別が可能であると報告している。1991年, Kohlerら⁷⁾が変形赤血球のなかで, “こぶ”状に胞体が突出した形態を呈するものをacanthocytes(AC:有棘型)^{7,8)}とよび, 糸球体由来出血に特異的であるとした。彼らは位相差顕微鏡法を用いた観察でACが5%以上出現した場合を糸球体出血と判定すると, 感度52%, 特異度98%であったと報告している。われわれの今回の検討では, 有棘状が3%以上出現したときに腎起源

の出血と判定したが, 感度, 特異度はKohlerら⁷⁾の結果とほぼ一致した。ただし感度50.9%が示すように, 腎疾患全症例に有棘状が認められるとは限らない。そこで, 有棘状が認められない場合にはドーナツ型の形態的な変化も出血起源鑑別法として有用の可能性がある。しかし, ドーナツ型にはKohlerら⁷⁾が示したdiscocytes, echinocytes, stomatocytes, codocytes, knizocytes型などがあり, それらは腎疾患, 下部尿路疾患のいずれでも尿中に出現することから, その鑑別については評価が難しい。

われわれの一人である三浦らはネフロンモデル⁹⁾を用いた実験で, 糸球体性血尿における赤血球の変形機序について検討を行っている。その検討によれば, 糸球体から漏出した赤血球はネフロン内の尿細管起始部の低浸透圧領域を通過するときに溶血して様々なヘモグロビン濃度(多様性)を有するに至る。その状態で集合管の高浸透圧領域に達すると, ヘモグロビンの流出により, Fig.に示すように, 外側の狭いリング部と広い内面積に変形していくことがわかった⁶⁾。このように糸球体起源出血の場合は, 顕微鏡観察でリング部が薄く, 内径面積が広く, 内側のヘモグロビンが欠損している状態として認められる(指環状赤血球)。一方同じ実験を通して, 内側にヘモグロビンが残りリング

部が幅広く観察されるものは糸球体起源で出現することがわかった。

そこで今回、位相差顕微鏡と光学顕微鏡の比較にあたり、標的状赤血球、指環状赤血球についても変形赤血球の指標として検討した。その結果は、3方法の平均では有棘状の50.9%に対して標的状では69.6%、指環状では88.4%であり、指環状で最も感度が高かった。一方、特異度は糸球体由来出血に最も特徴的に出現するとされる有棘状が94.9%であったが、標的状、指環状でも、ともに89.1%とほぼ同様の特異度を示した。このことから、有棘状のみでなく標的状、指環状も変形赤血球とみなしてよいものと考えられた。

尿中赤血球形態観察から腎疾患を鑑別できる変形赤血球出現率の基準値は2~4%¹¹⁾や5%⁶⁾と報告者により様々である。われわれは予備的な検討で、赤血球形態の有棘状に関しては基準値として3%を用いるのが最も有用との知見を得ていたことから、本研究では標的状、指環状についてもその基準を用いた。その結果、腎疾患症例で3形態いずれかの変形赤血球が3%以上出現した症例は、位相差顕微鏡法で88.1%、光学顕微鏡法では無染色法、染色法ともに74.6%であり、光学顕微鏡法の感度がやや低かったが、特異度では位相差顕微鏡法と光学顕微鏡法に差はなかった。光学顕微鏡法は74.6%の感度を有し、位相差顕微鏡法と同等の特異度を示したことから、出血起源の鑑別には十分に有用と考えられる結果であった。また、光学顕微鏡での無染色法と染色法の比較では、感度、特異度に差を認めなかった。当初、染色液による溶血の影響⁹⁾が懸念されたが、染色液を混和後直ちに鏡検を行えば、その影響はほとんど無視できると考えられた。

一方、今回の基準で変形赤血球を確認できなかった腎疾患症例は、位相差顕微鏡法で14例(11.9%)、光学顕微鏡法による無染色法、染色法でそれぞれ30例(25.4%)であった。この点に関しては位相差顕微鏡法の優位性が示唆されたが、赤血球数が5~9/HPFの症例群に限ると、位相差顕微鏡法を含め3方法いずれにおいても、10/HPF以上の赤血球数を呈する症例群に比較して誤判定率が増加しており、大きな問題点と考えられた。JCCLS標準法⁹⁾では鏡検すべき視野数は最低10視野、理想的には30視野とされている。出現率3%で出血起源の鑑別が可能とすれば、5~9/HPFの赤血球の症例では20視野を鏡検すれば評価可能な赤血球数が得られることになる。実際には、それ以上の視野の鏡検を行っているにもかかわらず誤判定される症例が存在する。また、光学顕微鏡法では50/HPF

以上で12例中3~4例に誤評価があった。その理由としては、鏡検時の見落とし、あるいは腎疾患症例でも変形赤血球の出現しない可能性などが考えられるが詳細は不明である。以上のように5~9/HPFの赤血球数の症例については問題が残るが、10/HPF以上の赤血球出現時にのみ出血起源の判定が可能なものとして検査を実施すれば、診断精度はさらに上昇すると考えられる。いずれにしても、感度74.6%、特異度90.9%を有する無染色法での光学顕微鏡による赤血球形態観察は位相差顕微鏡によるものに比較して遜色なく、日常検査として十分対応できる精度を有すると結論できるように思われた。

なお、尿中赤血球5/HPFといえども病的な所見であることは事実である。本研究において5~9/HPFの症例が全対象の約4割を占めていることから、それらの症例を今後どのように取り扱うかが大きな課題である。現在行われている尿中赤血球形態による出血起源鑑別法の限界の一つとも考えられた。

結 論

臨床的あるいは組織学的に確定診断され、顕微鏡的血尿(5/HPF以上)を認めた腎疾患および下部尿路疾患症例について尿中赤血球の形態による出血起源の鑑別を試みた。指環状、標的状赤血球の感度、特異度は高く、光学顕微鏡法は位相差顕微鏡法に比較して遜色なかったことから、光学顕微鏡法による赤血球形態観察は日常の検査でも有用な情報を提供することができると考えられた。

文 献

1. Birch DF, Fairley KF. Hematuria. Glomerular or non-glomerular? *Lancet* 1979; 2: 845-846.
2. Fairley KF, Birch DF. Hematuria: A simple method for identifying glomerular bleeding. *Kidney Int* 1982; 21: 105-108.
3. Fassett RG, Horgan BA, Gove D, Mathew TH. Scanning electron microscopy of glomerular and non-glomerular red blood cells. *Clin Nephrol* 1983; 1: 11-16.
4. 生駒雅昭. 肉眼的血尿症例の尿中赤血球形態の観察とその臨床的有用性について. *日小児会誌* 1985; 89: 2295-2302.
5. 日本臨床衛生検査技師会編. 尿沈渣検査法. 東京: 社団法人日本臨床衛生検査技師会, 1996: 7-14.
6. 三浦秀人, 五十嵐雅彦, 富永真琴. 尿中変形赤血球の形態による新たな出血源鑑別法の検討. *臨床病理* 2003; 51: 740-744.
7. Kohler H, Wandel E, Brunck B. Acanthocyturia—A charac-

- teristic marker for glomerular bleeding. *Kidney Int* ; 1991 ; 40 : 115-120.
8. Kitamoto Y, Tomita M, Akamine M, Inoue T, Itoh J, Takamori H, Sato T. Differentiation of hematuria using a uniquely shaped red cell. *Nephron* 1993 ; 64 : 32-36.
 9. 三浦秀人, 山口一郎, 福山はる. 尿中赤血球出現のメカニズム第3報, 高浸透圧液中諸成分の影響. *医学検査* 1994 ; 43 : 1735-1741.
 10. 稲垣勇夫. 尿沈渣染色法. *検査と技術* 1994 ; 22 : 424-430.
 11. Heine GH, Sester U, Girndt M, Kohler H. Acanthocytes in the urine : useful tool to differentiate diabetic nephropathy from glomerulonephritis? *Diabetes Care* 2004 ; 27 : 190-194.