

## 尿中赤血球形態による腎尿路障害の鑑別診断に関する研究

### 第1報 尿中赤血球の形態変化についての基礎的検討

橋本 淳

血尿の発現機構を探り、その病態を明らかにする目的で糸球体疾患5例、非糸球体疾患5例の尿沈渣赤血球形態を走査型電子顕微鏡で詳しく観察した。また浸透圧、pHの変化の赤血球形態に与える影響を検討した。

尿中赤血球には有棘赤血球、扁平な不整円形赤血球、球状赤血球、菲薄化赤血球等が認められた。菲薄化赤血球は糸球体疾患例全例に認められたが、非糸球体疾患例には認められなかったことから糸球体性血尿に特徴的な変形形態であると考えられた。また糸球体性血尿にみられる尿中赤血球変形の成因は尿細管における浸透圧およびpHの変化以外の未知の因子が主体であると考えられた。

(昭和63年10月31日採用)

## Morphological Studies of Urinary Red Blood Cells in Renal and Urinary Tract Disorders

### (I) Studies of Morphological Changes in Urinary Red Blood Cells by Scanning Electron Microscopy

Jun Hashimoto

To differentiate glomerular hematuria from non-glomerular hematuria, urinary red blood cells from 5 cases of various types of glomerulonephritis as well as those from 5 non-glomerular hematuric patients were investigated morphologically by scanning electron microscopy. The influence of osmolarity and pH on the form of erythrocytes was also investigated.

Echinocytes, erythrocytes with an irregularly contoured disc, spherocytes and thin erythrocytes were observed in urine sediments. Thin erythrocytes were observed in all cases of glomerular disease, but they were not observed in cases of non-glomerular hematuria. Therefore, it was suggested that thin erythrocytes are peculiar to glomerular hematuria. The cause of the distortion of erythrocytes in nephritic urine was considered. They appear to be unaffected by the urinary pH or osmolarity, but must be influenced by some other factors in the urine.

(Accepted on October 31, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 15 (1): 86-93, 1989

**Key Words** ① Hematuria ② Urinary red blood cell morphology  
③ Scanning electron microscopy

## 緒 言

血尿患者の診療において尿中赤血球が糸球体由来であるか、非糸球体由来であるかを鑑別することは血尿の診断と次に行うべき検査を選択する上で重要である。Birch, Fairley<sup>1)</sup> は1979年に位相差顕微鏡による尿中赤血球形態の観察を行って血尿の由来の鑑別が可能であることを報告した。その中で糸球体性血尿では尿中赤血球が多様な変形を示すのに対して、非糸球体性血尿では尿中赤血球が傷害されずに一定の形態を保つと述べた。その後 Fairley,<sup>2)</sup> Fassett,<sup>3)</sup> Rizzoni,<sup>4)</sup> De Santo ら<sup>5)</sup> によってこうした赤血球形態観察による血尿病態鑑別の有用性が報告された。しかしながらこれらの分析方法では混合性の形をとり糸球体型、非糸球体型の診断が困難な症例が少なくないことも併せて報告されている。

著者は尿中赤血球変形の発現機構を探り、血尿病態を明らかにする目的で、走査型電子顕微鏡を用いて臨床例10例の尿中赤血球を観察し、さらに尿中赤血球形態変化にかかわると予想される尿浸透圧およびpHの赤血球形態に対する影響を調べた。

## 対 象 と 方 法

### 1. 対 象

糸球体疾患5例、非糸球体疾患5例の血尿患者を対象とした。その診断の内訳はIgA腎症3例、メサングウム増殖性糸球体腎炎、急速進行性糸球体腎炎、前立腺癌、膀胱癌、尿管結石、嚢胞腎破裂、膀胱尿管逆流現象手術後各1例である（Table 1）。以上10例の尿中赤血球を走査型電子顕微鏡にて観察した。被験尿としては蓄尿による変化を避けるために、いったん排尿させてこれを捨て、その後1時間以内に採取した新鮮尿を用いた。

### 2. 走査型電子顕微鏡による尿沈渣の観察

①被験尿10mlを1,500rpm, 5分間遠心して得られた沈渣をリン酸緩衝食塩液（PBS）で洗浄後、1%グルタルアルデヒド溶液で90分

Table 1. Diagnosis in 10 patients with hematuria

No. 1	IgA 腎症
No. 2	IgA 腎症
No. 3	IgA 腎症
No. 4	メサングウム増殖性糸球体腎炎
No. 5	急速進行性糸球体腎炎
No. 6	前立腺癌
No. 7	膀胱癌
No. 8	尿管結石
No. 9	嚢胞腎破裂
No. 10	膀胱尿管逆流現象

間固定した。②これをPBSで洗浄後、1%オスミウム酸溶液で60分間、後固定を行った。③沈渣をPBSで洗浄後、50%エタノールを浮遊させ、これを金-パラジウム（Au-Pd）で被覆処理済みのカバーガラスに塗抹した後、70%, 80%, 90%, 95%, 100%のエタノール列で脱水。④酢酸イソアミル中に20分間静置した後、臨界点乾燥を行った。⑤Au-Pd ion sputter coatingの後、⑥日立走査型電子顕微鏡S-570型（加速電圧20kv）を用いて1,000~10,000倍で鏡検した。各症例につき100個以上の赤血球を観察した。

### 3. 赤血球に対するpHの影響の検討

pH 5.8, pH 7.4, pH 8.0に調製した0.14Mリン酸緩衝液10mlに正常人血液0.05mlを滴下、混和し20分間静置後に尿沈渣と同様に固定処理を行い、走査型電子顕微鏡にて観察した。

### 4. 浸透圧とpHの変化が赤血球形態に与える影響の検討

①Figure 1のごとくpH, 浸透圧の異なる8種類のリン酸緩衝液を作成し37°Cに保温した。これらの各々200mlずつをビーカーにとり、A, B, C, Dの4系列を作った。②A列, B列ではpHを7.4に固定して浸透圧のみの変化が赤血球形態に与える影響を観察した。C列, D列では浸透圧とpHの両方を尿細管におけるそれらの変化に従って変動させ、尿細管における浸透圧およびpHの変化が赤血球形態に与える影響を観察するためのモデルとした。

③濾紙で2.5×9cmの袋を作成し、まず第1段階のビーカーに袋の下部を沈めた。④袋の

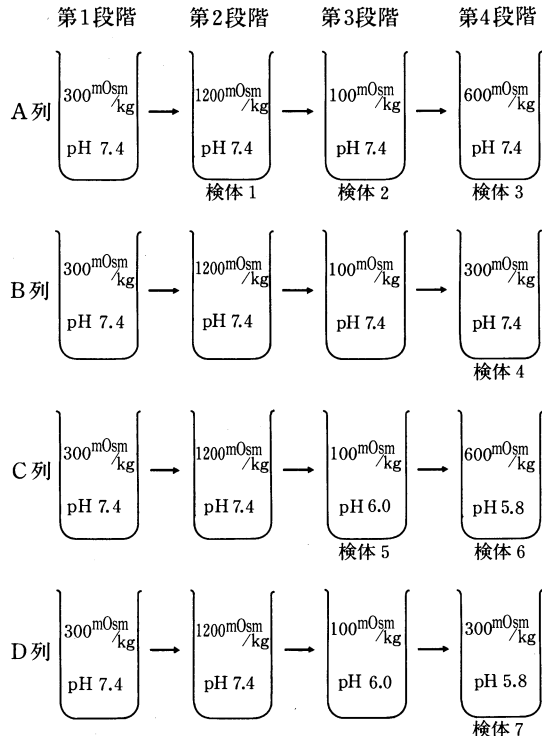
中に正常人血液 0.1 ml を滴下し、以後1分ごとに第1段階→第2段階→第3段階→第4段階へと袋を移動し、なかの pH および浸透圧を変化させた。各段階において袋とビーカーを軽く振盪して pH および浸透圧の変化を促進した。

⑤ **Figure 1** の検体 1～9 において赤血球を含んだ緩衝液を各々 1 ml 採取し、固定のためにグルタルアルデヒド溶液に混じた。グルタルアルデヒド溶液は検体混和後 1% となるように調製した。

## 結 果

### 1. 臨床例における尿沈渣赤血球の観察

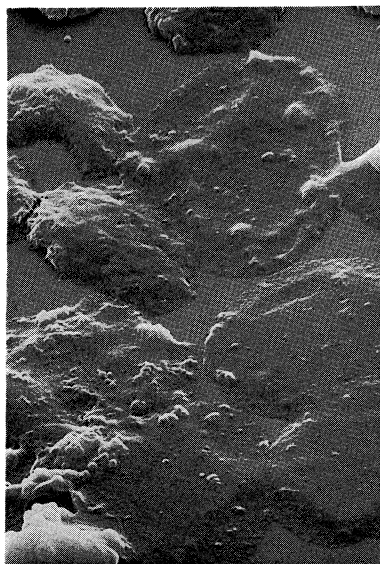
まず特異な形態を示した赤血球 ghost と菲薄化赤血球について説明を加える。赤血球 ghost は細胞質を失い、細胞膜だけが残った赤血球である。走査型電子顕微鏡による観察ではカバーガラス上に薄く延びた状態で付着し、その表面



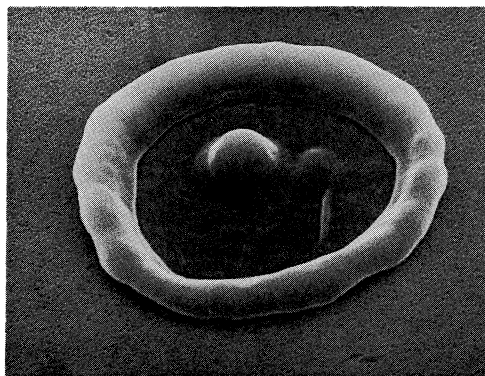
**Fig. 1.** Procedure for the study of the influence of osmolarity and pH on the form of erythrocytes

は平滑から粗な状態まで様々であった (**Fig. 2**)。菲薄化赤血球は光顕所見における central pallor にあたる中心陥凹部が拡大し、相対する細胞膜が密着した赤血球である (**Fig. 3**)。

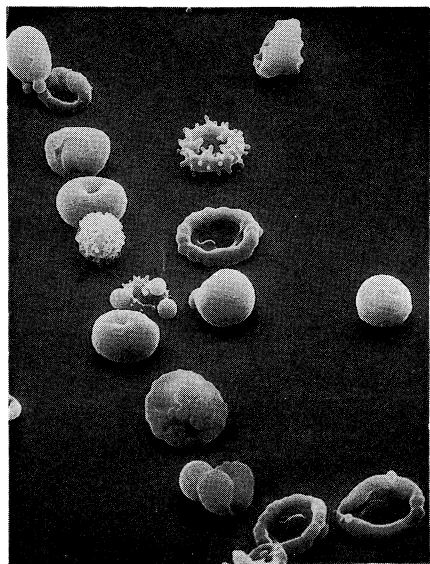
糸球体腎炎症例の尿沈渣をみると、症例 1 では赤血球 ghost がほとんどであった。その間に菲薄化した赤血球が点在していた。また菲薄化赤血球の外表面は損傷を受けたと考えられる粗な状態であった。症例 2 は比較的厚みをもった赤血球が多かった。また菲薄化した赤血球も混在していた (**Fig. 4**)。症例 3 は菲薄化



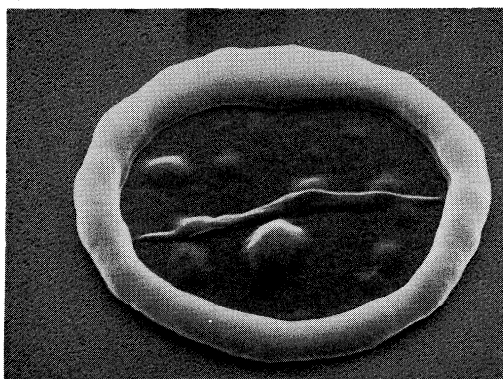
**Fig. 2.** Scanning electron micrograph of ghost cells ( $\times 10,000$ )



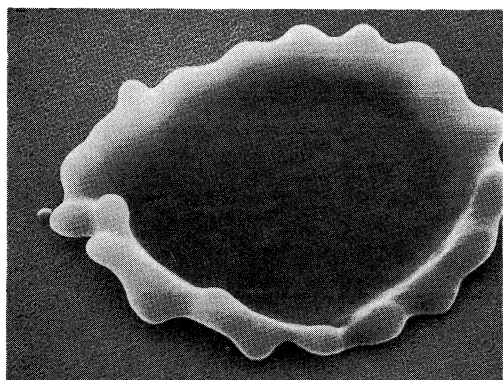
**Fig. 3.** Scanning electron micrograph of a thin erythrocyte ( $\times 5,000$ )



**Fig. 4.** Glomerular hematuria (scanning electron microscopy,  $\times 2,000$ )

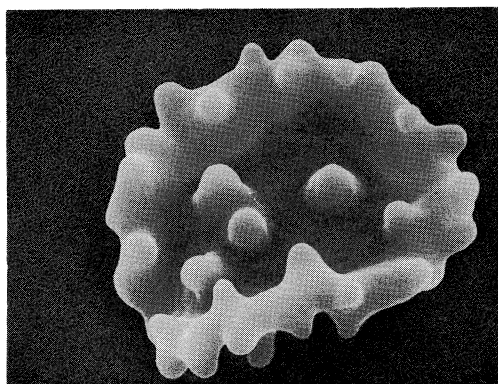


**Fig. 5.** Scanning electron microscopy showing a thin erythrocyte ( $\times 10,000$ )

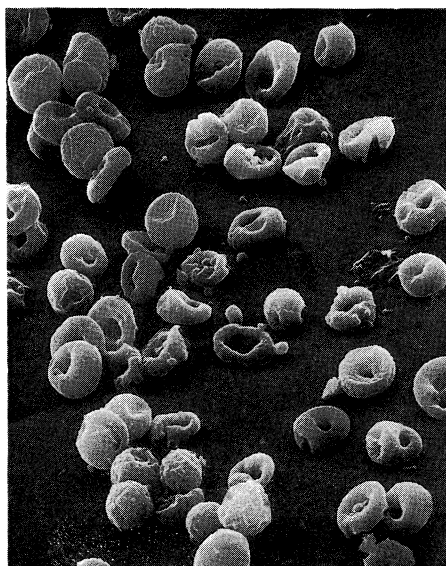


**Fig. 6.** Scanning electron microscopy showing a thin erythrocyte ( $\times 10,000$ )

した赤血球が多く、比較的厚みをもった赤血球は約 1/30 にすぎなかった。非薄化赤血球の辺縁は様々な形をとり、平滑 (**Fig. 5**)、波形 (**Fig. 6**)、突起状 (**Fig. 7**) などを示した。症例 4 も非薄化赤血球がほとんどであった。症例 5 は赤血球 ghost が比較的多く認められた。赤血球 ghost 以外では厚みをもった赤血球が多いがその大きさ、形は不揃いであった。また約半数は細胞膜表面が症例 1 と同様に粗な状態の赤血球であった (**Fig. 8**)。他方、非糸球体



**Fig. 7.** Scanning electron microscopy showing a thin erythrocyte with crenation ( $\times 10,000$ )



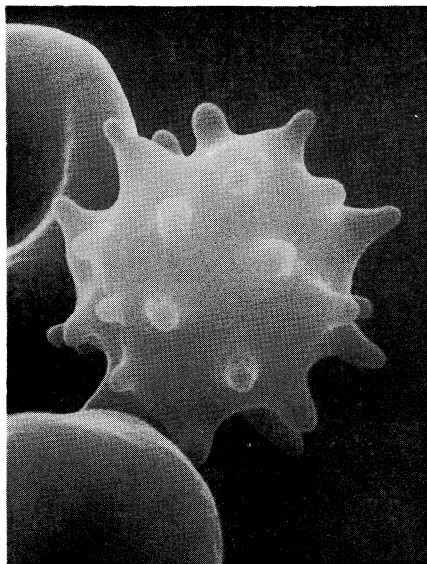
**Fig. 8.** Glomerular hematuria (scanning electron microscopy,  $\times 2,000$ )

疾患例をみると症例6は正常形態赤血球と有棘赤血球とが混在していた (**Fig. 9**). 症例7は正常形態赤血球がほとんどであったが有棘赤血球も混在していた (**Fig. 10**). 症例8は有棘赤血球が多かった. 症例9は赤血球 ghost が約半数を占めた. 菲薄化赤血球は認められず, 有

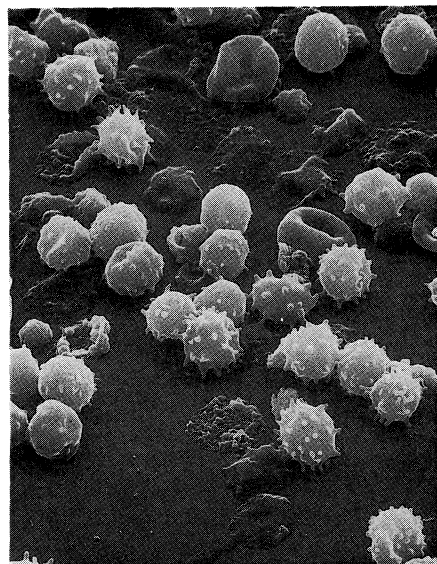
棘赤血球がほとんどであった (**Fig. 11**). 症例10は正常形態赤血球が大部分を占めた.

## 2. 赤血球形態に対する pH の影響

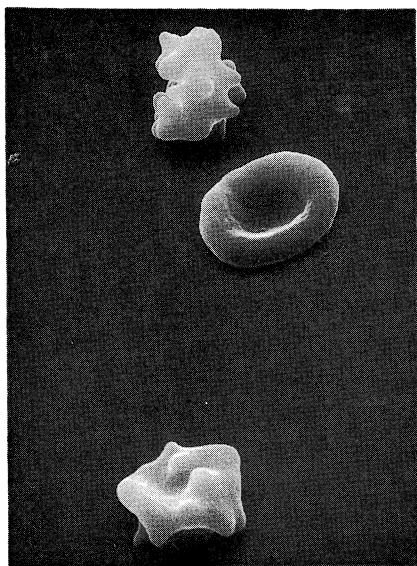
pH 5.8 のリン酸緩衝液に正常人血液を浮遊させた場合, 赤血球は有口赤血球および球状赤血球に変化した (**Fig. 12**). pH 7.4 および



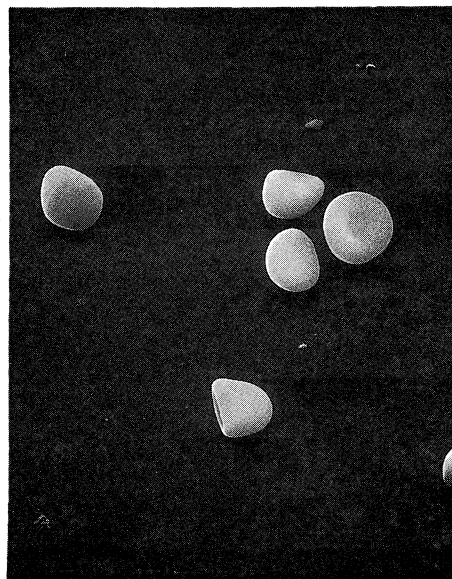
**Fig. 9.** Scanning electron microscopy showing a echinocyte ( $\times 10,000$ )



**Fig. 11.** Scanning electron microscopy showing echino-spherocytes and ghost cells ( $\times 2,000$ )



**Fig. 10.** Non-glomerular hematuria (scanning electron microscopy,  $\times 3,500$ )



**Fig. 12.** Scanning electron microscopy showing stomatocytes and stomatospherocytes ( $\times 2,000$ )

pH 8.0 では明らかな変形を示さなかった。

### 3. 浸透圧と pH の経時的变化が赤血球形態に与える影響

a. pH を 7.4 で一定にした場合（A 列, B 列）

① 1, 200 mOsm/kg, pH 7.4 溶液において赤

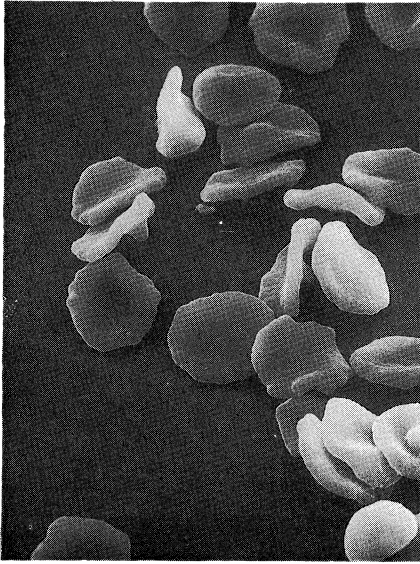


Fig. 13. Scanning electron microscopy showing erythrocytes with an irregularly contoured disc ( $\times 2,000$ )

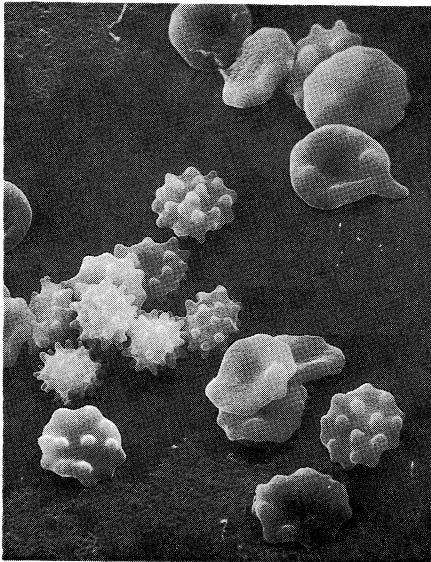


Fig. 14. Scanning electron microscopy showing echinocytes and erythrocytes with an irregularly contoured disc ( $\times 2,000$ )

血球は扁平な不整円形を示した (Fig. 13).

② これを第 3 段階の 100 mOsm/kg, pH 7.4 溶液に移すと溶血を来した。溶血を免れた赤血球の多くは球状および卵形を呈した。③ 次に 600 mOsm/kg, pH 7.4 溶液に移すと、溶血を免れた赤血球のほとんどは正常形態に復した。一部の赤血球は有棘赤血球となった。④ 第 3 段階から 300 mOsm/kg, pH 7.4 溶液に移すとほとんど③と同様の形態を示したが、有棘赤血球はやや少なかった。

b. pH を酸性に変動させた場合

① 1, 200 mOsm/kg, pH 7.4 溶液から 100 mOsm/kg, pH 6.0 の溶液に移すと溶血を来し、残存した赤血球はほぼ正常形態の赤血球に有棘赤血球を混じた状態となった。② 第 3 段階の赤血球を 600 mOsm/kg, pH 5.8 の溶液に移すと①の状態に加えて扁平な不整円形赤血球が認められた (Fig. 14)。③ 第 3 段階の赤血球を 300 mOsm/kg, pH 5.8 の溶液に移すと②で認められた有棘赤血球はほとんど認められず、正常形態赤血球が見られた。

## 考 按

血尿の由来が糸球体性であるか非糸球体性であるかの鑑別には尿中赤血球形態の観察が有用であるとされている。一般に糸球体性血尿では尿沈渣赤血球の変形が強度かつ多彩であるのに比べ、尿路系を中心とした非糸球体性血尿では赤血球変形が軽度であり、変形赤血球の出現頻度が低い。しかし症例によっては赤血球変形強度や変形率からはどちらも判断しにくい両者の中間ともいえるべき混合型を呈して診断困難である症例が少なくない。そこで著者は両者における赤血球変形の特徴を探るために糸球体疾患例と非糸球体疾患例各々 5 例において尿沈渣赤血球を走査型電子顕微鏡によって観察した。

糸球体性血尿における尿中赤血球形態の特徴は、多様な変形にあるとされている。今回検討した症例においても種々の変形が観察された。ここでは中心陥凹部が著明に拡大した菲薄化赤血球と比較的 hemoglobin を細胞内に多く



保っていると考えられる赤血球が症例によって様々な割合で存在した。非薄化した赤血球はその拡大した中心陥凹部において細胞膜同士が密着していた。またこの部分において瘤状の隆起が存在するものや細胞膜を貫通する穴が存在するものも認められた。非薄化赤血球の辺縁は様々な形態を示した。例えば辺縁が平滑な円を描くもの (**Fig. 3**)、辺縁が波うったような形をとるもの (**Fig. 4**)、辺縁に突起を有するもの (**Fig. 5**) 等である。これらの赤血球はいずれも非糸球体性血尿ではほとんど出現せず、糸球体性血尿に特徴的な形態変化であると考えられた。

糸球体性血尿例5例中2例において、赤血球膜表面に損傷の認められる赤血球が多数存在した。これらの症例は中等度の糸球体変化を有するIgA腎症例と急速進行性糸球体腎炎例であった。これら2症例に赤血球 ghost が多く認められたことを考え併せると、赤血球を強く障害する病態がこれらの症例に存在したと考えられる。

非糸球体性血尿例では正常形態赤血球、有棘赤血球、扁平な不整円形の赤血球、赤血球 ghost などが認められた。しかし非薄化赤血球は認められなかった。

糸球体疾患において尿中赤血球形態に影響を与える因子については①糸球体毛細血管基底膜を通過するときの物理的傷害、②尿細管を通過する際の浸透圧およびpHの急激な変化などが考えられる。著者は①pHのみを変化させた場合、②浸透圧のみを変化させた場合、③pHと浸透圧の両方を尿細管内でのそれらの変動に従って変化させた場合、以上三つの状態の赤血球形態に与える影響について検討した。高浸透圧状態の第2段階で扁平化を来した赤血球 (**Fig. 11**) は、低浸透圧状態の第3段階で溶血を来した。溶血を免れた赤血球はpH 7.4では球状および卵形を呈し、pH 6.0では正常形態および有棘赤血球を呈した。さらに第4段階で300 mOsm/kg および600 mOsm/kg の状態にすると赤血球は正常形態および有棘赤血球を呈した。特に、多様な変形を来した

600 mOsm/kg, pH 5.8 溶液においても赤血球変形の内容は有棘赤血球と扁平な不整円形赤血球であって糸球体性血尿に特徴的と考えられる非薄化赤血球は認められなかった。また同様の変化は末梢血赤血球を採血後すぐに600 mOsm/kg 溶液に混和したときにもみられることから、低浸透圧状態で溶血を免れた赤血球の形態は、最終的には尿細管を過ぎて腎盂に至った時点での浸透圧、pHに強く影響を受けると考えられる。

以上の結果より糸球体性血尿例の尿沈渣で観察される多彩な変形は、尿細管における浸透圧およびpHの急激な変化によって生じる可能性は少ない。そのほかに可能性のある成因として糸球体毛細血管基底膜を赤血球が通過する際の物理的傷害があげられるが、赤血球破碎症候群の末梢血に認められるようなヘルメット形、三角形などのshistocyteは糸球体性血尿例の尿沈渣で観察することはほとんどなかった。

非糸球体性血尿例では、その尿沈渣に正常形態赤血球以外に有棘赤血球が出現したが、この変形は高浸透圧状態に赤血球を浮遊させることによって実験的に作製できたことから、尿の高浸透圧による変化と考えられた。

赤血球 ghost は糸球体性、非糸球体性いずれの血尿例にも出現した。糸球体性血尿においては、遠位尿細管における低浸透圧状態が成因の一つと考えられた。

## 結 論

1. 糸球体疾患5例、非糸球体疾患5例について、その尿沈渣赤血球を走査型電子顕微鏡で検討した結果、糸球体疾患における尿中赤血球形態として特徴的所見は非薄化赤血球の存在であることを明らかにし得た。

2. 糸球体疾患2例において赤血球膜表面に損傷が認められ、赤血球膜に対する何らかの強い傷害因子が加わったものと考えられた。

3. 非糸球体性血尿で主に出現する有棘赤血球、扁平な不整円形赤血球の成因は尿の高浸透圧状態であると考えられた。一方糸球体性血尿

における多彩な赤血球変形は尿細管での浸透圧，pHの変化による可能性は少なく他の因子によるものと考えられた。

稿を終えるにあたって，本研究の御指導，御校閲を賜りました大澤源吾教授に深謝いたします。また症例を提供していただきました本学泌尿器科学教室（田中

啓幹教授）の諸先生方に感謝の意を表します。さらに御助力くださいました本学電子顕微鏡センター技術員上平賢三氏，須田泰司氏に感謝いたします。

本研究の一部は厚生省特定疾患「進行性腎障害」（班長 大野教授）の研究費によった。

## 文 献

- 1) Birch, D. F. and Fairley, K. F.: Haematuria: Glomerular or non-glomerular? Lancet ii: 845—846, 1979
- 2) Fairley, K. F. and Birch, D. F.: Hematuria: A simple method for identifying glomerular bleeding. Kidney Int. 21: 105—108, 1982
- 3) Fassett, R. G., Horgan, B. A. and Mathew, T. H.: Detection of glomerular bleeding by phase-contrast microscopy. Lancet i: 1432—1434, 1982
- 4) Rizzoni, G., Braggion, F. and Zacchello, G.: Evaluation of glomerular and nonglomerular hematuria by phase-contrast microscopy. J. Pediatr. 103: 370—374, 1983
- 5) De Santo, N. G., Nuzzi, F., Capodicasa, G., Lama, G., Caputo, G., Rosati, P. and Giordano, C.: Phase contrast microscopy of the urine sediment for the diagnosis of glomerular and non-glomerular bleeding-data in children and adults with normal creatinine clearance. Nephron 45: 35—39, 1987