

## 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2報 尿中赤血球形態診断における Wright 染色法の有用性

橋本 淳

血尿の由来の鑑別を容易ならしめる目的で Wright 染色法と位相差顕微鏡法を用いて糸球体疾患30例, 非糸球体疾患25例の尿沈渣赤血球形態を観察した. 位相差顕微鏡法においては赤血球 ghost と菲薄化赤血球の判別が困難な場合が多かったが, Wright 染色法では赤血球内の hemoglobin を染めることにより両者の判別は明確であった. 糸球体性血尿において菲薄化赤血球が全例で認められるのに対して, 非糸球体性血尿ではごくまれにしか認められなかった. また, 糸球体性血尿では菲薄化赤血球が30%以上に認められ, 非糸球体性血尿では菲薄化赤血球は14%以下であり, 両者の鑑別は極めて容易である.

(昭和63年10月31日採用)

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

### (II) Use of Wright's Stain in Differential Diagnosis between Renal and Urinary Tract Disorders

Jun Hashimoto

To improve the method for differentiating glomerular hematuria from non-glomerular hematuria, urinary red blood cells from 30 cases of various types of glomerulonephritis and 25 non-glomerular hematuric patients were investigated morphologically by Wright's stain of dried sediment smears and phase-contrast microscopy.

It was often difficult to differentiate thin erythrocytes from ghost cells by phase-contrast microscopy. On the other hand, as the hemoglobin of red blood cells was stained by Wright's stain solution, it was thin erythrocytes could be distinctly differentiated from ghost cells. (Accepted on October 31, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 15(1): 94-101, 1989

**Key Words** ① Hematuria ② Urinary red blood cell morphology  
③ Wright's stain ④ Phase-contrast microscopy

#### 緒 言

血尿患者の診療において, その血尿が腎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その後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年に位相差顕微鏡を用いて尿中赤血球形態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。すなわち糸球体性血尿においては尿中赤血球が多彩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とる。その後、Fairley,<sup>2)</sup> Fassett,<sup>3)</sup> Rizzoni,<sup>4)</sup> De Santo<sup>5)</sup>らによって尿沈渣赤血球形態の変形率が病態鑑別に有用であることが報告された。Fassettらは血尿の鑑別をより客観的にとらえるために糸球体性血尿、非糸球体性血尿の判定基準を仮定した。すなわち80%以上の尿中赤血球が変形しておれば糸球体性血尿、80%以上の尿中赤血球が一定の形態、大きさであれば非糸球体性血尿、その中間を混合型として253例について検討を行っている。その結果、糸球体性血尿と判断された120例中5例が下部尿路疾患であり、非糸球体性と判定された105例中5例において糸球体疾患が証明された。またこの際混合型は28例存在した。すなわち位相差顕微鏡による観察では診断しにくい事例も少なくなかった。一方Chang<sup>6)</sup>は血尿の由来の鑑別にWright染色法を用い、赤血球の染色性が鑑別の指標となり得ること、および特別な設備がいらす標本の保存性においても優れていることを示した。著者は第1報に尿中変形赤血球のうち非薄化を来したものは糸球体性血尿において特徴的であり非糸球体性血尿ではほとんど出現しないということを示した。そこで本報告では、さきに示した尿中赤血球の走査型電子顕微鏡による形態を位相差顕微鏡およびWright染色法による光顕観察所見を対比させ、血尿病態の鑑別を簡便化する方法を検討した。

## 対象と方法

腎糸球体疾患30例、泌尿器科的疾患25例の診断の内訳はTable 1に示すごとくである。

### 1. 標本作成

尿中赤血球の蓄尿による経時的变化を避けるために患者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被験尿とした。検体は採尿後30分以内にWright染色用の塗沫を行い、60分以内に位相差顕微鏡による観察を終えた。

Table 1. Diagnosis in 55 patients with hematuria

	M	F	
IgA 腎症	10	8	(case 1~18)
メサングウム増殖性糸球体腎炎		1	(case 19)
膜性増殖性糸球体腎炎	2		(case 20, 21)
膜性腎症	1	1	(case 22, 23)
急速進行性糸球体腎炎	2		(case 24, 25)
全身性エリテマトーデス	1	2	(case 26~28)
紫斑病性腎炎	1	1	(case 29, 30)
急性腎盂腎炎		1	(case 31)
慢性腎盂腎炎		1	(case 32)
急性膀胱炎	1	1	(case 33, 34)
腎結核	1		(case 35)
尿路結石	6	1	(case 36~42)
膀胱癌	2		(case 43, 44)
前立腺癌	2		(case 45, 46)
嚢胞腎	1		(case 47)
嚢胞腎破裂	1		(case 48)
nut cracker 現象	1	1	(case 49, 50)
左腎静脈瘤	1		(case 51)
VUR・術後	1		(case 52)
特発性血尿	3		(case 53~55)

### a. Wright 染色法による観察方法

① 被験尿を1,500 rpm, 5分間遠心し、沈渣に8%ウシアルブミン溶液0.05 mlを加えて混和した。② スライドガラスに塗沫し、1時間空気乾燥を行った。③ ジャーレ内で塗沫面にWright染色液を10滴滴下し、蓋をして3分間振盪した。④ Wright染色用緩衝液(pH 6.0)を10滴塗沫面に滴下、混和して3分間振盪した。⑤ 蒸留水にて洗浄。⑥ 乾燥後中性封入剤を用いてカバーガラスに封入。⑦ Nikon光学顕微鏡S-KE型を用い400倍で鏡検した。

### b. 位相差顕微鏡による観察方法

① 被験尿10 mlを1,500 rpm 5分間遠心し、② 上清9 mlを捨て残りの1 mlをプラスチックジャーレ(φ2.5 cm)に移したのち、③ Nikon Diaphoto TMDを用い400倍で鏡検した。

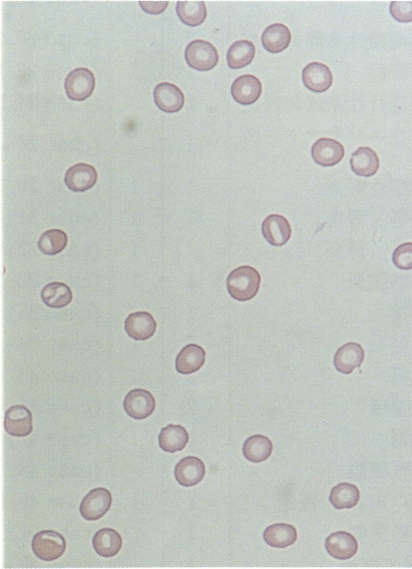
### 2. 赤血球分類、計数法

#### a. Wright 染色法による方法

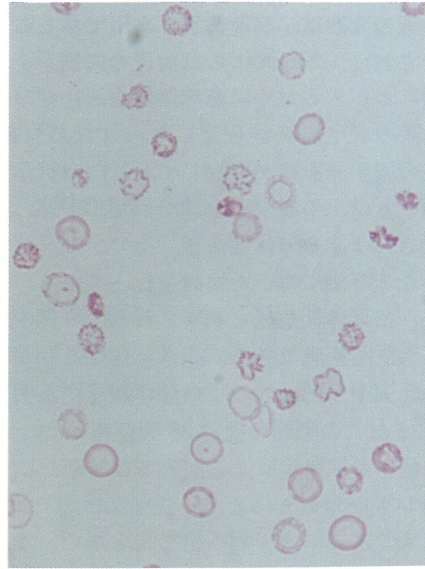
尿沈渣赤血球をその染色性によってA群、

B群および赤血球 ghost 群の3群に分類した。A群は細胞内に hemoglobin が十分に保持された染色性のよい赤血球とした。この群は正常形態赤血球，有棘赤血球，扁平で不整形の赤血

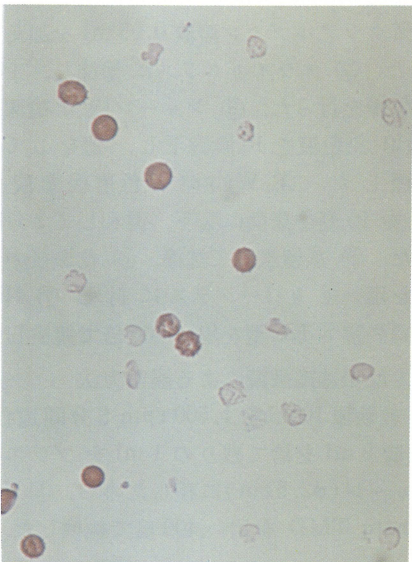
球等により成る。B群は細胞内に hemoglobin が乏しく，細胞辺縁部および突起部のみが染色される赤血球とした。この群は非薄化赤血球より成る。赤血球 ghost 群は細胞の輪郭は認め



**Fig. 1.** Urinary sediment—non-glomerular hematuria showing discocytes and stomatocytes. Wright's stain,  $\times 400$  (case 43)



**Fig. 3.** Urinary sediment—glomerular hematuria showing thin erythrocytes. Wright's stain,  $\times 400$  (case 10)



**Fig. 2.** Urinary sediment—non-glomerular hematuria showing echinocytes, spherocytes, and ghost cells. Wright's stain,  $\times 400$  (case 48)



**Fig. 4.** Urinary sediment—glomerular hematuria showing thin erythrocytes and echinocytes. Wright's stain,  $\times 400$  (case 11)

られるが染色性のほとんどない赤血球である。なお、円形の赤血球については central pallor の直径が細胞全体の直径の 4/6 未満であれば A 群に、4/6 以上であれば B 群に分類した。塗沫標本上の赤血球を原則として 100 個観察し、上記の 3 群に分類して各々の群の赤血球数の全体に占める割合をパーセントで表した。

b. 位相差顕微鏡による方法

Fassett らの方法により赤血球を 100 個数えて変形率を求めた。すなわち多様な変形を示す赤血球が 80% 以上認められる症例を糸球体型、一様な形態の赤血球が 80% 以上である症例を非糸球体型、両者の中間を混合型とした。

3. 尿中赤血球の染色性と腎組織所見の関連を調べる方法

IgA 腎症 18 例の糸球体変化の程度を ① ほぼ正常、② 軽度、③ 中等度、および ④ 高度の 4

群に分けた。各症例の尿塗沫標本における赤血球分類計数が各群間の比較において有意差をもつか否かを t 検定によって求めた。また赤血球 ghost の出現数も同様に比較した。

4. ① 尿中赤血球数、② 尿中蛋白量、③ 尿 pH、④ 尿浸透圧の 4 項目各々と Wright 染色による赤血球の分類、計数との間の相関係数を検定した。

結 果

1. Wright 染色法による尿中赤血球の観察 (Figs. 1~4)

Wright 染色法を用いて各症例の尿中赤血球を A 群、B 群、赤血球 ghost 群に分類した結果が Table 2 である。糸球体疾患例では 3 群の赤血球が様々な割合で出現したが、各疾患別に一定の傾向は見られなかった。B 群赤血球

Table 2. Differential count of urinary red blood cells

	糸球体疾患例			非糸球体疾患例			
	A群 (%)	B群 (%)	ghost (%)	A群 (%)	B群 (%)	ghost (%)	
case 1	57	31	12	case 31	93	0	7
case 2	2	1	97	case 32	98	0	2
case 3	67	28	5	case 33	100	0	0
case 4	13	13	74	case 34	55	0	45
case 5	50	37	13	case 35	91	9	0
case 6	26	73	1	case 36	9	0	91
case 7	45	51	4	case 37	95	2	3
case 8	49	40	11	case 38	99	0	1
case 9	31	58	11	case 39	97	0	3
case 10	15	84	1	case 40	83	0	17
case 11	21	79	0	case 41	97	0	3
case 12	10	88	2	case 42	89	0	11
case 13	29	57	14	case 43	98	0	2
case 14	20	53	27	case 44	100	0	0
case 15	20	65	15	case 45	80	0	20
case 16	2	15	83	case 46	53	14	33
case 17	53	45	2	case 47	100	0	0
case 18	42	51	7	case 48	75	0	25
case 19	35	23	42	case 49	100	0	0
case 20	20	72	8	case 50	100	0	0
case 21	33	62	5	case 51	100	0	0
case 22	16	81	3	case 52	89	0	11
case 23	36	45	19	case 53	100	0	0
case 24	61	35	4	case 54	100	0	0
case 25	26	66	8	case 55	96	0	4
case 26	24	61	15				
case 27	7	83	10				
case 28	37	51	12				
case 29	31	55	14				
case 30	26	16	58				

Table 3. Counting ratio of hemoglobin rich red blood cells to hemoglobin less red blood cells and ghost cells

糸球体疾患例		非糸球体疾患例	
case 1	57/43	case 31	93/ 7
case 2	2/98	case 32	98/ 2
case 3	67/33	case 33	100/ 0
case 4	13/87	case 34	55/45
case 5	50/50	case 35	91/ 9
case 6	26/74	case 36	9/91
case 7	45/55	case 37	95/ 5
case 8	49/51	case 38	99/ 1
case 9	31/69	case 39	97/ 3
case 10	15/85	case 40	83/17
case 11	21/79	case 41	97/ 3
case 12	10/90	case 42	89/11
case 13	29/71	case 43	98/ 2
case 14	20/80	case 44	100/ 0
case 15	20/80	case 45	80/20
case 16	2/98	case 46	53/47
case 17	53/47	case 47	100/ 0
case 18	42/58	case 48	75/25
case 19	35/65	case 49	100/ 0
case 20	20/80	case 50	100/ 0
case 21	33/67	case 51	100/ 0
case 22	16/84	case 52	89/11
case 23	36/64	case 53	100/ 0
case 24	61/39	case 54	100/ 0
case 25	26/74	case 55	96/ 4
case 26	24/76		
case 27	7/93		
case 28	37/63		
case 29	31/69		
case 30	26/74		

(A群/B群+ghost)

は糸球体疾患では全例に認められた。これに対し非糸球体疾患では3例に認められたのみであった。

B群と赤血球 ghost 群を染色性に乏しい群として一つに考え、A群/B群+赤血球 ghost 群比を求めた (Table 3)。糸球体疾患例のうちB群+赤血球 ghost 群の割合が80%以上を占めた症例は30例中10例(33.3%)であった。これに対して非糸球体疾患のうちA群が80%以上を占めた症例は25例中21例(84.0%)であった。非糸球体疾患でA群赤血球が80%未満であった4例はいずれも赤血球 ghost が多く存在した例であった。

次にA群/B群比をとって検討した (Table 4)。糸球体疾患例においてはA群とB群が種々の割合で存在し、各疾患別に一定の傾向は認められなかった。非糸球体疾患においてはA群赤血球が100%を占める症例が25例中22例

(88.9%)と大部分であった。糸球体疾患においてB群赤血球の占める割合は30~92%と非糸球体疾患に比較して明らかに多かった。

2. 位相差顕微鏡法による尿中赤血球形態の観察 (Table 5)

糸球体疾患例において変形率が80%以上であった症例は30例中17例(56.6%)であり非糸球体疾患例において変形率が20%以下であった症例は25例中14例(56.0%)であった。混合型を呈した症例は糸球体疾患30例中13例(43.3%)、非糸球体疾患25例中11例(44.0%)であった。

3. Wright染色法による尿中赤血球の染色性と糸球体組織所見の関係

尿中赤血球の染色性について〔ほぼ正常群+軽度群〕と〔中等度群+高度群〕の間に有意差が認められた (P=0.01)。すなわちIgA腎症

Table 4. Counting ratio of hemoglobin rich red blood cells to hemoglobin less red blood cells

糸球体疾患例		非糸球体疾患例	
case 1	65/35	case 31	100/0
case 2	67/33	case 32	100/0
case 3	70/30	case 33	100/0
case 4	49/51	case 34	100/0
case 5	58/42	case 35	91/9
case 6	26/74	case 36	100/0
case 7	46/54	case 37	98/2
case 8	55/45	case 38	100/0
case 9	36/64	case 39	100/0
case 10	15/85	case 40	100/0
case 11	21/79	case 41	100/0
case 12	10/90	case 42	100/0
case 13	34/66	case 43	100/0
case 14	28/72	case 44	100/0
case 15	34/66	case 45	100/0
case 16	10/90	case 46	79/21
case 17	54/46	case 47	100/0
case 18	45/55	case 48	100/0
case 19	60/40	case 49	100/0
case 20	22/78	case 50	100/0
case 21	35/65	case 51	100/0
case 22	16/84	case 52	100/0
case 23	46/54	case 53	100/0
case 24	64/36	case 54	100/0
case 25	28/72	case 55	100/0
case 26	28/72	(A群/B群)	
case 27	8/92		
case 28	42/58		
case 29	36/64		
case 30	62/38		

Table 5. Proportion of dysmorphic red blood cells to urinary red blood cells

糸球体疾患例 (%)		非糸球体疾患例 (%)	
case 1	77	case 31	25
case 2	85	case 32	6
case 3	52	case 33	15
case 4	73	case 34	52
case 5	84	case 35	38
case 6	88	case 36	58
case 7	77	case 37	35
case 8	92	case 38	10
case 9	81	case 39	22
case 10	84	case 40	51
case 11	84	case 41	12
case 12	86	case 42	25
case 13	71	case 43	11
case 14	74	case 44	13
case 15	85	case 45	19
case 16	98	case 46	57
case 17	76	case 47	27
case 18	63	case 48	37
case 19	84	case 49	20
case 20	85	case 50	16
case 21	94	case 51	16
case 22	84	case 52	13
case 23	72	case 53	20
case 24	82	case 54	0
case 25	82	case 55	19
case 26	36		
case 27	93		
case 28	60		
case 29	64		
case 30	69		

においては糸球体変化の強い群において、A群赤血球の比率が大である傾向が認められた。なお、赤血球 ghost 出現率、位相差顕微鏡法における変形率と糸球体変化の間に相関は認められなかった。

4. ①尿中赤血球数、②尿蛋白量、③尿 pH、④尿浸透圧の以上4項目と尿中赤血球の染色性の間には有意な相関は認められなかった。

### 考 按

血尿患者の確定診断を行うには内科的には腎生検を、泌尿器科的には膀胱鏡検査、逆行性腎盂造影、血管造影を必要とすることが多い。これらの検査はいずれも患者にとっての負担が大きいことより、それらを施行するに先立って血尿の原因が内科的疾患であるか泌尿器科的疾患であるかの正確な判断を行い、次に行うべき検査を吟味する必要がある。しかし病歴、臨床症状、尿所見その他の侵襲の少ない検査からは、その判断が困難である場合が少なくない。Birch らは位相差顕微鏡を用いて尿中赤血球形態を観察することで血尿の由来が糸球体性か非糸球体性かを鑑別することが可能であると述べた。その後 Fassett らはその方法が有用であるという報告を行ったが、同時に両者の中間である混合型を呈して血尿の由来の診断が困難な例が少なくないことも併せて述べた。また Raman ら<sup>7)</sup> は尿沈渣赤血球を観察する上で観察者によって診断結果に著しい差が生じることを指摘している。したがって尿沈渣赤血球の形態観察については糸球体性血尿と非糸球体性血尿における赤血球形態の差をさらに詳しく検討する必要がある。

著者は第1報において走査型電子顕微鏡を用いて尿中赤血球を観察した結果、糸球体性血尿においては非薄化赤血球が出現したのに対し、非糸球体性血尿においては有棘赤血球や扁平で不整形の赤血球等の hemoglobin を比較的保持した変形赤血球は認められたが、非薄化赤血球は認めなかった。Shichiri ら<sup>8)</sup> は Coulter counter を用いて尿中赤血球の粒度分布曲線を

描き、糸球体性血尿と非糸球体性血尿例における尿中赤血球の体積の差を検討しているが糸球体性血尿例ではその体積のピークが非糸球体性血尿のそれに比較してより小さい方に偏位することを示した。この成績は糸球体性血尿において非薄化赤血球が存在するという著者の観察に一致する。

Chang は尿沈渣の塗沫標本に Wright 染色法を施して尿中赤血球を観察する方法を報告した。この方法では赤血球の hemoglobin を染色することから前述の非薄化赤血球を判別することが可能であると考えられた。また Wright 染色法による尿塗沫標本は長期保存することができ、繰り返し多人数によって鏡検が可能である。

著者は以上のことをふまえて臨床例 55 症例の尿中赤血球を Wright 染色法と位相差顕微鏡法を用いて観察した。その結果は Table 2 のごとくであり糸球体性血尿においては B 群赤血球が全例に出現し、A 群赤血球、B 群赤血球、赤血球 ghost が様々な割合で出現したがこれらの出現率は各々の疾患において一定の傾向を認めなかった。非糸球体性疾患において非薄化赤血球は 25 例中 3 例 (12.0%) にのみ出現し各々における B 群赤血球出現率も少なかった。症例 46 は非薄化赤血球が 14% を占め比較的高率であった。この症例は前立腺癌であるが、軽度から中等度の蛋白尿を持続的に認めたことから糸球体性血尿の合併も否定できなかった。症例 2, 4, 16, 30 の糸球体性血尿において非薄化赤血球の占める割合は症例 46 と同等かあるいは下まわった。これらの 4 症例ではいずれも赤血球 ghost の占める割合が 50% 以上であり、A 群赤血球、B 群赤血球の占める割合が赤血球 ghost の占める割合に大きく影響されていた。また赤血球 ghost は糸球体疾患例、非糸球体疾患例のいずれにも出現するため、鑑別診断の指標にならなかった。そこで A 群/B 群比を求めたのが Table 4 である。これによれば糸球体性血尿例における B 群赤血球の占める割合は最低の値を示した症例 3 においても 30% であり、非糸球体性疾患との鑑別が可能で

あった。

IgA 腎症例 18 例において Wright 染色法による尿中赤血球の染色性と糸球体組織変化の関係を検討したところ糸球体変化の強い症例ほど A 群赤血球の比率が大きいという傾向が示された。糸球体疾患における尿中赤血球変形の成因の一つとして糸球体基底膜を通過する際の物理的傷害が考えられているが、糸球体病変の強い場合は糸球体毛細管基底膜の変化も強く、このためにむしろ赤血球が通過しやすくなっている可能性が考えられる。もう一つの可能性として、当教室例<sup>9)</sup>で IgA 腎症において膀胱粘膜からの出血を認めた症例を経験したが、糸球体病変の強い症例がこのような下部尿路粘膜の血管病変からの出血を併せもつ可能性も考えられる。

IgA 腎症例 18 例において赤血球破壊の最も強い形である赤血球 ghost の出現率と糸球体組織変化の強さについて相関を検討したが有意な相関関係は認められなかった。

次に位相差顕微鏡による尿沈渣赤血球の観察において糸球体疾患の診断率は 56.6% であり、非糸球体疾患の診断率は 56.0% であった。これらの診断率はいずれも低い、Birch の基準に当てはめると糸球体疾患の診断率は 96.3% となった。この差は基準の中に赤血球 ghost の扱いを取り入れているか否かの差であると考えられる。Birch らは糸球体型を多様な変形赤血球を有する例であると仮定し、非糸球体型を

形のない赤血球と赤血球 ghost の 2 種類よりなり、ときに有棘赤血球を含む例、混合型を多様な変形赤血球とともに一様な形態の赤血球が 50% 以上存在している場合と仮定している。著者のように赤血球 ghost の取扱いを特に設定することによって位相差顕微鏡法を用いた場合の診断がより確実なものになるとと思われる。

## 結 論

1. Wright 染色法を用いることによって、細胞内に hemoglobin を保った赤血球と非薄化した赤血球の判別が可能であった。

2. Wright 染色法を用いた場合、A 群赤血球数/B 群赤血球数比を求めることによって、糸球体性血尿と非糸球体性血尿の診断率が向上する。

3. IgA 腎症例 18 例において hemoglobin を保った赤血球が尿中赤血球に占める割合が多いほど、糸球体組織変化の強い傾向が認められた。

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心より感謝いたします。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。

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)の研究費による。

## 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 nonglomerular bleeding—data in children and adults with normal creatinine clearance. *Nephron* 45: 35-39, 1987

- 6) Chang, B. S.: Red cell morphology as a diagnostic aid in hematuria. JAMA 252: 1747—1749, 1984
- 7) Raman, G. V., Pead, L., Lee, H. A. and Maskell, R.: A blind controlled trial of phase-contrast microscopy by two observers for evaluating the source of hematuria. Nephron 44: 304—308, 1986
- 8) Shichiri, M., Oowada, A., Nishio, Y. and Tomita, K.: Use of autoanalyser to examine urinary-red-cell morphology in the diagnosis of glomerular haematuria. Lancet ii: 781—782, 1986
- 9) 大澤源吾：内科領域における血尿症例の腎生検組織の検討. 日腎会誌 27: 1709, 1985