泌尿器科における共焦点型レーザー顕微鏡の応用 Applications of the confocal laser microscope for urology

平川真治^a, 宮川征男^a, 飯野晃啓^b

^a鳥取大学医学部泌尿器科

^b同 解剖学

Shinji HIRAKAWA^a, Ikuo MIYAGAWA^a and Akihiro IINO^b

Departments of ^aUrology and ^bAnatomy, Faculty of Medicine Tottori University,
Nishimachi, Yonago 683

要 旨

最近, 当科では染色や固定の不要な共焦点型レーザー顕微鏡 (CLM) を血尿患者と男性不妊症患者に特に応用している。今回31例の血尿患者の尿を採取した。31例中23例が泌尿器科疾患, 8例が糸球体性疾患の患者だった。尿中の変形赤血球と正常赤血球はCLMで観察すると, きわめて形態学的に差がみられた。CLMによる泌尿器科疾患に対する感度と特異度は各々100%, 95.7%, 一方, 糸球体性疾患に対する感度と特異度は各々100%, 87.5%であった。

27例の正常男性と14例の男性不妊症患者について, 精液を採取してCLMで観察したところ, 正常男性と男性不妊症患者の精子にはいくつかの形態学的な差がみとめられた。良い精子は頭部が狭く, 中片が長く, 頭部のアクロゾーム領域が広いことが推測された。一方, 3例の血精液症患者的の精液中の赤血球はCLMで正常赤血球だった。

以上の結果より, CLMは尿中赤血球や精子の形態学的評価をより簡便かつ容易にするものと思われる。CLMは血尿患者の有力な補助的診断法になりうると考えられ, また男性不妊症の研究に役立つものと思われる。

キーワード: 共焦点型レーザー顕微鏡, 血尿, 男性不妊症

Abstract

Recently, the confocal laser microscope (CLM) has been used in our department, particularly for patients with hematuria and male infertility, without requiring fixation and staining. In this study, urine specimens from 31 patients with hematuria were collected. Twenty three patients had urological disease and 8 had glomerular disease. The CLM of the urine specimens showed a marked morphological difference between dysmorphic and isomorphic erythrocytes. The sensitivity and specificity for urological disease by CLM were 100% and 95.7%, whereas those for glomerular disease were 100% and 87.5%.

Semen specimens from 27 fertile men and 14 infertile men were collected. The sperm showed some morphological difference between fertile men and infertile men

by the CLM. It was supposed that the good sperm had narrow sperm head, long sperm midpiece and wide acrosomal region of sperm head. By the way, semen specimens from 3 patients with hematospermia were collected. The red-blood-cells in semen were isomorphous by the CLM.

From these results, it seems like that the CLM makes it simpler and easier to evaluate the morphology of the erythrocyte in urine and sperm. The CLM can be a good assistant diagnostic modality for patients with hematuria and investigative modality for male infertility.

Key Words : confocal laser microscope, hematuria, male infertility

1. 目的

最近、当科では、無固定、無設定で観察でき、画像が鮮明で、操作が簡単で、ビデオ収録も可能なリアルタイム共焦点型レーザー顕微鏡を用い、血尿患者の尿中の赤血球形態をルーチンに観察し、血尿の有力な補助診断法の一つとして使用している^{1)~3)}、それについて報告する。

また、男性不妊症患者の精子形態に関する研究についても、このレーザー顕微鏡を用いている⁴⁾、さらに、血精液症患者の赤血球形態をレーザー顕微鏡で観察してみたので、それらについてもあわせて報告する。

2. 対象および方法

最近、当科に受診した血尿患者31例、血精液症患者3例および男性不妊症患者14例を対象とし、自然妊娠のあった正常男性27例を男性不妊症患者の対照とし比較検討とした。

方法としては、血尿患者では新鮮尿10mlを1500回転、5分間遠沈し、その沈渣を一滴、鏡張り（アルミ蒸着）してあるスライドガラスの上に落とし、無固定、無染色で、レーザー顕微鏡を用いて観察した。肉眼的血尿の場合は遠沈せず、そのままスライドガラスの上に落とした。レーザー顕微鏡としてはレーザーテック社製の1 LMOIか1 LMIIを使用した。当科ではこのレーザー顕微鏡による尿中赤血球の形態診断をレーザー検尿と呼んでいる。尿中赤血球の形態をTVモニター上で観察する訳であるが、モニター上の倍率は、1 LMOIと1 LMIIでそれぞれ最大7200倍か6400倍だが、1440倍か1280倍（対物20倍）、あるいは3600倍か3200倍（対物50倍）が、尿中赤血球の観察に適している。排尿後1～2時間以内の新鮮尿なるべく検査するように試みたが、やむをえない場合は4℃で冷所保存を行った。Thielら⁵⁾の分類にもとづいて、尿中赤血球の形態を判定したが、偏見にとらわれないよ

うに、患者に関する情報はなしで、できるだけ二人でペアになって判定するように心がけた。30～50個（最低30個）の赤血球の形態を判定し、その検体の血尿由来を推定した。血尿由来の判定基準として、石原ら⁶⁾の報告にもとづき、尿中変形赤血球が70%以上を占める場合を糸球体性（変形型, dysmorphic）、正常赤血球が70%以上の場合を非糸球体性（正常型, isomorphic）、両者の中間を混合性（mixed）と判定した。一検体の評価に要する時間は通常5分以内であった。

一方、精子の形態診断の場合は、手淫によって採取した精液を30～60分間室温に放置し、均質化したところで、その一滴を鏡張りしてあるスライドガラスの上におとし、カバーガラスをかけ、無固定、無染色でレーザー顕微鏡で観察し、ビデオテープに収録したものをコンピューターを用いて画像解析した。血精液症の場合も同様に精液をレーザー顕微鏡で観察し、精液中の赤血球の形態を尿中赤血球の形態分類にもとづいて判定した。

3. 成績

1) 血尿患者

まず、レーザー検尿における尿中正常赤血球像と変形赤血球像の例を図に示す（図1、図2）。また、1 LMIIでは図3に示すように赤血球などの検体の微小寸法を測定することも可能である（図3）。

血尿患者31例の内訳は23例が泌尿器科疾患、8例が糸球体性疾患の患者であった。糸球体性疾患8例中、新鮮例6例、再燃例2例だった。レーザー検尿では、糸球体性疾患8例中7例（87.5%）が糸球体性のパターンを示し、1例が混合性と判定された。一方、泌尿器科疾患23例中22例（95.7%）が非糸球体性のパターンを示し、1例が混合性と判定された（表1）。レーザー検尿の糸球体性疾患に対する感度は100%、特異度は87.5%であり、また泌尿器科疾患に対する感度は100%、特異度は95.7

図1 レーザー顕微鏡でみた尿中正常赤血球像
左：1440倍，右：3200倍
(膀胱腫瘍症例)

図2 レーザー顕微鏡でみた尿中変形赤血球像
左：1440倍，右：6400倍
(腎炎症例)

図3 1 LMIIによる尿中赤血球の長径計測
3200倍 (前立腺肥大症例)

表1 レーザー検尿の結果

diagnosis	morphology of urinary RBC			
	dysmorphic	isomorphic	mixed	total
glomerular disease	7		1	8
urological disease		22	1	23
total	7	22	2	3

%であった(表2, 3)。

2) 男性不妊症患者

レーザー顕微鏡でみた正常精子像と異常精子像の例を図に示す(図4, 5)。男性不妊症患者では、当科からすでに報告したように¹⁾、精子頭部の最大幅が $3.4\mu\text{m}$ (mean) と正常男性の $3.1\mu\text{m}$ に比べて有意に広く($p < 0.05$)、精子中片の長さは $4.2\mu\text{m}$ と正常男性の $4.5\mu\text{m}$ に比べて有意に短かった($p < 0.05$)。また、精子頭部のアクロゾーム領域の頭部全体表面に占める割合は男性不妊症でやや少ない傾向にあった。一方、精子頭

図4 レーザー顕微鏡でみた正常精子像

表2 糸球体性疾患に対する感度と特異度

		positive	negative	total
glomerular disease	+	7	1	8
	-	0	23	23
total		7	24	31

positive=dysmorphic pattern
negative=isomorphic + mixed pattern
sensitivity=100%, specificity=87.5%

表3 泌尿器科疾患に対する感度と特異度

		positive	negative	total
urological disease	+	22	1	23
	-	0	8	8
total		22	9	31

positive=isomorphic pattern
negative=dysmorphic + mixed pattern
sensitivity=100%, specificity=95.7%

部の最大長は男性不妊症患者と正常男性で差が認められなかった。

図5 レーザー顕微鏡でみた異常精子像

図6 血精液症のレーザー顕微鏡所見
1440倍

3) 血精液症患者

血精液症患者3例の精液中の赤血球は、いずれも図に示すごとく正常赤血球がほとんどで、非糸球体性であった(図6)。

4. 考 察

血尿の原因疾患の診断において、まず重要なことは、その血尿が糸球体性か非糸球体性(泌尿器科血尿)なのかを鑑別することである。そうすることによって、余分な侵襲の大きい検査を省き、診断過程を簡略化できると考えられる。例外もあるが、一般的に、糸球体性の場合は尿中に変形赤血球がみられ、非糸球体性の場合は尿中に正常赤血球がみられるとされている^{7)・8)}。この尿中の赤血球形態を観察するために、従来より位相差顕微鏡や走査型電子顕微鏡などが用いられているが^{7)・9)}、位相差顕微鏡は観察にかなりの熟練を必要とするし、また、走査型電子顕微鏡は固定などの前処置が煩雑であるため、いずれも、日常診療でのルーチン検査にはなりにくいのが現状である。

一方、尿中変形赤血球は正常赤血球にくらべて小球性(平均赤血球容積が小さい)であることより、自動血球計数装置やフローサイトメトリーを用いて、尿中赤血球の容積分布を調べる方法が報告されているが¹⁰⁾、尿中の非赤血球成分をも一緒に分析してしまう欠点があり、また、フローサイトメトリーは非常に高価である。

今回、リアルタイム共焦点型レーザー顕微鏡を用いて尿中赤血球形態を観察したが、従来の方法に比べて簡便で、染色や固定の必要性もなく、画像が鮮明で、検査に要する時間も短く、得られた結果も位相差顕微鏡や走査型電子顕微鏡を用いた報告に比べ遜色なかった²⁾。以上より、レーザー顕微鏡を用いた尿中赤血球の形態観察は血尿の有力な補助診断になり得ると考えられる。

生きている精子を飯野らがレーザー顕微鏡を用いて観察して以来¹¹⁾、当科でもレーザー顕微鏡を用いて精子の形態を研究している。その結果、良い精子は頭部が狭く、中片が長く、頭部のアクロゾーム領域の頭部全体に占める割合が多いなどというようにことが推測されており¹⁾、さらに研究が進められている。

最近、他社の共焦点レーザー顕微鏡を用いて、他社の共焦点レーザー顕微鏡を用いて、染色下に細菌バイオフィルムの観察を行った報告¹²⁾がみられるが、この機種は我々の使用しているものと構造が異なり、蛍光色素による染色が必要であるので、精子など生きているそのままの条件下で観察したい場合には不向きと考えられる。いずれにしても、今後、泌尿器科の色々な分野に共焦点型レーザー顕微鏡が応用されてゆく可能性があると思われる。

5. 結 論

共焦点型レーザー顕微鏡は、血尿患者の尿中赤血球形態ならびに男性不妊症患者の精子形態の観察に有用であると考えられた。

文 献

- 1) Hyodo T, Ono K, Koumi T et al : Application of the confocal scanning laser microscope for observing biological specimens : Detection of glomerular bleeding. Nephron 59 : 685-686, 1991.
- 2) Miyagawa I, Hyodo T, Iino A : Detection of glomerular bleeding by the confocal scanning laser microscope. Akt Urol 24 suppl : 89-91, 1993.

- 3) 平川真治, 山根明文, 宮川征男他: 診断におけるレーザー顕微鏡の応用. 日本小児泌尿器科科学会雑誌. 2: 1994 (掲載予定)
- 4) Sofikitis N, Miyagawa I, Inaga S et al: New morphometric criteria for normal spermatozoa obtained by confocal scanning laser microscopy: Application in male infertility clinic. J Urol 147 suppl: 322 A (abstract), 1992.
- 5) Thiel G, Biemann D, Wegmann W et al: Glomeruläre erythrozyten im urin: Erkennung und Bedeutung. Schweiz Med Wschr 116: 790-797, 1986
- 6) 石原幸宏, 伊藤 拓: 血尿を起こす小児疾患をどう診るか: 血尿の診かた治しかた, 46-52, 金原出版, 1992.
- 7) Birch DF, Fairley KF: Hematuria: Glomerular or non-glomerular? Lancet ii: 845-846, 1979
- 8) Fassett RG, Horgan BA, Mathew TH: Detection of glomerular bleeding by phase-contrast microscopy. Lancet i: 1432-1434, 1982.
- 9) Fairley KF, Birch DF: Hematuria: A simple method for identifying glomerular bleeding. Kidney Int 21: 105-108, 1982.
- 10) Shichiri M, Oowada A, Nishio Y et al: Use of autoanalyser to examine urinary-red-cell morphology in diagnosis of glomerular hematuria. Lancet ii: 781-782, 1986.
- 11) Iino A, Inaga S, Mio Y: Application of color laser microscope for observing living biological specimens. Cytobios 60: 7-10, 1993.
- 12) 渡辺豊彦, 竹中 皇, 櫻本耕司他: 共焦点レーザー走査顕微鏡による細菌バイオフィルムの観察. 第82回日本泌尿器科学会総会予稿集: 369, 1984.