

尿沈渣成分を用いた LVSEM の基礎的検討

◎松本 結衣¹⁾、横山 貴¹⁾、伊藤 碧人¹⁾、樋口 未来¹⁾
新潟医療福祉大学医療技術学部臨床技術学科¹⁾

【はじめに】Low Vacuum Scanning Electron Microscopy (以下 LVSEM) は、一般的な SEM より試料室の真空度が低く、電子線が散乱されるため技術的困難を伴う。しかし、Miniscope TM3030Plus (日立ハイテク) は、高感度二次電子/反射電子検出器を搭載し、実用的、且つ簡便に使用できる機器である。今回我々は、尿中扁平上皮細胞を用いて LVSEM 測定方法について基礎的検討を行ったので報告する。

【対象】尿中に扁平上皮細胞が認められた健常者 3 名、糖尿病患者 3 名の尿を用いた。

【方法】1) 固定法：市販の尿沈渣固定液とグルタルアルデヒド・カコジル酸ナトリウム緩衝液の比較と固定後の経時的変化。2) ナノパーコレータへの塗抹方法。3) TI ブルー染色の有無。4) マグネトロンスパッタリングの効果。5) 健常者と糖尿病患者の扁平上皮細胞について細胞質表面構造を比較検討した。

【結果】1) 固定法は、グルタルアルデヒド・カコジル酸ナトリウム緩衝液が良好であり、1 週間後でも形態学的特徴を保持し観察できた。2) ナノパーコレータへの検体滴下量は、

10^4 個/ μ L 程度が適正であった。3) TI ブルー染色を行うことによって表面構造を目量に観察できた。4) マグネトロンスパッタリングにより、表面構造を明瞭に観察できた。5) 糖尿病患者の一部に表面構造が不明瞭である中層および表層扁平上皮細胞を認めた。

【考察】市販固定液に比して、グルタルアルデヒド・カコジル酸ナトリウム緩衝液固定液が形態学的特徴を保持していたことは、市販固定液のリン酸緩衝液より微細構造の保持と電子密度の向上が考えられた。マグネトロンスパッタリングの効果は、細胞質表面に金を密着させ、均一で緻密な膜を形成することで、光学・電子特性が向上したため、高倍率でも鮮明に表面構造を観察できたことが考えられた。糖尿病患者における扁平上皮細胞の表面構造は、シワおよび敷石構造が不明瞭であったことは、高濃度尿糖による変性が考えられた。

【結語】固定および前処理などの条件を適切にすることによって、LVSEM は微細な構造を観察することが可能であり、高い利便性と解像度から尿沈渣を用いた研究に広く利用される可能性が考えられた。 025-257-4474 (直通)

光波動場三次元顕微鏡を用いた尿中尿細管上皮細胞の判別パラメータの開発

◎石栗 沙風¹⁾、横山 貴¹⁾、植木 涼香¹⁾、齋藤 直子²⁾、桐生 あずさ²⁾、松田 和樹²⁾、村田 直之²⁾
新潟医療福祉大学医療技術学部臨床技術学科¹⁾、医療法人社団葵会 新潟聖籠病院²⁾

【目的】尿中尿細管上皮細胞の形態は、多彩であり目視でも判別が困難なため、客観的な鑑別法が望まれる。そこで、今回我々は、Pilot study として光波動場三次元顕微鏡を用いた尿中尿細管上皮細胞の判別パラメータによる客観的な鑑別法について検討したので報告する。

【方法】日常診療検査後の残余尿を用いて、鏡検法により尿細管上皮細胞を鋸歯型、顆粒円柱型、角柱・角錐台型、洋梨・紡錘型、線維型、円形・類円形型に分類した。評価方法は、細胞内の注目部分とその周辺の屈折率の差、注目部分の厚さの OPD (Optical Path Difference ; 光路差、屈折率差と厚さの積に比例)、面の最大高さ Sz、面の二乗平均平方根高さ Sq(粗さ)で比較した。それぞれを光波動場三次元顕微鏡における live データで、3 次元解析によりパラメータを算出した。

【結果】顆粒円柱型は鋸歯型に比べて OPD 値が高かった。面の最大高さ Sz は、顆粒円柱型が 1694nm となり、他の細胞より大きくなった。一方で洋梨・紡錘型は 498nm と最も小さくなった。面の二乗平均平方根高さ Sq(粗さ)は顆粒円

柱型や円形類円型が 140nm となり、他の細胞より大きくなった。一方で洋梨・紡錘型は 52nm と最も小さくなった。

【考察】光波動場三次元顕微鏡における OPD3 次元解析で、顆粒円柱型は鋸歯型に比べて OPD 値および面の最大高さ Sz が高かったことは、顆粒円柱型はいくつかの鋸歯型が融合し重なり合っているため、厚みと密度が高まったことが考えられた。顆粒円柱型や円形・類円型が、面の二乗平均平方根高さ Sq(粗さ)が高かったことは、顆粒円柱型については前述と同様であるが、円形・類円型については、目視では平坦に見えるが、実際は高低差があることが分かった。

【結語】多彩な尿細管上皮細胞の鑑別には、光波動場三次元顕微鏡による客観的、且つ定量的なアプローチ検査法が有用であった。今後、高品質な std または fine データを取得し、判別を要する多くの尿細管上皮細胞によるパラメータの検証および実運用への適用に関する検証が必要である。
025-257-4474 (直通)

LVSEM を用いた尿中赤血球形態の観察

◎横山 貴¹⁾、塚原 祐介²⁾、齋藤 温³⁾、中川 真奈美³⁾、星山 良樹³⁾、山本 卓⁴⁾、星野 純一⁵⁾

新潟医療福祉大学医療技術学部臨床技術学科¹⁾、東京女子医科大学病院中央検査部²⁾、国立大学法人 新潟大学医歯学総合病院³⁾、新潟大学医歯学総合総合研究科腎・膠原病内科⁴⁾、東京女子医科大学内科学講座腎臓内科学分野⁵⁾

【はじめに】Low Vacuum Scanning Electron Microscopy (以下 LVSEM) は、一般的な SEM より試料室の真空度が低く、電子線が散乱されるため技術的困難を伴う。しかし、Miniscope TM3030Plus (日立ハイテク) は、高感度二次電子/反射電子検出器を搭載し、実用的、且つ簡便に使用できる機器である。今回我々は、尿中赤血球の非糸球体型赤血球と糸球体型赤血球との形態学的特徴を比較検討したので報告する。

【対象】、非糸球体型が認められた患者 8 名、糸球体型が認められた患者 8 名の検査後残余尿を用いた。

【方法】1) 形態分類：非糸球体型は各 1 例で典型・円盤状、膨化・円盤状、球状、萎縮・球状、膜部顆粒成分凝集状脱ヘモグロビン。糸球体型はドーナツ状不均一 (2 例)、標的・ドーナツ不均一 (3 例)、コブ・ドーナツ不均一 (1 例)、ドーナツ・有棘状不均一混合型 (3 例) に分類した。2) 標本作製：沈渣をグルタルアルデヒド・カコジル酸ナトリウム緩衝液で固定後、PBS および蒸留水でそれぞれ 2 回洗浄し、ナノパーコレータに塗抹後、TI ブルー染色、マグネトロンスパッタリングを行った。3) 測定条件：加速電圧 15 kV、反射電

子、真空度：導電体 (5Pa)。4) 観察：赤血球表面構造・輝度、内腔構造について、非糸球体型と糸球体型とを比較した。

【結果】1) 赤血球表面構造：非糸球体型は滑らかであり、糸球体型はキズ、シワや亀裂などの変性所見が顕著であった。2) 赤血球表面輝度：凸や厚み及び高さのある構造部分は白く観察された。3) 糸球体型の内腔は薄い膜構造が認められ、穴ではなく「くぼみ」であった。

【考察】糸球体型に変性所見が多いことや内腔は薄い膜構造が認められ、穴ではなく「くぼみ」であることを明らかにした。これは、尿細管における浸透圧勾配の強いストレスと脱ヘモグロビンによる影響が考えられた。

【結語】LVSEM は微細な構造を観察することが可能であり、高い利便性と解像度から尿沈渣を用いた研究に広く利用される可能性が考えられた。今後、糸球体型赤血球の表面構造の変化や元素を解析・評価することで病態把握に有用な指標になり得る新たな検査アプローチ法である。

025-257-4474 (直通)