

血液像自動分析装置 HEG-L における 最適閾値と異常細胞の検出能の検討

山田 隆*¹, 林 文明*², 田中 千晶*²

*1 長岡赤十字病院 医療技術部 検査技術課：新潟県長岡市千秋 2-297-1 (〒 940-2085)

*2 シスメックス株式会社 学術本部 学術部

要 旨

現在、白血球自動分類の主流はフローサイトメトリー法を用いた自動血球分析装置であるが、パターン認識法を用いた血液像自動分析装置との併用により、検査の正確性と業務の効率化を図ることができる。今回、我々は血液像自動分析装置 HEG-L (HEG-L; シスメックス社) による細胞分類の最適化を目的とし、正常検体群 (n=99) を用いて最適分類のための閾値 (しきい値) の検討を行った。また、この最適閾値の異常検体群 (n=100) への適用と造血器腫瘍での病的細胞の検出率について検討した。正常検体群では最適閾値を設定することで、レビュー後の分類結果の一致率の大幅な向上を認めた。この閾値を異常検体群に適用したところ、一致率の若干の向上を認め、正常検体群で検討した最適閾値を異常検体群にも使用することが可能であった。また、異常検体群での検討結果より、HEG-L の造血器腫瘍での病的細胞の検出率は非常に良好であり、HEG-L は自動血球分析装置の弱点を補い、見落としのない検査を実施する上で有用であると考えられる。

キーワード 血液像自動分析装置, HEG-L, パターン認識法, 白血球分類

はじめに

白血球分類は臨床検査業務の中でも熟練を要し、かつ手間のかかる検査であったため、その自動化は古くから望まれていた。白血球分類の自動化は、1985年頃にパターン認識法による形態分類を用いた血液像自動分析装置 (以下、血液像自動分析装置) が、オムロン社、日立製作所など数社から発売され全国的に広がりを見せた。その後、より低コストで導入、運用できるフローサイトメトリー法を用いた自動血球分析装置 (以下、FCM 機) が発表されると主流は FCM 機に移り、現在に至っている。

しかし、FCM 機では好中球分類の桿状核球 (Band) と分節核球 (Seg) の区別ができない、赤血球系の形態異常のいくつかを検出できないなどの他、近年では低頻度の悪性リンパ腫細胞や白血病細胞を検出できない症例もあることが問題視されている¹⁾。

そこで当院では、血液像自動分析装置と FCM 機の

短所を互いに補い合うことのできる XE-Alpha + HEG-L システム (シスメックス社) を導入し検査の正確性と業務の効率化を図っている。今回、我々はレビュー (目視確認) 分類結果に対する血液像自動分析装置 HEG-L (以下、HEG-L) の分類一致率の向上を目的として、閾値の検討と腫瘍細胞等異常細胞の検出率について検討を行った。

XE-Alpha + HEG-L システム

当院の XE-Alpha + HEG-L システムの外観を図 1 に示す。検体は自動血球分析装置 XE-5000 (以下、XE-5000) で CBC、白血球分画を測定した後、自動標本作製装置 SP-1000i に運ばれ臨床側からのオーダーの他、XE-5000 からのサスペクトメッセージ、当院アルゴリズムに基づき標本の作製がなされる。作製された標本は自動で HEG-L 連携ユニットに運ばれ、HEG-L で白血球分類が行われる。

HEG-L 測定原理

HEG-Lは標本の一定領域内における血球の分布密度を算出することにより至適観察部位を決定し、血球走査を開始する。有核血球に相当する細胞を検知するとオートフォーカス機能により焦点調整を行った後、自動鏡検部に搭載された3CCDカメラで血球像を撮像する。画像はデジタル変換され、核・細胞質・その他の領域に分割された後、形態や色調の特徴を数値化した約70種類の特徴パラメータを基に「枝分かれ理論」によって血球を分類する²⁾。

対 象

正常検体群は、当院職員で明らかな現病歴のない健常人のうちXE-5000の検査結果で「NEGATIVE」と判定された検体99例を対象とした。異常検体群は幼若顆粒球出現例25例、赤芽球出現例8例、異型リンパ球出現例6例、好酸球-好塩基球異常例2例、ペルゲル様核異常2例、血液疾患57例(図2)、計100例を対象とした。



図1. XE-Alpha + HEG-L システム

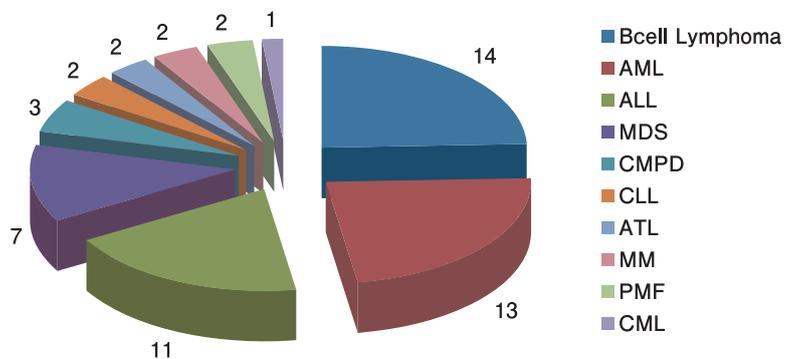


図2. 血液疾患内訳

方法

正常検体の標本を HEG-L にて 100 カウント測定した後、目視にてレビューを行い、一致率の低い項目について分類閾値を調整し最適な閾値を設定した。また、得られた最適閾値が異常検体にも使用可能であるか検討を行った。Band-Seg の分別は日本検査血液学会から提案された基準に基づいて行った³⁾。また、異常検体群の芽球等腫瘍細胞のレビュー分類結果との一致率と検出率を検討した。芽球等腫瘍細胞の検出率の検討については、HEG-L で細胞が 100 個以上分類可能であった 41 例を対象とした。

結果

表 1 にレビュー結果を示した。一致率は Band 32.3%、Seg 97.2%、Eosin 98.2%、Baso 23.5%、Lymph 97.3%、Mono 67.7% であり、全細胞一致率は 5 分類 (Band, Seg を区別しない) で 96.8%、6 分類 (Band, Seg を区別する) で 92.6% であった (Skip を除く)。本結果に基づいて、一致率の低かった Baso, Mono, Band の閾値パラメータを変更して一致の向上を試みた。

表 1. 初期閾値での正常検体群分類結果

HEG-L 自動分類結果													計	一致率 (%)
	Band	Seg	Eosin	Baso	Lymph	Mono	A-Ly	Imm	Blast	Ebl	UNC			
レビュー分類結果	Band	124	260										384	32.3
	Seg	148	5199					1			1		5349	97.2
	Eosin			221								4	225	98.2
	Baso		14		20			49				2	85	23.5
	Lymph	6	7			3224	13		15	16	1	32	3314	97.3
	Mono		5			78	308					64	455	67.7
	A-Ly					7				3			10	0.0
	Pro												0	—
	Myelo								1				1	100.0
	Meta								1				1	100.0
	Blast												0	—
	Ebl												0	—
	Skip	11	47	8	3	46	4		60	1	1	228	409	
	計	289	5532	229	23	3355	325	0	127	20	2	331	10233	

全細胞セルバイセル一致率 (Skip 除く) : 5 分類 96.8%, 6 分類 92.6%

Band : 桿状核好中球, Seg : 分節核好中球, Eosin : 好酸球, Baso : 好塩基球, Lymph : リンパ球, Mono : 単球, A-Ly : 異型リンパ球, Imm : 幼若顆粒球, Pro : 前骨髄球, Myelo : 骨髄球, Meta : 後骨髄球, Blast : 芽球, Ebl : 赤芽球, UNC : 分類不能細胞, Skip : スマッジ細胞, 非血液細胞 ほか

1. Baso 分類閾値の検討

レビューにて分類された Baso85 個の自動分類結果内訳は、一致したものの 20 個、Seg に分類されたものの 14 個、Imm に分類されたものの 49 個、UNC に分類されたものの 2 個であった。よって、Imm、Seg に分類されたものを Baso に認識されるように分類閾値を調整した。表 2 に変更後のレビュー結果を示す。Baso の一致率は 23.5% から 80.0% に向上した。

2. Mono 分類閾値の検討

レビューにて Mono に分類された 455 個の自動分類結果内訳は、一致したものの 308 個、Seg に分類されたものの 5 個、Lymph に分類されたものの 78 個、UNC に分類されたものの 64 個であった。よって、Lymph、UNC に分類されたものを Mono に認識され

るように分類閾値を調整した。表 2 に変更後のレビュー結果を示す。Mono の一致率は 67.7% から 94.7% に向上した。

3. Band 分類閾値の検討

Band に分類された 384 個の自動分類結果内訳は、一致したものの 124 個、Seg に分類されたものの 260 個であった。Band-Seg 間の不一致が大きかったのでパラメータ閾値変更検討を行ったが、Band の一致率が向上すると、Seg の一致率が低下するなど一致率の向上を図ることはできなかった。そこで、Band 以外の Baso、Mono で得られた閾値を最適閾値として設定した。最適閾値を適応することにより、5 分類の全細胞一致率は 96.8% から 98.1%、6 分類では 92.6% から 94.0% と向上した(表 2, Skip 除く)。

表 2. Baso, Mono 閾値変更後の正常検体群分類結果

HEG-L 自動分類結果													計	一致率 (%)
	Band	Seg	Eosin	Baso	Lymph	Mono	A-Ly	Imm	Blast	Ebl	UNC			
レビュー分類結果	Band	124	260										384	32.3
	Seg	148	5199					1			1		5349	97.2
	Eosin			221								4	225	98.2
	Baso		5		68				12				85	80.0
	Lymph	5	7		1	3189	49		15	16	1	31	3314	96.2
	Mono		5			7	431					12	455	94.7
	A-Ly					7				3			10	0.0
	Pro												0	-
	Myelo								1				1	100.0
	Meta				1								1	0.0
	Blast												0	-
	Ebl												0	-
	Skip	10	45	8	15	46	4		51	1	1	228	409	
計	287	5521	229	85	3249	484	0	80	20	2	276	10233		

全細胞セルバイセラー一致率 (Skip 除く) : 5 分類 98.1%, 6 分類 94.0%

Band : 桿状核好中球, Seg : 分節核好中球, Eosin : 好酸球, Baso : 好塩基球, Lymph : リンパ球, Mono : 単球, A-Ly : 異型リンパ球, Imm : 幼若顆粒球, Pro : 前骨髄球, Myelo : 骨髄球, Meta : 後骨髄球, Blast : 芽球, Ebl : 赤芽球, UNC : 分類不能細胞, Skip : スマッジ細胞, 非血液細胞 ほか

4. 異常検体群での検討

正常細胞で得られた最適閾値が、異常細胞でも適用可能か検討を行った。表3、4にレビュー結果を示す。Basoの一致率は34.1%から57.6%、Monoの一

致率は68.4%から71.4%となり、異常検体群でも一致率の上昇を認めたものの、正常検体群でみられたほどの大幅な向上は認められなかった。全細胞一致率は、5分類で73.1%から74.6%、6分類で65.3%

表3. 初期閾値での異常検体群分類結果

HEG-L 自動分類結果														
	Band	Seg	Eosin	Baso	Lymph	Mono	A-Ly	Imm	Blast	Ebl	UNC	計	一致率 (%)	
レビュー分類結果	Band	208	657	1	64	13	6	54			17	1020	20.4	
	Seg	148	2780	14	147	16	1	19	1		35	3161	87.9	
	Eosin	1	1	137	6						10	155	88.4	
	Baso		16	7	29	1		12			20	85	34.1	
	Lymph	1	6	1		2102	10	6	7	7		67	2207	95.2
	Mono	3	43			127	568	1	51	17		20	830	68.4
	A-Ly				2	120	19	15		13		5	174	8.6
	Pro						1			1		4	6	0.0
	Myelo	4	16		14	27	17		77	13		64	232	33.2
	Meta	5	13		1	8	1		38			7	73	52.1
	Blast	1	2	1		267	18	26	24	564	1	427	1331	42.4
	Other1*					495		9	1	63		151	719	8.8
	Other2**	1	3				29		13	3		1	50	6.0
	Ebl		2	15	2	19		1	1		106	62	208	51.0
	Skip	11	82	7	24	86	9	3	18	4	6	554	804	
	計	383	3621	183	289	3281	679	61	315	686	113	1444	11055	

全細胞セルバイセル一致率 (Skip 除く) : 5分類 73.1%, 6分類 65.3%

* 悪性リンパ腫細胞は Other1 に分類した
** M5b 異常単球は Other2 に分類した

表4. 最適閾値での異常検体群分類結果

HEG-L 自動分類結果														
	Band	Seg	Eosin	Baso	Lymph	Mono	A-Ly	Imm	Blast	Ebl	UNC	計	一致率 (%)	
レビュー分類結果	Band	189	613		97	23	6	58			33	1019	18.5	
	Seg	137	2798	2	131	19	1	28	1		42	3159	88.6	
	Eosin	1	4	127	10				1			12	155	81.9
	Baso		9	2	49	2		11				12	85	57.6
	Lymph	1	4	1	1	2111	10	8	8	7		26	2177	97.0
	Mono	3	25		4	129	593	1	36	20		19	830	71.4
	A-Ly					129	19	9		13		2	172	5.2
	Pro						1			1		4	6	0.0
	Myelo	3	4		25	30	22		77	14		55	230	33.5
	Meta	1	9		8	9	1		34			10	72	47.2
	Blast		2		3	272	20	120	35	587	1	212	1252	46.9
	Other1*					512		14	4	67		72	669	10.0
	Other2**	1	1		2		36		6	3		1	50	6.0
	Ebl		1	15		20		3	1		106	34	180	58.9
	Skip	10	68	6	19	104	10	4	28	5	6	469	729	
	計	346	3538	153	349	3360	719	159	327	718	113	1003	10785	

全細胞セルバイセル一致率 (Skip 除く) : 5分類 74.6%, 6分類 67.1%

* 悪性リンパ腫細胞は Other1 に分類した
** M5b 異常単球は Other2 に分類した

から 67.1% に向上した。また、A-Ly, Imm, Blast, Ebl, Other, UNC を異常細胞として包括した場合、全細胞一致率は、5 分類で 74.6% から 80.6%、6 分類で 67.1% から 73.1% に向上した (表 5)。また、芽球等腫瘍細胞の出現していた血液疾患群での芽球等腫瘍細胞検出率は UNC を含めた場合 98.0% で、一致率は AML (M5b を除き RAEB2 含む) 78.3%、ALL 72.1%、悪性リンパ腫 (CLL 除く) 30.4% であった (表 6)。

考 察

XE-5000 で正常検体とされた群では、Baso と Mono で自動分類とレビューの一致率をそれぞれ 23.5% から 80.0%、67.7% から 94.7% に向上させることのできる最適閾値を得ることができた。この一致率は臨床的に十分な値であると思われる。Band-Seg の一致率は向上をはかることはできなかった。しかし Band-Seg を一括して XE-5000 の Neutro として比較し

表 5. 最適閾値での異常検体群分類結果 (異常細胞包括時)

HEG-L 自動分類結果													計	一致率 (%)
	Band	Seg	Eosin	Baso	Lymph	Mono	A-Ly	Imm	Blast	Ebl	UNC			
レ ビ ュ ー 分 類 結 果	Band	189	613		97	23	6		58			33	1019	18.5
	Seg	137	2798	2	131	19	1		28	1		42	3159	88.6
	Eosin	1	4	127	10				1			12	155	81.9
	Baso		9	2	49	2			11			12	85	57.6
	Lymph	1	4	1	1	2111	10	8	8	7		26	2177	97.0
	Mono	3	25		4	129	593	1	36	20		19	830	71.4
	A-Ly					129	19	9		13		2	172	14.0
	Pro						1			1		4	6	83.3
	Myelo	3	4		25	30	22		77	14		55	230	63.5
	Meta	1	9		8	9	1		34			10	72	61.1
	Blast		2		3	272	20	120	35	587	1	212	1252	76.3
	Other1*					512		14	4	67		72	669	23.5
	Other2**	1	1		2		36		6	3		1	50	20.0
	Ebl		1	15		20		3	1		106	34	180	80.0
Skip	10	68	6	19	104	10	4	28	5	6	469	729		
計	346	3538	153	349	3360	719	159	327	718	113	1003	10785		

全細胞セルバイセル一致率 (Skip 除く) : 5 分類 80.6%、6 分類 73.1%

* 悪性リンパ腫細胞は Other1 に分類した
** M5b 異常単球は Other2 に分類した

表 6. 造血器腫瘍での病的細胞の検出

疾患名	例数	病的細胞一致率 (%)	検出率 (%)
AML (M5b を除き RAEB2 含む)	17	78.3	94
ALL	11	72.1	100
ML (CLL 除く)	13	30.4	100
全体	41	58.4	98

た場合は、ほぼ一致率 100%を示したことから検査結果として好中球の割合という意味では不一致はないとも言える。現在 Band-Seg の分別は日本検査血液学会での分類基準が提案されているが異論も多く、日本国内のみならず世界的にも広く合意がなされているとは言い難い状況にある。Band-Seg の分別は今後広く合意が形成されたのちに新たなパラメータおよび閾値の設定が必要であると思われる。また、この最適閾値は異常検体群の一致率をわずかではあるが向上させたことから異常検体群にも適応可能と考えられた。

今回の検討で異常検体群の全細胞一致率は 74.6%と正常検体群の 98.1%に比べ低い一致率であった(5分類かつ最適閾値の場合)。この原因の一つは、検討された異常検体群の約 1/4 が悪性リンパ腫であったことが要因と思われる。末梢血中に腫瘍細胞が多数出現しやすい悪性リンパ腫には、濾胞性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫などがあるがこれらの腫瘍細胞は目視においても正常リンパ球との鑑別が難しい場合が多い。これらのリンパ腫細胞が低頻度で CBC 値がほぼ正常の場合、FCM 機では異常として検出されず見落としの原因となっている¹⁾。今回の検討で、HEG-L での悪性リンパ腫細胞の分類一致率は 30.5%ながら検出率は 100%であった。このことは、血液像自動分析装置の FCM 機に対する優位性を示していると思われる。

まとめ

99 例の正常検体をもとに Baso と Mono の最適閾値を設定することで正常群、異常検体群ともに一致率の向上を図ることが可能であった。今回は Band-Seg の一致率の向上は得ることができなかったが、今後分類基準の標準化にあわせて新たなパラメータ閾値の設定が必要であると思われる。異常検体群では、一致率が正常群に比べ低値であったがそれは腫瘍細胞の存在が原因であった。しかし、腫瘍細胞検出率が 98%であったことは見落としのない検査を実施する上での HEG-L の有用性を示すものであった。

本論文の要旨は、日本臨床検査自動化学会第 42 回大会(2010 年 10 月 8 日 神戸市)にて発表した。

参考文献

- 1) 田中由美子 他. 自動血球計数装置(血球算定, 白血球分類)のピットフォールと対応. 日本臨床検査自動化学会会誌. 2009; 34(2): 190-194
- 2) 山田和宏, 山川展良. 血液像自動分析装置 HEG-L の概要について. Sysmex J. 2008; 9(1): 1-5
- 3) 土屋達行. 第 10 回日本検査血液学会学術集会シンポジウム 4 標準化委員会の現状と今後の方向性; 2. 血球形態検査の標準化-現在までの歩みと今後. 日本検査血液学会雑誌. 2010; 11(1): 88-95

Evaluation of Optimal Threshold for WBC Classification and Abnormal Blood Cells Detectability of Automatic Blood Cell Analyzer HEG-L

Takashi YAMADA*¹, Fumiaki HAYASHI*² and Chiaki TANAKA*²

*1 Department of Central Laboratory, Nagaoka Red Cross Hospital, 2-297-1 Senshu, Nagaoka-shi, Niigata 940-2085

*2 Scientific Research Division, Scientific Affairs, Sysmex Corporation

SUMMARY

Leukocyte differentiation was usually examined by automated cell counters based on flow cytometry principles, recently. A combination of automatic blood cell analyzer based on pattern recognition method and automated cell counter makes up for each other's weak points and improves the efficiency in differential counting test of peripheral blood cells. We tried to adjust the leukocyte differential threshold of Sysmex HEG-L for improvement of the classification performance, using 99 blood films from healthy subjects. We studied the detection ratio of the hematopoietic organ tumor cells and whether the foregoing optimal threshold was adaptable to abnormal specimens, using 100 blood films including abnormal cells. We adjusted the optimal differential threshold for normal bloods and improved the concordance rate with review (visual differentiation), considerably. This threshold also improved the concordance rate in abnormal samples measurably. Thus, the threshold is effectual also in abnormal specimens. We confirmed the detection ratio of the hematopoietic organ tumor cells by HEG-L had a very good prognosis.

Therefore, we think HEG-L covers for weakness of the automated blood cell analyzers and prevents undetected error of abnormal cells.

Key Words

Automatic Blood Cell Analyzer, HEG-L, WBC Classification, Pattern Recognition Method
