

# XE-2100における幼若血小板比率 (IPF) 測定の基礎的検討 — 抗凝固剤と保存条件の影響 —

柴山 正美\*<sup>1</sup>, 高見 昭良\*<sup>2</sup>, 朝倉 英策\*<sup>3</sup>, 桂 三智子\*<sup>4</sup>,  
二飯田 佳代子\*<sup>1</sup>, 和田 隆志\*<sup>1</sup>

\*1 金沢大学附属病院 検査部：金沢市宝町 13-1 (〒920-8641)

\*2 金沢大学附属病院 輸血部

\*3 金沢大学附属病院 高密度無菌治療部

\*4 福井済生会病院 検査部

## 要 旨

幼若血小板比率 (IPF) は多項目自動血球分析装置 XE シリーズで測定できるパラメータである。今回の検討では、この IPF 測定に使用できる抗凝固剤の種類や検体の保存条件を調べた。EDTA-2K, ヘパリン, クエン酸ナトリウムの 3 種類の抗凝固剤による末梢血を用い、健常参考値, 同時再現性, 希釈直線性, 採血後経時変化を検討した。健常参考値は, EDTA 加血 (0.54 ~ 4.72%), クエン酸加血 (0.52 ~ 5.52%) では同等であったが, ヘパリン加血のみ (0.80 ~ 14.80%) 分布が異なった。

同時再現性は EDTA 加血のみ CV が 11.0 ~ 13.9% と良好であった。IPF 測定値において EDTA 加血の希釈直線性では, 希釈率 0.2 まで良好な結果が得られた。IPF 測定値の経時変化に関しては, ヘパリン加血では血小板凝集の影響による IPF の急激な上昇をみとめた。EDTA およびクエン酸ナトリウム加血では経時的に徐々に上昇したが, 8 時間以内であれば測定値への影響はほとんどなかった。

以上の結果より, XE-2100 による IPF 測定は EDTA 加血検体を用い, 採血から 8 時間以内に測定する必要がある。ヘパリン加血・クエン酸加血検体は, IPF 測定に不向きである。

**キーワード** 幼若血小板比率 (IPF), 抗凝固剤, 経時変化

## 緒 言

骨髓から放出直後で細胞質が RNA に富む未成熟な血小板は, 網血小板と呼ばれ, 骨髓の血小板産生能を反映する<sup>1)</sup>。血小板減少が産生低下・消費亢進のどちらによって起こっているか, 簡便に見分ける指標として, 網血小板測定が注目されている。従来 Thiazol Orange を使ったフローサイトメトリー法で網血小板を測定していた<sup>2-4)</sup>が, 特殊技術・機器が必要なため, 一般に普及しなかった。一方, 多項目自動血球分析装置 XE シリーズに搭載される解析プログラムである XE IPF master (以下, XE IPF master; シスメックス社) では, 網血

小板は, 幼若血小板比率 (immature platelet fraction; IPF) として通常の血球計数と同時に測定できる汎用性に優れた項目である<sup>5-8)</sup>。今回は IPF 測定における基礎的検討結果を報告する。

## 対象と方法

### 1. 使用機器および測定原理

XE IPF master を搭載した多項目自動血球分析装置 XE-2100 (以下, XE-2100; シスメックス社) の RET チャンネルを用いて末梢血を測定した (図 1)。展開図上, 細胞サイズ (前方散乱光) を反映する Y 軸により, 赤血球と血小板が明確に区別できる。X 軸は蛍光強度

を示し、細胞あたりの核酸量を反映する。網血小板はRNAに富んでいるため、この原理により網血小板を含む細胞分画をIPFとして同定できる。

## 2. 対象

健常成人男性80名(23～63歳)、健常成人女性90名(21～56歳)、本院のIPF高値患者3名(特発性血小板減少性紫斑病:IPF2名、骨髄異形成症候群・腹部大動脈部破裂に伴う播種性血管内凝固症候群各1名)の静脈血を用いた。抗凝固剤は、EDTA-2K、ヘパリン、クエン酸ナトリウムを用いた。

## 3. 方法

健常人170名のIPFを、血算パラメータとともに測定した。同時再現性の検討に、健常人3人から3種類すべての抗凝固剤加静脈血検体を採取し、20回連続測定を行った。IPF高値患者3名のEDTA-2K加検体を用いて同様に検討した。健常人およびIPF高値患者のEDTA加血液を、XE-2100専用希釈液セルパックⅡで5段階希釈したサンプルを2重測定し、希釈直線性を検討した。3種類の抗凝固剤により採血した15検体を用いて、4℃5日間保存の経時変化を調べた。なお、経時変化を示す図3、4、5および6のY軸は採決直後の値を100%とした変化率で表した。ヘパリンによる血小板凝集の変化を見るた

め、採血直後より1分毎にIPFを測定した。同時に、May Giemsa染色による血液塗抹標本を経時的に作成し、凝集の有無を確認した。なお、EDTA-2Kでは室温における経時変化も調べた。さらに、4℃および室温保存によるPDW(血小板分布幅)、MPV(平均血小板容積)の変化を確認し、血液塗抹標本も作成し形態を観察した。

## 結果

### 1. 健常参考値

抗凝固剤の種類によるIPF測定値は、EDTA加血0.54～4.72%(平均1.85、標準偏差1.14)、クエン酸加血0.52～5.52%(平均1.70、標準偏差1.27)と、同等の結果が得られた(図2)。一方、ヘパリン加血は0.80～14.80%(平均3.35、標準偏差3.71)と、測定値、ばらつきともに大きくなる傾向がみられた。

### 2. 同時再現性

健常人の3検体を用い、IPF測定値の同時再現性を抗凝固剤毎に検討した。IPFの変動係数(CV)は、EDTA加血が11.0～13.9%と唯一良好で、ヘパリン加血およびクエン酸加血は20.8～39.7%であった(表1-a)。同様に、血小板数測定値でも同じ現象がみられ、同時再現性はEDTA加血のみ良好であった。

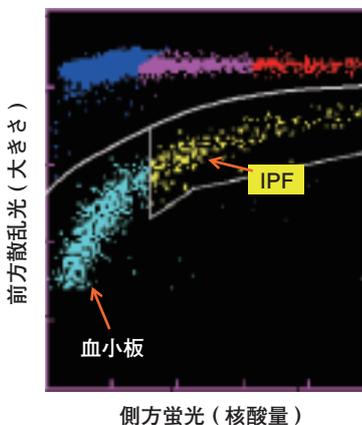


図1. 幼若血小板比率 (IPF) の測定原理

抗凝固剤の種類	N	IPF 健常参考値 (%)
EDTA-2K	170	0.54 ~ 4.72
ヘパリン	104	0.80 ~ 14.80
クエン酸ナトリウム	103	0.52 ~ 5.52

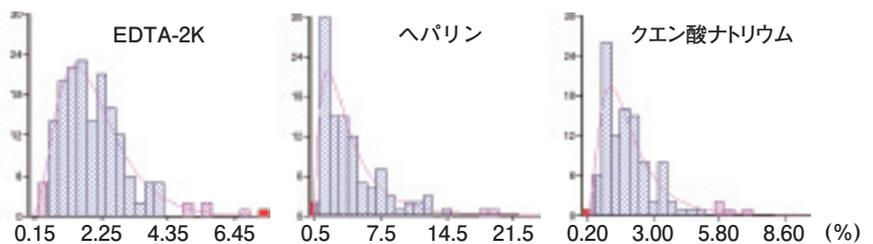


図2. 抗凝固剤の種類とIPFの健常参考値

次に、IPF 高値患者 3 名の EDTA 加血検体を用い、IPF 測定値の同時再現性を検討した。CV は、IPF が 7.9 ~ 14.2% と良好であった (表 1-b)。

### 3. 希釈直線性

IPF 測定値の希釈直線性を検討したところ、血小板数、ヘモグロビン (Hb) とともに各測定値と同様、希釈率 0.2 まで有意な影響はみられなかった (図 3)。

表 1. 同時再現性

測定項目	抗凝固剤	健常人			
		A	B	C	
IPF (%)	EDTA-2K	mean	1.74	1.97	1.95
		SD	0.24	0.25	0.21
		CV	13.9	12.8	11.0
	ヘパリン	mean	5.07	5.34	5.06
		SD	1.43	2.12	1.44
		CV	28.2	39.7	28.5
	クエン酸ナトリウム	mean	2.44	2.06	2.73
		SD	0.79	0.70	0.57
		CV	32.5	33.8	20.8
血小板 (×10 <sup>3</sup> /μL)	EDTA-2K	mean	213	199	265
		SD	3.61	3.22	4.15
		CV	1.7	1.6	1.6
	ヘパリン	mean	90	94	149
		SD	63.20	56.80	70.70
		CV	70.5	60.3	47.4
	クエン酸ナトリウム	mean	138	162	178
		SD	46.14	23.46	52.74
		CV	33.4	14.5	29.7

IPF 高値患者		
D	E	F
10	9	11
25.36	16.66	20.67
3.60	1.86	1.63
14.2	11.2	7.9

D	E	F
10.20	35.44	49.91
1.48	2.60	2.91
14.5	7.3	5.8

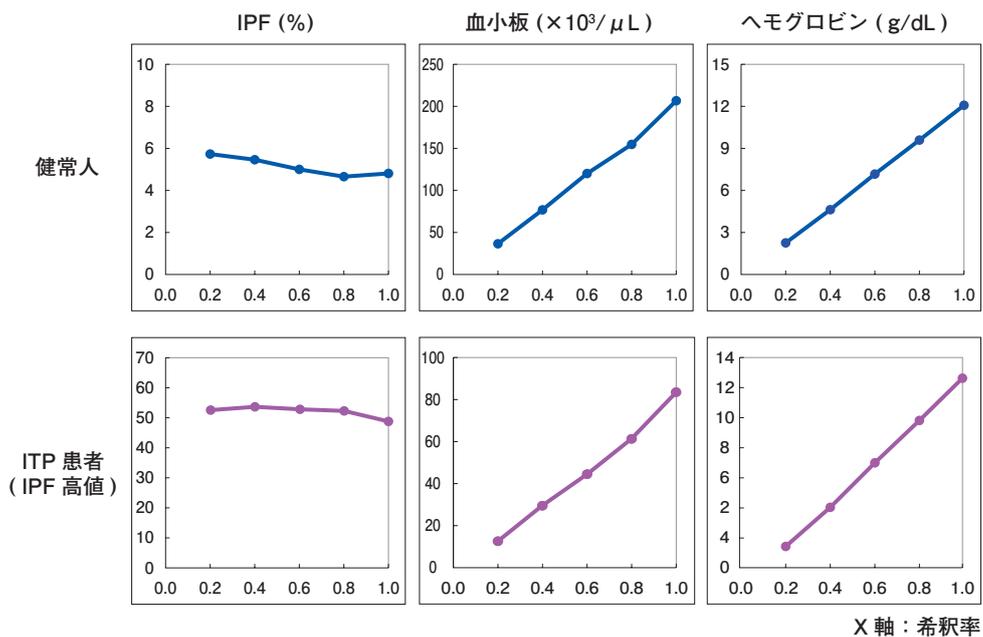


図 3. 希釈直線性 (EDTA 加血)

#### 4. 経時変化

IPF 測定値の経時変化を、抗凝固剤毎に検討した。抗凝固剤の種類や保存条件を問わず、IPF 測定値は経時的に上昇した(図4)。EDTA 加血の場合、室温より4℃で保存した方が、上昇率は高かった。ヘパリン加血の場合、IPF 測定値は検体採取直後から急激に上昇したのち一旦低下、その後徐々に上昇した。

#### 5. ヘパリン加血における血小板形態変化

ヘパリン加血で IPF 測定値が大きく変動した原因を調べるため、形態学的検討を行った。採血直後のヘパリン加血検体では血小板凝集はほとんどなかった。2分後、血小板2個程度の凝集像が出現し、その後急速に増加した(図5)。

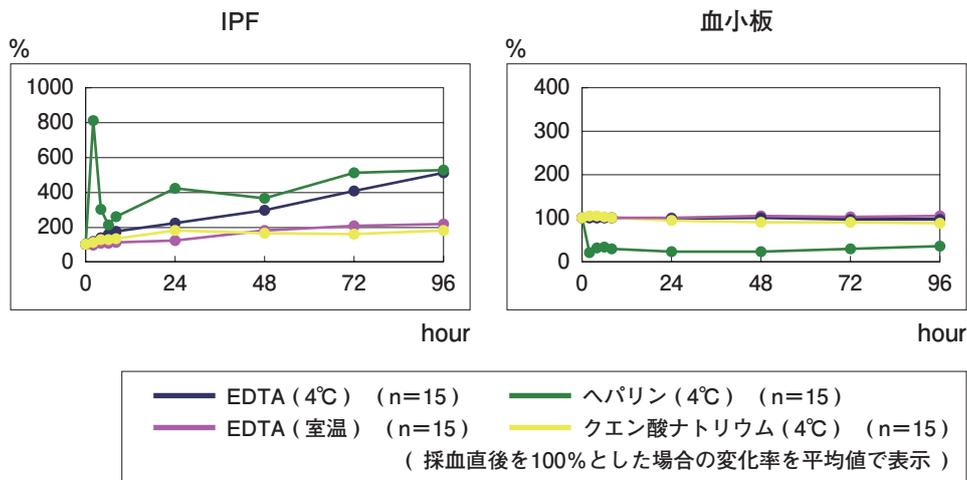
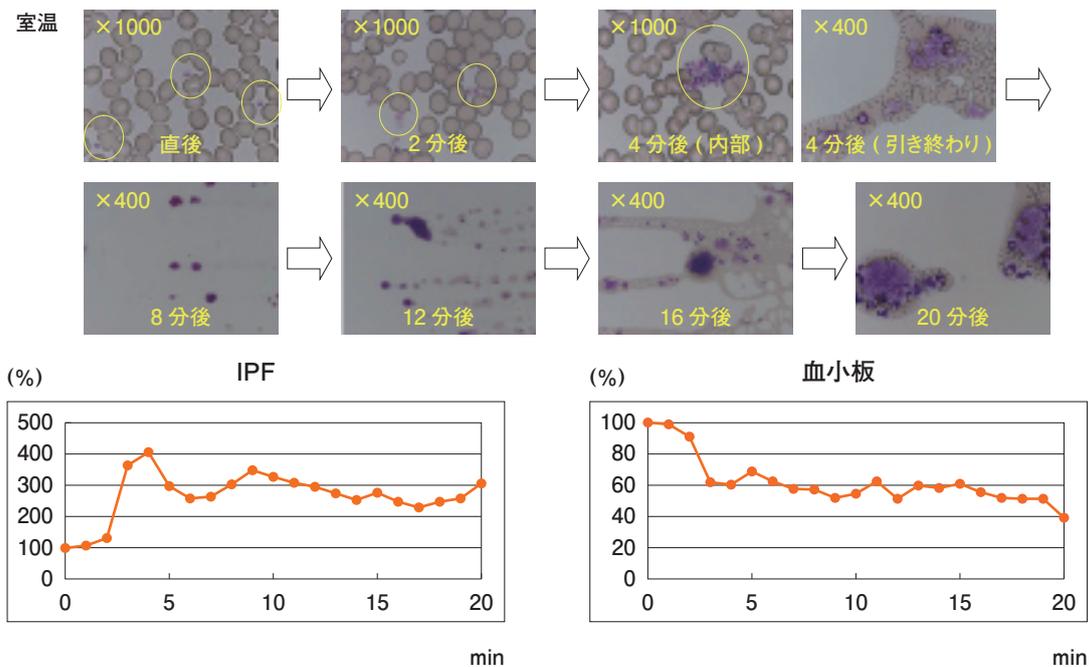


図4. 抗凝固剤・保存条件毎の経時変化



グラフは健常人3名の平均値(採血直後を100%とした場合の変化率)を表示

図5. ヘパリン加血における血小板形態変化と変化率

## 6. EDTA 加血における血小板形態変化

EDTA 加血における血小板形態変化を、保存条件毎に検討した。EDTA 加血の場合、血小板数の経時変化はほとんどなかった(図4)。IPF も採血後 8 時間までは、保存温度にかかわらず経時変化はほとんどなかった(図6)。しかし、8 時間を超えると IPF 測定値は急激に上昇し始めた。特に 4℃ 保存で顕著であった。形態像では、ヘパリン加血と異なり、EDTA 加血では血小板凝集像の増加はなかった。一方、経時的な血小板の巨大化が認められた(図6)。PDW と MPV の上昇はそれを裏付けている。実際に、4℃ 保存の方が室温保存より、PDW・MPV の経時上昇が大きかった。

## 考 察

網血小板・IPF は骨髓巨核球数を反映する<sup>1,9)</sup> ことから、骨髓の血小板産生能を反映する利便性の高い指標として、最近注目を集めている。IPF 測定の有用性では、特発性血小板減少性紫斑病や再生不良性貧血、肝硬変、新生児血小板減少症など血小板減少性疾患の鑑別診断、化学療法や造血幹細胞移植後の血

小板回復予測、血小板輸血適応の判断など、様々な病態・疾患において報告されている<sup>8)</sup>。最近では、血栓症予測因子や骨髓異形成症候群の診断、細菌感染症の早期診断など、IPF 測定の活用は多岐にわたっている<sup>7, 10~15)</sup>。IPF は XE IPF master で通常の血球計数と同時に測定できるものの、使用できる抗凝固剤の種類や検体の保存条件に関する情報は不足していた。そこで、血算で通常用いる EDTA-2K (EDTA) 加血の他に、ヘパリン加血およびクエン酸加血も用い、IPF 測定における同時再現性や経時変化、保存条件を検討した。

IPF 測定値に関して、EDTA 加血とクエン酸加血は、健常参考値と同様の分布を示した。ただし、クエン酸加血は十分な同時再現性の CV 値が得られなかった。ヘパリン加血は、同時再現性が大きく、測定値が大きくばらついていた。以上から、IPF 測定にヘパリン加血、クエン酸加血は不向きであり、抗凝固剤 3 種類の中では EDTA 加血のみ IPF 測定可能と考えられた。EDTA 加血を用いた場合の XE-2100 による IPF は、0.54 ~ 4.72% であり、他施設の報告<sup>16~18)</sup> とほぼ同等であった。同時再現性においても、CV 値は 7.9 ~ 14.2% であり、永井らの報告<sup>18)</sup> と同様の結果が得られた。

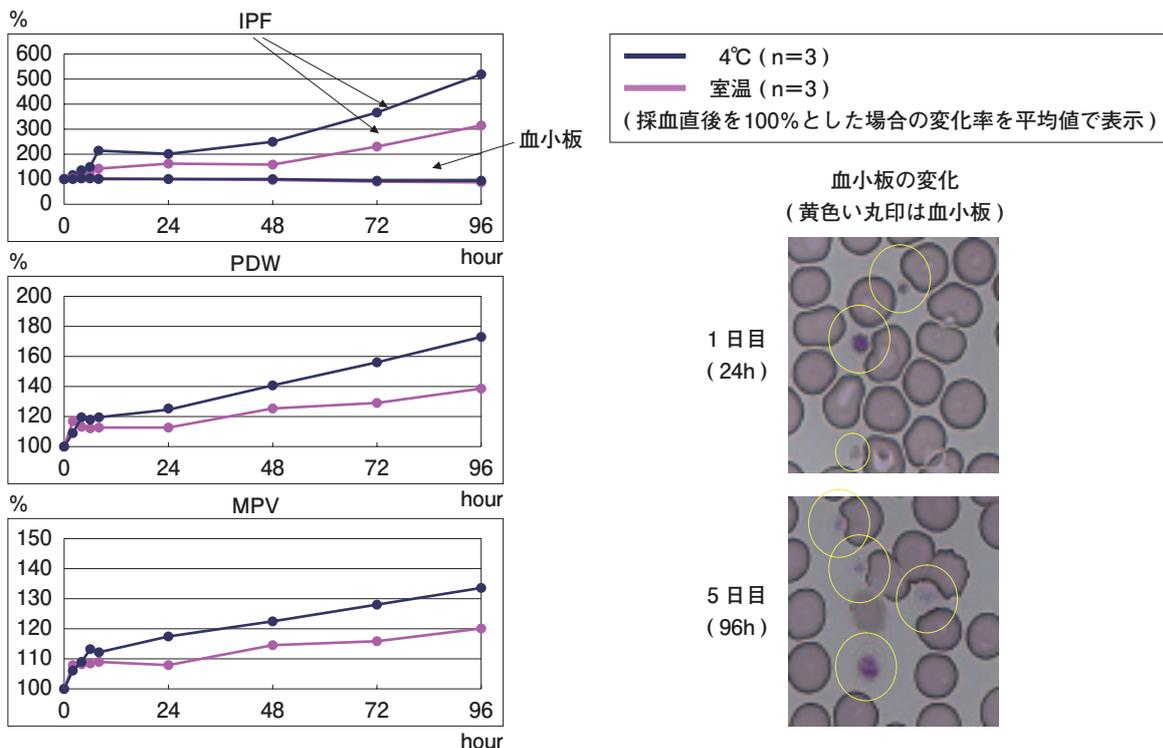


図6. EDTA 加血における血小板形態変化

経時変化を検討したところ、ヘパリン加血のIPF測定値は、採血直後急激に上昇した後低下し、その後、徐々に上昇するという不規則な動態を示した。一方、ヘパリン加血の場合、血小板数は採血直後から急激に低下した。採血直後の血液塗抹標本では血小板の凝集はなかったが、2分後より凝集が始まり、徐々に大きな凝集塊へと進展した。血小板凝集により、血小板数が見かけ上低下（偽性血小板減少）する一方、凝集した血小板の一部が見かけ上の蛍光強度の上昇により、IPFと測定された可能性が推測された。ヘパリン加血をIPF測定に用いざるを得ない場合は、末梢血塗抹標本を必ず鏡検するなどの、注意が必要である。

EDTA加血の場合、採血から8時間以内であれば、室温・4℃保存いずれも、IPF測定値の変化はほとんどなかった。しかし、8時間を超えるとIPFが上昇しはじめ、特に4℃保存で顕著であった。一方、EDTA加血の場合、血小板数の経時変化は、保存条件にかかわらずほとんどなかった。採血5日後でも、血小板数は採血直後とほとんど変わらなかった。EDTA加血の血液塗抹標本では、ヘパリンの場合とは異なり、血小板凝集の増加はなかった。ただし、血小板サイズは経時的に巨大化した。特に5日目で顕著であった。PDW（血小板分布幅）は、血小板粒度分布の最高値を100%とした場合の下方20%値における血小板の分布幅を示し、血小板サイズのばらつきを反映する指標である。PDWは、血小板大小不同や血小板凝集で高値を示す。MPV（平均血小板容積）は血小板の大きさを反映する。特に4℃保存におけるPDWとMPVの上昇は、このような血小板のサイズの上昇を反映していると考えられた。IPFの測定アルゴリズムの特性によりサイズが大きくなった血小板の一部がIPFと測定されたため、IPFの経時の上昇が生じたと考えられた。血小板サイズ（MPV）、大小不同（PDW）の上昇と、IPF上昇の関連性の検証は、今後の検討課題である。

## 結 語

XE-2100によるIPF測定は、EDTA加血検体を用い、採血から8時間以内に行う必要がある。保存条件は、冷蔵（4℃）より室温が望まれるが、8時間以内なら同等の信頼性が期待できる。ヘパリン加血・クエン酸加血検体は、IPF測定に不向きである。

## 参考文献

- 1) Ingram M, Coopersmith A. Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol.* 1969; 17 (3): 225-229
- 2) Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets : a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood.* 1990; 75 (1): 116-121
- 3) 林悟 他. 網状血小板測定法の基礎的検討および各種血小板減少症における網血小板比率の測定. *臨床血液.* 1999; 40 (3): 205-212
- 4) 鳥羽健 他. Maticの変法によるチアゾール・オレンジ法を用いた網血小板測定の臨床応用. *臨床血液.* 2000; 41 (11): 1151-1157
- 5) Koike Y et al. Clinical significance of detection of immature platelets : comparison between percentage of reticulated platelets as detected by flow cytometry and immature platelet fraction as detected by automated measurement. *Eur J Haematol.* 2010; 84 (2): 183-184
- 6) Ruisi MM et al. Stability of measurement of the immature platelet fraction. *Am J Hematol.* 2010; 85 (8): 622-624
- 7) 柴山正美 他. 骨髓異形成症候群の幼若血小板高比率は7番染色体異常を含む予後不良染色体異常の存在を示唆する. *日本検査血液学会雑誌.* 2008; 9 (2): 136-142
- 8) 高見昭良. 幼若血小板比率の臨床意義. *日本血栓止血学会誌.* 2010; 21 (6): 547-552
- 9) Ando M et al. New insights into the thrombopoietic status of patients on dialysis through the evaluation of megakaryocytopoiesis in bone marrow and of endogenous thrombopoietin levels. *Blood.* 2001; 97 (4): 915-921

- 10) Cesari F et al. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost.* 2008 ; 99 ( 5 ) : 930-935
- 11) Di Mario A et al. Immature platelet fraction (IPF) in hospitalized patients with neutrophilia and suspected bacterial infection. *J Infect.* 2009 ; 59 ( 3 ) : 201-216
- 12) Gonzalez-Porras JR et al. The role of immature platelet fraction in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost.* 2010 ; 103 ( 1 ) : 247-249
- 13) Grove EL, Hvas AM, Kristensen SD. Immature platelets in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost.* 2009 ; 101 ( 1 ) : 151-156
- 14) Rinder HM et al. Correlation of thrombosis with increased platelet turnover in thrombocytosis. *Blood.* 1998 ; 91 ( 4 ) : 1288-1294
- 15) Sugimori N et al. Aberrant increase in the immature platelet fraction in patients with myelodysplastic syndrome : a marker of karyotypic abnormalities associated with poor prognosis. *Eur J Haematol.* 2009 ; 82 ( 1 ) : 54-60
- 16) Briggs C et al. 末梢血血小板減少患者における未成熟血小板分画 (IPF) の評価 . *Sysmex J.* 2004 ; 27 : 1-9
- 17) 西山美保 他 . XE-2100 による幼若血小板の測定 - 基礎的検討および血小板減少症鑑別診断における有用性の検討 - . *日本検査血液学会雑誌 .* 2005 ; 6 : S86
- 18) 永井直治 他 . 自動血球計数装置 XE-2100 を用いた未成熟血小板分画の臨床的意義 . *天理医学紀要 .* 2005 ; 8 ( 1 ) : 64-72

# Basic Examination of Immature Platelet Fraction (IPF) by XE-2100 - Effect of anticoagulant and storage condition -

Masami SHIBAYAMA<sup>\*1</sup>, Akiyosi TAKAMI, MD<sup>\*2</sup>, Hidesaku ASAKUARA, MD<sup>\*3</sup>,  
Michiko KATSURA<sup>\*4</sup>, Kayoko NIHANDA<sup>\*1</sup> and Takashi WADA, MD<sup>\*1</sup>

\*1 Clinical Laboratory, Kanazawa University Hospital, 13-1 Takaramachi Kanazawa-shi Ishikawa 920-0934

\*2 Departments of Cellular Transplantation, Kanazawa University Hospital

\*3 Protected Environment Unit, Kanazawa University Hospital

\*4 Clinical Laboratory, Fukui Saiseikai Hospital

## SUMMARY

---

Regarding immature platelet fraction (IPF), reticulated platelets versatilely measured by the multiple automated hematology analyzer XE-2100 (Sysmex Corporation), we evaluated healthy reference values, within-run reproducibility, dilution linearity, and temporal stability after blood collection using three kinds of anticoagulants, EDTA-2K, heparin, and sodium citrate. While the healthy reference values were comparable between EDTA-added blood (0.54-4.72%) and sodium-citrated blood (0.52-5.52%), the large and varied measurement values of 0.80-14.80% were observed only in heparinized blood.

Within-run reproducibility was low and favorable only in EDTA-added blood at CV 11.0-13.9%. No significant effect was observed in dilution linearity of IPF measurement values up to the dilution rate of 0.2. For temporal changes, IPF measurement values elevated over time regardless of kinds of anticoagulants or storage condition, little change was observed in EDTA-added blood within eight hours.

The above results showed that IPF measurement by XE-2100 needs to be performed using EDTA-added blood samples within eight hours after collecting blood. Heparinized blood and sodium-citrated blood are not suitable for IPF measurement.

### Key Words

Immature platelet fraction (IPF), Anticoagulant, Temporal change

---