

多項目自動血球分析装置 XN シリーズの新規異常細胞検出チャンネルにおけるスキャッタグラム上の正常白血球の出現位置の検討

河内 佐和子, 河野 麻理, 高木 由里, 和田 淳, 森川 隆

シスメックス株式会社 学術本部 セルアナリシスセンター：神戸市西区室谷 1-3-2 (〒651-2241)

要 旨

新たに開発された多項目自動血球分析装置 XN シリーズは、異常白血球細胞を検出する WPC チャンネルを搭載している。WPC チャンネルでは、専用試薬が白血球の細胞膜に小孔を形成し、主に核内に存在する DNA を染色した後、それぞれの細胞の前方散乱光 (FSC)・側方散乱光 (SSC)・側方蛍光 (SFL) の強度を測定し、それらの情報を WPC スキャッタグラムおよび WPC (SSC-FSC) スキャッタグラムの 2 つの二次元スキャッタグラムとして表示する。

今回我々は、白血球の主要なサブタイプである T リンパ球、単球、好中球が、WPC スキャッタグラム上のどの位置に出現するのか、またその位置に出現する理由について、健康人ボランティア由来の正常白血球細胞を用いて検討した。末梢血より分離した T リンパ球・単球・好中球は、全血の WPC スキャッタグラム上に出現する左・中央・右のクラスターとそれぞれ一致していた。さらに T リンパ球は、WPC (SSC-FSC) スキャッタグラムで上下 2 つのクラスターに分離しており、FSC の強度は T リンパ球 < 単球 < 好中球の順であった。試薬反応後に共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡で解析したところ、3 つの白血球サブタイプはほぼ同じ強度で染色されていた。透過型電子顕微鏡による観察では、試薬反応後の内部構造は単純な方から T リンパ球 < 単球 < 好中球の順であり、特に T リンパ球は細胞質がほとんど流出したものと、細胞質が比較的良好に残存し核が緊密な細胞の 2 種類が見られた。走査型電子顕微鏡による観察では、試薬反応後の大きさは小さい方から T リンパ球 < 単球 < 好中球の順であり、特に T リンパ球は、表面の凹凸がなくなった小さな細胞と、表面の凹凸が比較的良好に保持されているやや大きな細胞の 2 種類が見られた。T リンパ球の形態が 2 種類に大別される理由について汎用フローサイトメーターを用いて検討したところ、小さい方の細胞からは表面抗原の流出が見られたことから、T リンパ球は細胞膜の損傷の度合いの差で、大小 2 種類の形態になることが示唆された。

以上の結果から、WPC スキャッタグラム上の 3 つのクラスターを形成する主要な白血球サブタイプは、左から T リンパ球・単球・好中球の順であること、また WPC (SSC-FSC) スキャッタグラム上では、T リンパ球は細胞膜の損傷の度合いに応じて上下 2 つのクラスターとして出現すること、が示された。

キーワード 多項目自動血球分析装置, XN シリーズ, WPC チャンネル, スキャッタグラム

はじめに

XN シリーズは、ユーザビリティとクリニカルバリエーションの向上を目的として新たに開発された、多項目自動血球分析装置である¹⁻⁴⁾。新たに搭載された機能の一つである WPC チャンネルは、主に芽球やリ

ンパ球系の異常白血球細胞を検出しフラグgingするチャンネルである。

WPC チャンネルはフローサイトメトリー法の原理^{5,6)}に基づいて、白血球分画から主に白血球系の異常細胞を検出している。WPC チャンネルの内部ではまず、専用の溶血剤であるライザセル™ WPC によっ

て、赤血球・血小板の溶血と、白血球細胞膜への小孔形成を行う。次に、ここで生じた小孔より、専用の染色液であるフルオロセル™WPCが白血球内に侵入し、主に核内に存在するDNAを染色する。染色された白血球細胞はフローサイトメトリーの原理に基づいて、波長633nmのレーザー光による前方散乱光(FSC)・側方散乱光(SSC)・側方蛍光(SFL)それぞれの強度を測定される。測定された情報は、SSC-SFLで展開するWPCスキュッタグラムおよびWPC(SSC-FSC)スキュッタグラムの、2つの二次元スキュッタグラムとして表示される(図1)。WPCチャンネルの異常白血球細胞検出能は臨床検体を用いた検討で確かめられており、異常細胞はWPCスキュッタグラムおよびWPC(SSC-FSC)スキュッタグラム

の上で、正常な白血球とは異なる位置に出現するクラスターとして検出される^{1,4)}。一方、WPCスキュッタグラムおよびWPC(SSC-FSC)スキュッタグラム上の白血球の出現位置は健常者の正常白血球を用いて確認されているが、どの白血球サブタイプがスキュッタグラム上のどの位置に出現するのかを明確に示したデータはこれまで得られていなかった。

今回我々は、白血球の主要なサブタイプであるTリンパ球、単球、好中球が、WPCスキュッタグラムおよびWPC(SSC-FSC)スキュッタグラム上のどの位置に出現するのか、またその位置に出現する理由について、健常人ボランティア由来の正常白血球細胞を用いて検討を行い、有用な知見を得ることができたので、以下に報告する。

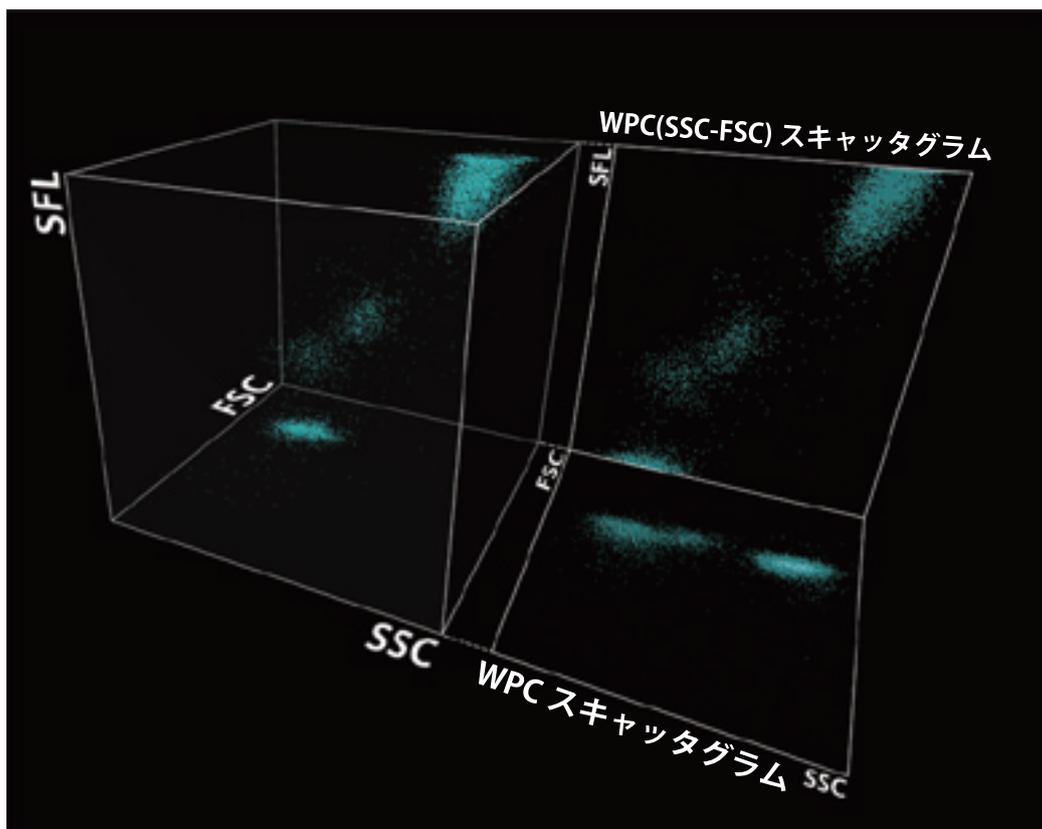


図1 WPC スキュッタグラムと WPC (SSC-FSC) スキュッタグラム

WPCチャンネルでは、WPC専用試薬を反応させた白血球から側方散乱光(SSC)、側方蛍光(SFL)、前方散乱光(FSC)の強度情報を取得し、WPCスキュッタグラム、WPC(SSC-FSC)スキュッタグラムの2つを表示する。左はWPCチャンネルで解析した健常人白血球の情報を、SSC、FSC、SFLの3軸を用いて3次的に表示したもの。

材料と方法

1. 対象

16名の健常者（インフォームド・コンセント実施済み）の静脈から得た末梢血を、EDTA2K 採血管（テルモ社）にて採取した。

2. 細胞分離法

1) 比重遠心法

健常者末梢血に等量のPBSを加え、比重 $d=1.077$ と $d=1.119$ の2種類のリンパ球分離液（ナカライテスク社）上に重層し、比重遠心により単核球層および顆粒球層を分離し、PBSにて洗浄した。

2) 磁気細胞分離法

RoboSep システム（ステムセル・テクノロジー社）のネガティブセレクション法を用いて、単核球層からTリンパ球、単球を、顆粒球層から好中球を分離した後、各白血球の形態が分離前の白血球と同じ状態になるよう、1%ウシ血清アルブミン含有PBSにて、37℃、1時間加温し、回復させた。

3. 細胞の分離純度の確認

分離したTリンパ球、単球、好中球を、各々FITCで標識したCD3（Tリンパ球マーカー）、CD14（単球マーカー）またはCD16b（好中球マーカー）に対するモノクローナル抗体（ベックマンコールター社）の溶液（20mg/L in PBS）にて20分間、4℃で反応させた。またFITCで標識したマウスIgG₁（ダコ社）を陰性対照抗体として用いた。PBSで洗浄後、各細胞をFACSCalibur™（BDバイオサイエンス社）にて解析し、分離した細胞の純度を確認した。

4. XNシリーズによる測定

分離した各白血球を、多項目自動血球分析装置 Sysmex XN-2000™（以下、XN-2000）にて測定し、各スキャッタグラム上の出現位置を確認した。

5. WPC専用試薬による反応

各細胞をXN-2000内と同様の希釈倍率及び反応時間で、WPC専用試薬（ライザセル™ WPCとフルオロセル™ WPC）にて処理した。

6. 共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡による観察

染色した細胞をポリ-L-リジン（シグマアルドリッチ社）でコートしたガラスボトムディッシュ（松浪硝子工業社）に接着し、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡（IX81；オリンパス社、CSU-X1；横河電機社、ImagEM；浜松ホトニクス社）で観察して、細胞の染色部位を確認した。また共焦点顕微鏡の画像をMetaMorph（モレキュラーデバイス社）にて解析し、各白血球の蛍光強度を定量した。

7. 電子顕微鏡による観察

1) 細胞の前固定

染色した細胞を1.5%グルタルアルデヒド（Electron Microscopy Sciences社）／PBSで16時間、4℃で固定した。

2) 透過型電子顕微鏡による観察

1)で固定した細胞を、Cytospin®（サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社）を用いてMASコートスライドガラスに接着した。1%四酸化オスmiumで45分、室温で後固定した後、エタノール系列で脱水し、クエトール812を主とする樹脂（日新EM社）で倒立包埋した。ここからウルトラミクロトーム（Ultracut UCT、ライカ・マイクロシステム社）を用いて作製した厚さ60～80nmの超薄切片を酢酸ウラニル水溶液と鉛染色液にて二重染色し、透過型電子顕微鏡H-7500（日立ハイテクノロジー社）にて観察した。

3) 走査型電子顕微鏡による観察

1)で固定した細胞をポリ-L-リジンコートしたガラス片に貼り付け、1%四酸化オスmiumで45分、室温で後固定した。後固定の後、エタノール系列で脱水し、t-ブチルアルコールに置換した。凍結乾燥装置（日立ハイテクノロジー社）にて乾燥し、オスmiumコーターにて細胞表面をオスmiumでコートし、無蒸着で電解放出型走査型電子顕微鏡（JSM-7500F、日本電子社）にて観察した。

8. Tリンパ球の解析

1) 汎用フローサイトメーターによる WPC スキャッタグラム上の再現

1. の血液を 5. の手順により専用試薬で染色し、汎用フローサイトメーター (FACSCalibur, BD バイオサイエンス社) を用い、縦軸に SFL, 横軸に SSC をとり WPC スキャッタグラムを、縦軸に FSC, 横軸に SSC をとり WPC (SSC-FSC) スキャッタグラムを再現した。

2) Tリンパ球の解析

2. で分離した各白血球を、3. の手順により特異抗体および陰性対照抗体で染色した後、さらに 5. の手順により専用試薬で二重染色して、汎用フローサイトメーターで解析した。

結果と考察

1. 分離した白血球サブタイプの WPC スキャッタグラム上の出現位置

健康者ボランティアから採血した末梢血より分離した各白血球サブタイプを XN シリーズで測定することで、各白血球サブタイプの WPC スキャッタグラム上の出現位置を検討した。まず末梢血より、Tリンパ球・単球・好中球の各白血球サブタイプを比重遠心法・磁気細胞分離法により分離した^{7,8)}。分離した細胞の純度を汎用フローサイトメーターで確認したところ、Tリンパ球、単球、好中球の分離純度はそれぞれ 95.8%、57.6%、97.8%であった (図2A)。次に、分離した各白血球サブタイプを XN シリーズで測定し、WPC スキャッタグラム上の出現位置を、全血での白血球の出現位置と比較した。全血の WPC スキャッタグラムでは、白血球は左・中央・右の3つのクラスターとして検出される (図2B, 全血)。分離した Tリンパ球の WPC スキャッタグラム上の出現位置は全血の左のクラスター (L) と、また分離した単球は中央 (M)、好中球は右 (N) のクラスターとそれぞれ一致した (図2B)。一方、全血の WPC (SSC-FSC) スキャッタグラム上では、正常な白血球は4つのクラスターとして検出されるが、分離した Tリンパ球はこの WPC スキャッタグラム上で全血での右側の上下2つのクラスター (L1, L2) と一致する位置に出現しており、単球、好中球はそれぞ

れ中央 (M)、右 (N) のクラスターとそれぞれ一致する位置に出現していた (図2C)。

フローサイトメトリー法では、FSC は粒子の大きさ、SSC は粒子の形状や内部の粒子 (細胞の核・顆粒など) に関する情報を反映するとされている。また WPC チャンネルの専用試薬は、主に核の DNA を染色するので、試薬による細胞膜の損傷が同程度に生じる健康人成熟白血球の場合、SFL は細胞内の DNA 量を主に反映する。これらのことから、図2の結果は、専用試薬処理後の3種の白血球サブタイプについて、以下の4つのことを示唆すると考えられた。

- 1) WPC 専用試薬染色による蛍光強度の差はあまりないこと
- 2) 試薬反応後の内部構造は、単純な方から Tリンパ球<単球<好中球の順に複雑であること
- 3) 試薬反応後の大きさは、小さい方から Tリンパ球<単球<好中球の順であること
- 4) Tリンパ球が大きさの違う2つの集団にわかれること

そこで、これらの4点について、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡、透過型電子顕微鏡、走査型電子顕微鏡、汎用フローサイトメーターを用いた検証を行った。

2. 専用試薬反応後の各白血球サブタイプの蛍光強度

健康者ボランティアから採血した末梢血より分離した各白血球サブタイプの細胞を、WPC 専用試薬と反応させながら共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて撮影したところ、細胞の核が主に染色されていることが確認できた (図3A-C)。このようにして得られた画像から、細胞1つあたりの蛍光強度を算出した。Tリンパ球の平均蛍光強度を 1.00 とし、3つのサブタイプそれぞれの蛍光強度の平均と標準偏差を求めたところ、Tリンパ球 1.00 ± 0.10 、単球 1.02 ± 0.19 、好中球 1.07 ± 0.14 となった (図3A-C)。この結果は図2の WPC 専用試薬染色による蛍光強度の差はあまりないという結果 (図2, 図3D) と一致した。また、これらの白血球サブタイプ間で DNA の含有量はほとんど変わらないという事実から、この結果は WPC 専用試薬が主に DNA を染色することともよく一致していると考えられた。

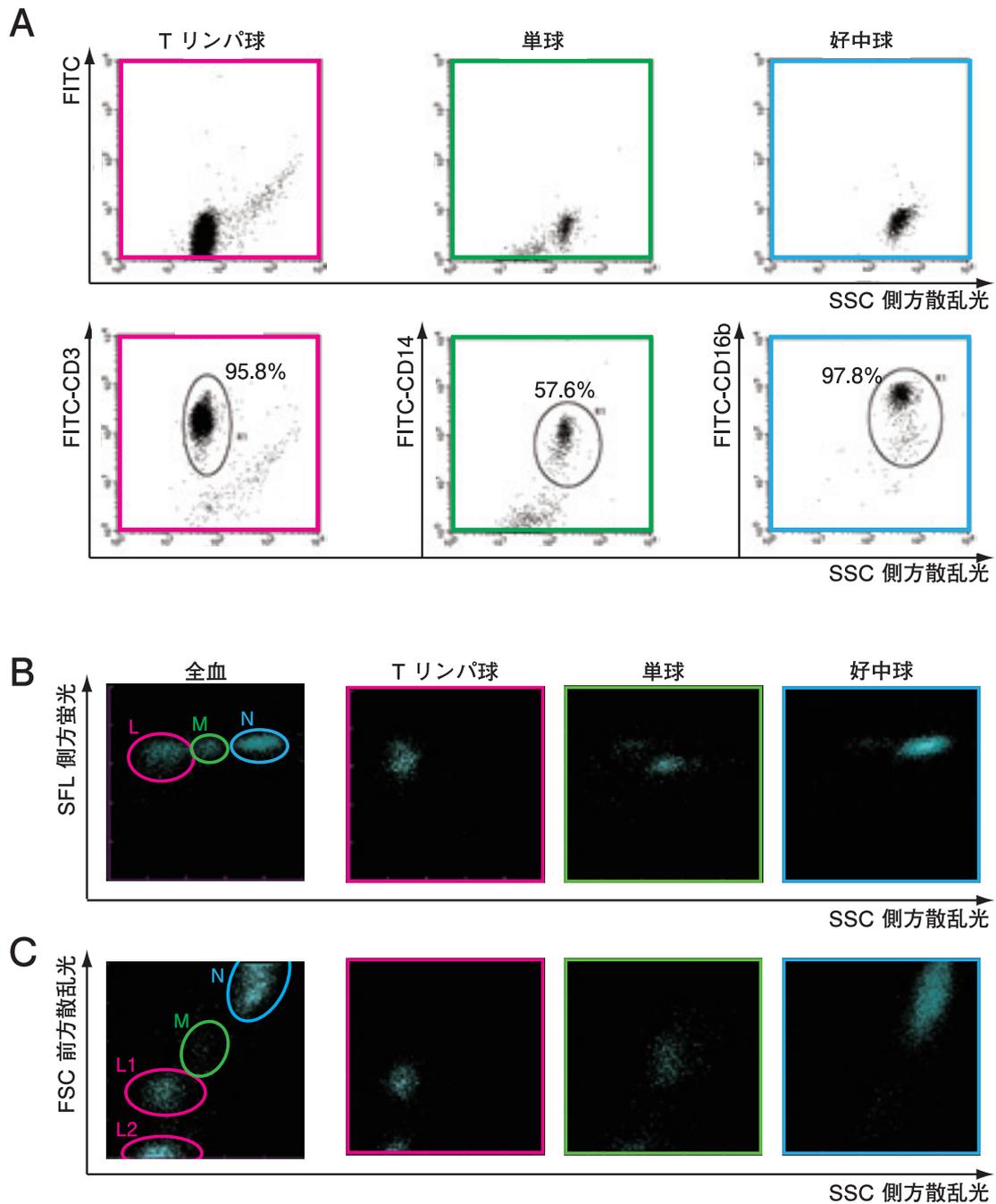


図2 健常者末梢血から分離した3種の主要な白血球サブタイプのWPCスキャッタグラム上での出現位置

- (A) 分離した各白血球サブタイプのFACSCaliburによる純度確認
 (上段) 分離した各白血球サブタイプにFITC標識陰性対照抗体を加え、FACSCaliburで解析した。(下段) 分離した各白血球サブタイプを、各白血球サブタイプに特異的なFITC標識抗体(Tリンパ球: 抗CD3抗体, 単球: 抗CD14抗体, 好中球: 抗CD16b抗体)を用いて染色し、FACSCaliburで解析して分離純度を確認した。
- (B) 全血および各白血球サブタイプ分画のWPCスキャッタグラム
 健常者末梢血の全血と、全血から分離した3種の白血球サブタイプのWPCスキャッタグラム。(左) 全血, (左中) Tリンパ球, (右中) 単球, (右) 好中球。
- (C) 全血および各白血球サブタイプ分画のWPC(SSC-FSC)スキャッタグラム
 健常者末梢血の全血と、全血から分離した3種の白血球サブタイプのWPC(SSC-FSC)スキャッタグラム。(左) 全血, (左中) Tリンパ球, (右中) 単球, (右) 好中球。

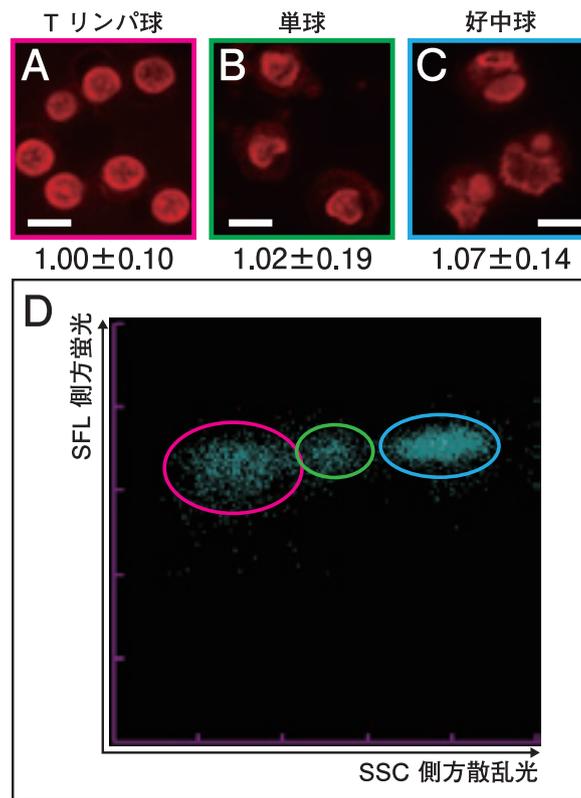


図3 WPC専用試薬にて染色した各白血球サブタイプの蛍光染色像と蛍光強度

(A-C)分離した各白血球サブタイプの、WPC専用試薬反応後の共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡像。(A)Tリンパ球,(B)単球,(C)好中球。パネル下の数字は、Tリンパ球の平均蛍光強度を1.00とした平均蛍光強度と標準偏差を表す。Bar =5 μ m。(D)健康者末梢血全血のWPCスキヤッタグラム。Tリンパ球、単球、好中球の出現位置に相当する部分をそれぞれマゼンタ、緑、青で示している。

3. 専用試薬反応後の各白血球サブタイプの形態

健康者ボランティアから採血した末梢血より分離した各白血球サブタイプの細胞を、WPC専用試薬と所定の時間反応させた後に固定し、超薄切片を作成し電子染色した後に、透過型電子顕微鏡で観察した(図4A-C)。その結果、Tリンパ球では、細胞質がほとんど流出して核が膨化し細胞全体が縮んだような細胞(図4A, \triangle)と、細胞質が比較的良好に残存し核が緊密な細胞(図4A, \blacktriangle)の二種類が見られた。また単球は、細胞質内の顆粒が残存し、全体にTリンパ球よりも複雑な内部構造を有していた(図4B)。好中球では、核の分葉が保たれ、また特徴的な顆粒も多数維持されており、3つのサブタイプの中ではもっとも複雑な内部構造を保持していた(図4C)。以上の透過型電子顕微鏡観察の結果は、図2で得られた結果から示唆された、試薬反応後の内部構造は、単純な方からTリンパ球<単

球<好中球の順に複雑であること、およびTリンパ球が大きさの違う2つの集団にわかれること、と一致していた。

さらに、同様にして固定した細胞をオスミウムでコートし、その表面構造を走査型電子顕微鏡で観察した(図4D-F)。その結果、細胞の大きさは小さい方からTリンパ球<単球<好中球の順であった。またTリンパ球は、表面の凹凸がなくなった小さな細胞(図4F, \triangle)と、表面の凹凸が比較的良好に保持されているやや大きな細胞(図4F, \blacktriangle)の2種類が見られた。これら走査型電子顕微鏡観察の結果は、図2で得られた結果から示唆された、試薬反応後の大きさは小さい方からTリンパ球<単球<好中球の順であること、およびTリンパ球が大きさの違う2つの集団にわかれること(図2, 図4G)、と一致しており、また透過型電子顕微鏡観察の結果(図4A-C)とも一致していた。

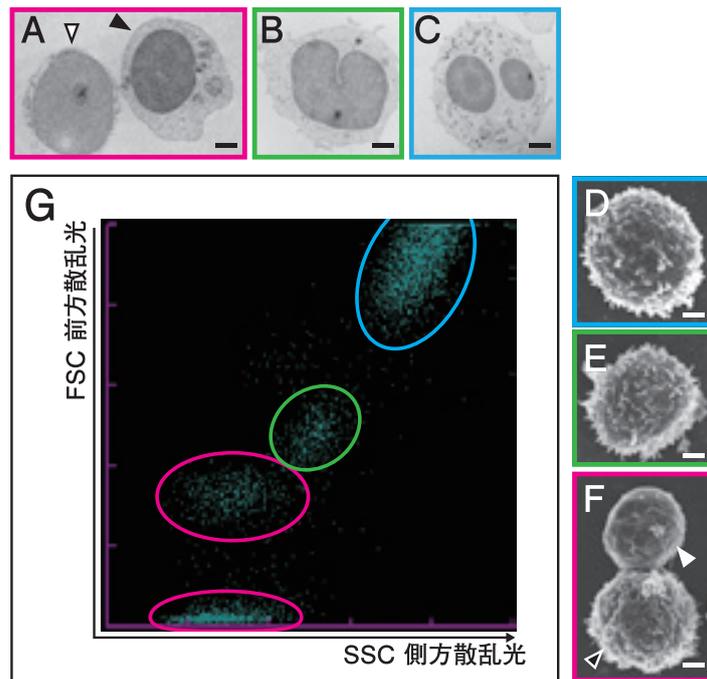


図4 WPC専用試薬にてした各白血球サブタイプの電子顕微鏡像

(A-C)分離した各白血球サブタイプの、WPC専用試薬反応後の透過型電子顕微鏡像。(A)Tリンパ球、(B)単球、(C)好中球。(D-F)分離した各白血球サブタイプの、WPC専用試薬反応後の走査型電子顕微鏡像。(D)好中球、(E)単球、(F)Tリンパ球。なお、A、Fにおいて、Tリンパ球の▲、△はそれぞれ、損傷の度合いの低いもの、高いものを示す。Bar=1 μm。(G)健常者末梢血全血のWPC(SSC-FSC)スキャットグラム。Tリンパ球、単球、好中球の出現位置に相当する部分をそれぞれマゼンタ、緑、青で示している。

以上の電子顕微鏡観察の結果より、単球・好中球はWPC試薬反応後も比較的良好に元の構造を残しているが、Tリンパ球は比較的良好に元の構造を残しているものと、細胞膜の喪失と核の膨化により細胞質のほとんどを失って縮小したものの、2種に大別されることが示唆された。

4. WPC専用試薬処理後のTリンパ球の形態が2種に分かれる理由

図4で示した通り、WPC専用試薬反応後のTリンパ球の形態は主に、表面の凹凸や内部構造が比較的良好に保持されているやや大きな細胞と、表面の凹凸がなくなり細胞質も失ったより小さな細胞の2種類となっていた。そこで最後に、試薬反応後のTリンパ球でこのような違いが生じる理由について、以下の通り検討した。

Tリンパ球特異抗原として知られるCD3抗原は、T細胞抗原受容体を含む大きな複合体の一部である⁹⁾。CD3抗原は一回膜貫通型タンパク質であり、細

胞内の構造とは強固に結合していないことから、細胞膜の脂質二重層が失われるとともに細胞から遊離することが知られている¹⁰⁾。

そこで、健常者ボランティアから採血した末梢血より分離したTリンパ球をFITC標識抗CD3抗体で染色した後、WPC専用試薬を反応させ、汎用フローサイトメーターを用いてSSCとFITC蛍光強度(図5D)、SSC-WPC蛍光強度(WPCスキャットグラムの再現、図5E)、SSC-FSC(WPC(SSC-FSC)スキャットグラムの再現、図5F)で展開し、CD3抗原を保持した細胞が、WPCスキャットグラムのどのクラスターと一致するかを検討した。

その結果、CD3の大半を喪失したTリンパ球(図5D, R1)はCD3を保持しているTリンパ球(図5D, R2)に比べて、WPC試薬によってやや強く染色され(図5E, 赤)、FSCの小さなクラスターを形成し(図5F, 赤)、SSCはやや小さかった(図5E, F)。前述した通り、CD3抗原の有無は細胞膜の喪失の度合いを反映することから、WPC(SSC-FSC)ス

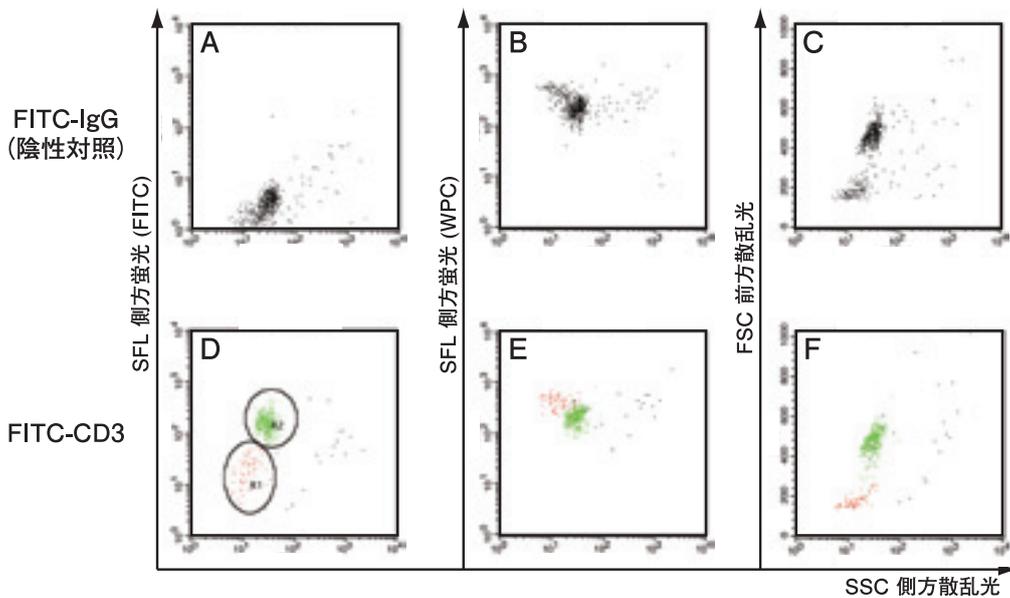


図5 健常者末梢血から分離したTリンパ球の解析

健常者末梢血から分離したTリンパ球をFITC標識陰性対照抗体(A-C)またはFITC標識抗CD3抗体(D-F)で染色し、さらにWPC専用試薬により二重染色した後、FACSCaliburで解析した。(A, D) FITC標識抗体による染色性の確認、(B, E) FACSCaliburによるWPCスキュッタグラムの再現、(C, F) WPC (SSC-FSC)スキュッタグラムの再現。Dのスキュッタグラム上でFITC蛍光強度が低いクラスター(R1)を赤に、FITC蛍光強度が高いクラスター(R2)を緑に着色し、E, Fにも同色で示している。

スキュッタグラム上のTリンパ球の2つのクラスターのうち、FSCの大きなクラスターは細胞膜の喪失が少なく元の形態を比較的良好に保った細胞の集団であり、FSCの小さなクラスターは細胞膜の多くを喪失し縮小した細胞の集団である可能性が強く示唆された。

結論

今回我々は、正常白血球の代表的な3種のサブタイプを用いて、WPCスキュッタグラム上の出現位置とその位置に出現する原理について検討した。その結果、以下のことが明らかになった。

- ・ XNシリーズ WPC スキュッタグラムにおける正常白血球の出現位置を、健常者ボランティアから採血した末梢血より分離したTリンパ球・単球・好中球を用いて確認できた。
- ・ WPC スキュッタグラム上には、正常白血球由来の3つのクラスターが出現する。今回の結果から、これらは側方散乱光強度の小さなクラスターから順に、Tリンパ球・単球・好中球の順であった。

- ・ これらの白血球サブタイプ間では、WPC専用試薬による染色性の差はあまりなかった。これは、各サブタイプ間でのDNA含量に大きな差がないこと、WPC専用試薬が主に核を染色していることと一致していた。
- ・ WPC (SSC-FSC) スキュッタグラム上には、正常白血球由来の4つのクラスターが出現する。今回の結果から、側方散乱光強度の小さな2つのクラスターはTリンパ球であり、残りの2つは側方散乱光強度の小さな方から単球・好中球の順であった。
- ・ WPC (SSC-FSC) スキュッタグラム上でTリンパ球クラスターは、前方散乱光強度の大きいクラスターと、前方散乱光強度の小さいものの2つに別れた。前方散乱光強度の大きいクラスターは、細胞膜と細胞質をより保持している細胞の集団であり、前方散乱光強度の小さいクラスターは、細胞膜と細胞質を喪失し核が膨化して全体が縮小した細胞の集団であった。

以上の結果から、WPCスキュッタグラム上の3つのクラスターは左からTリンパ球・単球・好中球の

順であり、また WPC (SSC-FSC) スキャッタグラムでは T リンパ球は細胞膜の損傷の度合いに応じて上下 2 つのクラスターとして出現することが示された。今後は、異常検体やそのモデルとなるような細胞を用いて、異常白血球が WPC スキャッタグラムで検出できる原理についても検討していきたい。

参考文献

- 1) 松下弘道 他. 宮地勇人 監修. XN-Series 多項目自動血球分析装置 Clinical case report Vol.1. 神戸: シスメックス株式会社 学術本部; 2011. 79p.
- 2) 越智康浩 他. 多項目自動血球分析装置 XN-Series の概要. Sysmex J. 2011; 34, Suppl. 2: 31-46
- 3) 阿部智行 他. 多項目自動血球分析装置 XN-Series の基礎的検討と臨床参考範囲の検討. Sysmex J. 2011; 12, Suppl.2: 72-81
- 4) 松下弘道 他. 宮地勇人 監修. XN-Series 多項目自動血球分析装置 Clinical case report Vol.2. 神戸: シスメックス株式会社 学術本部; 2012. 69p.
- 5) 日本サイトメトリー技術者認定協議会編. スタンダードフローサイトメトリー. 東京: 医歯薬出版; 2009. 152p.
- 6) 中内啓光 監修. 細胞工学別冊 新版フローサイトメトリー自由自在 マルチカラー解析からクローンソーティングまで. 東京: 学研メディカル秀潤社; 2004. 192p.
- 7) 河野麻理 他. CD 抗体を用いたシスメックス自動血液分析装置の白血球分類スキャッタグラムにおける各白血球出現エリアの検証. Sysmex J. 2010; 33, No.2 35-42
- 8) Dainiak MB, Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B. Methods in Cell Separation; Adv Biochem Eng Biotechnol. 2007; 106: 1-18
- 9) 日本バイオセラピー学会編集. CD 分類ハンドブック 細胞の分化抗原 (抗体) に関する国際分類 改訂第 4 版. 東京: 癌と化学療法社; 2004. 586p.
- 10) Exley M, Wileman T, Mueller B, Terhorst C. Evidence for multivalent structure of T-cell antigen receptor complex. Mol Immunol. 1995; 32 (11): 829-39

The appearance positions of normal leukocytes in the scattergram of the newly developed abnormal cell-detection channel of XN-Series multiparameter automated hematology analyzers

Sawako KAWAUCHI, Mari KONO, Yuri TAKAGI, Atsushi WADA and Takashi MORIKAWA

Scientific Research Division, Scientific Affairs, Sysmex Corporation, Kobe, Japan. 1-3-2 Murotani, Nishi-ku, Kobe 651-2241

SUMMARY

The newly launched XN-Series multiparameter automated hematology analyzers carry a new channel named WPC channel, which detects blasts and abnormal cells of the lymphocyte series. In WPC channel, dedicated WPC reagents for the WPC channel penetrate the cell membranes of leukocytes and stain the intranuclear DNA. Then the strength of forward scattered light (FSC), side scattered light (SSC) and side fluorescent light (SFL) of the cells are measured and expressed as two 2D scattergrams, the WPC scattergram and the WPC (SSC-FSC) scattergram.

In this study, we examined where in the WPC scattergram each of the three major subtypes of leukocytes (T-lymphocytes, monocytes, and neutrophils) which were separated from healthy volunteers were located. In addition, we also studied the reasons why they were located there. We confirmed T-lymphocytes, monocytes or neutrophils from healthy volunteers were located in the left, middle, or right cluster in the WPC scattergram. Moreover, T-lymphocytes were separated in two clusters in the WPC (SSC-FSC) scattergram, and the intensities of FSC was followed by T-lymphocytes < monocytes < neutrophils, from the lowest. Analysis with the confocal laser scanning fluorescent microscopy showed that the staining intensity of the three leukocyte subtypes after reacted with the WPC reagents were in the same level. Transmission electron microscopy observation revealed that the intracellular complexity of each subtype after treatment with the WPC reagents was the order of lymphocytes, monocytes and neutrophils from the simplest, and the order was agreed with the order of intensities of SSC. Additionally, intracellular structure of T-lymphocytes showed two types: some cells had bulging nuclei and little cytoplasm, and the others retained most of their cytoplasm with organelles and had well-packed nuclei. Scanning electron microscopy demonstrated that the cell size after treatment with the reagents was the order of T-lymphocytes < monocytes < neutrophils, from the smallest. Surface morphology of T-lymphocytes also showed two types: some cells were much smaller than control and had abnormally smooth surfaces, and the others had the size and surface-structures equivalent to control. Finally, by using general-purpose flow cytometer, we investigated the reasons why the morphology of T-lymphocytes showed two kinds, and found that the most of the smaller ones lost their surface antigen. This result suggested that T-lymphocytes with much damage in cell membrane showed much smaller morphology.

These results indicated that the three major leukocyte subtypes that form three major clusters in the WPC scattergram were the order of T-lymphocytes, monocytes and neutrophils, from the left. The results also showed that T-lymphocytes appeared two clusters in the WPC (SSC-FSC) scattergram according to the level of their damage in cell membrane.

Key Words Multiparameter Automated Hematology Analyzer, XN-Series, WPC Channel, Scattergram