

多項目自動血球分析装置 XN シリーズ WDF チャンネルにおける白血球出現位置の検証

河内 佐和子, 高木 由里, 河野 麻理, 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：兵庫県神戸市西区室谷 1-3-2 (〒651-2241)

要 旨

WDF チャンネルは、多項目自動血球分析装置 XN シリーズ（以下、XN シリーズ；シスメックス社）の新しく開発された白血球分類チャンネルである。WDF チャンネルでは、従来の多項目自動分析装置 XE シリーズ（以下、XE シリーズ；シスメックス社）の DIFF チャンネルと同様に、界面活性剤と蛍光色素を含む専用試薬で処理した血球細胞の側方散乱光と側方蛍光の強度情報を、フローサイトメトリーの原理により取得し、その強度の差から各白血球を分類・計数している。XN シリーズの WDF チャンネルは試薬・ハードウェア・ソフトウェアの改良により、XE シリーズの DIFF チャンネルに比べてリンパ球と単球の分画能が向上している。今回我々は、各白血球がこれらのチャンネルで識別される理由を電子顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡を用いて形態学的に検証した。さらに、WDF チャンネルでリンパ球と単球の分画能が向上した理由を、両専用試薬の白血球への作用の違いから検討した。

まず始めに、健常者末梢血を用い、WDF スキャッタグラム上では XE シリーズの DIFF スキャッタグラムに比べ、単球とリンパ球のクラスターの分画能が向上していることを確認した。次に、同じ健常者末梢血より T リンパ球・B リンパ球・単球・好中球・好酸球を分離し、これらを汎用フローサイトメーターおよび XN シリーズにて測定して、各血球の WDF スキャッタグラム上での出現位置を確認した。さらに、両シリーズの測定（反応）条件と同じ条件下で、WDF 専用試薬または DIFF 専用試薬で細胞を処理した後、共焦点レーザー顕微鏡にて染色強度を、透過型電子顕微鏡にて内部構造を、走査型電子顕微鏡にて表面構造を観察し、3D 測定レーザー顕微鏡にて細胞の大きさを解析した。

分離した各白血球は、WDF スキャッタグラム上で全血の場合と同じ位置に出現した。共焦点レーザー顕微鏡像の WDF 専用試薬による染色強度は高い順に、単球＞T リンパ球＞B リンパ球＞好中球＞好酸球であり、WDF スキャッタグラムの側方蛍光強度を反映していた。また、透過型電子顕微鏡像における両専用試薬処理後の細胞内部構造の残存度合いは大きい順から、好酸球＞好中球＞単球＞リンパ球であり、両スキャッタグラムの側方散乱光強度を反映していた。また 3D 測定レーザー顕微鏡で観察した両試薬処理後の各白血球の大きさは、小さい順にリンパ球、単球、好中球、好酸球となり、WDF サブスキャッタグラム（SSC-FSC）の前方散乱光強度の順序を反映していた。このことから、細胞内小器官の量や、細胞膜の界面活性剤への耐性が各白血球で異なるために、試薬反応後の蛍光強度、細胞形態の複雑さ、細胞の大きさに各白血球の違いが生じ、それぞれのクラスターを作り弁別されることがわかった。加えて、電子顕微鏡像の観察から、それぞれの専用試薬の白血球への作用の違いが確認され、WDF スキャッタグラムでは DIFF スキャッタグラムに比べてリンパ球と単球の分画能が向上したことが明らかになった。

キーワード XN シリーズ, WDF チャンネル, 分画能, 血球形態

はじめに

生体防御に重要な役割を持つ白血球は、健常人の血液 1 μ L につき 4,000 ~ 9,000 細胞含まれる。臨床

検査の現場では、CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) の推奨法 (H20-A2) などにより、メイギムザ染色した血液塗抹標本を用いて、多核球系の好中球、好酸球、好塩基球と、単核球系の単球、リンパ

球の5つに分類されている¹⁾。多核球系の細胞は核/細胞質比が小さく、分葉した核を持つ。急性炎症で最初に動員される好中球は、健常人末梢血の白血球の50～70%を占め、多種多様な顆粒を有する。慢性アレルギーや寄生虫感染症で増加する好酸球は、白血球の2～5%を占め、好中球よりやや大きめで、核はほぼ同じ大きさの腎臓様に膨らんだものが2つあることが多く、特徴的で大きな顆粒を有する。アレルギー反応などに関与する好塩基球は1%以下であり、好中球よりやや小さめで、大型の顆粒を有す。一方、単核球系の単球は、白血球の3～6%を占め、異物を貪食し、大部分は組織固有のマクロファージに分化し、切れ込みの入った核を持つものが多い。免疫機能の中心を担うリンパ球は、白血球の20～40%を占め、核/細胞質比が大きく、主にTリンパ球・Bリンパ球・NK細胞の各サブタイプに大別されるが、これらサブタイプを形態学的に識別することは非常に困難で、表面抗原による検討が必要になる²⁾。一方、白血球は、細胞表面抗原に対する抗体(CD抗体)を用いてフローサイトメーターにて分類できる。CLSIで検討されている表面抗原を用いた白血球分類の標準プロトコルでは、Tリンパ球はCD3陽性、Bリンパ球はCD19陽性、単球はCD14陽性、好中球はCD16b陽性、好酸球はCD123陰性かつCD294陽性の細胞として記述されている³⁾。しかしCD抗体による分類法は、抗体が高価なこと、フローサイトメーターの操作が煩雑なことなどの理由から、日常検査で広く用いられてはいない。

現在の臨床検査では、自動血球分析装置による、より安価で迅速な白血球分類がスクリーニングとして用いられている。自動血球分析装置にはフローサイトメトリー法が採用されており、専用試薬との組み合わせにより白血球を分類している⁴⁾。シスメックス株式会社では、1999年に多項目自動血球分析装置XEシリーズ(以下、XEシリーズ;シスメックス社)を発売し、2011年には多項目自動血球分析装置XNシリーズ(以下、XNシリーズ;シスメックス社)を発売した。両装置の白血球分類チャンネル(XEシリーズのDIFFチャンネル、XNシリーズのWDFチャンネル)では、専用試薬によって赤血球の溶血と、白血球細胞膜への小孔形成、細胞

の蛍光染色を行った後、波長633nmのレーザー光による側方散乱光(SSC)・側方蛍光(SFL)の強度を測定し、2次元スキッタグラムに展開する⁵⁻⁸⁾。なお、XNシリーズでは、前方散乱光(FSC)情報も測定することで、SSC-FSCスキッタグラムを追加している。WDFチャンネルはDIFFチャンネルと比較して、リンパ球と単球の分画能が向上したとされているが、形態学的データに基づく検証はこれまで報告されていないかった。

今回我々は、WDFチャンネルにおける白血球分類の原理について、正常白血球細胞を使用した形態学的な検討を行った。特に、WDFスキッタグラムにおいて、DIFFスキッタグラムに比べてリンパ球と単球のSSC強度の相違が大きくなり分画能が向上した理由を、WDFチャンネル専用試薬の各白血球に対する作用の違いから検討したので、以下に報告する。

材料と方法

1. 対象

15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) 磁気細胞分離法による各血球細胞の陰性分離

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、メーカーの使用説明書に基づいて単核球層からTリンパ球、Bリンパ球、単球を、顆粒球層から好中球、好酸球を、それぞれ目的の血球以外の血球に対する抗体と磁気ビーズを用いて除くことで陰性分離した(StemCell Technologies社、順にST-19051、ST-19054、ST-19059、ST-19257、ST-19256)^{9,10)}。分離後、1% Albumin from bovine serum further purified Fraction V

(シグマ製; A3294-100G) 含有 PBS にて, 37℃, 1 時間加温し, 各白血球の形態の回復を行った。

3. 各白血球の分離純度の確認

分離した T リンパ球, B リンパ球, 単球, 好中球を, 各々 FITC で標識した抗 CD3 (T リンパ球の表面マーカー, ベックマンコールター社製, A07746), 抗 CD19 (B リンパ球の表面マーカー, ベックマンコールター社製; A07768), 抗 CD14 (単球の表面マーカー, ダコ社製; F0844), 抗 CD16b (好中球の表面マーカー, ベックマンコールター社製; IM2353U) のモノクローナル抗体で, また好酸球を FITC で標識した抗 CD123 (Miltenybiotec 社製; 130-090-897) および PE で標識した抗 CD294 (Miltenybiotec 社製; 120-001-698) のモノクローナル抗体 (20 mg/L in PBS) で, 4℃ で 20 分間反応させた。FITC で標識したマウス IgG₁ (ベックマンコールター社製; A07795) または, PE で標識したラット IgG2a (BD バイオサイエンス社製; 553930) 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. XE シリーズおよび 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 XE-2100 (以下, XE-2100; シスメックス社) および多項目自動血球分析装置 XN-2000 (以下, XN-2000; シスメックス社) にて測定し, 各スキャットグラム上の出現位置を確認した。

5. それぞれの専用試薬による反応

各白血球を XE-2100 または XN-2000 と同じ測定条件下 (希釈倍率及び反応時間) で, XE-2100 の DIFF 専用試薬 (ストマトライザー® 4DL とストマトライザー® 4DS) または XN-2000 の WDF 専用試薬 (ライザセル™ WDF とフルオロセル™ WDF) 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

染色した各白血球をポリ-L-リジン (シグマアルドリッチ社製; 513-74891) 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; オリパス社,

CSU-X1; 横河電機社, ImagEM; 浜松ホトニクス社) で観察して, WDF 専用試薬による細胞の染色部位を確認した。また共焦点顕微鏡の画像から, 各白血球 (N > 80) の蛍光強度を AQUACOSMOS (浜松ホトニクス社) にて測定し, その平均値と誤差範囲を算出した。

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% 四酸化オスミウムで 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 (和光純薬工業株式会社製; 94260) と鉛染色液 (ナカライテスク社製; 99723-64) 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ズ社) 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% 四酸化オスミウム (日新 EM; 3022-1) 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 (和光純薬工業株式会社製; 028-03386) に置換した。凍結乾燥装置 (ES-2030; 日立ハイテクノロジーズ社) にて乾燥し, オスミウムコーター (Neoc-AN; メイワフォーシス社) にて細胞表面をオスミウムでコートし, 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. 3D 測定レーザー顕微鏡による観察

前述の 7. 3) にて作成した走査型電子顕微鏡用のサンプルを用いて, 各白血球サブタイプを少なくとも

も各細胞を 100 個以上、3D 測定レーザー顕微鏡 (LEXT-OLS4000; オリンパス社) にて撮影し、その画像をもとに付属のアプリケーションにて各細胞の断面積を少なくとも 100 個以上計測し、最大値・中央値・最小値・50 % のデータが入る区間を求め算出して、グラフで表示した。

結果

各白血球分類スキヤッタグラム上における各白血球の出現位置

健常者ボランティアから採血した末梢血より、磁気細胞分離法による陰性分離によって、Tリンパ球、Bリンパ球、単球、好中球、好酸球を分離し、分離した各白血球の純度を汎用フローサイトメーターで確認した(図1)。Tリンパ球分離キットで分離した血球のうち95.8%がCD3陽性、Bリンパ球分離キットで分離した血球のうち88.4%がCD19陽性、単球分離キットで分離した血球のうち57.6%がCD14陽性、好中球分離キットで分離した血球のうち97.8%がCD16陽性、好酸球分離キットで分離した血球のうち87.4%がCD294陽性かつCD123陰性であった。

次に、分離した各白血球画分をXE-2100およびXN-2000で測定し、XE-2100のDIFFスキヤッタグラム(図2A)、XN-2000のWDFスキヤッタグラム(図2B)、XN-2000のWDF(SSC-FSC)スキヤッタグラム(図2C)上での出現位置を確認し、全血での各白血球の出現位置と比較した。DIFFスキヤッタグラム、WDFスキヤッタグラム、WDF(SSC-FSC)スキヤッタグラムにおいて分離したTリンパ球とBリンパ球はリンパ球の位置に、単球は単球の位置に、好中球は好中球の位置に、好酸球は好酸球の位置に出現した。さらに全血を測定した各スキヤッタグラムから、DIFFスキヤッタグラムと比べてWDFスキヤッタグラムでは、リンパ球と単球のクラスターのSSC強度の差がより大きく、両細胞集団が離れたことが確認できた(図2全血)。

WDF専用試薬反応後の各白血球の蛍光強度

健常者ボランティアから採血した末梢血より、磁気細胞分離法によって陰性分離した各白血球画分を、WDF専用試薬と反応させた後、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて撮影した(図3)。この結果から、WDF専用試薬は主に細胞質の構造を染色してい

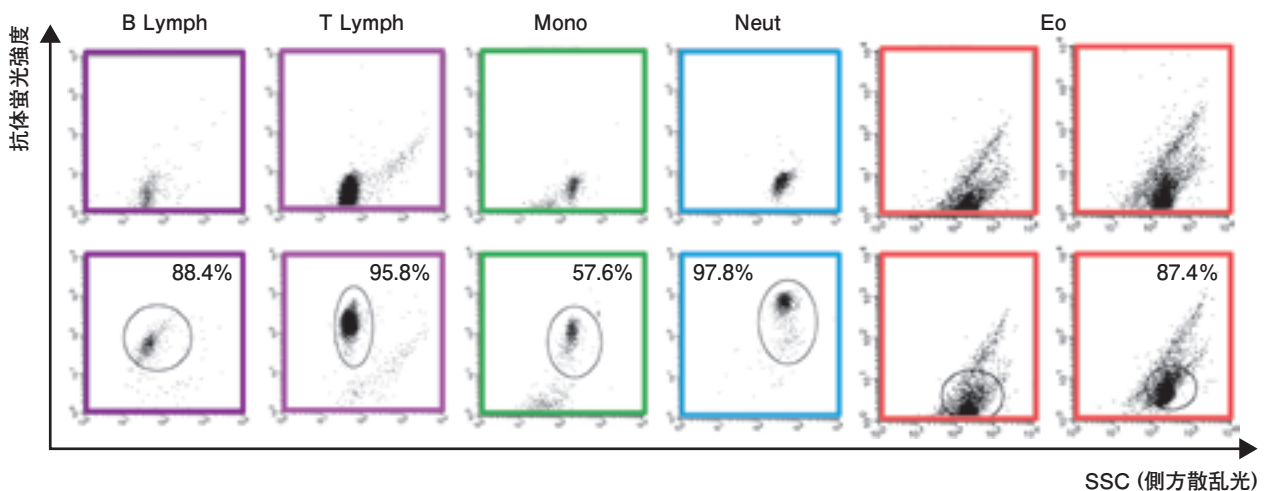


図1. 健常者末梢血から分離した各白血球の分離純度

分離した各白血球のFACSCaliburによる純度確認

横軸はSSC強度、縦軸は各血球の特異抗体による染色強度を表した。

(上段)分離した各白血球をFITCあるいはPE標識の陰性対照抗体で染色し、FACSCaliburで解析した。

(下段)分離した各白血球を、FITCあるいはPEで標識した抗体(Tリンパ球:抗CD3抗体、Bリンパ球:抗CD19抗体、

単球:抗CD14抗体、好中球:抗CD16b抗体、好酸球:抗CD123及び抗CD294抗体)で染色し、FACSCaliburにて解析を行った。左から順に、Bリンパ球、Tリンパ球、単球、好中球、好酸球

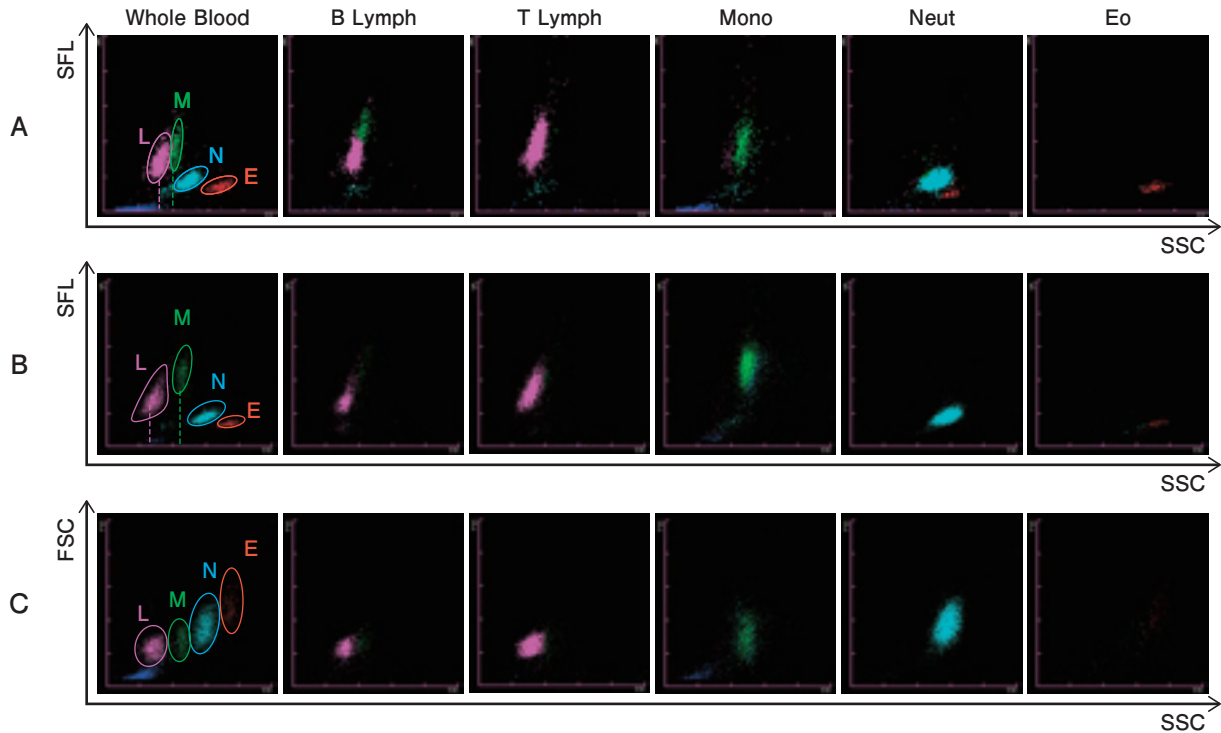


図2. 多項目自動血球分析装置の白血球分類スキャッタグラムにおける健常者末梢血から分離した各白血球の出現位置
 健常者末梢血の全血と、全血から分離した各白血球の XE-2100 および XN-2000 における分類スキャッタグラム。
 (A) XE-2100 DIFF スキャッタグラム。縦軸が側方蛍光 SFL，横軸が側方散乱光 SSC。
 (B) XN-2000 WDF スキャッタグラム。縦軸が側方蛍光 SFL，横軸が側方散乱光 SSC。
 (C) XN-2000 WDF (SSC-FSC) スキャッタグラム。縦軸が前方散乱光 FSC，横軸が側方散乱光 SSC
 左から順に、全血，Bリンパ球，Tリンパ球，単球，好中球，好酸球
 L：リンパ球，M：単球，N：好中球，E：好酸球。

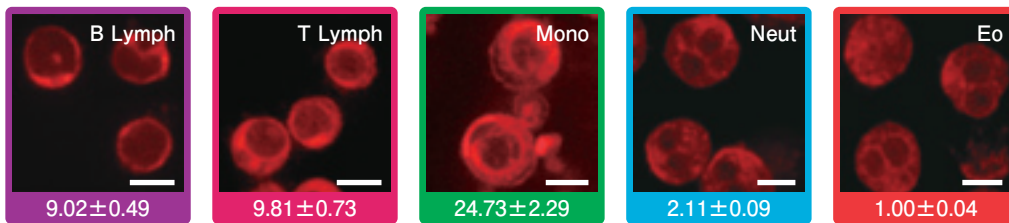


図3. WDF 専用試薬にて染色した各白血球の蛍光染色像

分離した各白血球を WDF 専用試薬にて反応させた後の共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡像。パネル下の数字は、好酸球の平均蛍光強度を 1.00 とした平均蛍光強度と標準誤差を表す。
 左から順に、Bリンパ球，Tリンパ球，単球，好中球，好酸球
 Bar = 5 μm.

ることが確認できた。次に、得られた画像から、細胞 1 つあたりの平均蛍光強度を算出し、好酸球の平均蛍光強度を 1.00 とした各白血球の蛍光強度の平均と標準偏差を求めたところ、Bリンパ球 9.02 ± 0.49 ，Tリンパ球 9.81 ± 0.73 ，単球 24.73 ± 2.29 ，好中球 2.11 ± 0.09 ，好酸球 1.00 ± 0.04 となった。

各専用試薬反応後の各白血球の形態変化

健常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を、DIFF 専用試薬又は WDF 専用試薬と、装置内と同じ条件で反応させた後に、透過型電子顕微鏡で観察した(図4)。どちらの試薬による反応でも、細胞膜に最も損傷を受けるのは Bリンパ球で、次に Tリンパ球，単球，好中球，好酸球の順と

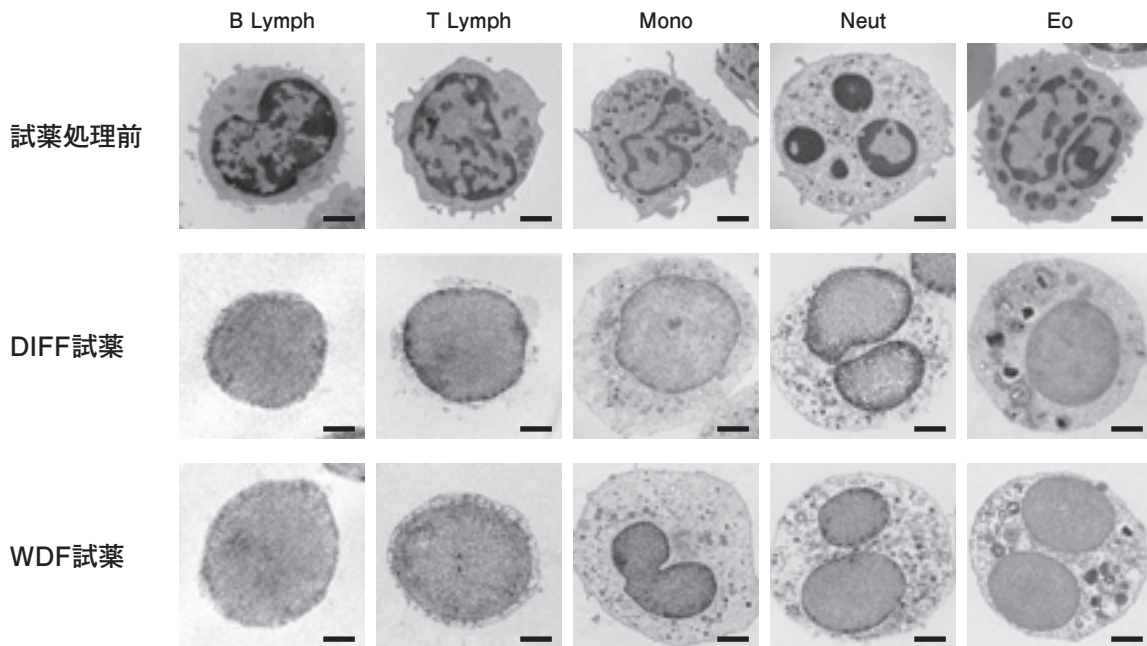


図4. 専用試薬にて処理した各白血球の透過型電子顕微鏡像
 (上段) 各白血球の、専用試薬反応前の透過型電子顕微鏡像。
 (中段) 各白血球の、DIFF 試薬反応後の透過型電子顕微鏡像。
 (下段) 各白血球の、WDF 試薬反応後の透過型電子顕微鏡像。
 左から順に、B リンパ球、T リンパ球、単球、好中球、好酸球
 Bar = 1 μ m.

なった。また、全体に DIFF 試薬に比べ、WDF 試薬は細胞膜に与える影響が弱い傾向が見られた。リンパ球は両試薬により細胞膜が強く損傷され細胞質がほとんど流出した。細胞膜の損傷は WDF 試薬の方が DIFF 試薬に比較して小さいが、リンパ球では元々細胞内小器官が少ないため、どちらの試薬による反応でも、2 種類のリンパ球の間で内部構造の複雑さの度合いにほとんど差は生じなかった。(図4 Bリンパ球、T リンパ球)。一方、単球はリンパ球より細胞内小器官が多いため、両試薬による損傷の違いが内部構造の残存度合いに反映されやすく、WDF 試薬処理された単球は DIFF 試薬のそれに比べ、内部構造を多く残存していた。(図4 単球)。また好中球でも、単球と同様に DIFF 試薬の方が WDF 試薬に比べ、細胞への影響が強く、細胞膜の損傷と細胞質内の流出が強かった(図4 好中球)。一方、好酸球は DIFF 試薬の方が WDF 試薬に比べて細胞内の構造を保持していたが、特徴的で大きな顆粒はいずれの試薬処理後

でも確認できた(図4 好酸球)。

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、その大きさや表面構造を走査型電子顕微鏡で観察した(図5)。細胞の大きさは小さい方からリンパ球、単球、好中球、好酸球の順になる傾向が見られた。走査型電子顕微鏡の結果からも、全体に DIFF 試薬処理された細胞の方が、WDF 試薬に比べて細胞膜への損傷が激しく、一細胞あたりの穿孔の数や、典型的な穿孔の径が大きいことが確認できた。

WDF 専用試薬反応後の各白血球サブタイプの断面積

上述の走査型電子顕微鏡の試料について、3D 測定レーザー顕微鏡で断面積を測定した。各白血球サブタイプの断面積は小さい順から、リンパ球、単球、好中球、好酸球の順であった(図6)。以上の結果から、WDF 専用試薬による反応により、各白血球の大きさは好酸球>好中球>好中球>単球>リンパ球の順になることが確認できた。

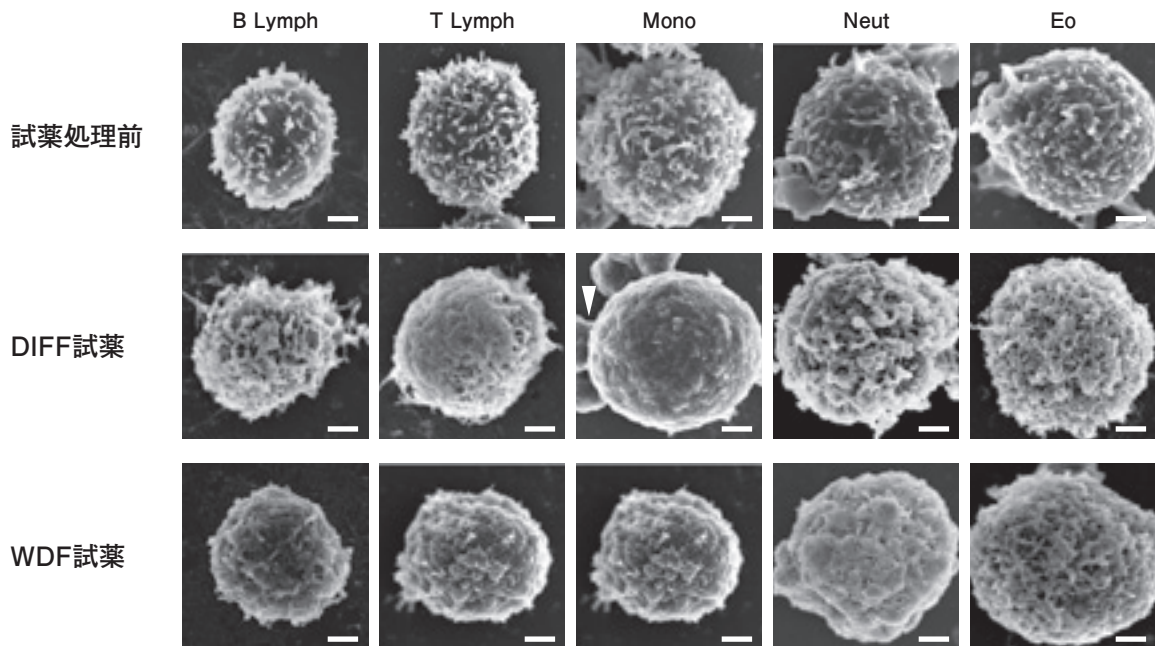


図5. 専用試薬にて処理した各白血球の走査型電子顕微鏡像
 (上段)分離した各白血球の, 専用試薬反応前の走査型電子顕微鏡像.
 (中段)分離した各白血球の, DIFF 試薬反応後の走査型電子顕微鏡像.
 (下段)分離した各白血球の, WDF 試薬反応後の走査型電子顕微鏡像.
 左から順に, Bリンパ球, Tリンパ球, 単球 (▼が血小板), 好中球, 好酸球
 Bar = 1 μ m.

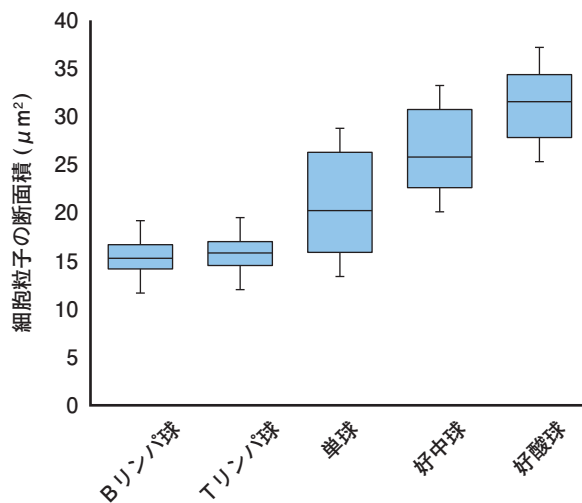


図6. WDF 試薬にて処理した各白血球の断面積

WDF 専用試薬にて反応させた SEM 試料用の各白血球の断面積を, 3D レーザー顕微鏡にて計測した. 縦軸に各白血球サブタイプの断面積 (μm^2) を示した. 各白血球は, 少なくとも 100 個以上測定した. パーの上下先端が最大値と最小値, 箱が 50% のデータが出現した範囲, 箱の中の横線が中央値を示す.
 左から順に B リンパ球, T リンパ球, 単球, 好中球, 好酸球

考 察

今回我々は、WDF チャンネルにおける白血球分類の原理について、DIFF チャンネルとの比較を行いつつ、各白血球がスキヤッタグラム上のそれぞれ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を行った。まず、健康者末梢血から分離した各白血球は、汎用フローサイトメーターにてそれぞれの分離純度を確認し、単球を除いて分離純度は 85 % 以上となった (図 1)。単球の分離純度が低くなった原因は、一部の単球に血小板が付着していたことが原因と推察された (図 3, 図 5 単球の像)。XE-2100, XN-2000 とも、全血を測定した場合には、正しく分画された。分離した各白血球は、WDF スキヤッタグラムでは正確に分画したのに対し、DIFF スキヤッタグラムでは、一部が他の血球として認識されていた。以上の結果より、分離した白血球においては、XN-2000 の方が XE-2100 に比べて各白血球の分画能が向上したことが確認できた。また、B リンパ球と T リンパ球はスキヤッタグラムにおいて若干異なる分布で出現することが確認された。リンパ球サブタイプ分類は特異的 CD 抗体を用いたフローサイトメーターによる解析を必要とするが、自動血球分析装置によってリンパ球サブタイプの比率異常を見出せる可能性が考えられた¹⁰⁾。

また、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて得られた結果から、WDF 試薬は主に、細胞質成分を染色していた。これは WDF 試薬に含まれるポリメチン系色素が細胞質に含まれる核酸物質を染色していることが考えられる。蛍光強度は単球、リンパ球、好中球、好酸球の順に高く、これは WDF (FSC-SSC) スキヤッタグラムの SFL (側方蛍光強度) と一致した (図 3)。次に各試薬反応後の透過型電子顕微鏡像の細胞内部構造の複雑さは単純な方から順に、リンパ球、単球、好中球、好酸球であり、これは WDF スキヤッタグラムおよび WDF (FSC-SSC) スキヤッタグラムの

SSC 強度の順と一致していた (図 4)。さらに走査型電子顕微鏡観察、3D レーザー顕微鏡測定により、細胞の断面積は小さい順、すなわち細胞が小さい順にリンパ球、単球、好中球、好酸球となることが分かった (図 5, 6)。これは、WDF (FSC-SSC) スキヤッタグラムの FSC 強度の順と一致した。細胞内小器官の量や、細胞膜の界面活性剤への耐性が各白血球で異なるため、試薬反応後の蛍光強度、細胞形態の複雑さ、細胞の大きさが各白血球により異なり、それぞれのクラスターに弁別されると考えられた¹⁰⁾。

WDF スキヤッタグラムでは、DIFF スキヤッタグラムに比べてリンパ球と単球の SSC 強度の相違が大きくなり分画能が向上しているが、その理由について形態学的に検討した。透過型電子顕微鏡像からは、WDF 試薬より DIFF 試薬の方が細胞の内部構造に与える影響が大きいことが確認された (図 4)。走査型電子顕微鏡像からも、DIFF 試薬の方が WDF 試薬に比較して細胞膜への影響が強いことが確認できた (図 5)。リンパ球は核/細胞質比が大きく細胞小器官が少ないため、各試薬による細胞膜の損傷の度合いに差があっても、細胞内構造の複雑さに大きな変化はなかったが (図 4, 5, リンパ球)、単球は核/細胞質比が小さく、リンパ球よりも細胞小器官を多く有するため、細胞膜の損傷の度合いに応じて細胞小器官が流出し、細胞内構造の複雑さが減少していた (図 4, 5, 単球)。すなわち、WDF 試薬は DIFF 試薬に比べ細胞膜を損傷せず、単球内部の構造をより残存させ、リンパ球と単球の側方散乱光強度の差がより大きくなるため、WDF スキヤッタグラム上でリンパ球と単球のクラスターが離れたと考えられた。

本検討により、健康人ボランティア由来の正常白血球細胞は、WDF スキヤッタグラム上の SFL, SSC, FSC の各光軸強度と各種顕微鏡より得られた蛍光像、電子顕微鏡像、粒子解析結果と一致した。また WDF スキヤッタグラムにおいて DIFF スキヤッタグラムに比べてリンパ球と単球の SSC 強度の相違が大きくなり分画能が向上した理由が明らかになった。

参考文献

- 1) NCCLS. Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods. Approved standard. NCCLS document. H20-A
- 2) 奈良信雄 他. 臨床検査学講座第3版 血液検査学. 医歯薬出版株式会社 2010; p.17-43
- 3) Kishimoto T ed. Leukocyte typing VI : White cell differentiation antigens. Leukocyte Typing; 1997; VI : 1376
- 4) 巽典之. 計測技術ティーチングー自動血球分析装置の基本原則. 血液検査学研究会 株式会社宇宙同八木書店. 2006 : 3-54
- 5) 松本英彬. XE-2100 の試薬技術についてー特に赤色蛍光反応についてー. Sysmex J. 1999; 22, No.2 : 262-269
- 6) 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.
- 7) 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
- 8) 藤本敬二. 当社の血球計数装置の測定原理の概要. Sysmex J. 1999 ; 22, No.1 : 43-60
- 9) 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 35-4.
- 10) Dainiak MB, Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B. Methods in Cell Separation ; Adv Biochem Eng Biotechnol. 2007 ; 106 : 1-18
- 11) M Kono, Y Takagi. Non-activated T and B lymphocytes become morphologically distinguishable after detergent treatment. Cytometry A 2013 ; Vol.83A : 396-402
- 12) Anderson RE, Standefer JC, Scaletti JV. The phospholipid and glycoprotein composition of T and B cells. Lab Invest 1977 ; 37 : 329-338.

Comparison of the Leukocyte differentiation Scattergrams Between the XN-Series and the XE-Series of Hematology Analyzers

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

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

SUMMARY

The newly launched XN-Series multiparameter, automated, hematology analyzer features a new channel named the WDF channel. Like the DIFF channel of the XE-Series, this channel can differentiate leukocytes from cells treated with specific reagents containing detergents and fluorescent stains, by using the 2-parameter flow-cytometric method. The scattergrams of the 2 channels have different patterns due to the differences in the reagents used as well as differences in the hardware and software. In particular, the WDF channel differentiates between lymphocytes and monocytes and enhances the separation capacity, thereby distinguishing it from the DIFF channel. In this study, we morphologically examined the reasons for the positional appearance of each subtype of the leukocytes on the scattergram. Additionally, we also assessed the reason why lymphocytes and monocytes separated evidently on the WDF scattergram, in terms of the influence of the reagents.

First, using the XN-and XE-analyzers, we confirmed that the lymphocytes and monocytes separated better on the WDF scattergram than on the DIFF scattergram. Next, the separation of leukocytes was assessed following treatment with the WDF or DIFF reagents by the same method using the analyzers. Fluorescence staining was performed, and the intensity of the stained area in the leukocytes was observed under the Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) ; the intracellular structure of the leukocytes was observed under the Transmission Electron Microscope (TEM) ; and the size and surface structures of the leukocytes were observed under the Scanning Electron Microscope (SEM) . Each leukocyte appeared at the same position as they are measured in whole blood. Analysis under the CLSM showed that of all the leukocytes, the staining intensity after treatment with the reagents was highest in the monocytes, followed by that in the T lymphocytes, B lymphocytes, neutrophils, and eosinophils, which correlated with the side fluorescence intensity on the WDF scattergram. In addition, observation by TEM revealed that of all the subtypes of leukocytes, the intracellular complexity after treatment with reagents was simplest in the lymphocytes, followed by that in monocytes, neutrophils, and eosinophils, which correlated with the side-scattered intensity on both the scattergrams. Moreover, observation by SEM demonstrated that after treatment with reagents, the size of the lymphocytes was the smallest, followed by that of monocytes, neutrophils, and eosinophils, which correlated with the forward-scattered intensity on the WDF (side SCAter detector-forward scatter) scattergram. These observations indicated that each leukocyte cluster was different in terms of the amount of its organelles as well as the detergent tolerance of cell membranes.

From each electron microscope observation, it was clear that the intracellular structures of the leukocytes were retained after treatment with WDF reagents compared with that after treatment with DIFF reagents. In conclusion, the separation of lymphocytes and monocytes was better demonstrated by a WDF scattergram than by a DIFF scattergram.

Key Words XN-Series, WDF Channel, Separation Ability, Blood Cell Morphology