

多項目自動血球分析装置 XN シリーズ PLT-F チャンネル における血小板の染色特性の検証

和田 淳, 高木 由里, 河野 麻理, 山本 志緒里,
海道 雅子, 中澤 文恵, 森川 隆

シスメックス株式会社 学術本部：神戸市西区室谷 1-3-2 (〒 651-2241)

要 旨

背景

血小板数の測定は止血異常の診断やその治療において不可欠な検査項目である。現在、臨床検査室に普及している自動血球分析装置の血小板測定システムの多くは、健常者末梢血中の血小板数を正確に測定する。しかし、異常血液検体の中には正確な計数が難しいものも存在する。多項目自動血球分析装置 XN シリーズ (シスメックス株式会社；以下、シスメックス) の PLT-F チャンネルは、PLT-O チャンネルを改良した新しい血小板測定系であり、多くの異常血液検体で信頼性の高い測定ができることが知られている。本論文では、正確な血小板測定を実現した PLT-F チャンネルの測定原理について報告する。

方法

多項目自動血球分析装置 XN シリーズで血小板、赤血球、および破碎赤血球を測定した。血小板を PLT-F 専用試薬と血小板の表面もしくは細胞内小器官に特異的な抗体 (抗 - CD62p, CD63, Grp75, Calreticulin, CD41, CD61 各抗体) で共染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡もしくは汎用フローサイトメーターで解析した。

結果

PLT-F チャンネルは赤血球・破碎赤血球と血小板を正確に識別した。PLT-F 専用試薬は、血小板の細胞小器官であるミトコンドリアを強く染色したが、血小板や赤血球の細胞膜はほとんど染色しなかった。さらにフローサイトメーターでの測定でも、PLT-F 専用試薬は血小板を強く染色し、破碎赤血球とは明瞭に分離した。

結論

PLT-F 専用試薬の血小板と破碎赤血球に対する染色特異性を利用することで、PLT-F チャンネルは正確な血小板測定を実現している。

キーワード

多項目自動血球分析装置 XN シリーズ, PLT-F チャンネル, 血小板測定システム, 血小板小器官, ミトコンドリア

はじめに

臨床検査室において、血小板は他の全血項目と同様に自動血球分析装置で測定され、止血異常の診断や治療に重要な検査項目である¹⁻⁵⁾。先進国の基幹病院における血小板数の計数は、以前は臨床検査技師による目視法で行われていたが、工数がかかるうえに計数値の再現性が低いため、自動血小板測定装置での測定へと移行していった⁶⁾。PLT-I (シスメックス),

CDS-I (アボットジャパン株式会社；以下、アボット), LH-750 impedance (ベックマン・コールター株式会社；以下、ベックマン・コールター) などの第一世代を改良した血小板計数法は現在でも臨床検査室で広く活用されている。しかし、第一世代の測定原理はインピーダンス (電気抵抗) 法であり、電気抵抗の大きさとして推定される粒子の大きさ情報のみが血小板とその他の細胞を区別するため、血小板と大きさが同程度の別の粒子とを区別することは

* 本稿は、PLOS ONE 10 (10) : e0141311. doi:10.1371/journal.pone.0141311 の文献を翻訳・転載したものです。

Web 公開日：2017 年 3 月 27 日

きないという問題がある。

この問題は、血小板に特異的な表面抗原に対するモノクローナル抗体（抗 CD41 抗体や抗 CD61 抗体）で血小板を標識し、汎用のフローサイトメーターで測定することで（免疫学的フローサイトメトリー法）解決できる^{7,8)}。しかし、抗体を使った血小板測定はコストと手間がかかるため、臨床検査室での日常検査として用いる標準法としては実用的ではなく、参照法と位置付けられている。

現在多くの臨床検査室で使用されている PLT-O（シスメックス）、CDS-O（アボット）、ADVIA2120 血小板スキャッターサイトグラム（シーメンスジャパン株式会社；以下、シーメンス）などは、フローサイトメトリーの原理に基づく第二世代の血小板測定方法である。これら第二世代の血小板測定方法は、通常の血液検体の血小板を正確に測定することができるが、血小板数が少ない検体や巨大血小板のような異常な血小板が含まれている検体での正確な血小板数の測定は難しい⁹⁻¹⁶⁾。特に、重症熱傷患者の血液検体では、赤血球ゴーストと呼ばれる血小板と同程度の大きさをした微小な破碎赤血球が大量に含まれているため、正確な血小板数測定が難しくなる。一方で、信頼性が高い参照法である免疫学的フローサイトメトリー法での血小板測定は、依然として臨床検査室では難しい。そのため、迅速かつ簡単で、信頼性の高い血小板測定法の開発が必要とされていた。

最新の多項目自動血球分析装置 XN シリーズは蛍光染色法とフローサイトメトリー法を原理とする次世代の自動血小板測定方法である PLT-F システムを搭載している。PLT-F 専用試薬で用いられている蛍光染色液は血小板を特異的に染色する能力が優れている。そのため、PLT-F チャンネルは血小板が少ない血液検体でも、さらには重症熱傷患者の血液検体でも、免疫学的手法を用いた参照法と高い相関性を示す¹⁷⁻²⁰⁾。しかし、これまで PLT-F システムはどのような原理で血小板を正確に測定しているのかについて、日本語による学術的な研究報告はなされていなかった。

本論文では、PLT-F チャンネルの正確性とその原理を、以下のような実験で確認した。PLT-F チャンネルと PLT-O チャンネルにおいて、同一の血液検体

を用いてそれぞれのスキャッターグラムの比較を行い、また PLT-I を含めた 3 つのチャンネル間で計数値を比較した。次に共焦点レーザー顕微鏡を用いて、PLT-F 専用試薬と従来の PLT-O 専用試薬の染色性を比較し、さらに免疫学的手法を用いて血小板と破碎赤血球の染色性の比較と染色部位の検討を行った。

材料と方法

1. 血小板，赤血球，破碎赤血球の調整

健康者ボランティアの末梢血 5 検体を 5mL の EDTA-2K 採血管（テルモ株式会社；以下、テルモ）に採取した。多血小板血漿（platelet-rich plasma: PRP）は末梢血を遠心して調整した²¹⁾。赤血球は PRP を回収したあと、 $d=1.119$ のリンパ球分離液（ナカライテスク株式会社）を用いた比重遠心法で調整し、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline: PBS）で洗浄した。破碎赤血球（fragmented RBC: fRBC）は洗浄した赤血球を 15 分間 50℃ で熱処理して調整した。これらの検体は多項目自動血球分析装置 XN-2000（以下 XN-2000, シスメックス）で測定した。また、メイグリユンワルドギムザ（武藤化学株式会社）染色を行い、顕微鏡（BX-50, オリパス株式会社；以下、オリパス）で観察、DP25 顕微鏡カメラ（オリパス）で撮影した。

2. PLT-F, PLT-I, PLT-O チャンネルの血小板測定値における統計学的解析

2 人のドナーの全血検体から多血小板血漿（PRP）と赤血球（RBC）もしくは破碎赤血球（fRBC）からなる画分を上記の方法で調整した。RBC-PRP もしくは fRBC-PRP（RBC もしくは fRBC: PRP: PBS = 1:1:8）の割合で混合した検体を調整し、XN-2000 の 3 種類の血小板測定法（PLT-F, PLT-I, PLT-O）で連続 10 回測定した。これら 3 種類の測定値の平均値を一元配置分散分析法（対比較：t 検定, P 値の調整：Bonferroni）で比較した。また、同じ計数方法により測定した RBC もしくは fRBC と PRP との混合検体の平均値は 2 標本 t 検定を用いて比較し、p 値が 0.05 以下の場合には統計的に有意であるとみなした。すべての統計分析は R（The R Foundation for Statistical Computing,

Vienna, Austria, version 3.2.2; <http://www.R-project.org/>) 用のグラフィカルユーザーインターフェースである EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター, バージョン 1.30) を使用した²²⁾. EZR は生物統計学で繁用される統計関数が追加された, R コマンド (バージョン 2.2.0) の改変版である.

3. 共焦点レーザー蛍光顕微鏡での観察

1) 生細胞の染色と観察

検体を FITC 標識 抗ヒト CD41 モノクローナル抗体 P2 (ベックマン・コールター IM0649U) もしくは, FITC 標識 抗ヒト CD61 モノクローナル抗体 SZ21 (ベックマン・コールター IM1758) 溶液 (20 μ g/mL 1% Bovine Serum Albumin (BSA)) 中で反応させ, ポリ-L-リジンでコートしたガラスボトムディッシュ (松浪硝子工業株式会社; 以下, 松浪硝子) 上で, 室温で 30 分間反応させた. PLT-F もしくは PLT-O 試薬での染色には, 同様にポリ-L-リジンでコートしたガラスボトムディッシュに検体を定着させ, PLT-F もしくは PLT-O 試薬 (PLT-F, セルパック DFL: フルオロセル PLT = 50:1; PLT-O, レットサーチ染色液: レットサーチ (II) 染色液 = 50:1, シスメックス) で約 1 分間反応させた. 染色した検体を共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (IX81, オリンパス; CSU-X1, 横河電機株式会社; Imagem, 浜松ホトニクス株式会社) で観察した.

2) 固定血小板の染色と観察

PBS で 10 倍に希釈した PRP をポリ-L-リジンコートしたガラスボトムディッシュ (D11131H, 松浪硝子) に室温で 30 分以上静置して血小板を付着させ, その後上清を除き, 4% パラホルムアルデヒド/PBS に置換して室温で 20 分間固定した. 固定後の血小板を 100 mM グリシン/PBS で 3 回洗浄後, 0.2% TritonX-100/PBS を用いて室温で 2 分間処理した. 液を除いた後, 血小板を PBS で 2 回洗浄し, 1% BSA/PBS 溶液で室温 30 分間ブロッキングし, 1% BSA/PBS 溶液中に以下の一次抗体を添加した液に置換し, 4°C で一晩反応させた.

・1/20 抗-CD63-FITC (マウス モノクローナル IgG1 clone CLB-Thromb/6, ベックマン・コールター) および 1/200 抗-Grp75 (ウサギモノクロー

ナル IgG1 clone D13H4, CST ジャパン株式会社; 以下, CST)

・1/20 抗-CD62p-FITC (マウス モノクローナル IgG1 clone CLB Gran/12, ベックマン・コールター) および 1/20 抗-Calreticulin (ウサギモノクローナル IgG clone D3E6, CST)

一次抗体反応後, PBS で 3 回洗浄し, 2 種の二次抗体 (1/400 Alexa Fluor 488 標識 ヤギ 抗-マウス IgG (H+L) 二次抗体 (A-11029), 1/400 Alexa Fluor 546 標識 ヤギ 抗-ウサギ IgG (H+L) 二次抗体 (A-11035), サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を添加した 1% BSA/PBS に置換して, 30 分間室温で反応させた.

二次抗体反応後, PBS で 3 回洗浄し, PBS で希釈した 2% フルオロセル-PLT (シスメックス) と反応させ, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡 FV-10i (オリンパス) で観察した.

4. フローサイロメトリー

血小板と破碎赤血球を等量ずつ混合し, 細胞の混合液 24 μ L と以下の蛍光標識した抗体各 3 μ L を添加し, 30 分間室温で反応させた.

・FITC 抗-CD41 モノクローナル抗体 P2 (ベックマン・コールター IM0649U)
 ・FITC control IgG (ベックマン・コールター A07795)
 ・PE 抗-CD61 モノクローナル抗体 SZ21 (ベックマン・コールター IM3605)
 ・PE control IgG (ベックマン・コールター A07796)

抗体との反応後, 細胞混合液に 300 μ L の PLT-F 試薬を加え, 90 秒間室温で反応させたあと, EC 800 セルアナライザー (ソニー株式会社) で解析した.

5. 研究倫理声明

本研究はシスメックス研究倫理委員会において承認済みである. また, 研究参加にあたり, すべての被験者への書面によるインフォームドコンセントの実施と同意書の取得を行っている.

結果

1. PLT-F スキャッタグラムと PLT-O スキャッタグラムの比較

全血検体を XN-2000 の 2 つの血小板測定チャンネルである PLT-F チャンネルと PLT-O チャンネルで同時に測定し、両チャンネルのスキャッタグラムの比較を行った (図 1)。その結果、PLT-F スキャッタグラムと PLT-O スキャッタグラム両方において、血小板と赤血球は前方散乱光 (FSC) の強度の差によって、明瞭に区別された (図 1, Y 軸)。一方で、PLT-F スキャッタグラムでは、赤血球は一塊のコンパクトなクラスターとして出現したが (図 1, 赤枠内)、PLT-O スキャッタグラムでは、長く尾を引いたようなクラスターを形成した。以上のことから、二つのチャンネルで使用する蛍光試薬の染色特性が異なることが示された。

2. PLT-F 試薬と PLT-O 試薬の異なる染色特異性

PLT-F と PLT-O チャンネルのそれぞれの専用試薬の染色性の違いについて検証した。全血から血小板画分 (PLT) として多血小板血漿 (PRP)、濃度勾配遠心法により分離した赤血球 (RBC)、熱処理後の破碎赤血球 (fRBC) を調整し (図 2A)、自動血球分析装置と同様の反応条件になるように、それぞれの細胞を PLT-F もしくは PLT-O 試薬と反応させた。共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した結果 (図 2B および

C, 上段)、PLT-F 試薬で染色した血小板は細胞内の顆粒が強く染色された (図 2B, 左上段) が、血小板、赤血球および破碎赤血球はかすかに染色されるのみであった (図 2B, 上段)。対照的に、PLT-O 試薬による染色では、血小板だけではなく、赤血球の細胞膜も明瞭に染色された (図 2C, 上段)。XN-2000 で確認したところ、PLT-F と PLT-O 両方のスキャッタグラムにおいて血小板と赤血球は正確に認識された (図 2B および C, 下段左, 中央)。しかし破碎赤血球は、PLT-F スキャッタグラムでは赤血球として正確に認識されたが (図 2B 左, 下段右, 青点)、PLT-O スキャッタグラムでは一部が血小板として認識されていた (図 2C, 右下段, 黄枠内の淡青色の点)。

3. 各チャンネルにおける破碎赤血球の影響

次に、PLT-F システムがどのようにして血小板と破碎赤血球を識別しているかの検証を行った。正常な赤血球 (RBC)、もしくは熱処理済みの破碎赤血球 (fRBCs) と血小板 (PRP) を混合した検体を調整後、PLT-F、PLT-I、PLT-O のそれぞれのチャンネルで 1 検体あたり 10 回測定した。その結果、PLT-F スキャッタグラムでは破碎赤血球 (fRBCs) と血小板を比較的正確に識別しているが (図 3A, 上段右)、PLT-O スキャッタグラムでは、微小な破碎赤血球は血小板として認識されることが確認された (図 3A, 中段右, 黄色枠内の淡青色の点)。また、PLT-I チャンネルのヒストグラムにおいては、血小板のピーク

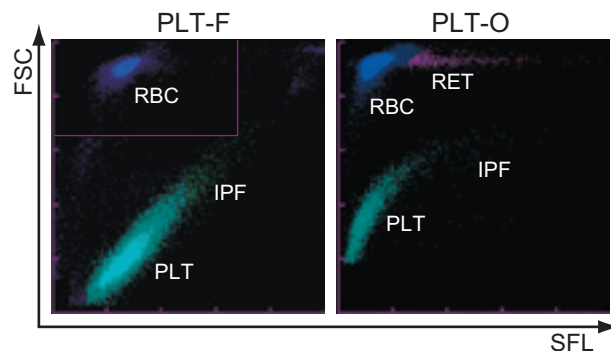


図 1. 多項目自動血球分析装置 XN シリーズの 2 つの血小板計数チャンネルの典型的なスキャッタグラム

同一の健常者の全血検体を XN-2000 で測定した。各パネルは PLT-F (左)、PLT-O (右) のスキャッタグラムを示している。FSC: 前方散乱光, SFL: 側方蛍光, RBC: 赤血球, PLT: 血小板, IPF: 幼若血小板, RET: 網状赤血球

の右側（高抵抗値側）に破碎赤血球とみられる裾が見られた（**図3A**，**下段**）。

それぞれの血小板測定値に対する統計解析を行ったところ，正常な赤血球（RBC）と血小板の混合検体では，PLT-FとPLT-Oシステム間の血小板測定値に統計学的な有意な差は見られなかった（**図3B**，**表1**）。一方で，破碎赤血球（fRBC）と血小板との混合検体

の場合，PLT-Fチャンネルでは，正常な赤血球（RBC）を混合した検体の測定値よりも15%（ドナー #1）もしくは17%（ドナー #2）増加したが，PLT-Oチャンネル（#1：372%，#2：661%）やPLT-Iチャンネル（#1：326%，#2：996%）の増加率と比較すると，はるかに影響は少なかった（**図3B**，**表1**）。

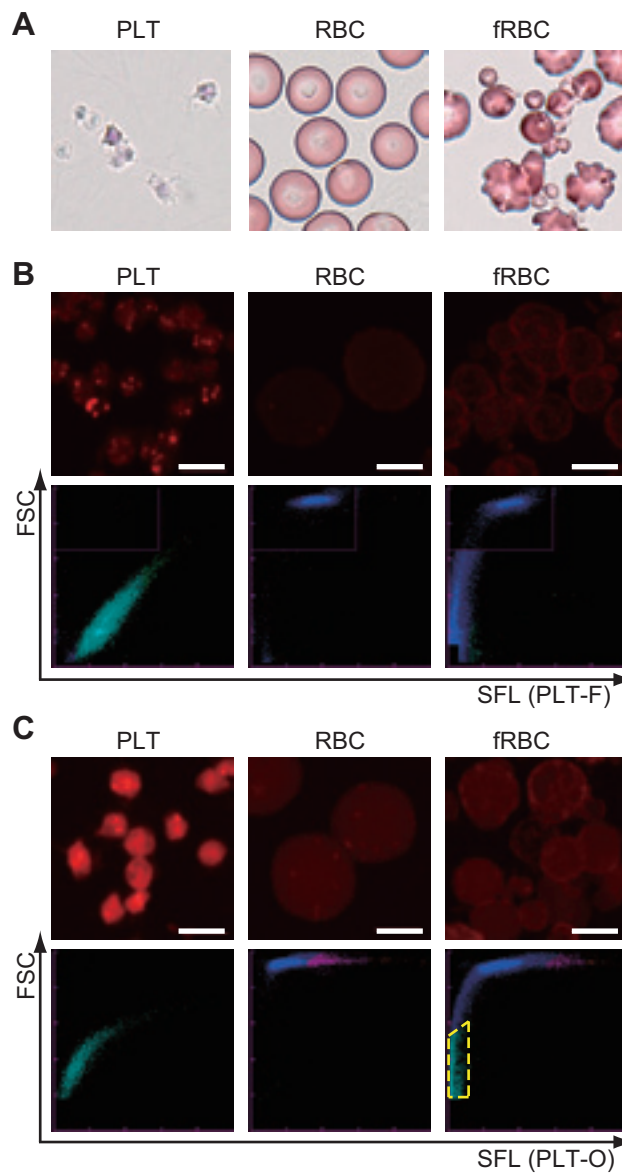


図2. PLT-F 試薬の血小板と破碎赤血球における染色特異性

各行の左，中央，右の列は血小板（PLT），赤血球（RBC），破碎赤血球（fRBC）を示す。（A）メイギムザ染色した細胞。（B）PLT-F試薬で染色した細胞（上段），PLT-Fスキャッタグラム（下段）。（C）PLT-O試薬で染色した細胞（上段），PLT-Oスキャッタグラム（下段）。黄色の点線で囲まれた水色ドットのfRBCは血小板として誤認されていることを示している。Bar: 5 μ m

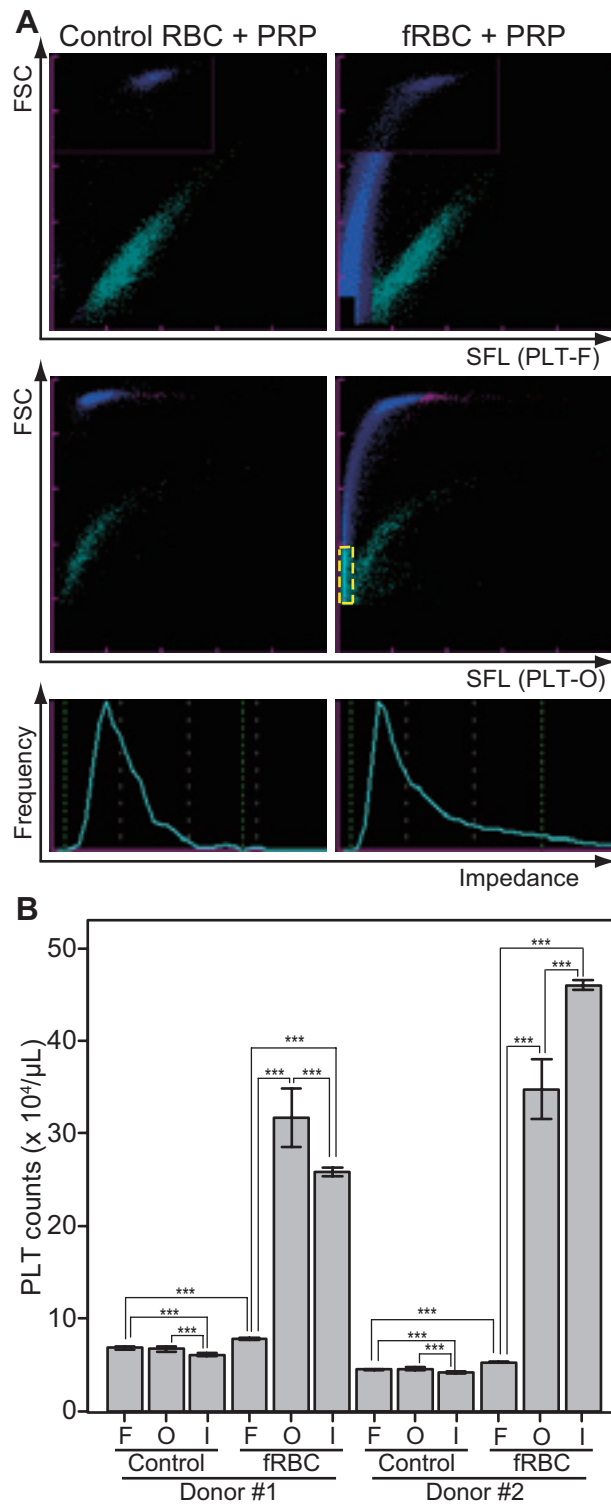


図3. 3つの血小板計数法による破碎赤血球，多血小板血漿の混合物の血小板数の比較

3つの血小板計数法（PLT-F，PLT-O，PLT-I）を，正常な赤血球（RBC）または破碎赤血球（fRBC）のどちらかと多血小板血漿（PRP）との混合物を用いて比較した。混合物は2人のドナー由来の全血検体それぞれから作り，検体あたり10回検討した。（A）3つの方法からの典型的なスキャットグラム。上段：PLT-F，中段：PLT-O，下段：PLT-I。左：RBC，PRPの混合物，右：fRBC，PRPの混合物。黄色の点線で囲まれた水色のドットは血小板と誤認されたfRBCを示している。（B）混合物の血小板計数。データは平均±標準偏差として表している。F：PLT-F，O：PLT-O，I：PLT-I。Control：対照RBCおよびPRPの混合物，fRBC：fRBCおよびPRP混合物。

*** は $p < 0.001$ を意味する。

表 1. PLT-F, PLT-O, PLT-I による血小板数の平均, SD, CV

	ドナー #1						ドナー #2					
	Control			fRBC			Control			fRBC		
	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
PLT-F	6.82	0.15	2.27	7.84	0.13	1.61	4.51	0.06	1.26	5.27	0.09	1.80
PLT-O	6.71	0.28	4.12	31.68	3.19	10.06	4.57	0.18	3.87	34.76	3.24	9.31
PLT-I	6.06	0.19	3.13	25.84	0.44	1.70	4.20	0.11	2.51	46.02	0.56	1.22

SD: 標準偏差, CV: 変動係数 (%)

4. 血小板内小器官に対する PLT-F 染色試薬の染色特異性

PLT-F 試薬は血小板内の顆粒を強く染色した (図 2B)。そこで, PLT-F 試薬がどの顆粒を染色しているか検証した。血小板内の顆粒に特異的な抗体 (抗-CD62p/P-selectin (α 顆粒マーカー), 抗-CD63 (濃染顆粒マーカー)²³⁾, 抗-Grp75/mortalin (ミトコンドリアマーカー)²⁴⁾, 抗-Calreticulin (小胞体・暗調小管系マーカー)²⁵⁾) を用いて免疫蛍光染色を行ったあと, さらに同じ検体について PLT-F 試薬での染色も行った。その結果, PLT-F 試薬での染色シグナルはミトコンドリアのマーカーである Grp75 のシグナルと共局在した (図 4A, 黄色矢頭) が, 他の 3 種類の顆粒マーカーの染色シグナルとは共局在しなかった (図 4A, B)。

5. PLT-F 試薬と血小板特異的抗体 (参照法抗体) との染色特異性の比較

PLT-F 試薬と参照法で用いられる抗 CD41 もしくは抗 CD61 抗体との染色特異性の比較を行った。血小板と破碎赤血球の混合検体について PLT-F 試薬と上記の血小板特異抗体で二重染色し, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した (図 5)。その結果, PLT-F 試薬は小さい細胞を強く染色し (図 5 中央, 矢頭), 血小板特異的な抗体で認識される細胞 (図 5 左,

矢頭) と完全に重なった (図 5 右, 矢頭)。一方で, PLT-F 試薬は破碎赤血球の細胞膜をかすかであるが染色した (図 2, 4, 5)。この検証の結果から, PLT-F 試薬による染色は参照法の抗体による染色と同様に, 血小板と破碎赤血球を識別する方法として有用であることが示された。

6. PLT-F 試薬と血小板特異的抗体 (参照法抗体) のスキャッタグラムの解析

最後に, 血小板と破碎赤血球の混合検体を FITC-抗 CD41 抗体および PE-抗 CD61 抗体で標識後, さらに PLT-F 試薬で三重染色し, 汎用フローサイトメーターで解析を行った。その結果, CD41 陽性 /CD61 陽性の血小板 (図 6A 左パネル, 淡青色) と, CD41 陰性 /CD61 陰性の破碎赤血球 (図 6A 左パネル, 青色) は, 二つの分離したクラスターとしてスキャッタグラム上に出現した。さらに, これらのクラスターは PLT-F チャンネルを再現したスキャッタグラム (X 軸: PLT-F 蛍光強度, Y 軸: 細胞の大きさ) においても, それぞれ別のクラスターを形成し (図 6A 右パネル), 血小板と破碎赤血球を識別できることが示された。また, FITC-抗 CD41 抗体, もしくは PE-抗 CD61 抗体のどちらか一方で標識後, PLT-F 試薬で染色した場合も同様の結果になった (図 6B, C 右パネル)。

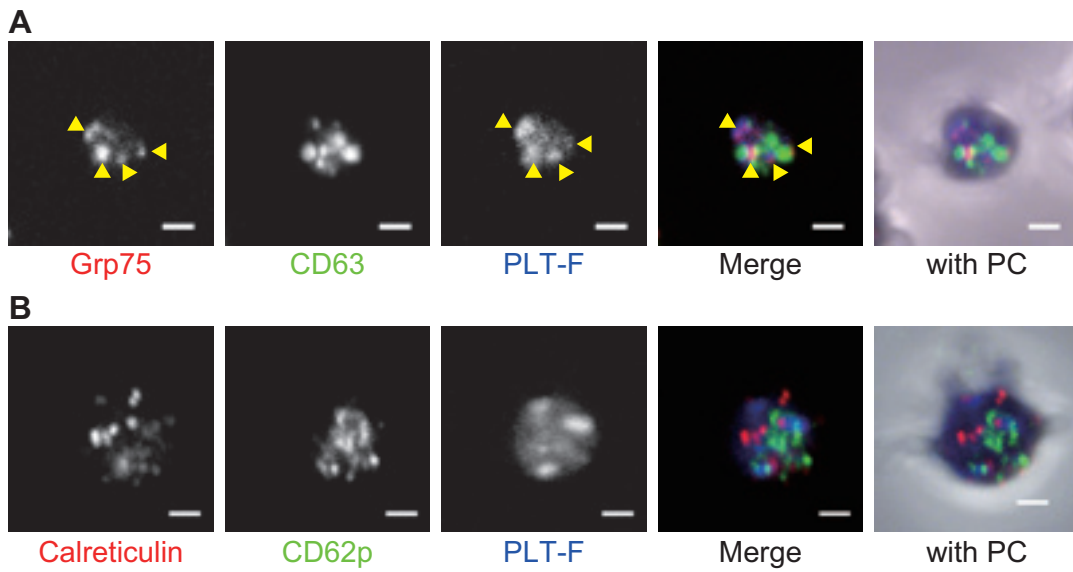


図4. PLT-F 染色試薬のミトコンドリアにおける染色特異性

(A) 抗 Grp75 (Merge の赤色), 抗 CD63 (Merge の緑色), PLT-F (Merge の青色) の三重染色. 黄色の矢印は抗 Grp75 および PLT-F 染色の重なったシグナルを示している. (B) 抗 Calreticulin (Merge の赤色), CD62p (Merge の緑色), PLT-F シグナル (Merge の青色). (A および B) 「with PC」チャンネルは免疫蛍光, PLT-F, 位相差像の合成像を示している. PC は位相差 (Phase Contrast) の略. Bar=1 μ m

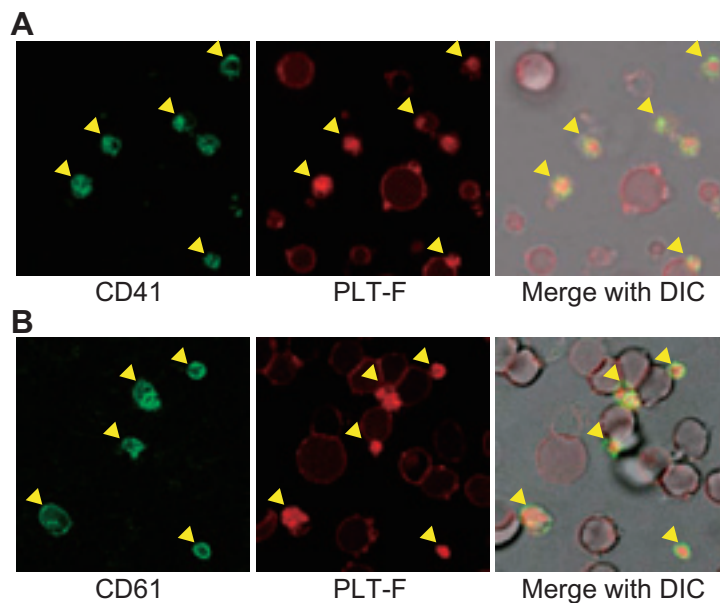


図5. PLT-F 試薬の CD41/CD61 陽性細胞における染色性特異性

血小板および破碎赤血球の混合物を血小板特異抗体 (抗 CD41 (A) または抗 CD61 (B), 左) および PLT-F 試薬 (中央) で染色した. 黄色の矢印は血小板を示している.

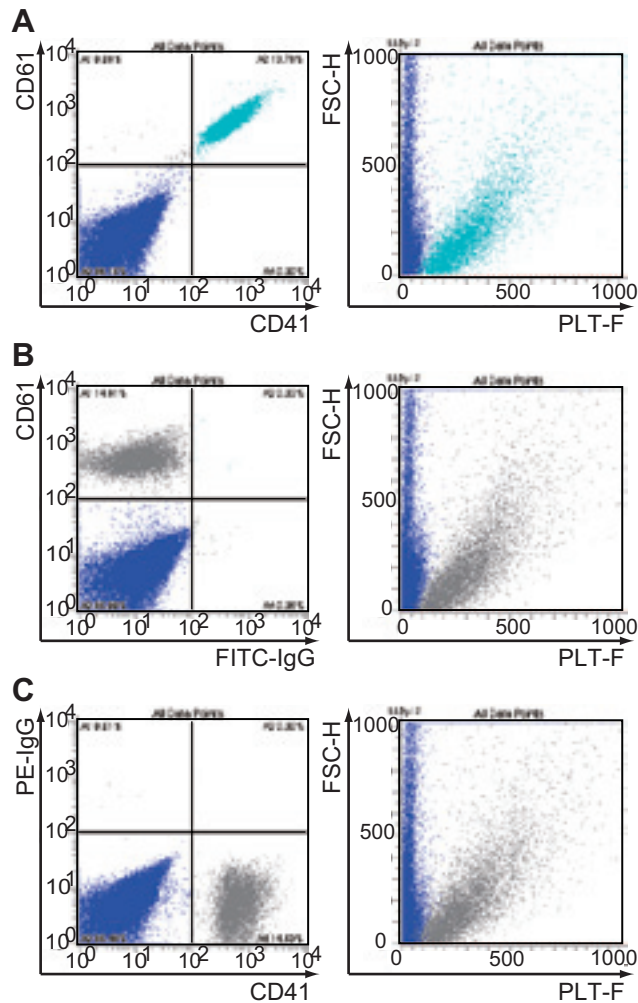


図 6. PLT-F 試薬染色によるスキャッタグラムでの CD41 陽性 /CD61 陽性細胞の識別

血小板および破碎赤血球の混合物を FITC 標識抗 CD41 抗体および PE 標識抗 CD61 抗体で染色した後、PLT-F 試薬で染色し、汎用フローサイトメーターにより検討した。(A) 血小板特異抗体 (抗 CD41 または抗 CD61, 左) および PLT-F 試薬 (左) で染色した混合物。(B) FITC-control IgG または (C) PE-control IgG を蛍光補正のためネガティブコントロールとして使用した。

考 察

多項目自動血球分析装置 XN シリーズの PLT-F スキャッタグラムと PLT-O スキャッタグラムの比較により (図 1), それぞれの測定チャンネルで使用されている蛍光染色液は、赤血球の異なる部位を染色することが示された。特に PLT-O スキャッタグラムにおいて、網赤血球は赤血球よりも蛍光強度が高い位置に出現するが (図 2C, 下段中・下段右, ピンクと赤の点), PLT-F スキャッタグラム上では網

赤血球と赤血球は分離されなかった (図 2B, 下段中・下段右)。PLT-O チャンネルで使用する染色液は血小板 (図 2C) と同様に網赤血球の内部構造を染色することが知られている²⁶⁾。一方、今回の PLT-F スキャッタグラムの結果から、PLT-F チャンネルの染色液は網赤血球の内部構造をほとんど染色しないことが示唆された (図 2B, C)。一方で、PLT-F, PLT-O の色素はどちらも核酸を染色するカチオン性色素であるため、陰イオン性の細胞膜を多かれ少なかれ染色することが示された (図 2)。

血小板と同等の大きさの破碎赤血球⁹⁾と血小板に対する PLT-F 試薬と PLT-O 試薬の染色性を比較したところ、PLT-O スキャッタグラムでは、破碎赤血球の一部は血小板として認識された(図 2C, 3A)。これは、PLT-O 試薬が赤血球の細胞膜を強く染色するためであると考えられる(図 2C)。一方で、PLT-F 試薬は血小板の細胞内小器官の一部を強く染色したが、赤血球の細胞膜はほとんど染色しなかった(図 2B, 4)。両試薬の染色性の違いは、それぞれの試薬に含まれる色素の化学的特性と関係していることが考えられる。つまり、PLT-F 試薬に含まれる色素がフェノキサジン系(特許 US20120315667 A1)であるのに対し、PLT-O 試薬に含まれる色素はポリメチン系(特許 US5891731 A)であり、この化学的特性の違いが PLT-F と PLT-O スキャッタグラムにおける染色性の違いとなって(図 1～3)、PLT-F スキャッタグラム上で PLT-F 試薬が血小板と破碎赤血球をはっきりと識別している理由であると考えられる(図 2B, 3)。血小板と破碎赤血球の混合検体を用いた定量解析では、PLT-F チャンネルでの測定は他のチャンネルに比べ高い性能を示した(図 3B, 表 1)。次に、血小板と高濃度の破碎赤血球を実験的に混合した検体を 3つのチャンネルで測定したところ、破碎赤血球の影響による血小板測定数の増加は PLT-F では 15～17%であったが、PLT-O および PLT-I では 300%以上であった(図 3B, 表 1)。さらに、血小板計数値の変動係数(CV)は PLT-F では安定していたが、PLT-O では予想外に高くなることがあると分かった(図 3B, 表 1)。この理由は今のところ不明だが、PLT-O チャンネルの解析アルゴリズムによる可能性が考えられる。以上の結果より、PLT-F チャンネルは他のチャンネルに比べ、より正確な血小板測定法であると結論づけた。

次に、PLT-F 試薬が強く染色する血小板内の顆粒(図 2B, C)について検討した。PLT-F 試薬はカチオン性のため、酸性の顆粒である濃染顆粒とミトコンドリアのゲノム DNA や様々な RNA などの核酸を染色するのではないかと考えられた。また、その他の候補として顆粒が考えられた。そこで、PLT-F 試薬とそれぞれの細胞小器官に特異的な抗体とで共染色したところ、PLT-F 試薬による染色とミトコンドリア

の特異的なマーカーである Grp75 タンパク質との局在が一致した(図 3A)。一方で、他の 3種類の顆粒マーカー(CD63:濃染顆粒, CD62p:α顆粒, Calreticulin:小胞体由来の細胞小器官)の局在とは一致しなかった(図 3)。これらの結果より、PLT-F 試薬の染色液は血小板内のミトコンドリアを強く染色することが示された。この結果は、PLT-F 試薬がミトコンドリアなどの細胞小器官や細胞内・核内 DNA/RNA が存在しない成熟赤血球や破碎赤血球を染色しない結果と一致する。

上記のとおり、PLT-F 試薬での染色は血小板と破碎赤血球を識別できる良い方法であると考えられる(図 2)。実際に複数の論文で、PLT-F チャンネルと血小板に特異的な抗体を用いた参照法との良い相関関係があることが報告されている^{18, 19)}。これらの研究は、PLT-F 試薬は参照法と同様に破碎赤血球が混在する検体中の血小板を特異的に染色することを示している。CD41 および CD61 抗原は、血小板の細胞膜上に存在する糖タンパク質(GPⅡb および GPⅢa)で、その特異的な抗体は血小板測定用の参照法に使用される^{7, 8)}。そこで PLT-F 試薬の染色シグナルと抗 CD41 または抗 CD61 抗体に特異的な染色シグナルとを比較したところ、PLT-F 試薬は赤血球の細胞膜をかすかに染色し、CD41 および CD61 抗原の抗体が認識する血小板内の顆粒を強く染色することが示された(図 5)。臨床検体を用いた研究でも、PLT-F チャンネルでの測定は、抗 CD 抗体を用いた免疫学的参照法での測定方法と良い相関を示している¹⁷⁻²⁰⁾。

最後に、汎用フローサイトメーターで PLT-F スキャッタグラムを再現し、PLT-F 染色法と血小板特異抗体での染色法との相関関係を検討した(図 6)。血小板内での PLT-F 試薬の染色部位は抗 CD41/61 抗体とは完全に異なっているにもかかわらず、PLT-F チャンネルを再現したスキャッタグラム上で、抗 CD41/61 抗体が認識するほとんどすべての血小板と破碎赤血球を識別することができた(図 5)。さらに、PLT-F チャンネルでの測定は血小板数が $30 \times 10^9 /L$ 以下の血液検体であっても、免疫学的参照法での測定方法と良い相関関係を示したという研究結果とも一致する¹⁷⁻²⁰⁾。

おわりに

今回の研究において、血小板のミトコンドリアを染色するという PLT-F 試薬の染色特性が PLT-F チャンネルの血小板測定 of 正確さに大きく寄与していることが明らかになった。さらに、PLT-F 試薬の優れた染色特性を利用することにより、正確な血小板測定を阻害する一因である破碎赤血球のような小さな粒子が混在するような異常検体であっても、正確に血小板を測定することができることが示された。

参考文献

- 1) Kuwana M. Helicobacter. Pylori-associated immune thrombocytopenia : clinical features and pathogenic mechanisms. *World J Gastroenterol.* 2014 ; 20 : 714-723. doi : 10.3748/wjg.v20.i3.714 PMID : 24574745
- 2) Kashiwagi H, Tomiyama Y. Pathophysiology and management of primary immune thrombocytopenia. *Int J Hematol.* 2013 ; 98 : 24-33. doi : 10.1007/s12185-013-1370-4 PMID : 23702914
- 3) Sola-Visner M. Platelets in the neonatal period : developmental differences in platelet production, function, and hemostasis and the potential impact of therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012 ; 2012 : 506-511. doi : 10.1182/asheducation-2012.1.506 PMID : 23233626
- 4) Daugirdas JT, Bernardo AA. Hemodialysis effect on platelet count and function and hemodialysis-associated thrombocytopenia. *Kidney Int.* 2012 ; 82 : 147-157. doi : 10.1038/ki.2012.130 PMID : 22592187
- 5) Ortel TL. Heparin-induced thrombocytopenia : when a low platelet count is a mandate for anticoagulation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 225-232. 2009.
- 6) Rappaport ES, et al. Automated hematology : where we stand. *South Med J.* 1988 ; 81 : 365-370. PMID : 3279533
- 7) Dickerhoff R, Von Ruecker A. Enumeration of platelets by multiparameter flow cytometry using platelet-specific antibodies and fluorescent reference particles. *Clin Lab Haematol.* 1995 ; 17 : 163-172. PMID : 8536420
- 8) Harrison P, et al. An interlaboratory study of a candidate reference method for platelet counting. *Am J Clin Pathol.* 2001 ; 115 : 448-459. PMID : 11242802
- 9) Tvedten H. What is your diagnosis? Discrepancy in platelet counts determined using a Sysmex XT-2000 iV hematology analyzer. Erroneous PLT-O due to RBC ghosts. *Vet Clin Pathol.* 2010 ; 39 : 395-396. doi : 10.1111/j.1939-165X.2010.00240.x PMID : 20646258
- 10) Sandhaus LM, et al. Platelet counting by the coulter LH 750, sysmex XE2100, and advia 120 : a comparative analysis using the RBC/platelet ratio reference method. *Am J Clin Pathol.* 2002 ; 118 : 235-241. PMID : 12162684
- 11) Hong KH, et al. Platelet count evaluation using three automated haematology analysers compared with the immunoplatelet reference method, and estimation of possible inadequate platelet transfusion. *Int J Lab Hematol.* 2009 ; 31 : 298-306. doi : 10.1111/j.1751-553X.2008.01032.x PMID : 18294237
- 12) Trabuo E, et al. Performance of automated platelet quantification using different analysers in comparison with an immunological reference method in thrombocytopenic patients. *Blood Transfus.* 2009 ; 7 : 43-48. doi : 10.2450/2008.0039-08 PMID : 19290080
- 13) Sehgal K, et al. Comparison of platelet counts by CellDyn Sapphire (Abbot Diagnostics), LH750 (Beckman Coulter), ReaPanThrombo immunoplatelet method (ReaMetrix), and the international flow reference method, in thrombocytopenic blood samples. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010 ; 78 : 279-285. doi : 10.1002/cyto.b.20515 PMID : 20229505
- 14) Dadu T, et al. Comparison of platelet counts by sysmex XE 2100 and LH-750 with the international flow reference method in thrombocytopenic patients. *Indian J Pathol Microbiol.* 2013 ; 56 : 114-119. doi : 10.4103/0377-4929.118701 PMID : 24056646
- 15) Cid J, et al. Evaluation of low platelet counts by optical, impedance, and CD61-immunoplatelet methods : estimation of possible inappropriate platelet transfusion. *Transfusion.* 2010 ; 50 : 795-800. doi : 10.1111/j.1537-2995.2009.02504.x PMID : 19951312
- 16) Diquattro M, et al. Relationships between platelet counts, platelet volumes and reticulated platelets in patients with ITP :

- evidence for significant platelet count inaccuracies with conventional instrument methods. *Int J Lab Hematol.* 2009 ; **31** : 199-206. doi : 10.1111/j.1751-553X.2007.01025.x PMID : 18190589
- 17) Briggs C, et al. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. *J Clin Pathol.* 2012 ; **65** : 1024-1030. doi : 10.1136/jclinpath-2012-200930 PMID : 22851510
- 18) Schoolr M, et al. New fluorescent method (PLT-F) on Sysmex XN2000 hematology analyzer achieved higher accuracy in low platelet counting. *Am J Clin Pathol.* 2013 ; **140** : 495-499. doi : 10.1309/AJCPUAGGB4URL5XO PMID : 24045545
- 19) Tanaka Y, et al. Performance evaluation of platelet counting by novel fluorescent dye staining in the XN-series automated hematology analyzers. *J Clin Lab Anal.* 2014 ; **28** : 341-348. doi : 10.1002/jcla.21691 PMID : 24648166
- 20) Seo JY, Lee ST, Kim SH. Performance evaluation of the new hematology analyzer Sysmex XN-series. *Int J Lab Hematol.* 2015 ; **37** : 155-164. doi : 10.1111/ijlh.12254 PMID : 24815300
- 21) Araki J, et al. Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates : maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012 ; **18** : 176-185. doi : 10.1089/ten.TEC.2011.0308 PMID : 21951067
- 22) Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 2013 ; **48** : 452-458. doi : 10.1038/bmt.2012.244 PMID : 23208313
- 23) Heijnen HF, et al. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood.* 1998 ; **91** : 2313-2325. PMID : 9516129
- 24) Flachbartova Z, Kovacech B. Mortalin – a multipotent chaperone regulating cellular processes ranging from viral infection to neurodegeneration. *Acta Virol.* 2013 ; **57** : 3-15. PMID : 23530819
- 25) Michalak M, et al. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 2009 ; **417** : 651-666. doi : 10.1042/BJ20081847 PMID : 19133842
- 26) Kono M, et al. Morphological definition of CD71 positive reticulocytes by various staining techniques and electron microscopy compared to reticulocytes detected by an automated hematology analyzer. *Clin Chim Acta.* 2009 ; **404** : 105-110. doi : 10.1016/j.cca.2009.03.017 PMID : 19302987

Accuracy of a New Platelet Count System (PLT-F) Depends on the Staining Property of Its Reagents

Atsushi WADA, Yuri TAKAGI, Mari KONO and Takashi MORIKAWA

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

SUMMARY

Background

Platelet count is essential for the diagnosis and management of hemostasis abnormalities. Although existing platelet count methods installed in common hematology analyzers can correctly count platelets in normal blood samples, they tend to miscount platelets in some abnormal samples. The newly developed PLT-F channel in the XN-Series hematology analyzer (Sysmex) has been reported to be a reliable platelet count system, even in abnormal samples. However, how the PLT-F platelet counting system achieves such accuracy has not been described in scientific articles.

Methods

Isolated platelets, erythrocytes, and fragmented erythrocytes were examined using an automated hematology analyzer. The samples were labeled by combining PLT-F reagents and anti-CD62p, CD63, Grp75, Calreticulin, CD41, or CD61 antibody, and analyzed using confocal laser scanning microscopy or flow cytometry.

Results

The PLT-F system correctly discriminated platelets in erythrocytes. Its reagents strongly stained some intraplatelet organelles labeled with anti-Grp75, but only faintly stained the plasma membrane of both platelets and erythrocytes. Microscopic observation and flow cytometric examination revealed that all of these strongly stained cells were also labeled with platelet-specific anti-CD41 and anti-CD61 antibodies.

Conclusions

This study revealed that the staining property of the PLT-F reagents, by which platelets and fragmented erythrocytes are clearly distinguished, contributes to the platelet-counting accuracy of the PLT-F system.

Note: This article was translated and reprinted from PLOS ONE 10 (10) : e0141311. doi:10.1371/journal.pone.0141311.