

多項目自動血球分析装置 XN シリーズのバージョンアップに伴う造血器腫瘍細胞検出能の評価

永井 直治, 高橋 陸, 津田 勝代, 嶋田 昌司, 松尾 収二

公益財団法人 天理よろづ相談所病院 臨床検査部：奈良県天理市三島町 200 (〒 632-8552)

要 旨

シスメックス株式会社の多項目自動血球分析装置 XN シリーズはバージョンアップに伴い造血器腫瘍細胞に対するフラグ (Blast?, Abn Lympho?) が改良された。そこで今回、旧バージョンとの比較を行った。

対象は EDTA2K 加血のうち、塗抹標本にて芽球もしくは異常リンパ球を認めた 358 件、陰性対照 100 件を用い、採血後 4 時間以内に旧バージョン (Ver.16) および新バージョン (Ver.20) で測定した。WDF チャンネル (“Blasts/Abn Lympho?” Flag) および WPC チャンネル (“Blasts?” もしくは “Abn Lympho?” Flag) の感度、特異度を比較した。旧、新バージョンの腫瘍細胞出現に対する感度、特異度は、旧バージョンは 63.4 および 100%, 新バージョンは 74.0 および 100.0% であった。腫瘍細胞を系統別に見た場合、各々の旧、新バージョンの感度は、骨髄球系は 65.2 および 71.8%, 単球系は 77.6 および 89.4%, リンパ球系は 44.9 および 65.4%, 赤芽球系はともに 57.1% であり単球系およびリンパ球系において大きな改善が見られた。新バージョンにおける偽陰性の腫瘍細胞数は、骨髄球系 8 ~ 2,995/μL, 単球系 7 ~ 126 μL, リンパ球系 4 ~ 5,676 μL, 赤芽球系 57 ~ 140 μL であり、骨髄球系およびリンパ球系にて細胞数が多いにもかかわらず見落とす可能性があった。Blast? や Abn Lympho? のようなフラグのみでは腫瘍細胞の検出には限界がある。WBC Abn Scattergram, Lymphocytosis, Monocytosis, IG Present など、造血器腫瘍細胞が認められる検体で付記されやすい他のメッセージも使用することや、鏡検条件に特定疾患条件や診療科条件も交えた運用を構築することが重要である。

キーワード XN シリーズ, 腫瘍細胞, 感度

はじめに

近年自動血球計数装置は血液検査を行ううえで迅速化、省力化に重要な役割を担っている。日常業務では、まず血球計数装置にて検体を分析し、数的、質的異常が見られた場合、目視鏡検で確認している施設が多い¹⁾。そのため我々は、血球計数装置において異常検体を検出する感度および特異度が重要であると考えている。シスメックス株式会社の多項目自動血球分析装置 XN シリーズ (以下、シスメックス, XN シリーズ) は多彩なチャンネルと自動再検を駆使して、効率よく異常所見の検出を行っている。またソフトウェアの定期的なバージョンアップにより装置の性能向上も為されている²⁻⁴⁾。今回、芽球や異常

リンパ球などの腫瘍細胞の検出に関するバージョンアップが行われたため、旧バージョンおよび新バージョンにおける感度および特異度を中心に比較した。

対 象

対象は当院にて採血された EDTA2K 加血のうち、塗抹標本にて芽球もしくは異常リンパ球を認めた陽性群 358 検体および陰性対照 100 検体を用いた。陽性群の腫瘍細胞系統の内訳は、骨髄球系 39 症例 181 検体、単球系 12 症例 85 検体、リンパ球系 25 症例 78 検体および赤芽球系 3 症例 14 検体であった。系統の鑑別は骨髄検査所見、染色体検査、造血器細胞表面マーカー検査および遺伝子検査により総合的に判断した。

方法

使用機器は多項目自動血球分析装置 XN-3000（以下、シスメックス、XN-3000）を用い、対象検体を採血後 4 時間以内に旧バージョン（Ver. 16）および新バージョン（Ver. 20）にて測定した。XN シリーズは腫瘍細胞に対する感度の高い WDF チャンネルで測定し Flag が陽性の場合、さらに特異度が高い WPC チャンネルで自動再検を行っている。両バージョンの WDF チャンネルの“Blasts/Abn Lympho?” Flag および WPC チャンネルの“Blasts?” もしくは“Abn Lympho?” Flag の出現状況について以下の比較を行った。今回は両チャンネルにおいて Flag が検出されたもののみを陽性とした。なお、両 Flag の出現の基準となる Q-Flag の cut off 値は 100 とした。

① WDF チャンネルの“Blasts/Abn Lympho?” Flag および WPC チャンネルの“Blasts?” もしくは“Abn Lympho?” Flag の腫瘍細胞出現に対する感度および

特異度について比較した。

- ②対象症例を腫瘍細胞の各系統に分類し Flag の感度を比較した。
- ③腫瘍細胞の系統別に偽陰性であった症例の腫瘍細胞数および細胞割合を比較した。
- ④目視鏡検にて腫瘍細胞形態を観察し、Flag の感度を比較した。鏡検のポイントは細胞の大きさ、核の切れ込みやくびれの有無、細胞質内の顆粒や空胞の有無によりそれぞれ 2 群に分類した。細胞の大きさは腫瘍細胞の直径を各症例 3 細胞ずつ測定し、その平均が 14 μm 未満もしくは以上で 2 群に分けた。

結果

1. 両チャンネルを用いた感度、特異度

対象検体の疾患の内訳と腫瘍細胞数を示した（表 1）。全対象症例の平均腫瘍細胞数は 7,047/μL（2 ~ 115,473）であった。

表 1. 対象の疾患内訳および腫瘍細胞数

	症例数	件数	腫瘍細胞 (%) (最小値~最大値)	腫瘍細胞 (/μL) (最小値~最大値)
骨髄球系	39	181	32.2 (0.5 ~ 97.0)	3,852 (8 ~ 78,013)
AML with myelodysplasia related changes	7	51		
Hypoplastic leukemia	7	50		
Myelodysplastic syndromes	16	43		
Myeloproliferative neoplasms	3	15		
Acute promyelocytic leukemia	2	8		
Acute basophilic leukemia	1	8		
Bone marrow metastasis of cancer	2	5		
AML with minimal differentiation	1	1		
単球系	12	85	26.4 (0.5 ~ 99.8)	14,270 (2 ~ 115,473)
Acute monoblastic and monocytic leukemia	8	65		
Acute myelomonocytic leukemia	4	20		
リンパ球系	25	78	31.9 (0.5 ~ 97.2)	9,126 (3 ~ 105,370)
Acute lymphoblastic leukemia	7	31		
Adult T cell leukemia	3	14		
Diffuse large B cell lymphoma	3	9		
Angioimmunoblastic T cell lymphoma	2	5		
Follicular lymphoma	3	5		
Plasma cell neoplasms	3	5		
Mantle cell lymphoma	1	4		
Sezary syndrome	1	3		
CML blast crisis	1	1		
Intravascular large B cell lymphoma	1	1		
赤芽球系	3	14	3.4 (1.0 ~ 7.0)	78 (6 ~ 148)
Pure erythroid leukemia	3	14		
合計	79	358	28.3 (0.5 ~ 99.8)	7,047 (2 ~ 115,473)

各 Flag の出現状況について比較した。旧バージョンの WDF チャンネルにおいて陽性群 358 検体中 302 検体が陽性であった。さらにこの 302 検体は WPC チャンネルによる自動再検がなされ、227 検体が陽性であり、最終的な Flag の感度は 63.4%であった。偽陰性は WDF チャンネルにおいて 56 検体、WPC チャンネルにて 75 検体認められた。

一方、新バージョンの WDF チャンネルでは 309 検体が陽性、さらに WPC チャンネルにて再検された 265 検体が陽性であり、最終的な感度は 74.0%と感度の上昇が見られた。偽陰性は WDF チャンネルにて 49 検体、WPC チャンネルにて 44 検体認められた。特異度は、両バージョンとも陰性対照群 100 検体中すべて陰性で 100%であった。

2. 各系統別の感度

旧バージョンおよび新バージョンを系統別に見るとそれぞれの感度は、骨髄球系は 65.2%が 71.8%、単球系は 77.6%が 89.4%、リンパ球系は 44.9%が

65.4%であり単球系およびリンパ球系にて大きな改善が見られた(表2)。ただしリンパ球系については WDF チャンネルにて 19.2%、WPC チャンネルにて 15.4%の偽陰性が見られさらなる改良が必要であった。赤芽球系については両バージョンとも 57.1%であり変化が見られなかった。

3. 偽陰性の腫瘍細胞数および割合

腫瘍細胞出現時の偽陰性が細胞数に依存するか否かを見るため、WDF および WPC チャンネルにて偽陰性が見られた症例の腫瘍細胞数と割合を比較した(図1)。

旧バージョンにおいては腫瘍細胞数が 1,000/ μ L もしくは腫瘍細胞割合が 20%以上であった症例が骨髄球系は 181 検体中 10 検体、リンパ球系は 78 検体中 17 検体認められたが、新バージョンにおいては、骨髄球系は 181 検体中 6 検体、リンパ球系は 78 検体中 5 検体と減少していた。新バージョンにて偽陰性であったものの内訳は、骨髄球系は Acute promyelocytic leukemia (APL) 4 検体、AML with myelodysplasia related

表2. 腫瘍細胞系統別の各チャンネルの検出状況

	旧バージョン			新バージョン		
	WDF+WPC+	WDF+WPC-	WDF-	WDF+WPC+	WDF+WPC-	WDF-
骨髄球系	118 件 (65.2%)	36 件 (19.9%)	27 件 (14.9%)	130 件 (71.8%)	22 件 (12.2%)	29 件 (16.0%)
単球系	66 件 (77.6%)	13 件 (15.3%)	6 件 (7.1%)	76 件 (89.4%)	5 件 (5.9%)	4 件 (4.7%)
リンパ球系	35 件 (44.9%)	23 件 (29.5%)	20 件 (25.6%)	51 件 (65.4%)	12 件 (15.4%)	15 件 (19.2%)
赤芽球系	8 件 (57.1%)	3 件 (21.4%)	3 件 (21.4%)	8 件 (57.1%)	5 件 (35.7%)	1 件 (7.1%)

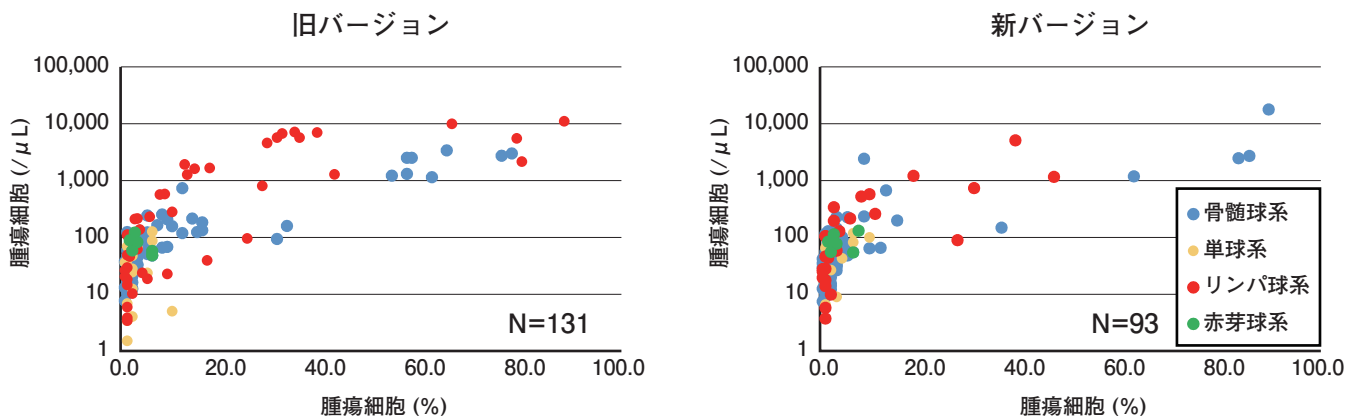


図1. 偽陰性群の腫瘍細胞数および腫瘍細胞割合の分布

changes (AML-MRC) 2 検体, リンパ球系は Acute lymphoblastic leukemia (ALL) 3 検体, Sezary syndrome 1 検体, Mantle cell lymphoma (MCL) 1 検体であった. APL については腫瘍細胞の少ないものを含めると 8 検体中 7 検体が見落としていた. 偽陰性の症例について, 細胞形態およびスキヤッタグラムを示した (図 2).

Case1 : AML-MRC の症例. 腫瘍細胞数 20,171/ μ L, 腫瘍細胞割合 81.5% であった. 細胞形態は大型で N/C 比大, 核型は類円形, 細胞質にアズール顆粒は認めない比較的単純な形態の芽球であった. そのため WDF チャンネルのスキヤッタグラムにおいては単核細胞 (リンパ球~単球) 領域に広く分布, WPC チャンネルにおいては正常細胞と比較し低側方蛍光方向に分布していたが, 出力された Flag は “WBC Abn Scattergram”, “Lymphocytosis”, “Monocytosis” および “Leukocytosis” のみであった.

Case2 : APL の症例. 腫瘍細胞数 2,995/ μ L, 腫瘍細胞割合 78.0% であった. 細胞形態は大型で N/C 比大, 核型は切れ込みや分葉を認め, 細胞質に豊富なアズール顆粒を認める複雑な形態で

あった. WDF スキヤッタグラムにおいては幼若顆粒球領域に広く分布しており, WPC チャンネルでは明らかな分布異常は見られなかった. 出力された Flag は “WBC Abn Scattergram”, “IG Present” および “Left Shift?” であった.

Case3 : Sezary syndrome の症例. 腫瘍細胞数は 5,676/ μ L, 腫瘍細胞割合は 35.5% であった. 細胞形態は大型で核型不整な細胞であった. WDF スキヤッタグラムにおいては単核細胞領域に分布しており, 側方散乱光 (SSC) は正常細胞と比較し広い傾向にあった. WPC チャンネルにおいては低側方蛍光方向に少数のプロットが見られた. 出力されたフラグは “WBC Abn Scattergram”, “Monocytosis” および “Leukocytosis” であった.

以上より, 腫瘍細胞に対する Flag のみでは限界があり, “Lymphocytosis” や “Monocytosis”, “IG Present” など, 数的な Flag についても腫瘍細胞検索のロジックに組み込む必要があった.

各系統における腫瘍細胞の検出感度を検索するため, 陽性であった症例および WDF, WPC チャンネル

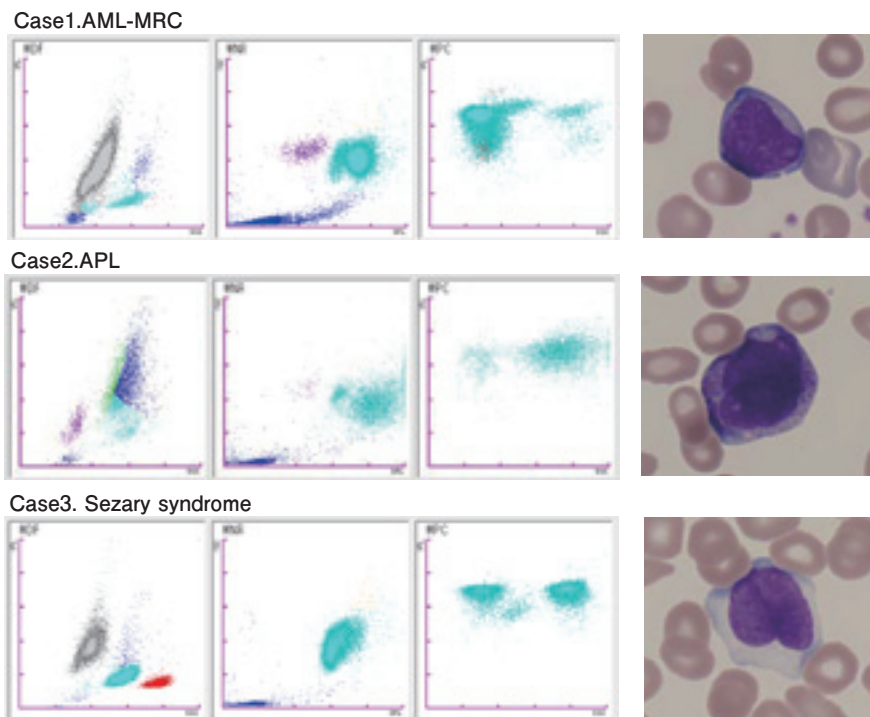


図 2. 偽陰性症例のスキヤッタグラムと細胞形態

にて見落とした症例の腫瘍細胞数を比較した(図3)。単球系はWDF, WPCチャンネルともに偽陰性は細胞数少数例であり最大126/ μ Lであった。一方、骨髓球系およびリンパ球系は旧バージョンと比較し改善は見られたものの、腫瘍細胞の多い症例においても見落としがあり、最小検出感度の把握は難しかった。

4. 目視鏡検における細胞形態との比較

両バージョンにおいて、細胞形態による腫瘍細胞検出感度を比較したところ、核の切れ込み、くびれなしは60.4%が73.4%、顆粒なしは62.7%が74.7%、小型細胞は58.7%が73.2%と大きな向上が見られた(表3)。

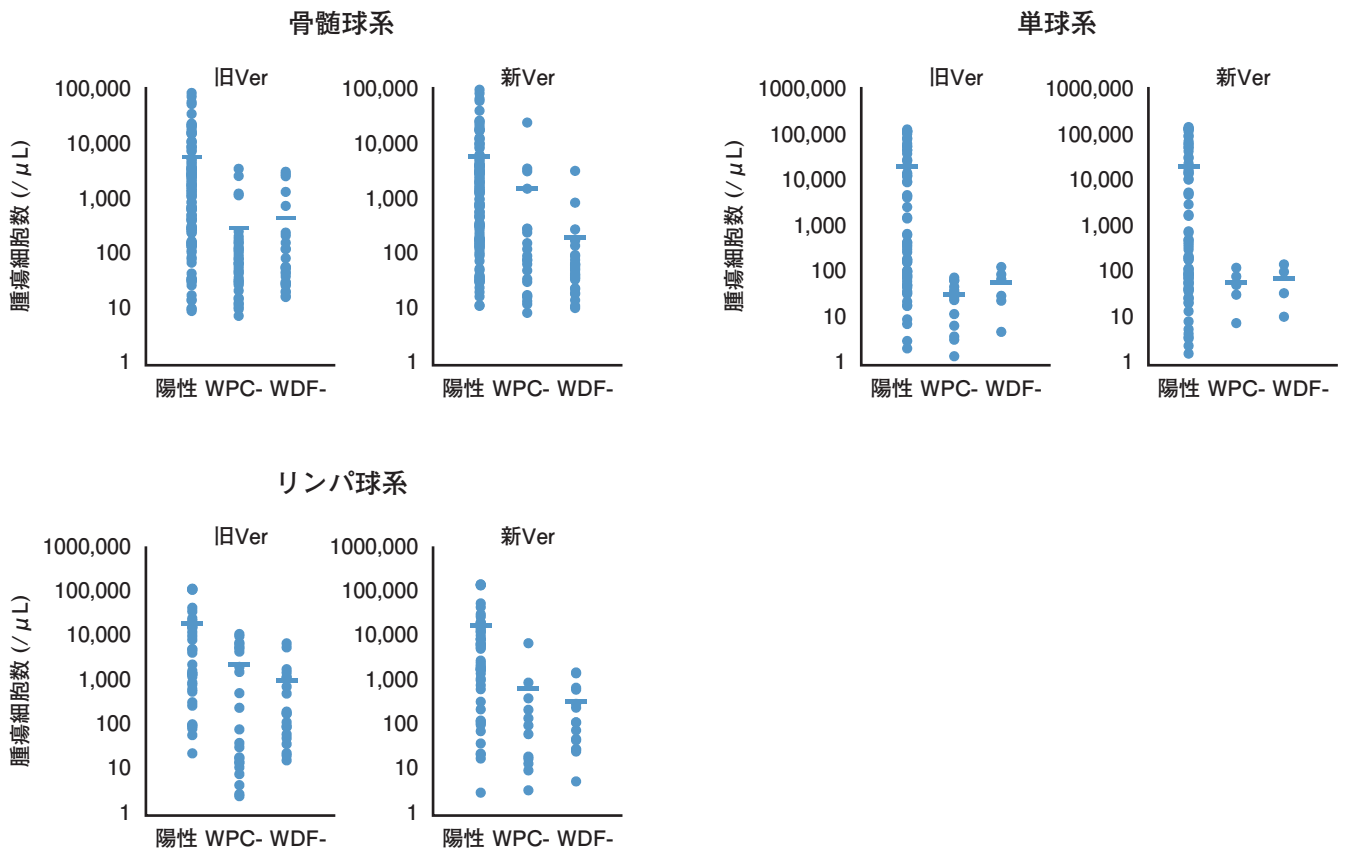


図3. 偽陰性群の各チャンネルにおける腫瘍細胞数の分布

表3. 腫瘍細胞の形態所見と感度の比較

観察ポイント	分類	Ver.	感度
細胞の大きさ	小 (14 μ m 未満)	old	58.7%
		new	73.2%
	大 (14 μ m 以上)	old	67.9%
		new	73.4%
切れ込み, くびれ	あり	old	69.2%
		new	72.0%
	なし	old	60.4%
		new	73.4%
顆粒, 空胞の有無	あり	old	65.7%
		new	60.0%
	なし	old	62.7%
		new	74.7%

考 察

XNシリーズは細胞を正確に測定するため多彩なチャンネルが搭載されており、かつこれらは自動再検機能により検査業務の効率化が可能である。WDFチャンネルおよびWPCチャンネルもその一つであり、腫瘍細胞の検出に有用である。これらのチャンネルは核酸を持つ細胞小器官を染色する蛍光色素と非イオン界面活性剤を含有する試薬で血液を処理し、細胞の形態学的情報、脂質ラフトの含有率に起因する界面活性剤に対する細胞膜の抵抗性、染色された残存細胞小器官の相違に基づき細胞が分画される⁵⁻⁹⁾。これにより正常検体は高い再現性で迅速に結果を得ることができる。しかし、腫瘍細胞出現例は未だ適切な分類ができず、目視鏡検に頼っているのが実状である。このことから血球計数装置に求められるのは高感度、高特異度で検出し、目視鏡検へ引き継ぐことであると考えている。血球計数装置を有効に活用するためには、各施設で十分に検討のうえその施設にあったロジックを組むことが重要である。しかし一般社団法人日本臨床衛生検査技師会検査部門で日常の血液像検査がより効率的で信頼性の高い検査となることを目的とし、「血液形態検査における目視再検基準に関する指針」をテーマとしてプロジェクト研究を行い、

実態把握を目的とするアンケート調査を行っているが¹⁾、目視鏡検を行う基準として98.6%の施設が“異常Flagが出現した場合”と挙げているのに関わらず、そのFlagの設定根拠は“経験上から”、“その装置を信用して”等エビデンスの乏しい理由が多く“自施設で検討して”と答えた施設はわずかであった。

今回の検討において、バージョンアップにより各システムにおいて腫瘍細胞に対する感度の向上が確認できた。特に単球系においては89.4%と高感度を示しており、腫瘍細胞数も126/ μL 以上の症例はすべて検出していた。骨髓球系およびリンパ球系においては感度の大きな向上は見られたものの、少数ながら腫瘍細胞数1,000/ μL もしくは20%以上の症例を認め、偽陰性となる可能性があった。

形態学的特徴から、従来より自動血球計数装置にて見落としやすいと報告されている^{10, 11)} Adult T cell leukemia (ATL)やFollicular lymphoma (FL)について解析したところ旧バージョンでは19検体中12検体で腫瘍細胞数10,000/ μL 以上の症例でも見落としがあったが、新バージョンでは6検体と改善が見られ腫瘍細胞数も600/ μL 以下の少数例のみであった(図4)。以上よりリンパ球系において小型～中型、N/C比大の細胞群において大きな改善があったと考えられた。

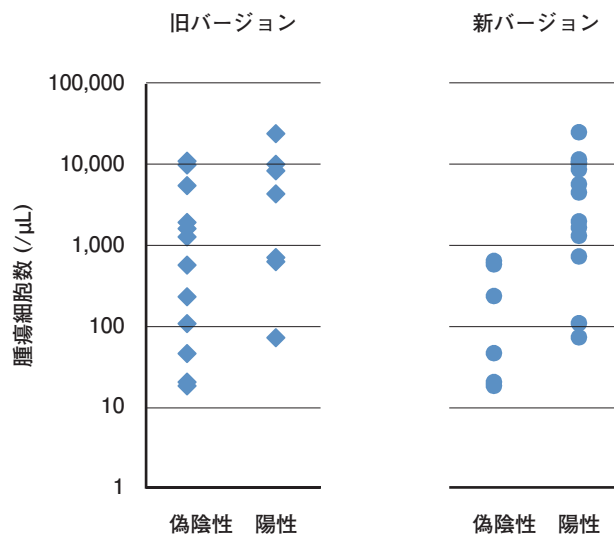


図4. ATL および FL の検出状況と腫瘍細胞数

鏡検による腫瘍細胞形態との比較においても、核の切れ込み、くびれなし、顆粒なしおよび小型細胞において大きな感度の向上が見られた。これは核の分葉、豊富なアズール顆粒が特徴である APL において改善が見られなかったこと、腫瘍細胞が小型～中型で細胞質内顆粒の見られない ATL や FL において改善が見られたことと一致していた。

当院の腫瘍細胞検出に対するロジックを示した(図5)。まず WDF チャンネルが陽性の場合、WPC にて再検し陽性であれば目視鏡検を、陰性であり図に示したその他の該当項目がなければ機械値を報告している。WDF チャンネル陰性の場合も同様である。なお、当院における各 Flag の設定値は“Lymphocytosis”：4,000/ μ L もしくは 50% 以上, “Monocytosis”：1,000/ μ L もしくは 15% 以上, “Leukocytosis”：WBC15,000/ μ L 以上, “IG Present”：IG1.4% 以上に設定している。初診患者は Negative であった場合、機械値にて報告するが、その後、異常細胞や異常所見の有無について確認している。すでに造血器腫瘍の診断がついている患者については検査システムにて登録し、必ず目視鏡検を行うようにしている。腫瘍細胞の出現する確率の高い血液内科は全例、他科については医師の依頼があった場合、測定結果に関わらず、必ず目視

鏡検を行っている。また、当院は検体検査をワンフロアーにて行っており、TP、免疫グロブリン、LD、可溶性 IL-2 レセプターなどの生化学検査や ATL 抗体などの感染症検査も腫瘍細胞の存在を疑う異常値があった場合、相談しながら報告している。これが主治医の予期せぬ結果であり精査の依頼がない場合、いち早く診断できるよう検査室より疑われる疾患と必要な検査を提示している¹²⁾。

血球計数装置を使用する上で、我々臨床検査技師の役割は装置の特性を把握しそれを補うようなロジックを作成することが重要である。また血球計数装置は多くのリサーチ項目が存在しているため、データを解析しロジックに組み込める項目の模索が検出感度の向上につながる。

結 語

自動血球計数装置の進歩は目覚ましいが、本研究が示したように、腫瘍細胞の検出など検査技師の目視には未だ及ばない点も存在する。メーカーにはさらなる性能向上を期待する。また、検査部門においては複雑化する装置を使いこなすことが求められている。本研究がその一助となれば幸いである。

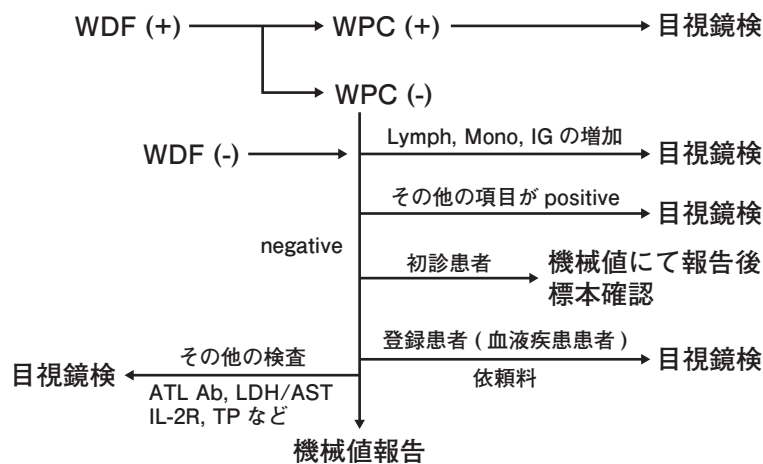


図5. 当院のCBCにおける腫瘍細胞検出口ジック

参考文献

- 1) 岸孝彦 他. 血液形態検査(白血球系)における目視再
検基準に関する指針 施設の現状 アンケート調査結
果より: 医学検査. 2007; 56(5): 817-823
- 2) 濱田悦子 他. 多項目自動血球分析装置 XN-3000 の検
査業務効率に及ぼす改善効果 1. 測定性能の観点より:
Sysmex J. 2014; 15(2): 1-18
- 3) 谷田部陽子 他. 新規多項目自動血球分析装置 XN-1000
の性能評価: 日本検査血液学会雑誌. 2013; 14(1):
34-40
- 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.1 神戸: シスメックス
株式会社 学術本部. 2011.
- 5) 越智康浩, 丸木佳子 他. 多項目自動血球分析装置
XN-Series の概要: シスメックス株式会社 学術本部.
2011; 34.
- 6) 高木由里 他. XN 専用試薬処理後の白血球のフローサ
イトメトリーの光学情報と顕微鏡画像情報との比較:
Symex J. 2016; 17(2): 1-7
- 7) 河内佐和子 他. 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:
Sysmex J. 2013; 14(2): 1-10
- 8) Kawauchi S, Kono M, Takagi Y, et al. The Positions of
Normal Leukocytes on the Scattergram of the Newly
Developed Abnormal Cell-detection Channel of the XN-Series
Multi-parameter Automated Hematology Analyzers: Sysmex J
In. 2013; 23(1): 1-9
- 9) Takagi Y, Kono M, Yamamoto S, et al. Comparison of
optical data from flow cytometry and microscopy of leukocytes
after exposure to specific reagents: Microscopy. 2015; 64
(5): 305-310
- 10) 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
- 11) 宮地勇人 他. 末梢血検査で見落とししやすい造血器腫
瘍の原因と対策: 日本臨床検査自動化学会会誌. 2003:
28(2): 102-106
- 12) 永井直治 他. 骨髄移植における臨床検査技師の役割
-血液検査-: 臨床病理. 2017; 65(3): 339-344

Flagging Performance Evaluation for Hematopoietic Tumor Cells of Upgraded Software Version by Automated Hematology Analyzer XN Series

Naoharu NAGAI, Riku TAKAHASHI, katsuyo TSUDA, Masashi SHIMADA, Shuji MATSUO

Department of Laboratory Medicine, Tenri Hospital, 200 Mishima, Tenri, Nara, Japan 632-8552

SUMMARY

A flagging algorithm against hematopoietic tumor cells in Sysmex Automated Hematology Analyzer, XN-series was improved with a software upgrade. This time, we performed a comparison study of the previous software version and the upgraded version. Of the peripheral blood specimens collected in EDTA2K tubes, we analyzed 358 specimens that confirmed the presence of blasts or abnormal lymphocytes by blood smears, and 100 negative control specimens within 4 hours of collection by the previous version (Ver16) and the upgraded version (Ver20).

Sensitivity and specificity of both WDFch ("Blasts/AbnLympho?" Flag) and WPCch ("Blasts?" or "Abn Lympho?" Flag) were compared by both software versions in this study. Sensitivity and specificity against the presence of tumor cells were determined as following: 63.4% and 100%, respectively, in the previous version, and 74.0% and 100.0%, respectively, in the upgraded version. Sensitivity of tumor cell lines in both the previous version and the latest version was determined as following: 65.2% and 71.8%, respectively, in myeloid cells, 77.6% and 89.4%, respectively, in monocytic cells, 44.9% and 65.4%, respectively, in lymphocytic cells, and 57.1% and 57.1%, respectively, in erythroblasts. These results indicated a huge improvement especially to detect monocytic and lymphocytic tumor cells. A count of tumor cells in the specimens analyzed by the upgraded version were 8 ~ 2,995/uL in myeloid cells, 7~126/uL in monocytic cells, 4~5,676/uL in lymphocytic cells, and 57~140 /uL in erythroblasts, and this indicated the possibility for oversight in spite of larger counts of cells such as myeloid and lymphocytic tumor cells. There is a limit to detect tumor cells only by flagging messages such as "Blast?" or "Abn Lympho?". It is important to utilize other messages such as "WBC Abn Scattergram", "Lymphocytosis", "Monocytosis", and "IG Present" that likely to be appeared on the measurement results of specimens that confirmed the presence of hematopoietic tumor cells, and also to build suitable workflow for microscopic examination by rule settings based on specific diseases or clinical departments.

Key Words XN Series, Tumor Cells, Sensitivity
