

# 多項目自動分析装置 XN シリーズの WNR チャンネルにおける有核赤血球と好塩基球の識別原理の検証

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

シスメックス株式会社 学術本部 学術研究部 リサーチ課

## 要 旨

**背景：**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 WNR チャンネルは, 白血球の計数, 好塩基球および有核赤血球の分類・計数を行っている。WNR チャンネルの専用試薬である酸性溶血剤は血球細胞の細胞膜を破壊し, 同時に添加される蛍光染色液によって有核赤血球や白血球の核酸を含む細胞小器官を染色する。そしてフローサイトメトリーで得られたそれぞれの細胞の前方散乱光強度 (以下, FSC) と側方蛍光 (以下, SFL) の情報をスキャッタグラムに展開する。本論文では, WNR チャンネルにおける有核赤血球と好塩基球の識別原理について報告する。

**方法：**健康者の末梢血と臍帯血由来の有核赤血球を WNR 専用試薬で反応させ, 汎用のフローサイトメーター (FCM) でスキャッタグラム上の各血球の出現位置を確認した。さらに, 透過型電子顕微鏡 (以下, TEM) で WNR 専用試薬処理によって生じた細胞の形態の変化を観察した。

**結果：**汎用 FCM の結果, 好塩基球は他の白血球よりも FSC, SFL とも高い位置に出現した。また, 有核赤血球は白血球よりも SFL が低い位置に出現した。TEM 観察の結果, 有核細胞は WNR 専用試薬処理後の細胞質 (細胞小器官を含む) の残存度合いが異なっていた。一方で, 網赤血球と赤血球は検出されなかった。

**考察：**今回の結果より, 各血球細胞のスキャッタグラム上の出現位置の違いは, 細胞内の細胞質の残存度と WNR 専用試薬で染色される核酸量の違いに相関していることが示唆された。

### キーワード

自動血球計数分析装置, フローサイトメトリー, 透過型電子顕微鏡, 白血球, 有核赤血球, 散乱光強度, 蛍光強度

## はじめに

好塩基球は健康者末梢血中の白血球に 1 ~ 2 % の割合で含まれており, ヘパリンとヒスタミンの顆粒を持ち, 慢性炎症や感染性障害だけでなく, 慢性骨髄性白血病, 他の骨髄増殖性の疾患で末梢血中に増加することが知られている<sup>1)</sup>。有核赤血球は赤血球の分化過程で脱核する幼若な赤血球で<sup>2~4)</sup>、健康者の末梢血中にはほとんど認められないが, 重度の貧血, 出血, 低酸素症などで骨髄が刺激された場合, 末梢血中に現れる。巨赤芽球性貧血症の患者では, 末梢血中の有核赤血球は巨大赤芽球様の核の形態である

ことが報告されている<sup>5~7)</sup>。また, 臍帯血, 胎児, 新生児の末梢血に含まれることが報告されている<sup>8~12)</sup>。

臨床検査室において, 好塩基球および有核赤血球の分類・計数は, ウェッジ法などにより作成された血液塗抹標本を用いて顕微鏡下で行われる。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) では, 2 名の熟練した臨床検査技師が各有核の血球を顕微鏡下で 200 細胞計数し, 白血球数に対する有核赤血球の数を 100 分率として算出する<sup>13)</sup>。しかし, この方法は工数がかかり, さらに計数される有核赤血球数が少なすぎるため, 技師による統計的なバラツキが生じ

\* 本稿は, Practical Laboratory Medicine 8 (2017). doi:10.1016/j.plabm.2017.05.001 の文献を翻訳・転載したものです。

Web 公開日: 2017 年 9 月 25 日

やすい。そのため、迅速かつ信頼性のある方法として計数測定が自動化が求められてきた。ところが、汎用のフローサイトメーター（以下、FCM）では、有核赤血球に特異的なマーカー（抗体を用いた免疫学的手法）がないため、網赤血球や赤血球との識別ができない。また、電気抵抗法（インピーダンス法）では、有核赤血球と同じくらいのサイズの白血球を分離することが難しく、特異性が低いことが問題であった<sup>14)</sup>。そのため、現在では、適切な界面活性剤と蛍光染色剤を組み合わせたフローサイトメトリーで有核赤血球を弁別する方法が一般的となっている<sup>15)</sup>。この原理を用いた計数方法は、低コストで測定時間が短く、さらに相当数の細胞を測定することができるため、技術者によって生じるバラツキが小さいなどのメリットがある。

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、XN シリーズ）は蛍光染色法とフローサイトメトリーの原理を組み合わせた多項目自動血球分析装置である。測定項目の一つである WNR チャンネルでは、好塩基球と有核赤血球を弁別、計数することができる。測定の過程では、界面活性剤である酸性溶血剤（ライザセル WNR）で細胞膜に穴を開け、網赤血球と成熟赤血球を溶血させるとともに、有核赤血球と白血球の細胞膜を損傷させる。同時に添加される蛍光染色液（フルオロセル WNR）によって、血球細胞の核酸や細胞小器官を蛍光染色する。そして、XN シリーズに搭載されている半導体レーザーより 633 nm の光を細胞に照射し、蛍光染色された細胞内構造物の量を側方蛍光強度（以下、SFL（横軸））として、細胞の大きさを前方散乱光強度（以下、FSC（縦軸））として測定する。そして得られた情報をもとに 2 次元のスキヤッタグラムである WNR スキヤッタグラムを描く。WNR スキヤッタグラム上では、好中球や T リンパ球などの白血球と比較して、好塩基球は SFL 強度、FSC 強度がともに高い位置に、有核赤血球は SFL 強度が低い位置に出現する<sup>16-18)</sup>。しかし、好塩基球や有核赤血球がどのような原理でその他の白血球と異なる位置に出現するかについてはこれまでに示されていなかった。そこで本論文では、WNR 専用試薬処理前後の各血球細胞の形態の変化に着目し、有核赤血球と好塩基球がそ

れぞれ異なる SFL 強度、FSC 強度を持つ事由を検討した。具体的には汎用 FCM でそれぞれの血球細胞の出現位置を確認後、透過型電子顕微鏡で WNR 専用試薬処理による各細胞の形態がどのように変化するかを観察し、各血球細胞のスキヤッタグラム上の出現位置との相関性について検討を行った。

## 材料と方法

### 1. 検体の準備

2012 年 6 月から 2015 年 3 月にボランティアの健康者末梢血 4 検体（インフォームド・コンセント実施済み）、または臍帯血 4 検体（インフォームド・コンセント実施済み、理化学研究所バイオリソースセンター）を入手した。

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、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た。

### 2. 細胞の調整

検体を  $d=1.077$  と  $d=1.119$  の 2 種類のリンパ球分離液（ナカライテスク株式会社）を用いた比重遠心法（ $100\times g$ 、20 分間）により、各検体中の白血球、または有核赤血球の濃度を高めた後、PBS で洗浄した。各種類の白血球についてはメーカーの指示書に従い、好中球、T リンパ球、好塩基球を MACS システム（ステムセル・テクノロジーズ、ベリタス株式会社）のネガティブセレクションを用いて分離した。分離した好中球を FITC で標識した CD16b（好中球のマーカー）、T リンパ球を CD3（T リンパ球のマーカー）、好塩基球を CD123（好塩基球のマーカー）モノクローナル抗体（DAKO）溶液（20 mg/L in PBS）中で 30 分間 4 °C にて染色し、FASCalibur™（BD バイオサイエンス株式会社）で分離純度が 80% 以上であることを確認した。陰性対照には FITC で標識したマウス IgG1 抗体（DAKO）を用いた。

### 3. XN-2000 での測定

多項目自動血球分析装置 XN-2000（シスメックス、以下、XN-2000）の WNR チャンネルで、末梢血と臍帯血を測定した。

#### 4. 汎用フローサイトメーター FACSCalibur でのスキヤッタグラムの解析

MACS システムで分離した各白血球を WNR 専用試薬、ライザセル WNR (シスメックス) とフルオロセル WNR (シスメックス) で XN-2000 と同様の手順 (細胞懸濁液: 18 L, :ライザセル WNR 1,000 L, フルオロセル WNR 1 L を混合) で反応処理を行った。有核赤血球を濃縮した臍帯血は、Phycoerythrin (PE) で標識したマウス抗 CD71 モノクローナル抗体 (DAKO) 溶液 (20 mg/L PBS) 中で 30 分間 4 °C にて染色し、さらに、白血球と同様の方法で WNR 専用試薬との二重染色を行った。FACSCalibur で縦軸に FSC 強度、横軸に SFL 強度を取り、感度を調節して WNR スキヤッタグラムを再現した。

#### 5. 有核赤血球の分離

比重遠心法により有核赤血球濃度を高めた臍帯血を、PE- 抗 CD71 (幼若赤血球のマーカー)、および FITC- マウス抗 CD45 (白血球マーカー) モノクローナル抗体 (DAKO) 溶液 (20 mg/L in PBS) 中で 30 分間 4 °C にて染色し、CD71 陽性・CD45 陰性の網赤血球と有核赤血球を含む画分をセルソーター (SH800: ソニー株式会社) で分取した。陰性対照には PE または FITC で標識したマウス IgG 抗体 (DAKO) を用いた。分取した画分を 2. と同様に WNR 専用試薬で処理し、透過型電子顕微鏡での解析に用いた。

#### 6. 透過型電子顕微鏡 (以下, TEM) による観察

2. または 5. で WNR 専用試薬で処理した好中球, T リンパ球, 好塩基球または幼若赤血球を, 1% グルタルアルデヒド (Electron Microscopy Sciences) / PBS, 4°C で 16 時間固定した。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株式会社) を用いてマスコートスライドガラス (松浪硝子株式会社) に接着させた。1% 四酸化オスmium で室温で 45 分間の後固定を行った後, エタノール系列で脱水し, クエトール 812 樹脂 (日新 EM 株式会社) 倒立包埋した。包埋したサンプルをウルトラミクロトーム Ultracut UCT (ライカ・マイクロシステムズ株式会社) で超薄切片を作製し, 透過型電子顕微鏡 H-7500 (株式会社日立ハイテクノロジー) で観察した。

## 結果

### 1. XN-2000 の WNR スキヤッタグラム上で末梢血と有核赤血球の細胞群が出現する

XN-2000 の WNR チャンネルで健常者末梢血と有核赤血球を濃縮した臍帯血を測定し, WNR スキヤッタグラム上の各血球細胞の出現位置の確認を行った。末梢血の検体では, 好塩基球として分類される位置 (図 1-A 黄色の点) とその他の白血球として分類される位置 (図 1-A 水色の点) にそれぞれ細胞群を形成した。臍帯血の検体では, 有核赤血球として分類

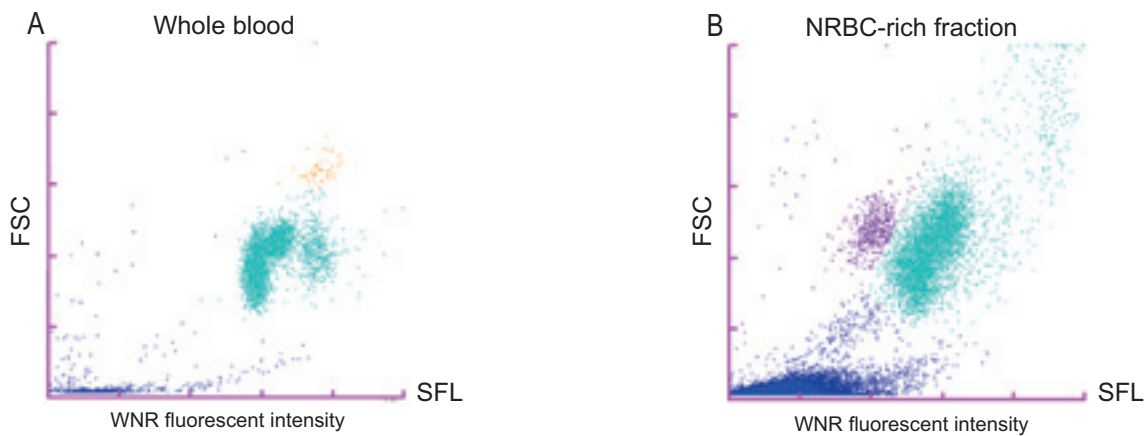


図 1. XN シリーズの WNR スキヤッタグラムでの末梢血中の白血球と臍帯血の各血球細胞の出現位置

(A) 健常者末梢血の検体: XN シリーズで好塩基球 (黄色の点), その他の白血球 (水色の点) として分類される位置に細胞集団が出現した。  
 (B) 有核赤血球を濃縮した臍帯血の検体: XN シリーズで有核赤血球 (紫の点), その他の白血球 (水色の点) として分類される位置に細胞集団が出現した。

される位置 (図 1-B 紫の点) と、その他の白血球として分類される位置 (図 1-B 水色の点) に細胞群が出現した。

**2. 汎用 FCM において各白血球は WNR スキャッタグラムと同じ位置に出現する**  
好塩基球, Tリンパ球, 好中球が汎用 FCM のス

キャッタグラム上のどの位置に出現するかについての検証を行った。健康者末梢血から濃度勾配遠心法とマグネット法で分離した好塩基球, Tリンパ球, 好中球の分離純度がそれぞれ 80 % 以上であることを FACSCalibur で確認した (図 2-A)。次に, 分離した好塩基球, Tリンパ球, 好中球を WNR 専用試薬で処理後, FACSCalibur を用いて, WNR スキャッタグラムを

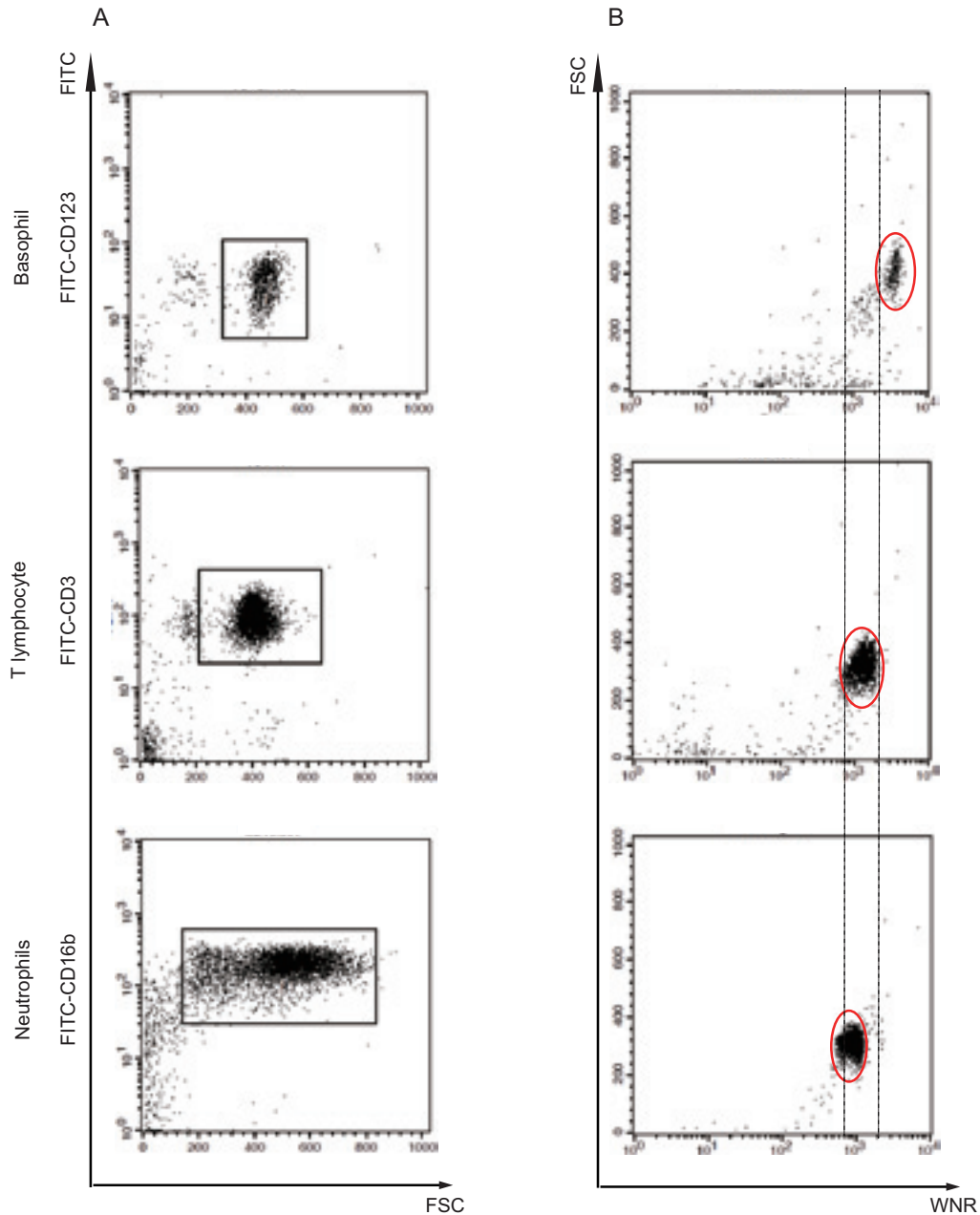


図 2. FACSCalibur (汎用 FCM) による末梢血より分離した好塩基球, Tリンパ球, 好中球のそれぞれのスキャッタグラム

(A) 各細胞の純度確認

好塩基球: FITC-抗 CD123 抗体, Tリンパ球: FITC-抗 CD3 抗体, 好中球: FITC-抗 CD16b 抗体で標識後, FACSCalibur で純度を確認した。精製純度は好塩基球: 84.3%, Tリンパ球: 89.0%, 好中球: 92.0%であった。

(B) 分離した好塩基球, Tリンパ球, 好中球の WNR 専用試薬処理後の FACSCalibur スキャッタグラムを示す。好塩基球 (上段) は Tリンパ球 (中段), 好中球 (下段) よりも FSC, SFL 強度が高い位置に出現した。

再現し、それぞれの白血球の出現位置の検証を行った。その結果、好塩基球はTリンパ球、好中球よりFSC強度、SFL強度ともに高い位置(図2-B 上段)、一方で、Tリンパ球、好中球は好塩基球よりFSC強度、SFL強度ともに低い位置に出現した(図2-B 中段, 下段)。つまり、汎用FCMのスキヤッタグラム上の好塩基球は、WNRスキヤッタグラム上の好塩基球として分類される位置に(図1-A 黄色の点)、Tリンパ球、好中球はWNRスキヤッタグラム上のその他白血球として分類される位置に出現した(図1-A 水色の点)。

### 3. 汎用FCMにおいてCD71陽性細胞はWNRスキヤッタグラムと同じ位置に出現する

次に、汎用FCMのスキヤッタグラム上のどの位置に有核赤血球が出現するかについての検証を行った。臍帯血を幼若赤血球マーカーであるCD71の特異的な抗体とWNR専用試薬による二重染色を行い、FACSCaliburを用いて有核赤血球の出現位置の検証を行った。まずPEで標識したCD71抗体で単色染色すると、CD71-PE陽性細胞集団がスキヤッタグラムのSFL強度が高い位置に出現した(図3-A, B 赤色の点)。次に、WNR専用試薬で染色すると、全体の細

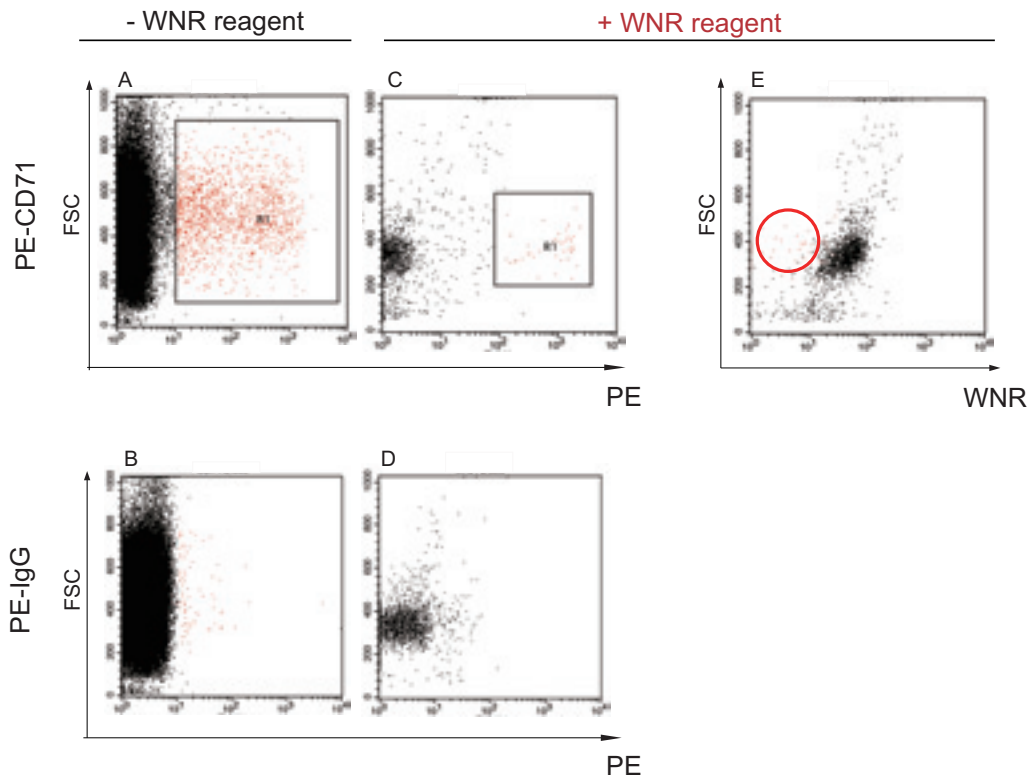


図3. FACSCaliburによる有核赤血球のスキヤッタグラム

臍帯血から濃縮した有核赤血球をPEで標識した抗CD71抗体(B, D)もしくは抗IgG抗体(A, C, E)で染色、さらにWNR専用試薬との共染色(C-E)し、FACSCaliburで解析を行った。

(A, B) PE陽性細胞はスキヤッタグラムの右側に出現した(黒枠, 赤色の点)。

(C, D) WNR専用試薬処理後では、全細胞数とPE陽性細胞(赤色の点)が減少した。

(E) FACSCaliburによるWNRスキヤッタグラムの再現。PE陽性細胞(赤色の点)のSFL強度はPE陰性細胞(黒色の点)よりも低く、XNシリーズのWNRスキヤッタグラムで有核赤血球として想定される位置(赤丸枠)に出現した。

胞数 (図3-C, D) と CD71 陽性細胞数はともに大きく減少した (図3-C 黒枠). さらに WNR 専用試薬処理後に残った CD71 陽性細胞をゲーティングし (図3-C 黒枠), 縦軸を FSC, 横軸を WNR 専用試薬蛍光強度 (SFL) に変更し, WNR スキャットグラムを再現した (図3-E). その結果, CD71-PE 陰性細胞集団 (図3-C, E 黒点) よりも SFL 強度が低い位置に CD71 陽性細胞集団が出現した (図3-E 赤丸枠).

#### 4. 血球細胞の種類によって WNR 専用試薬反応後の細胞質の形態変化が異なる

透過型電子顕微鏡で WNR 専用試薬処理による好塩基球, Tリンパ球, 好中球および網赤血球, 有核赤血球の形態の変化について観察を行った (図4). WNR 専用試薬処理前において, それぞれの白血球では典型的な特徴が認められた (図4-C ~ E)<sup>18, 19)</sup>. CD71 陽性・CD45 陰性の血球画分では脱核後の網赤血球と脱核前の有核赤血球の両方が存在した (図4-A, B). 一方, WNR 専用試薬反応後では, 脱核後の網赤血球は検出できなかった. 次に, 有核細

胞について比較すると, 好塩基球, リンパ球の順に細胞質が残っていたのに対し, 好中球, 有核赤血球の細胞質はほとんど消失し, 核が残っていた (図4-F ~ I).

## 考 察

今回, 汎用 FCM を用いて WNR スキャットグラムを再現することによって, 各血球細胞のスキャットグラム上での出現位置を検証した. 末梢血から分離した白血球では, 好塩基球は SFL 強度, FSC 強度がともに好中球, リンパ球より高い位置に出現することを確認した (図2-B). さらに, 共焦点顕微鏡での観察によって得られた結果を反映していることが示された<sup>18)</sup>. 臍帯血では, CD71 陽性細胞および陰性細胞とも, WNR 専用試薬処理により細胞数が減少したことから, 網赤血球と赤血球が WNR 専用試薬の溶血作用により消失したと考えられた. さらに, CD71 陽性細胞の電子顕微鏡の観察で, 網赤血球と赤血球が検出できなかったことから, CD71 陽性

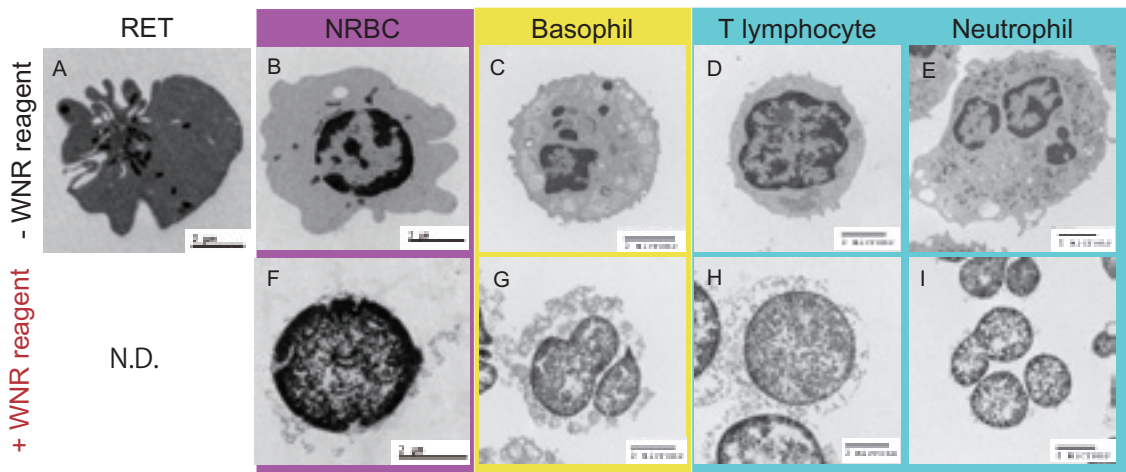


図4. WNR 専用試薬処理前後の各血球細胞の形態の変化 TEM 観察

(A-E, 上段) WNR 専用試薬処理前では, それぞれの血球細胞に特徴的な形態が観察された.  
 (F-I, 下段) WNR 専用試薬処理後では, 網赤血球は溶血して消失しており, 検出できなかった. 有核細胞について比較すると, 好塩基球, リンパ球の順に細胞質が残っていたのに対し, 好中球, 有核赤血球の細胞質はほとんど消失し, 核が残っていた.

細胞の有核赤血球と CD71 陰性細胞の白血球が残ることが示唆された (図 3-A, C)。その結果, WNR 専用試薬処理により残った有核赤血球は白血球よりも SFL 強度が低い位置に出現することが示された (図 3-E 赤丸枠)。次に, WNR 専用試薬処理による細胞形態の変化に着目し, 血球細胞の種類による WNR スキャットグラム上での出現位置の違いとの相関性について検討した。TEM による観察を行った結果, WNR 専用試薬処理後の白血球では, 好塩基球, リンパ球, 好中球の順に細胞質を残し, 好中球ではほぼ核のみになり (図 4-G ~ I), WNR スキャットグラム上での蛍光強度は白血球の細胞質の残り具合に相関することが示された。一方, CD71 陽性細胞の TEM 観察の結果から, 有核赤血球は好中球と同様に細胞質はほとんど消失し, ほぼ核だけを残すことが明らかになった (図 4-F, I)。そのため, WNR 専用試薬反応後, ほぼ核のみとなった有核赤血球と好中球の両者のスキャットグラム上の出現位置はほぼ同じであると推測された。今回の検証において, 有核赤血球とその他の白血球細胞の前方散乱光強度 (FSC) は同じ値を示した (図 1-B, 3-E)。しかし, 実際には, 側方蛍光 (SFL) では, 臍帯血由来の有核赤血球の蛍光強度は白血球に比べて低くなり, 蛍光強度の違いが生じ, その結果, 白血球の細胞集団と弁別された (図 1-B, 3-E)。その理由として, 有核赤血球は白血球より核内の核酸総量が少なくなることが考えられる。赤血球の分化の過程で, 有核赤血球は脱核する際に, 細胞質に存在するポリソームの数が減ることが電子顕微鏡による観察され, アミノ酸合成が減ることが報告されている<sup>20)</sup>。そのため, 有核赤血球の核内のメッセンジャー RNA や, リボソーム RNA の量が減っていることが推察される。

好塩基球, 有核赤血球ともに健常人の末梢血中には僅かしか存在しない。このような血球を顕微鏡下で目視計数すると, どうしても検査数値のバラツキが多くなる。しかし, 蛍光染色法とフローサイトメトリーの原理を組み合わせれば, 短時間で多くの血球について調べることができ, 技術者によるバラツキを防ぐことができる。したがって, 好塩基球と有核赤血球を自動血液分析装置で測定するメリットは非常に大きいと考えられる。

## 参考文献

- 1) M. Blumenreich. The white blood cell and differential count. Clin. Methods Hist. Phys. Lab. Exam. 3rd Ed. 1990 : 724-727. <http://newmodernlabservices.com/userfiles/file/WBC DLC.pdf>.
- 2) P. R. Sarma, Red Cell Indices, Clin. Methods Hist. Phys. Lab. Exam. 1990 : 720-723. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK260/>.
- 3) E. Skutelsky, D. Danon, An electron microscopic study of nuclear elimination from the late erythroblast. J. Cell Biol. 1967 ; 33 ( 3 ) : 625-635
- 4) C. F. Simpson, J. M. Kling, The mechanism of denucleation in circulating erythroblasts. J. Cell Bio. 1967 ; 35 ( 1 ) : 237-245. doi:papers2://publication/uuid/5F15988A-99C1-4997-B46E-D373EAF8B06B.
- 5) H. Walker et al. Peripheral blood smear Clin. Methods Hist. Phys. Lab. Exam. 3rd Ed. 1990 : 732-734. doi:10.1016/j.clineuro.2010.12.012.
- 6) B. T. Constantino et al. Nucleated RBCs—Significance in the Peripheral Blood Film. Lab. Med. 2000 ; 31 ( 4 ) : 223-229. doi : 10.1309/D70F-HCC1-XX1T-4ETE.
- 7) R. S. Neiman, Erythroblastic Transformation in Myeloproliferative Disorders ; confirmation by an immunohistologic technique. Cancer. 1980 ; 46 ( 7 ) : 1636-1640
- 8) M. C. Hermansen, Nucleated red blood cells in the fetus and newborn. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 2001 ; 84 : F211-F215. doi:10.1136/fn.84.3.F211.
- 9) B. Ghosh et al. Prediction of perinatal asphyxia with nucleated red blood cells in cord blood of newborns. Int. J. Gynecol. Obstet. 2003 ; 81 ( 3 ) : 267-271. doi:10.1016/S0020-7292 ( 03 ) 00124-3.
- 10) F. Akercan et al. Nucleated red blood cells in infants of women with preterm labor and pre-eclampsia. Int. J. Gynecol. Obstet. 2005 ; 90 ( 2 ) : 138-139. doi:10.1016/j.ijgo.2005.04.019.
- 11) H. E. Broxmeyer et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1989 ; 86 ( 10 ) : 3828-3832. doi:10.1073/pnas.86.10.3828.
- 12) C. E. Stevens et al. Placental/umbilical cord blood for unrelated-donor bone marrow reconstitution : Relevance of nucleated red blood cells. Blood. 2002 ; 10 ( 7 ) : 2662-2664. doi:10.1182/

- blood. V100.7.2662.
- 13) Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods ; Approved Standard — Second Edition. 27 ( 2008 ).
  - 14) Y. R. Kim et al. Simultaneous differentiation and quantitation of erythroblasts and white blood cells on a high throughput clinical haematology analyser. *Clin. Lab. Haematol.* 1998 ; 20 ( 1 ) : 21-29. doi:10.1046/j.1365-2257.1998.00092.x.
  - 15) G. Gulati et al. An evaluation of the performance of sysmex XE-2100 in enumerating nucleated red cells in peripheral blood, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2007 ; 131 ( 7 ) : 1077-1083. doi:10.1043/1543-2165(2007)131[1077:AEOTPO]2.0.CO;2.
  - 16) J. Y. Seo et al. Performance evaluation of the new hematology analyzer Sysmex XN-series. *Int. J. Lab. Hematol.* 2015 ; 37 ( 2 ) : 155-164. doi : 10.1111/ijlh. 12254.
  - 17) V. T. P. Nguyen et al. Spurious decrease in the WBC count measured by the WNR channel of XN haematology analyser ( Sysmex ) could be associated with metastatic adenocarcinoma. 2015 ; 37 ( 5 ) : 129-132
  - 18) Y. Takagi et al. Comparison of optical data from flow cytometry and microscopy of leukocytes after exposure to specific reagents. *Microscopy.* 2015 ; 64 ( 5 ) : 305-310. doi:10.1093/jmicro/dfv023.
  - 19) D. Zucker-Franklin, Electron Microscopic Study of Human Basophils. *Blood.* 1967 ; 29 : 878-890
  - 20) E. Skutelsky et al. Comparative study of nuclear expulsion from the late erythroblast and cytokinesis. 1970 ; 60 ( 3 ) : 427-436



# Investigation of Morphological Changes for the Discrimination of Nucleated Red Blood Cells and Other Leukocytes in Sysmex XN Hematology Analyzer Scattergrams Using Transmission Electron Microscopy

Masako KAIDO, Yuri TAKAGI, Mari KONO, Fumie NAKAZAWA,  
Shiori MATSUHIROYA-YAMAMOTO, Atsushi WADA, Takashi MORIKAWA

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

## SUMMARY

---

### Background

The WNR channel of the XN-Series automated hematology analyzer (Sysmex) counts white blood cells (WBCs) and simultaneously performs a differential counting of basophils and nucleated red blood cells (NRBCs). The detection process involves exposing the cells to WNR-specific reagents containing an acidic detergent and a fluorescent dye and measuring the intensity of the forward scattered light (FSC) and side fluorescence light (SFL).

### Method

We treated isolated peripheral WBCs and NRBCs with specific reagents and assessed the morphological changes in NRBCs and each leukocyte type using transmission electron microscopy (TEM).

### Results

The results from a flow cytometer (FCM) showed that, after exposure to the reagents, basophils appeared on the highest FSC and SFL areas compared to other leukocytes on the WNR scattergram. Owing to the hemolysis of reticulocytes and erythrocytes, NRBCs that survived the reagent treatment could be distinguished by their lower intensity than those of the other leukocytes on the WNR scattergram. We investigated the significance of the relationship between the TEM and FCM results after the reagent treatment.

### Conclusion

We confirmed that the WNR channel differentiates the blood cells on the WNR scattergram based on differences in the amount of residual cytoplasm and nucleic acids.

### Key Words

Automated Hematology Analyzer, Flow Cytometry, Transmission Electron Microscopy, Leukocytes, NRBCs, Scatter Light Intensity, Fluorescent Intensity

---

Note: This article was translated and reprinted from Practical Laboratory Medicine 8 (2017) : doi:10.1016/j.plabm.2017.05.001.