

XE-2100NRBC チャンネルにおける 当社試薬の特性について

シスメックス株式会社開発本部試薬系グループ

神戸市西区高塚台4-4-4 (〒651-2271)

SUMMARY

当社の自動血液分析装置の歴史は¹⁾、静電容量式検出器と希釈液を用いた赤血球の計数に始まり、細胞溶解試薬の開発による白血球計数、白血球の2、3分類の実現、RF/DC方式の開発による白血球5分類の実現、幼若顆粒球特異溶血剤の開発による幼若顆粒球検出の実現、HPC(Hematopoietic Progenitor Cell)測定²⁾の実現等、新しい検出器と試薬の二人三脚の開発により進んできた。一方、光学式検出原理と細胞染色技術を組み合わせたフローサイトメトリー(FCM)の開発は、網赤血球計数を実現し、さらに、臨床側へより有用な骨髓造血機能情報をフィードバックするIRF(Immature Reticulocyte Fraction)³⁾等の解析項目の提供も可能としている。今回、我々が開発した多項目自動血液分析装置「XE-2100」では、赤色半導体レーザーを用いたコンパクトなFCM検出器、NRBC測定用試薬「ストマトライザ-NR」の開発により有核赤血球(以下、NRBC : Nucleated Red Blood Cell)測定を実現するに至ったのでここに報告する。

Key Words

Flow Cytometry(FCM) Semiconductor Laser NRBC
Polymethine Dye 血球分析装置

はじめに

NRBCの測定は、サラセミア等の症例において、治療方針を決定するうえで重要な情報を提供するとともに、骨髓線維症や慢性骨髓性白血病などの慢性骨髓増殖性疾患等の診断及び病態の把握に有用な情報を与えてくれる^{4,6)}。しかしながら、従来のルーチン検査(目視法)では、細胞計数の数が通常100カウントと少なく、正確度・精度⁷⁾に問題があった。また、これまでの自動血液分析装置では、NRBCとWBCを完全に弁別することが困難であり、NRBCがWBC数に正の誤差を与える場合があった。これらの問題を解決するために、種々のFCMを用いたNRBC計数法が開発され

た⁸⁾が、実質的に満足できる結果は得られていなかった。

XE-2100は、新たに開発したNRBC検出用試薬「ストマトライザ-NR」、赤色半導体レーザーを用いたFCM検出器を使用することにより、NRBC数を精度良く計数することが可能となった。

本報告では、NRBC測定用試薬「ストマトライザ-NR」、XE-2100のNRBCチャンネルの測定原理を概説する。合わせて、FCMを用いたNRBC対照測定法について紹介する。

NRBC測定用試薬 ストマトライザ-NRについて

NRBC測定用試薬「ストマトライザ-NR」は、ポリメチン系色素を含む染色液と界面活性剤を含む酸性低浸透圧の(溶血)希釈液で構成される。以下に、試薬の構成、作用機序について概説する。

1. 染色液(ポリメチン系色素)

細胞を染色するためには、染色目的に応じて種々の色素が使用されるが、細胞を染色しFCMで測定するためには、次のように多くの特性が色素に要求される。

- 1) 蛍光色素であること。
- 2) FCMの光源(XE-2100では赤色半導体レーザー633nm)の光を吸収し、蛍光を励起可能であること。
- 3) 細胞膜透過性があり、目的とする細胞成分と特異的に結合すること。
- 4) 溶液中では蛍光を発せず、細胞成分と結合したときのみ蛍光を発すること。
- 5) 化学的に安定であること。
- 6) 毒性の低いこと。

我々は、これらの条件を満足するNRBC染色用色素として、赤色半導体レーザー(633nm)で励起可能なポリメチン系色素を開発した。ポリメチン系色素は、一般に機能性色素として、近赤外吸収色素、色素レーザー用、LB膜、カラーフィルムの増感色素など最新の工業技術を支える機能材料として利用されている⁹⁾。一方、サイトメトリー分野では、細胞膜電位測定用色素として知られているものの¹⁰⁻¹²⁾、これまで血液学検査や病理検査用色素としてはほとんど使われていなかった。しかし、ポリメチン系色素は染色用色素として優れた特性を有しており、XE-2100ではNRBCチャンネルだけではなく、Diffチャンネル、Retチャンネルにも目的に応じて好適なポリメチン系色素を開発・使用することにより各種細胞の分類・計数を行っている¹³⁾。なお、ポリメチン系色素の特性については、Sysmex Journal Vol.22 No. 2の技術解説で詳細に報告しており、ここでは割愛する。

2. 希釈液(溶血剤)

自動血液分析装置で白血球測定を行う場合、抗凝固

剤処理された末梢血液を適当な希釈液で処理する必要がある。希釈液は、以下に示すようにいくつかの機能を有している。

1) 全血の希釈

全血をそのまま測定すると検出器を複数の細胞が重なって通過するため、細胞が検出器を1個ずつ通過するように適当な濃度に希釈する必要がある。通常、白血球を計測するためには全血を10倍~数10倍に希釈する。

2) 赤血球の溶解

末梢血液中に白血球の約1,000倍以上存在する赤血球はNRBC測定の障害となる。赤血球の影響を除去するためには、赤血球を選択的に溶解することが必要となる。

3) 細胞の処理

測定対象の細胞を特異的に染色し弁別するためには、pH、イオン強度等の物理化学的条件を計測する細胞に応じて好適な条件に設定する必要がある。ストマトライザ-NRでは、酸性低張の条件が使用されている。

4) 色素透過性の調整

ポリメチン系色素は比較的細胞膜透過性の良い色素である。ストマトライザ-NRでは、さらに短時間で(十数秒)染色を完了させるために色素透過促進剤を含有している。

このように、希釈液は血球の形態を維持しつつ、赤血球の溶解、染色性の調整、色素透過性促進など種々の機能を有することが要求される。

本解説では、特に2)項の赤血球の溶解について詳細に解説する。

赤血球を溶解する方法には、浸透圧の変化、浮遊溶液の界面活性の低下、構成成分の分解、膜物質と他物質との強い物理化学的相互作用の4つがあり¹⁴⁾、様々な赤血球溶解法が報告されている¹⁵⁻²⁰⁾。一方、自動血液分析装置で使用される溶血剤は次の3種類に大別され(表1)、測定する細胞に応じて好適な溶血剤が使用される。

「ストマトライザ-NR」希釈液では、赤血球をほぼ完全に溶解し、WBCとNRBCの間に染色性の差異をつけるため、カチオン系界面活性剤を含有した酸性低張溶液を使用している。

表 1. 溶血剤

主成分	メリット	デメリット	備考
低張溶液	<ul style="list-style-type: none"> 白血球系細胞に与えるダメージが少ない。 細胞の形態・特長を生体内に近い状態で保持することが可能である。 溶液のpHを酸性に調整することにより、赤血球を選択的に溶血可能である。 	<ul style="list-style-type: none"> 赤血球を溶血するが、赤血球膜がゴーストとして残存するため電気抵抗式測定法には不適である。 	<ul style="list-style-type: none"> 光学式測定法によく使用される。
カチオン系界面活性剤	<ul style="list-style-type: none"> 溶血反応が非常に早い。 RBCゴーストがかなり小さくなる。 	<ul style="list-style-type: none"> 細胞に与えるダメージが比較的大きく、細胞形態が変化しやすい。 	<ul style="list-style-type: none"> 電気抵抗式測定法でよく使用される。
ノニオン系界面活性剤	<ul style="list-style-type: none"> 溶血反応が非常に早い。 RBCゴーストを完全に溶解可能である。 	<ul style="list-style-type: none"> 細胞に与えるダメージが比較的少ない。 	<ul style="list-style-type: none"> 上記2法の中間的な方法として応用される。

NRBC 測定原理 (図1, 図2)

赤血球は、血液をNRBC測定用試薬「ストマトライザ-NR」希釈液と混合することにより細胞膜脂質成分が溶解されて細胞膜に細孔を生じる。赤血球は、赤血球内に含まれるヘモグロビンを流出するとともに収縮し細胞膜のみとなり、光学的に透明となる。NRBCは、同様の機序で細胞膜に細孔を生じ、細胞内部のヘモグロビンを流出するとともに、色素透過性が亢進される。白血球細胞は、赤芽球と同様に細胞膜に細孔を生じ色素透過性が亢進されるが、白血球の細胞内小器官は流出せずに保持される。この状態で、「ストマトライザ-NR」染色液を作用させることにより、白血球細胞内の核酸や小器官、核などが染色液中に含まれるポリメチン系色素で染色される。一方、NRBCの核はクロマチンが凝集しているために、色素が結合しにくく弱く染色される。

染色した細胞はFCMのフローセルに流され、633nmの赤色半導体レーザー光が照射される。このとき細胞から発せられる前方散乱光強度と側方蛍光強度が検出される。X軸に側方蛍光強度、Y軸に前方散乱光強度の情報を二次元座標にプロットすると、

1) 赤血球は、希釈液の作用によって赤血球膜のみと

なるため、ほとんど光が散乱しないので前方散乱光強度が低く、また、赤血球膜はほとんど染色されないため、側方蛍光強度が低い左下の原点付近、いわゆるGhost領域に出現する。

2) 白血球は、希釈液の作用によって細胞膜に細孔を生じるがほぼ形態は保たれるため、強く光を散乱し、またポリメチン系色素によって強く染色されるため、前方散乱光強度が強く、蛍光強度の強い右中上部のWBC領域に出現する。

3) NRBCは希釈液の作用によって、ほとんど核のみの状態となるため前方散乱光の強度が低く、かつ、ポリメチン系色素で弱く染色されるため、蛍光強度が低いGhost領域とWBC領域の中間に位置するNRBC領域に出現する。

このように、NRBCとWBCは前方散乱光強度と蛍光強度の差によって明確に弁別されるため、NRBCを正確に分類計数することが可能となる(図3)。このようにして計数されたNRBCは、NCCLS H20-A²¹⁾の臨床的感度評価基準に準拠して20個/μL以上出現している場合に、NRBC%(/100WBC)NRBC#/μL)として表示される。

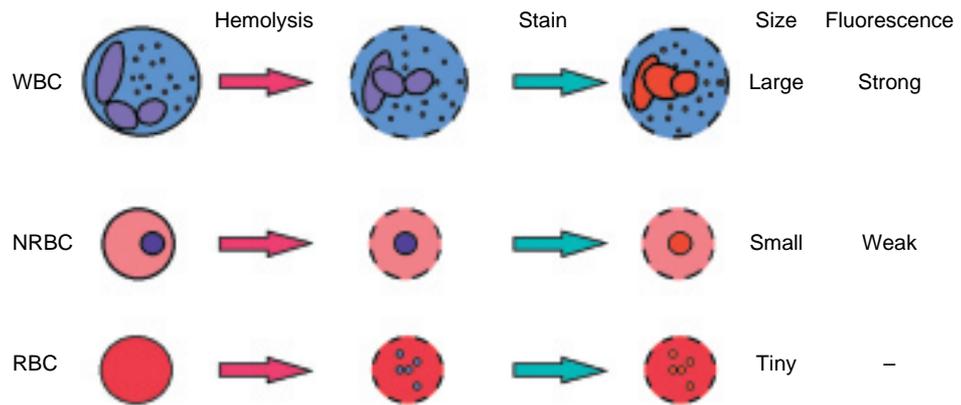


図 1. NRBC チャンネル測定原理図

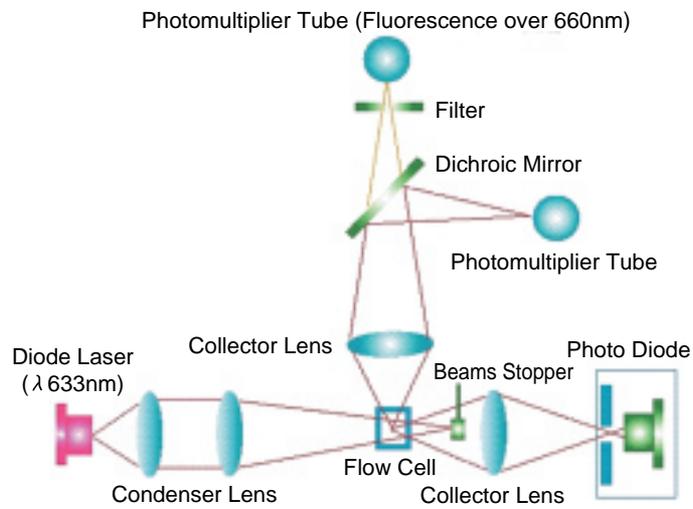


図 2. 測定原理

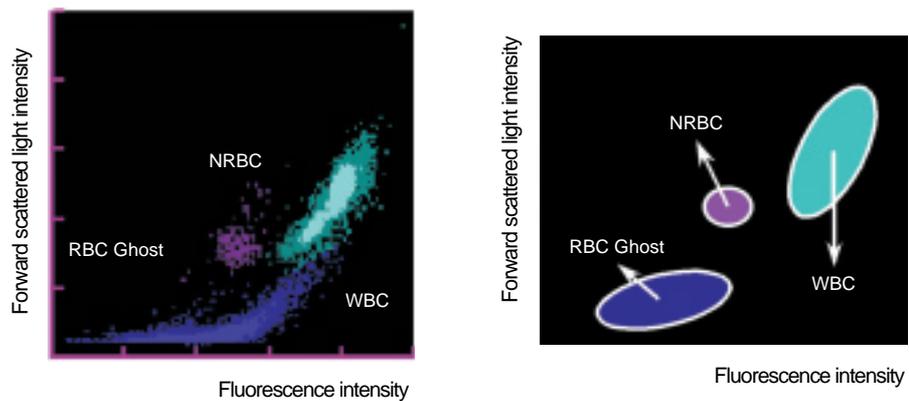


図 3. NRBC スキャッタグラム

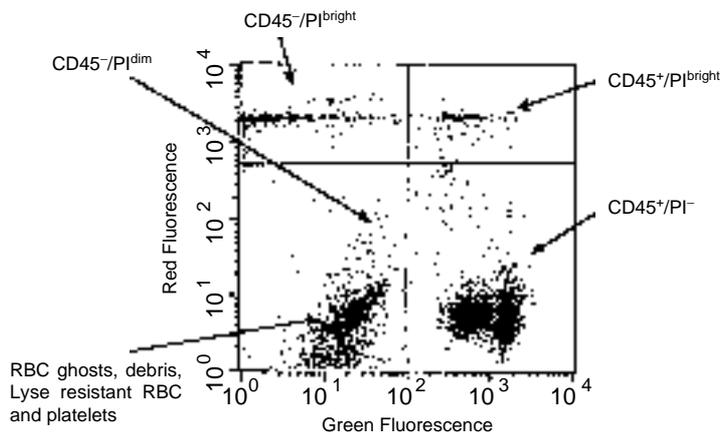


図 4. FCM による NRBC 測定例

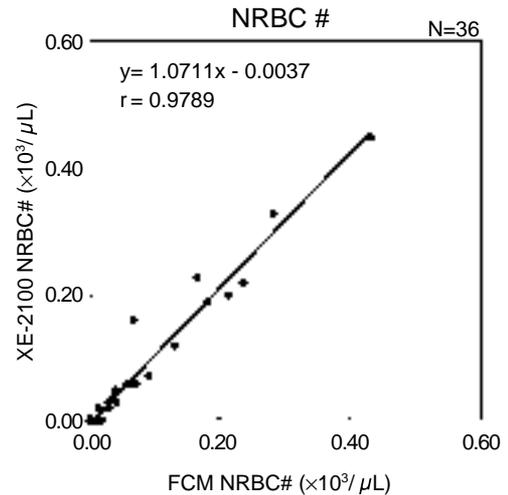


図 5. FCM と XE-2100 との相関

NRBC 対照測定法について

通常、血液分析装置の白血球分類性能を評価するために、顕微鏡を用いた目視法である NCCLS H20-A が使用されている。目視法は、いろいろな血球形態情報を一度に評価できる優れた方法である反面、細胞計測数の少なさによる統計学的誤差や鏡検する技師の個人差等の問題点があり、必ずしも客観的に且つ精度よく測定できる方法とは言えない。弊社では、血液分析装置の性能を評価するために、フローサイトメトリーを用いた対照測定法を考案してきた²²⁾。今回、新たに血液分析装置の NRBC 計数性能を評価するために FCM を用いた NRBC 対照測定法を考案した²³⁾。本法は、白血球共通抗原を認識するモノクローナル抗体 (FITC 標識 CD45 抗体) 核酸染色色素 (プロピジウムアイオダイド) を用いて各細胞を染色し、NRBC を特異的に検出し計数する方法である。従って、WBC、NRBC、赤血球ゴーストを明確に区別することができ、NRBC % を

正確に計数することが可能である。また、目視法 WBC100 カウントに対して、1 万個の細胞を計測するため、精度に優れている。以下に、XE-2100 の NRBC 測定性能を本法を対照として評価した結果と測定例を示す (図 4, 5)。

おわりに

血球分析装置は、日々進化しており、従来不可能であった細胞の計測、解析が可能となってきている。本解説では、「ストマトライザ-NR」の試薬技術を中心に、NRBC チャンネルの測定原理を概説した。本解説によって NRBC 測定チャンネルをご理解いただき、臨床の現場で活用していただければ、技術者冥利に尽きる幸せである。

血球計数機の進化はこれからも脈々と続き、現在、計数不可能である細胞の「計数結果を買っていただく」ことが、我々の永遠の課題であると信じている。

文 献

- 1) シスメックス株式会社 : 血球計数装置の技術と進歩, *Sysmex J*, 22 : 1 ~ 75, 1999.
- 2) 東亜医用電子(株) : HPCプログラムの概要, *Sysmex J*, 20 : 142 ~ 149, 1997.
- 3) 寶田 馨 : 自動網赤血球測定装置 R-3500 の概要, *Sysmex J*, 21 : 76 ~ 81, 1998.
- 4) Schwartz FO, Stanbury F : Significance of nucleated red blood cells in peripheral blood. *JAMA*, 154 : 1339 ~ 1340, 1954.
- 5) Weick JK, et al. : Leukoerythroblastosis : diagnostic and prognostic significance. *Mayo Clin Proc*, 49 : 110 ~ 113, 1974.
- 6) Nelson DA, Morris MW : Basic examination of blood. In : Henry J B editor. *Clinical diagnosis and Management by laboratory method*, 18th edition. Philadelphia : W.B. Saunders Company, P589 ~ 590, 1991.
- 7) Koepk JA, et al. : A Critical evaluation of the manual / visual differential leukocyte counting method. *Blood Cells*, 11 : 173 ~ 186, 1985.
- 8) Terstappen LW, et al. : Discriminating between damaged and intact cells in fixed flowcytometric samples. *Cytometry*, 9 : 548 ~ 556, 1988.
- 9) 速水正明監修 : 感光色素 - その不思議な作用と多彩な機能 -, 日本感光色素研究所編, 産業図書, 東京, 1997.
- 10) Waggoner AS : Optical probes of membrane potential. *J Membrane Bio*, 27 : 317 ~ 334, 1976.
- 11) Waggoner AS : Dye indicators of membrane potential. *Ann Rev Biophys Bioeng*, 8 : 47 ~ 68, 1979.
- 12) Waggoner AS : Fluorescent probes for cytometry, *Flow Cytometry and Sorting*(2nd Edition) pp.209 ~ 225, 1990.
- 13) 松本英彬 : XE-2100 の試薬技術について - 特に赤色蛍光反応について -, *Sysmex J*, 22 : 262 ~ 269, 1999.
- 14) 近藤 保 : 界面活性剤による溶血, *表面*, 5 : 630 ~ 635, 1967.
- 15) Dodge JT, et al. : The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives Biochem Biophys*, 100 : 131 ~ 139, 1963.
- 16) Thron CD : Hemolysis by holothurin A, digitonin, and quillaia saponin : Estimates of the required cellular lysin uptakes and free lysin concentration, 145 : 194 ~ 202, 1964.
- 17) Kondo T, Tomizawa M : Hemolysis by nonionic surface-active agents. *J Pharm Sci*, 57 : 1246 ~ 1248, 1968.
- 18) Tomizawa M, Kondo T : Mechanism of hemolysis by anionic surface-active agents. *Kolloid-Z u Z Polymere*, 246 : 694 ~ 699, 1971.
- 19) Kondo T, Tomizawa M : Hemolytic action of surface-active electrolytes. *J Colloid Interface Sci*, 21 : 224 ~ 228, 1966.
- 20) Helenius A, Simons K : Solubilization of membrane by detergents. *Biochim Biophys Acta*, 415 : 29 ~ 79, 1975.
- 21) National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS) : NCCLS H-20A
- 22) Lauralynn K. LEBECK, et.al. : フローサイトメトリ法による白血球 5 分類の標準測定法, *Sysmex J*, 18 : 1 ~ 10, 1995.
- 23) Tsuji T, et al. : New rapid flow cytometric method for the enumeration of nucleated red blood cells. *Cytometry*, 37 : 291 ~ 301, 1999.

Reagent Characteristics in the XE-2100 NRBC Channel

Product Development Division, Sysmex Corporation

4-4-4 Takatsukadai Nishi-ku, Kobe 651-2271

SUMMARY

The history of the Sysmex automatic hematology analyzers began with the simple counting of red blood cells using a capacitance-type detector¹⁾. This counting technology has progressed through many stages, with the development of detectors and cytolytic reagents to count white cells, then two and three part differentiation of white cells, to the automated five-part differential (through development of the RF / DC system). In addition, immature granulocyte detection was made possible through the development of specific hemolytic agents, and now Sysmex has achieved measurement of HPC (hematopoietic progenitor cells)²⁾. The development of flow cytometry methods (FCM) combining optical detection principles with cell staining techniques has led to automated reticulocyte counting, and also enabled the measurement of parameters such as IRF (immature reticulocyte fraction)³⁾, providing useful clinical information hematopoietic function. In the XE-2100 multi-parameter automated blood cell analyzer recently developed by Sysmex, nucleated red blood cell (NRBC) measurement has been achieved through development of a compact FCM detector. This detector uses a red semiconductor laser and a specific reagent "STROMATOLYSER-NR" which will be discussed in this report.

Key Words

Flow Cytometry (FCM), Semiconductor Laser, NRBC, Polymethine Dye,
Automated Hematology Analyzer