

多項目自動血球分析装置 XE-2100 を用いた 破碎赤血球定量測定の開発

Meiyi JIANG^{*1}, 川住 勇^{*1}, 井本しおん^{*2}, 西郷勝康^{*3}

*1 シスメックス株式会社学術部：神戸市西区高塚台4-4-4 (〒651-2271)

*2 兵庫県赤十字血液センター

*3 神戸大学医学部附属病院輸血部

SUMMARY

破碎赤血球 (FRC) 出現症例 (HUS, DIC, 火傷など), 骨髄移植後血栓性微小血管障害 (BMT-TMA) において, FRC % は病態の重症度を反映している。しかし, 塗抹標本での視算法では誤差が大きく, 定量化が難しい。我々は研究目的で多項目自動血球分析装置 XE-2100 (以下 XE-2100) の網赤血球スキャッタグラム上に専用の検出ゲート (Gate 1) を設定し, 末梢血中の FRC % 定量測定を行った。FRC 出現検体 100 例において, この定量測定システムにより算出した FRC % は目視 FRC % との間で有意な相関が認められた ($r=0.902$, $P<0.001$)。一方, 鉄欠乏性貧血の患者の検体においては, 小球性の赤血球がスキャッタグラムの低い位置に出現し, Gate 1 にオーバーラップするケースが多いため, 補正用のゲート (Gate 2) を設定し, このゲート内の粒子数と Gate 1 の粒子数を合わせて, FRC % 算出の補正を行い, その臨床的有用性を検討した結果, 10 症例において, 補正後の FRC % は目視 FRC % と有意に相関した ($P<0.05$)。この FRC 定量測定プログラムを XE-2100 へ導入することで, より正確かつリアルタイムに BMT-TMA 患者の病態モニタリングへの有用性が期待できる。

Key Words

破碎赤血球 定量測定 XE-2100 BMT-TMA

はじめに

血管内血液凝固症候群 (DIC), 溶血性尿毒症症候群 (HUS), 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) などの症例では, 末梢血中破碎赤血球 (FRC) の出現がしばしば観察される。FRC は正常な赤血球から, 物理的, 化学的または熱傷によるダメージを受けて出現すると考えられる。近年, 骨髄移植後血栓性微小血管障害 (bone marrow transplantation-associated thrombotic microangiopathy (BMT-TMA)) への研究が進み, FRC の末梢血中の出現率 (FRC %) が BMT-TMA の早期診断の重要な指標として注目を浴びてきた¹⁾。

FRC の出現率は, 末梢血塗抹標本の念入りの観察により算定が可能だが, 一般の検査室ではこのような算定が行われず, FRC の半定量データしか報告されていない。血球計数装置の赤血球粒度分布において, FRC が検出可能との報告がいくつかあるが, 最近の多くの自動血球計数装置には, このような粒度分布をスタンダードとして装備されている²⁾。しかし, FRC の定量算定は依然として塗抹標本の目視に頼らざるをえない現状であり, また, その算定は技師の個人差により大きくバラツクことが考えられる。

我々は, 多項目自動血球分析装置 XE-2100 (以下 XE-2100) の網赤血球スキャッタグラム上に専用の検

出ゲートを設定し、末梢血中のFRC %定量測定システムの開発を試みた。XE-2100の網赤血球チャンネルでは、全血を蛍光染色し、フローサイトメトリーを用いて、633nmの半導体レーザーにより網赤血球を測定している。スキャッタグラム上X軸に蛍光強度（RNAの含有量）を現し、Y軸に散乱光強度（血球の大きさ）³⁾をとることにより、PLT領域、成熟RBC領域、RET領域に分けることができる（図1）。FRCは、スキャッタグラム上正常赤血球より小さな細胞として検出され、また核酸量の違いにより、血小板との区別が可能となる。

材料と方法

1. FRC 検出ゲートの設定

健常男性ドナーの血液を420g10分間遠心し、白血球を除去し、PBSを用いて3回洗浄により得られた赤血球を用いた。一部の洗浄赤血球（サンプルA）を100秒間50 の水浴でインキュベーションし、FRC試料を作成し⁴⁾、残りの洗浄赤血球と比率を変えて混合することにより、FRC試料の系列を作成した。各試料のメイ・ギムザ染色した塗抹標本において、顕微鏡下で1,000個正常赤血球中のFRCの割合を算定した。FRCは、Dacie & Lewis⁵⁾の定義に基づき、不規則またはヘルメット状の細胞、あるいはシャープな角または棘を有する小さな血球、あるいは小型の球状赤血球をFRCとした。なお、直径4 μ m以上の球状赤血球はFRCとして算出しなかった。

各試料をXE-2100を用いて測定し、スキャッタグラムにおいてFRCが出現するエリアにゲートを設定し、

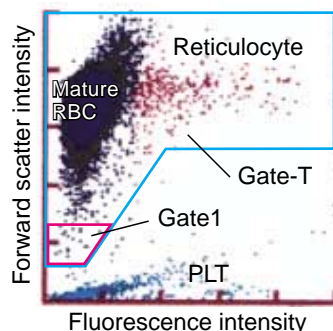


図1. XE-2100のRET-ch 健常者スキャッタグラム
Gate-Tは赤血球の総数、Gate 1 (Gate-Tに含まれる)はFRC出現領域を表す。

このゲート内の粒子数 (%) が目視FRC %との間で一番良い相関を持つようにゲートを探った。

2. 患者血液サンプルのFRC %算出への応用

上記の相関関係を用いて、DIC, HUS, MDS, リンパ腫等の患者血液100サンプル (EDTA-2K加血) のFRC %を算出した。それぞれのサンプルは顕微鏡下で目視算定も行った。

3. 健常人血液サンプルFRC %算出への応用

健常人ボランティア762名の血液サンプル (EDTA-2K加血) を用いて、FRC %の正常参考範囲を求めた。

4. 小球性赤血球補正用ゲートの設定

鉄欠乏性貧血患者のサンプルにおいては、赤血球のサイズが健常人より小さいため、スキャッタグラム上Y軸の低い位置に出現するが多い。このため、FRCの検出ゲートに小型の赤血球が入り込み、FRCの算出に偽性高値をもたらすため、補正用のゲートを考案した。

5. 統計処理

FRC %の正常参考値の算出 (MCP-STAT 5.0 パッケージ, 国際試薬社製) を除き、すべての統計処理は、Statview 5.0 パッケージ (Abacus Concepts, CA, USA) を用いた。

結 果

1. 熱傷によるFRCの作製

100 ~ 150秒間50 でインキュベーションした試料を10秒おきに血球を固定し、走査電子顕微鏡にて観察した (図2)。100秒間インキュベーションした試料 (図2A) はサイズが *in vivo* のものと近似しているため、その後の実験はすべてこの条件を採用した。なお、さらに50秒間熱した試料では、赤血球からたくさんの偽足のような突起が見られ (図2B)、これらの突起がさらに破砕し、きわめて小さな破片となる可能性がある為、本研究の実験に採用しなかった。

2. FRC 検出ゲート

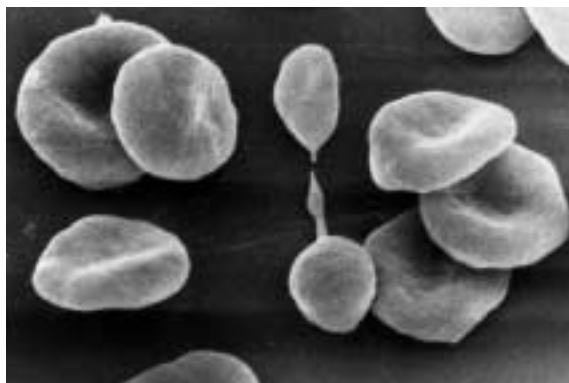
FRC 試料系列の FRC % が 0 % から 7.0 % の範囲に渡り、各試料の目視 FRC % が、試料中サンプル A の割合と有意に相関したため (図 3)、この試料系列が実験に適したことが示唆された (Fisher's Z-transformation, $r=0.980$, $p<0.0001$)。

XE-2100 の測定結果では、試料中サンプル A の割合が多いほど、スキャッタグラム上血小板分画の左上の領域に粒子が多く出現していた。この領域の一番適切な場所にゲートを検討し、Gate 1 (図 1) を設定した。Gate 1 内の粒子 % は、目視 FRC % との間で有意な相関 (Fisher's Z-transformation, $r=0.984$, $p<0.0001$) が見られた (図 4, 式 (1))

$$y=5.20x - 0.26 \quad (1)$$

y : 目視 FRC %

x : Gate 1 内の粒子%, $(\text{Gate1} / (\text{GateT}-\text{Gate1})) \times 100 (\%)$



A) incubated for 100 seconds x4500



B) incubated for 150 seconds x7000

図 2. 加温時間の違いによる FRC のサイズ差

- A) 50 100 秒間の加温により、比較的サイズの大きな FRC が得られた。
- B) 50 150 秒間の加温により、サイズの小さな FRC が得られた。

3. 患者血液サンプル FRC % の算出への応用

式 (1) を用いて、FRC が観察された 100 サンプルの FRC % を算出したところ、目視 FRC % との間で、良好な相関が見られた (Fisher's Z-transformation, $r=0.902$, $p<0.001$) (図 5)。また、Paired t-test により、算出 FRC % は目視 FRC % との一致が認められた ($P=0.54$)。

4. 健常人血液サンプル FRC % の算出への応用

式 (1) を用いて算出した 762 名健常人の FRC % の臨床参考範囲⁶⁾ は 0.03 % ~ 0.56 % となった。これは、発表文献の臨床参考範囲の報告⁷⁾ とほぼ一致している。

5. 小球性赤血球補正用ゲートの設定

10 名の鉄欠乏性貧血患者において、スキャッタグラム上赤血球の位置は、正常サンプルの赤血球分画より

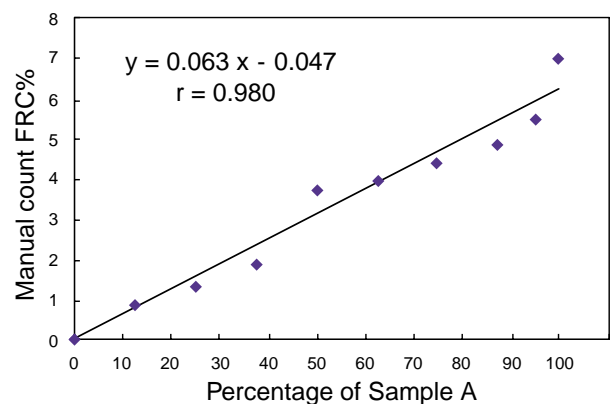


図 3. サンプル A の占めるパーセントと各希釈系列試料の目視 FRC % との相関

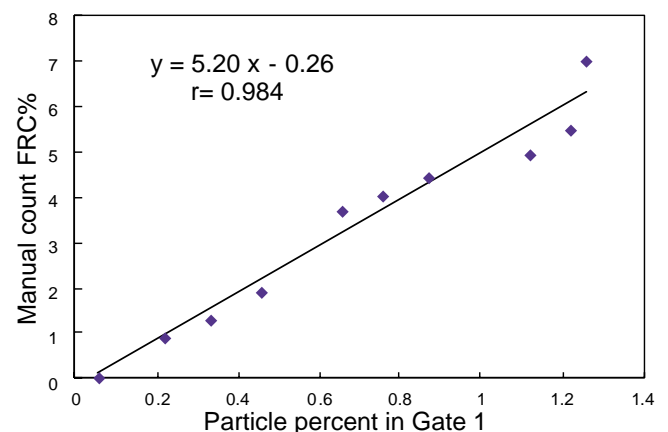


図 4. Gate 1 粒子パーセントと各希釈系列試料の目視 FRC % との相関

低いところにプロットされていた(図6)。式(1)より算出したFRC%は、目視FRC%の値よりはるかに高かったため、我々はGate 1の上方にさらにGate 2(図6)を設定した。このゲート内の粒子数を横軸に、算出FRC%と目視FRC%の乖離度(算出FRC/目視FRC)を縦軸にプロットしたところ、指数相関が見られ(図7、式(2))、Gate 2内の粒子数が多いほど、目視との乖離が大きいたことが示唆された。

$$y = (\text{算出FRC} / \text{目視FRC}) = e^{(0.19x)} \quad (2)$$

y: 算出FRC%と目視FRC%の乖離度

x: Gate 2内の粒子数, Gate 2 / Gate T (%)

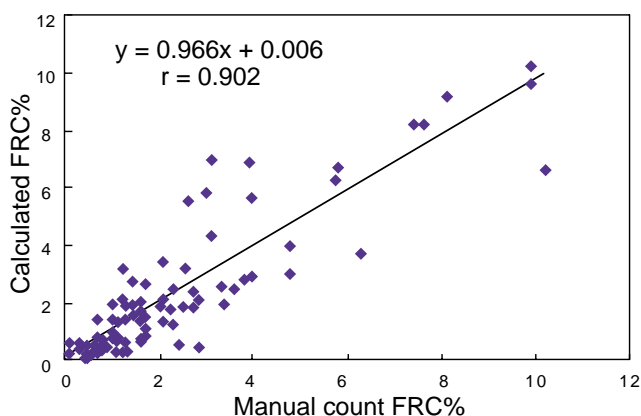


図5. 100症例における目視FRC%と算出式(1)によるFRC%との相関

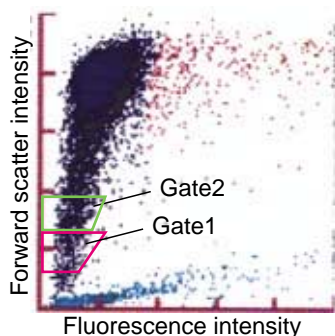


図6. 鉄欠乏性貧血患者の典型的なスキャッタグラム
このサンプルは目視にてFRC%が5.8%を占めている。小球赤血球が出現しGate 1に影響がでる可能性がある為、Gate 1の上方にGate 2を設け、算出FRC%の補正を行った。

式(2)より、真のFRC%を算出するための補正式、式(3)を逆算することが出来る。

$$\text{目視FRC\%} = \text{算出FRC} / e^{0.19x} \quad (3)$$

そこで、10名の鉄欠乏性貧血患者の血液中FRC%を補正したところ、目視FRC%との相関が改善された(Fisher's Z-transformation, $r=0.812$, $P<0.05$)(図8)。これらのGateはXE-2100のRETスキャッタグラム上に設定することが可能であり、また式(1)や式(3)もプログラムに組み込むことができるため、ルーチンの全血CBC測定と同時にFRC%のスクリーニングが可能となる。

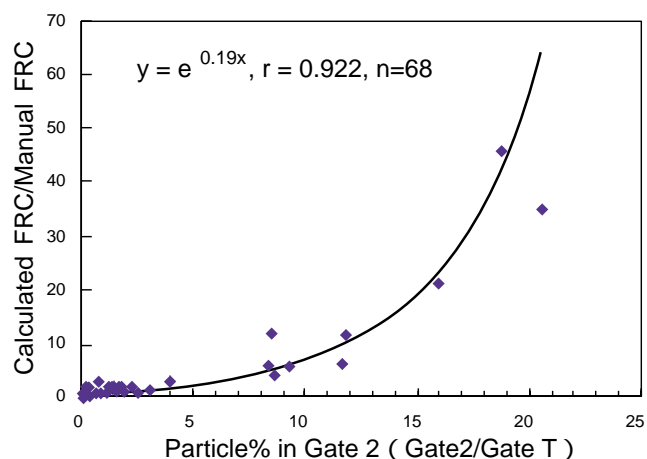


図7. 算出FRC%と目視FRC%の乖離がGate 2の粒子数と相関する。

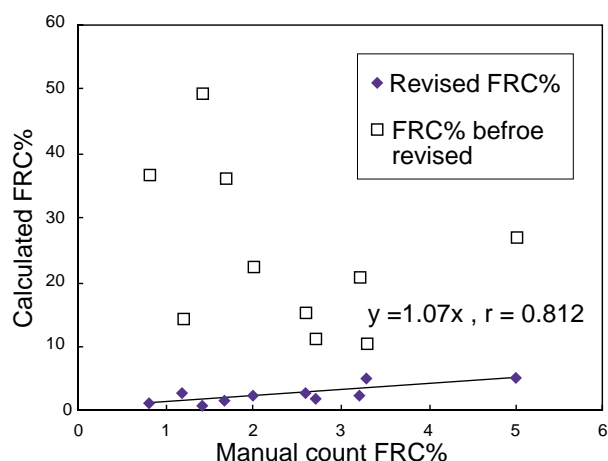


図8. 10例の鉄欠乏性貧血症例において、目視FRC%と算出FRC%(補正後)との相関
 $y = 1.07x$ で図5に示す $y = 0.966x$ の相関直線とほぼ一致する。補正前のデータも表示している()。

表 1. Grading system for BMT-TMA (Zeigler et al. 1995)

Grade	LD (U / L)	% Fragmented Cells	Clinical BMT-TMA
0	Normal or Increased	1.2	None
1	Normal	1.3	Subclinical
2	Increased	1.3 - 4.8	Mild
3	Increased	4.9 - 9.6	Moderate
4	Increased	9.7	Severe

考 察

in vitro で熱を用いて血球を破砕させる報告がいくつかあり、異なった温度が報告されている^{7, 8)}。Williamsonらは、血球を49℃で熱し、血球が球状化や、偽足またはフラグメンテーションを起こした^{7, 8)}。また、赤血球の細胞骨格と知られているスペクトリン⁹⁾が熱によって変化し、ほかの膜成分と強く結合した構造を緩ませ、膜の成分が流動しやすくなっていると報告されている⁸⁾。そして、Wintrobeらは、血球が再び膜を癒合することによって、二つ、または二つ以上のFRCが生じることを発表しており¹⁰⁾、これは、本研究の電顕像観察と一致していた。本研究では、50～100秒間のインキュベーションにより作製した試料のFRCは、そのサイズが*in vivo*のものに近似していた。

自動血球計数装置は約3万個の細胞をカウントするため、正確性に優れており、自動血球計数装置の赤血球粒度分布からのFRCの推定は、末梢血塗抹標本の算定より精度と特異性いずれも優れているとBessmanにより報告されている²⁾。また、Guetarniらは、血小板を除去し、熱でインキュベーションした赤血球を、血小板測定チャンネルで正確に測定可能と報告している⁷⁾。今回報告した全血を用いたFRCの定量測定システムは、*in vitro*だけでなく、臨床症例(100例の患者サンプルおよび10例の鉄欠乏性貧血患者のサンプル)においても、良好な相関が得られた。この定量測定システムは、3つのゲート(Gate 1, Gate 2, Gate T)と2つの計算式からなり、XE-2100のプログラムに組み込むことにより、FRCの自動定量測定の実現、さらに、FRC症例の診断及びフォローアップへの有用性が期待される。

同種骨髄移植後血栓性微小血管障害(BMT-TMA)の発症率は広く0%～74%まで報告されていたが¹¹⁻¹⁶⁾、そ

の確定診断には、FRCが唯一信頼性のある指標とされていた¹²⁾。また、ZeiglerらはBMT-TMAの早期診断のために、FRC%及びLDHを用いて0～4のグレードシステム(表1)を開発し、FRC率の算定は、移植後患者の予後の判断及び治療方法の選択に有用であることを報告している¹⁾。今回開発した自動血球計数装置に搭載できるFRC定量測定システムは、リアルタイムにBMT-TMAの発症のモニタリングに有用と考えられる。

参 考 文 献

- 1) Zeigler ZR, et al. : Bone marrow transplant-associated thrombotic microangiopathy : a case series. Bone Marrow Transplantation, 15 : 247 ~ 253, 1995.
- 2) Bessman JD : Red blood cell fragmentation, improved detection and identification of causes. American Journal of Clinical Pathology, 90 (3) : 268 ~ 273, 1988.
- 3) Tsuruda K, et al. : Evaluation and clinical usefulness of the automated hematology analyzer, Sysmex XE-2100. Sysmex Journal International, 19 : 129 ~ 138, 1999.
- 4) Bull BS, Brailsford JD : A new method of measuring the deformability of the red cell membrane. Blood, 45 (4) : 581 ~ 586, 1975.
- 5) Dacie SJ, Lewis SM : Practical Haematology (6th edn) , pp. 68 ~ 69, Churchill Livingstone Inc, New York, 1984.
- 6) Tango T : Estimation of normal ranges of clinical laboratory data. Statistics in Medicine, 5 : 335 ~ 346, 1986.
- 7) Guetarni D, et al. : Quantification of red blood cell fragmentation : usefulness of heating cells and of automatic counting devices. Ann Biol Clin, 50 : 649 ~ 651, 1992.
- 8) Williamson JR, Shanahan MO, Hochmuth RM : The influence of temperature on red cell deformability. Blood, 46

-
- (4) : 611 ~ 624, 1975.
- 9) Palek J, Lambert S : Genetics of the red blood cell membrane skeleton. *Seminars in Hematology*, 27 (4) : 290 ~ 332, 1990.
- 10) Wintrobe MM, et al. : *Clinical Hematology* (7th edn) , pp. 201, Igaku Shoin LTD, Tokyo, 1974.
- 11) Holler E, et al. : Microangiopathy in patients on cyclosporine prophylaxis who developed acute graft-versus-host disease after HLA-identical bone marrow transplantation. *Blood*, 73 (7) : 2018 ~ 2024, 1989.
- 12) Pettitt AR, Clark RE : Thrombotic microangiopathy following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 14 : 495 ~ 504, 1994.
- 13) Kalhs P, et al. : Microangiopathy following allogeneic marrow transplantation. *Transplantation*, 60 : 949 ~ 957, 1995.
- 14) Zomas A, et al. : Red cell fragmentation (schistocytosis) after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 22 : 777 ~ 780, 1998.
- 15) Iacopino P, et al. : Severe thrombotic microangiopathy : an infrequent complication of bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 24 : 47 ~ 51, 1999.
- 16) Takatsuka H, et al. : Thrombotic microangiopathy following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 24 : 303 ~ 306, 1999.
-

Quantification System Development of Red Blood Cell Fragmentation by Automated Hematology Analyzer XE-2100

Meiyi JIANG ^{*1}, Isamu KAWASUMI ^{*1}, Shion IMOTO ^{*2}, and Katsuyasu SAIGO ^{*3}

* 1 Scientific Division, Sysmex Corporation
4-4-4 Takatsukadai Nishi-ku, Kobe 651-2271

SUMMARY

Red blood cell fragmentation can be observed in many diseases and its extent in peripheral blood is considered to be a useful indication for diagnosis and follow-up in hemolytic uremic syndrome (HUS), transplantation-associated thrombotic microangiopathy (BMT-TMA) and etc. However, this quantification still relies on manual counting of fragmented red cells on blood smears. We have developed a quantification system by gating a fixed area of fragmented red blood cells (Gate 1) on an automated hematology analyzer (XE-2100, Sysmex Co.). The fragmented red cell percentage (FRC %) calculated with this system, from 100 samples, was highly correlated with the manual count ($r=0.902$, $p<0.001$). Because microcytic anemia specimens usually occupy a lower position of the XE-2100 scattergram, with microcytic cells overlapping Gate 1 and causing a spuriously high FRC % calculation, a supplementary gate (Gate 2) was added. Using the particle number in this gate as well as in Gate 1, a revise method for such samples was developed and its validity confirmed (revised FRC % correlated with a manual count for 10 subjects ($p<0.05$). Because this gating system can be programmed on any XE-2100, it is likely to prove useful for accurate quantification of red blood cell fragmentation and for the monitoring of the development of BMT-TMA.

Key Words

Red Blood Cell Fragmentation, Quantification, XE-2100, BMT-TMA