

多項目自動血球分析装置 XN-Series における 新規血小板測定チャンネルを用いた 低値域血小板測定性能の検討

片桐 尚子*¹, 荒井 智子*¹, 谷田部 陽子*¹, 清水 長子*¹,
林 文明*², 田中 千晶*², 三ツ橋 雄之*³, 村田 満*³

*1 慶應義塾大学病院 中央臨床検査部：東京都新宿区信濃町 35 (〒160-8582)

*2 シスメックス株式会社 学術本部

*3 慶應義塾大学医学部 臨床検査医学

要 旨

近年、多項目自動血球分析装置においては多彩な機能が搭載された機種が開発されている。これらの進歩とともに、より高性能な検査機能や検査室のニーズに適合する多様なシステムが望まれる。今回、多項目自動血球分析装置 XN-1000 (シスメックス社) を試用する機会を得て、新規搭載機能である蛍光色素を用いた PLT-F (fluorescence) チャンネルによる血小板測定法を中心に基本的性能について検討を行った。同時再現性、希釈直線性、キャリアオーバー、相関性は良好な結果が得られた。血小板計数性能の検討においては、Cell-Dyn 専用抗 CD61 抗体を用いて Cell-Dyn Sapphire (アボット社) にて測定を行い、本装置との比較を行った。血小板低値域における同時再現性 (CV%) の結果は PLT-I (impedance), PLT-O (optical) に比較し、PLT-F は最も良好であり、精密度の高い結果であった。また、抗 CD61 抗体を用いた免疫学的方法との相関性の検討では、PLT 低値領域も含め、PLT-F は PLT-I, PLT-O よりも良好な相関が得られ、正確度の優れた結果であった。本装置は高性能な検査機能を持ち、機能性に優れた次世代多項目自動血球分析装置として期待できる。

キーワード 多項目自動血球分析装置, XN-1000, 基礎性能, 新規血小板数測定法

はじめに

近年、多項目自動血球分析装置においては多彩な機能が搭載された機種が開発されている¹⁾。これらの進歩とともに、より高性能な検査機能、検査室のニーズに適合する多様なシステムが期待される。特に血小板計数については、その多くには電気抵抗方式や光学的方法が採用されており、XE シリーズ (シスメックス社) においてもシースフローシステムによる電気抵抗法と光学的方法が用いられている²⁾。しかし、著しい血小板減少、大型、巨大血小板の存在や小赤血球、破碎赤血球の出現時では、血小板計数値の信頼性がしばしば問題とされる。

今回、多項目自動血球分析装置 XN-1000 (以下、

XN-1000; シスメックス社) を試用する機会を得て、新規搭載機能である蛍光色素を用いた新規血小板測定法を中心に基本的性能について検討を行ったので報告する。

装置の特長

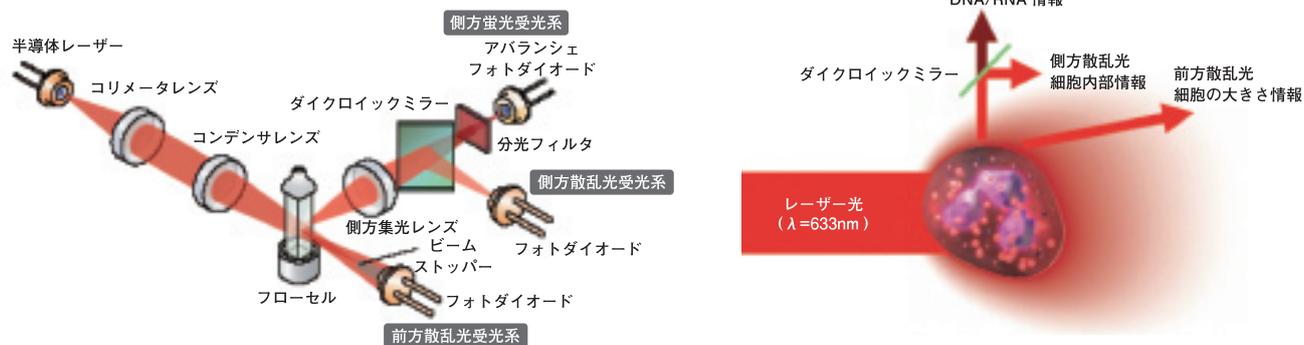
XN-1000 の特長として、「モジュール方式」と「新規測定チャンネル」が挙げられる。本装置は多様な測定モジュールを有し、装置を複数台連結させることにより機能的かつ効率的な運用が可能である。また新規搭載測定チャンネルを目的に合わせて選択することができ、各々の施設に適した測定モジュールの組み合わせにより多機能、多様な運用が可能となる。

本装置の新規測定チャンネルとしては、白血球、好塩基球および有核赤血球を同時に計数できる「WNRチャンネル」、幼若細胞検出専用の「WPCチャンネル」、蛍光染色により血小板を計測する「PLT-Fチャンネル」が新規搭載されている。

血小板計数の方法としては、従来装置であるXEシリーズでは電気抵抗法 PLT-I (impedance) と光学的方法 PLT-O (optical) が搭載されているが、XN-1000より蛍光色素を利用した PLT-F (fluorescence) チャン

ネルが新規搭載された。測定原理は、血小板を染色する蛍光色素（オキサジン系色素）を利用して血小板を染色し、フローサイトメトリー（FCM）を用いて前方散乱光（FSC）と側方蛍光（SFL）を測定し、2次元スキャッタグラムに展開する（図1）。この原理を利用することにより、従来から問題とされていた低値血小板検体測定 of 正確性、精密性の向上が期待される。

蛍光フローサイトメトリー法の原理



PLT-F スキャッタグラム

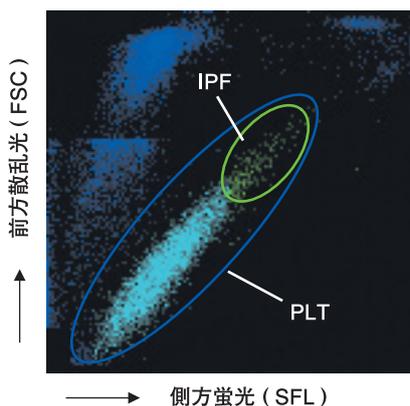


図1. 蛍光フローサイトメトリー法の原理と PLT-F のスキャッタグラム

対象および使用機器

1. 対象

当院入院・外来患者および職員より得た EDTA-2K 加静脈血を用いた。

2. 使用機器

検討機として XN-1000, 対照機として当院ルーチン機である多項目自動血球分析装置 XE-5000 (以下, XE-5000; シスメックス社) を用いた。また血小板計数の検討では, Cell-Dyn Sapphire (アボット社) を用い, 抗 CD61 モノクローナル抗体による免疫学的方法にて測定を行った。

方法

1. 同時再現性

CBC 項目 (WBC, RBC, HGB, MCV, PLT-I) および網赤血球 (RET) について低, 中, 高値域のそれぞれ 2 検体を用い, 10 回連続測定し, 変動係数を算出した。

2. PLT 低値域における同時再現性

PLT $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ 以下の低値域 6 検体を用い, 10 回連続測定し, PLT-I, PLT-O および PLT-F の変動係数を算出した。また 6 検体中, PLT 粒度分布異常フラグが認められた 3 検体および認められなかった 3 検体について, 方法間比較を行った。

3. 希釈直線性

CBC 項目 (WBC, RBC, HGB, HCT, PLT-I) について高値検体を用い, 検体希釈液にて 6 段階希釈系列を作製して測定し, 直線性を検討した。

4. WBC キャリーオーバー

白血球数について ICSH のガイドライン³⁾ に従い, キャリーオーバーの検討を行った。試験は異なる 3 組の白血球高値および低値検体を用いて行った。WBC 高値検体を連続 3 回測定 (H_1, H_2, H_3) 後, 続けて WBC 低値検体を連続 3 回測定 (L_1, L_2, L_3) した。同様の操作を 3 セット行い, 以下の式よりキャ

リーオーバー率を算出した。

$$\text{キャリーオーバー率 (\%)} = (L_1 - L_3) / (H_3 - L_3) \times 100$$

5. 相関性

患者検体を用い, CBC 項目, RET および白血球 5 分類 (NEUT, LYMPH, MONO, EO, BASO) について従来装置である XE-5000 との比較を行った。CBC および白血球 5 分類の患者検体は, XE-5000 にて NEGATIVE と判定された 150 件および POSITIVE と判定された 196 件, 計 346 件を用いた。

6. 抗 CD61 抗体を用いた免疫学的方法による

血小板計数と本装置での血小板計数との比較

免疫学的血小板測定法は, Cell-Dyn 専用の FITC 標識抗 CD61 (膜糖蛋白 GPⅢa) モノクローナルマウス抗体 (以下, 抗 CD61 抗体) を用い, Cell-Dyn Sapphire にて PLT 数を自動計測した。一方, 本装置では, PLT-I, PLT-O に加えて新規搭載 PLT-F チャンネルにて PLT 数を自動計測し, 前述の抗 CD61 抗体を用いた PLT 数と PLT-I, PLT-O および PLT-F との比較を行った。さらに, 抗 CD61 抗体による測定法にて PLT 数が $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ 以下を示した検体を対象に全検体と同様に比較を行った。

結果

1. 同時再現性

CBC 項目の変動係数 (CV%) は WBC 0.4 ~ 2.5%, RBC 0.3 ~ 1.2%, HGB 0.3 ~ 1.1%, MCV 0.2 ~ 1.5%, PLT-I 1.2 ~ 11.7%, RET の CV% は 2.5 ~ 5.8% と良好な結果を示した (表 1)。

2. PLT 低値域における同時再現性

PLT 低値域について PLT 粒度分布異常フラグを認めなかった 3 検体の CV% は, PLT-I 5.0 ~ 14.0%, PLT-O 5.4 ~ 11.6%, PLT-F 2.2 ~ 4.4% であった。また, PLT 粒度分布異常フラグを認めた 3 検体の CV% は, PLT-I 7.4 ~ 24.7%, PLT-O 4.0 ~ 7.3%, PLT-F 2.3 ~ 5.1% となり, いずれの検体においても PLT-F が最も良好な結果を示した (表 2)。

表 1. 同時再現性

		低値検体		中値検体		高値検体	
		Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	MEAN	2.64	2.48	4.70	6.85	18.43	43.42
	SD	0.06	0.06	0.08	0.09	0.07	0.20
	CV%	2.1	2.5	1.8	1.4	0.4	0.5
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	MEAN	1.32	2.43	4.48	4.61	6.54	5.82
	SD	0.01	0.03	0.03	0.03	0.02	0.04
	CV%	1.0	1.2	0.7	0.7	0.3	0.6
HGB (g/dL)	MEAN	3.9	6.8	14.1	14.2	18.0	20.1
	SD	0.04	0.07	0.06	0.09	0.07	0.06
	CV%	1.1	1.1	0.5	0.7	0.4	0.3
MCV (fL)	MEAN	67.8	70.6	82.7	90.2	106.6	117.4
	SD	0.11	0.22	0.73	0.92	0.95	1.76
	CV%	0.2	0.3	0.9	1.0	0.9	1.5
PLT-I ($10^3/\mu\text{L}$)	MEAN	17.6	26.9	270.1	190.4	896	576
	SD	2.07	1.29	4.84	3.27	10.97	12.86
	CV%	11.7	4.8	1.8	1.7	1.2	2.2
RET (%)	MEAN	0.7	0.8	1.1	1.4	5.4	12.7
	SD	0.04	0.04	0.05	0.07	0.13	0.39
	CV%	5.8	4.9	4.5	5.4	2.5	3.0

表 2. 各 PLT 測定法による血小板低値域の同時再現性

		PLT 粒度分布異常フラグなし			PLT 粒度分布異常フラグあり		
		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 1	Sample 2	Sample 3
PLT-I	MEAN	17.8	24.7	19.5	55.8	42.9	14.3
	SD	2.49	1.49	0.97	4.29	10.59	1.06
	CV%	14.0	6.1	5.0	7.7	24.7	7.4
PLT-O*	MEAN	20.4	26.1	21.2	73.1	56	17
	SD	2.37	1.45	1.14	5.04	2.26	1.25
	CV%	11.6	5.6	5.4	6.9	4.0	7.3
PLT-F**	MEAN	16.9	26.1	21.3	70.1	56.8	15.4
	SD	0.74	0.57	0.67	3.54	1.32	0.52
	CV%	4.4	2.2	3.2	5.1	2.3	3.4

PLT 単位 ($10^3/\mu\text{L}$)

* PLT-O: PLT-I のデータの信頼性が疑われるときにスイッチングされ採用される血小板数。
 ** PLT-F: ディスクリットで PLT-F を選択して測定した場合、血小板数として表示される。

3. 希釈直線性

WBC $236.7 \times 10^3/\mu\text{L}$, RBC $7.24 \times 10^6/\mu\text{L}$, HGB 22.8 g/dL, HCT 66.1%, PLT $2472.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ までの直線性が確認できた(図2)。

4. WBC キャリーオーバー

WBC 高値, 低値検体を用いて検討を行った結果, キャリーオーバーは認められなかった(表3)。

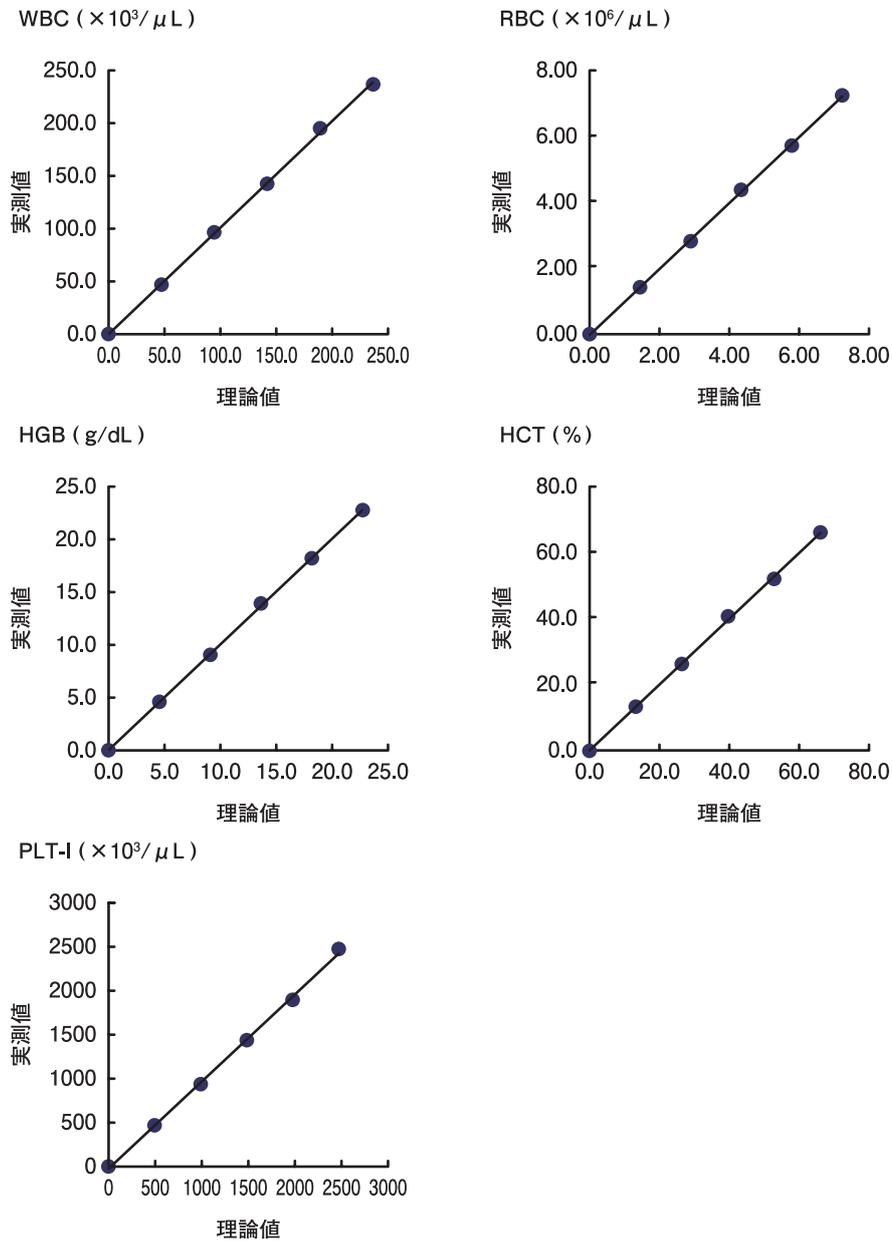


図2. 希釈直線性

表3. WBC キャリーオーバー

	H ₁	H ₂	H ₃	L ₁	L ₂	L ₃	キャリーオーバー率 (%)
A	139.52	134.41	134.82	0.43	0.44	0.43	0.000
B	133.73	133.98	134.28	0.13	0.14	0.11	0.015
C	240.07	243.78	240.79	0.10	0.05	0.04	0.025

WBC単位: (10³/μL)

5. 相関性

XE-5000 との相関性について、CBC 項目は相関係

数 $r=0.995 \sim 1.000$ 、RET は $r=0.984$ と良好な相関を示した (図 3-a)。

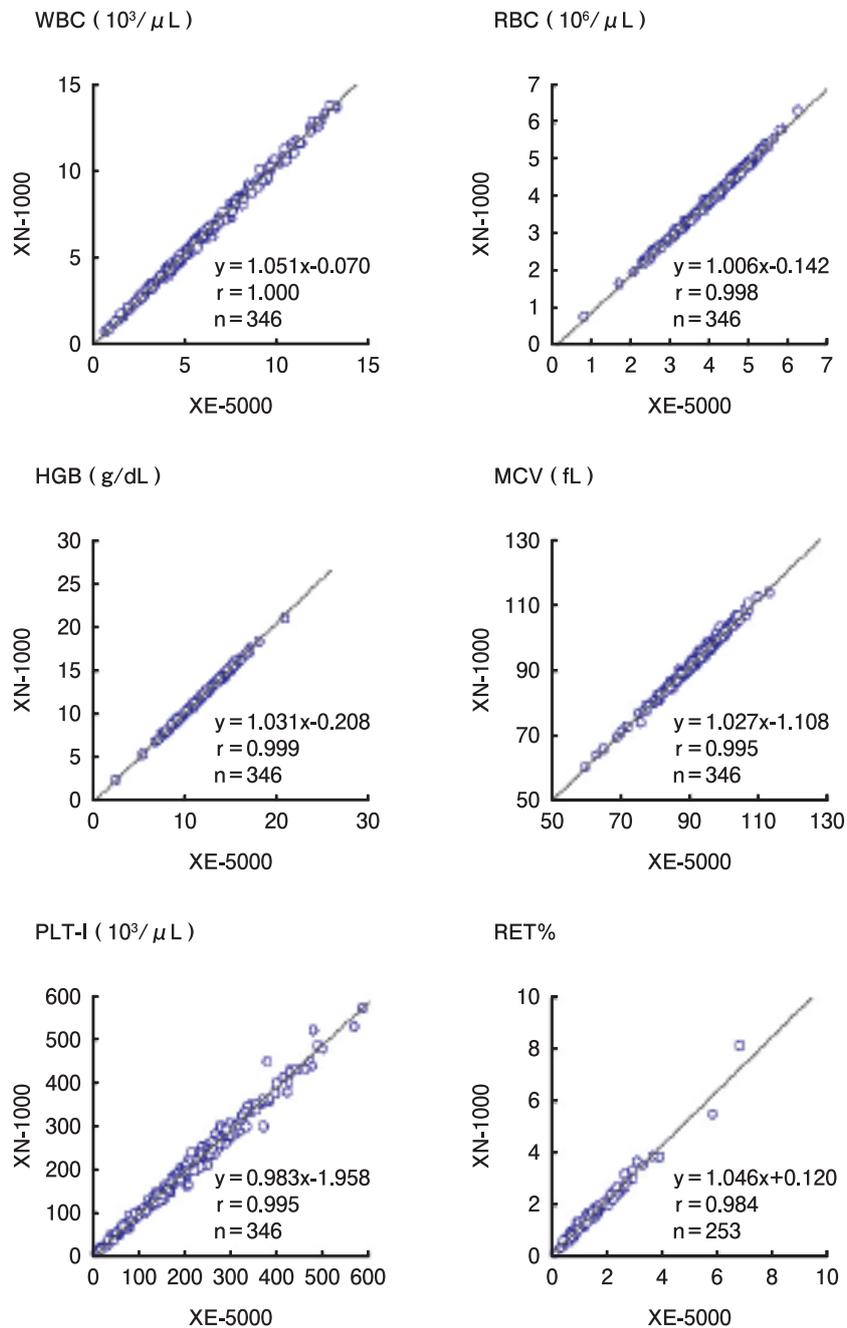


図 3-a. XE-5000 との相関性 (CBC 項目, RET%)

白血球5分類の相関係数は、NEUT、LYMPH、EOでは $r=0.994 \sim 0.996$ 、MONOでは $r=0.973$ と良好

な相関を示したが、出現頻度の低いBASOは $r=0.788$ であった(図3-b)。

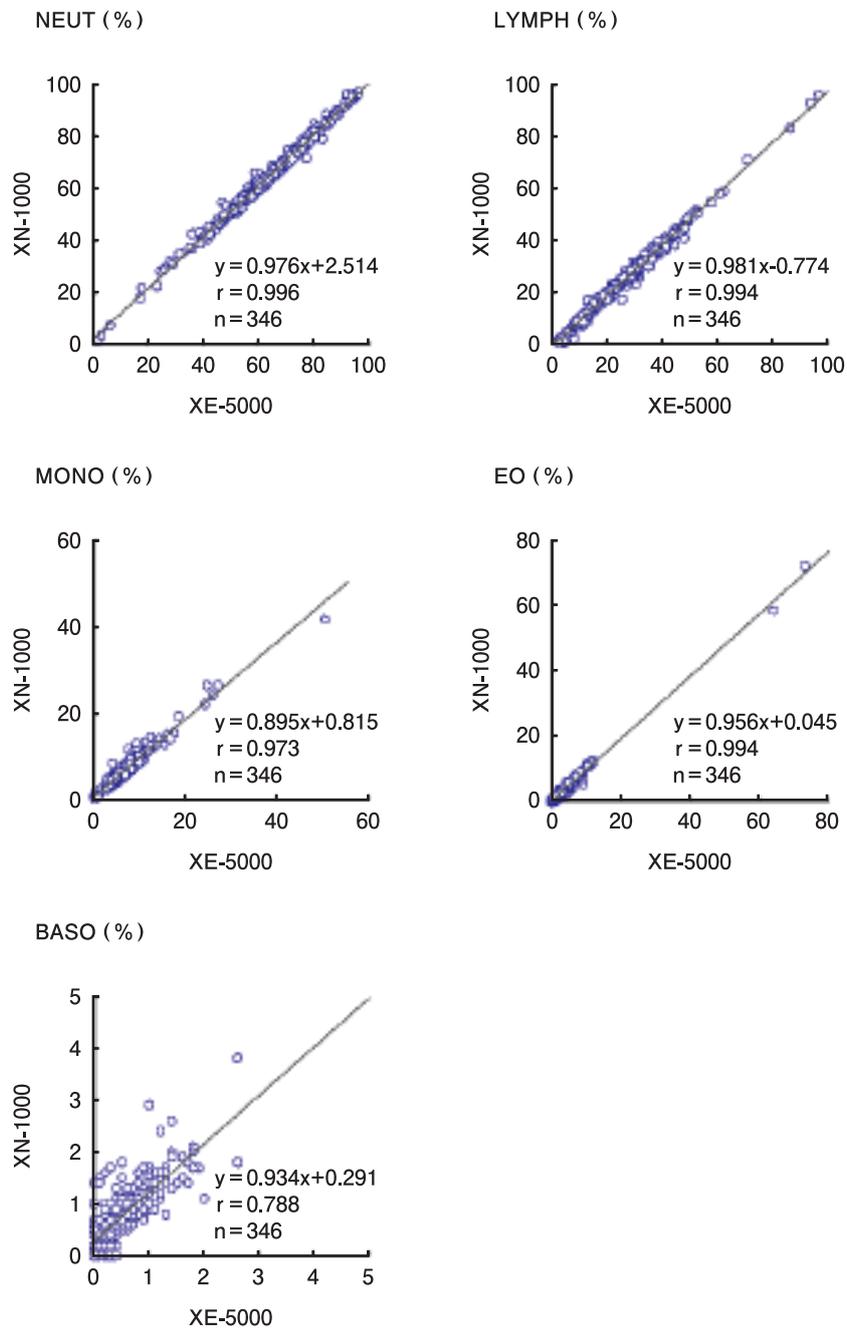


図3-b. XE-5000 との相関性 (白血球5分類)

6. 抗 CD61 抗体を用いた免疫学的方法による

血小板計数と本装置による血小板計数との比較

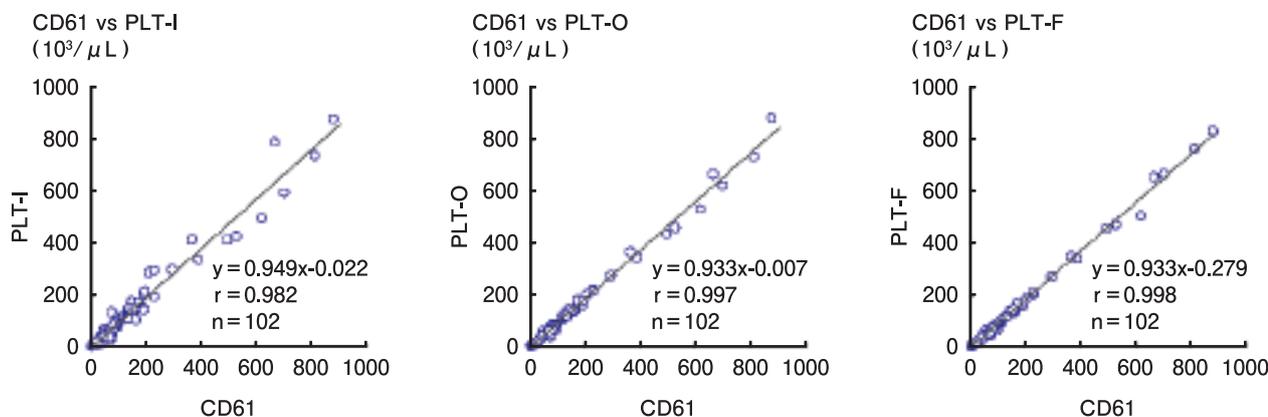
全検体 (n=102) の相関係数は PLT-I $r=0.982$, PLT-O $r=0.997$ であり, PLT-F では $r=0.998$ と最も高い相関を示した. PLT 数が $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ 以下の低値域の比較 (n=41) では PLT-I $r=0.828$, PLT-O $r=0.949$ であり, PLT-F では $r=0.979$ と全体の相関と同様に最も高い相関を示した (図4).

考 察

今回, XN-1000 を試用する機会を得て, 従来装置である XE-5000 との比較および新規搭載血小板計数測定チャンネルの評価を含めた基礎的検討を行った. 同時再現性, 希釈直線性, キャリーオーバー, 相関性は良好な結果が得られた. 希釈直線性の検討では WBC および PLT において従来機⁴⁾ よりも直線性の範囲の広がりが確認できた.

血小板計数性能の評価においては, Cell-Dyn 専用抗 CD61 抗体を用いて Cell-Dyn Sapphire にて測定を行い, 本装置との比較を行った. 近年, 血小板計数測定は, 電気抵抗法が主流であり, 機種によっては光学的方法が用いられている. 電気抵抗法は, 赤血球と血小板を同一の希釈サンプルで計測しているため, 血小板と同サイズの小赤血球や破碎赤血球が混在する症例では, それらが血小板に測り込まれて血小板数が偽高値となる場合がある. 一方, 大型または巨大血小板の存在が示唆される症例では, 血小板数が偽低値となる場合がある. このような検体の場合, XE シリーズでは, 一定の粒度分布異常を認め, 装置が PLT-I の信頼性が乏しいと判断した場合, 網赤血球 (RET) チャンネルにスイッチングし, FCM による光学的方法にて測定結果が表示される. 光学的方法を採用することにより血小板数の信頼度は電気抵抗法よりも向上する. 血小板減少症において血小板数を正確に測定することは, 血小板輸血の適応

全検体



低値検体 (PLT $\leq 50 \times 10^3/\mu\text{L}$)

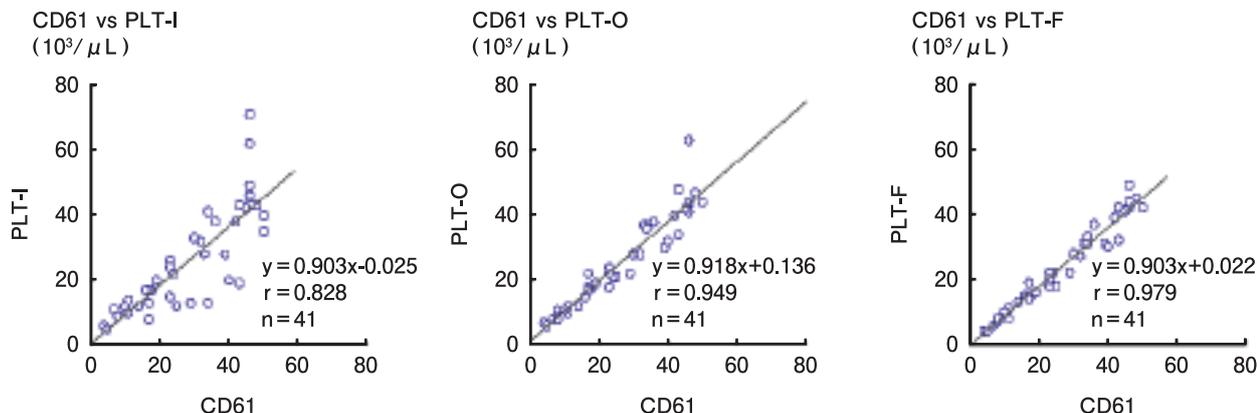


図4. 血小板計数 免疫学的方法との相関性

をはじめとする診断や治療のモニタリングに極めて重要である。しかし、血小板輸血の適応閾値に関与する 20,000/ μ L 以下の血小板数が著減している症例や破碎赤血球が多く存在する症例などでは、さらなる信頼性の高い測定結果が求められている。今回、XN-1000 を用いて新規血小板数測定方法として蛍光色素を利用した PLT-F チャンネルにて血小板計数値の検討を行った。血小板低値域における同時再現性の結果は三法 (PLT-I, PLT-O, PLT-F) の中で、PLT-F が最も良好な CV% を示し、精密度の高い結果であった。また抗 CD61 抗体を用いた免疫学的方法との比較では、PLT-F ($r=0.998$) は PLT-I ($r=0.982$)、PLT-O ($r=0.997$) よりも良好な相関性が得られた。特に、低値域において免疫学的方法との良好な相関を認め (PLT-I : PLT-O : PLT-F = 0.828 : 0.949 : 0.979)、正確度に優れており、満足な結果であった。

今回、血小板低値検体における PLT-F と免疫学的測定法との相関を検討した中で、抗 CD61 抗体を用いた PLT 数よりも本装置の PLT 数が 20% 程度高い値となる検体が 1 検体存在した。乖離を認めた検体の PLT-F スキャッタグラムを確認したところ、前方散乱光ならびに側方蛍光共に低値の領域にデブリスと考えられる異常プロットが認められ、それらが PLT 計測に干渉していることが考えられた。この事例を受けて、シスメックス社にて PLT-F スキャッタグラムの解析アルゴリズムの改良が図られた。この改良アルゴリズムで乖離検体データを再解析したところ、干渉の影響を低減することができた。

現在、血小板数のリファレンスは CD61 と CD41 の抗体を用いた FCM による方法が国際標準法 (ICSH/ISLH) である^{5,6)}。我々は以前、血小板減少例について、アボット社で開発された専用抗 CD61 抗体を用いて Cell-Dyn 4000 による血小板数と目視法による血小板数との比較検討を行い、免疫学的方法による血小板計数の測定は、正確で迅速な方法であると報告した⁷⁾。松野らは抗 CD61 抗体を用いた免疫学的方式血小板計数の測定は、最もリファレンス法による真値に近く、かつバラツキも少なく正確度、精密度とも他の方式に比べ優れていると報告している⁸⁾。本装置による PLT-F チャンネルを用いた血小板計数では、血小板を染色するオキサジン系色素を

用い、蛍光染色された血小板が FCM によりスキャッタグラム上に明瞭に区分され、精度の高い測定法と思われた。Cell-Dyn を用いた免疫学的血小板計数測定は、簡便で迅速に測定可能であり、信頼性の高い測定法であるが、専用の抗体を用いた場合のコストは決して安価ではない。一方、本装置は、同一の機種でありながら通常の測定で、PLT-I に信頼性が乏しいと装置が判断した場合、この情報を取り入れ、自動切り替えが作動し、PLT-F チャンネルによる再測定が可能である。本装置は施設に適応したシステム構築が可能であり、従来装置である XE シリーズと比較して効率性、精度ともに向上していると思われる、より精度の高い情報の提供が期待される。

まとめ

本装置の基礎的検討は良好であり、従来機種に比較し希釈直線性範囲の向上が認められた。特に血小板計数について、低値域および粒度分布異常の検体における血小板計数は、新規測定モードを用いることにより正確度、精密度の高い結果が得られた。また、本装置は高性能な検査機能を持ち、機能性に優れた次世代多項目自動血球分析装置として期待できる。

参考文献

- 1) 近藤弘, 巽典之. 自動血球計数器の進歩. 臨床病理レビュー. 2009; 特集号 142 : 14-19
- 2) 田中千晶 他. 多項目自動血球分析装置 XE-5000 の概要と基礎性能. Sysmex J. 2007 ; 30 : 63-69
- 3) International Council for Standardization in Haematology (ICSH). ICSH (1994) Guidelines for the evaluation of blood cell analyzer including those used for differential leukocyte and reticulocyte counting and cell maker application. Prepared by the ICSH expert panel on cytometry. Clin Lab Haem. 2001 ; 23 : 237-242
- 4) 清水宏伸 他. 多項目自動血球分析装置 XE-5000 の基礎的検討. Sysmex J. 2010 ; 33 : 3-14
- 5) International Society of Laboratory Haematology (ISLH). An interlaboratory study of a candidate reference method for platelet counting. Am J Clin Pathol. 2001 ; 115 : 448-459

- 6) International Council for Standardization in Haematology (ICSH), International Society of Laboratory Haematology (ISLH). Platelet Counting by the RBC/platelet ratio method. *Am J Clin Pathol.* 2001 ; 115 : 460-464
- 7) 長田恵美里 他. 血小板数測定正確度向上のための免疫学的血小板測定の検討. *臨床病理.* 2002 ; 50 (9) : 887-892
- 8) 松野一彦 他. 市販の抗 CD61 モノクローナル抗体を用いたセルダイン サファイアによる血小板数の免疫学的測定. *日本検査血液学会雑誌.* 2010 ; 11 : 293-298

Verification of Low Platelet Count by novel PLT detection on the Automated Hematology Analyzer XN-Series

Hisako KATAGIRI^{*1}, Tomoko ARAI^{*1}, Yoko YATABE^{*1},
Nobuko SHIMIZU^{*1}, Fumiaki HAYASHI^{*2}, Chiaki TANAKA^{*2},
Takayuki MITSUHASHI^{*3} and Mitsuru MURATA^{*3}

*1 Central Clinical Laboratory, Keio University Hospital, 35 Shinanomachi, Shinjyuku-ku, Tokyo 160-8582

*2 Scientific Affairs, Sysmex Corporation

*3 Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Keio University

SUMMARY

In recent years, various automated hematology analyzers equipped with many functions have been developed. With this progress, the systems that meet greater high-performance functions and needs of clinical laboratories are demanded. We evaluated the basic performance of the new automated hematology analyzer XN-1000 (Sysmex), especially focusing on the PLT-F channel. This new PLT measurement channel uses the fluorescence flow cytometry measuring methodology.

We confirmed within-run reproducibility, linearity of dilution, WBC carry over, and correlation with XE-5000 (automated hematology analyzer; Sysmex), and got positive results. In the evaluation of PLT measurement, we compared within-run reproducibility of PLT-I (impedance), PLT-O (optical) and PLT-F. Moreover, the correlation between Sysmex XN-1000 PLT counts and immunological PLT counts using anti-CD61 monoclonal antibody of Cell-Dyn Sapphire (automated hematology analyzer; Abbott) was confirmed. Among the three Sysmex XN-1000 PLT measurement modes, PLT-F had the best reproducibility, and the best correlation with the immunological method. Therefore PLT-F had good precision and accuracy, compared with other two PLT measurement modes. The XN-1000 is a promising instrument as next-generation hematology analyzer.

Key Words

Automated Hematology Analyzer, XN-1000, Basic Performance, New PLT Measurement Mode