

血球分析装置用動物対応ソフトウェア XT-2000*i*V / XT-1800*i*Vのご紹介

シスメックス株式会社 科学計測部 坂田 孝

はじめに

臨床分野において、多項目自動血球分析装置は日々進歩を続け、血球数計数 (CBC) のみならず、白血球分類 (DIFF)、網赤血球計数 (RET) を標準搭載した装置が主流を占めている。今回、我々は、最新の多項目自動血球分析装置 XT-2000*i*¹⁾ (図1)、XT-1800*i* を動物血液分析に対応させるソフトウェア XT-2000*i*V、XT-1800*i*V を開発した。以下にその概要を紹介する。

開発コンセプト

従来の XT-2000*i*、XT-1800*i* はサテライトラボラトリー、中規模医療施設をメインターゲットとして開発された装置であり、以下のような特徴がある。

1. XT-2000*i*、XT-1800*i* の基本搭載機能・特徴

- 1) 測定原理：DIFF、RET 測定に、半導体レーザーを用いたフローサイトメトリー法を採用し、高精度な血球分析が可能 (図2)。
- 2) 微量血液対応：微量血液 (マニュアルモード 85 μ L) で、CBC、DIFF、RET の測定を実現。
- 3) ディスクリート測定：CBC、DIFF、RET から必要な項目のみを選択して測定できる。測定項目に関連する試薬のみを仕様することにより使用試薬量の低減が可能である。
- 4) イージーメンテナンス：豊富なメンテナンスプログラムを搭載し、フローセル洗浄、シャットダウンなどの日常メンテナンスを自動的に実施。サンプリングバルブの洗浄は15,000 検体測

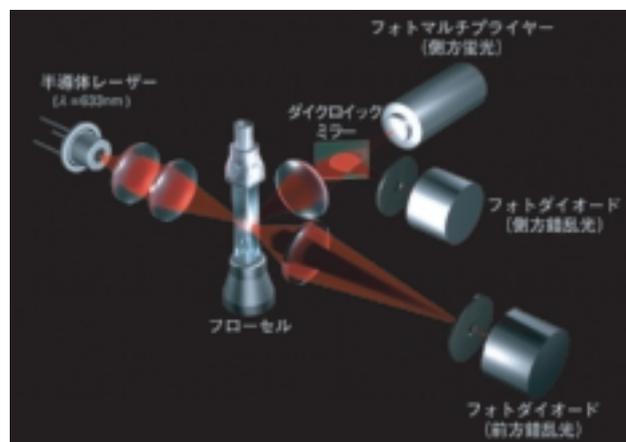
図1. XT-2000*i* 外観

図2. 半導体レーザーを用いたフローサイトメトリー

2. XT-2000iV, XT-1800iV で追加搭載される機能

XT-2000iV, XT-1800iVでは、動物血液及び肺胞洗浄液等の細胞浮遊液中の血球を分析するために各種機能が追加搭載されている。

- 1) 5種類の動物種(マウス, ラット, サル, イヌ^{*1}, ウサギ^{*1})のCBC8項目, DIFF5分類, RETの測定が可能
*1 イヌ, ウサギ等のDIFF5分類機能は現在開発中
- 2) カテゴリー設定で、各動物ごとに異常判定値を設定可能
- 3) キャピラリーモード(40 μ L)でDIFF測定対応
- 4) 測定データのCSV出力対応: Excel等のアプリケーションでのデータ解析が可能
- 5) マニュアル解析機能: 研究用途に、スカッタグラムのマニュアル解析機能を搭載。異常試料の再解析, 肺胞洗浄液等の血液試料以外の血球分析に対応

技術

1. 測定原理

1) フローサイトメトリー法

XE-2100で開発された、半導体レーザーを光源としたフローサイトメトリー法(図2)を測定原理として採用し、各専用試薬で処理された血球

の前方散乱光, 側方散乱光, 側方蛍光から得られる情報を解析することにより各血球を分類計数する^{2,3)}。

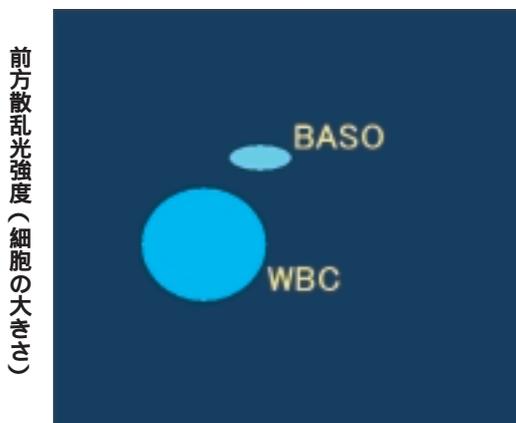
WBC/BASO: 酸性低張溶血剤(ストマトライザーFB)で処理された白血球の前方散乱光と側方散乱光を測定することにより、酸性低張で形態を保持した好塩基球(BASO)とその他の裸核化白血球を分類計数する。同時に白血球(WBC)を計数する(図3)。

DIFF: 白血球を溶血剤(ストマトライザー4DL)を用いて、白血球形態を保持する穏和な条件下でポリメチン系色素(ストマトライザー4DS)で蛍光染色し、側方散乱光と側方蛍光を測定する。

側方散乱光は細胞内の構成物質で散乱した光であり、細胞内の核形態, 顆粒の有無等, 細胞内の複雑さを反映する。側方蛍光は主にRNA量を反映する(図4)。これら二つの情報を用いて白血球を計数・分類する(図5)。

RET: 赤血球をポリメチン系色素で蛍光染色し、前方散乱光と側方蛍光を測定する。蛍光強度はRNA量を反映し、RNA量から赤血球と網赤血球を弁別し、計数する(図6)。

RET測定はXT-2000iVのみ



側方散乱光強度(細胞内部情報)

図3. WBC/BASOチャンネル

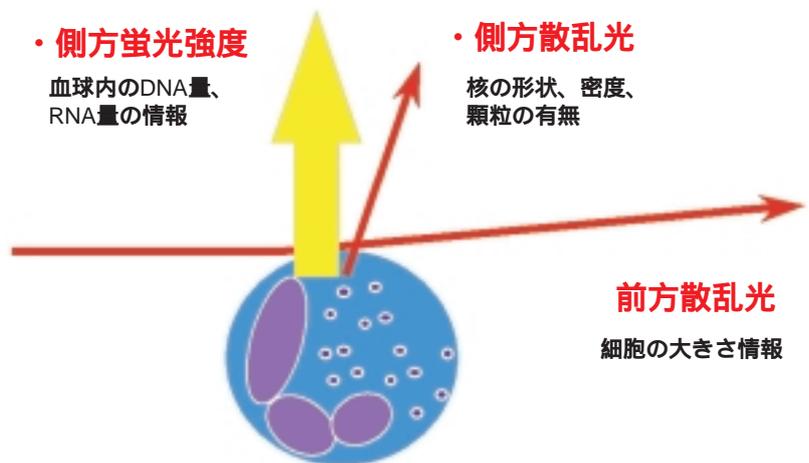
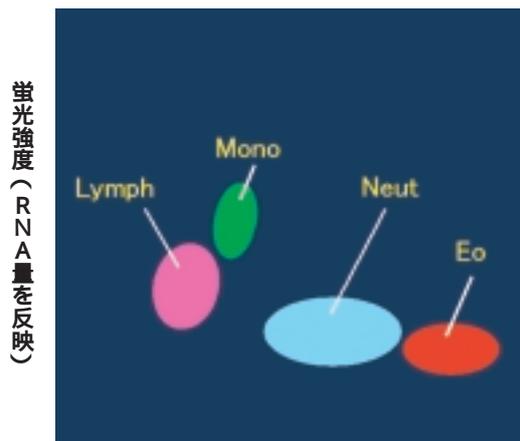
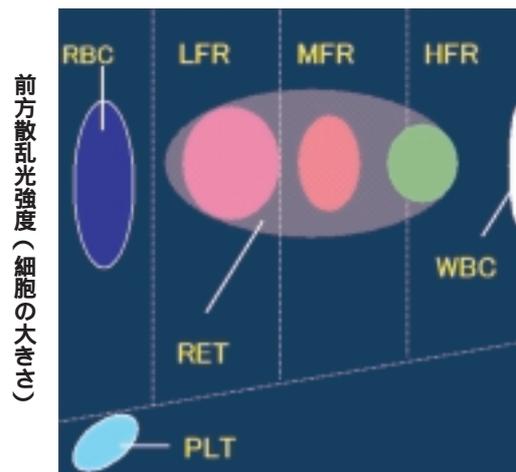


図4. 測定パラメータ



側方散乱光強度 (細胞内部情報)

図5. DIFFチャンネル



蛍光強度 (RNA量)

図6. RETチャンネル

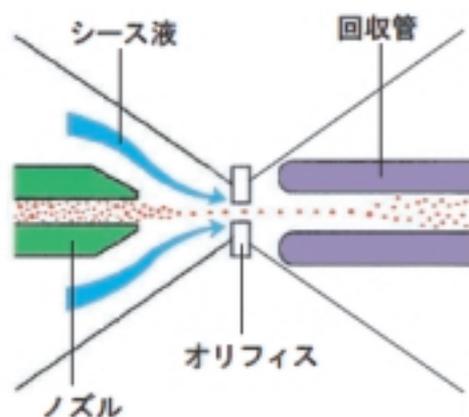


図7. XT-2000iのシースフローDC検出法

2) シースフローDC検出法

シースフローDC検出法は、ノズルから吐出される血液希釈試料を周りからシース液で包み込んでシースフローとして整流し、血球がアパーチャーの中心付近を流れるようにして、血球がアパーチャーを通過する際の抵抗の変化を検出する方法である。抵抗の変化量は、血球の体積に比例し、赤血球 (RBC) と血小板 (PLT) を弁別して計数する。シースフローを採用することにより、正確な血球体積の測定が可能になっている。

XT-2000iのRBC, PLT測定用検出部の概略図を図7に示す。

3) SLS-ヘモグロビン法

ヘモグロビン (HGB) は、SLS-ヘモグロビン法⁴⁾による比色法で測定する。溶血剤で赤血球は溶解され溶出したHGBは、メト化されSLSと結合してSLS-ヘモグロビンとなる。

SLS-ヘモグロビン法ではシアン等の毒劇物を使用しておらず、試薬の取り扱いが安全で容易である。

2. 動物血液対応について 測定例

動物血液の測定例を以下に示す。

RBC/PLT：赤血球，血小板の大きさは動物種，系統ごとに異なり，最適な弁別位置は試料ごとに異なる。本装置では，シースフローDC検出方式で検出した信号をヒストグラムに展開し，赤血球と血小板の弁別を自動的に最適な位置に決定することにより，各血球数，体積を正確に求めることができる(図8)。

DIFF：動物の白血球は，核の形態，顆粒の大きさ，染色性等が，動物種ごとに異なる。

XT-2000iVでは，各動物種ごとに最適な分類が行えるように，動物種ごとに専用の解析アルゴリズムを搭載している。動物種は，測定登録時にセレクトメニュー(図9)で簡単に選択できる。

サルは，ほとんどヒトと同じスキヤッタグラムを示すが，ラット，マウスでは，顆粒球

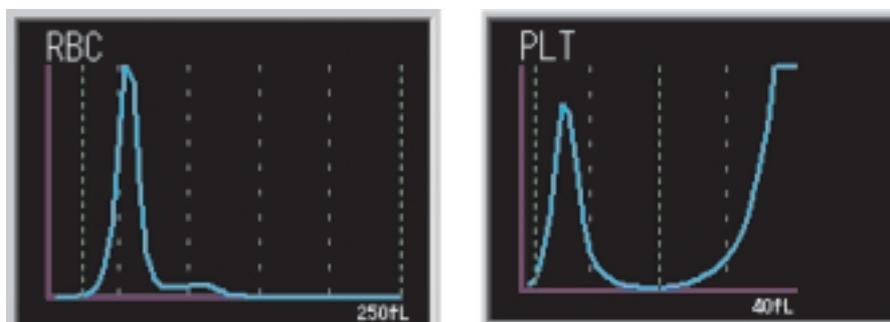


図8. ラット RBC/PLT ヒストグラム例

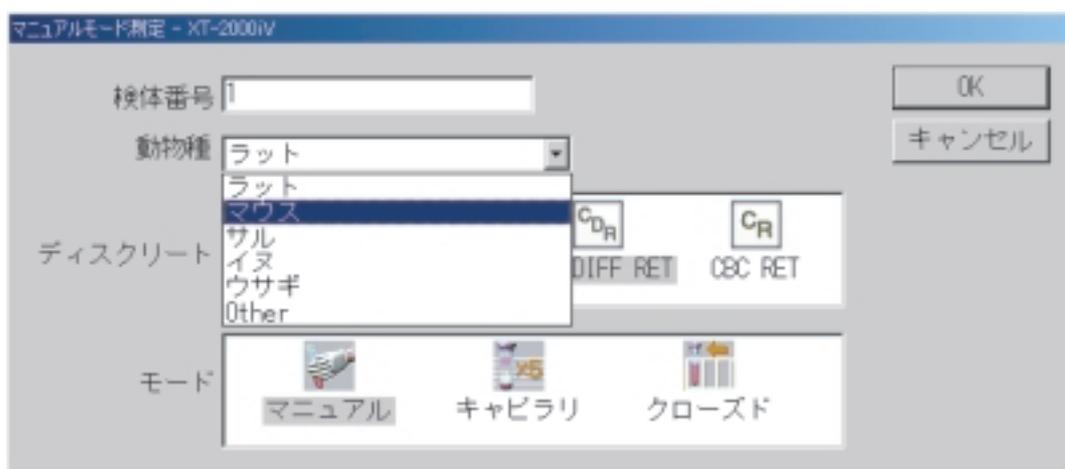


図9. 動物種セレクト画面

系細胞の側方散乱光強度が低く比較的リンパ球寄りに分布する傾向にある。各動物のDIFFスキッタグラム例を、図10に示す。

RET：網赤血球の正常値は、各動物種ごとに異なるが、RETスキッタグラム上RBC、RETなどの各血球の分布位置は、ヒト血と比べて大きな差異は認められない。XT-2000iV、XT-1800iVでは、ヒトと同様のアルゴリズムを用いて解析を行っている(図11)。

3. マニュアル解析機能について

本装置では、各血球を自動的に判別して分類する自動解析機能だけでなく、ユーザがマニュアルで血球領域を設定できるマニュアル解析機能を搭載している(図12)。さらに、本装置では、白血球5分類をマニュアルで行うモードと、血球を限定せずフリーで解析細胞を設定できるExtend解析モードを搭載している。本モードでは、血液試料以外の肺胞洗浄液、腹水等の解析が可能である。肺胞洗浄液の解析例を図13に示す。

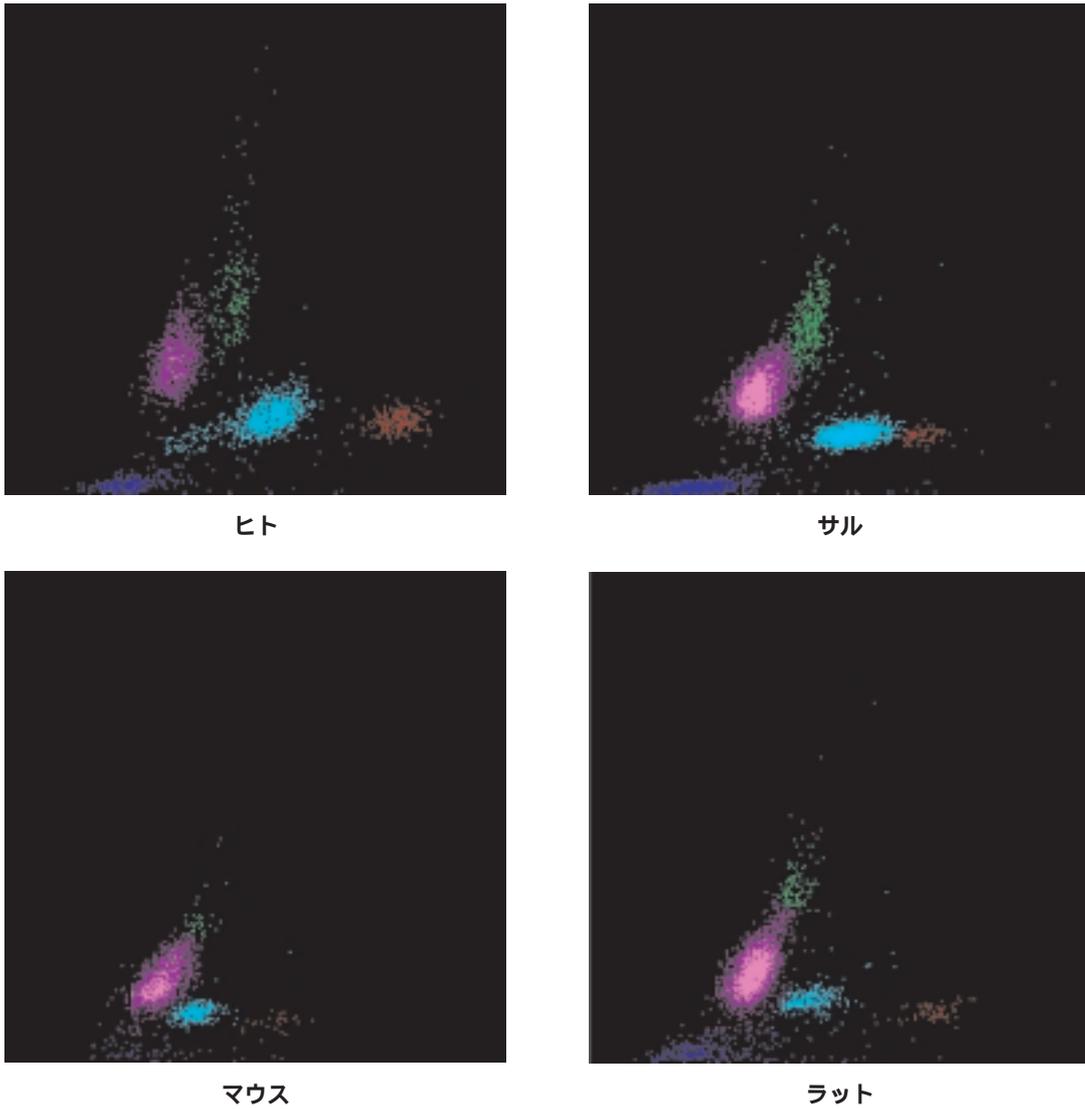


図10 . DIFF スキャッタグラム例

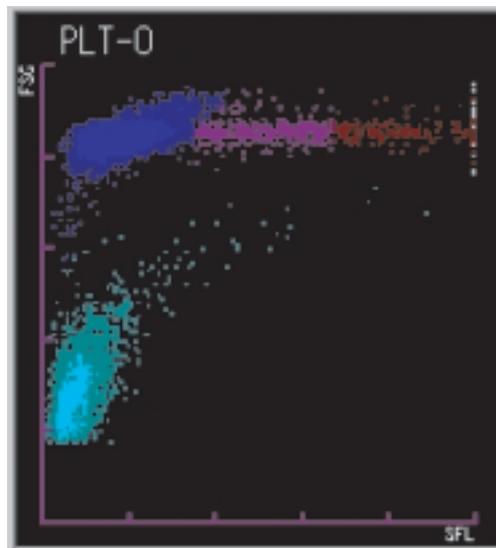


図11 . ラット RET スキャッタグラム例

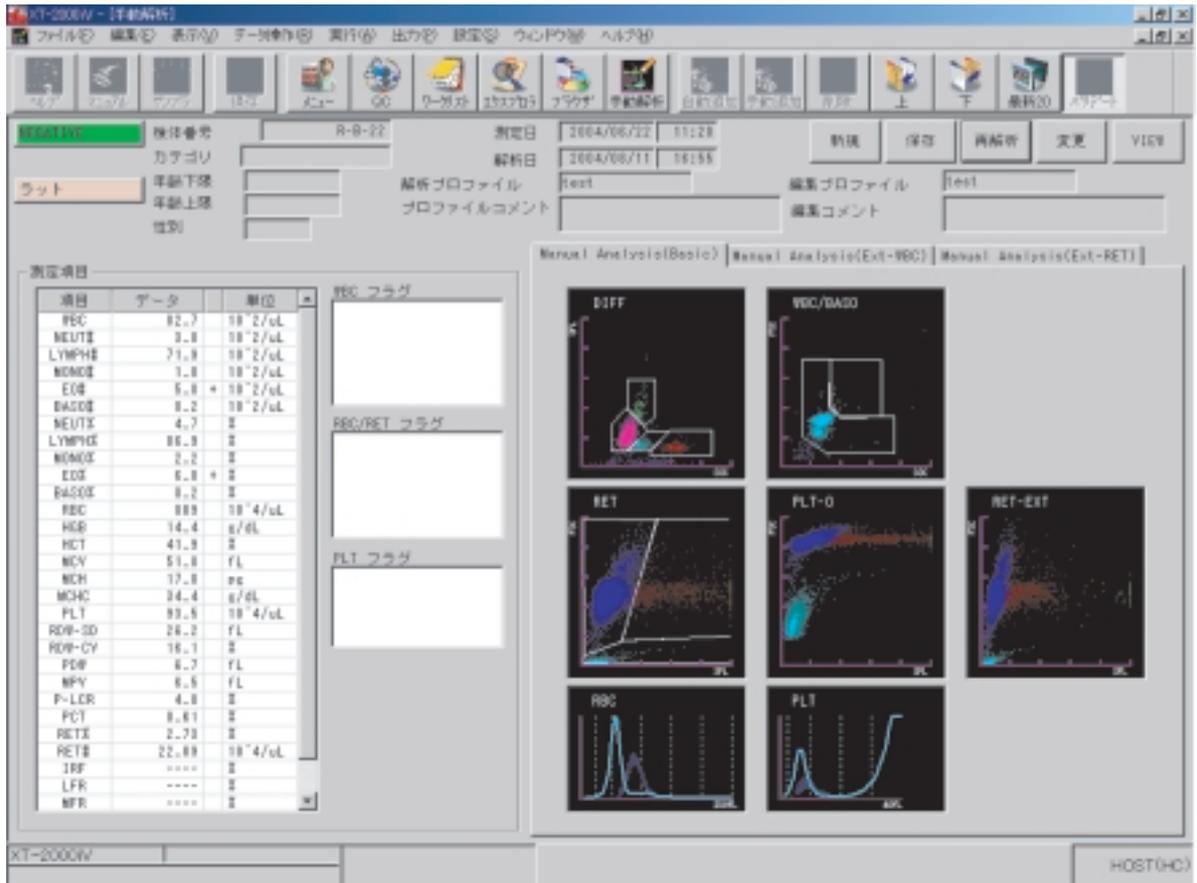
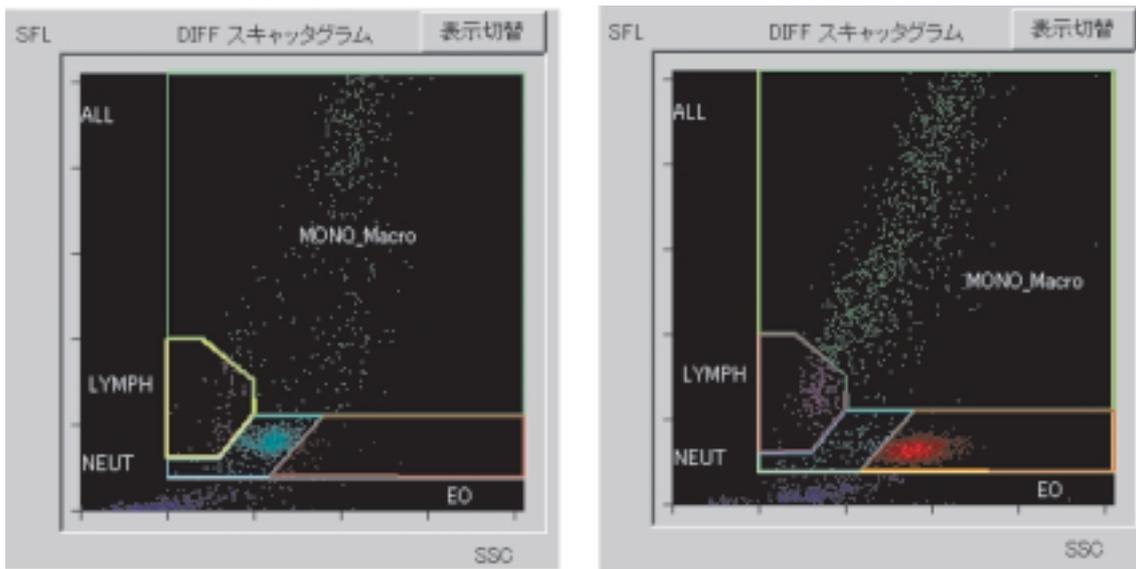


図12. マニュアル解析画面



ラット (好中球増多モデル) 肺胞洗浄液
(NEUT 51.5% EO 5.6%)

ラット (好酸球増多モデル) 肺胞洗浄液
(NEUT 3.2% EO49.0%)

図13. 肺胞洗浄液解析例

主な仕様

1. 名称

- 1) 名称：血球分析装置用動物対応ソフトウェア
- 2) 型式：XT-2000iV / XT-1800iV

2. 用途

本ソフトウェアは、XT-2000i / XT-1800iにインストールすることにより、抗凝固剤処理した動物血液の血球計数項目を測定する。

3. 装置構成

- 1) 測定部本体
- 2) 50検体サンプル
- 3) 空圧源
- 4) データ処理部

4. 測定項目

測定項目及び原理を表1に示す。

5. 所用血液量

- 1) マニュアルモード : 約85μL
- 2) キャピラリーモード : 約40μL
- 3) サンプラーモード : 約150μL

6. 処理能力

- 1) CBC : 約80 / 時間
- 2) CBC + DIFF : 約80 / 時間
- 3) CBC + DIFF + RET : 約80 / 時間 (XT-2000iVのみ)
- 4) CBC + RET : 約80 / 時間 (XT-2000iVのみ)

7. データ処理部

- 1) 記憶検体 : 3,000検体 (スキヤッタグラム含む)
- 2) 測定登録数 : 1,000検体

表1. 測定項目と原理

	測定項目	原理
CBC 項目	白血球数 (WBC)	半導体レーザーを用いたフローサイトメトリー
	赤血球数 (RBC)	シースフローDC法
	血色素量 (HGB)	SLS-ヘモグロビン法
	ヘマトクリット値 (HCT)	赤血球パルス波高値検出法
	平均赤血球容積 (MCV)	RBCおよびHCTから算出
	平均赤血球血色素量 (MCH)	RBCおよびHGBから算出
	平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	HCTおよびHGBから算出
	血小板数 (PLT)	シースフローDC検出法および半導体レーザーを用いたフローサイトメトリー
	赤血球分布幅 (RDW-SD, RDW-CV)	赤血球粒度分布から解析
	血小板分布幅 (PDW)	血小板粒度分布から解析
	平均血小板容積 (MPV)	
	大型血小板比率 (P-LCR)	血小板パルス波高値検出法
	血小板クリット値 (PCT)	
DIFF 項目	好中球比率 (NEUT%)	半導体レーザーを用いたフローサイトメトリー
	リンパ球比率 (LYMPH%)	
	単球比率 (MONO%)	
	好酸球比率 (EO%)	
	好塩基球比率 (BASO%)	
	好中球数 (NEUT#)	
	リンパ球数 (LYMPH#)	
	単球数 (MONO#)	
	好酸球数 (EO#)	
RET 項目 ^{*2}	好塩基球数 (BASO#)	半導体レーザーを用いたフローサイトメトリー
	網赤血球比率 (RET%)	
	網赤血球数 (RET#)	
	網赤血球高蛍光強度比率 (HFR)	
	網赤血球中蛍光強度比率 (MFR)	
	網赤血球低蛍光強度比率 (LFR)	
網赤血球幼若指数 (IRF)		

*2 RET項目はXT-2000iVのみ

おわりに

今回、血球分析装置用動物対応ソフトウェア XT2000-iV / XT-1800iV について概説した。

今後、皆様の研究室でご使用頂き、ご意見・ご要望を頂ければ幸いです。また、現在、適用動物種の拡大、並びに、21CFR Part11 対応ソフトウェアを開発中である。

参考文献

- 1) 今津雅範：多項目血球分析装置 XT-2000i の概要，
Sysmex J. 25 : 46 ~ 51, 2003.
- 2) シスメックス（株）開発本部：多項目自動血球
分析装置 XE-2100 の概要， Sysmex J. 22 : 76 ~ 84,
1999.
- 3) 松本英彬：XE-2100 の試薬技術について一特に
赤色蛍光反応について一， Sysmex J. 22 : 262 ~
269, 1999.
- 4) シスメックス（株）開発本部：当社のヘモグロビン
測定原理の概要， Sysmex J. 22 : 61 ~ 69, 1999.