

Readout

HORIBA Technical Reports

特集 血液をはかる

July 1991 ■ No.3

白血球分類機能付自動血球計数装置 (ARGOS 5DIFF)

The Hematology Analyzer with Leukocyte
Differential ARGOS 5DIFF

奥 成博・臼井誠次
Narihiro OKU, Seiji USUI

(Pages41-48)

株式会社 堀場製作所

白血球分類機能付自動血球計数装置 (ARGOS 5 DIFF)

The Heamatology Analyzer with Leukocyte Differential
ARGOS 5DIFF奥 成博・臼井 誠次
Narihiro Oku, Seiji Usui

要 旨

当社が技術提携をしているフランスの ABX 社で開発された血球計数装置 ARGOS と、それに接続可能な、白血球 5 分類用ユニット 5 DIFF について紹介する。本装置は、小型でコンパクトなものであり、かつまだまだ用手法で行われていることが多い白血球分類を粒子計測法である電気抵抗方式と染色細胞を光学的に測定する方式とを組み合わせ自動化したものであり、最近臨床検査分野で盛んに叫ばれている省力化に貢献が期待できる。

Abstract

This paper introduces the ARGOS blood cell counter developed by the ABX Corporation under a technical agreement with Horiba. Also discussed here is the Horiba WBC five-part-differential unit, the "5DIFF," which can be connected to the ARGOS blood cell counter. The ARGOS is a small, compact piece of equipment, useful for hand-held operations. It can automatically measure (1) the WBC differential (by electrical resistance, using a particle-counting method), and (2) dyed cells (these are measured optically). The efficiency, convenience, and advanced features of the ARGOS are expected to be welcome in the area clinical laboratory testing.

1. はじめに

我々が体に異常を覚え病院に行ったとき必ずと言っていいほど採取されるのが尿であり、血液である。それらに含まれる成分の濃度や量を測定することは現代医学にとっては必要欠くべからざるものとなってきている。その中でも血液中の赤血球、白血球などを調べる血液検査は必須検査の一つである。血液検査分野において、検査の省力化のために種々の装置が開発されてきた。その中の一つである血球計数装置は、血球が粒子の一種であることから、電気抵抗方式や光散乱方式の原理が採用され、その測定精度向上、高速処理化などの改良がなされており、今では、赤血球、白血球、および血小板の計数については、ほとんど検査の現場で使用されている。¹⁾

一方、白血球分類検査には、コンピュータによるパターン認識から分類する装置が開発されたが、前処理が必要であること、処理速度が遅く一度に多数検

体を処理できないことから、一般に普及するまでには至っていない。²⁾ 従って、白血球分類はまだまだ目視で計数しているところが多い。

近年、血球計数装置を使用し、白血球に特殊な試薬を作用させたときに得られる粒度分布図が三つのピークを示すことが発見された。³⁾ このピークを調べてみると、粒子サイズの小さい方から、リンパ球、単球、顆粒球に対応していることがわかってきた。これらの比率を求めることにより、簡易的な白血球分類を行うことが可能となってきた。また、この分布パターンを詳しく解析することにより、種々の血液疾患を予想することもできるといわれている。さらに最近では、試薬の改良や、電気抵抗方式だけでなく光学的方法を組合せすることにより、顆粒球を、好酸球、好塩基球、好中球に分類することが可能になっている。これらの手法を用いた装置は、正常細胞に対して精度良く分類できると報告されており、外来患者などのスクリーニング検査への適用が盛んに検討されている。⁴⁾

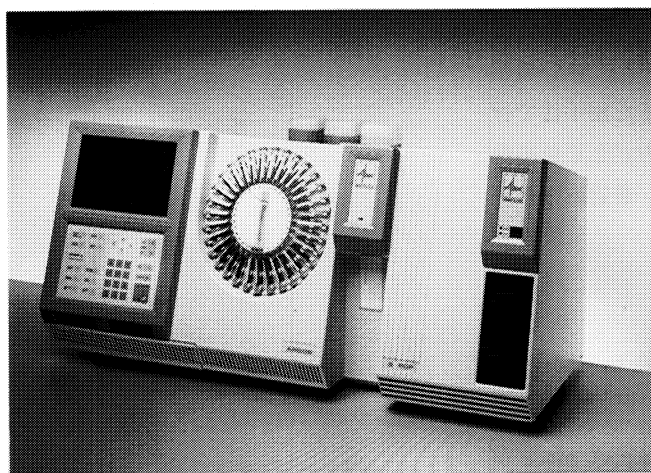


図 1 ARGOS 5DIFF の外観図
Overview of the ARGOS 5DIFF

測定項目	WBC, (LYM, MONO, *GRAN, +NEU, +EOS, +BASO, +ALY, +LIC (その割合と絶対数)) RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW, PLT, PCT, MPV, PDW
処理速度	1 時間120検体 (緊急モードで1 時間80検体)
必要サンプル量	200 μ l (オートサンプラーモード) 25 μ l (緊急モード)
検体チューブ	真空採血管
検体識別	バーコードリーダー 内蔵キーボードによる入力
操作	前面パネルにあるキーからの直接入力 キーボードによるプログラム選択
表示画面	バックライト付き LCD 画面 (640 \times 400dot)
内蔵 CPU	2つのマイクロプロセッサ MC68000 40MB ハードディスク 3.5インチフロッピーディスクドライブ
メモリー	10,000検体 (マトリックス, 粒度分布付き)
警報フラッグ	試薬残量 チャンバー間の液移送 圧力関係その他
記録	測定時刻, 患者の名前, トレーの番号, 測定結果 WBC, RBC, PLT およびバジチャンネルの粒度分布図 マトリックス, 各種フラッグ
プリンター	グラフィックプリンター (標準付属) チケットプリンター (オプション)
QC 機能	X 管理法, 移動平均法 (BULL'S METHOD), X-R 管理法 (LEVEY-JENNINGS) 平均, 標準偏差, および CV (%) の計算
寸法	ARGOS : 485H \times 760W \times 450D (mm) 5 DIFF : 485H \times 300W \times 450D (mm)
重量	88KG
電源	100/110/220V 60/50HZ
消費電力	870VA

表の測定項目中, *は 5 DIFF を接続しない場合に出力される項目,
+は 5 DIFF 接続時に出力される項目を示す。

表 1 ARGOS 5DIFF の仕様
Specifications for ARGOS 5DIFF

ARGOS とその付属装置である 5 DIFF は、電気抵抗方式をベースとし、白血球分類のために染色細胞を光学的に測定する方法を組み合わせ、血球計数と白血球 5 分類を実現している。

ARGOS と 5 DIFF の主な仕様を表 1 に、外観を図 1 に示す。

本稿では、ARGOS と 5 DIFF の特長、測定原理、構成、および臨床例について報告する。

2. 測定原理

2.1 白血球数、赤血球数、および血小板数の測定

白血球 (White Blood Cell: WBC)、赤血球 (Red Blood Cell: RBC)、および血小板 (Platelet: PLT) の計数原理は、本誌掲載している「血算 8 項目自動血球計数装置 LC-360」に述べた方式と同じ電気抵抗方式を採用している。血液の希釈倍率は、白血球測定では 240 倍と同じであるが、赤血球/血小板測定ではパルスカウンタの高速処理を可能としたため 10,000 倍と LC-360 の半分になっている。

計測されるパルスはカウントされる時、その高さにより 256 段階に弁別される。これから白血球、赤血球、血小板それぞれの血球の粒度分布図が求められる。(図 2, 図 3, 図 4) 白血球の粒度分布図では、三つのピークが現れ、そのサイズが 30fl から 100fl にリンパ球 (Lymphocyte: LYM) が、続いて 100fl から 150fl に単球 (Monocyte: MONO)、150fl 以上には顆粒球 (Granulocyte: GRAN) が分布する。これは、白血球を測定する際に添加される溶血試薬が、白血球の種類によって作用が異なり大きさが変化する現象に基づいている。

この結果から本装置では、白血球をリンパ球、単球、顆粒球の三つに分類しその比率が求められる。

2.2 ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の測定

ヘモグロビン濃度 (Hemoglobin: Hgb) 測定も LC-360 に述べた方式と同じシアンメトヘモグロビン法を採用している。ヘマトクリット測定 (Hematocrit: Hct) も同じく電気パルスの高さを積分する方式である。貧血の判断に用いられる Wintrobe 恒数 (MCV, MCH, MCHC)⁵⁾ も、定められた計算式により内蔵の CPU で演算される。

2.3 白血球 5 分類⁶⁾

白血球は臨床診断上 5 種類の細胞、すなわちリンパ球、単球、そして顆粒球と総称される好中球 (Neutrophil: NEU)、好塩基球 (Basophil: BASO)、好酸球 (Eosinophil: EOS) に分類して計数することが求められている。本装置の白血球 5 分類は、付属装置である 5 DIFF に設置されたバズチャンネル (Basophil Channel) と、マトリックスチャンネル (Matrix Channel) のふたつのチャンネルで行われる。

抗凝固剤 (EDTA-3K など) を加えた全血は二つに分けられる。バズチャンネルでは、白血球全体の数に占める好塩基球のパーセンテージを求める。マトリックスチャンネルでは、白血球全体の数に占めるリンパ球、単球、好中球、及び好酸球のパーセンテージが求められる。マトリックスチャンネルでは、好塩基球は単球に含まれて測定されるため、バズチャンネルで求めた好塩基球のパーセンテージをマトリックスチャンネルで求めた単球から差し引いて単球の

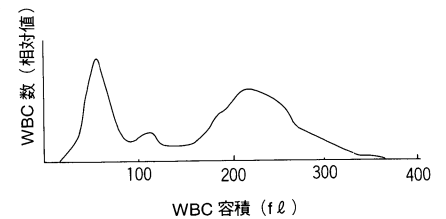


図 2 白血球粒度分布図
WBC distribution curve

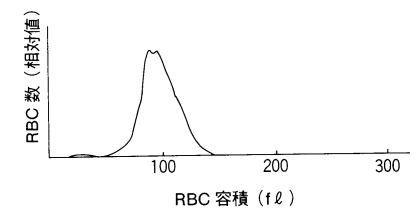


図 3 赤血球粒度分布図
RBC distribution curve

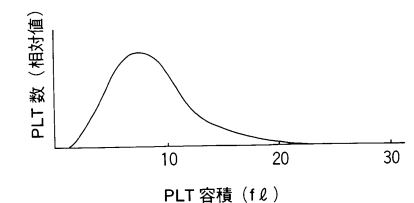


図 4 血小板粒度分布図
PLT distribution curve

パーセンテージを求める。

2.3.1 好塩基球の測定 (バジチャンネル)

全血15 μ lと2000 μ lのBASOLYSEと称される専用試薬が約40 $^{\circ}$ Cに温調されたチャンバーで混ぜられる。BASOLYSEは好塩基球の細胞膜にはまったく作用せず、好塩基球の大きさは変化しない。一方、血液中の赤血球細胞膜は、このBASOLYSEにより溶解され、赤血球粒子は完全に破壊されてしまう。これにより、2~3秒後には赤茶色の透明な液となる。同時に、好塩基球以外の白血球の細胞膜も溶解され裸核にされる。裸核化された白血球の大きさは、好塩基球よりも明らかに小さくなる。このようにBASOLYSEの作用により、血球を処理した後、WBC、RBCなどと同様に、電気抵抗法により好塩基球、および裸核化された白血球とを計数する。これよりBASOLYSEによって処理された白血球がアパーチャーを通過する際に得られる電気パルスを大きさで弁別することにより粒度分布図が得られる。(図5)この粒度分布図では、容量的に、好塩基球とそれ以外の白血球が明らかに分画されているので、比を求め、好塩基球パーセントが求められる。

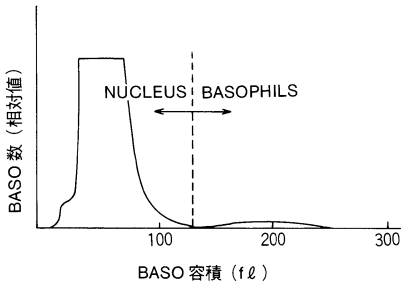


図5 好塩基球粒度分布
Basophile distribution curve

2.3.2 マトリックスチャンネル

25 μ lの全血と1mlのEOSINOFIXと称される専用試薬が40 $^{\circ}$ Cに温調されたチャンバーで混合される。その後1mlのDIFTONが加えられる。最終希釈倍率は80倍となる。このように処理された後、サンプルは光学フローセル(図6)に導かれ測定される。

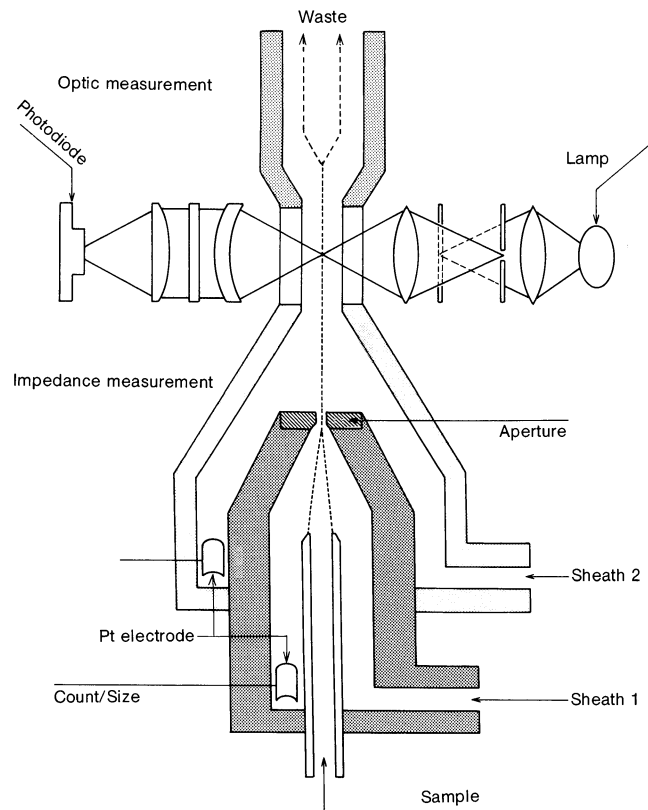


図6 光学フローセル構造図
Schematic illustration of optical flow-cell

EOSINOFIX は、血球に対して①赤血球を溶解する②好酸球以外の白血球の細胞膜も溶解し裸核にする③好酸球を強く染色するという3つの働きをする。DIFTON の働きは EOSINOFIX の作用を止めることにある。

まず、サンプルはシース液 1 (DIFTON) に囲まれ、細い流れを形成しながらアパーチャーを通過する。この際、アパーチャーの両端に設置された白金電極で電気抵抗の変化をパルスとして捉え、通過した細胞の大きさを測定する。

(電気抵抗測定) これから白血球の大きさに関する情報が得られる。

続いて、サンプルはシース液 2 (DIFTON) に囲まれ、光学測定部へと導かれる。光学測定部の両端には、タングステンハロゲンランプとフォトセルが配置され、白血球一個一個の染色度に応じた信号が測定される。(光透過度測定) この値は白血球の細胞組成に関する情報となる。

これらの電気抵抗測定と光透過度測定によって得られる測定値は、サンプルの流速を一定にすれば、白血球一個について電気抵抗と光透過度を測定した時間のズレを一定にすることにより、一個一個の白血球について求めることができる。このようにして求められた2つの情報をマトリックスとして表示する。正常分布図の一例を図7に示す。

3. 装置構成⁷⁾

3.1 システム構成

ARGOS のデータフローを図8に示す。ARGOS は、装置本体及びプリンターより構成されている。この場合、測定項目は、血球計数及び白血球3分類である。白血球5分類の結果は、5 DIFF ユニットを接続することにより得られる。

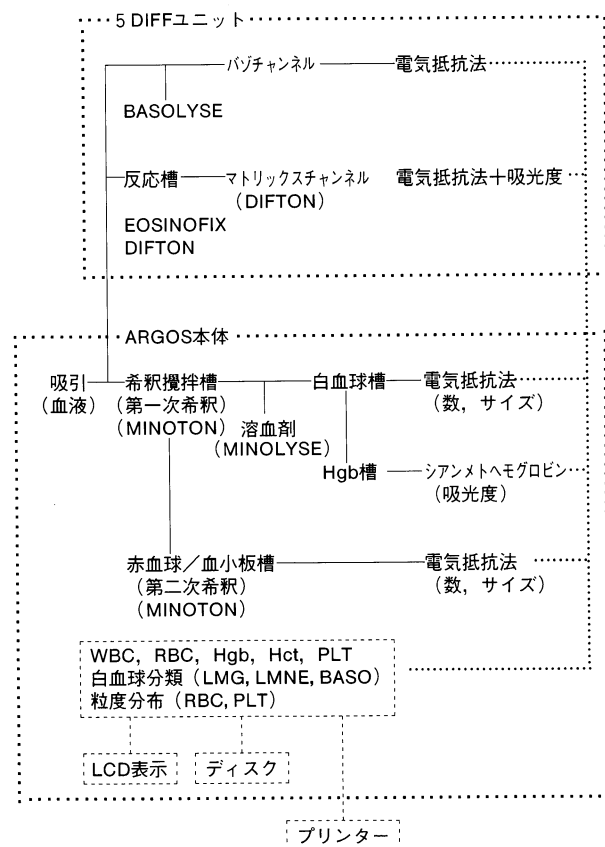


図8 ARGOS データフロー図
Flow of data in the ARGOS

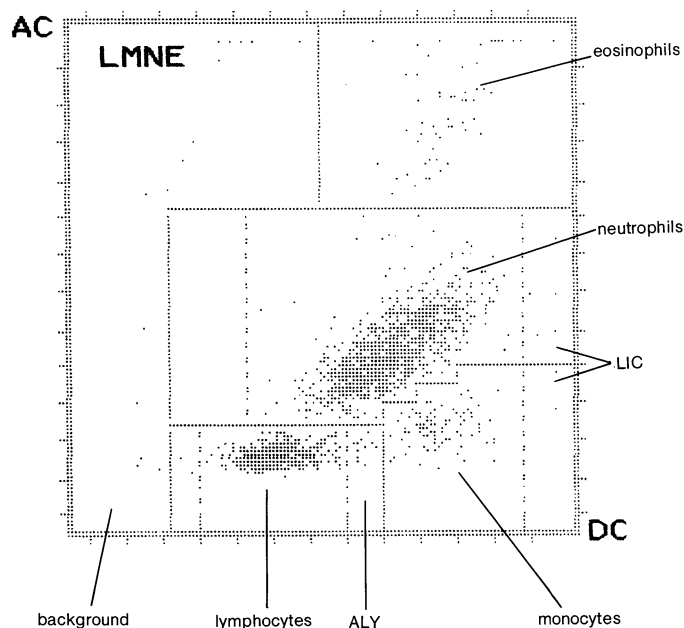


図7 白血球分布図 (正常)
WBC scattered matrix (normal)

本体サンプリング部では、血液吸引後、希釈、溶血などの前処理が行われ、白血球槽、赤血球／血小板槽、Hgb 槽の3つの測定槽に検体が送られる。白血球槽では、白血球数、白血球粒度分布が測定され、赤血球／血小板槽では、赤血球数、赤血球容積和、赤血球粒度分布、血小板粒度分布が測定され、CPUで測定値及び各パラメーターが算出される。

5 DIFF ユニット接続時には、本体サンプリング部より血液が、5 DIFF ユニットに送られ、希釈、溶血、及び染色の前処理が行われ、バゾチャンネル及び、マトリックスチャンネルにサンプルが送られ、それぞれのチャンネルで、各細胞が測定される。これらの測定データは、ARGOS 本体に送信され、本体のCPUで処理され、白血球5分類に関するパラメータが算出される。これらのサンプリングシステムは、ニューマティックで形成されており、その制御は、時間及び、各部に取り付けられたセンサーの出力をCPUで判定する事により行われている。

また、測定値及びグラフは、一括してLCD及び付属のプリンターに出力されると同時に、内蔵のハードディスクに記憶される。

3.2 付加機能

ARGOS は、血球計数以外にデータ送信機能、記憶管理機能、プリンター出力機能、特別機能、精度管理プログラムがある(表2)。これらの機能は、ARGOS を単なる血球計数装置ではなく血液総合診断システムとしている。装置の操作は、本体LCD表示、ファンクションキー、テンキー及び、付属内蔵キーボードにより、対話方式で行なえる。

3.3 フラッグ

ARGOS は、測定データに関するフラッグ・メッセージを持っている(表3)。フラッグには①一般フラッグ②白血球フラッグ③赤血球フラッグ④血小板フラッグがあり、5 DIFF ユニット接続時には、⑤5分類フラッグも出力される。

また、これらのフラッグは使用用途に応じ①装置状態に関するフラッグ(システム・メッセージ)②測定値に対して正常値の上限、下限を設定することに

データ送信機能	RS-232C出力の設定
記憶管理機能	記憶検体の再呼び出し リスト表示 記憶検体量の表示
プリンター出力機能	記憶管理機能との組合せによるプリンター出力
特別機能	測定項目の選択 単位の選択 正常値範囲の設定 フラッグの設定 メンテナンスプログラム
精度管理プログラム	管理血液による変動管理 患者血液による管理

表2 ARGOS 5DIFF の付加機能
Additional functions for ARGOS 5DIFF

フラッグ	システム	アブノーマル	サスペクト
一般	*	H, L	
白血球	*DIL	Abnormal distribution Leukocytosis Leukopenia Lymphocytosis Lymphopenia Granulocytosis Granulopenia	L1, M2, G1, G2, G3, EOS) .5, BAS) .2
赤血球		Abnormal Distribution Polyglobulia Anemia Macrocytosis Microcytosis Anisocytosis Hypochromia	
血小板			M, **M, **S, **P
5分類	CO		MP, MB, LL, NL, MN, LN, RM, RN, NO, LB

表3 ARGOS 5DIFF のフラッグ一覧
List of flags for ARGOS 5DIFF

より導き出されるフラッグ(アブノーマル・メッセージ)③粒度分布,マトリックスを解析し,予め求めておいた臨床データと比較することにより求められるフラッグ(サスペクト・メッセージ)に分類される。

これらのフラッグは,測定データの異常を知らせるだけでなく,その信頼性,血液学的臨床診断に関する情報をも与えるものである。

4. 臨床例

4.1 白血球3分類

病院での患者検体300検体について, ARGOS 3 DIFF と用手法(100カウント法)と比較評価した結果が図9, 図10, 図11である。その相関係数は,リンパ球%が $r=0.915$, 単球%が $r=0.356$, 顆粒球%が $r=0.902$ であった。ここで単球%の相関性が低いのは,その値が低いために起因しているものと考えられる。

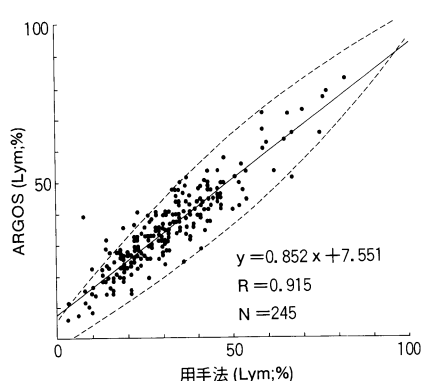


図9 リンパ球相関図
Lymphocyte correlations between the ARGOS and the Coulter STKR

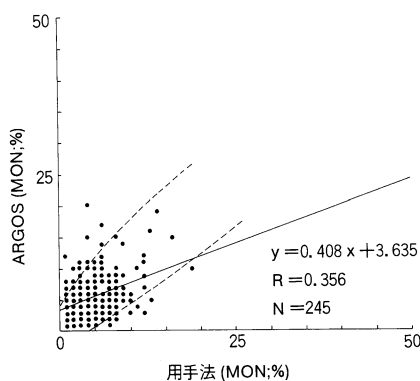


図10 単球相関図
Monocyte correlations between the ARGOS and the Coulter STKR

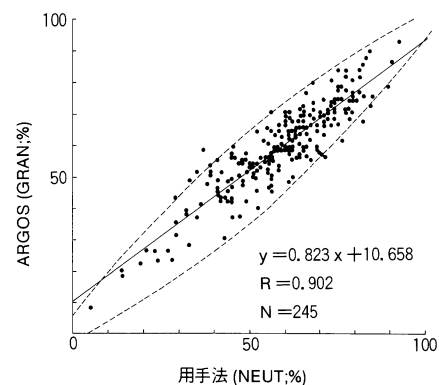


図11 顆粒球相関図
Granulocyte correlations between the ARGOS and the Coulter STKR

用手法⁹⁾の場合,その標本の作成,細胞のカウント数(100個)が少ないなど,統計的問題が介在する。この用手法の統計的問題について,Rumkeが検討した結果,100カウントでは,信頼限界95%以内であっても,再検時には相関図に示す破線の範囲内であるとの報告がなされている。⁸⁾したがって,この相関結果から,ARGOS 3 DIFFがスクリーニング用として従来法に置き換え使用可能であると考えられる。⁹⁾

4.2 白血球5分類

一例として,フェラリア患者の測定結果を図12に示す。マトリックス図に見られるように,正常(図7参照)とは違い好酸球領域に著しい細胞の分布が見られ,EOS%は22.8%を示した。用手法においても,EOS%は23%と観測された。この結果は,フェラリアによるアレルギーの症状をよく反映している。

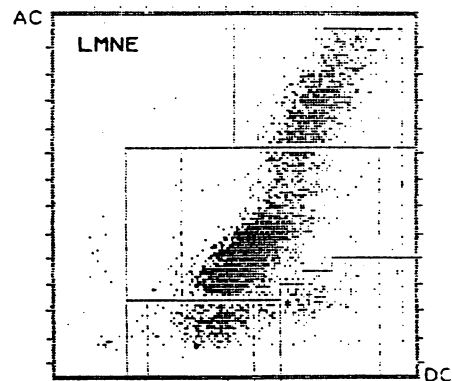


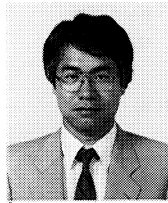
図12 白血球分布図(フェラリア患者)
WBC scattered matrix (case of filaria)

5. まとめ

血液検査分野で従来用手法で行われていた項目を自動化した ARGOS 5 DIFF について紹介した。本装置は、コンパクトであり用手法と比べ格段に精度が向上している。病院の臨床検査室では、検査の省力化が大きな課題の一つであるため、今後臨床現場で貢献できることを願っている。

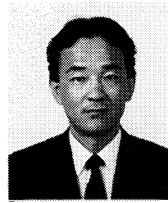
参考文献

- 1) 新谷和夫 “血球係数とくに容積測定法の発展と問題点” 臨床血液(1984) P768-775
- 2) P.Wilding “Use of pattern recognition technology for determination of the human differential leukocyte count” Blood Cells(1985)P187-201
- 3) England J.M.et al “Simple method for automating the differential leukocyte count”Lancet (1975)P492-493
- 4) W.R.Swaim M.D. “Laboratory and clinical evaluation of white blood cell differential counts” A.J.C.P(1991)P381-388
- 5) 臨床検査法提要 (改訂第29版) 金原出版 P245-248
- 6) ABX 社 “ARGOS 5DIFF 技術資料”
- 7) ABX 社 “ARGOS 5DIFF 取扱説明書”
- 8) 臨床検査法提要 (改訂第29版) 金原出版 P273-274
- 9) C.L.Rumke M.D. “The Statistically Expect Variability in Differential Leukocyte Counting”



奥 成博
Narihiro Oku

開発2部 主任
1955年10月7日生
立命館大学理工学部化学科
京都保健衛生専門学校
第2臨床検査学科



臼井誠次
Seiji Usui

製品開発部 係長
1951年8月12日生
大阪大学基礎工学部
生物工学科

