Readout
HORIBA Technical Reports

特集　医用計測システム　April 1998 ■ No.16

血液細胞の光学電気的自動分析
Optoelectronic Analysis of Blood Cells

巽　典之・津田　泉・辻　義光・田窪孝行
Noriyuki TATSUMI, Izumi TSUDA, Yosimitsu TSUJI, Takayuki TAKUBO

(Pages 4－10)

株式会社 堀場製作所

Guest Article
特集寄稿

血液細胞の光学電気的自動分析

Optoelectronic Analysis of Blood Cells

巽 典之* 津田 泉* 辻 義光* 田窪孝行*

(* 大阪市立大学 医学部)

要旨

近年，臨床検査室の自動化は目覚しく発展しており，そこでは計測技術と情報処理技術の進歩が大きく寄与している。しかし，血液検査は変性しやすい生細胞を扱うため，検査結果の正確性の保証を含め，自動化には解決すべき課題が多くあった。本稿では，血液検査自動分析の最近の動向と近い将来について論じた。

Abstract

In recent years, marked progresses have taken place in the automation of clinical laboratories and advances in measuring and information processing technologies have helped accelerate the move. However, since blood cell analysis deals with living cells which are prone to ready degeneration, much had to be done before the process could be performed without human intervention and the analytical results be made stable and accurate. This paper discusses recent trends and future courses of automated analysis of blood cells.

1．はじめに

血液検査が用手法的ないし顕微鏡的に行われた時代は過ぎ去り，今は検体検査の80%余りが電気的自動分析の時代となった。臨床検査室(Clinical Laboratory)の中では試験管だけが動いており検査技師があまり見かけられない。すなわち，臨床検査では大半の検体が機器で処理され，ごく一部の検体のみが専門技師の手で処理される。そのことから，現在の医師は検査値を判読するだけで診療が可能であり，検査方法や過程はほとんど理解していなくてもよいともいえる状況にある。このようにして作り出される検査値は，外部および内部精度管理法の普及により，ひと昔前に比し，正確度・精密度の何れにおいても極めて優れたものとなっており，その陰には最近の計測技術および情報処理技術の進歩があることになる。

血液検査が臨床化学検査と大きく違っている点は，被検試料が生細胞を対象としており，極めて変性し易いことと，その生細胞をコントロール試料として扱わねばならないことである。この生物学的特性の易変性が全ての細胞計測を困難にしている元凶であるものの，それを克服した昨今の細胞計測技術は，全ての医師に血液検査を必須不可欠の臨床検査として認知させた点で賞賛に値するものと言える。本稿では最近の血液検査自動分析の動向とその近未来について述べることとする。

2．赤血球・血小板自動分析[1)]

血液自動分析の嚆矢は1953年のコールター原理の開発である。その後，半自動，全自動型血球計数装置が相次いで開発され，基本測定項目に赤血球粒度分布，血小板粒度分布，ヘモグロビン分布，白血球3分類から5分類，異常所見フラッギング・システム，網赤血球測定などが順次追加され，現在では1ml以下の血液でもって多項目を同時測定できる総合的血液分析装置にまで成長してきている。

図1にABX社製，網赤血球計測機能付自動血球計数測定装置（VEGA Retic）の測定フローを示す。

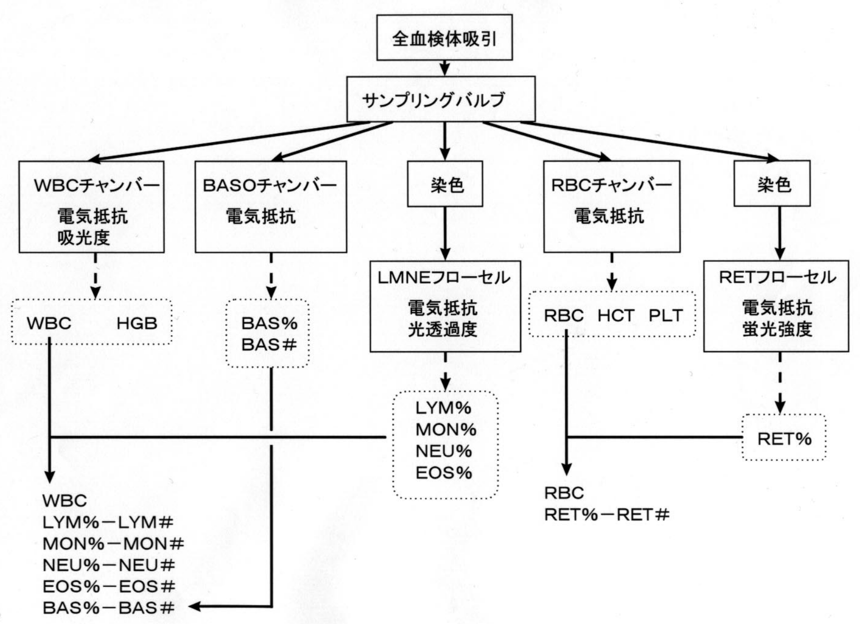

図1 網赤血球計測機能付き自動血球測定装置(VEGA Retic)の測定フロー
Measurement flow of VEGA Retic

スフローなど)をするなど，装置自体に各機種とも種々の工夫をこらしている。

粒度分布は個々の細胞容積を積分図としたものであり，赤血球粒度分布，血小板粒度分布**(図2)**，そして白血球分画にも利用される。なかでも赤血球の球粒度分布幅(Red cell Distribution width: RDW)は赤血球大小不同症の判定に，平均血小板容積(Mean Platelet Volume; MPV)は巨大血小板症の判定に極めて有用である。

2.1 全血算

血球計数装置で赤血球数(RBC)と血小板数(Plt)は同時測定され，その識別は信号強度の強弱でもって決定される。個々の細胞の計数と容積測定計測原理は，電気抵抗法(インピーダンス法)が大半であるが，一部は光学的測定法を採用している。白血球数(WBC)測定では，全血を界面活性剤ないしサポニンでもって赤血球を溶血させた残りの粒子を白血球とすることから，赤血球凝集(寒冷凝集など)，血小板凝集塊が白血球とみなされることがある。他方，ヘモグロビン(Hgb)はシアンメトヘモグロビン法を採用している機種が多いが，今後は環境汚染度が低い界面活性剤(SLSなど)の利用が盛んになるものと考えられる。赤血球指数としての平均赤血球容積(MCV)，平均赤血球ヘモグロビン(MCH)，平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)はRBC，Hgb，ヘマトクリット(Hct)から自動計算され，貧血症と多血症の診断には不可欠のパラメーターである。他方，RBC，Hgb，Hct，血小板数(Plt)，WBC，そして赤血球指数が基本８項目と称され血球計数装置には不可欠の測定項目である。それら基本項目の内，機種間差の多いのはPltとWBCであり，前者はN/S(雑音細胞信号)間の切り分けが原因し，後者では溶血剤の差が測定値の差をもたらす大きな原因となる．Hctの機種間差は血球浮遊液の浸透圧とpHが大きく関係する。血球計数では，固有の細胞検知孔の構造や，舞い戻りや同時通過を減少させるための特異的な流路の製作(シー

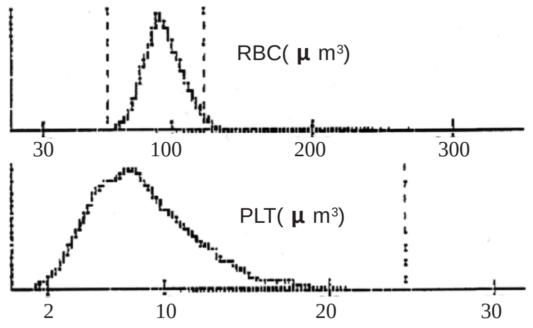

図2 VEGA Reticで表示される赤血球・血小板の粒度分布図
Particle distribution curve of RBC and platelet displayed on VEGA Retic

2.2 網赤血球，網血小板計測 [2)]

網赤血球(Reticulocytes)とか網血小板(Reticlated platelets)はRNA結合性(蛍光あるいは発色性)色素で染色される人工的細胞内構造物を保有している赤血球あるいは血小板をさすことから，正確な表現をするならばRNA-rich cellと呼ぶべきである。このRNAは細胞内RNAaseで消化され，赤血球では約4日，血小板では数時間で成熟型となるので，その分画比の多寡は骨髄内での赤血球造生あるいは血小板の造成の強さを反映する。貧血症では貧血の度合い(ヘマトクリット)が強い程，末梢血に幼若な網赤血球が多く遊離され，末梢血内でゆっくり成熟していく。この現象を骨髄推移(marrow shift)とよぶが，末梢血でのこの増加を相対的評価しやすくするためにヘマトクリット補正を行うことがある**(図3)**[3, 4)]。

Corrected reticulocyte count (%)=

$$\text{observed count} \times \frac{\text{measured hematocrit (\%)}}{45}$$

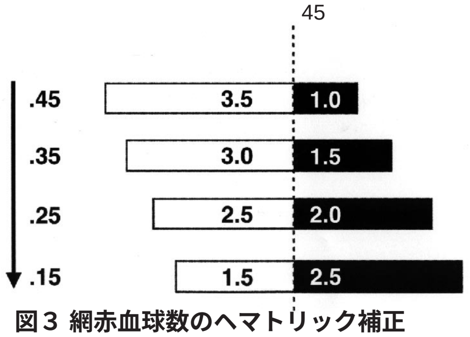

図3 網赤血球数のヘマトリック補正
Corrected reticulocyte count
PCV(ヘマリック)と成熟日数
(骨髄および末梢血における)の変化

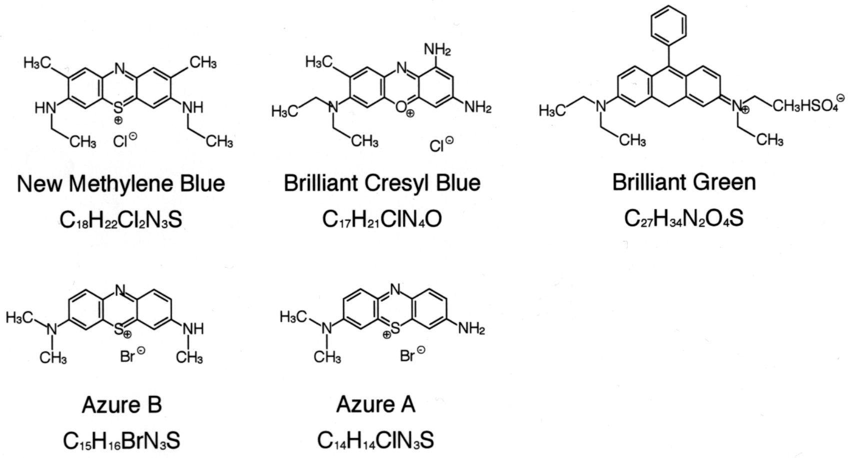

図4 主な発色性色素
Main color couplers

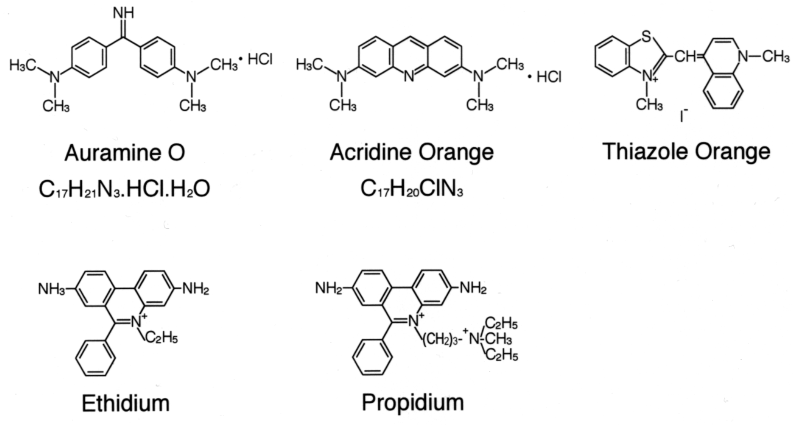

図5 主な蛍光性色素
Main fluorescent dyes

網状細胞の顆粒凝集状構造の観察は，これまで発色性色素**(図4)**であるニューメチレン青，アズールB，ブリリアントクレシル青を用いた超生体染色法(超生体とは固定操作前に染色することをさす)でもって染色し顕微鏡で解析されてきた。通常のギムザ染色法では，メタノール固定操作でもってRNAとその結合蛋白が細胞質内でそのまま固定され，これにギムザ色素構成成分であるメチレン青が付着して，その結果，網赤血球ないし網血小板の細胞質は全体にわたり青みを帯びた色調となり，網状細胞のRNA-richな網状構造物は観察できない。

これに対し蛍光性色素**(図5)**としては，3 flat aromatic ringsを基本骨格とするアクリジン系色素などが主に用いられている。これらは分子量が小さく容易に細胞膜を通過し，DNAへは2重ラセン構造の間に6核酸に1分子割合でintercalation(介在)結合ではまりこむのに対し，RNAにはヌクレオチドのリン酸基の陰イオンと順次stacking(屋根瓦様)結合していく。それら色素は，構造類似体であるDNAおよびRNAの両者に対して結合性を示しうるが，染色される顆粒(RNA)と核(DNA)の蛍光色調は異なることが多い。そのaffinity(結合度)，色素濃度，イオン強度，pH，カチオン，温度などに大きく影響され，色素浸透性は細胞外環境としてのイオン強度，イオン構成，蛋白，糖などで，また膜構造により左右されることから，DNAとRNAを同条件でうまく染め出しうる色素の数は少ない。RNAの場合，色素の一端はリン酸基で満たされるが，他端がさらに別のリン酸と結合すると同時に色素・色素間結合が生じて大きな色素塊と成長することから2相性の反応曲線をとる。この結合はvan der Waal静電結合であり，僅かの条件の差でもって容易に離れうる。一度染色された細胞は核酸構造の障害のため死滅する[5]。蛍光性色素では，色素低濃度域でRNAが結合し原液から推移した波長での固有蛍光を発するがこの濃度では顆粒凝集状構造は観察できない**(図6)**。この構造を形成させるためには，より高濃度の色素と強い振盪操作が必要となる。

網赤血球の自動機器による算定法はパターン認識法・発色比較型フローサイトメトリー・蛍光比較型フローサイトメトリーに大別されるが，

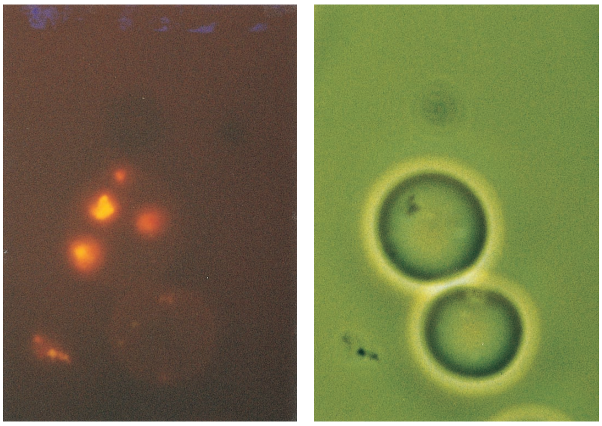

図6　チアゾールオレンジで染色された網赤血球
Colored reticulocyte by Thiazole Orange

全ての基本参照検査法はニューメチレン青ないしアズールBを用いる伝統的顕微鏡法[3,4,6,7]である。網血小板は細胞形の小ささから顕微鏡下での網状構造の観察・同定は非常に困難であり，フローサイトメトリーでのみ解析可能である。ちなみに，ジョリー小体やマラリア原虫は網赤血球として捉えうる。

蛍光色素を用いた網赤血球自動算定法では，RNA量に比例した蛍光強度が得られ，これが成熟度を反映する。このことから蛍光量による成熟度分類(高・中・低蛍光)ないしは成熟度指数(immature rericulocyte fraction; IRF)でもって造血能の評価をすることができる[8]。自動血球計数装置VEGA-Reticでは，チアゾールオレンジを含む染色液で細胞を染めスキャッタグラムから成熟赤血球と網赤血球を識別し，成熟度による3分類も同時に行っている。ただ，現在のところIRFの算出方法には国際的な基準はない。網赤血球はin vitroでは成熟が遅れることから，管理用物質は比較的容易に調製できる[9]。

3．白血球自動分析

白血球分類の基本参照法はロマノフスキー染色である。ロマノフスキー染色とは，固定標本をメチレン青とエオシンでもって染色する方法の総称であり，メイ・グルンワルド・ギムザ法もライト染色法もこの中に含まれる(**図7**)。ここで用いられる色素としての陽イオン・塩基性色素としてのメチレン青はBernthsen法で合成されるものであり，Azure Bほか微量成分としての金属塩を含んでいる。さらにこのメチレン青が製造中および保存中に酸化的メチル化を受けて，主成分であるMacNeal's Azure Aと，Polychrome methylene blue of fieldと称される色素群が形成され，これがロマノフスキー効果と呼ばれる異染効果を生み出す。他方，陰イオン・酸性色素としてのエオシンにはeosin Yとeosin Bが混合していることが多い。このメチレン青とエオシン塩の混合溶液は両イオンの混合の結果poly-

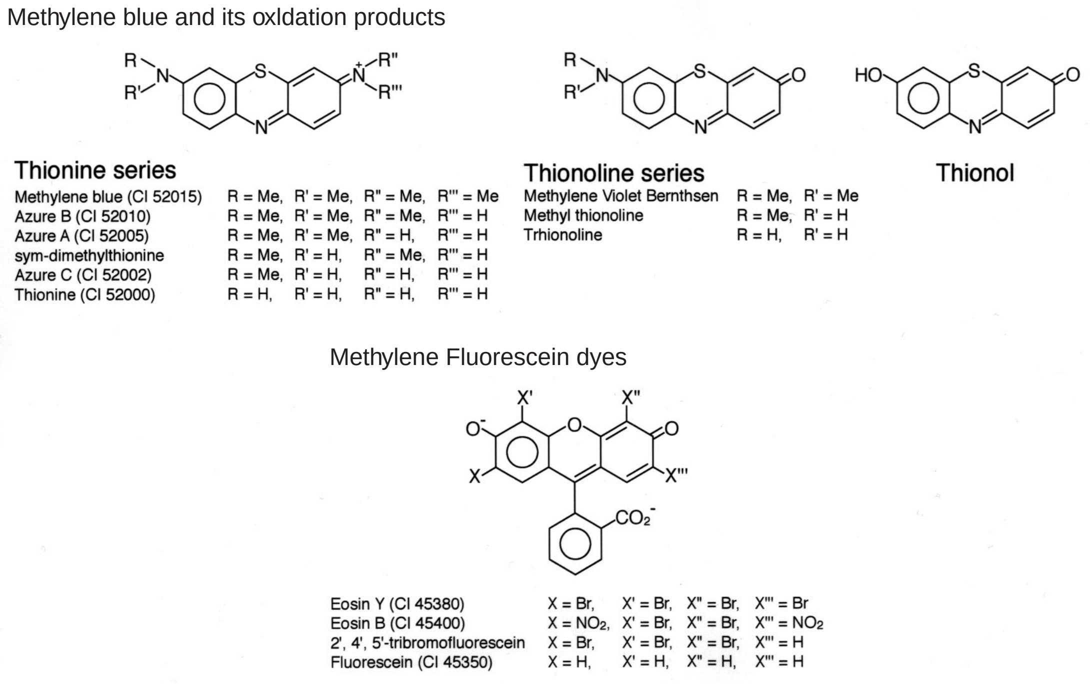

図7 ロマノフスキー染色に用いられるメチレン青およびエオシンの構造式
Constitutional formula of Methylene Blue and Eosin using for Romanowsky coloring

chrome methylene blue eosin結晶を形成し，沈殿してくる。この結晶である中性色素methylene blue eosinateのメタノール溶液がギムザ染色液として市販されており，これを用いることで固定と染色に利用できると同時に，血液細胞特殊顆粒を綺麗に染めあげることができる[5]。ただ，ロマノフスキー色素の多様性から米国NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)ではAzure BとEosin Yを用いる方法を基本としている[10]。

3.1　パターン認識方式

本方式は上述の伝統的ギムザ染色法で作成された標本を顕微鏡下で自動分析する方式であり，10年ほど前には多種の機種が存在しており，私どもも同様の分析器の試作を試みたこともあるが**(図8)**，現在は2社が市場に販売しているに過ぎない。その衰微の理由として，分析細胞数の少なさによる精密性の悪さ，処理速度(分析効率)の遅さ，再検率の高さ，そして分析器の維持の難しさなどがあげられる。このことから，本方式の分析器は今後，フローサイトメトリー法で異常検体をスクリーニングした後の細胞同定・確認・像のファイリングなどに利用するのが最も効率的でないかと考えられる。

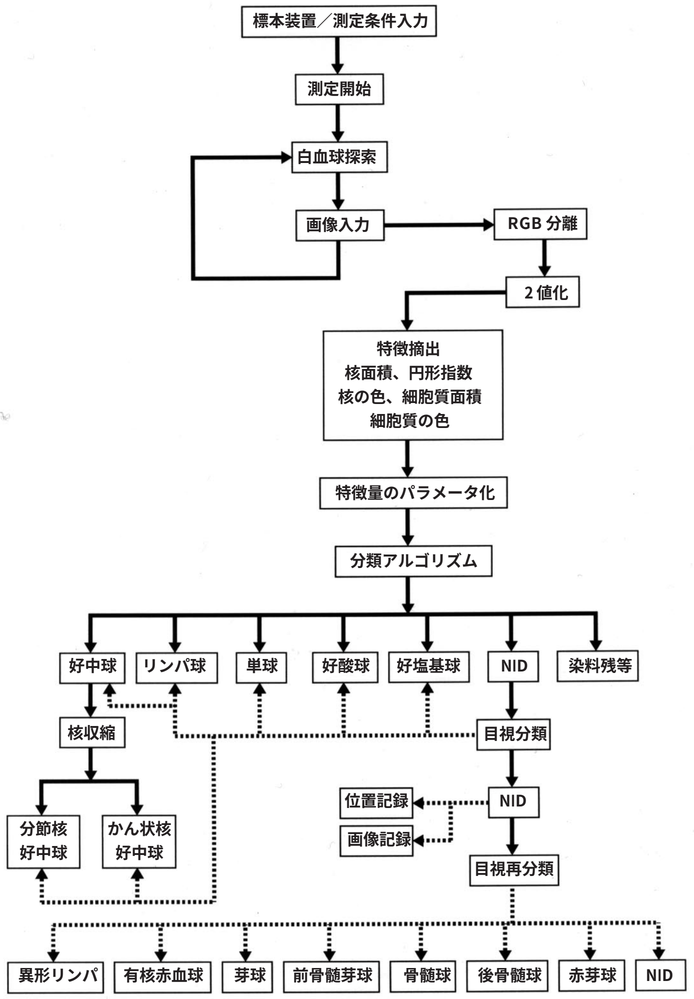

図8　パターン認識方式による白血球分類のアルゴリズム
Algorithm structure for WBC classification using pattern recognition

3.2　フローサイトメータ分析

自動白血球分類に用いられる本分析法は，モノクローナル抗体を用いる免疫学的フローサイトメトリーとは異なり，直流・交流抵抗計測，散乱光計測，DNA特異的色素や顆粒特異的色素による染色度，組織化学的染色度，酸・アルカリ溶血度などを組み合わせて細胞信号を解析し，その結果を電算処理してスキャッタグラム上で白血球分画を同定してゆく電子的白血球分類と呼びうるものである。これを古典的ギムザ分類に適応させているものの，全てがうまく符号するわけではなく，屡々乖離する細胞が出現する。例えば，白血病細胞や異形リンパ球のような病的細胞では正常白血球と電気的識別が困難なことが少なくない。このため血球分析装置では，光学電気的性状が異常な細胞信号がでたものに対して，メッセージないしフラッグを立てて分析者に警告を与えている**(表1)**。しかし，正常検体に対する分析性は顕微鏡的分析法をはるかに凌ぐ識別能を有している。この精度のよさは，フローサイトメトリー法の分析感度の高さ，分析細胞数の多さによるものであり，またその評価のための国際標準参照法ができあがっているためである[11]。

自動血球計数装置VEGA[12]の分析系では，ペルオキシダーゼと同様の染色態度をもつクロラゾールブラックEでもって溶血後の白血球を染色し，その光透過度と電気抵抗法により求めた細胞容積から好中球・リンパ球+単球，好酸球，好塩基球を分類する**(図9)**。さらに好塩基球以外の細胞を溶血させ，残った好塩基球を電気抵抗方式で測定するバゾチャンネルが設けられている。白血球分類だけではなく網赤血球解析も可能な最新機種VEGA-RETICでは，血液容量はマニュアルモードで130 μlであり，処理速度は1時間当たり120検体となっており，その性能評価試験でも優れた成績を示している。

表1 VEGA Reticに表示されるメッセージ一覧
Message table of VEGA Retic

WBC	RBC	Plt	Ret
Leukocytosis	Erythrocytosis	Thrombocytosis	Immatures
Leukopenia	Cold agglutinin	Thrombopenia	NRBC
Lymphocytosis	Anemia	Microcytosis	Reticulocytosis
Lymphopenia	Macrocytosis	Schizocyte	Reticulopenia
Neutrophilia	Microcytosis	Small cell	
Neutropenia	Anisocytosis	Plt aggregate	
Eosinophilia	Hypochromia		
Myelemia	Poikilocytosis		
Large immature cell	Pancytopenia		
Atypic. lymphocyto			
Left shift			
Nucleated RBC			
Monocytosis			
Basophilia			
Pancytopenia			

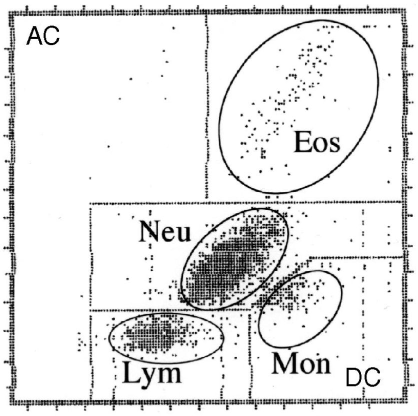

図9 VEGA Reticに表示される白血球マトリックス
WBC scattered matrix on VEGA Retic

4. 血液検査正確性の保証

現在の血液検査の精密性は臨床化学検査のそれを上回るものとなっている。その正確性は生物学的国際標準物質であるヘモグロビン溶液と各種の国際的基準参照計測法が確立しているためである。最近では，フローサイトメトリー法による網赤血球数，白血球分類，血小板などの自動計測のための参照測定法がほぼ完成しており，血球計測の信頼性は一層高くなりつつある。さらに，外部精度管理法，内部制度管理法も標準化されており，検査室間およびメーカー間差は極めて少ないものである。

このように基本的参照法，評価法，管理法などができあがっているにも関わらず，精度管理用物質についてはまだ問題がある。内部および外部精度管理用物質に用いうる理想的試料は新鮮血である．しかし新鮮血は生活性があり，保存するとどんどん変性劣化する．他方，精度管理用物質に求められるのは生物物理学性状の長期安定性である。そのためより良い管理用試料を得るための努力が重ねられているものの，まだ確実なものが得られていないのが現状である。

5．総合的血液分析装置

血液検査装置が全て同様の標準化された機能を有する現在，その商品の差別化と検査効率の向上を目指して各社が積極的に取り上げているのが，血液分析装置の拡張性であり，この目的のために，自動血液標本作製装置，自動染色装置，生化学検査・凝固検査・感染症マーカー(CRPなど)検査の組み込み，搬送ベルトライン・システムへの対応，検査・病院情報システムへの対応化，高容量データメモリーの装備などであり，これらが各種血液分析装置の特徴を作り出している。さらに，情報システム対応，Laboratory Information Systemの組み込みが現在の情報化社会ではニーズが高く，このため，ウインドウズ採用，インターネット対応，リモート・メインテナンス機構の作成などを一部の機種で実行している現状にある。次なる問題は，安全性と環境保全の対する配慮がなされているか否かも課題とされる。このように考えると総合的分析装置はますます巨大化するものの，臨床検査に必要な提供情報と経済性を考えると，総合分析装置の使い方はかなり限られてくるであろう。

6．おわりに

今，臨床検査市場は世界的に厳しい医療環境のもとにいかに変革を遂げるかが盛んに討議されている。1960年代は検査法の開発，1970年代が自動化，1980年代が総合化，1990年代が搬送システム化，そして2000年代はモデュール化(ダウンサイジング化)あるいはマルチ分析化の時代と考えられている。他方，世界的に大型機器の市場は飽和し，小型機器市場の開発に検査機器メーカーの成否がかかるとも考えられている。この意味において小型血球計数器によって多項目同時迅速測定可能となれば，新しい活を市場に入れることができるであろう。

血液検査は世界的に極めて標準化されており，対話と協調のなかで血球計数装置が製作されている。この標準化への努力を重ねている団体としては，基本的検査に対する国際標準を検討しているICSH(International Council for Standardization in Hematology)があり，その作業はNCCLSやWHO(World Health Organization)と連動している。他方，新しい検査に対する標準化はISLH(International Society of Laboratory Hematology)が熱心であり，ホリバグループからは代表としてラコムスキー氏が評議員として参画している。これらが総合され，ほぼ全ての血液分析装置が同様の分析を同じレベルでもって計測できるようになっており，今後もこれら諸団体の指導により血液検査の質は一層向上すると思われる。

今ひとつの問題は，臨床検査が次々と自動化されるとともに臨床検査技師の専門的知識と経験を生かしうる領域が少なくなりつつある現状であり，これからの技師は生理的検査，血液形態分析，病理・細胞診などに限定されてくるのではないかとも予測されている。しかし，臨床検査に人の心が通うような検査機器を理想として製作された機種は，検査技師や医師に愛用されるのではなかろうか？

参考文献

1) 巽 典之，前田宏明，津田 泉，臼井誠次，"自動血球計数の基礎知識"，厚生社 (1991)，p.19-44.
2) 巽 典之．三輪史朗編，"血液病学"，文光堂(1993)，p.91-172.
3) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). "Method for reticulocyte counting NCCLS Document H16-P”, NCCLS(1985)，p.225-236.
4) J. A. Kopke, "Practical Laboratory Hematology", Chrchill Livingstone (1991), p. 99-108
5) R. M. Schmit, "CRC Handbook Series in Clinical Labaratory Science", CRC Press (1980), p. 63-77.
6) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). "Reticulocyte counting by flow cytometry; pro posed guideline NCCLS Document H44-P", NCCLS (1986), p.1-80.
7) J.V.Dacie, S. M. Lewis, "Practical Haematology, 7th Ed", Churchill Livingstone (1991), p.37-66.
8) B. H. Davis, "Immature reticulocyte fraction (IRF): by any name, a useful clinical parameter of erythropoietic activity", Laboraoty Hematology, 2, 2-8 (1996).
9) I. Tsuda, N. Tatsumi, "Reticulocytes in human preserved blood as control material for automated reticulocyte counters", Am. J. Clin. Pathol. 94, 109-110 (1990).
10) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). "Romanowsky blood stains NCCLS Document H32-P", NCCLS (1986), p.1-80.
11) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), "Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods NCCLS Document H20-A", NCCLS (1992), p.1-55.
12) 津田 泉，川合清毅，巽 典之，"自動血球計数装置VEGAの基礎的検討"，日本臨床検査自動化学会誌，22，162-168 (1997).

巽 典之
Noriyuki TATSUMI, M.D.
大阪市立大学　医学部
臨床検査教室　教授
医学博士

津田 泉
Izumi TSUDA
大阪市立大学　医学部
臨床検査教室

辻 義光
Yoshimitsu TSUJI, M.D.
大阪市立大学　医学部
臨床検査教室
医学博士

田窪孝行
Takayuki TAKUBO, M.D
大阪市立大学　医学部
臨床検査教室　助教授
医学博士