

血球計数の国際的標準化 および外部精度評価の現状

The Actual Situation of the International
Standardization and External Quality
Assurance on Blood Cell Count



近藤 弘

Hiroshi KONDO

関西医療大学
保健医療学部 教授
薬学博士

血球計数検査では自動血球計数に用いる国際的な認証標準物質が存在しないため、国際常用標準測定操作法で新鮮血液を値付けすることで正確な値を伝達する必要がある。その基準分析法のガイドラインの策定は国際的な枠組みの中で進められており、ガイドラインは具体的な測定手順などを記している。また、外部精度管理評価は測定系の信頼性を反映する客観的な情報となり、理想的な条件下で外部精度管理評価を実施するために、実施方法の標準化を進める意義は大きい。

In the hematology tests by using automated hematology analyzer, there is not internationally certified reference material. Therefore, an internationally recognized reference method enables the clarification of traceability of measurements since the use of fresh blood is necessary for the assurance of accuracy in hematology tests. The guidelines of the reference method are formulated with under international framework. The external quality assurance acts as an invaluable reference source for evaluation the reliability of measurement system. It's significant to standardize the method of implementation for external quality assurance.

はじめに

血液学的検査が日常診療に果たす役割は大きく、特に全血球計数(CBC: Complete Blood Count)および白血球分類は、臨床診断のほとんどにおいて必要不可欠なものであり、高い精度が求められる。臨床検査室においては、その高い精度、質の高い医療サービスの提供を保証するために、ISO15189(臨床検査室品質と能力に関する特定要求事項)などの検査室認定を取得する施設が増加している。このことは国際的な標準化に対応できる検査室の管理運営が求められていることを意味している。本稿では、血球計数検査のトレーサビリティ、国際的標準化の動向、国際常用標準測定操作法、外部精度評価について概説し、新鮮血液試料を実試料標準物質として用いる血球計数検査における国際的標準化および外部精度評価の現状を概観し、それらに係るいくつかの問題点について触れる。

血球計数項目のトレーサビリティ

体外診断用医療機器の欧州指令(Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices)が2004年に施行されたことにより、分析結果は適正な標準物質によってトレーサビリティを確保されていることが、臨床検査機器・試薬製造業者に義務づけられた^[1]。これにより、分析結果の妥当性の確認のために、測定系はSI単位にトレーサブルであることが求められ、トレーサビリティを明らかにすることで分析値の信頼性の範囲(不確かさ)が表示可能になる。

臨床検査領域では、質量や距離の大きさなどの物理量におけるような国際標準器がないため、SI単位に向けてトレーサブルでない場合が多い。臨床化学検査では国際的な認証標準物質(Certified Reference Material: CRM)を用いることにより、トレーサビリティを明確にすることが可能だが、血液学的検査領域では血球が分析対象であり、多様な測定原理、試薬系で構成される自動血球分析装置で共通に使用できる安定な標準物質が存在しないため、新鮮血液を用いて正確さを保障することが必要となる。このような例は、「SI単位への計量学的トレーサビリティがなく国際常用標準測定操作法(一次ではない)はあるが国際常用校正物質がない場合(ISO17511:2003)」に相当し、実試料標準物質を値付けする基準分析法がきわめて重要となる^[2]。全血球計数のトレーサビリティ体系図の例をFigure 1に示す。国際常用標準測定操作法として、国際血液学標準化委員会(International Council for Standardization in Haematology: ICSH)、世界保健機関(World Health Organization: WHO)、臨床・検査標準協会(Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI)の基準分析法が推奨される。株式会社 堀場製作所は自動血球分析装置によるCBC測定の基準分析法として、赤血球数、白血球数はICSH参照法(シングルチャンネル電気抵抗法)、ヘモグロビン濃度はCLSI参照法(シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値はCLSI参照法(マイクロヘマトクリット法)、血小板数はWHO法(プレッカー・クロンカイト法)を使用している。

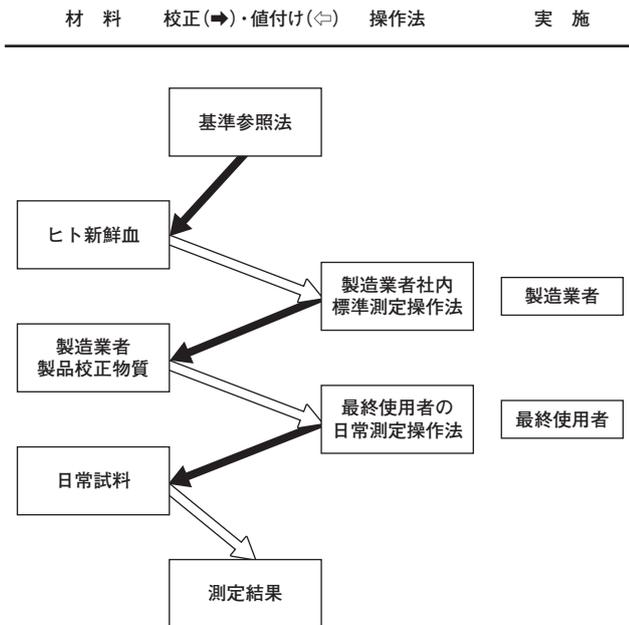


Figure 1 全血球計数のトレーサビリティ体系図の例

血球計数標準化の動向

血球計数項目における国際的標準化活動は、ICSHならびにCLSIが中心となって進めてきた。現在、ICSHは国際検査血液学会(International Society for Laboratory Hematology : ISLH)の標準化作業部会に位置づけられており、CLSIとも連携して血球計数項目における基準分析法の国際的標準化を進めている^[3]。ICSHは通常、標準化に係るプロジェクトが完了すると、その成果を学術論文として公表し、その内容をICSHのホームページに掲載し、自由にダウンロードできるようにして公開している。日本では、日本検査血液学会(Japanese Society for Laboratory Hematology : JSLH)が、血液学的検査法の標準化に係る課題について、ISLH、ICSHと協調して活動している。その活動方針は「日本検査血液学会(JSLH)は、国際的な標準化推進活動を行っている団体である国際血液検査標準化協議会(ICSH)、臨床・検査標準協会(CLSI)および世界保健機関(WHO)から発行されるドキュメントに掲載される標準法を、国際常用標準測定操作法および参照測定手順として推奨する」と規定し、ホームページに掲載している。

国際常用標準測定操作法の概要

検体採取と抗凝固

健康人から採取した新鮮血液を検体として使用する。抗凝固剤として、EDTA-2K (1.5~2.2 mg/mL血液)またはEDTA-3K (1.5~2.2 mg/mL血液)が用いられる^[4, 5]。EDTA-2Kは欧州および日本、EDTA-3Kは北米で広く使用されている。EDTA-3KはEDTA-2Kに比べて、血球を強く収縮させるためにヘマトクリット値が低値を示すことが知

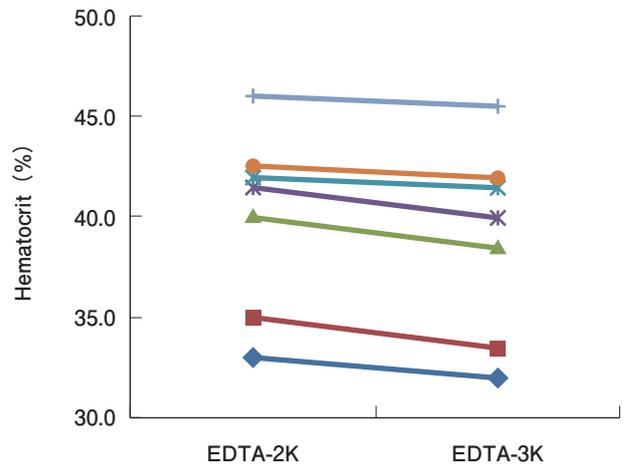


Figure 2 EDTA塩の種類による影響(ヘマトクリット値)(参考文献^[7]から改変)

られており、経時的にその影響は大きくなるためEDTA-3K加血液は採血後3時間以内に測定する^[6]。ICSHは最も影響の少ないCBCのための抗凝固剤としてEDTA-2Kを推奨している。抗凝固後の血液は $20 \pm 2^\circ\text{C}$ で保存し、4時間以内に測定する。著者らの経験でも、EDTA-2K、EDTA-3Kを終濃度1.5 mg/mLになるように静脈血に添加したとき、EDTA-3Kを使用した検体では、EDTA-2Kに比べてヘマトクリット値は1.40%低値を示した($n = 7, p < 0.01$) (Figure 2)^[7]。また、EDTAの添加濃度を変化させた時、添加濃度の増加に伴い、ヘマトクリット値は減少傾向を示し、その傾向はEDTA-2KよりもEDTA-3Kにおいて顕著であった。

ヘモグロビン濃度

基準分析法は測定波長540 nmでの比色分析によるシアンメトヘモグロビン法であり、ICSHガイドラインには、測定操作法、標準液作製法、測定試薬作製法と作製試薬の評価法が明記されている^[6]。また、比色分析法に使用する標準液としては、ユーロトロール社がシアンメトヘモグロビン標準液(ICSH HiCN Standard)を供給する。この標準液は直接自動血球分析装置で測定することはできない。このシアンメトヘモグロビン標準液を基準分析法の標準液として使用し、製造業者内基準分析法を校正するための新鮮血液を値付けする。

ヘマトクリット値

ヘマトクリットはPCV (Packed Cell Volume)とも呼ばれる。基準分析法はトラップドプラスマに配慮しないマイクロヘマトクリット法である^[9]。トラップドプラスマとは、遠心沈殿後の血球層の血球と血球の隙間に閉じ込められた血漿のことである。一方、自動血球分析装置は赤血球個々の容積値と血球パルス数をもとに積分してヘマトクリット値を算出するため、トラップドプラスマによる影響はなく、基準分析法の測定値とは測定原理に基づく差が生じる。

赤血球数および白血球数

基準分析法は単チャンネルの電気抵抗方式の血球計数器による測定法である^[10]。ICSHガイドライン「自動血球計数機を校正するために使用する新鮮血液の値付け」は校正用血液や管理用血液の値付けの方法、管理限界の決定法、装置の仕様や評価法などを規定している^[11]。

血小板数

基準分析法として、蛍光色素で標識したCD41・CD61抗体を用いる免疫学的フローサイトメトリー（Flow Cytometry：FCM）により得られる血小板数と赤血球数の比率、および自動血球計数装置で得られる赤血球の絶対数から、血小板数を算出する間接法（FCM法）、および検体を1%シュウ酸アンモニウム溶液で希釈後、計算板を用いて位相差顕微鏡で算定する直接法がある^[12]。

網赤血球数

基準分析法には、ニューメチレン青で染色し、ミラーディスクを用いて鏡検算定する視算法、およびFCM法がある。最新のガイドラインは、核酸染色のための蛍光色素シアゾールオレンジを用いるFCM法、さらに幼若網赤血球指数（Immature Reticulocyte Fraction：IRF）についても記載している^[13]。ただし、ガイドラインにはFCM法の関連文献が引用されているが、操作法、スキヤッタグラム上での解析法などの手技についての具体的な記述はない。

白血球分類

基準分析法には血液薄層塗抹標本をロマノフスキー染色して目視分類する方法およびモノクローナル抗体とフローサイトメータを用いたFCM法がある。最新のガイドラインには、現行の目視分類による方法は術者の主観による、少数比率細胞の再現性が良くない、標本上の細胞分布状態の影響を受けることなどをあげている。これに対してFCM法は、分析細胞数が目視法に比べて格段に多く、精確な白血球分類が可能なることから、自動血球分析装置の参照法としてはFCM法が適していると記されている^[14]。ただしガイドラインにはFCM法の関連文献が引用されているが、手技についての具体的な記述はない。現在ICSHはモノクローナル抗体を用いたFCM法を検討中である。

血球計数項目の外部精度評価 (External Quality Assurance ; EQA)

国内で実施されている全国規模の血球計数項目の外部精度管理プログラムの概要をTable 1に示す^[15]。

これら以外に、地方自治体単位の医師会、臨床衛生検査技師会が単独または共催で実施するEQAプログラムがあり、これらの多くは新鮮血液を用いている。さらに関連病院内EQA、自動血球分析装置製造業者が実施するユーザーを対象としたものがある。また関連学会である日本検査血液学会（Japanese Society of Laboratory Hematology：JSLH）では、製造業者6社の協力を得て、2001年から2~4年毎にJSLH6社EQAを実施している^[16]。

これらのEQAで使用されている調査試料には加工血液と新鮮血液がある。加工血液は内部精度管理用のコントロール血液と同様に固定や安定化のための薬剤添加により、保存安定性に優れ、多量の検体を準備しやすいが、固定処理や薬剤添加に伴うマトリックス効果による機種間差がみられることがある。しかし、日常検体と同様の新鮮血液を用いればそのような心配はない。例えば、厳密に校正された電気抵抗方式自動血球分析装置および光散乱方式自動血球分析装置を用いてEDTA加新鮮血液を測定したとき、両者の測定値に機種間差は認められないが、加工血液を測定すると、マトリックス効果による影響で電気抵抗方式に比べて光散乱方式では低値を示す^[3]。光学的原理では、前方散乱光の断面積から赤血球容積を測定するために、赤血球を膨化させる必要があり、新鮮血と固定処理が行われた加工血では希釈液に対する挙動が異なり、測定原理に基づく差が生じる。自動血球分析装置には血球を膨化させて計測する機種、収縮させて計測する機種があり、機種によって赤血球希釈液の浸透圧が異なる。現在市販されている自動血球分析装置用赤血球希釈液の浸透圧の範囲は約250 mOsm~331 mOsmである^[17]。また、白血球においても、加工血液では測定原理に起因すると推測されるメーカー間の差が生じることが報告されている^[18]。

国内で実施されている全国規模のEQA試料として、日本臨床検査技師会、日本医師会、日本総合健診医学会は加工血液、日本衛生検査所協会はEDTA-2K加新鮮血液、全国労

Table 1 全国規模の自動血球計数項目EQA

団体	試料	実施回数/年	参加施設数*	調査項目					その他
				RBC	Hb	Ht	WBC	Plt	
日本臨床衛生検査技師会	加工血液	1	3404	○	○		○	○	MCV
日本医師会	加工血液	1	3140	○	○	○	○	○	
日本総合健診医学会	加工血液	2	390	○	○	○	○	○	MCV, MCH, MCHC
全国労働衛生団体連合会	加工血液, 新鮮血液**	1	360	○	○	○	○	○	MCV
日本衛生検査所協会	新鮮血液***	1	260	○	○	○	○	○	Neut, Lympho(他の白血球分画)

*2012~2013年の概数, **輸血用のCPDA液入り血液バッグに採血後EDTA-2Kを添加, ***EDTA-2K加血液

働衛生団体連合会は静脈血をCPD (Citrate Phosphate Dextrose)液入り輸血用血液バッグに採取後、EDTA-2Kを添加した新鮮血液を使用している。また、地方自治体単位の臨床検査技師会が実施しているEQAについてのアンケート調査では、44%の臨床検査技師会が静脈血をCPD-A液入り輸血用血液バッグに採取後、EDTA-2Kを添加した新鮮血液、30%がEDTA-2K加新鮮血液、11%がCPD-A入り新鮮血液、その他が15%であった^[19]。全国規模の大規模EQAに日常検体と同じ新鮮抗凝固血液を使用できれば、マトリックス効果の影響を回避でき、すべての機種をまとめて評価することが可能となる。ところが、ボランティアが提供できる血液量には限りがあり、新鮮血液原料を大量に準備することはできない。このため、各団体の新鮮血液EQAの報告値を共有して評価できれば、全国規模の解析が可能になる。今後は、試料調製法などの実施に係る作業手順を標準化するなどして、データの共有化ができる仕組みを構築することが求められる。

おわりに

血球計数検査では、自動血球分析装置に適した国際的な認証標準物質がないため、国際常用標準測定操作法を用いて新鮮血液を値付けすることで正確な値を伝達する必要がある。その基準となる分析法の開発やガイドラインの策定は国際的な枠組みのなかで進められており、その動向を十分に理解しておくことが求められる。血球計数項目の基準分析法は、視算法と自動血球分析における分析細胞数の差、特異性、客観性などの理由により、今後は血小板数と同様に、白血球分類、網赤血球についてもFCM法が主流になることが予想される。検査結果の信頼性の維持および向上、自動血球分析装置製造業者への働きかけなどのために、EQAによる客観的な評価が果たす役割は大きい。このため、特に血球検査項目においては、理想的な条件下でEQAを実施するために、配布試料の調製手順や報告値の解析方法の標準化を進める必要がある。

参考文献

- [1] 永井 豊, 巽 典之, “血液検査と化学検査の正確さ検証の違い”, *生物試料分析*, **31**, 307(2008)
- [2] 永井 豊, 近藤 弘, 川合陽子, “実試料標準物質の概要—血液検査系—”, *臨床化学*, **38**, 408(2009)
- [3] 近藤 弘, 佐藤陽子, 永井 豊, 巽 典之, “血球分析のグローバルな標準化の現状と対策”, *JJCLA*, **33**, 168(2008)
- [4] International Council for Standardization in Haematology, “Recommendations for ethylenediaminetetraacetic acid anticoagulation of blood cell counting and sizing”, *Am J Clin Pathol*, **100**, 371(1993)
- [5] International Council for Standardization in Haematology, “Reference method for the enumeration of erythrocytes and leukocytes”, *Clin Lab Haematol*, **16**, 131(1994)
- [6] International Council for Standardization in Haematology, “Recommendations for “Surrogate Reference” method for packed cell volume”, *Lab Hematol*, **9**, 1(2003)
- [7] 近藤 弘, 巽 典之, 川端邦弘, 久原巻彦, “マイクロヘマトクリット法の標準法NCCLS : H7-Aの検討”, *大阪府立公衆衛生専門学校紀要*, **13**, 1993
- [8] International Council for Standardization in Haematology, “Expert Panel on Haemoglobinometry, Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood”, *J Clin Pathol*, **49**, 271(1996)
- [9] International Council for Standardization in Haematology, “Recommendation for the reference method for the packed cell volume”, *Lab Hematol*, **7**, 148(2001)
- [10] International Council for Standardization in Haematology, “Reference method for the enumeration of erythrocytes and leukocytes”, *Clin Lab Haematol*, **16**, 131(1994)
- [11] International Council for Standardization in Haematology, “The assignment of values to fresh blood used for calibrating automated blood cell counters”, *Clin Lab Haematol*, **10**, 203(1998)
- [12] International Council for Standardization in Haematology”, Expert Panel on Cytometry and International Society of Laboratory Hematology Task Force on Platelet Counting. Platelet counting by RBC/platelet ratio method. A reference method”, *Am J Clin Pathol*, **115**, 460(2001)
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute, “Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline—Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute”, Document H44-A2, 2004
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute, “Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard—Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute”, Document H20-A2, 2007
- [15] 近藤 弘, 杉山昌晃, 白上 篤, 川合陽子, “新鮮血を用いた血液学検査の外部精度管理”, *臨床検査*, **58**, 621(2014)
- [16] 田窪孝行, 近藤 弘, 佐藤尚武, 他, “6社の基準血球分析装置による血球計数(網赤血球)と白血球分類の2007年度外部精度評価”, *日本検査血液学会雑誌*, **14**, 282(2013)
- [17] 池本敏行, 田窪孝行, “自動血球計数機の測定原理と留意点”, *検査と技術*, **35**, 523(2007)
- [18] 日本医師会 : 第47回臨床検査精度管理調査結果報告書(平成25年度), 173-180, 2013
- [19] 近藤 弘, 渡邊眞一郎, 川合陽子, “新鮮血液を用いる自動血球分析項目の外部精度評価の現状分析”, *日本検査血液学会雑誌*, **3**, 189(2012)