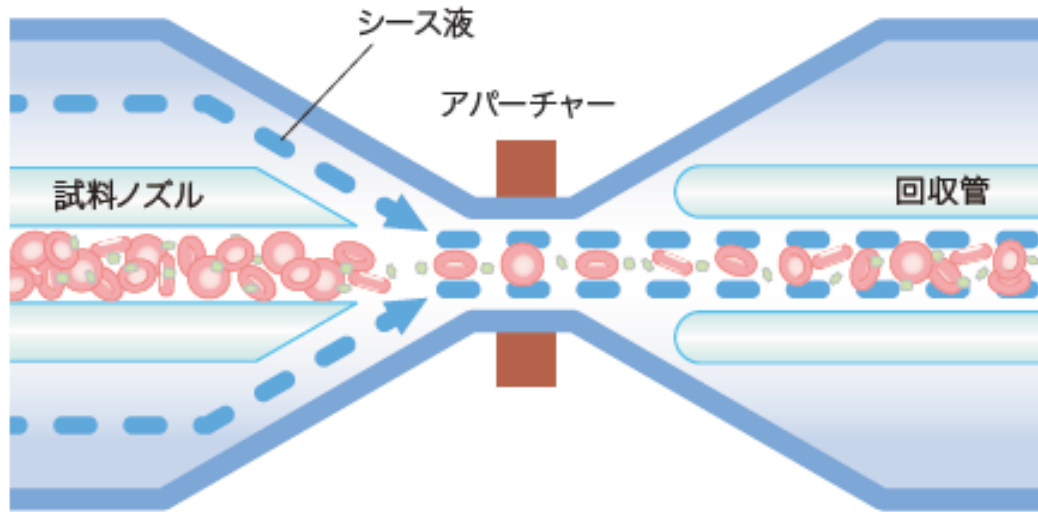


# 当院における血球計数装置の実運用 (シスメックス社)

川崎医科大学附属病院 中央検査部  
今田 昌秀



※イメージ図です。

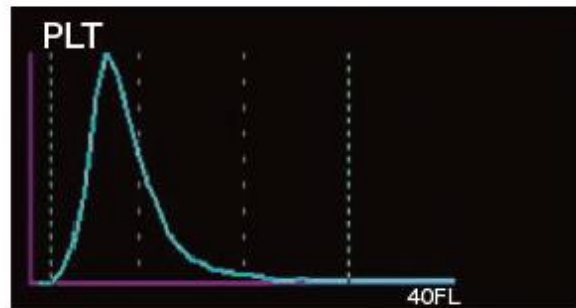
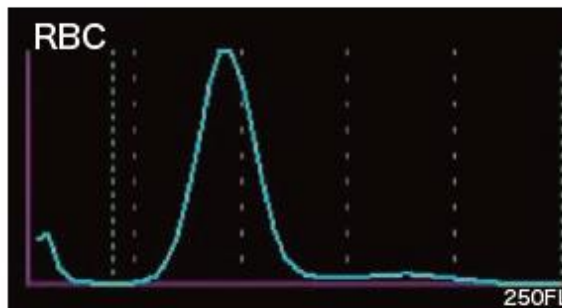
- ・ シース液の流れ（シースフロー）により一列に整列させられた血球は、アパーチャー（隙間/開口部）に流し込まれる。アパーチャーには電圧（DC）がかけられ絶縁体である血球が差し掛かると電気抵抗が生じる。

- ・ 電気抵抗の大きさは血球の体積に比例

$$PLT < RBC < WBC$$

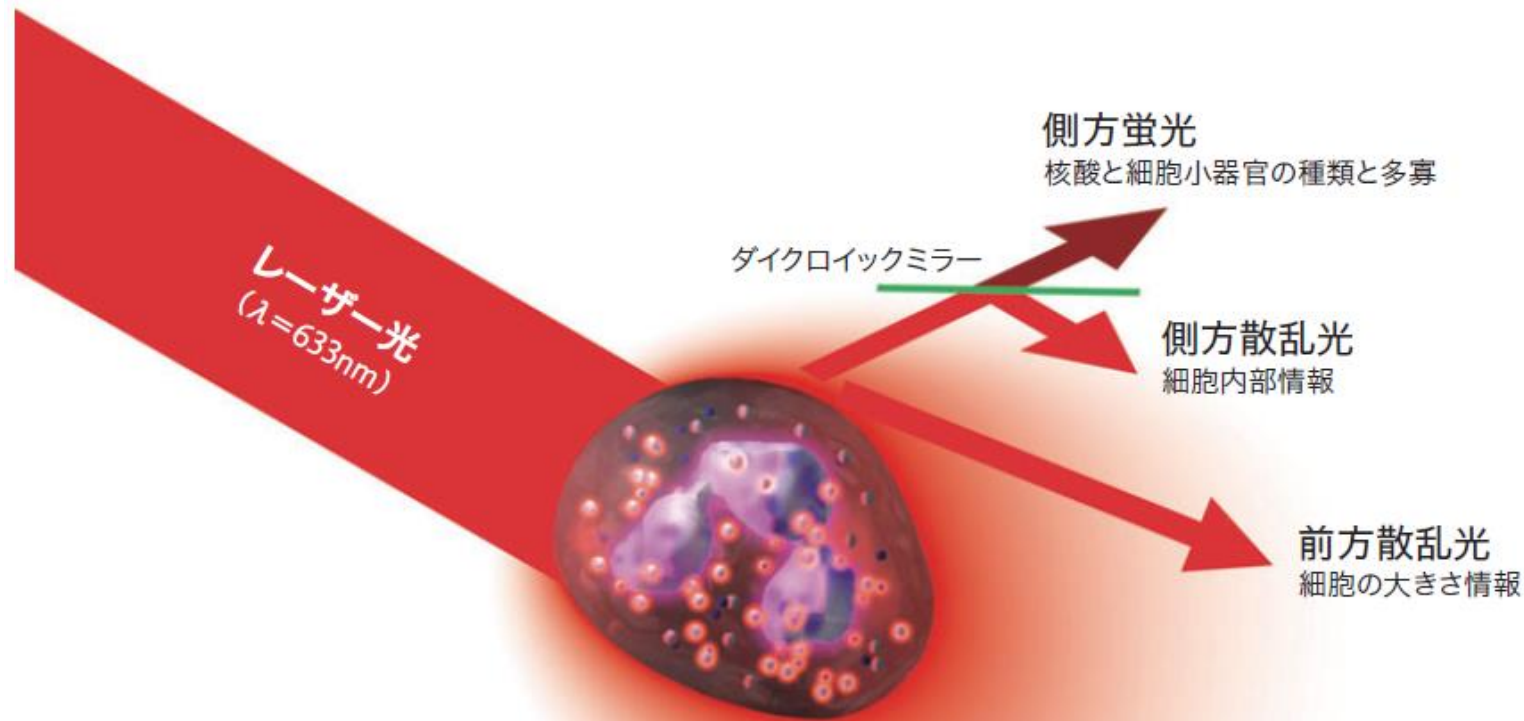
RBCヒストグラム

PLTヒストグラム



引用：XN Series Clinical Case Report (シスメックス株式会社)

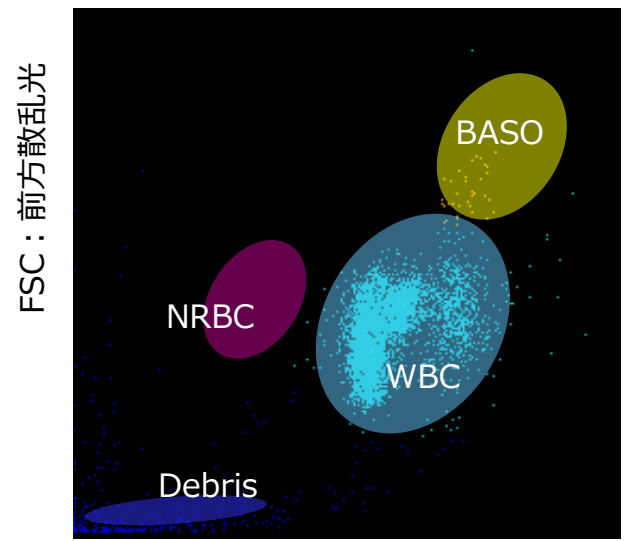
# 半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法



※イメージ図です。

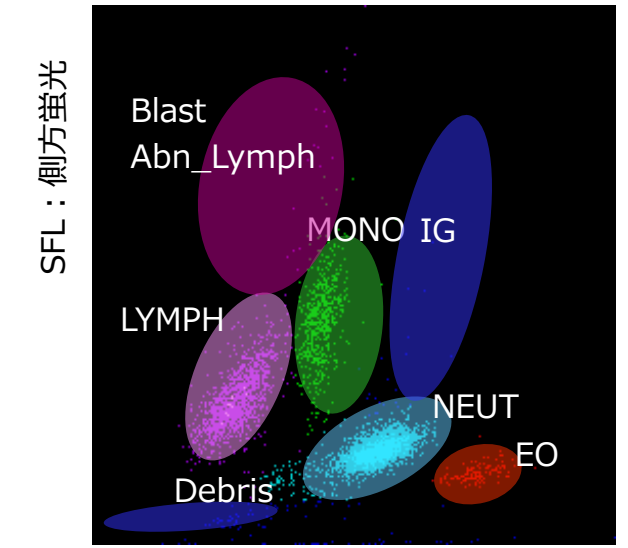
・界面活性剤により赤血球を溶血、白血球の細胞膜を損傷させ、蛍光色素で核酸・細胞小器官を染色する。白血球は細胞形態が変化し、散乱光と蛍光強度をスキッタグラムに展開し解析

WNRスキッタグラム



SFL : 側方蛍光

WDFスキッタグラム



SSC : 側方散乱光

- CBCのTAT（Turn Around Time）は可能な限り早く  
異常値ほど臨床は早く結果が欲しいはず
- 分析器に異常がない場合の異常結果は別の方法で確認
  - 血小板数（今回値、前回値比）
  - 白血球数（好中球数）
  - MCHC > 37.0g/dL
  - 分画異常など

用手法やスキッターグラム、塗抹標本を用い再検（確認）を実施

# 川崎医科大学附属病院におけるCBCの再検基準

	基準範囲	再検基準 (今回値)	再検基準 (差)	パニック値
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3.3-8.6	<1.00,>100.00		<1.00,>100.00
RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	M:4.35-5.55 F:3.86-4.92	<1.50,>8.00		<1.50
HGB (g/dL)	M:13.7-16.8 F:11.6-14.8	<5.0,>20	上下 1.9	<5.00
HCT (%)	M:40.7-50.1 F:35.1-44.4	<15.0,>60.0		<15.0
MCV (fL)	83.6-98.2	<60.0,>120.0	上下 7.0	
MCHC (g/dL)	31.7-35.3	<25.0,>37.0	上下 5.0	
PLT ( $\times 10^9/L$ )	158-346	<60,>950		<30,>1000
RET (%)	0.5-2.0	<0.1		

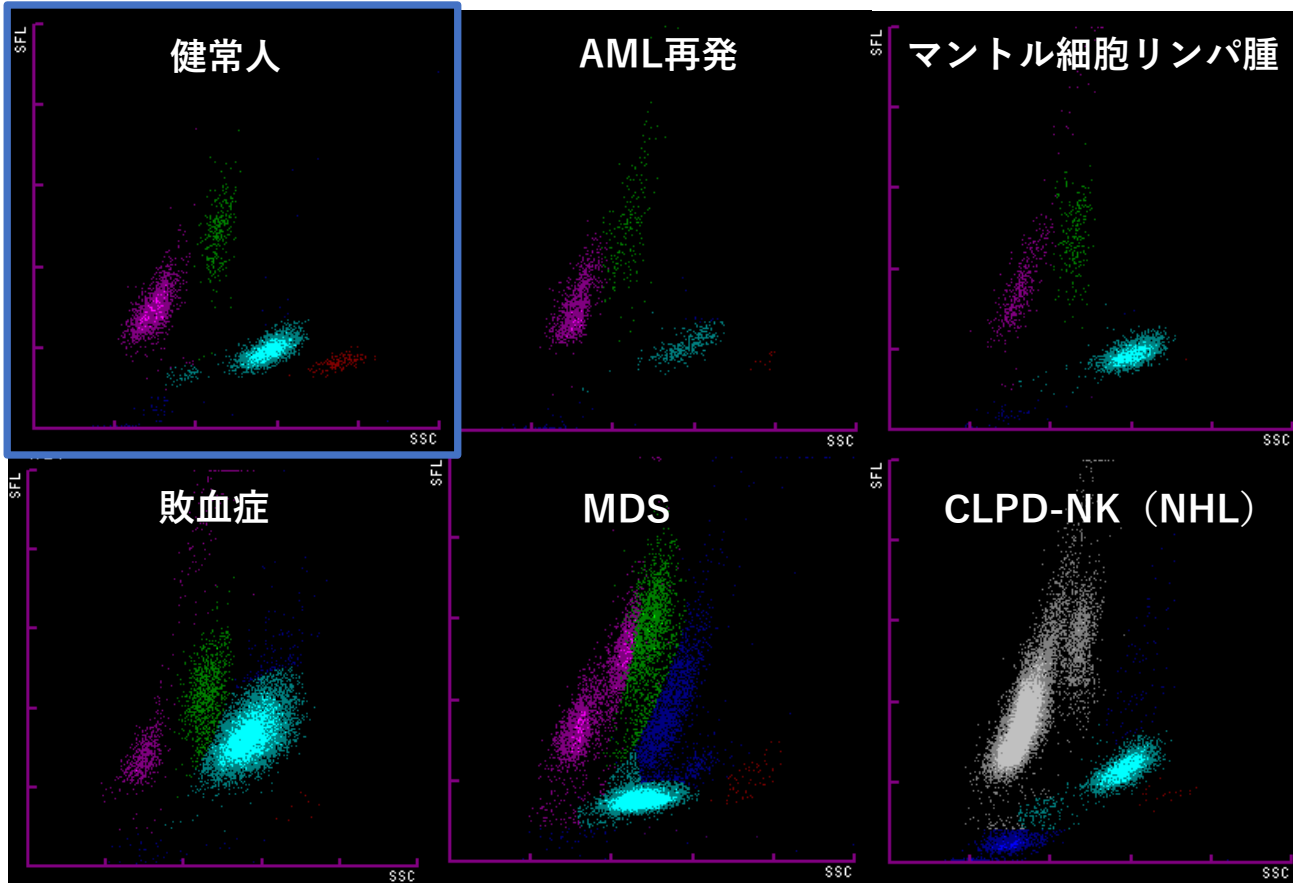
**CBC再検率**  
10.3%~12.9% (平均12.1%)

- PLT-Fを追加：PLT\_Abn\_Distribution、PLT\_Clumps?もしくはPLTが<50, >950、MCV<70、Iron\_Deficiency?
- WBC<1.00ときはLWモードを追加する
- RET\_Abn\_Scattergramのとき再検し,スキャッターに異常を認めた場合、目視（超生体染色）にて確認
- WBC\_Abn\_Scattergram、Blast/Abnormal\_Lympho?が出力された際はWPCモードを追加する

# 川崎医科大学附属病院における標本作成基準

RBC	HGB	MCV	MCHC	RET	WBC	PLT
<p>&lt;2.50 &gt;8.00 Fragment?</p>	<p>&lt;6.0 &gt;20.0</p>	<p>&lt;60.0 &gt;115.0</p>	<p>&lt;28.0 &gt;36.0</p>	<p>&lt;0.1 &gt;7.9</p>	<p>&lt;2.00,&gt;20.00 NE%:&lt;20.0,&gt;90.0 NE # &lt;#1.00,&gt;#19.00(乳腺甲状腺外科以外) &lt;#1.30,&gt;#19.00(乳腺甲状腺外科のみ) LY%:&gt;60.0 LY#&lt;#0.60,&gt;#5.00 Mo%:&gt;20.0 Mo#&gt;#1.00 Eo%:&gt;30.0 Baso%:&gt;5.0 <b>Baso#&gt;#0.20</b> DIFFがフノウ Atypical Lympho ? (Ly&gt;15%) Blasts? WBC Abn Scattergram Abn Lympho? Left Shift IG Present pRBC? NRBC Present Action message eosinophil 血液内科 目視必須にコメント</p>	<p>&lt;60.0,&gt;910.0 &lt;100.0(前回値なし) PLT clumps?</p>
					<p><b>目視再検率</b> 26.0%~28.1% (<b>平均27.5%</b>)</p>	

## 自動分析から得られる白血球分画図（スキャッター）



### 目視カウント

- ・細胞集団の境界が不明瞭
- ・Ly・Mo・Basoが高値
- ・敗血症など（左方移動）
- ・異常パターン、グレイアウト
- ・異常細胞  
（幼若顆粒球、有核赤血球、腫瘍細胞など）

↑ NO

CBC・スキャッター・フラグを確認後、  
フロー分類（5分類）の妥当性の判断

↓ YES（妥当）

### 自動分類を採用

- ・細胞集団の境界が明瞭（正常な分布）
- ・左方移動、幼若顆粒球の出現なし
- ・異常細胞なし
- ・巨大血小板、中毒性顆粒、赤血球形態異常などは所見を入力

CBC異常（血球増多、血球減少）と  
スキャッター（リンパ球・単球（単核球））の増加は要注意（要目視）

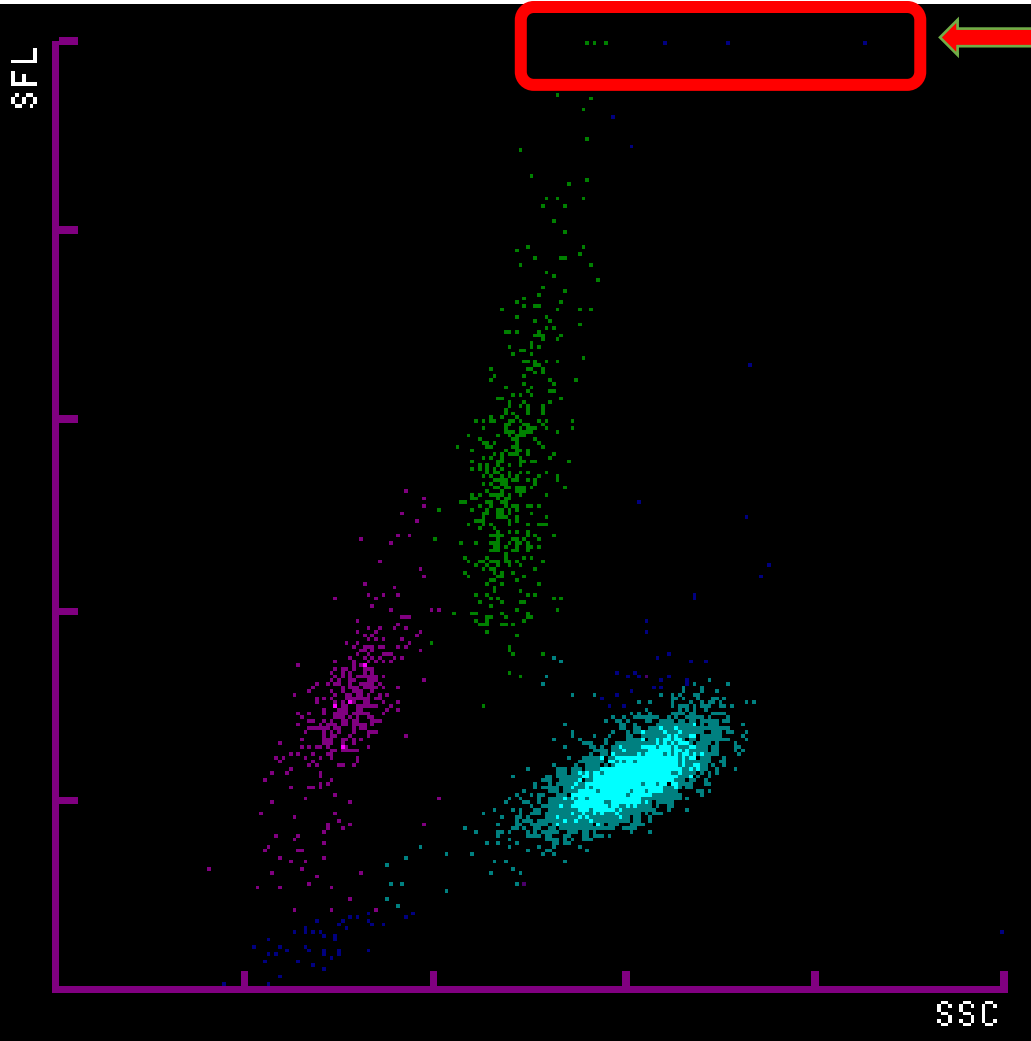
全血算		
WBC	6.23	$\times 10^9/L$
RBC	2.55	$\times 10^{12}/L$
Hb	7.5	g/dL
Ht	22.4	%
PLT	21	$\times 10^9/L$
MCV	87.8	fL
MCHC	33.5	g/dL

白血球分画		
Sg	85.0	%
St	0.0	%
Ly	8.0	%
Mo	7.0	%
Eos	0.0	%
Baso	0.0	%
Abn.Ly	2.0	%
Ebl	1.0	/100WBC
赤血球大小不同		
多染性赤血球		

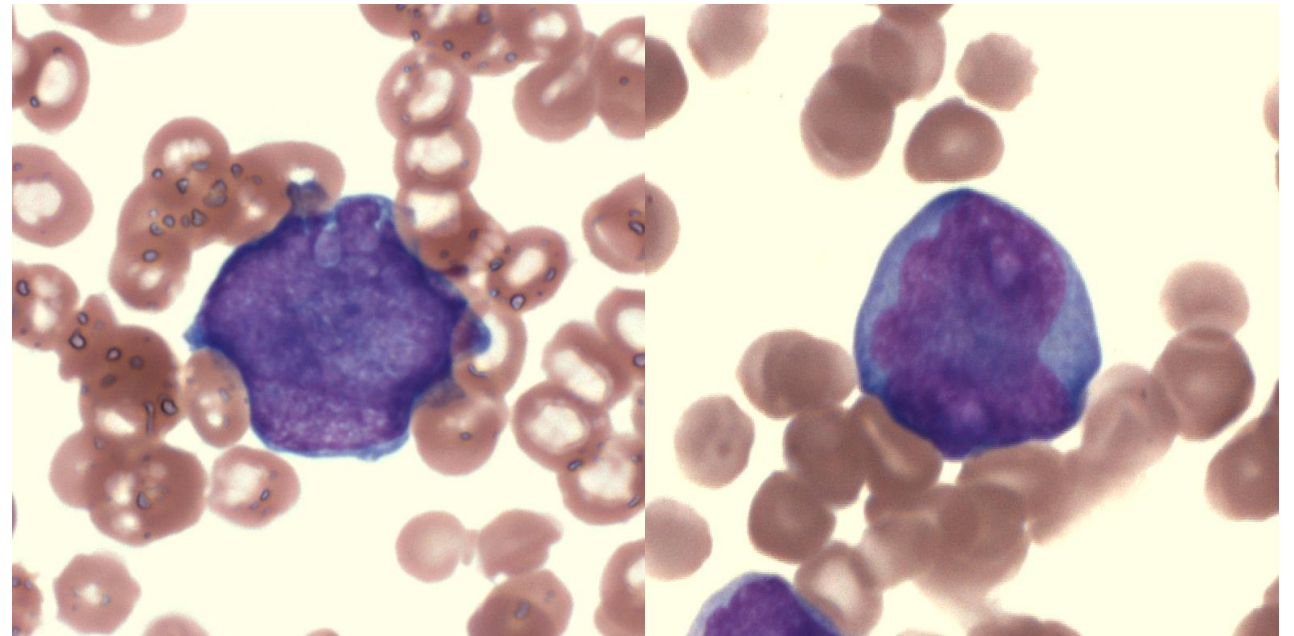
生化学		
Alb	3.2	g/dL
T-BIL	0.7	mg/dL
AST	78	U/L
ALT	25	U/L
ALP	242	U/L
$\gamma$ GTP	93	U/L
LD	3366	U/L
UN	10	mg/dL
CRE	0.47	mg/dL
UA	5.2	mg/dL

Blast?  
Lympho-  
Aniso  
Anemia  
Thrombo-

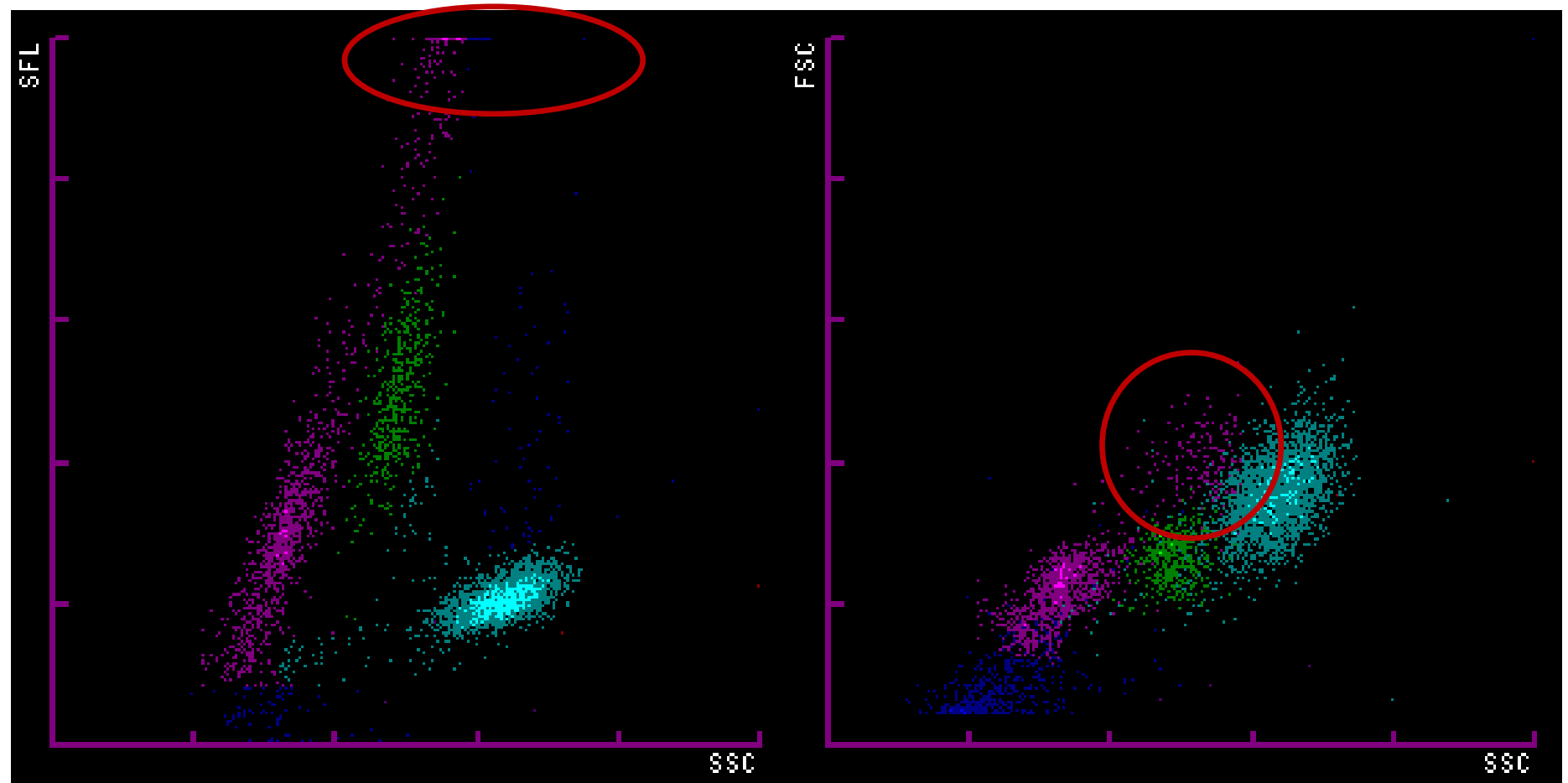




SFLの飽和領域にMoからIGの領域へ  
プロットされる細胞



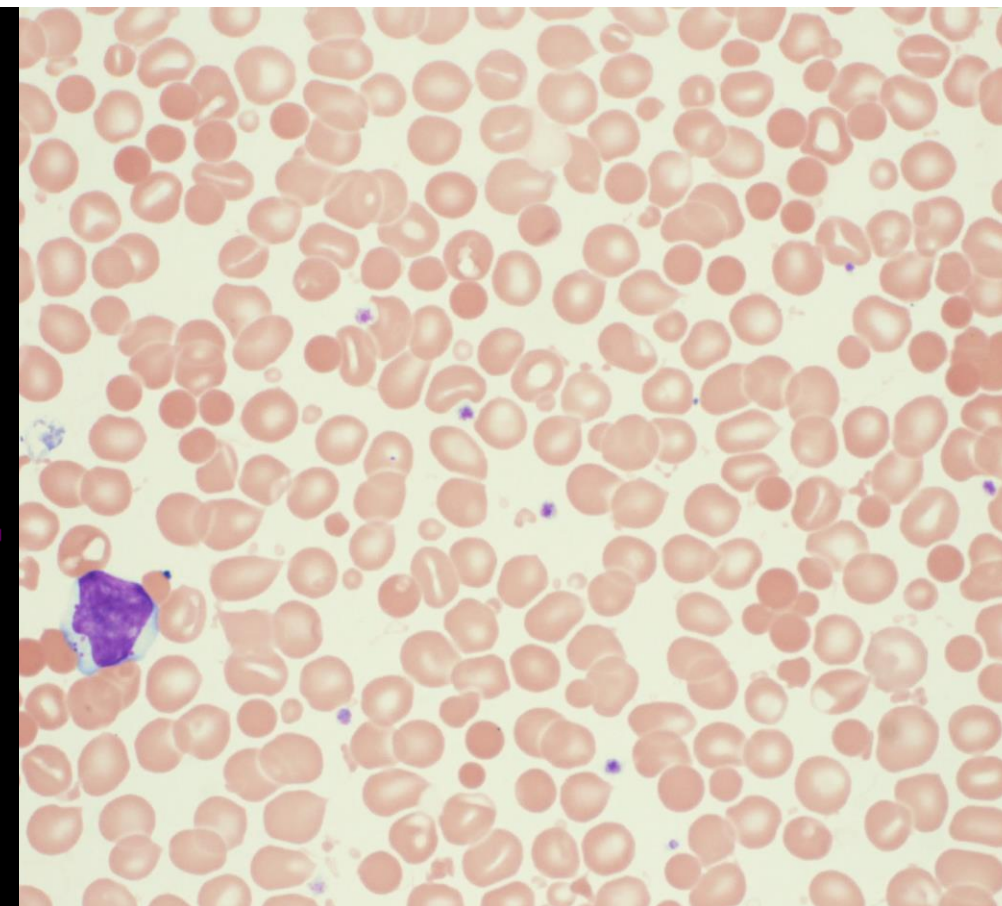
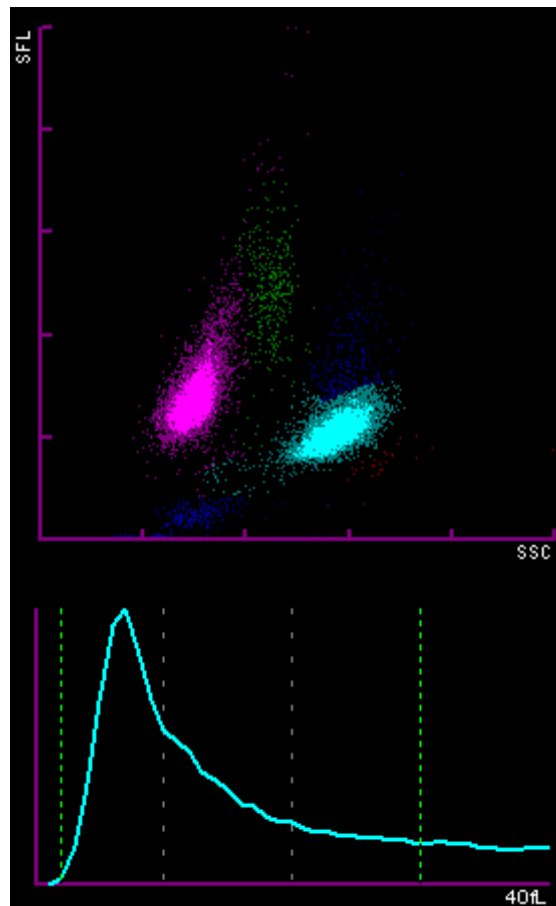
全血算		
WBC	4.83	$\times 10^9/L$
RBC	2.82	$\times 10^{12}/L$
Hb	9.3	g/dL
Ht	29.2	%
PLT	17	$\times 10^9/L$
MCV	103.5	fL
MCHC	31.8	g/dL
白血球分画		
Sg	62.0	%
St	1.0	%
Ly	20.0	%
Mo	8.0	%
Eos	0.0	%
Baso	1.0	%
Abn.Ly	3.0	%
Ebl	9.0	/100WBC



大型細胞はFSC/SSCとも大きくなり，大型異常細胞の一部が，SFLの飽和領域にMoからIGの領域へプロットされる

全血算		
WBC	19.38	$\times 10^9/\mu\text{L}$
RBC	4.95	$\times 10^{12}/\mu\text{L}$
Hb	14.2	g/dL
Ht	44.3	%
PLT	938	$\times 10^9/\mu\text{L}$
MCV	89.5	fL
MCHC	32.1	g/dL






末梢血液像		
Ne	47.0	%
Ly	50.7	%
Mo	1.4	%
Eo	0.2	%
Ba	0.7	%



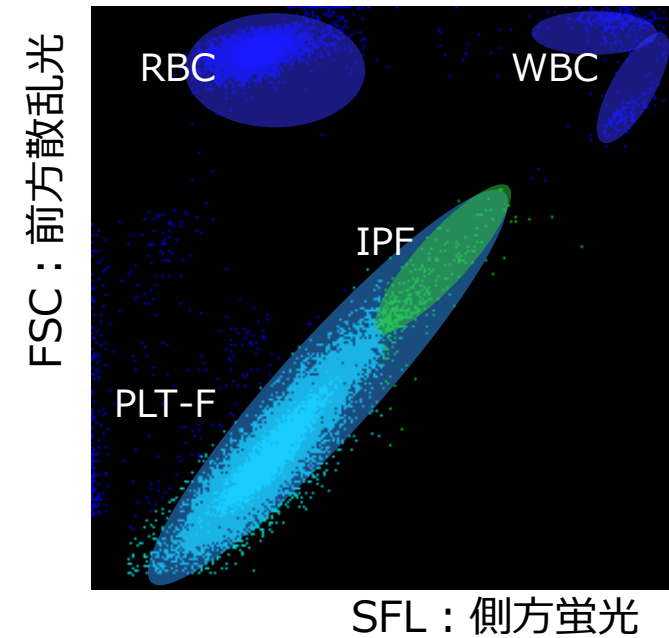
**PLT\_Abn\_Distribution → → → PLT-Fを追加**

・項目 PLT-F、IPF

●PLTへの特異性が高い試薬を使用、実測細胞数を増やした低値精度が高いPLT測定が可能。

		染色		側方蛍光 (SFL)	前方散乱光 (FSC)
赤血球		→		弱～中	強
血小板		→		弱～中	弱
IPF (幼若血小板)		→		中～強	中

PLT-Fスキュッタグラム



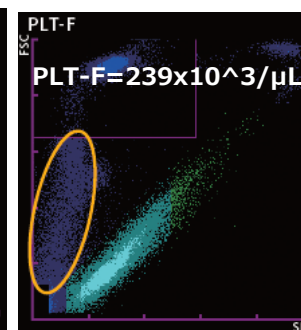
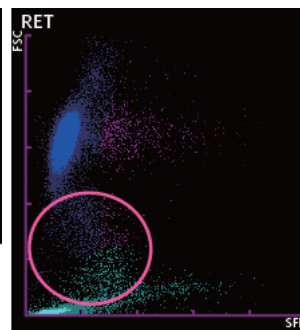
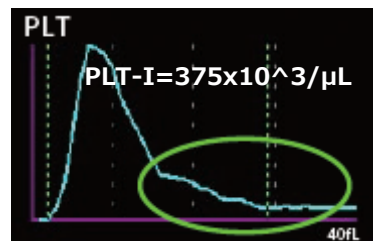
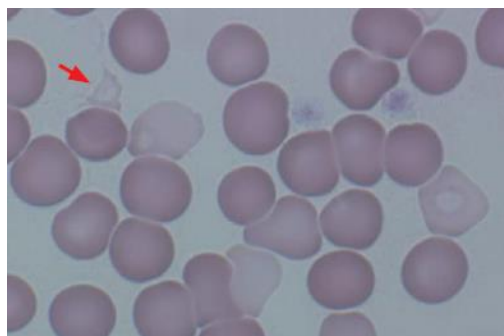
機序：蛍光色素フルオロセルPLTは血小板の核酸に富む小器官（ミトコンドリア）を染色し、血小板がより特異的に分画される

## ① 血小板分画の特異性が高い（血小板を蛍光染色して測定）

### 【再検が有意な事例】

- 赤血球の破砕や溶血ゴーストの出現事例（電気抵抗方式の誤差要因）
- 巨大血小板・血小板大小不同の事例（電気抵抗方式の誤差要因）

### 溶血事例



溶血	
CD61+(×10 <sup>4</sup> /μL)	24.4
FRC(%)	2.29
κ <sup>+</sup> (mEq/L)	8.4
溶血指数*	21

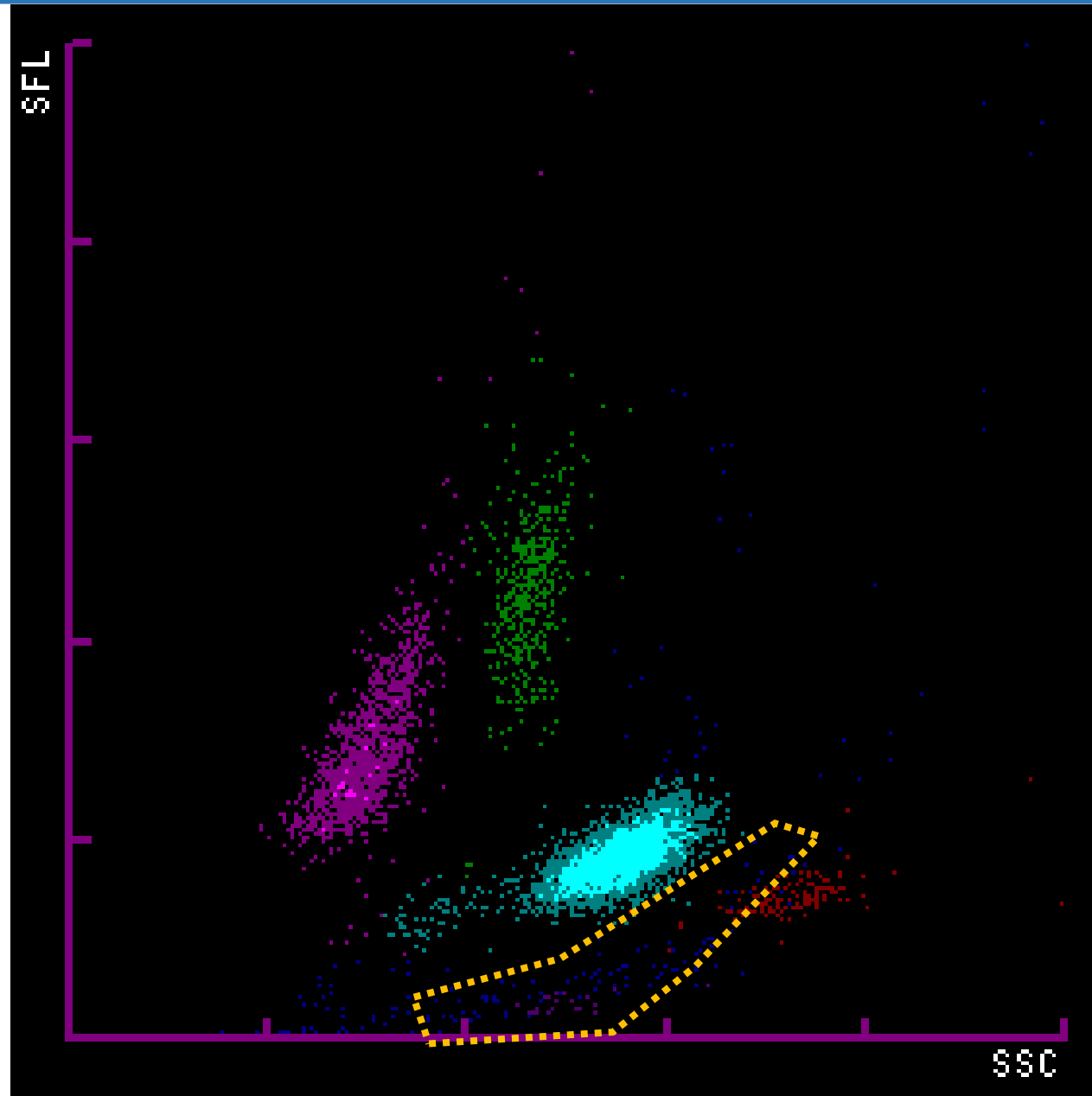
## ② 血小板計数の精度が高い（PLT-Iの約5倍計数）

### 【再検が有意な事例】

- 血小板数の少ない事例

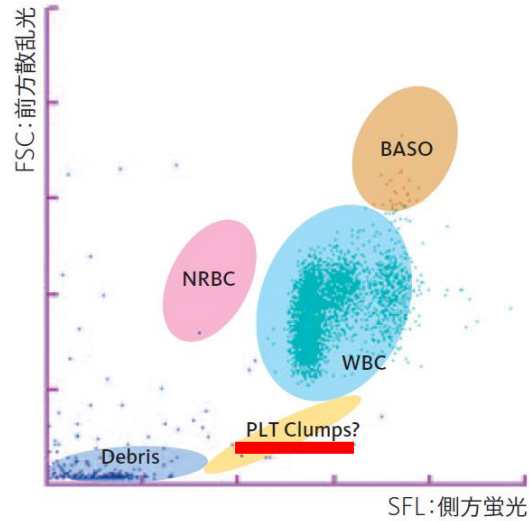
# 検体凝固によるスキッターグラム (PLT clumps?)

全血算		
WBC	7.28	$\times 10^9/\mu\text{L}$
RBC	3.74	$\times 10^{12}/\mu\text{L}$
Hb	11.4	g/dL
Ht	34.2	%
PLT	126	$\times 10^9/\mu\text{L}$
MCV	91.4	fL
MCHC	33.3	g/dL



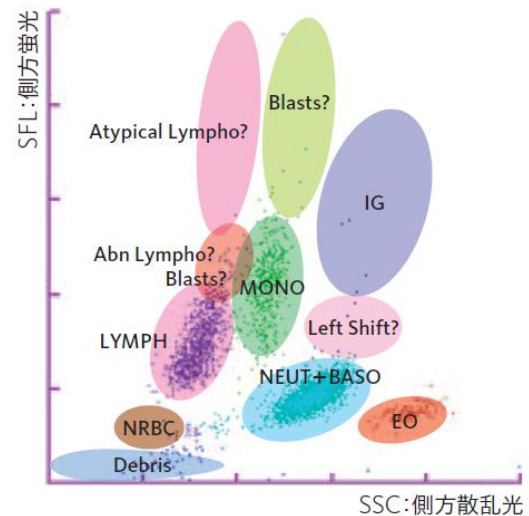
# XNシリーズでの血小板凝集の検知

WNR スキャッタグラム

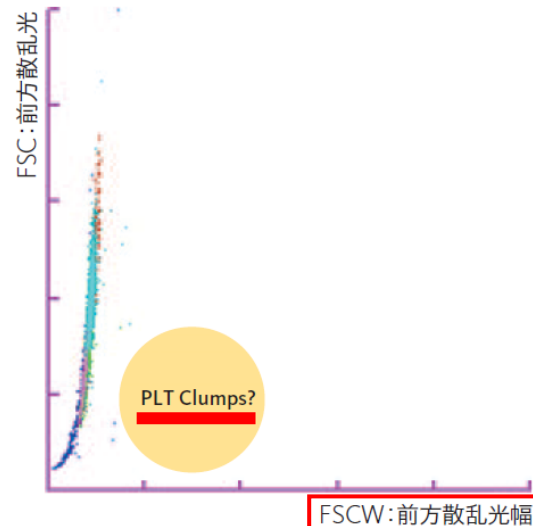


- XNシリーズでは「WNR」「WDF」「PLT-F」の3チャンネルで血小板凝集を監視
- 基本的に各チャンネルで設定された血小板凝集出現ゲートへの異常プロットの出現を監視
- XNシリーズで特徴的な検知手法が「前方散乱光幅 (FSCW)」を使用した方法である

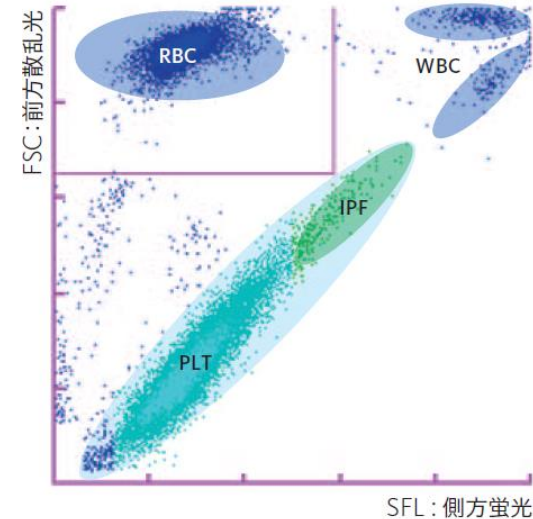
WDF スキャッタグラム



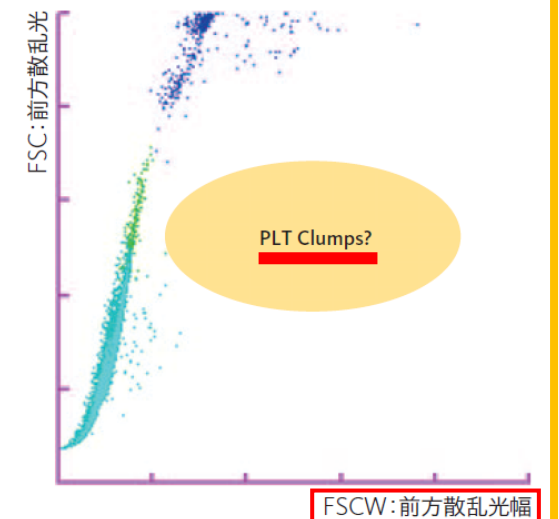
WDF サブスキャッタグラム



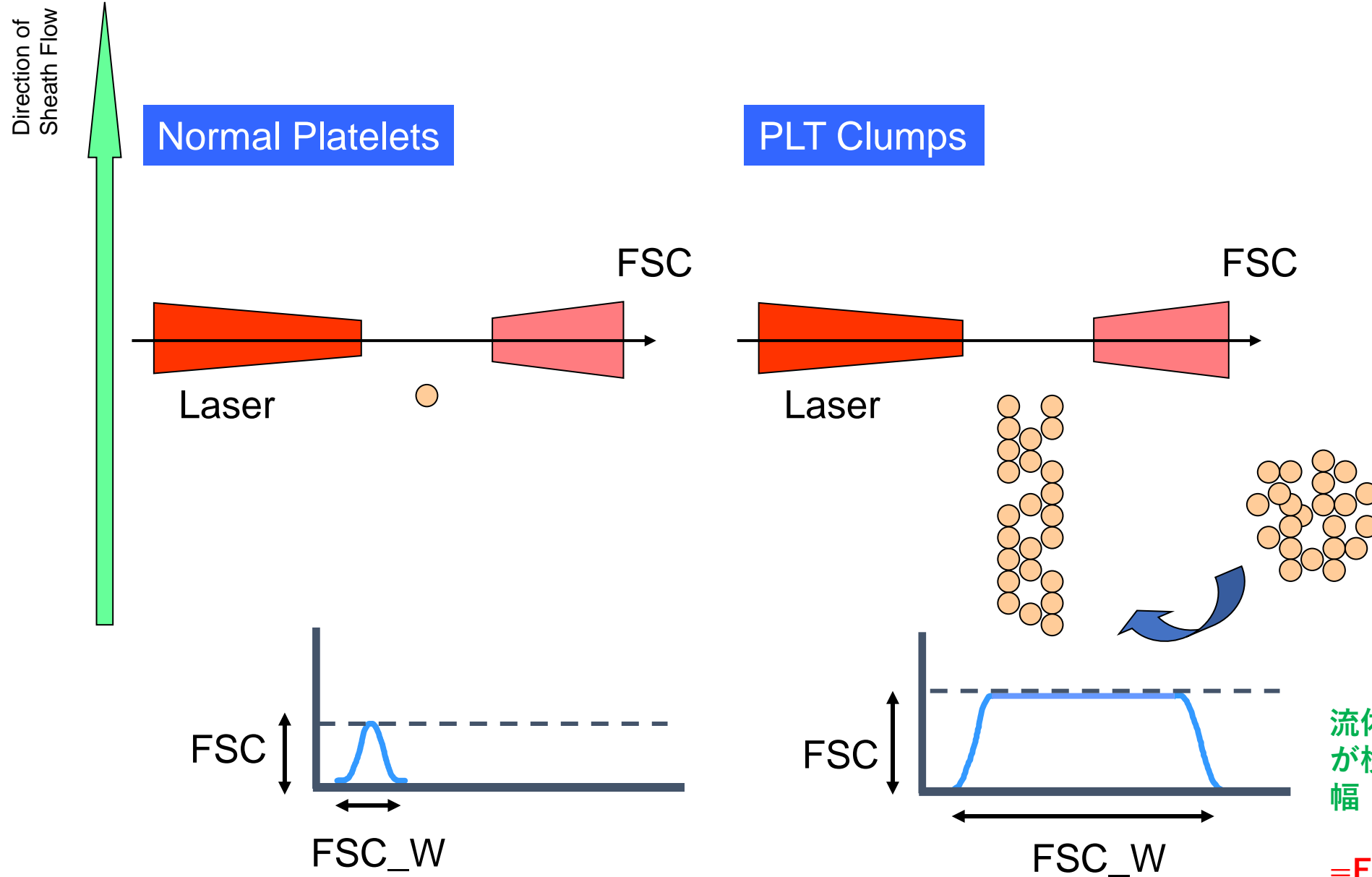
PLT-F スキャッタグラム



PLT-F サブスキャッタグラム



# 前方散乱光幅 (Forward Scattered light Width) とは？



流体内で縦長に伸長した凝集塊が検出部を通過する際にパルス幅 (Width) が広がる

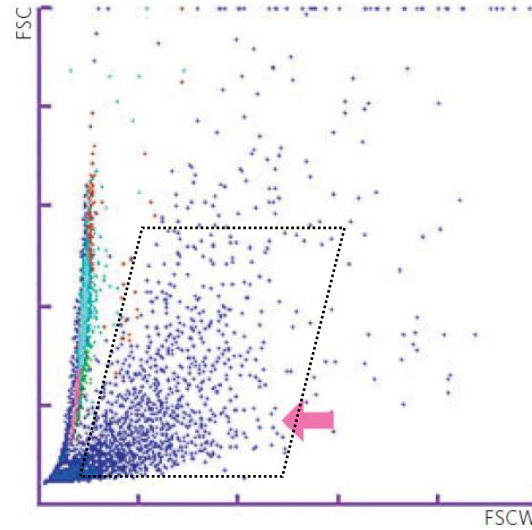
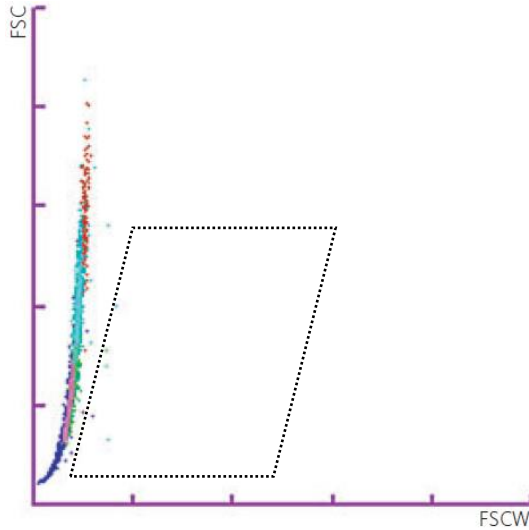
=FSCWが高い



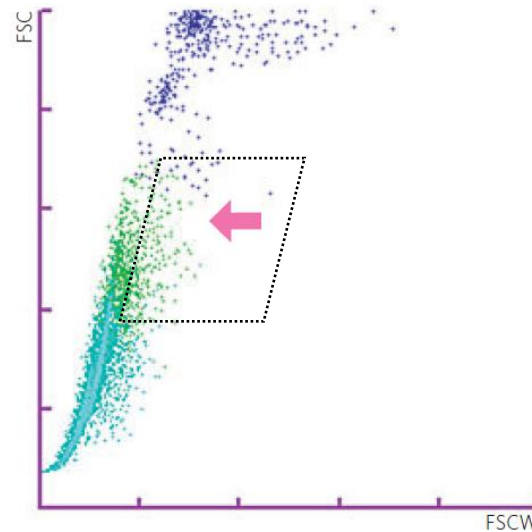
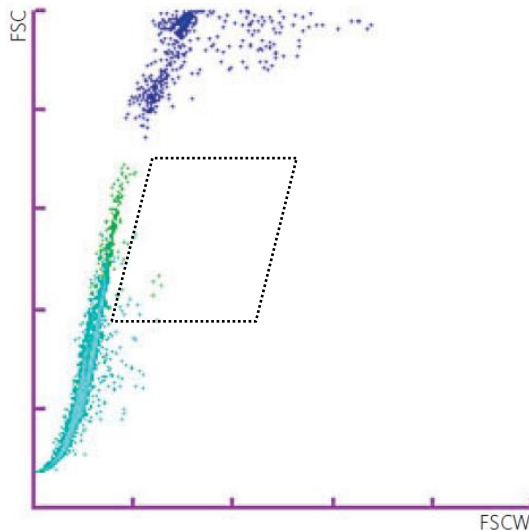
WDFスキュッタグラム

正常例

凝集例

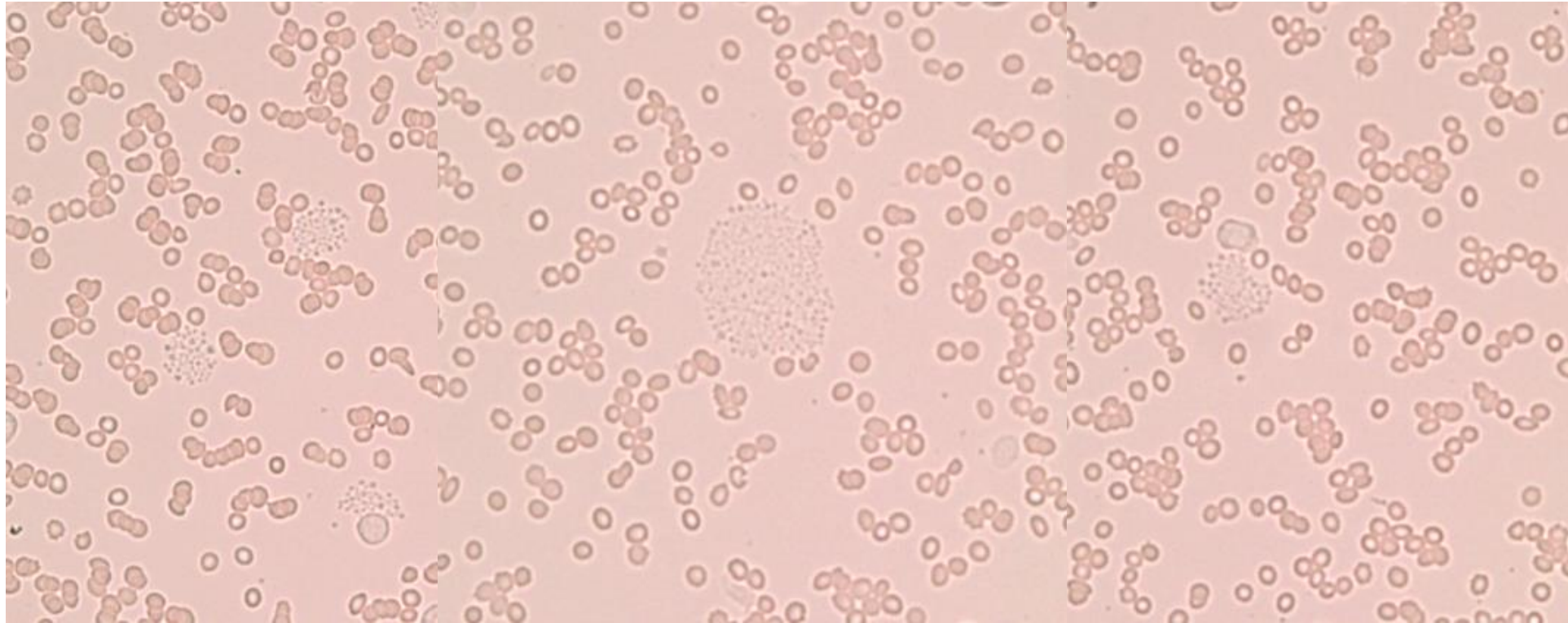


PLT-Fスキュッタグラム



前方散乱光幅(FSCW)

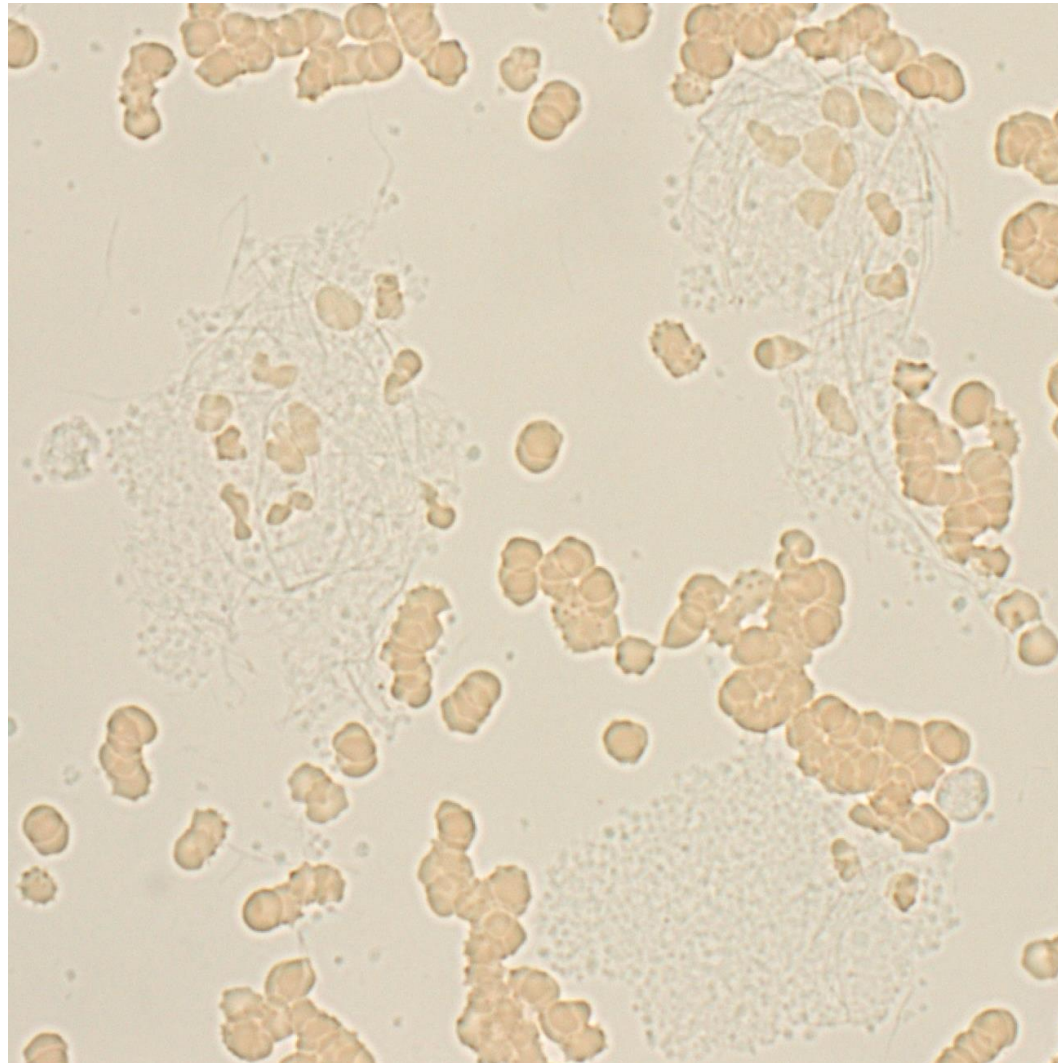
- 流体中の凝集塊の長径が長いいためFCSWがスキュッタグラム右方にプロットされる
- **WDFスキュッタグラム**ではスキュッタグラム**原点から右上方に分布するように異常プロット**が認められることが特徴
- **PLT-Fスキュッタグラム**では血小板の集団の**右側が膨張**するようなスキュッタグラム**変化**をすることが特徴



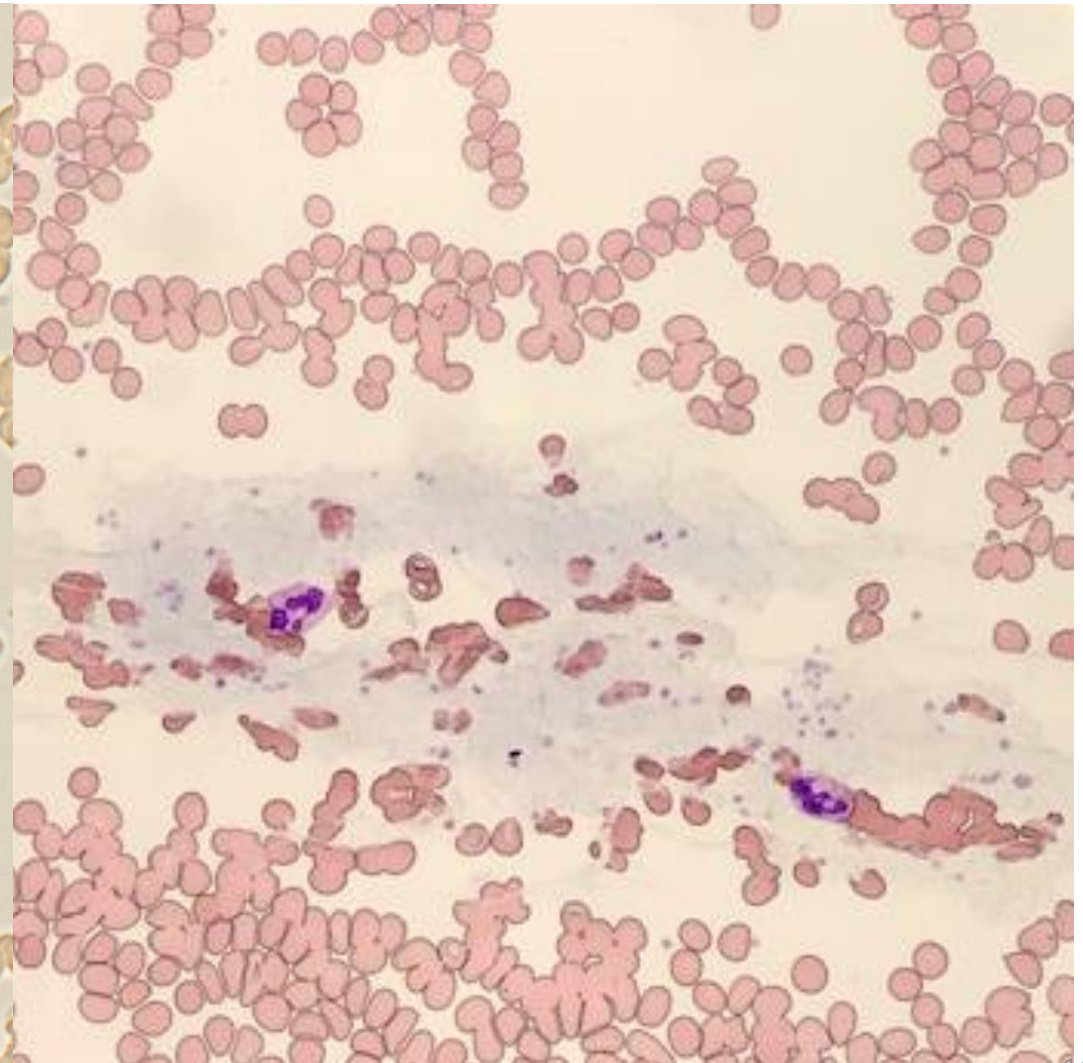
例) EDTA凝集

**染色（未染色）標本でフィブリンの有無の観察が重要**

未染色



MG染色



前回値に比べ極端（半分以下）な減少、 $10万/\mu L$ （初回値）

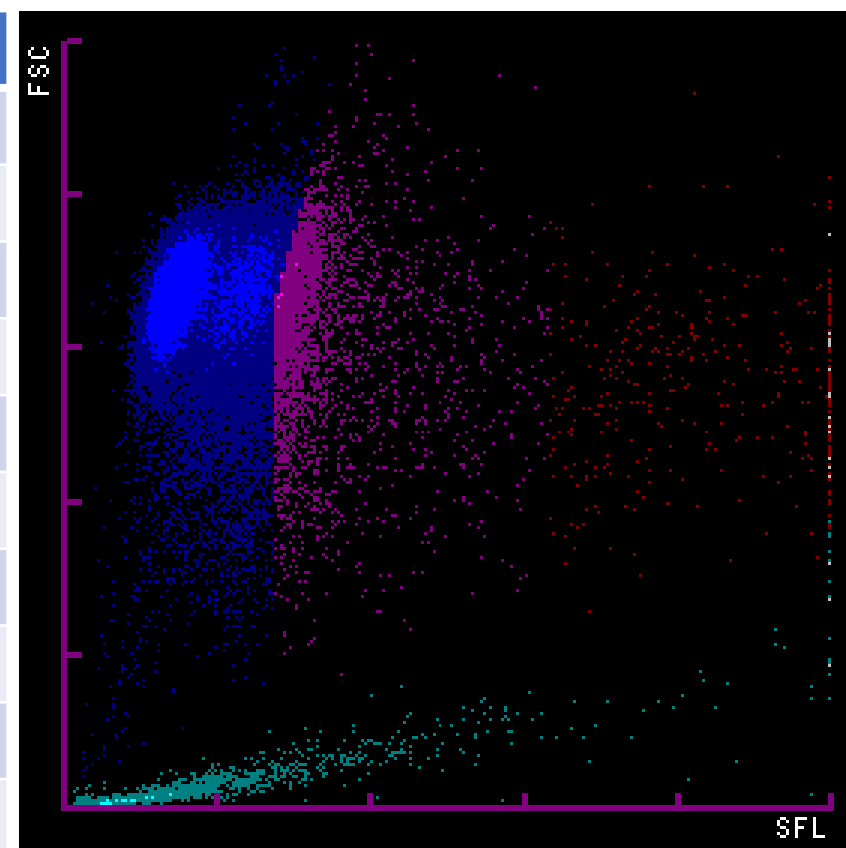


- 検体不備（検体凝固）
- EDTA凝集
- 破砕赤血球（熱傷などは偽高値を呈することが多い）

検体、スキャッタグラムや標本などで直接確認（再検）、対応することが不可欠

# 78歳男性 MDS AZA治療中

全血算			白血球分画			生化学		
WBC	3.38	× 10 <sup>9</sup> /L	Sg	64.0	%	TP	6.0	g/dL
RBC	2.59	× 10 <sup>12</sup> /L	St	2.0	%	Alb	3.4	g/dL
Hb	7.9	g/dL	Ly	29.0	%	T-BIL	0.5	mg/dL
Ht	25.4	%	Mo	5.0	%	AST	22	U/L
PLT	89	× 10 <sup>9</sup> /L	Eos	0.0	%	ALT	19	U/L
MCV	98.1	fL	Baso	0.0	%	ALP	76	U/L
MCHC	31.1	g/dL	赤血球大小不同			γGTP	27	U/L
RET	10.5	%	多染性赤血球			LD	345	U/L
RET_Abn_Scattergram			脱顆粒好中球			UN	28	mg/dL
			大型血小板			CRE	1.41	mg/dL
			巨大血小板			UA	6.8	mg/dL

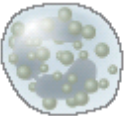







- 測定項目

RET, RET-He , PLT-O

- 特長

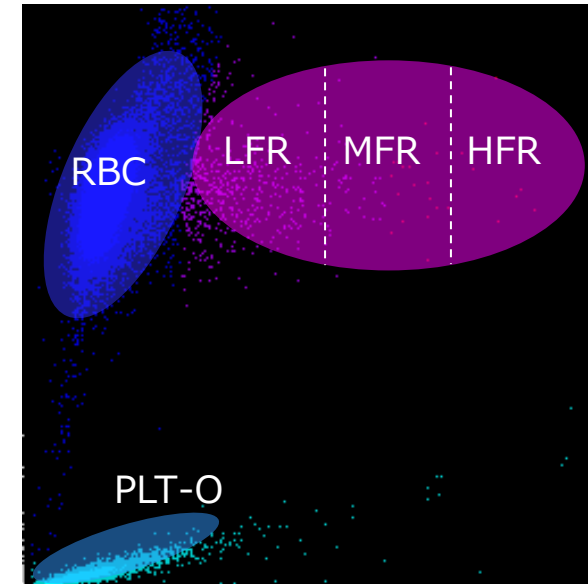
- 染色性の相違によりWBC、RET、RBCを分類
- 従来機種、あるいはPLT-F無しの機種ではPLT-Iをサポートする光学的なPLTの測定（PLT-O）が可能。

	染色	側方蛍光 (SFL)	前方散乱光 (FSC)	
白血球		→ 	強	強
網赤血球		→ 	中	強
赤血球		→ 	弱	強

機序：核酸に親和性のある蛍光色素フルオロセルRETにより網赤血球では細胞質内の残存RNAは染色され、成熟RBCと分画される。

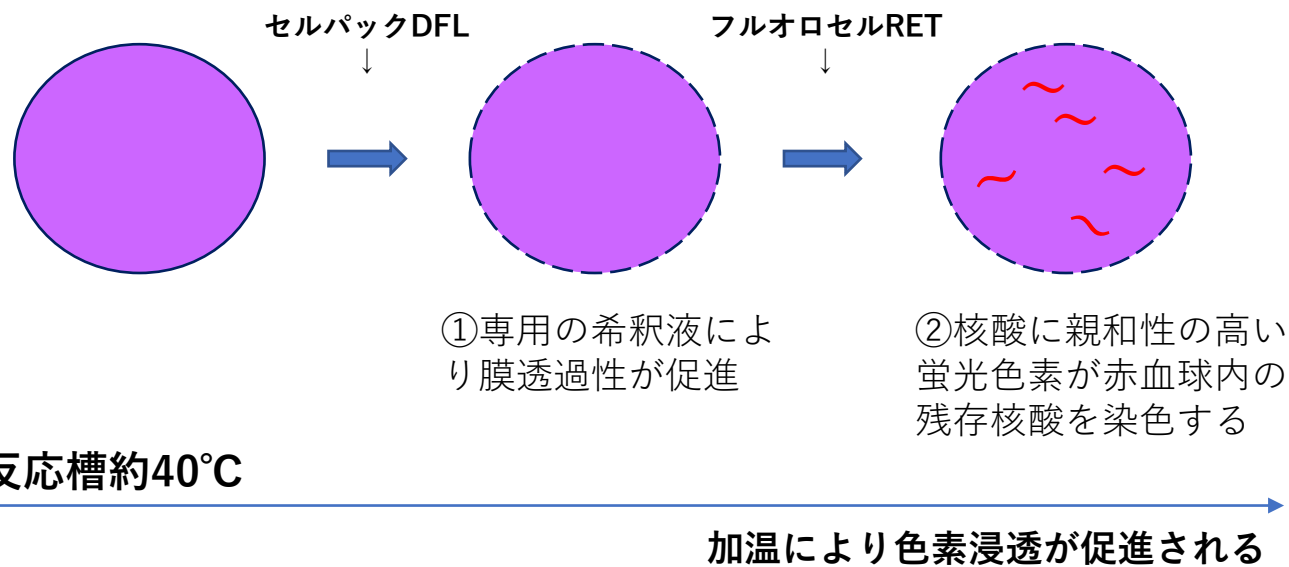
## RETスキヤッタグラム

FSC：前方散乱光

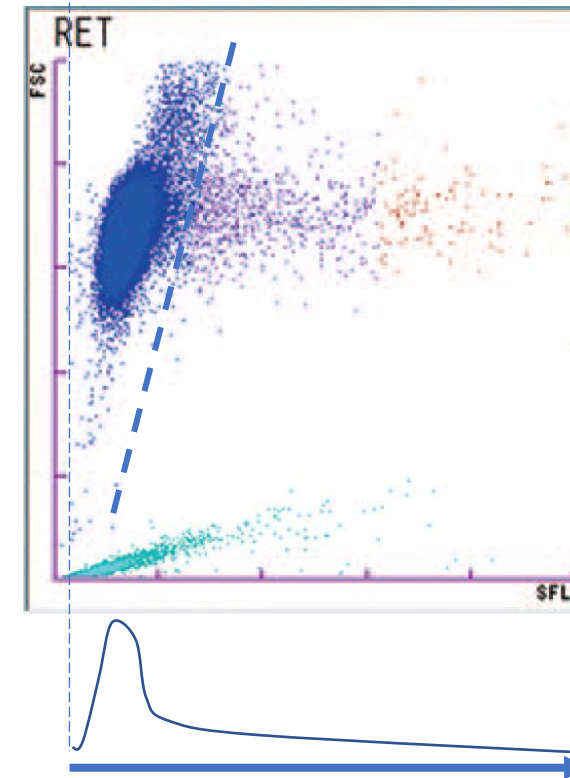


SFL：側方蛍光

## 【①RETチャンネルの試薬反応】

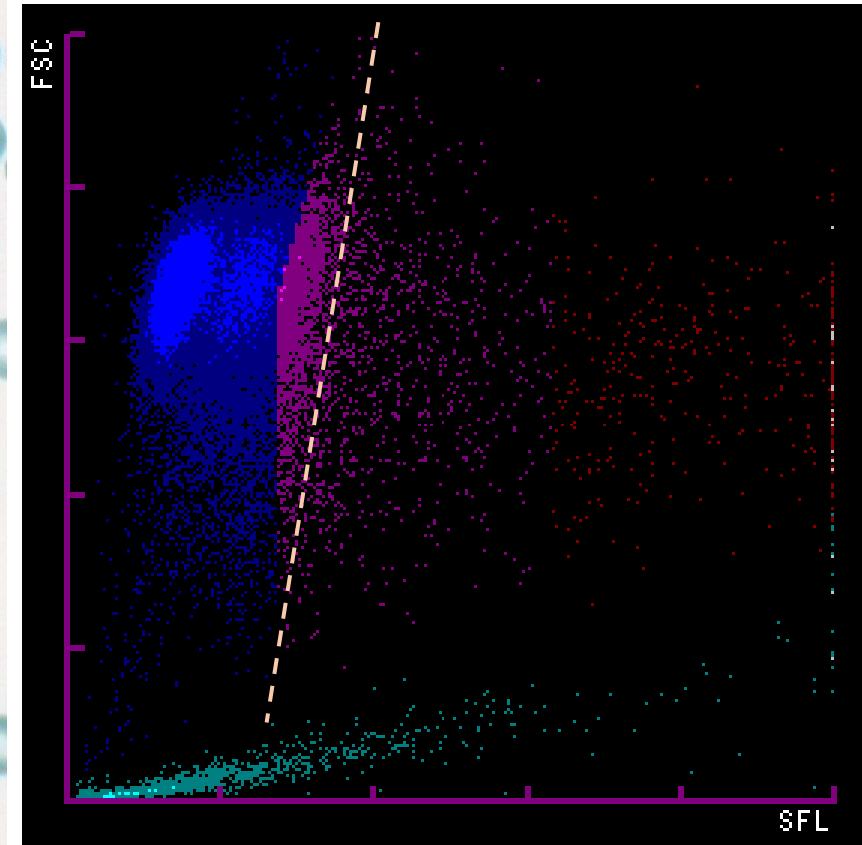
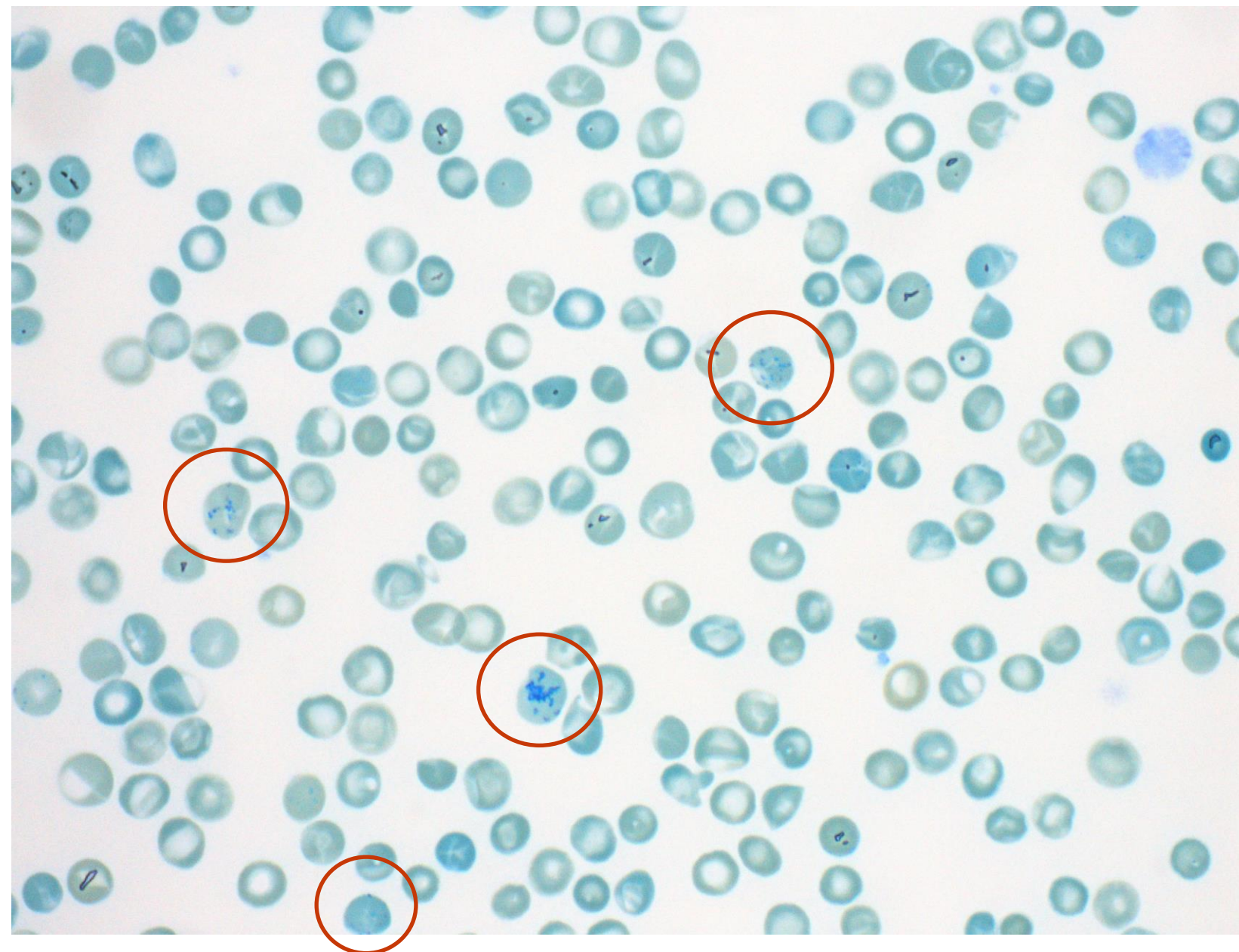


## 【②RETスキッタグラムの自動ゲート】



RETを含む赤血球集団の分布の状態から成熟赤血球の集団を推定してゲート位置や角度が決定される。

# 超生体染色（ニューメチレンブルー染色）



目視カウント 3.0%



# 【症例】 25歳女性 SLE経過観察中両下腿浮腫を発症

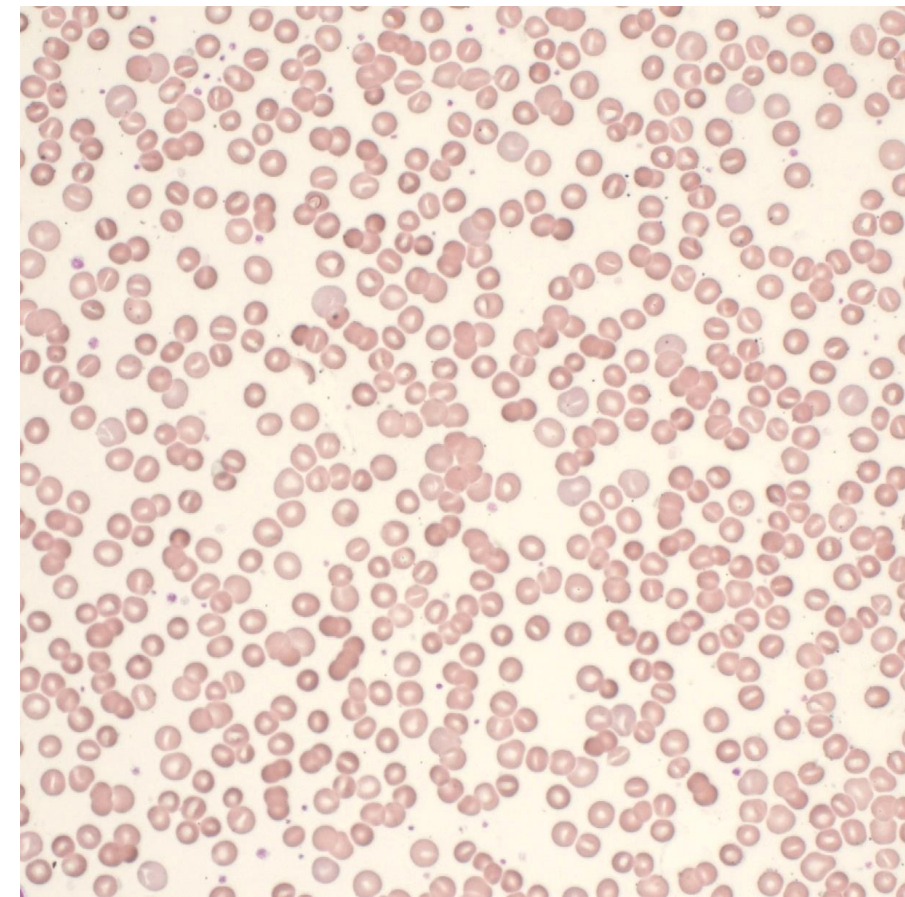
全血算		
WBC	7.88	$\times 10^9/\mu\text{L}$
RBC	0.89	$\times 10^{12}/\mu\text{L}$
Hb	7.4	g/dL
Ht	11.0	%
PLT	377	$\times 10^9/\mu\text{L}$
MCV	123.6	fL
MCHC	67.3	g/dL

末梢血液像		
Sg	56.0	%
St	0.0	%
Eo	13.0	%
Ba	0.0	%
Mo	6.0	%
Ly	25.0	%

球状赤血球、赤血球凝集

生化学検査		
TP	6.4	g/dL
ALB	2.7	g/dL
T-BIL	1.0	mg/dL
AST	21	U/L
ALT	24	U/L
LDH	322	U/L
CRE	0.81	mg/dL
Hp	<5.0	mg/dL

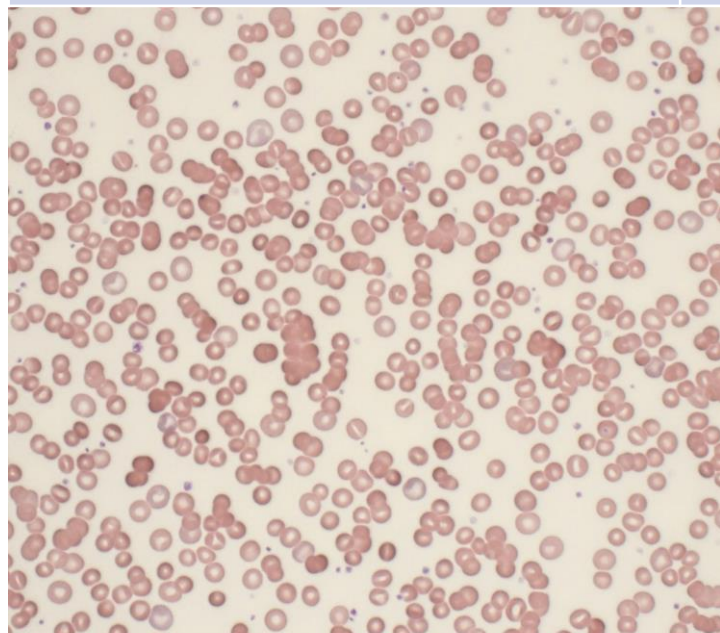
免疫学的検査	
直接クームス	3+
間接クームス	1+



末梢血液像 MG染色 (×400)

# 【加温および希釈測定結果】

RBC-I	37°C加温後RBC-I	RBC-O
$0.89 \times 10^{12}/L$	$0.98 \times 10^{12}/L$	$2.13 \times 10^{12}/L$
RBC-I	7倍希釈測定RBC-I	RBC-O
$1.23 \times 10^{12}/L$	$1.20 \times 10^{12}/L$	$2.19 \times 10^{12}/L$



・ 37°C30分加温後、および7倍希釈測定により血算値に変化なし

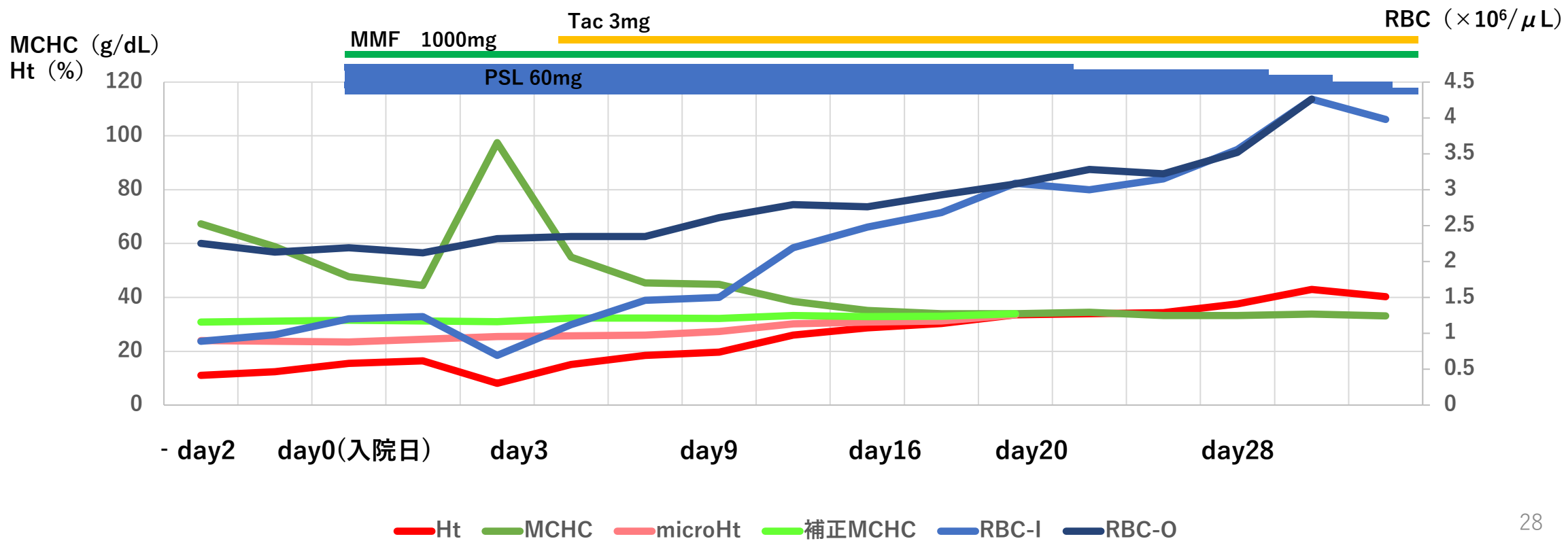
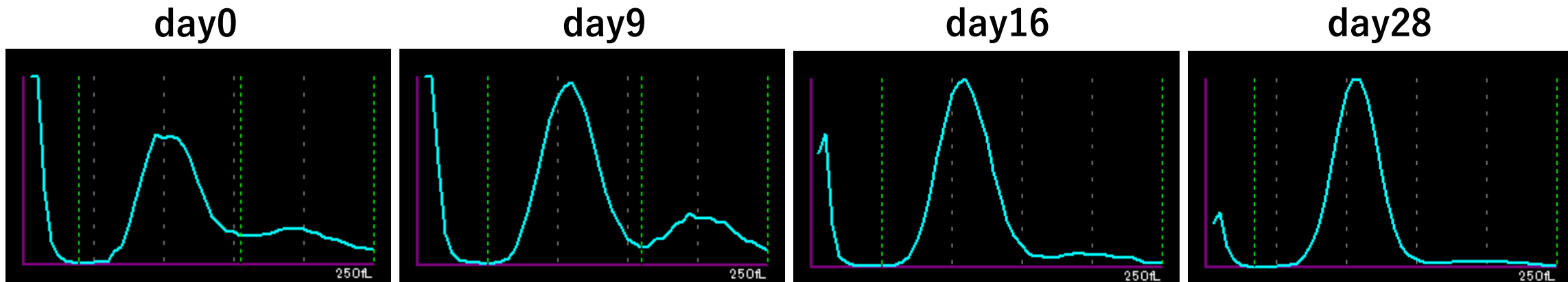
・ RETチャンネルは40°Cで加温測定

37°C加温後末梢血液像 MG染色 (×400)

	初回測定結果	補正後測定結果	補正測定法
RBC	$0.89 \times 10^{12}/L$	$2.13 \times 10^{12}/L$	RBC-O
Hb	7.4g/dL	7.4g/dL	
Hct	11.0%	24.0%	ミクロヘマトクリット法
MCV	123.6fL	112.7fL	
MCHC	67.3g/dL	30.8g/dL	

- ・ 目視法により凝集は認めるが、測定値に差異なし

# 【臨床経過】



# MCHC>37.0g/dLの再検法

MCHC>37.0g/dL

上清を確認

血清浸透圧(血清Na値)  
血清浸透圧 =  $2(\text{Na}) + \text{血糖}/18 + \text{尿素窒素}/2.8$

RBC-O(RETチャンネル)  
粒度分布確認

膜異常  
(肝障害など)

塗抹標本確認

球状赤血球の有無

ミクロヘマトクリット測定

37°C30分加温後測定  
(×7希釈検体も)

混濁 有り

混濁 無し

(Hb以外の影響)

MCHC正常化

MCHC>37.0g/dL

補正Hb値

= 全血Hb値 - 血漿Hb × (1 - Ht%)

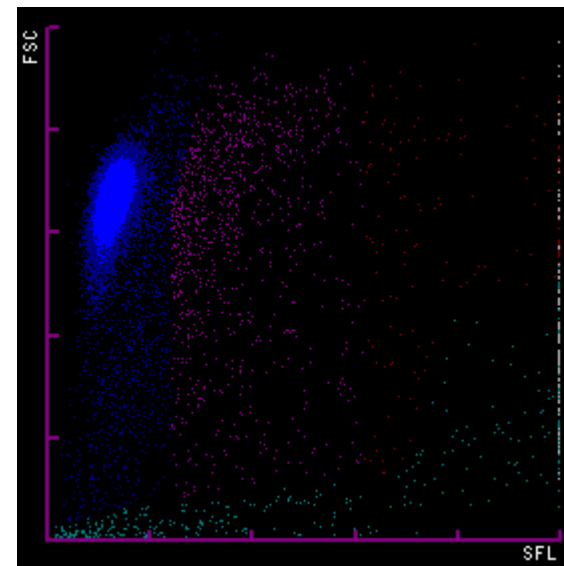
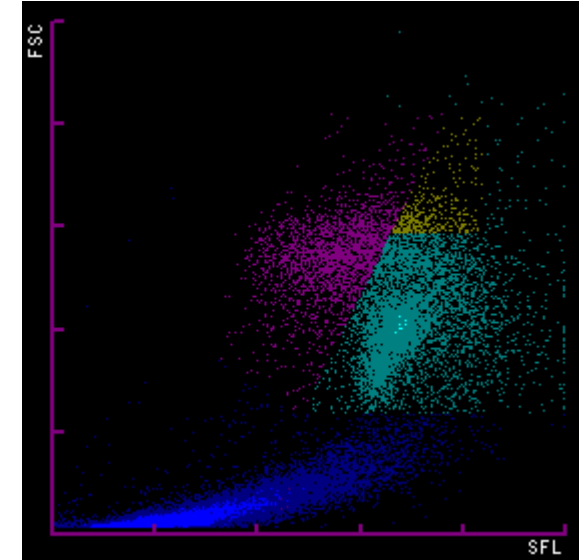
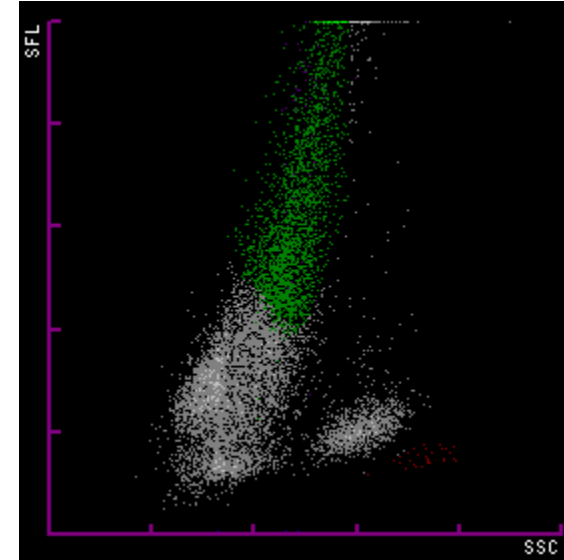
ミクロヘマトクリット測定  
RBC-O

# 69歳女性 MDS-MLD AZA治療中

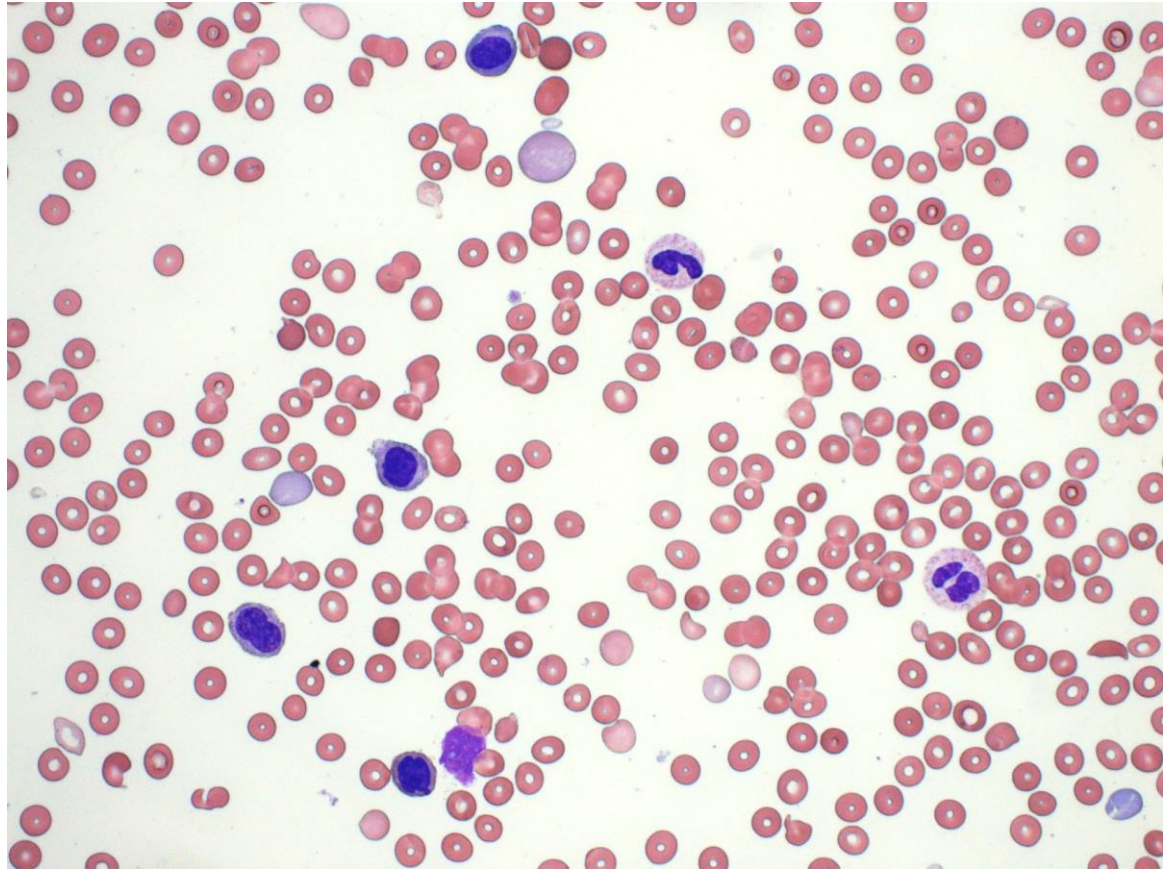
全血算			白血球分画		
WBC	6.91	× 10 <sup>9</sup> /L	Mt	1.0	%
RBC	1.98	× 10 <sup>12</sup> /L	Sg	1.0	%
Hb	5.8	g/dL	St	47.0	%
Ht	18.1	%	Ly	43.0	%
PLT	15	× 10 <sup>9</sup> /L	Mo	7.0	%
MCV	91.4	fL	Eos	1.0	%
MCHC	32.0	g/dL	Baso	0.0	%
RET	3.8	%	EBL	178.0	/100WBC

WBC Abn Scattergram  
 Abn Lympho?  
 IG Present  
 NRBC Present  
 PLT\_Abn\_Distribution  
 PLT\_Clumps?

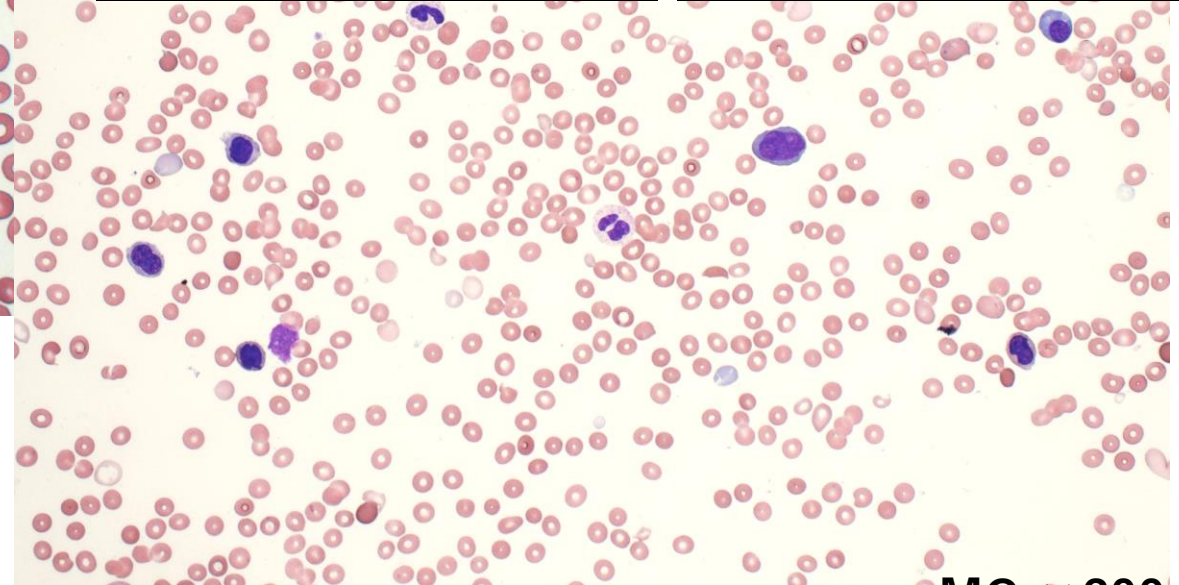
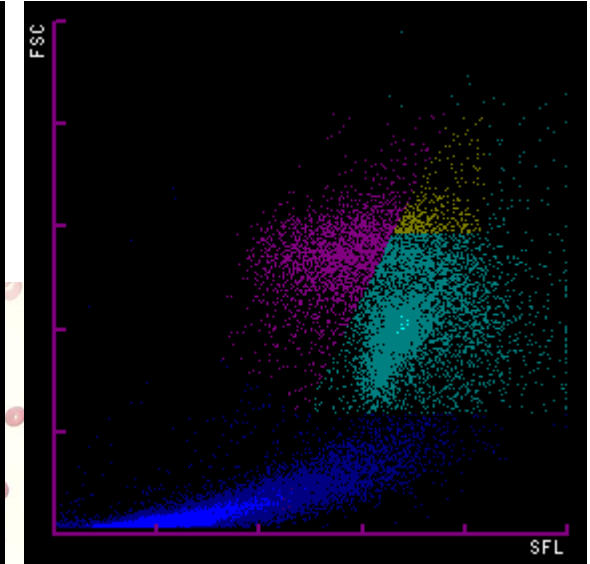
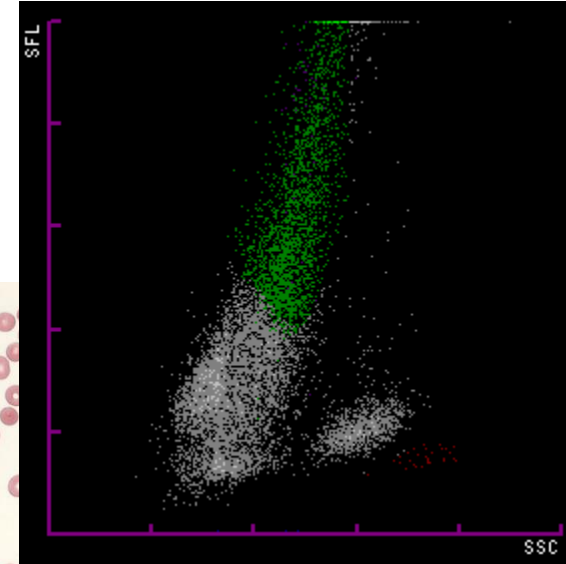
芽球? +  
 赤血球大小不同  
 多染性赤血球  
 巨赤芽球様変化  
 大型血小板  
 巨大血小板



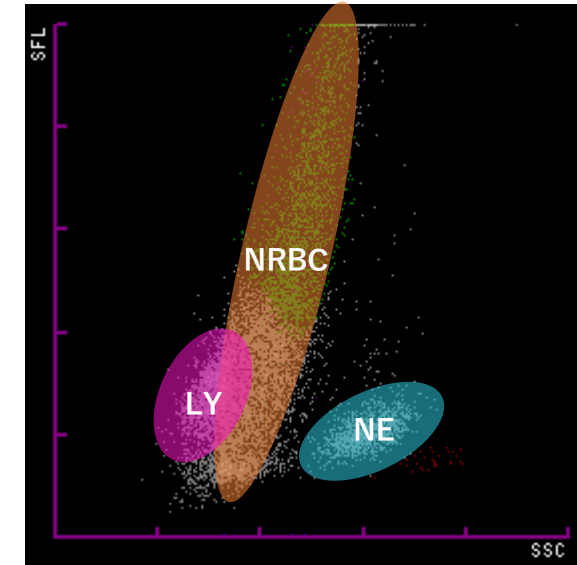
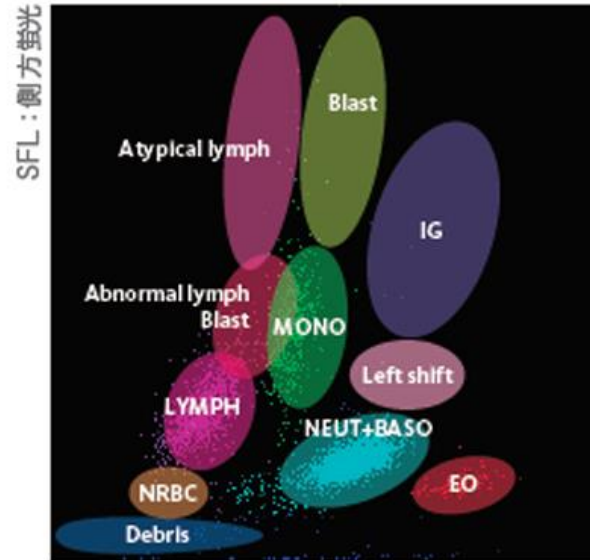
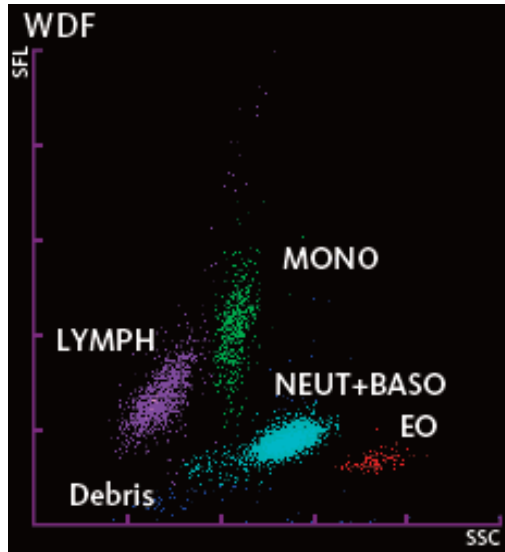
# 末梢血液像



MG × 400



MG × 200



SSC : 側方散乱光

	溶血	染色	側方蛍光 (SFL)	側方散乱光 (SSC)
単球			中	弱
リンパ球			中	弱
好中球			弱	中
好酸球			弱	強

※イメージ図です。

ライザセルWDF中の界面活性剤により赤血球を溶血させ、白血球の細胞膜を損傷させる。各白血球はその特徴により細胞形態が変化し、その差異を側方散乱光で区別する。同時にフルオロセルTMWDF中の傾向色素が細胞質内に入り、核酸および細胞小器官を染色し、その種類や量により各白血球の蛍光強度に差が生じる。各白血球から得られる散乱光と蛍光強度を二次元スキャッタグラムに展開し、独自のアルゴリズムでクラスター解析する。



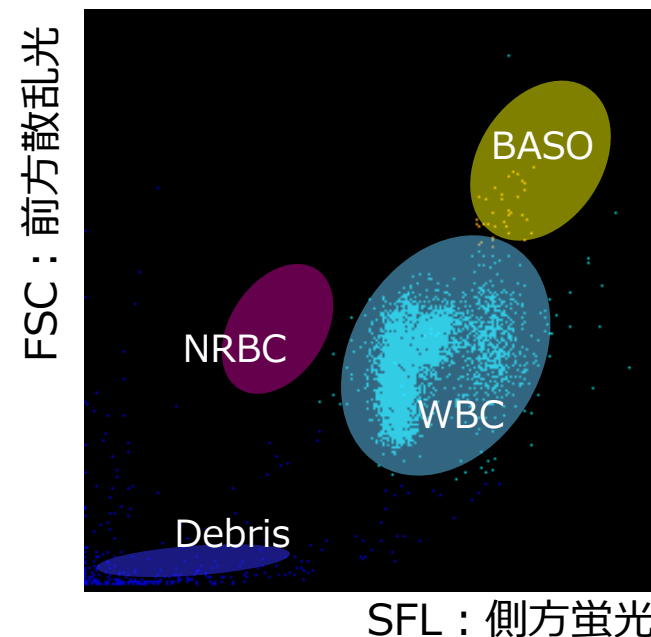
## 測定項目：WBC, NRBC, BASO

	細胞膜透過 溶血		蛍光	側方蛍光 (SFL)	前方散乱光 (FSC)
好塩基球		→	→	強	強
リンパ球		→	→	中	中
単球		→	→		
顆粒球 (好中球・好酸球など)		→	→	弱	中
有核赤血球		→	→		
赤血球		→	→	極弱	極弱

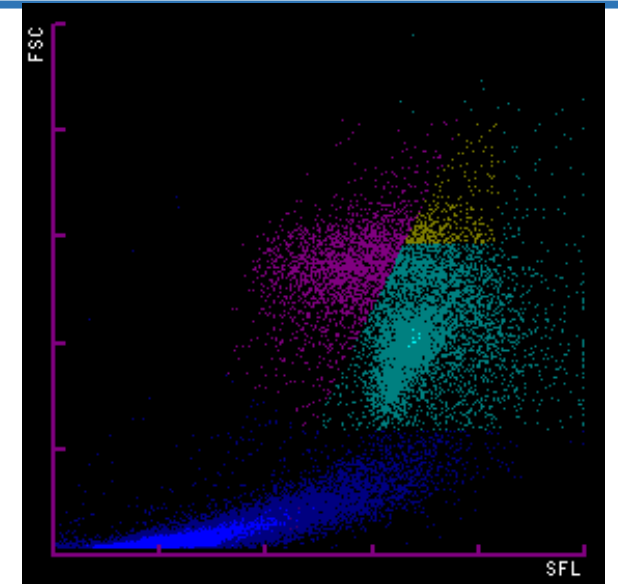
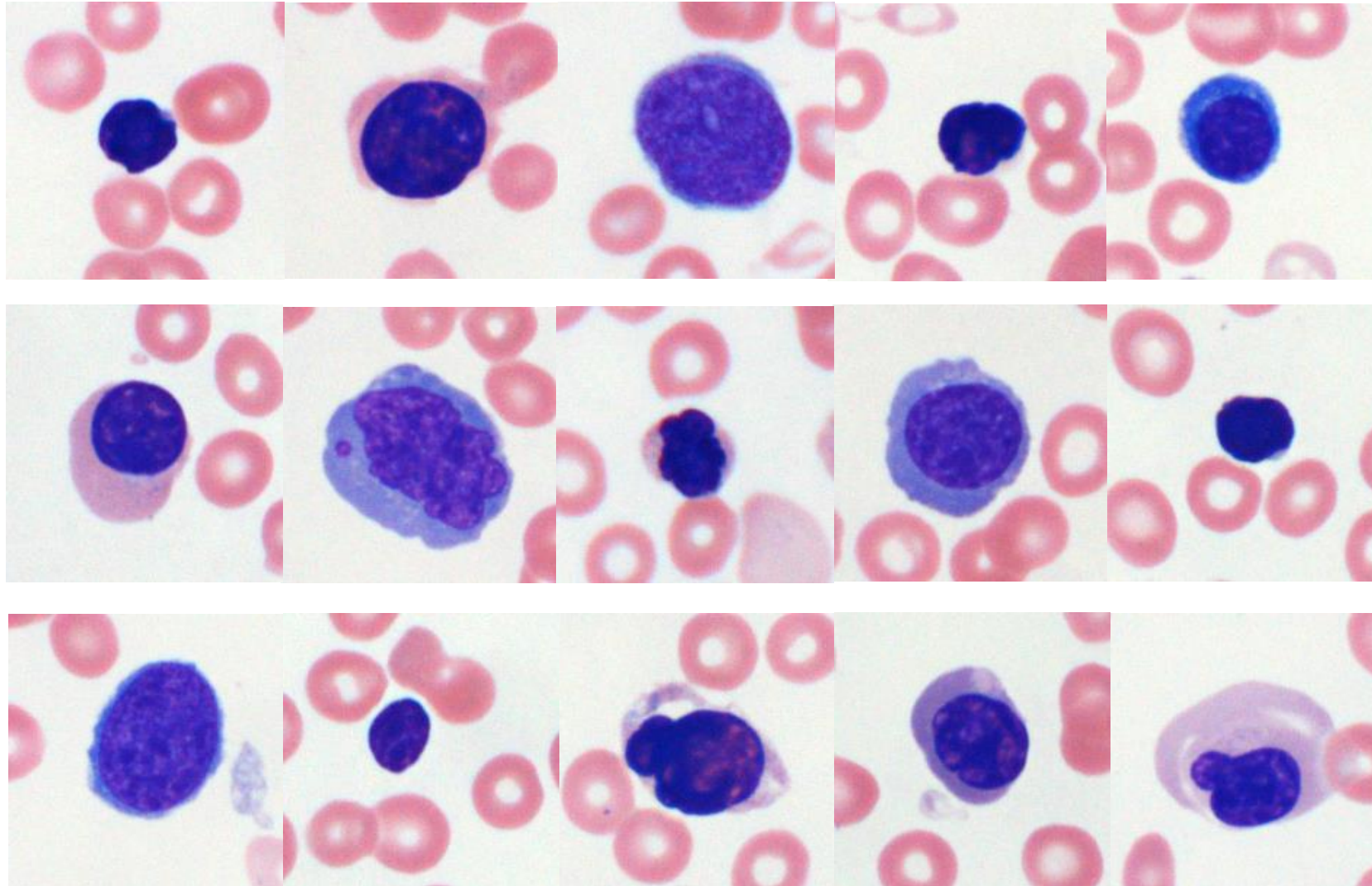
機序：酸性の溶血剤ライザセルWNRにより殆どのWBCは細胞膜が著しく傷害され半裸核化し収縮した粒子状になる。一方で、好塩基球は酸性溶血剤に耐性を示し、他の白血球と比較して膜の障害が少なく収縮や脱顆粒が軽微である。この特徴から好塩基球とその他白血球は分画される。核染色蛍光色素としてフルオロセルWNRが添加されると核が染色され、デブリスとの切り分けが明確になる。NRBCはWBCに比較して核の染色性が弱く、白血球から分画される。

全測定検体にてNRBCの定量測定  
有核細胞数=>WBC 自動補正実施

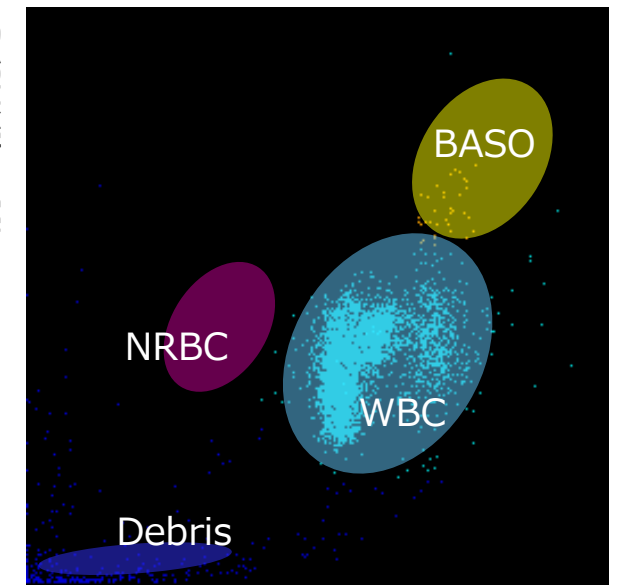
### WNRスキヤッタグラム



# 末梢血液像 (有核赤血球)

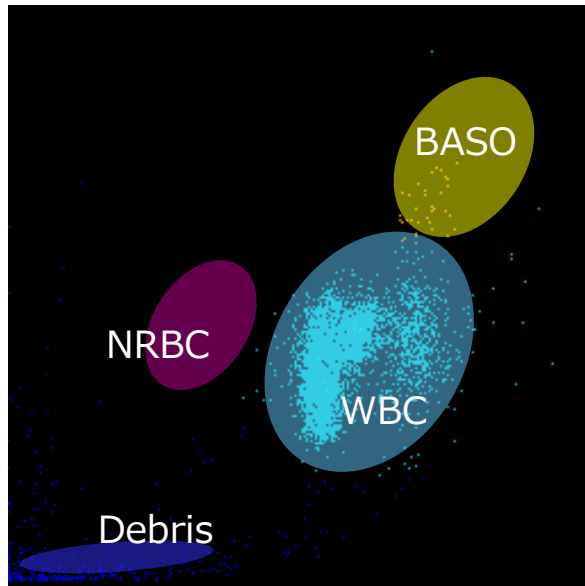


FSC : 前方散乱光

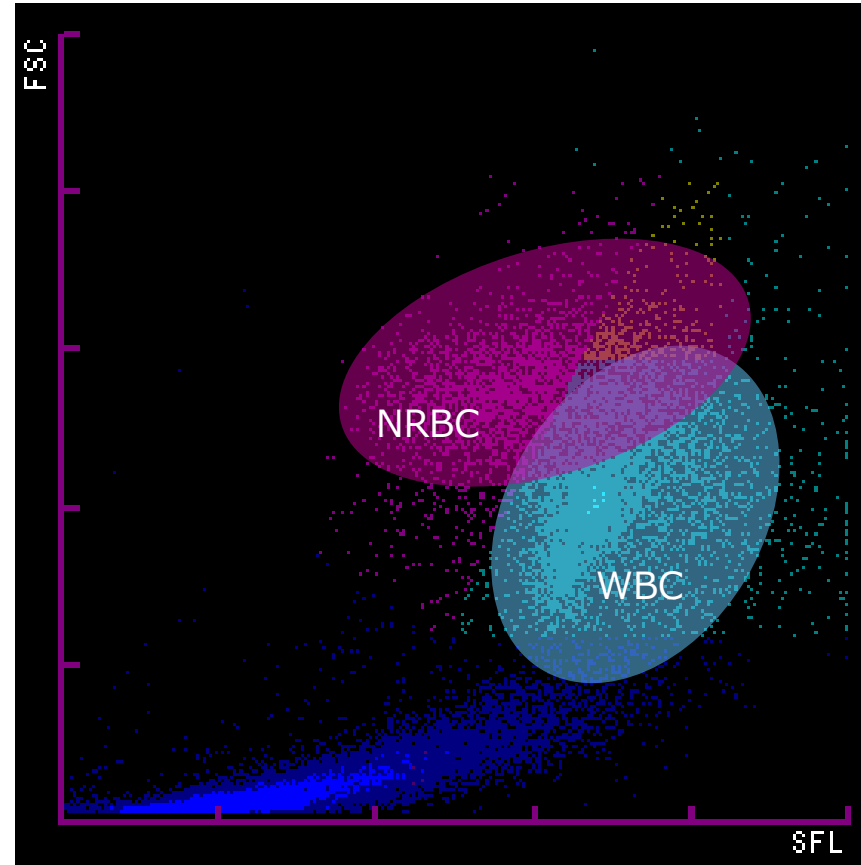


SFL : 側方蛍光

FSC : 前方散乱光



SFL : 側方蛍光



異常なNRBCに対し、通常  
の染色態度と異なるため、  
WBCとの分離が不明瞭



WBCの自動補正が不十分



用手的に補正が必要

# 白血球数補正

全血算			白血球分画		
WBC	6.91	$\times 10^9/L$	Mt	1.0	%
RBC	1.98	$\times 10^{12}/L$	Sg	1.0	%
Hb	5.8	g/dL	St	47.0	%
Ht	18.1	%	Ly	43.0	%
PLT	15	$\times 10^9/L$	Mo	7.0	%
MCV	91.4	fL	Eos	1.0	%
MCHC	32.0	g/dL	Baso	0.0	%
RET	3.8	%	EBL	178.0	/100WBC
			芽球?	+	
			赤血球大小不同		
			多染性赤血球		
			巨赤芽球様変化		
			大型血小板		
			巨大血小板		

※TNC-N : Total nuclear cell

$$\text{TNC-N} \times 100 / 100 + \text{EBL}$$

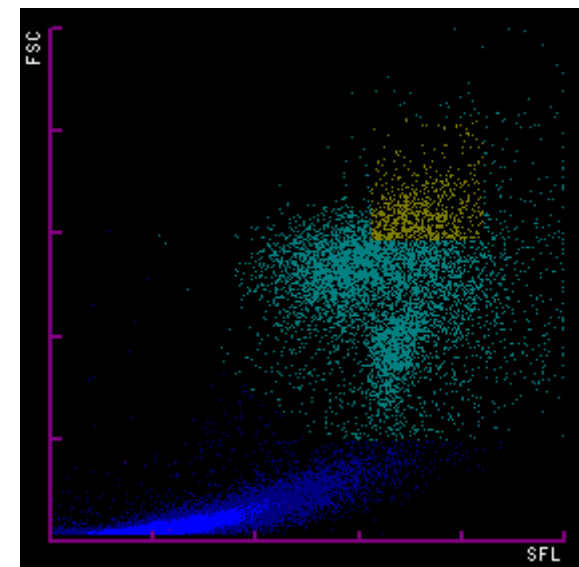
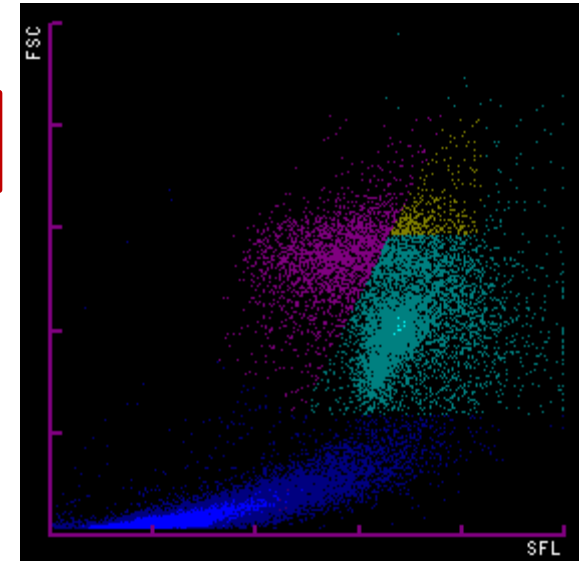
6.91 (補正值 : 自動血球計数器) は自動補正された数値であるため使用不可

TNC-N :  $9.47 \times 10^9/L$ を使用



$6.91 \times 10^9/L \rightarrow 3.41 \times 10^9/L$

ちなみにこれは3日後の同一患者→



- 検体凝固（フィブリン析出：Clumps?）検体を検出
- PLT-Fは特異性の高い染色を用い正確性が高い
- RETチャンネルでは、加温測定により寒冷凝集素の影響が緩和される
- XN-3000の搬送内での自動再検による効率化
- 通常と異なるスキッターを参考にすることで、効率的な運用が可能