

〈特集: 血液検査の精確さ検証の実際〉

光学的白血球自動分類法の精確さの保障

山田 卷弘、秋葉 俊一

Assuring the accuracy of WBC differential method

Makihiro Yamada and Shyunichi Akiba

Summary In order to assure the accuracy of WBC differential data using the optical detection method, it is necessary to adjust the sensitivity comprehensively to include both hardware and reagents.

This step still involves confirmation of the operational stability of the measurement system, and provides no guarantee that this process assures accuracy.

As a general rule, for the assurance of the accuracy of the WBC differential, the correlation is more important than a constant level between the results, as suggested in the H-20A document by CLSI, which is the standard analytical method, and the result obtained from the analyzer shall be recognized.

Key words: Accuracy, Optical detection, Data guarantee, ADVIA2120i, WBC differential

I. はじめに

個人的には精確さより正確さという言葉になじみがある。臨床検査を取りまく環境がますます複雑化された近年では精度管理の要求度も高くなり、正確さではなく精確さという表現に変わってきたように感ずる。統計的な本を見ると正確さも精確さも同一とされているが、精確さはデータが真値に近くと同時にバラツキも少ないという意味らしい。考えて見ると、データのバラツキの程度と真値にどれだけ近いかという要素の方向は別であり、データを表現する場合

に、精密さ、正確さあるいは両方を含む精確さを論議しているかが不明になる可能性がある。

II. 光学的細胞分析

最初に、光学的細胞分析法に関して論議するため、光源に関することについてレビューしてみることにする。フローサイトメーターを代表とする細胞分析¹⁾には、レーザー光源が多く用いられるが、レーザーの意味は、Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (輻射の誘導放出による光増幅)の合成語で、

シーメンスヘルスケア ダイアグノスティクス株式会社 サービスサポート部 技術管理グループ 学術サービス
〒104-0033 東京都中央区新川1-3-17, 新川三幸ビル

Siemens Healthcare Diagnostics K.K.,
Scientific Solution,
1-3-17 Shinkawa, Chuo-ku, Tokyo 104-0033, Japan

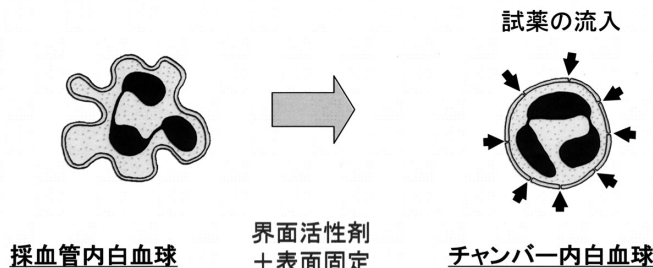


図1 界面活性効果と細胞膜固定反応

自然界には存在しない人工的な光とされている。レーザー光の特徴は自然光と異なり、「単一波長」、「同位相による干渉性」、そして「光拡散がない」三つの物理特性を持った光エネルギーで、位相、エネルギーがそろって干渉する。この光拡散がないレーザー光の特性は理論的に光束内に密度の異なった成分が存在しない限り無限大まで直進するとされている。

細胞をこの光束にあてると、細胞の特性（細胞容積、顆粒密度、表面構造など）に応じて光が散乱するため、散乱角度に応じた散乱光量を求めることにより細胞を分別することが可能となる。また、脂肪染色やペルオキシダーゼ染色などに代表されるような細胞染色処理をした細胞懸濁液の分析には、可視部波長を利用したハロゲン光が広く用いられている。細胞染色を用いるこの分析法は無染色の細胞を解析するより分別能力が高い利点を持っている。

Ⅲ. 白血球分類の測定原理

次に、精確さの保証を説明する上で必要であるため、我々の白血球分類の測定原理を紹介する³⁾。ADVIA2120iを代表とするシーメンスの白血球分類は、PEROXとBASOと呼ばれる2つの測定チャンネルから求められる。ペルオキシターゼ染色を行うPEROXチャンネルの最初のステップでは、全血にSDSと呼ばれる界面活性剤を混和させると、赤血球は破壊され溶血が生ずる。この段階で白血球の形状は球状となり、細胞膜は、界面活性剤の作用により小さな穴が空き、さらにホルマリンの作用によって細胞膜自体の形状の固定化が行なわれる（図1）。次いで、

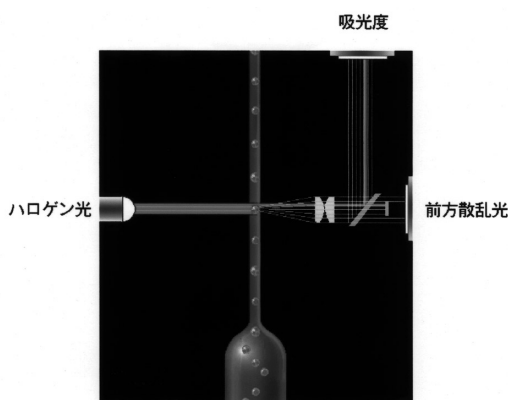


図2 フローセル内を通過する細胞

呈色反応物質である4塩化1ナフトールとペルオキシダーゼ反応の基質である過酸化水素が、界面活性剤によって開けられた小さな穴から入り込む。約70度に加熱されたチャンバー内でインキュベーションされ、染色が促進される。ペルオキシダーゼ活性を有する細胞は、過酸化水素を分解して発生した活性酸素によってペルオキシターゼの活性の強さに応じて、呈色試薬が黒褐色に着色される。このイメージは半熟卵を想像して頂けると良く理解できると思うが、このステップで細胞の形状の安定化を図ると同時に液相系ペルオキシダーゼ反応を完成させる。この細胞懸濁液は、ハロゲン光が照射されているフローセルに送り込み、前方散乱光と吸光度を求める（図2）。ハロゲン散乱光量は細胞容積、吸光度はペルオキシダーゼ活性度を反映することから、この二つのパラメータを使って2

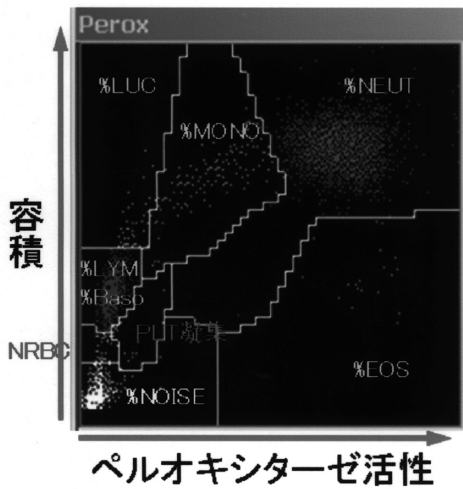


図3 Peroxサイトグラム

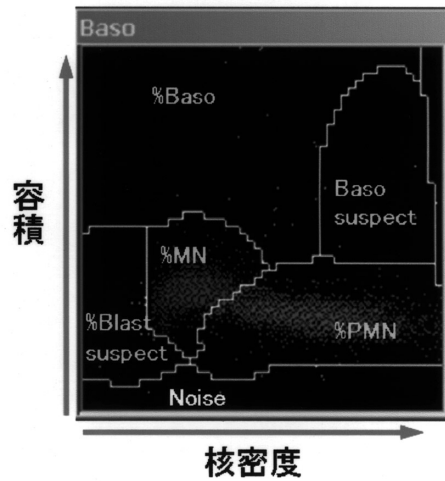


図4 Basoサイトグラム

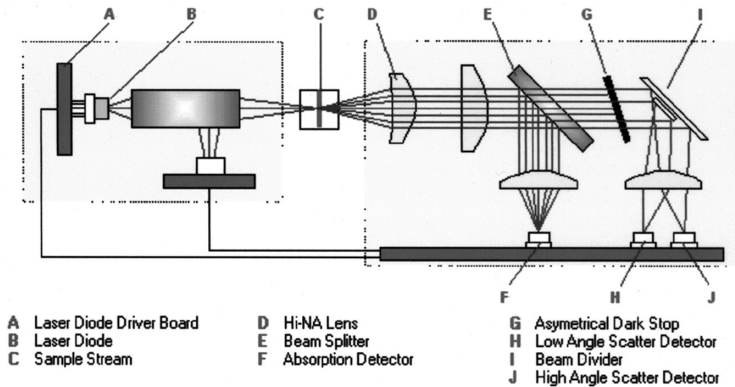


図5 レーザー光学系検出器

次元スカッタグラムを作成する。コンピュータ・アルゴリズムがクラスター形状を判断して、NEUT、EOS、MONO、LYM+BASO、LUCの5つの白血球集団を分類し、さらに、NRBCやPLT凝集の情報も得ることができる(図3)。

このPEROXチャンネルでは、リンパ球と好塩基球が同じ領域のクラスターに混在することから、好塩基球を求めるBASOチャンネルを設け、PEROXチャンネルで求めたLYM+Baso値からBasoを差し引きLYMを算出し、最終的に白血球5分類値とLUCを算出する(図4)。

ここで、LUC (Large Unstained Cell) であるが、ペルオキシターゼ陰性大型細胞と定義し、

大型リンパ球、活性化リンパ球、異型リンパ球、芽球などが出現している場合に増加するシーメンス社製装置固有のパラメータで、異常細胞出現の可能性を示唆するマーカーとして活用されている³⁾。

次にBASOチャンネルであるが、好塩基球の細胞膜は、酸性下における界面活性剤の作用に抵抗性があることを利用している。具体的には酸性状態にして界面活性剤と全血を混和すると、赤血球は破壊され、好塩基球以外の白血球は、細胞膜が消失した裸核状態となる。この細胞懸濁液をレーザー光が照射されているフローセルに送り込み、個々の細胞を低角度(2~3度)

と高角度（5～15度）位置のシグナルを検出器（図5）に取り込む。低角度散乱光は細胞容積を反映し、高角度散乱光は核の複雑度を反映する情報として得ることができる。好塩基球は細胞質が残存していることから、裸核された白血球とは容積の差で分別することが可能となる。一方、裸核された細胞は、核の複雑さによって出現位置が異なることから、リンパ球のような丸い核はレーザー散乱光があまり増加しない特性を持ち、裸核細胞の左方（MN領域）に位置し、分葉核球のように複雑な核構造をしている場合はレーザー散乱光の量が増し中央から右方（PMNI領域）に位置する。このように、BASOチャンネルでは好塩基球の割合だけでなく、単核球と多形核球との比率を求めることが可能になっている。裸核化された細胞群は核構造が複雑なほど高角度散乱光量が強くなる特性を持つため、単核白血球（MN）群と多形核白血球（PMN）群が形成する。また、単核白血球（MN）群と多形核白血球（PMN）群の位置から分葉指標（図6、Lobularity Index：LI）が算出できる。LI値が小さいほど、好中球の左方移動が起きている可能性を警告する。

IV. ADVIA2120iにおける光学系の校正

光学的に細胞測定を行なうためには、最初に光束の形状と光軸の位置調整が必要となる。こ

の物理的なアライメント作業は光学的に細胞分析を行なう上で非常に大切で、検出感度や正確性に影響を及ぼす。特に白血球分類のように相対的比率を算出するような項目であっても、光学系の感度が変化すればサイトグラムの形状に影響を与え、色素沈着量を求めるような場合や細胞容積といった絶対的値を求める項目では更に大きく影響をする。

光学的検知法では、実際は、オートマチックゲインコントロール回路によって出現位置は変わらない。上記で述べたようにデータ保証を行なう上で最初に行なわなければならないことは、装置や光源の状態によって生じる光の強度に対する個々の誤差を調整し、画像としての出現位置を一定にしなければならない。

具体的には、RBC/PLT・Baso・Retic・Peroxのチャンネル毎に異なるサイトグラムが得られるため、それぞれについてゲイン調整が必要である。

RBC/BASO/RETICレーザー系には、オブチポイント（ADVIA120/2120の光学調整用マテリアル）と呼ばれる固定赤血球を使う。この固定赤血球は、標準オイルによって校正されたADVIA120/2120システムを用いて基準値が決められている。標準オイルの屈折率は、NIST標準品を使って校正を行った屈折計を使用し、ADVIA120/2120のレーザーと同じ波長で温度を考慮して測定して決められている。

分葉指数 (Lob.Index)

$$\text{VALLEY} = \frac{d}{D}$$

< 0.15 の時に、MNとPMNの群は分けられず (LEFT SHIFT) 左方移動傾向の警告をします

$$\text{LOBULARITY INDEX} = \frac{A}{B}$$

LIの計算により、左方移動傾向のレベルを決めます

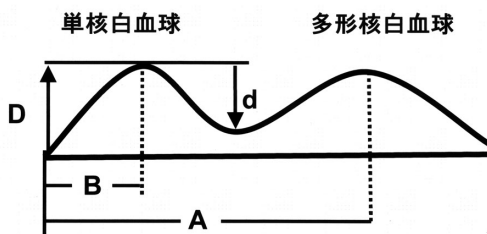


図6 分葉指数 (Lob. Index)

はじめにしなければならないのは、RBC/PLT/RETICゲイン調整と呼ばれる作業で、RBCx、RBCy、ReticZ、PLTx、PLTyのゲイン値を決定する。次に、同じレーザーを用いて分析するBasoチャンネルのゲイン調整は、採血後8時間以内の健常者の血液を用いて、裸核細胞の出現位置であるMNx、MNYで決定する。

ハロゲン光を用いるPeroXチャンネルでは、セットポイントというキャリブレーター内にある好中球集団の座標X軸とY軸の中心であるNEUTx、NEUTyが基準値になるようにゲイン値を調整する。

これらは、光ディテクターで検知したシグナルを基準値に対してどのぐらい増幅させるかを決める作業で、各サブボリュームが適正位置にプロットされるようになった訳であるがこれは単にサイトグラムを作るための物理的校正作業にすぎなく、このステップによって正確性を保証された訳ではない。

V. 白血球分類の正確さの保証

白血球分類の正確さを保証するにはやはり白血球分類の基準分析法であるCLSI (臨床検査標準協会 Clinical and Laboratory Standards Institute) が提唱するH-20Aドキュメント⁵⁾に従うことが基本である。具体的には、ウェッジ法によって作製した血液塗抹標本を2名のベテラン技師が200カウントし、その平均値を真値とするもので、健常者の検体を用いて光学的自動白血球分類法との一致率を求めデータの正確性を確認する。これが自動白血球分類法の正確性を保証する方法であるが、これは光学的白血球分類法に限定された手順ではなく、全てのFCM法による白血球分類法に共通するものである。

異常な細胞を含む検体の場合は、形態異常を警告するモフォロジーフラグであるIG (幼若顆粒球出現傾向) やBlasts (芽球出現傾向) などで分析装置では不可能な細胞の存在を警告する。

一方、健常者の検体で一致率が低い場合には、装置の異常を含め基本的な測定系のチェックや充分なメンテナンスを行なう必要がある。一致率の許容であるが、目視法分類を含め各施設の検査室で値を決めることを原則とし、一致率の低下が見られる場合にはメンテナンスを含め装

置の測定系のチェックを行なう必要がある。

例え、正確性が保証されていても、測定値に再現性が認められないような場合は、結果としてデータの信頼性が低下する。データ保証をするためには正確性だけでなく、精密性が維持されていることが大切であり、その意味では測定値のバラツキを少なくすること自体が装置の信頼性ということが出来る。

VI. まとめ

光学的分析という視点から生化学分析のエンドポイント法を例に挙げ説明して見たい。既知の濃度の基準物質と検体とを目的の化学反応を行い、その呈色反応液の吸光度を求め、基準物質と検体との吸光度の比率から検体中に含まれる測定対象物の濃度を算定する。この条件下でバラツキが生ずる要因には、光源量の変化、受光部の感度の変化、セルのよごれなどが考えられる。光源量の変化やセルの汚れについては考えられることとして納得頂けると思うが、受光部の感度の変化についてはピンとこないのではないだろうか？

一般的に測定装置の周囲温度 (室温) が増加すると、光学系の受光部の抵抗値が増し電圧の上昇が認められる。この変化は僅かではあるが、吸光度変化から測定を行なう比色定量にとっては間違いなくバラツキの原因となる。従って、一般的に室温の変化によって影響を受ける生化学や免疫反応を行なう装置は温度管理された部屋に設置することが要求される。この室温の変化に伴う測定値の変動は生化学や免疫測定法に限ったことではなく、光学的検知法を用いた血球計数装置でも同じことが言える。白血球分類のように比率を求める検査項目では影響を受けにくい傾向があるとは言え、光学的原理に基づいて血球の分析を行なっている装置は運用する部屋の温度管理が必須であることは間違いない。いづれにしても、光学的自動白血球分類のデータ保証は目視分類との一致率によって判断して頂くことになるが、その低下の原因となるものに、光学系の変動も考慮する必要がある。

文献

- 1) 池本敏行 他: 自動血球計数機の測定原理と留意

生 物 試 料 分 析

- 点. 検査と技術, 35: 523-534, 2007
- 2) Siemens: ADVIA2120i Operator's Guide
 - 3) 池本敏行 他: バイエルメディカルADVIA120. 日本検査血液学会誌, 6: 142-150, 2005
 - 4) 巽 典之他: 自動血球計数の基礎知識. P87-P92, 厚生社, 大阪, (1991)
 - 5) NCCLS: Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods. Approved standard. NCCLS document H20-A, Vol. 12, No. 1, (1992)