

〈原著〉

## フローサイトメトリーによる免疫学的血小板計測法を 応用した血小板と破碎赤血球の同時測定を試み

近藤 弘<sup>1,2)</sup>、寺社下 悠木<sup>1)</sup>、天野 陽子<sup>2)</sup>、永井 豊<sup>2)</sup>

### A study on simultaneous measurement method for both platelets and fragmented red cells using flow-cytometric immunoplatelet count

Hiroshi Kondo<sup>1,2)</sup>, Yuki Jisyage<sup>1)</sup>, Yoko Amano<sup>2)</sup> and Yutaka Nagai<sup>2)</sup>

**Summary** Simultaneous measurement of both platelets and fragmented red cells (FRCs) using the flow-cytometric immunoplatelet (CD41/CD61) count was attempted. FRCs were prepared artificially by heating. The ICSH/ISLH immunoplatelet count obtained by flow cytometry was extended to count FRCs, and the finding was compared to that obtained with the visual microscope-dependent method using the Miller ocular disk. A new region was established to enumerate the FRCs on the scattergram for immunoplatelet counting by flow cytometry. A favorable correlation and regression were obtained between FRC% by flow-cytometric immunoplatelet counting and that by counting on microscopic observation. Simultaneous measurement of both platelets and FRCs was possible up to a 3.8% FRC concentration.

**Key words:** Platelet, Fragmented red cell, Flow cytometry, Miller ocular disc

#### I. 緒言

血栓性微小血管障害症 (thrombotic microangiopathy: TMA) のような破碎赤血球 (fragmented red cell: FRC) 出現と血小板減少を認める疾患において、血小板数を正確に把握することは、血小板輸血などの治療方針を決定するうえできわめて重要である。現在、日常検査では血小板算定に自動血球分析装置が広く使用さ

れているが、FRC、白血球断片などの非血小板粒子の出現検体では、血小板と非血小板粒子の切り分けが困難なため、血小板算定結果に異常メッセージが表示されるものの、精確な血小板算定は難しい<sup>1,2)</sup>。このような場合、計算板を用いる視算法または血小板膜表面抗原に対するモノクローナル抗体 (CD41抗体、CD61抗体) を用いる免疫学的血小板算定法 (以下、FCM法) などが使用される。国際血液学標準化協議会

<sup>1)</sup>大東文化大学大学院 スポーツ・健康科学研究科

<sup>2)</sup>大東文化大学 健康科学科

<sup>1,2)</sup>〒355-8501 埼玉県東松山市岩殿560

受領日 平成25年10月16日

受理日 平成25年10月17日

<sup>1)</sup>Graduate School of Sports and Health Science, Daito Bunka University,

<sup>2)</sup>Department of Health Science, Daito Bunka University

<sup>1,2)</sup>560, Iwadono, Higashimatsuyama, Saitama, 355-8501, Japan

(International Council for Standardization in Hematology: ICSH) はこれらの血小板算定法を自動血球分析装置のための国際基準分析法として規定している<sup>3)</sup>。

そこで、本研究ではFCM法を応用した簡便な血小板とFRCの同時測定法を考案し、FRCの添加実験を行った。加温処理により作製した含FRC赤血球浮遊液を抗凝固全血液に添加し、FCM法、視算法、自動血球分析装置法で測定することにより、血小板とFRCの同時測定法の有用性を検討した。

## II. 材料と方法

大東文化大学スポーツ・健康科学部健康科学科の学内実習で採血し、実習に使用した後の残余血液を試料として用いた。採血には22G針付き5mL用シリンジ(テルモ社、東京)および抗凝固剤EDTA-2K(di-potassium ethylenediaminetetraacetic acid)入りの真空採血管(バクトンディッキンソン社、米国)を使用した。採血後の血液は、抗凝固剤を添加後に10回以上穏やかに転倒混和して抗凝固した。試料は採血後室温に静置し、使用前に再度同様に転倒混和して、採血後5時間以内に使用した。

### 1. 測定法

#### 1) 単カラー免疫学的血小板算定法(FCM法)

国際基準分析法<sup>3)</sup>に準拠した。抗凝固血液5 $\mu$ LにFITC(fluorescent isothiocyanate)標識CD41(抗GP II b)抗体およびCD61(抗GP III a)抗体(DAKO社、東京)を各5 $\mu$ Lおよび0.1%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin: BSA)を加えたリン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline: PBS)85 $\mu$ Lを添加して混和後、暗所、室温で15分間反応させた。次に0.1%BSA加PBSを900 $\mu$ L加え、混和して反応液とした。この反応液200 $\mu$ Lに0.1%BSA加PBSを800 $\mu$ L、または1300 $\mu$ Lを加えて、フローサイトメーターFACS Calibur(バクトンディッキンソン社、米国)を用いて測定した。得られたスキャットグラム(Fig. 1)から血小板数(R2+R3)と赤血球数(R1+R3)の比率を求め、これに、自動血球分析装置ADVIAで測定した赤血球数を乗じて、血小板数を算出した。

#### 2) ミラーディスク法<sup>4)</sup>

抗凝固血液を用いて血液薄層塗抹標本を作製後、パッペンハイム染色し、これを接眼レンズ内にミラーディスク(エルマ社、東京)を装着した生物顕微鏡BX41(オリンパス社、東京)を用いて総合倍率1,000倍で観察し、血小板数およびFRC数と赤血球数の比率を計測した。別にADVIAで測定した赤血球数を用いて、計算により間接的に血小板およびFRCの絶対数を算出した。微小球状赤血球、三日月型、三角形、角型、不規則変形型、ヘルメット型赤血球をFRCとした<sup>5)</sup>。

ミラーディスク小区画内の赤血球数2000個以上を算定する間に、大区画内に出現した血小板数およびFRC数を算定した<sup>6)</sup>。鏡検で得られた血小板およびFRCの比率とADVIAで測定した赤血球数を用いて、計算により血小板数およびFRC比率を算出した。算出は、血小板またはFRC(%) = 計数したPltまたはFRC数  $\times$  100 / 計数した赤血球数  $\times$  9、血小板絶対数( $\times 10^9/L$ ) = Plt(%)  $\times$  ADVIAで測定した赤血球数( $\times 10^9/L$ )  $\times$  100/100の計算式で行った。

#### 3) 自動血球分析装置による血球算定

全自動血球分析装置ADVIAを使用した。ADVIA使用時は、検体の測定前に精度管理用の

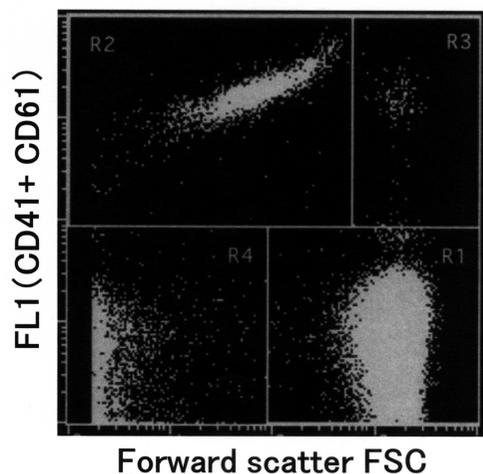


Fig. 1 Scattergram of immunoplatelet count. RBC (R1), PLT (R2), coincident passages of RBCs and PLT (R3), noise (R4)

管理血球テストポイントヘマトロジーコントロールNormal（シーメンス社、ドイツ）を測定して、全血球の測定値が表示許容範囲内であることを確認した。

2. 検討内容

1) FCM法の基礎的検討

国際基準分析法の一つであるFCM法について、健常ボランティア血液（n=40）を用いて、検体を抗体染色した後の最終希釈倍率を500～3,000倍まで変化させ、赤血球と血小板の同時通過およびデブリス値に及ぼす影響を検討し、最終希釈倍率を決定した。同時再現性（n=10）を検討した。

2) FRC添加試料の作製

加温処理<sup>2)</sup>によるFRCの作製条件を決定した。EDTA加全血液を遠心して血漿を除去後、PBSを加えて遠心する操作を3回行い、洗浄赤血球浮遊液を作製した。この赤血球数が $4.00 \sim 5.00 \times 10^{12}/L$ になるようにPBSで調整し、恒温槽で51℃、40秒から240秒まで20秒おきに加温後、この含FRC赤血球浮遊液1容とEDTA加全血液9容を混合してFRC添加試料とした。

FRCの添加実験では、同一検体の全血液9容に対して、試料①は未加温洗浄赤血球浮遊液1容、試料②は加温洗浄赤血球浮遊液と未加温洗浄赤血球浮遊液の等量混合試料1容、試料③は加温洗浄赤血球浮遊液1容をそれぞれ添加した。これらの試料中のFRC数は、FCM法とは別に、

それぞれ血液塗抹染色標本を作製し、ミラーディスクを用いて鏡検分析して得たFRC比率に同一検体のADVIAで測定した赤血球数を乗じて求めた。

3) 血小板とFRCの同時測定の検討

FCM法のスキャッタグラム上で領域を設定することにより、血小板算定用のスキャッタグラム上で、血小板算定時にFRCの同時測定が可能かどうかを検討した。FRC領域は、FSC-FL1（CD41・CD61）のスキャッタグラム上でFL1（-）かつR1領域（赤血球集団）よりも小容積側に設定した。FRC領域の位置と面積は、ミラーディスク法で定量した試料①のFRC比率に基づいて設定した。そして、FCM法、ミラーディスク法、自動血球分析法で測定した試料①～③のFRC値を比較検討した。

3. 統計学的解析

統計学的検定には、統計解析ソフトMedCalc Version 12.3（MedCalc software社、ベルギー）を用いた。

4. 倫理的配慮

本研究は、大東文化大学スポーツ・健康科学部の研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。また、対象学生には、残余血液の使用に関して、文書ならびに口頭による説明を行い、承諾を得た者から書面による同意を得た。

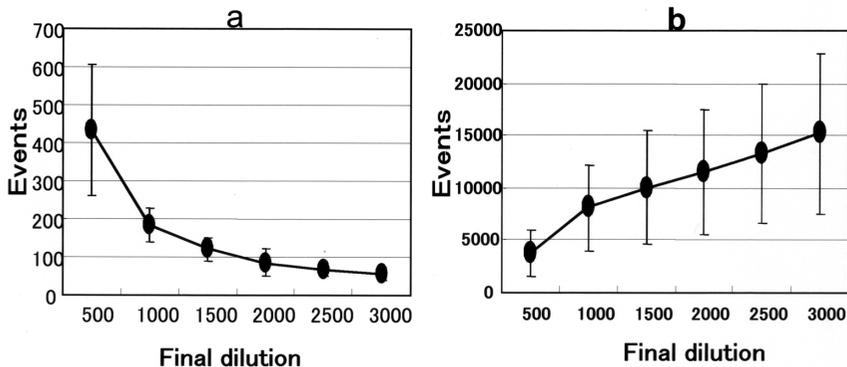


Fig. 2 Relationship between final dilution and coincident passages or debris counts. Coincidence pass(a) and debris counts(b)

### Ⅲ. 結果

#### 1) FCM法の基礎的検討

デブリス値および赤血球と血小板の同時通過に及ぼす影響のイベント数はFig. 2-a, bに示すとおりである。希釈倍率が高いほど同時通過する血球の減少がみられたが (Fig. 2-a)、デブリス値は増加傾向を示した (Fig. 2-b)。そこで同時通過およびデブリス値が低値傾向を示した1,500倍を最終希釈倍率とした。

FCM法による血小板算定における同時再現性はCV値1.9% (n=10)であった。

#### 2) FRC添加試料の作製

添加用FRCは、51℃で220秒間加温したときに、収率よく作製することができた。

#### 3) 血小板とFRCの同時測定の見直し

試料①～③をFCM法で測定したときのスクアッタグラムはFig. 3に示すとおりである。スクアッタグラム上のFRC領域は、加温洗浄赤血球浮遊液を添加していない試料①のスクアッタグラムを用いて、CD41・CD61 (－)で赤血球集団よりも小容積側に設定し、FRC比率がミラーディスク法のFRC測定値 (0.31%)と等しくなるように配置した。このFRC領域を用いて解析したところ、FRC比率はFRC添加量の増加とともに上昇し、ミラーディスク法とFCM法のFRC比率の変化は同傾向を示した (Fig. 4)。

FRC添加試料①～③の血小板数を改良FCM法、ミラーディスク法、およびADVIAで測定した結果はFig. 5に示すとおりである。ADVIAではFRC比率の高値試料ほど血小板数は高値傾向を示したが、FRC法、ミラーディスク法では、検討し

たFRC比率3.8%まではFRC添加による影響を認めなかった。

### Ⅳ. 考察

FCMによる血小板数および破碎赤血球数同時測定の見直しについて検討した。検討する際に、はじめに国際基準分析法の1つであるFCM法の基礎的検討を行い、次にFRCの作製条件を決定した後、FRC添加試料を調製し、血小板数と破碎赤血球数同時測定を試みた。

現在、国際的に規定されている血小板算定のためのFCM法<sup>3)</sup>では、血小板と抗体を反応させた後にフローサイトメーターで測定するための試料の最終検体希釈倍率を1,000倍と記載しているが、今回検討したところ、同時通過およびデブリスの影響を少なくするためには、最終検体希釈倍率は1,500倍が適切であったことから、以後の検討では最終希釈倍率を1,500倍とした。最終希釈倍率は測定機種の特性などの測定条件によって変動することが予想され、実施に際しては各施設で検討しておく必要がある。

末梢血液中のFRC算定はTMAの診断に有用なため、計測法の標準化が進められている<sup>5)</sup>。TMA症例では細血管障害性溶血性貧血、破壊性血小板減少、細血管内血小板血栓を認め、FRC、血小板減少、臓器障害がみられるため、精確な低値血小板算定とFRC計測が求められる。ICSHワーキンググループ<sup>5)</sup>は、TMAの診断的価値が高いFRC形態をschistocytesと規定した。Schistocytesには、小型で、ヘルメット状、小型三角形、三日月形、先のとがった突起をもつ、

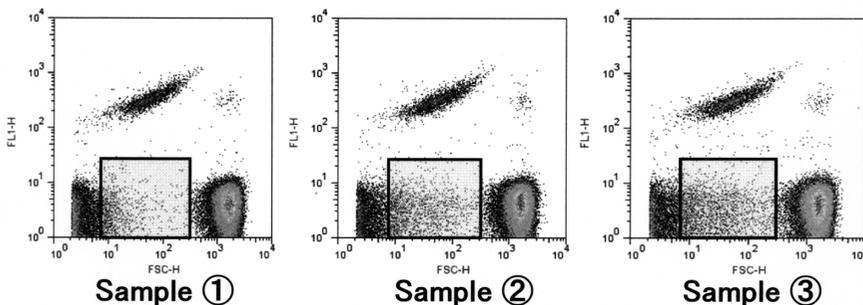


Fig. 3 Scattergram of fragmented red cell count.

または微小球状の赤血球が該当し、特に微小球状赤血球については、他のschistocyte形態赤血球の出現する場合にschistocytesに含めるとした。

加温処理による赤血球生成は、TMAでの生体内におけるFRCの生成メカニズムとは異なるため、微小球状赤血球の出現が優位であったが、それ以外のschistocyte様各種形態の赤血球も出現した。そこで本研究では、微小球状赤血球とschistocyte 様形態の赤血球をあわせてFRCとした。

各種血小板算定法に及ぼすFRCの影響を検討するために、同一ボランティアの抗凝固血液に加温洗浄赤血球浮遊液を0%、50%、100%の割合で添加したところ、FRC添加量の増加に伴っ

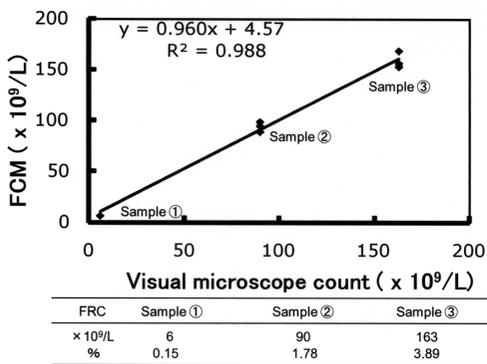


Fig. 4 Fragmented red cell count.

て、ADVIAの血小板数は見かけ上増加傾向を示した (Fig. 5)。ADVIAは光散乱方式であり、血球容積だけでなく、血球内タンパク量も同時に検出しているため、血小板とFRCの弁別がある程度可能であるとされているが、FRCの影響を完全には回避できないことが示唆された。一方、ミラーディスク法は、血液塗抹標本を形態観察して血小板とFRCの比率を求めて算定することが可能なため、FRCの影響を受けなかった。

次に、FCM法で血小板とFRCの同時測定が可能であるかを検討した。加温洗浄赤血球浮遊液を添加していない試料!を用いて、改良FCM法のスキャッタグラム上にCD41・CD61 (-) のFRC領域を設定し、ミラーディスク法で計測した試料①のFRC比率をもとにスキャッタグラム上のFRC領域の位置と面積を決定した後、試料②、③のFRC比率を解析した。設定したFRC領域内のFRCイベント数は、FRC添加量の増加に伴って増え、ミラーディスク法の比率とFCM法のFRC比率が近似していたことから、スキャッタグラム上でのFRC計測が可能なが推察された (Fig. 4)。

これらのことから、モノクローナル抗体を用いたFCMによる血小板測定法を用いた血小板とFRCの同時測定が可能なが示唆された。今後は赤血球膜表面に対する抗体を組み合わせ、FRCに対する特異性を高めることにより、日常診療に有用な血小板数とFRCの同時測定法、さらには自動血球分析装置の値付けのためのFRC

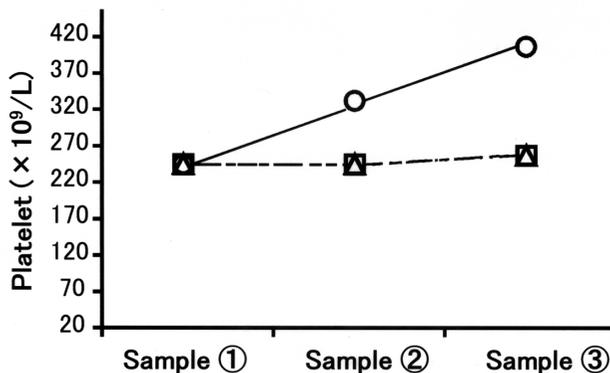


Fig. 5 Effect of fragmented red cell.

- Automated hematology analyzer
- Immunoplatelet counting by flow cytometry
- △-.-△ Visual microscope-dependent method using Miller ocular disk

測定参照法の開発を目指してさらに研究を進める必要がある。

## V. 結語

FCM法による免疫学的血小板算定とFRCの同時測定が可能なが示唆された。また、FRCの精確な視算のためにミラーディスクを用いる意義は大きい。

本研究の一部は平成24年度大東文化大学特別研究費の助成により実施した。

## 文献

- 1) 齊藤 翠, 秋山 秀彦, 伊藤 裕子, 椎野 由裕, 徳永 恵津子, 勝田 逸郎, 江崎 幸治, 大島 久二: 血小板測定法に及ぼす破碎赤血球の影響について. 医学検査, 53: 254-258, 2004.
- 2) 近藤 崇, 辻 直樹, 工藤 茜, 竹森 聡美, 山内 春香, 古谷 桃子, 金子 礼子, 遠藤 明美, 佐藤 剛敏, 浅沼 康一, 佐藤 和昭, 小林 大介, 渡辺 直樹: 多項目
- 3) International Council for Standardization in Haematology Expert panel on cytometry and international Society of Laboratory Haematology task force on platelet counting; Platelet counting by the RBC/platelet ratio method: Am J Clin Pathol, 460-464, 2001.
- 4) 土江 文乃, 近藤 弘, 間島 あゆみ, 寺社下 悠木, 佐藤 陽子, 永井 豊: ミラーディスクを用いた血小板算定のための間接測定法の検討. 第47回関東甲信地区医学検査学会抄録集, pp200, 2010.
- 5) G. Zini, G. D'Onofrio, C. Briggs, W. Erber, J. M. Jou, S. H. Lee, S. Mcfadden, J. L. Vives-Corrans, N. Yutaka, J. F. Lesesve: ICSH recommendations for identification and quantification of schistocytes. Int Jnl Lab Hem, 34: 107-116, 2012.
- 6) NCCLS and ICSH: Methods for reticulocyte counting (automated blood cell counters, flow cytometry, and supravital dyes); approved guideline-second edition; NCCLS document H44-A2, 2004.