

犬及び猫の血液を用いた動物用自動血球計数装置

Microsemi LC-662 の評価

根尾櫻子[†] 久末正晴 土屋 亮

麻布大学獣医学部 (〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71)

(2017年10月8日受付・2017年10月17日受理)

要 約

インピーダンス法を用いた臨床現場即時検査 (POCT) 対応の自動血球計数装置は特に猫の血小板数 (PLT) を正確に測定することが困難である。動物用自動血球計数装置 Microsemi LC-662 (LC) は測定原理にインピーダンス法を用いた POCT 対応機器である。本研究では基準機には Sysmex XT-2000iV (XT) を用いて、さらに LC と同じ測定原理を用いた POCT 対応機器である Celltac α (C α) を比較対象として、LC の精度評価を行った。また、採血直後の測定ができない場合も考慮して血液保存による測定値への影響についても検討した。検討用血液は、相関性の確認には健康犬 9 頭及び猫 5 頭と、無作為に選出した疾患犬 90 頭及び猫 62 頭、血液保存による測定値への影響の検討には健康犬 9 頭及び猫 5 頭から得たものを用いた。血小板数 (PLT) の相関は、犬では LC/XT と C α /XT で同程度に高かった。一方、猫においては C α /XT は中等度の相関に止まったのに対し、LC/XT では高度の相関が認められた。保存による影響については、温度と時間経過の両面から検討した。その結果、4℃で長時間保存すると、犬、猫共に PLT が顕著に減少し、白血球数は増加した。——キーワード：自動血球計数装置、CBC、血液保存効果。

-----日獣会誌 70, 795~799 (2017)

臨床現場即時検査 (point-of-care testing : POCT) 対応機器は、大型検査機関ではなく、おもに一般の診療現場で用いられる簡易型の装置である。POCT 対応機器による測定値の信頼性を評価するためには、すでに高度の測定信頼性が確認されている機器との相関性の検討が有効である。

獣医領域に普及している POCT 対応自動血球計数装置の測定原理には、一般的に細胞のサイズをもとに血球を分類するインピーダンス法が用いられている。インピーダンス法では、各細胞の粒度分布の谷間が閾値となり細胞分類が行われる。しかし、たとえば猫の血小板と赤血球のように細胞サイズの重なりが大きく、粒度分布の谷間を認めにくい傾向にある場合、各細胞を正確に判別することが困難であり、その影響は赤血球より数の少ない血小板の測定値に強く表れる。一方、大型検査機関ではフローサイトメトリー法を基本原理として、細胞サイズのみならず細胞内顆粒や核密度を指標に細胞分類を行う高性能の装置が用いられることが多く、血小板測定

においても高度の信頼性が確認されている。そのため、これらは POCT 対応機器の精度を評価する際に基準機としても利用されている [1-3]。たとえば Sysmex XT-2000iV (XT) (シスメックス株, 兵庫) は、高性能の動物用自動血球計数装置であり、POCT 対応機器である Celltac α (C α) (日本光電工業株, 東京) との相関評価に利用された報告がある [2]。XT の測定原理にはインピーダンス法とフローサイトメトリー法が用いられている。血小板数 (PLT) はインピーダンス法で測定する PLT-I とポリメチン系色素で細胞内の核酸を染色し、フローサイトメトリー法によって検出する PLT-O の 2 種のデータが提示される。犬では PLT-I と PLT-O の相関は高く、いずれの原理でもほぼ同じ結果が得られる。一方、猫においては前述の理由により PLT-I の正確度は高くないが、PLT-O は赤血球と血小板の細胞サイズの重なりの影響を受けないためにマニュアル法による測定値との相関も高く、PLT 測定において信頼性が高い [4]。

[†] 連絡責任者：根尾櫻子 (麻布大学獣医学部小動物内科学研究室)

〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71

☎042-754-7111 FAX 042-769-1636

E-mail : neo@azabu-u.ac.jp

表 CBC 測定値の自動血球計数装置間の相関

項目	比較	r		回帰式	
		犬	猫	犬	猫
WBC ($\times 10^3/\mu l$)	LC/XT	0.992***	0.911***	$y=1.02x-0.70$	$y=0.93x+0.16$
	C α /XT	0.992***	0.976***	$y=0.97x-0.28$	$y=0.88x+0.42$
RBC ($\times 10^6/\mu l$)	LC/XT	0.993***	0.987***	$y=0.96x+0.24$	$y=1.02x-0.34$
	C α /XT	0.995***	0.994***	$y=0.96x+0.29$	$y=1.01x-0.09$
HGB (g/dl)	LC/XT	0.988***	0.995***	$y=0.88x+1.22$	$y=0.92x+0.37$
	C α /XT	0.993***	0.994***	$y=1.00x+0.37$	$y=1.04x+0.01$
HCT (%)	LC/XT	0.979***	0.950***	$y=1.07x-2.38$	$y=0.97x+1.50$
	C α /XT	0.982***	0.971***	$y=1.07x-1.43$	$y=1.01x+0.88$
MCV (fl)	LC/XT	0.929***	0.927***	$y=0.62x+25.81$	$y=0.75x+11.8$
	C α /XT	0.820***	0.929***	$y=0.62x+26.53$	$y=0.75x+12.32$
PLT ($\times 10^3/\mu l$)	LC/XT	0.970***	0.832***	$y=0.99x-36.17$	$y=0.68x-40.75$
	C α /XT	0.975***	0.585***	$y=1.20x-17.88$	$y=0.97x+13.27$

***: $P < 0.001$ LC: LC-662 XT: XT-2000iV C α : Celltac α

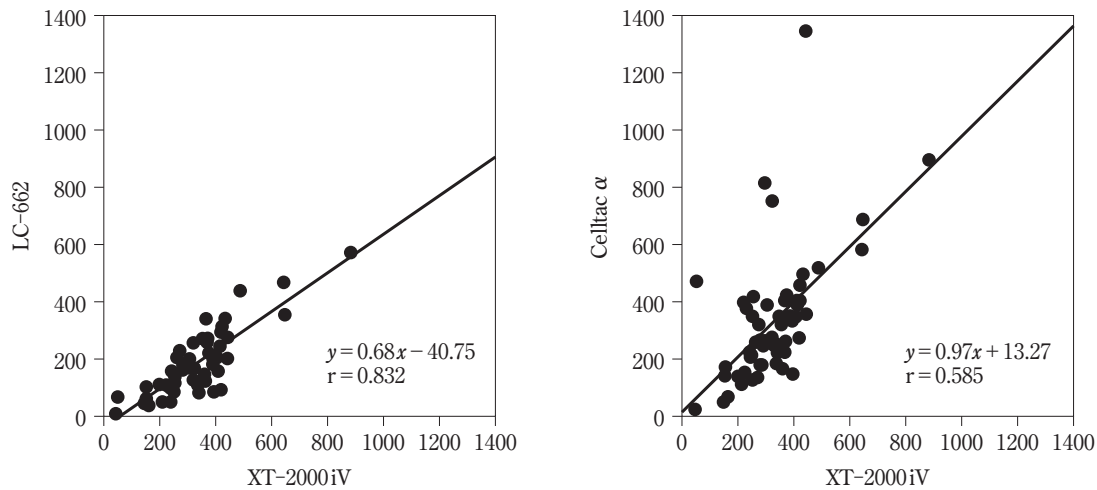


図1 猫の PLT における自動血球計数装置間の相関 (PLT $\times 10^3/\mu l$)

本研究では、インピーダンス法を用いた POCT 対応機器として開発され、動物診療施設に普及しつつある Microsemi LC-662 (LC) (株堀場製作所, 京都) について、犬と猫における測定信頼性について検討した。LC の測定項目は、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン濃度 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、PLT、リンパ球数 (LYM)、単球数 (MONO)、顆粒球数 (GRAN)、好酸球数 (EOS) であり、これらの測定値から赤血球恒数などが演算される。

LC による測定成績の信頼性は XT のデータを基準とし、LC と同様にインピーダンス法を用いた POCT 対応機器である C α のデータと比較評価した。

また、一般の動物診療施設では、採血直後に CBC 測定を行えない場合が少なくないことを想定して、LC を用いてサンプルの保存温度と時間による測定値への影響を検討した。

材料及び方法

装置間の相関性評価: 検体には、麻布大学小動物飼育施設または附置生物科学総合研究所内で飼育されている健康な実験用犬 9 頭、猫 5 頭及び附属動物病院に診察のために来院した症例から無作為に抽出した犬 90 頭、猫 62 頭の静脈血を用いた。採取した血液は、抗凝固剤 EDTA-2K を入れた 1 ml 採血管 (ニプロ株, 大阪) に規定量の 1 ml ずつ分注した。なお、XT の PLT に関しては、PLT-O の成績を検討に用いた。赤血球恒数の中で、平均赤血球ヘモグロビン量及び平均赤血球ヘモグロビン濃度は、個体間のバラツキが小さく有意な相関を得にくいために [4]、評価対象から除外した。

保存温度と時間経過による影響: 上記と同じ健康犬 9 頭及び健康猫 5 頭の血液を用いた。各個体の血液は EDTA-2K にて抗凝固処理した 0.5 ml 採血管 (ニプロ株,

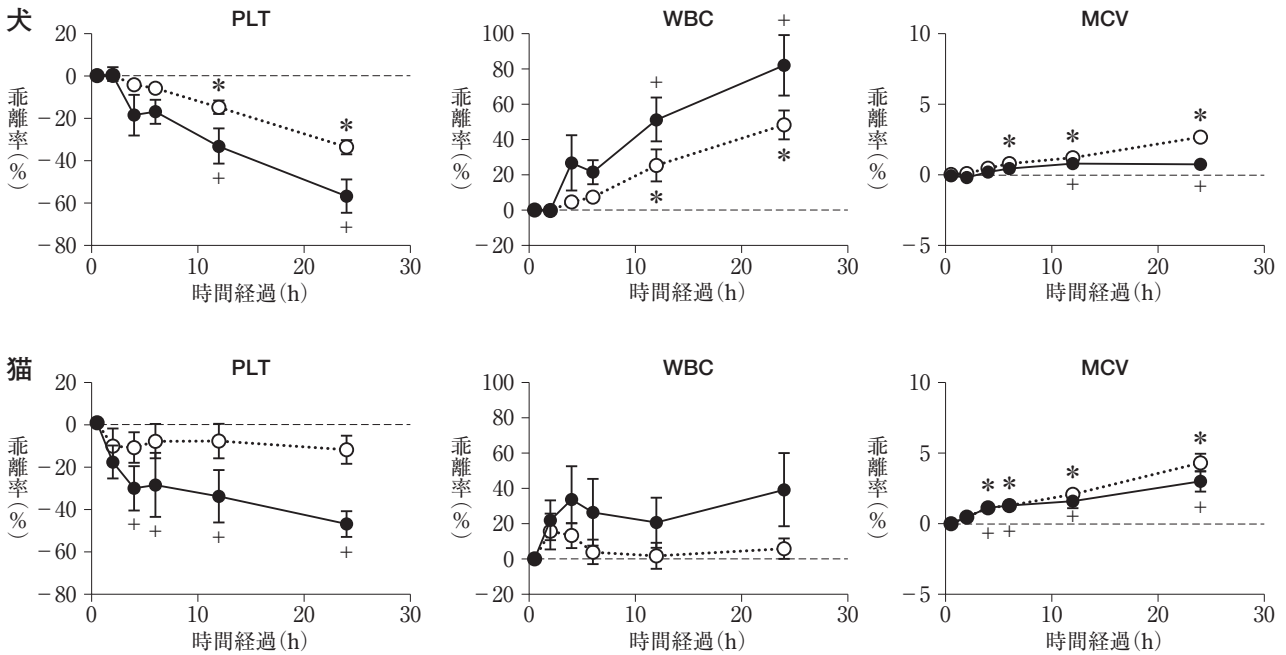


図2 採血0.5時間後から24時間後までの時間経過と温度の影響

Dunnett法を用いて採血30分後の値を基準(100%)として各測定時間における乖離率(%)を比較し、有意差があった場合、室温(○)では(*), 4℃(●)では(+)で表示した(P<0.05)。

大阪) 2本に規定量を分注し、室温並びに4℃で各1本を保存した。これらについて30分、2、4、6、12、24時間後にLCで各項目を測定し、WBC、RBC、HGB、HCT、平均赤血球容積(MCV)、PLTに関して経時的変動を評価した。サンプル保存による測定値の経時的変動は、保存開始30分後の値を基準に、乖離率(増減の百分比)で示した(図2)。

統計処理: WBC、RBC、HGB、HCT、MCV、PLTに関して、各装置間(LC/XT並びにCa/XT)で、相関分析と回帰分析を行った。保存温度と時間経過による影響に関する評価においては、Dunnett法を用いて保存開始30分後を基準としてその後の変化を多重比較し、P<0.05で有意差ありとした。

成績

装置間の相関性: 装置間測定値の相関計数(r)と回帰直線を表に示した。LCの値は、犬、猫共に、全測定項目(WBC、RBC、HGB、HCT、MCV、PLT)においてXTの値と高い相関が認められた。猫のPLTに関しては、LCの値はCaの値よりもXTの値との相関が明らかに高かったが、低値となる傾向が認められた(表、図1)。

保存温度と時間経過による影響: 各時間群のデータと保存開始30分後の値との乖離率を図2に示した。

PLTは、犬、猫共に経時変化が著しかった。犬では室温、4℃保存共に12時間後から有意に減少し始め、室温保存では24時間後に34%、4℃保存では57%の減少を

示した。猫においては4℃で保存した場合のPLTに早期から顕著な影響が認められ、4時間後には減少し始め、24時間後には47%減少した。一方、室温保存では有意な影響はみられなかった。

WBCは、犬では室温、4℃保存共に12時間後から増加し始め、室温保存では24時間後に48%、4℃保存では81%増加した。一方、猫においては、経時的に増加傾向が認められたものの、有意な変化ではなかった。

赤血球系項目では犬、猫共にMCVに軽度に影響が認められたが、その他の項目は影響を受けなかった。犬ではMCVは室温保存では6時間後から増加し始め、24時間後に室温保存では2.7%、4℃保存では0.8%増加した。猫では室温、4℃保存共に4時間後から増加し始め、24時間後に室温保存で4.3%、4℃保存で3.0%増加した。

考察

LCの測定値は、犬、猫共にWBC、RBC、HGB、HCT、MCV、PLTに関して、XTと高い相関を認め、Caとほぼ同等ないしそれ以上の信頼性を得られることが分かった。

猫のPLTにおいては、LCはCaよりもXTと高い相関性を認めた。検体によっては、PLTはCaで得られた値がLCの2倍になるものもあった。血小板と赤血球の閾値は、LC、Ca共に検体ごとに自動的に検出する機能が備わっている。しかし、血小板と赤血球の粒度分布が大きく重なる場合、LCは、各細胞の分布曲線の傾きが極小となる点を閾値とするのに対し、Caはある固定値

に閾値が設定されている。C α とXTの値が乖離した場合にC α の固定閾値を確認すると、比較的小型な赤血球が血小板領域に多数入り込み、PLTが顕著な偽高値を示していることが分かる(データ示さず)。猫のPLTにおけるLC/XTとC α /XTにおける相関の違いは、この閾値設定方法の相違に原因すると思われた。一方、LCによる猫PLTは、基準機XTよりも低値を示す傾向にあった。XTのPLT-Oは、インピーダンス法による場合と異なり、大型血小板も正確に赤血球と識別される[4]。すなわち、LCとXTとのPLT測定値の差は、LCが大型血小板を検出しないためと考えられた。

白血球分類に関しても検討したが、犬、猫共にLC/XT及びLC/C α で同様に相関が低い傾向がみられ(データ示さず)、現在の性能では塗抹標本での評価を併用する必要はある[5]。

保存による影響は犬、猫共にPLTに顕著に表れた。PLTは時間の経過に従って減少し、その変化は室温より4℃で大きかった。このような現象はかねてから知られ、その理由として血小板の膨化や凝集が関連していると考えられている[1, 6, 7]。実際に塗抹標本上では、4℃の方が大型の凝集塊を形成し、また、それは時間経過に伴い、さらに大型化する傾向にあった。

WBCは、犬・猫共に、PLTの変化とは逆に時間経過とともに増加する傾向がみられ、4℃でより大きな増加を示した。このことから、白血球増加は、凝集した血小板が白血球と誤認して計測されている可能性が推測された。

以上のことから、血液は室温に保存し、できる限り速やかに測定を行うことが推奨される。

今回の研究で、LCは猫のPLTに関しても信頼性が高いPOCT対応機器であると考えられた。しかしながら、

LCによる猫のPLTは低値を示す傾向があるため、利用者は各機種の特徴を熟知した上で診断に利用する必要がある。

本論文執筆に当たりご助言をいただいた麻布大学名誉教授小川絵里博士に深謝する。

引用文献

- [1] Bauer NB, Nakagawa J, Dunker C, Failing K, Moritz A: Evaluation of the impedance analyzer Poch-100iV Diff for analysis of canine and feline blood, *Vet Clin Pathol*, 41, 194-206 (2012)
- [2] McDaniel BJ, Hirschberger J, Weber K: Validation of the Celltac alpha automated hematology analyzer for canine and feline blood samples, *Vet Clin Pathol*, 42, 11-18 (2013)
- [3] Riond B, Weissenbacher S, Hofmann-Lehmann R, Lutz H: Performance evaluation of the Sysmex pocH-100iV Diff hematology analyzer for analysis of canine, feline, equine, and bovine blood, *Vet Clin Pathol*, 40, 484-495 (2011)
- [4] Lilliehöök I, Tvedten H: Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts, *Vet Clin Pathol*, 38, 163-174 (2009)
- [5] Tvedten H, Haines C: Canine automated differential leukocyte count: Study using a hematology analyzer system, *Vet Clin Pathol*, 23, 90-96 (1994)
- [6] Bourges-Abella NH, Geffré A, Deshuillers PL, Braun JP, Trumel C: Changes in hematology measurements in healthy and diseased dog blood stored at room temperature for 24 and 48 hours using the XT-2000iV analyzer, *Vet Clin Pathol*, 43, 24-35 (2014)
- [7] Mathers RA, Evans GO, Bleby J: Platelet measurements in rat, dog and mouse blood samples using the Sysmex XT-2000iV, *Comp Clin Pathol*, 22, 815-821 (2013)

Evaluation of the Microsemi LC-662 Hematology Analyzer for Dog and Cat Blood Specimens

Sakurako NEO[†], Masaharu HISASUE and Ryo TSUCHIYA

*Laboratory of Small Animal Internal Medicine, School of Veterinary Medicine, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara, 252-5201, Japan

SUMMARY

Accurate platelet count measurement with point-of-care testing (POCT) using an automated impedance-based hematology analyzer is difficult, particularly in cats. Microsemi LC-662 (LC) is a new POCT automated impedance-based hematology analyzer for use in veterinary clinics. In this study, we compared the performance of POCT analyzers LC and Celltac α (C α) with Sysmex XT-2000iV (XT) in measuring hematological variables in dogs and cats. To cope with the delayed measurement of complete blood count (CBC), which can occur in clinics, we also determined the storage effects on hematological data collected using LC. Blood samples from healthy dogs and cats (nine dogs and five cats), as well as from dogs and cats that were brought to our hospital (90 dogs and 62 cats), were included in the study. To study the storage effects on hematological data, we used nine healthy dogs and five healthy cats. In dogs, platelet counts measured using LC and C α were highly correlated with those measured using XT. In cats, platelet counts measured using LC were highly correlated with those measured using XT; however, platelet counts measured using only C α were moderately correlated with those measured using XT. Both time and temperature effects on CBC data were assessed for stored blood. Prolonged storage and low temperature resulted in significantly decreased platelet counts and increased white blood cell counts in both dogs and cats. — Key words : automated hematology analyzer, CBC, storage effects.

[†] Correspondence to : Sakurako NEO (Laboratory of Small Animal Internal Medicine, School of Veterinary Medicine, Azabu University)

1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara, 252-5201, Japan

TEL 042-754-7111 FAX 042-769-1636 E-mail : neo@azabu-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 795 ~ 799 (2017)