

〈特集: 血液検査の精確さ検証の実際〉

国際的血球基準器としての コールターカウンター モデルZBIの機能

近藤 也寸紀、吉田 里恵、中村 元則

Validity of the Coulter Counter model ZBI as an international standard blood cell analyzer

Yasunori Kondo, Rie Yoshida and Motonori Nakamura

Summary The standard analytical method (reference method) for blood cells is provided by ICSH. However, since the reference methods are troublesome manual operations, the reference value of RBC and WBC counts are analyzed by a standard blood cell analyzer with fresh blood. There are some regulations for a standard analyzer that ICSH recommends, such as the mechanical regulations that require an analyzer to have a semi-automated single channel counter. The Coulter Counter model ZBI, which conforms to the regulations of the standard method, is a particle analyzer principally designed to analyze biological cells. It uses the Coulter Principle (an electrical resistance method) to analyze the counts and volume of cells 0.6-75 μ m in diameter, and indicates their distribution curves (histograms). The validity of the Coulter Counter model ZBI as an international standard blood cell analyzer is described in this report.

Key words: ICSH (International Council for Standardization in Hematology), Standard Blood Cell Analyzer, Semi-Automated Single Channel Counter, Coulter Counter model ZBI, Coulter Principle (Electric resistance method)

I. はじめに

1953年にW.H. CoulterとJ.R. Coulterが、粒子(細胞)の数と体積を計測する理論であるコールター原理を考案し、1956年に世界初の血球計数装置Coulter Counter model Aが開発された。それまで用手法で細胞算定を行っていた血球計数

は、半自動単項目の血球計数器の実用化によって正確性と効率性が飛躍的に向上した。その後、科学技術の発展とメーカーの技術革新によって血球計数装置はより進歩し、当初の単項目半自動型から多項目全自動型に移行し、現在は血球算定、白血球5分類、網赤血球算定、さらには有核赤血球まで自動計数が可能なヘマトロジー

ベックマン・コールター株式会社
〒135-0063 東京都江東区有明 2-5-7
TOC有明ウエストタワー

Beckman Coulter K.K., Hematology, Diagnostics
Marketing & Quality,
TOC Ariake West Tower, 2-5-7 Ariake, Koutou-ku,
Tokyo 135-0063, Japan

システムとなり、多機能・多項目血液分析装置として機能・精度(精密性)は申し分のないレベルまで到達している。

しかし、一方で血液分析データの品質を決定づけるのは血液分析装置が測定した測定結果の正確度であり、これはテクノロジーの進歩で解決できるものではない。つまり、臨床検査室の血液分析装置が定期的に校正され、それが参照値と目盛り合わせができていなければならない。

血球計数装置の校正はICSH (International Council for Standardization in Hematology) が定める基準分析法 (参照法)^{1),2)}で新設血を計測し、得られた参照値によって分析装置の校正を行う (表1参照)。しかし、基準参照法は煩雑な用手法であり、赤血球数・白血球数は基準分析装置で新鮮血を測定して得られた参照値により装置の校正が実施される^{2),3),4),5)}。ここで述べる基準分析装置とはICSHが推奨するいくつかの規定があり、構造的には半自動シングルチャンネルの装置である^{2),3),4),5)}。その仕様に適合した装置としてコールターカウンター モデルZBIがある (図1参照)。コールターカウンターモデルZBIは、主に生物学的細胞の測定を目的とした粒子アナライザーで、測定原理はコールター原理 (電気抵抗方式) を用いて細胞数およびその体積を計測し、個数分布や体積分布 (ヒストグラム) を表示する。その詳細は、Ⅲ. コールターカウンター モデルZBIの概要で述べる。

Ⅱ. 血球計数装置の校正とその現状

近年、臨床検査を含めて医療を取り巻く環境は大きく変化した。医療費抑制政策の中で、検査室における限られたリソースの中で、検査業務の効率性と正確性がより強く求められている。このような状況の中、2003年2月、ISO (国際標準化機構) から臨床検査室の品質マネジメントに関する国際規格として、ISO15189:2003「臨床検査室と適応能力に対する特定事項」が発行された。ISO15189は臨床検査の品質管理と信頼性の向上を目指したもので検査室マネジメントについての要求事項を定めている。技術的要求には「機器は必要な性能を達成することが可能であることが示され、目的の検査に関する仕様を満たさなければならない。検査室管理チームは機器の性能、試薬、分析システムが適正に校正され運用されていることを定期的にモニターし、立証するプログラムを作成しなければならない。」と記載されている^{6),7)}。今後、臨床検査室においてISO15189認定を目指すにはトレーサビリティの確保された分析装置を使用し、検査室を運営していく必要がある。自動血球計数装置の校正は弊社では疑似血球を性状とした校正用血球S-CALキャリブレーションプログラムにより実施している。しかし、毎年開催しているヘマトロジーシンポジウムでのアンケートの質問事項「校正物質には何を使用されていますか?」における集計結果から

表1 血液計数の基準参照法 (Study Book No. 3 自動血液検査品質保証論より抜粋)

項目	方法	基準参照法
RBC	Glass chamber法 シングルチャンネル電気抵抗法	ICSH. Reference method for the enumeration of erythrocytes and leukocytes. Clin Lab Hema. 16. 131-138. 1994.
WBC	Glass chamber法 シングルチャンネル電気抵抗法	ICSH. Reference method for the enumeration of erythrocytes and leukocytes. Clin Lab Hema. 16. 131-138. 1994.
Hb	HiCN法 (シアンメトヘモグロビン法)	ICSH. Recommendations for reference method for hemoglobinometry in human blood (ICSH Standard 1995), J Chin Pathol, 42. 271-274. 1996. NCCLS. Reference and selected procedures for the quantitative determination of hemoglobin on blood. H15-A3. 2000. 日本臨床病理学会標準委員会血液小委員会, 血液ヘモグロビン濃度基準分析法, 臨床病理. 48. 261-267. 2000
Hct	MicroHematocrit法 (遠心ヘマトクリット法)	ICSH. Recommendations for reference method for the packed cell volume (ICSH Standard 2001), Lab Hematol, 7. 148-170. 2001. NCCLS. Procedure for determining packed cell volume by the microhematocrit method. Approved standard-3rd edition. H7-A3. 2000.
Plt	Phase contrast法 RBC/Platelet Ratio法 (RBC/Plt比法)	ICSH. Recommended methods for the visual determination of white cell and platelet counts. WHO Lab. 1988: 88: 1. ICSH. Platelet counting by the RBC/Platelet Ratio method. a reference method. Am J Clin Pathol. 115. 460-464. 2001.

は、①専用校正用血球（キャリブレタ）を使用：43.4%、②コントロール血球を使用：16.5%、③分からない：17.8%、④その他・無解答：22.3%となっており、校正用血球とコントロール血球の違いを含め、血球分析装置の校正についての概念が十分に浸透していない状況である。

血球計数の校正は、基準分析装置で新鮮血を測定して参照値を求めて校正を行う必要があるが、基準分析装置の概要や参照値を得るまでの操作手順についてはあまり認識されていない。このような現状から上記のような状況が起きている可能性が考えられる。

Ⅲ. コールターカウンター モデルZBIの概要

コールターカウンター モデルZBIは、主に生物学的細胞の計測を目的とした粒子アナライザーである。測定原理はコールター理論（電気抵抗方式）により直径0.5～75 μ mの範囲の細胞の個数と体積を計測でき、個数分布*や体積分布（ヒストグラム：Coulter Chanalyzer model C-1000接続時/図2参照）*も求めることが可能である^{8),9)}。また、上下限スレッシュホルドダイヤルにより粒子径測定範囲を精密に設定でき、粒子径測定範囲に合わせて各種口径のアパチャーチューブを選択できる。装置は図3¹⁰⁾のダイアグラムの通り、アパチャースタンド部（アパチャーチューブ、マンメーターや真空ポンプなど）とエレクトリックカウンター部（デジタル表示部、オシロスコープ、上下限スレッシュホルドダイヤル、アパチャー電流スイッチなど）が内蔵さ



図1 Coulter Counter model ZBI 外観



図2 Coulter Chanalyzer C-1000外観

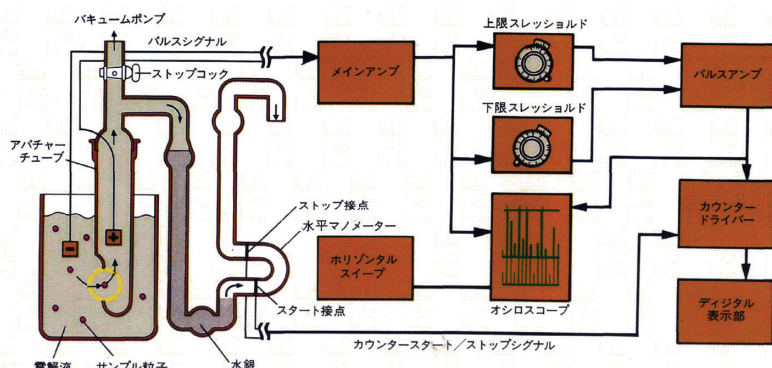


図3 Coulter Counter model ZBIブロックダイアグラム

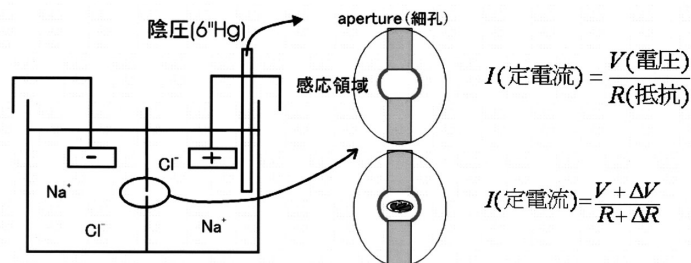


図4 コールター原理回路図

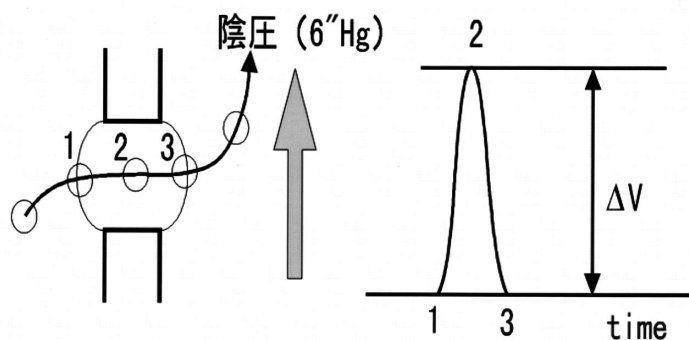


図5 感应領域進入時のパルス高変化

れている。

また、コールターカウンターモデル ZBIの主な仕様は下記の通りである¹⁰⁾。

- ・粒子径測定範囲 : 0.6~400 μm
- ・使用アパチャー径 : 30~560 μm
- ・サンプル吸引量 : 50, 500, 2000 μL
- ・マノメーター精度 : ± 1 %
- ・アパチャー電圧 : 0.0623~8 mA 11段階
- ・アッテネーション : 10段階
- ・スレッシュホールド : 上下2段のレベル設定
- ・表示 : 5桁デジタル表示部
- ・システムモニター : オシロスコープ、サウンドアラーム、アパチャー拡大スクリーン

コールター理論は一般的に電気抵抗方式と呼ばれ、粒子の体積と数を測定する基本理論である。その物理的背景を以下に示す。

電導性溶液が入ったピーカーに2枚の電極を入れて電流を流すと、電圧：V、電流：I、抵抗：Rとの間に $V=IR$ という関係が成り立つ（オームの法則）。この条件下で両電極の間に細孔（アパチャー：細孔）の開いた仕切りを入れ同

様に電流を流す（図4）。また、アパチャーを通る電流を定電流にした場合には電圧と抵抗の間には次の関係が成り立つ。

$$I = \frac{V}{R} \quad (式1)$$

また、アパチャー内に粒子が存在すると粒子が抵抗（ΔR）となり、電流を一定（定電流）にすることにより抵抗の増加と電圧（ΔV）との間に比例関係が成立する。

$$I \text{ (定電流)} = \frac{V + \Delta V}{R + \Delta R} \quad (式2)$$

パルス電圧は粒子が感应領域に入ったとき（図5：1）から電圧が発生し、中央部（図5：2）でピークとなり、感应領域を抜けるときの（図5：3）に電圧はゼロになる。このピーク（最大）電圧が粒子の体積と比例し、パルス電圧の高さからは通過粒子の体積を、パルス電圧の発生頻度からは粒子数を得ることができる。

$$\text{粒子体積} \Delta V \times \text{factor} \quad (式3)$$

図6の通り、血球が均一に懸濁している場合はアパチャーを通過する血球数は同時通過を除き、ほぼ懸濁液中の血球密度に比例する。この

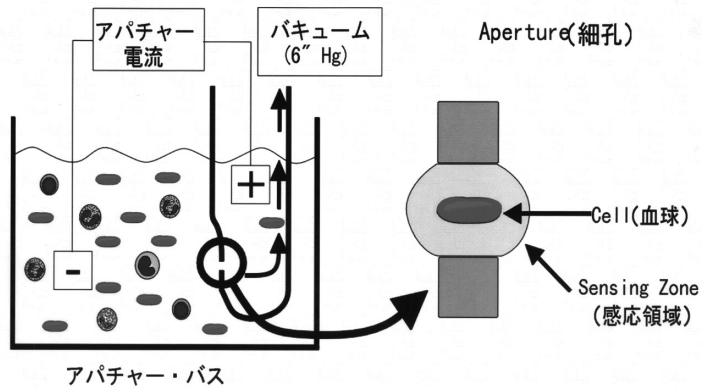


図6 コールターカウンター測定原理

ような血球計数の測定系では血球の同時通過を除くことができないため、アパチャー通過数をベースに同時通過した数（統計学処理ポアソン分布）を補正して目的となる細胞計測を行う。

IV. コールターカウンター モデルZBIの機能

コールターカウンター モデルZBIは多様な機能により、さまざまなアプリケーションに対応できる。コールター原理により粒子（細胞）の体積変化量（3次元）に基づくサイズ測定を行なっているため、2次元変化量に基づく光学的測定法より、はるかに高い測定精密性が得られる。また、光学的測定法に見られる粒子の表面形態、内部構造、屈折率、色、検出部通過方向などの差異による誤差がない測定が可能である。

コールターカウンター モデルZBIで測定可能な範囲（粒子径）はアパチャー（細孔）：以下アパチャー径により決定される。アパチャー径に対して2~40%の範囲の粒子が測定可能であり（図7、8参照）、大きな粒子（細胞）を測定する場合は大きなアパチャーチューブを、小さな粒子（細胞）には小さなアパチャーチューブを使用する。アパチャーチューブは対象となる粒子（細胞）のサイズにより選択する。また、その交換は1分以内で行えるため、異なるサイズの粒子（細胞）を短時間で計測が可能である。また、アパチャー部には人工ルビーを使用し、その周りには硬質ガラスを使用しているためにアパチャーが磨耗せずに正確な粒子測定が行える。以下に選択可能なアパチャー径を示す¹⁰⁾。

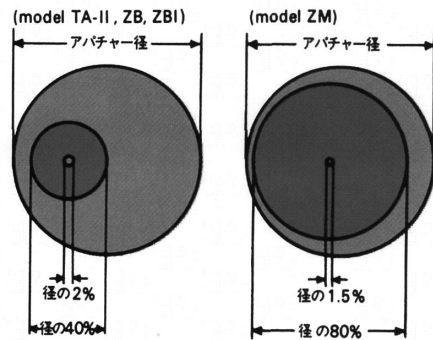


図7 アパチャー径に対する測定範囲

10、20、30、50、70、100、140、200、280、400、560、1000、2000 μ m

これらのアパチャーチューブにより、さまざまな粒子（細胞）が計測でき、ライフサイエンス分野から産業分野、医療分野などのサンプル測定において幅広い対応が可能である¹⁰⁾（図8参照）。

また、コールターカウンター モデルZBIの対象サンプルとしては主に以下のものがある¹⁰⁾。

赤血球、白血球、血小板、組織培養細胞、原生動物類、細菌、プラクトン、精子、藻類、ビールス、サスペンション、エマルジョン、スラリー、花粉、カーボン、顔料、染料、インク、香料、化粧品、プラスチック、トナー、ラテックス、海水中の粒子、粉石けん、菌

生物試料分析

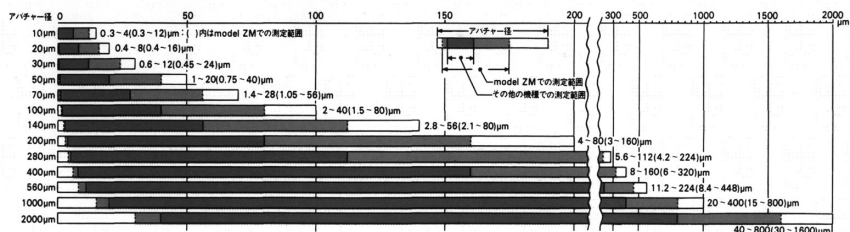


図8 各種アパチャー径の測定範囲

磨き粉など粉体や粒子状物質。

また、使用されるマノメーターの容量は計測される粒子（細胞）の測定時間、サンプルの安定性、同時通過、粒子サイズによって決定される。代表的なアプリケーションによるアパチャー径とマノメーター容量を以下に示す⁸⁾（表2参照）。

アプリケーションを実施するためには装置のキャリブレーションが必要となる。キャリブレーションは、対象サンプルと同様なサイズを持つ標準粒子を使用して上下限のスレッシュホールドレベルを決定する。また、対象サンプルの種類やそのサイズによりアパチャー電流などを調整し、適正な計測セッティングを行う。

コールターカウンター モデルZBIの最も代表的なアプリケーションはマニュアルにも記載されている通り、赤血球と白血球の計測である。赤血球計数は50,000倍に調整されたサンプルを用いて測定し、白血球計数は251倍に調整し、溶血剤により赤血球を溶血したサンプルを用いて測定を行う。以下で、弊社で行われている基準分析法⁹⁾による赤血球、白血球計数について述べる。

赤血球数の計測

器具/試薬/サンプル

- ・ Coulter Counter model ZBI
- ・ メスフラスコ 1000 ml Class A
- ・ ピペット DRUMMOND Series 300 Fixed Volume Micro-Dispenser
- ・ ISOTON II（電解液）
- ・ ガラスビーカー30 ml
- ・ EDTA加血検体

表2 アプリケーションによるアパチャー径とマノメーター容量

アプリケーション	アパチャー径 (μm)	マノメーター容量 (λ)
赤血球	100	500
白血球	100	500
血小板	70	100
原生動物類	100または200	500または2000
バクテリア	30	50
プランクトン	100または140	500または2000
精子	50または70	50または100
藻類	100	500
ビールス	10	50
組織培養細胞	100または200	500

装置の調整

- ① COULTER COUNTER model ZBIの各種セッティングを行う
- ② アパチャーチューブ（ $100 \times 70 \mu\text{m}$ ）、マノメーター $500 \mu\text{L}$ （Class A）を使用する
- ③ バックグラウンドレベルの確認を行う（50個/ $500 \mu\text{L}$ 以下）

検体の前処理と測定方法

- ① 1000mlメスフラスコにISOTON II 900 mlと検体 $20 \mu\text{L}$ を加える
- ② さらにISOTON IIを加えメスアップする
- ③ 6-8回転倒混和する（測定は5分以内で行う）
- ④ 測定用ビーカーに希釈検体を20 ml採取する
- ⑤ 希釈検体をCOULTER COUNTER model ZBIにセットする
- ⑥ 測定を開始する。その後3回測定を行う。初回測定値をプライムとして記録から削除する
- ⑦ 3回の測定値を同時通過補正表⁸⁾（表3）

表3 同時通過補正表

COULTER COUNTER® COINCIDENCE CORRECTION CHART

Count loss due to coincident passage of cells is a function of aperture volume and cell concentration. This chart is for use with a 100 micron aperture only and covers cell concentrations from 10,300 per ½ ml to 109,600 per ½ ml. Only the first three significant numbers are shown.

Example: If the counters record a count of 26,000, locate 260 on the chart, read the number in the adjacent column and record the true count as 27,800 cells per ½ ml.

100	103	150	156	200	210	250	267	300	323	350	382	400	441	450	503
01	104	51	157	01	211	51	268	01	324	51	383	01	442	51	504
02	105	52	158	02	212	52	269	02	326	52	384	02	444	52	505
03	106	53	160	03	213	53	270	03	327	53	386	03	445	53	507
04	107	54	161	04	214	54	272	04	328	54	387	04	446	54	508
05	108	55	162	05	216	55	273	05	329	55	388	05	448	55	509
06	109	56	163	06	217	56	274	06	330	56	389	06	449	56	510
07	110	57	164	07	218	57	275	07	331	57	390	07	450	57	512
08	111	58	165	08	219	58	276	08	333	58	392	08	451	58	513
09	112	59	166	09	220	59	277	09	334	59	393	09	453	59	514
110	113	160	167	210	222	260	278	310	335	360	394	410	454	460	515
11	114	61	168	11	223	61	279	11	336	61	395	11	455	61	516
12	115	62	169	12	224	62	281	12	337	62	396	12	456	62	518
13	116	63	170	13	225	63	282	13	338	63	398	13	457	63	519
14	117	64	171	14	226	64	283	14	340	64	399	14	459	64	520
15	118	65	172	15	227	65	284	15	341	65	400	15	460	65	521
16	119	66	173	16	228	66	285	16	342	66	401	16	461	66	523
17	121	67	175	17	230	67	286	17	343	67	402	17	462	67	524
18	122	68	176	18	231	68	287	18	345	68	403	18	464	68	525
19	123	69	177	19	232	69	289	19	346	69	405	19	465	69	526
120	124	170	178	220	233	270	290	320	347	370	406	420	466	470	527
21	125	71	179	21	234	71	291	21	348	71	407	21	467	71	529
22	126	72	180	22	235	72	292	22	349	72	408	22	469	72	530
23	127	73	181	23	236	73	293	23	350	73	409	23	470	73	531
24	128	74	182	24	237	74	294	24	352	74	410	24	471	74	532
25	129	75	183	25	239	75	295	25	353	75	412	25	472	75	534
26	130	76	184	26	240	76	296	26	354	76	413	26	474	76	535
27	131	77	185	27	241	77	298	27	355	77	414	27	475	77	536
28	132	78	186	28	242	78	299	28	356	78	415	28	476	78	537
29	133	79	187	29	243	79	300	29	358	79	416	29	477	79	538
130	134	180	188	230	244	280	301	330	359	380	418	430	478	480	540
31	136	81	190	31	245	81	302	31	360	81	419	31	480	81	541
32	137	82	191	32	246	82	303	32	361	82	420	32	481	82	542
33	138	83	192	33	248	83	304	33	362	83	421	33	482	83	543
34	139	84	193	34	249	84	305	34	363	84	422	34	483	84	544
35	140	85	194	35	250	85	307	35	365	85	424	35	484	85	546
36	141	86	195	36	251	86	308	36	366	86	425	36	486	86	547
37	142	87	196	37	252	87	309	37	367	87	426	37	487	87	548
38	143	88	197	38	253	88	310	38	368	88	427	38	488	88	549
39	144	89	198	39	254	89	311	39	369	89	428	39	489	89	550
140	146	190	199	240	256	290	312	340	370	390	429	440	491	490	552
41	147	91	200	41	257	91	313	41	372	91	430	41	492	91	553
42	148	92	201	42	258	92	314	42	373	92	432	42	493	92	554
43	149	93	202	43	259	93	315	43	374	93	433	43	494	93	555
44	150	94	204	44	260	94	316	44	375	94	434	44	496	94	556
45	151	95	205	45	261	95	317	45	376	95	435	45	497	95	558
46	152	96	206	46	262	96	319	46	377	96	436	46	498	96	559
47	153	97	207	47	263	97	320	47	379	97	438	47	499	97	560
48	154	98	208	48	265	98	321	48	380	98	439	48	501	98	561
49	155	99	209	49	266	99	322	49	381	99	440	49	502	99	563

より補正を行い、記録する

- ⑧ 測定値の最大値と最小値の差が 0.06×1000 以上ある場合は攪拌が不十分のため再測定する
- ⑨ ①～⑧をもう一回繰り返し行い、測定値の平均から参照値を求める

WBC数定量

—器具/試薬/サンプル—

- ・ Coulter Counter model ZBI
- ・ メスフラスコ 50 ml Class A

- ・ ピペット DRUMMOND ガラスキャピラリー
- ・ ピペット 100 μ L $\pm 0.5\%$
- ・ ピペット DRUMMOND Series 300 Fixed Volume Micro-Dispenser
- ・ ISOTON II (電解液)
- ・ Zap-0-Globin II (溶血剤)
- ・ ガラスビーカー30 ml
- ・ EDTA加血検体

—装置の調整とバックグラウンド測定—

- ① Coulter Counter model ZBIの各種セッティ

ングを行う

- ② アパチャーチューブ (100×70 μ m)、マンメーター 500 μ L (ClassA) を使用する
- ③ ISOTON II を50 mlメスフラスコに入れてメスアップし、100 μ LのISOTON IIを加える
- ④ Zap-0-Globin II 0.5 ml加え、5回転倒混和し、測定用ビーカーに20 ml採取する
- ⑤ 希釈検体をCOULTER COUNTER model ZBIにセットする
- ⑥ 測定を開始し、合計3回の測定を行う(測定は5-10分以内)
- ⑦ 合計9個の計測を行い、バックグラウンドの平均値を求める(50個/500 μ Lであることを確認)

－検体の前処理と測定方法－

- ① 50 mlメスフラスコにISOTON II 40 mlと検体100 μ Lを加える
- ② Zap-0-Globin II 0.5 ml加え、ISOTON IIを加えメスアップする。5-6回転倒混和し、5分間静置する(測定は5-10分以内で行う)
- ③ 測定用ビーカーに希釈検体を20 ml採取する
- ④ 希釈検体をCOULTER COUNTER model ZBIにセットする
- ⑤ 測定を開始する。その後3回測定を行う。初回測定値をプライムとして記録から削除する
- ⑥ 3回の測定値を同時通過補正表⁸⁾(表3)より補正を行い、記録する
- ⑦ 測定値の最大値と最小値の差が2%以上ある場合は攪拌が不十分のため再測定を行う
- ⑧ ①～⑦をもう一回繰り返し、測定値の平均からバックグラウンド値を引き、参照値を求める

V. 終わりに

コールターカウンター モデル ZBIは多機能な粒子アラナイザーであり、さまざまな分野での粒子(細胞)サンプルの計測が可能である。その中で、本装置は赤血球・白血球計数においての基準分析法(参照法)に推奨されている規格に合致した仕様で基準分析器としての役割も果たしている。約25年前、臨床検査室にはコール

ターカウンター モデル ZBIのような半自動タイプの血球計数器が設置されていた。そのころ筆者も血液検査室の担当者と一緒にCoulter Counter model ZBIを使用して赤血球・白血球・血小板計数を行なったことがある。また、アパチャーの交換や水銀マンメーターの洗浄など装置の構造やメンテナンスについても熟知していた。

今日の臨床検査室に設置されている血球計数装置は全自動タイプであり、検体測定は全自動で行なわれてしまっている。現在、この半自動タイプ(半自動型)の血球計数器は一部の検査室(クリニックや動物実験室など)を除き、マイクロヘマトクリット遠心器や光電比色計などと同様に臨床検査室から姿を消してしまった。半自動タイプの血球計数器とその測定手順は、臨床検査室においては、すでに実態の無いものになりつつある。今回、血球計数基準器であるコールターカウンター モデル ZBIの機能やアプリケーション(参照法による赤血球、白血球の計測)について述べたが、このような現状の中で血球計数の基準分析法(参照法)や血球計数の校正の概念を理解していただく上での一助になれば幸いである。

引用文献

- 1) ICSH: Reference method for the enumeration of erythrocytes and leukocytes. Clin. Lab. Hemat., 16: 131-138, 1994
- 2) 巽 典之 他: 自動血液検査品質保証論. Study Book, #3: 13-75, 2006
- 3) JM England, RM Rowan: The assignment of values to fresh blood used for calibration automated blood cell counter. Clin. Lab. Hemat., 10: 203-212, 1988
- 4) 巽 典之 他: 血球計数機の正確性. From Coulter, #21: 1-6, 1993
- 5) 巽 典之 他: 血球計数と白血球分類のReferenceについて血液検査に用いられる用語、単位. From Coulter, #8: 1-4, 1988
- 6) 清水義秋: ISO15189におけるメーカーの責務. 医療と検査機器・試薬, 26(6): 451-454, 2003
- 7) 財団法人日本規格協会: 国際規格ISO15189英語対訳. 第1版: 14, 2002
- 8) Instruction manual for the COULTER COUNTER MODEL ZBI
- 9) Coulter Channelyzer OPERATOR'S INSTRUCTION MANUAL
- 10) Coulter Counter Particle Analyzer カタログ