

好中球系細胞標準化の経緯と血球形態標準化合同ワーキンググループについて

渡 邊 眞一郎（藤沢市民病院 臨床検査科）

【はじめに】

末梢血液形態検査は日常診療活動の根幹をなす基本的検査であるが、好中球の形態学的判断基準や基準範囲は未だ標準化が達成されていない。日本臨床衛生検査技師会と日本検査血液学会は、この現状を打開すべく血球形態検査の標準化普及活動を協同で行う方針で合意し、活動を開始した。その経緯とその後の進捗状況を報告する。

【今までの経緯】

日本臨床衛生検査技師会（JAMT）の血液形態検査標準化ワーキンググループは、1996年に「血液形態検査に関する勧告法」（日臨技案）を公表し、その中で好中球桿状核球と分葉核球の分類基準案を示した。その後、新たに成立した日本検査血液学会（JSLH）の標準化委員会に血球形態標準化小委員会が設置され、上記ワーキンググループの検討内容を引き継いだ。そして、2003年に「好中球桿状核球・分葉核球」の分類標準（学会案）を発表した。

その後、この二つの分類基準は併存し、どちらの基準を採用するかは各施設に任されてきた。その結果、採用基準の違いによって、桿状核球の値が基準範囲も含め施設間で明らかに異なることが判明し、少なからぬ施設に混乱を招いている現状がある。そもそも学会案は日臨技案の改良版として提案されたはずであるが、その採用率は日臨技案約80%、学会案10～20%と報告されている。

【新しい分類基準（新学会案）の提唱】

2013年10月、JSLH血球形態標準化小委員会は、好中球桿状核球と分葉核球の鑑別に関して、日臨技案と学会案を折衷し、日常業務形態に即した新しい分類基準（新学会案）を合意した。

新学会案は、以下の通りである。桿状核球、分葉核球の目視鑑別は、適切な塗抹染色標本を用いて原則として倍率400倍の鏡検で判定する。なお核クロマチンはいずれも粗剛である。**桿状核球**：核の長径と短径の比率が3：1以上、かつ核の最小幅部分が最大幅部分の1/3以上の長い曲がった核を持つ。**分葉核球**：核糸の存在をもって定義される。ただし、核の最小幅部分が十分に狭小化した場合は、核糸形成が進行したとみなして分葉核球と判定する。このとき実用上400倍で、

核の最小幅部分が最大幅部分の1/3未満、あるいは赤血球径の1/4（約2 μm）未満であれば核糸形成とみなす。また、核が重なり合って分葉核球か桿状核球か明確でないときは分葉核球と判定する。

【合同ワーキンググループの発足について】

2013年12月、JAMTとJSLHは、現状を打開すべく、新学会案を新しい分類基準として血球形態検査の標準化普及活動を協同で行う方針を合意した。この目的を実現するため、JAMT5名、JSLH5名、計10名の委員からなる「血球形態検査標準化合同ワーキンググループ」（合同ワーキンググループ；合同WG）を新たに結成し、2014年度より活動を開始した。

【合同ワーキンググループの活動目標と進捗状況】

合同WGは、新学会案の基礎的、臨床的妥当性を検証し、その成果をもとに新学会案準拠アトラスを作成し、これをJAMT各支部における形態学研修に活用して頂き、新しい好中球分類法を全国的に普及させること。さらに、精度管理調査や教科書でも新分類法を採用して頂き、確立した分類法とすることを目標とした。

まず、新学会案に基づく好中球の基準細胞画像約250枚を合同WG7施設に配布して、実務担当者に新分類基準の周知と確認を行った。次に、健常人を対象に桿状核球および分葉核球比率を求め、あらためて目視分類の基準範囲を設定する作業を開始した。これは新学会案の基本的な妥当性を検証する重要な作業と考えた。各施設は健常者を対象とした基準範囲設定の研究計画書（各施設共通の）を倫理審査会へ提出し、全施設が認可された。各施設は職員健診等の機会を利用して、研究計画書にしたがい同意を得た職員から末梢血塗抹標本を作製し、白血球分類を実施した。その結果、約950名の成績を得ることが出来、目下統計解析中である。解析結果は山本慶和委員が発表する。

新学会案の臨床的妥当性等については、静岡赤十字病院が担当し、次演題で発表する。

【結語】

新好中球分類法の全国的普及・展開は今後の作業となるが、JAMTおよびJSLH会員の皆様には絶大なお支援を頂きたい。新分類法の全国的普及が達成されれば、最終目標は自ずと達成されると確信している。

バーチャルスライド・健診検体・SIRS症例を用いたstab, seg新基準の検証

山口 孝 一（静岡赤十字病院 検査部）

「はじめに」桿状核球（stb）と分葉核球（seg）の基準には日臨技勧告法と日本検査血液学会案が存在し、少なからず混乱を招いている現状がある。2013年に日本臨床検査技師会と日本検査血液学会は、現状を打破すべく血液形態検査の標準化普及活動を協同で行う方針で合意した。血液形態検査標準化合同ワーキンググループを新たに結成し、2014年7月には好中球のstbとsegの目視区分を両学会案の折中案（新基準案）として提唱した。我々は、第14回日本検査血液学会（2013年）で日臨技勧告法と日本検査血液学会案の基準についての問題点を臨床検体やバーチャルスライドを用い“桿状核球と分葉核球：SIRS症例での検証”と題して報告した。これらの経緯から、本学会のパネルディスカッションで新基準案の検証を報告するに至った。

今回、新基準案の検証として、健診検体およびバーチャルスライド、SIRS症例を用いて検討を行い、さらに実際の検査室の現場における形態標準化にむけた教育・指導についても紹介する。

「桿状核球と分葉核球の新基準案」

新しい好中球の目視区分法は顕微鏡400倍での鏡検判定を想定。核クロマチンはいずれも粗剛。

桿状核球は、核の長径と短径の比率が3:1以上かつ核の最小幅部分が最大幅部分の1/3以上長いまがった核を持つ。

分葉核球は、分葉した核の間は核糸でつながるが、核の最少幅部分が十分に狭小化した場合は核糸形成が進行したとみなして分葉核として判定する。実用上400倍にて、核の最小幅部分が最大部分の1/3未満、あるいは赤血球径の1/4（約2 μ m）未満であれば核糸形成とみなす。また、核が重なりあって分葉核球か桿状核球か明確でないときは分葉核球と判定する。

「対象・方法」健診検体は当院の健診受診者で血液学的および生化学的検査データに異常値を認めない50名（男性：21名、女性：29名 WBC: 5,934 \pm 1,023）の標本を用いた。標本作製はSP-1000i（sysmex）で行い、当院の血液標本担当者10名で200細胞目視分類した。今回標本観察を担当した技師は、認定血液検査技師が7名で、血液担当年数内訳は15年～：1名、10～15年：3名、5～10年：3名、1～5年：3名で構成されている。

バーチャルスライドは、末梢血バーチャル標本（CML症例）から50細胞の顆粒球系細胞を選択し、stb, segを主体に一部myeloとmetamyelocyteを含め、依頼に同意が得られた87名にカウントをお願いした。SIRSの検証に関しては、第14回日本検査血液学会で報告したSIRS症例の標本を用いた。

「結果」健診標本検討：今回便宜上、stb/seg比：10%以上を示した標本を“左方移動”とし、50標本について観察を行った。新基準案はstbおよびsegの比率やばらつきに関しては概ね良好であった。しかし、1/10名はstb/seg比：10%以上の比率が34%と他に比し著しくstb比率が高いカウントであった。

バーチャルスライド検討：stb, segの判別において一致率80%未満は2細胞（6.1%）であり、新基準案はバーチャルスライドにおいても概ね良好であった。

さらに当院の技師には、新基準案の細胞判別ポイントに加え一致率の低い細胞を提示し、施設内での共有化を図った後、第14回日本検査血液学会の検討で用いたバーチャルスライドを行った。日臨技勧告法 vs 検査血液学会案 vs 新基準案では、一致率が80%以上であった細胞数はそれぞれ61:55:75細胞であり、新基準案が最も高かった。stb, seg別で見ると、検査血液学会案はstbに、日臨技勧告法と新基準案はsegの一致率に収束が認められた。

SIRSの検討：検査血液学会案でカウントを行うと、SIRSポイントが2ポイント以上のstbの比率は平均30%で、ポイント数の増加との関連はみられなかった。一方、日臨技勧告法ではSIRSのポイントに比例してstb比率も漸次増加した。

教育・指導：当院では年間数回の精度管理調査や関連病院のバーチャルスライド調査を行う機会がある。その都度、個人の結果を表にまとめて公開し、個人のクセなど認識を高める工夫を行っている。

「まとめ」新基準案は、使い勝手やカウントの一致率等に問題はないと考える。しかし、学会主導の普及活動や啓蒙/教育や各施設内での地道な目合わせは必須である。またstbとmetamyelocyteとの細胞判別もstb比率のカウント安定化には不可欠であり、顆粒球系細胞の成熟の連続性を意識した個々の特徴を再認識することも大切である。

（連絡先：054-254-4311）

検査現場での捉え方と形態学検査のあり方

志賀 修 一（京都大学医学部附属病院 検査部 臨床検査技師長）

現在、好中球の目視区分（形態学的分類）をどれだけの施設が意識をして臨床に就いているのであろうか。1996年日本臨床衛生検査技師会、血液形態標準化委員会が「血液形態検査に関する勧告法」を発表して久しい。その後、2000年には日本検査血液学会が設立、形態検査標準小委員会による標準化作業が進められてきた。しかし、実状は日臨技勧告法に基づいて運用されている施設がほとんどであり（約8割）、日臨技勧告法に変わって、日本検査血液学会でとりまとめた目視区分が、日本の検査の現場ではなかなか受け入れられてこなかった。

今回、日本臨床衛生検査技師会と日本検査血液学会での血液形態標準化合同ワーキングを開催して、今後の好中球（分葉核球、桿状核球）の目視区分（分類）法について再度新目視区分法を提案することになった。新しい好中球の目視区分法は以下に示す。

「顕微鏡400倍での鏡検判定を想定し、核クロマチンはいずれも粗剛である。桿状核球は、核の長径と短径の比率が3:1かつ核の最小幅部分が最大幅部分の1/3以上で長い曲がった核を持つ。分葉核球は、分葉した核の間は核糸でつながるが、核の最小幅部分が十分に狭小化した場合は、核糸形成が進行したとみなして分葉核と判定する。実用上400倍にて、核の最小幅部分の最大幅部分の1/3未満、あるいは赤血球径の1/4（約2μm）未満であれば核糸形成とみなす。また、核が重なり合って分葉核球が明確ではない時には分葉核球と判定する」

今回、これまでの歴史的な背景をもう一度見直し、日本臨床衛生検査技師会と日本検査血液学会合同で考案した好中球の新目視区分法を、検査現場でどのように捉え日本で普及させるかを、以下の内容について考えてみたい。

①国際的な分類の動きはどうなっているのか？

②好中球目視区分（分葉核球、桿状核球）を分ける意義はあるのか？

③標準化を浸透させるには何が必要なのか

④自動血球分析装置の性能が向上している昨今、自動血球分類装置のフラグ（幼若顆粒球等）の有用性と運用の展望

好中球目視区分（分類）法の比較

		日臨技	検査血液	日臨技・検査血液	ICSH	自動分類法
好中球	分葉核球	分類	分類	新分類区分	好中球 (桿状核球が多い とコメント)	好中球 (フラグ)
	桿状核球	分類	分類	新分類区分		
	目視分類普及率	80%	20%	今後導入検討		

【まとめ】

末梢血の白血球5分類は、自動血球分析装置の性能が向上し目視に引けをとらなくなった。自動塗抹染色装置から出てきた標本が、自動で細胞を読み取れる時代が来ている。しかし、機械はあくまで機械であり、核幅は測れても、末梢血の“印象”までは測れない。日本人の繊細さを生かす所はここに存在するではないか。

好中球の分葉核球と桿状核球の新目視区分法を運用拡大していくためには、何時でも、どの施設でも、いかなる検査技師でも、簡便に用いることができる標準法である必要がある。

一方で治療法、医療技術革新、国際情勢等が刻々と変化していく中、我々、日本の優れた技術を持った検査技師もそれらに柔軟且つスピーディに対応していく事も平行して進めなければならない。

標準化を推進するためには、標準化案を世に送り出した当事者が、その手法、分類することによるエビデンスを明確に伝え、現場の検査技師はエビデンスに基づき、一人ひとりが当事者意識を持って対応していく必要がある。

基準範囲の統計処理の立場から

山本 慶和（学校法人 天理よろづ相談所学園 天理医療大学 臨床検査学科 特任講師）

日常診療に頻用される血液検査項目について、日本全国で共通して使用することが可能な共用基準範囲が検査関連の諸学会、団体の協力を得て設定された。このような状況において、日本検査血液学会と日本臨床衛生検査技師会が協働して白血球分類の標準化を進めるため、血球形態標準化ワーキングが設置された。

白血球分類の好中球の桿状核球と分葉核球の定義の確認・合意が行われ、それに基づいて目視分類の基準範囲を設定し、これを全国的に普及させることとなった。以下に目視分類の基準範囲の設定方法および結果（経過報告）を示す。

I. 対象および方法

1) 健常対象者（基準個体）

健常対象者を医療施設における健康診断受診者、または臨床検査部に勤務している職員のうちから募ることとした。健常対象者は1000名を目標として、男女の割合を等しくし年齢分布も考慮して、対象年齢の範囲は20～65才とした。

2) 除外基準

除外基準は、2014年に日本臨床検査標準化協議会から公表された「日本における主要な臨床検査項目の共用基準範囲案」に則り、(1)慢性疾患で定期的に服薬している、(2)入院を要する急性疾患や手術から回復後2週以内、(3)HBV, HCVキャリア、(4)妊娠中または分娩後1年以内、および検体採取日に発熱がないこととした。なお、BMI、飲酒および喫煙の除外基準については調査票に記載されたものを元に、変動要因の解析に基づいて評価することとした。

3) 基準範囲設定のための調査票

調査票では(1)基本情報：性別、年齢、身長、体重、(2)生活習慣：喫煙習慣、飲酒習慣、定期運動および絶食時間を調査した。

4) 採血および測定項目

検体採取はEDTA-2K採血管（CBC用 2mL）を用い、採血時間は午前8～11時とし、少なくとも10分間座位安静の後採血することとした。

血液検査項目：WBC, RBC, Hb, Ht, PLT, 白血球の目視分類と自動（フロー）分類および網赤血球数（可能な施設）とした。

目視分類については、各施設内で普通染色をおこなった塗抹標本を用いて認定血液検査技師またはその指導のもとに、日常的に血液検査を担当する検査技師が200個カウントした。目視分類項目は骨髄芽球、前骨髄球、骨髄球、後骨髄球、桿状核球、分葉核球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、反応性リンパ球、その他とした。

5) 基準範囲の妥当性評価

各施設で得られた健常者の測定値分布を、従来流布している基準範囲とマッチしているかどうか、および施設間差の有無を血液形態検査標準化ワーキンググループのもとで解析した。

- (1) 変動要因の解析、層別化の評価：枝分かれ分散分析、SDR指数および重回帰分析
- (2) データの正規化：Box・Coxべき乗変換方式
- (3) 基準範囲の算出：潜在異常値除外法を予定しており、解析ソフトとしてStatFlexを用いた。

II 結果（経過報告）

1) 基準個体

7施設より939名の健常者の協力が得られた。その内訳を表に示した。

男女構成 年齢/性別	基準個体		基準個体比		
	M	F	All	M	F
20～29	80	125	205	0.39	0.61
30～39	103	130	233	0.44	0.56
40～49	111	147	258	0.43	0.57
50～59	88	100	188	0.47	0.53
60～65	31	24	55	0.56	0.44
合計	413	526	939	0.44	0.56

2) 男女、年齢およびBMIの変動要因評価

各目視項目における性・年齢・BMI変動要因による枝分かれ分散分析の結果、性SDR、年齢SDR、BMISDRに有意な差は認めなかった。