

黒毛和種子牛の血球計数における多項目自動血球計数装置の信頼性の検討

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
巻/号	6612
掲載ページ	p. 859-862
発行年月	2013年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



黒毛和種子牛の血球計数における多項目自動 血球計数装置の信頼性の検討

阿野仁志 若槻拓司 那須哲夫 萩尾光美 片本 宏[†]

宮崎大学農学部 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)

(2011年12月15日受付・2013年9月4日受理)

要 約

45頭の黒毛和種子牛（健常牛：35頭，疾患牛：10頭，1～30週齢）より血液検体を採取し，用手法及び自動血球計数装置を用いて各血球数及び赤血球恒数を測定した．用手法と自動血球計数装置との間での相関は赤血球数で $r = 0.426$ 及び血小板数は $r = 0.513$ と低かったが，白血球数は $r = 0.705$ とやや高い相関を示した．本研究の結果より，これまで信頼性が低いとされてきた自動血球計数装置による子牛の血液測定は，改良された機器の使用により各血球数が基準値の範囲内で信頼性があることが示された．——キーワード：自動血球計数装置，血球数測定，黒毛和種子牛．

----- 日獣会誌 66, 859～862 (2013)

従来，一般臨床の現場では，子牛の血液学的検査，特に血球数の計数は血球計算盤や血液塗抹標本を用いた用手法が用いられてきたが，これらの方法は時間的，労力的に獣医師の負担となり，実施される機会は少ない．現在では血球計数は多くの動物で自動血球計数装置により実施され [1]，時間的，労力的に獣医師の負担を軽減し，多くの検体を処理することも可能である．成牛では自動血球計数装置による測定も行われているが，子牛に関してはその報告も少ない．その理由として，従来の自動血球計数装置では測定に要する溶血剤が原因となり溶血不良や白血球凝集，血小板凝集などが生じやすいことに加え，子牛では成牛より平均赤血球容積が低値を示すため [2]，小型の赤血球と血小板の分離精度が低いことが考えられる．

しかし，近年多発する感染症など多くの子牛の疾病の診断や健康状態把握には血液検査は有用であり，臨床現場に即した機器の実用性の評価が必要である．牛の血液学的性状に関する基準値はさまざまな論文，成書に記載されているが [3, 4]，そこに記載されている成牛に関する基準値を，成長段階において大きな変化を伴う子牛にそのまま当てはめることは避けるべきである [5]．

一方，黒毛和種以外の子牛における血液学的変化を調べた報告はいくつか見られるが [5-8]，黒毛和種子牛に関しての血液学的変動や自動血球計数装置での測定に関して評価を行った報告は見当たらない．

そこで今回われわれは30週齢までの黒毛和種子牛の血液を用いて，赤血球数，血小板数，白血球数，リンパ球の割合を，血球計算盤及び血液塗抹標本による用手法と動物用多項目自動血球計数装置による計測とで比較し，黒毛和種子牛における自動血球計数装置による血球計数の信頼性を検討した．

材料及び方法

血液サンプル：繁殖農家（31頭）及び宮崎大学附属牧場（4頭）で飼育される健常な黒毛和種子牛35頭並びに附属動物病院に診療のため来院または鑑定殺のために獣医解剖学研究室に搬入された同種の疾患子牛10頭の計45頭の子牛（1～30週齢，雄22，雌23頭）の頸静脈より血液検体を採取した．採取した血液はEDTA加真空採血管中で抗凝固処理し，測定まで0～6時間は氷冷保存した．

用手法による計測：赤血球数の計測にはEDTA加血液を生理食塩水で希釈し，トーマ型血球計算盤により赤血球数を計数した．血小板数の計測にはディスプレイ血液希釈用ピペット（ユノペット，日本ベクトン・ディッキンソン(株)，東京）を用い，トーマ型血球計算盤により血小板数を計数した．

白血球数の計測にはEDTA加血液をチュルク液（和光純薬工業(株)，大阪）で希釈後，改良型ノイバウエル式血球計算盤により白血球数を計数した．

[†] 連絡責任者：片本 宏（宮崎大学農学部獣医内科学研究室）

〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1 ☎・FAX 0985-58-7277 E-mail : katamoto@cc.miyazaki-u.ac.jp

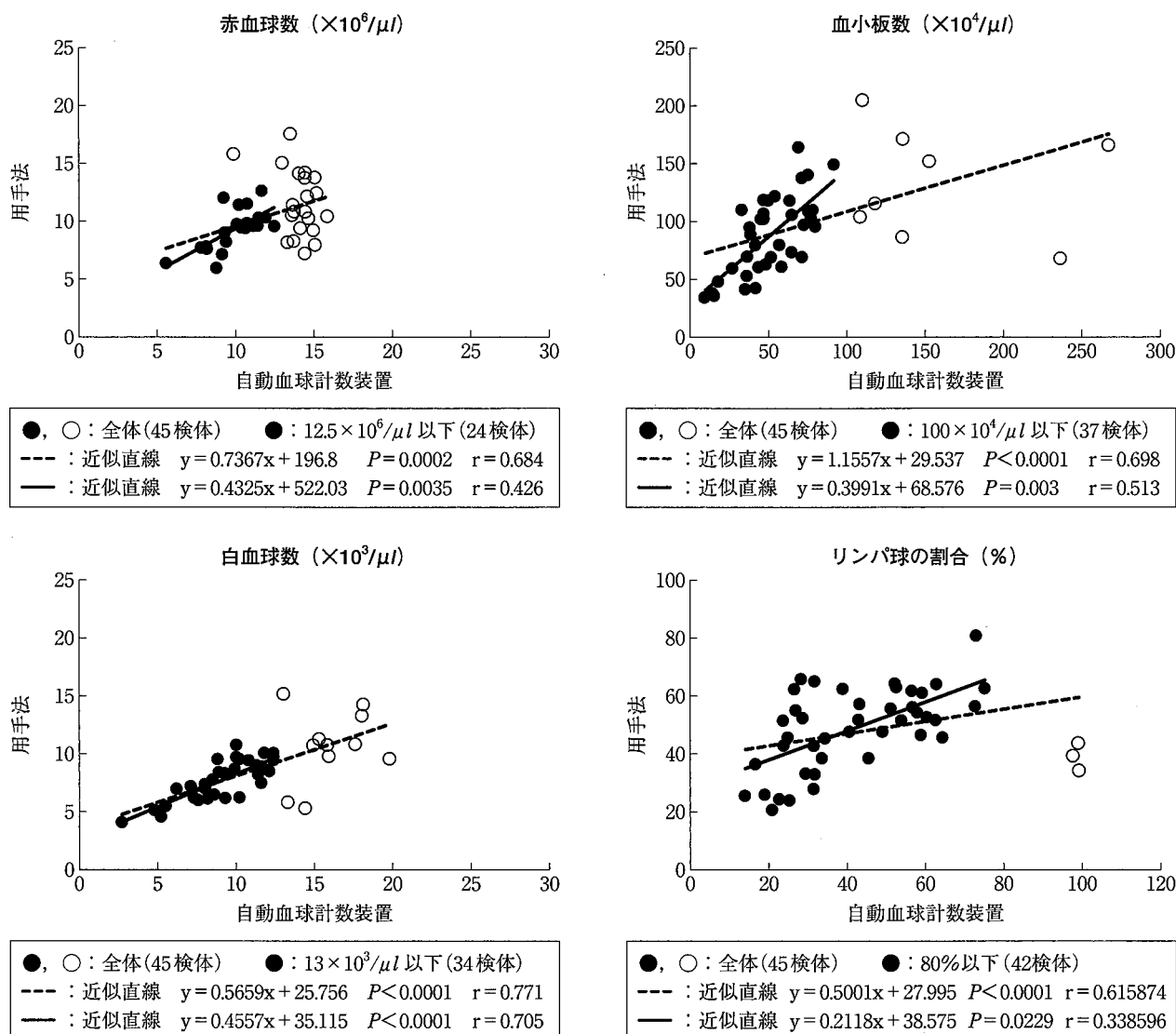


図 用手法と自動血球計数装置間での黒毛和種子牛の赤血球数, 血小板数, 白血球数及びリンパ球の割合の相関

リンパ球の割合の計測のため, ウェッジ法により血液塗抹標本を作製し, 簡易迅速染色液(ディフ・クイック, シスメックス㈱, 兵庫)で染色後, 白血球100個中の百分率(好酸球, 好塩基球, 好中球, リンパ球, 単球)を求めた。これらの測定は自動血球計数装置での測定値を知らない4名でおのおの計数後, 各測定値及び平均値を記録した。

自動血球計数装置: 各血液検体は動物用自動血球計数装置(pocH-100iV Diff, シスメックス㈱, 兵庫)を用いて赤血球数, 白血球数, 血小板数, リンパ球の割合を計測した。

統計処理: 用手法及び自動血球計数装置で得られた赤血球数, 血小板数, 白血球数, リンパ球の割合に関して, 回帰分析により相関関係を求めた。

成 績

赤血球数: 全45検体での用手法及び自動血球計数装置での各赤血球数を比較したところ, 相関係数は $r = 0.426$ と低かった。特に自動血球計数装置での測定で赤血球数が成牛の正常範囲上限の $10 \times 10^6/\mu l$ [3, 4, 9]を越えた $12.5 \times 10^6/\mu l$ 以上の21検体ではばらつきが多かった。そこで, $12.5 \times 10^6/\mu l$ 以下であった24検体について再度相関を求めたところ, 相関係数は $r = 0.684$ と高値を示した。また, 自動計数では用手法に比べ計測過多の傾向がみられた(図)。

血小板数: 全45検体での用手法及び自動血球計数装置での各血小板数を比較したところ, 相関係数は $r = 0.513$ と低かった。赤血球と同様, 成牛の正常範囲である $60 \times 10^4/\mu l$ [9]を越えた中でばらつきの多かった $100 \times 10^4/\mu l$ 以上の8検体を除く, 37検体で再度相関

係数を求めたところ、 $r = 0.698$ と高値を示した。また、自動計数では用手法に比べ赤血球とは逆に低い傾向がみられた (図)。

白血球数: 全45検体での相関係数は $r = 0.705$ と高く、自動血球計数装置による白血球数が成牛の正常範囲上限である $12 \times 10^3/\mu l$ [3, 4, 9] 付近の $13 \times 10^3/\mu l$ 以下の34検体における相関係数は $r = 0.771$ と、ともに0.7以上の高値を示した。また、自動計数では用手法に比べ計測過多の傾向が現れた (図)。

リンパ球の割合: 全45検体での相関係数は $r = 0.338$ であり、白血球全体と比べばらつきも大きかった (図)。特に自動血球計数装置でリンパ球比が100%近い測定エラーと思われる3検体を除く42検体で再解析したところ、相関係数は $r = 0.615$ と改善がみられた (図)。

考 察

動物用自動血球計数装置と用手法との間で黒毛和種子牛の血球数算定について比較・検討を行ったところ、赤血球数、血小板数はやや相関値が低いものの、白血球数に関しては血球数の過小に関わらず安定した相関が得られた。さらに、赤血球数 $12.5 \times 10^6/\mu l$ 以下、血小板数 $100 \times 10^4/\mu l$ 以下、白血球数 $13 \times 10^3/\mu l$ 以下の成牛の正常範囲のやや上限付近まではそれ以上高値の検体を含んだ場合よりも高い相関が得られた。赤血球数及び血小板数で相関が低い原因の一つに、EDTA加血液中で血小板が時間とともに凝集し、なおかつ破壊されやすいため [1, 10, 11]、凝集血小板が赤血球分画に混入することで自動血球計数装置においては赤血球数を過大に、逆に血小板数は過小に測定してしまうことが考えられ、それにより血球計算盤による用手法との相関が低下してしまった可能性が考えられる。本研究で用いた検体の多くは農場で採血し、氷冷保存後測定に供したため、前述の測定結果で自動血球計数装置では計測過多の傾向が見られたことから、測定までの時間経過は大きな誤差要因と考えられた。今後は採血から測定までの時間を短くする、あるいは血小板の凝集を抑制する [10, 11] などの方策が必要と考えられる。

従来の自動血球計数装置では、子牛の血液の場合、赤血球を十分に溶血できず、赤血球ゴースト膜の重なりが白血球数の粒度分布に影響し、また、小型赤血球と血小板の粒度分布が重なり、血小板数に影響するなど各血球の分画が不十分なため、血球の粒度分布の境目を判断できず、自動的な測定が不可能であった [12]。しかし、今回用いた自動血球計数装置では、精度の高いシースフローDC検出方式により、一般的な電気抵抗方式に比べ、血球通過時のパルス信号の乱れによる影響や血球の同時通過や再循環が低減され、赤血球、血小板の計数、分画に優れているとされている [13]。

リンパ球の割合は他の3項目 (赤血球数、血小板数、白血球数) に比べるとばらつきが大きかった。測定者に起因する要因として、計測者の主観や血液塗抹標本の作製技術などがあげられる。今回の研究では血液塗抹標本の作製は1名により行われ、それを4名で観察したが、各自の主観が入ってしまうことや観察部位での差も影響すると思われるため、できるかぎり一定の技術を有する者が血液採取後できるかぎり速やかに塗抹標本を作製、観察することが望ましいと思われる。

計測器側の問題として、溶血剤により白血球を収縮させ、その大きさや膜の性状などで簡易的に白血球を分画しており、厳密な分類ではないことがあげられる。本装置では新規溶血剤として4級アンモニウム塩を主成分としたPoch-pack LVDを使用し、膜の性状や核、顆粒の大きさ等により白血球の収縮程度を区別することで白血球の大きさを簡易に分画する [13, 14]。本研究と同じ計数装置による犬の血球計測の研究では、測定まで保存時間がかかると、好中球のサイズが減少するため、リンパ球と分類してしまうと述べられている [15]。本研究でも採取後氷冷保存した血液での測定が誤差要因となってしまう可能性が考えられる。

しかしながら、臨床現場では採血後速やかな測定は困難な場合も考えられるため、明らかな異常値を除けば本測定装置は簡易にリンパ球とその他の白血球の割合を算出することができるため、まずスクリーニングを目的とした測定には本測定装置は有用であると考えられる。

本研究において、これまで正確性を欠くとされてきた子牛の自動血球計数装置による血球計測において、今回用いた動物用自動血球計数装置は血球数が著しく高値を示す場合での相関は低いが、各血球数が基準値の範囲内である場合には高い相関を示し、特に白血球数に関しては高い信頼性を示し、黒毛和種子牛における血球計数に十分使用でき、特に多検体を迅速に測定する必要のあるスクリーニング等に非常に有用であると考えられた。

引用文献

- [1] Pastor J, Cuenca R, Velarde R, Marco I, Viñas L, Lavín S : Evaluation of a haematological analyzer (Sysmex F-800) with equine blood, *J Vet Med A*, 45, 119-126 (1998)
- [2] Brun-Hansen HC, Kampen AH, Lund A : Hematologic values in calves during the first 6 months of life, *Vet Clin Pathol*, 35, 182-187 (2006)
- [3] Kramer JW : Normal hematology of cattle, sheep, and goats, *Schalm's Veterinary Hematology*, Feldman BF, et al eds, 5th ed, 1075-1084, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2000)
- [4] Morris DD : Alterations in the Erythron, *Large Animal Internal Medicine*, Smith BP eds, 3rd ed, 415-419, Mosby, Inc, St Louis (2002)

- [5] Knowles TG, Edwards JE, Bazeley KJ, Brown SN, Butterworth A, Warriss PD : Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age, *Vet Rec*, 147, 593-598 (2000)
- [6] Egli CP, Blum JW : Clinical, haematological, metabolic and endocrine traits during the first three months of life of suckling simmentaler calves held in a cow-calf operation, *J Vet Med A*, 45, 99-118 (1998)
- [7] Zanker IA, Hammon HM, Blum JW : Delayed feeding of first colostrum: are there prolonged effects on haematological, metabolic and endocrine parameters and on growth performance in calves?, *J Anim Physiol a Anim Nutr*, 85, 53-66 (2001)
- [8] Mohri M, Sharifi K, Eidi S : Hematology and serum biochemistry of Holstein daily calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults, *Res Vet Sci*, 83, 30-39 (2007)
- [9] 川村清市 : 臨床検査項目の基準範囲, 獣医内科学 (大動物編), 日本獣医内科学アカデミー編, 331-336, 文永堂出版, 東京 (2005)
- [10] Ohnuma O, Shirata Y, Miyazawa K : Use of theophylline in the investigation of pseudothrombocytopenia induced by edetic acid (EDTA-2K), *J Clin Pathol*, 41, 915-917 (1988)
- [11] Sakurai S, Shiojima I, Tanigawa T, Nakahara K : Aminoglycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia, *Br J Haematol*, 99, 817-823 (1997)
- [12] 白石順一, 松本英彬, 平山秀樹 : 多項目自動血球計数装置による各種動物血の測定, *Sysmex Journal Web*, 7, 1-8 (2006)
- [13] 寺澤早紀子, 小岩正照, 大塚浩通 : 自動血球計数装置を用いた子牛の免疫能のモニタリング—末梢血リンパ球の自動測定—, *臨床獣医*, 25, 66-69 (2007)
- [14] Rioud 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)
- [15] Bauer NB, Nakagawa J, Dunker C, Failling 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)

An Evaluation of the Reliability of an Automated Hematology Analyzer in Counting the Blood Cells of Japanese Black Calves

Hitoshi ANO, Takuji WAKATSUKI, Tetsuo NASU, Mitsuyoshi HAGIO and Hiromu KATAMOTO[†]

* Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1, Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki, 889-2192, Japan

SUMMARY

We collected blood samples from 45 Japanese Black calves (healthy calves, 35; diseased calves, 10; 1-30 weeks old) and measured their blood cell counts and erythrocyte indices both manually and using an automated hematology analyzer. Although the correlation between the values derived from a manual count and that using an automated hematology analyzer were low for red blood cell counts ($r = 0.426$) and platelet counts ($r = 0.513$), a high correlation was observed for white blood cell counts ($r = 0.705$). The results of this study proved that counting blood cells in calves using an automated hematology analyzer, whose reliability had previously been considered to be low, was reliable to a certain degree using an improved automated hematology analyzer. — Key words : automated hematology analyzer, blood cell count, Japanese Black calves.

[†] Correspondence to : Hiromu KATAMOTO (Department of Veterinary Internal Medicine, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

1-1, Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki, 889-2192, Japan

TEL · FAX 0985-58-7277 E-mail : katamoto@cc.miyazaki-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 859 ~ 862 (2013)