

9 血液塗抹標本の作製と白血球形態観察に関する考察

○藤森 英雄

要 約

地方病性牛白血病対策の一環で血液塗抹検査の機会が多くなっている。その中で「異型リンパ球」の判断に苦慮することが多く、他県でも同様と考えられる。つくば病理談話会（第 213 回、平成 29 年 9 月 29 日開催）に、持続性リンパ球増多症牛の血液塗抹標本を提出したところ、「リンパ球異型率」は「数%」から「ほとんど全て異型」と見解が一定しなかった。また、「用語の適正使用」、「標本の作り方による形態への影響」、「異型の判断は主観」といった意見も出された。このことは、血液塗抹検査の標準化がされていないことが原因と考え、標準化の一助とするために標本の作製方法、白血球形態観察について若干の検討を行った。

作製方法では、ウエッジ法とクラッシュ法の標本で形態の比較したところ、適切な部位で観察すれば、影響は少ないと考えられたが、個体によってはクラッシュ法で同定不能な崩壊細胞の増加が懸念された。染色では、メイグリンワルド・ギムザの重染色が適切であり、希釈緩衝液の pH は色調に影響する要因の 1 つであった。リンパ球の形態観察では、医療分野での鑑別法を参考にし、細胞の大きさ、核の形状、核・細胞質比 (N/C 比)、核クロマチン、細胞質の状態 (色調、顆粒、空胞など) を観察ポイントとした。さらに、医療分野では反応性での形態変化を「異型リンパ球」、腫瘍性での形態変化を「異常 (病的) リンパ球」と区別しており、家畜衛生分野での「異型リンパ球」が反応性・腫瘍性のどちらを指しているのかは明確ではないが、この区別方法はわかりやすいと思われた。

標本の良否が、その標本から得られる情報の良否にも反映すると言われており、血液塗抹標本から得られる情報を評価するには、医療分野に倣った標準化を目指し、同じ土俵で論じられることが大切であると感じた。

(本演題は、口頭発表で要約と図表のみ掲載しています。)

他県では血液塗抹検査の実施？
異型リンパと呼ばれているリンパ球？ → **血液塗抹標本に関する調査**

・調査対象 平成29年度病理分科会名簿中、秋の研修会に参加(予定)の47名(各県1名)
実施:平成29年6月上旬 回答数:18県 (38%)

・方法:7設問に対し、回答項目(選択肢)を提示して選択、または具体的に記載

問1 血液塗抹標本の鏡検は？ → **実施する**

問2 実施する場合、どのような事例、症例で実施しますか？ → **ルーチン、事例により**

問3 血液塗抹標本を観察する場合、どなたが主に検査しますか？ → **生化学担当、事業の担当、病理担当**

問4 牛白血病対策で末梢血中のリンパ球の形態観察の意義は？ → **意義ある**

問5 「異型リンパ球」の判断は？ → **難しい**

問6 病性鑑定指針以外で、公表されている「異型リンパ球の基準、定義」？ → **知らない**

問7 「異型リンパ球」について、貴県での「基準や定義」の有無？ → **ない**

家畜共済における臨床病理検査要領(平成17年3月) (P36~)

(9)リンパ球の増加

・細菌・ウイルス感染症でリンパ球が増加 → 免疫能が高まっていることの反映 → **異型リンパ球**が出現

・牛白血病ウイルス感染牛(20~30%) → **持続性リンパ球増多症**
形態上は正常なリンパ球が増加(1万~3万/μL)、これは腫瘍化とは別の現象

・腫瘍を発生する感染牛(0.1%以下)は多数の**異型リンパ球(大型で不規則な核の形状を示し、細胞質は弱紫色に染まる)**が観察される

(10)リンパ球の減少

(11)異形リンパ球

抗原刺激によって活性化した非腫瘍性の異常リンパ球で、次のような形態的特徴を持つ。

a 細胞質と核の大型化	e 単球様の核形を持つものがある
b 細胞質の塩基性が強い	f 核小体が明瞭なものがある
c 核のクロマチン構造が粗い	
d 細胞質内に空胞を持つものがある	

ポイント! ・形態
・染色
・腫瘍化(多数)

家畜共済・臨床病理検査要領(H17年3月)

ホルスタイン♀、左右眼球突出、元氣消失、後肢ふらつく。
WBC 21,800、RBC330万、LVがほとんどを占め異型性、大小不同が顕著

大小不同の異型リンパ球 核の切れ込みが強い異型リンパ球

異型リンパ球として示されている写真

動物研ニュースNO.59 (2015.9.30) 牛白血病診断便覧(昭和61年・日本獣医師会) 家畜血液学図説:チクサン出版 1989年10月第3版

病性鑑定指針(病鑑マニュアル)
リンパ球の異型性について
正常リンパ球より大型で、不規則な核の形態を示し、細胞質は濃染する

ポイント! ・形態
・染色

当所で扱う生体の全血(EDTA加血液)の検査

地方病性牛白血病(EBL)対策を実施 → 検査数増加

検査項目(通常)

◎全血算(CBC:complete blood count) → 血球計算装置

◎血液塗抹検査
＜白血球の分類＞
白血球(リンパ球)の観察 → 担当者

血球数(リンパ球)の算定
↓
ECの鍵の判定

・EBLが疑われるような症例(体表リンパ節の腫脹等):治療 or 出荷 or 経過観察?
→ 迅速な診断(判断)

・診断予防技術向上対策事業(H28、H29)
＜EBLの監視診断体制強化に関する診断予防技術の向上＞

↓
対象牛は**異型リンパ球の測定** → 定義とカウント方法？

↓
本事業の全国検討会で要望

診断予防技術事業におけるEBLの異型細胞率の算出方法 (H29年9月19日回答)

血液塗抹で白血球を100個または200個数え、その際、正常なリンパ球と異型細胞をそれぞれカウントします。
異型細胞率は、異型細胞数/(正常リンパ球数+異型細胞数)×100(%)としてください。
ここで、**異型細胞**とは、核の形状等が正常なリンパ球と異なる**腫瘍性のリンパ球**とします。
なお、この算出方法は、本事業限りとして示すものですので、御留意ください。

ポイント! ・形態
・腫瘍性

家畜診療・牛白血病診断における異型リンパ球の形態学的検査の進め方(2016.5)

血液塗抹標本の形態観察
医療分野(臨床検査技師) 日本検査血液学会標準化委員会などで検討

家畜衛生分野?

持続性リンパ球増多症牛(PL牛)を継続検査 → つくば病理(H29.9.29)に血液塗抹標本

提出理由 ① 持続性リンパ球増多症牛の血液塗抹標本(特にリンパ球)の見方
② この標本の「リンパ球の異型率」は?

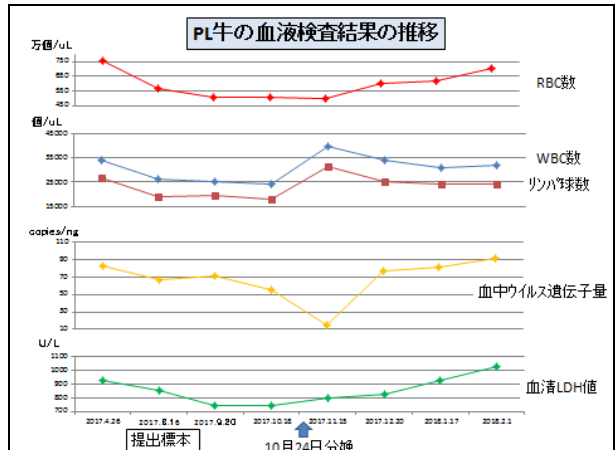
「つくば病理談話会」とは 農研機構HPより引用
前身は「東京病理談話会」、都道府県の病性鑑定病理部門で実際に携わるの方々を中心
に、家畜衛生試験場(現・動物衛生研究部門)が茨城県(つくば市)に移転する前から開
催。つくば市へ移転後、「つくば病理談話会」として再発足し、年5回のペースで実施。

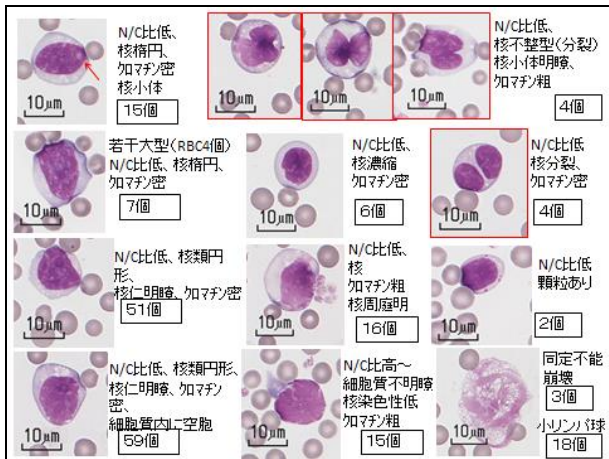
本談話会の目的
参加者の病理標本を見る力や発表する能力を高めること、会員機関に前もって標本を
配布し、提出標本を中心とした討議(時間を多くとり、参加者それぞれの質問や経験を
踏まえた上で各自が勉強することが出来る。
診断の難しい症例や興味深い症例ばかりでなく、よく見かける症例なども提出される。
このことは、家畜防疫上、疾病診断の共有という面でも重要と考えている。

対象牛 ●飼養規模:搾乳牛約40頭
仔牛5頭(育成牛は、預託)

H29.9.20撮影(乾乳中)

2010(H22)年12月17日生まれ
最終分娩 H29年10月24日 4産
臨床症状なし(H29年4月以降)
ECの鍵:真症





発表後の主な意見

- ・リンパ球異型率は、「数%」から「ほとんど全て」(見解不一致)
- ・「核が分裂」→「有糸分裂」? 別の言葉がよい(用語の適正使用)
- ・崩壊細胞は塗抹標本の作製方法が原因ではないか?(アーチファクト)
- ・医療分野でもウエッジ法で作製。クラッシュ法は壊れやすいのでは?
- ・大型の細胞は壊れやすい
- ・標本の見場所によって違ってくるのでは?
- ・赤血球にこっ付いている白血球が多く、それはカウントしなかった
- ・異型の判断は主観

検討・確認項目

- ①作製方法(崩壊細胞の出現、観察部位)
- ②染色液の希釈液(緩衝液のpH)
- ③染色法(単染色、重染色)
- ④塗抹後の染色時期(当日、翌日以降)
- ⑤リンパ球の鑑別

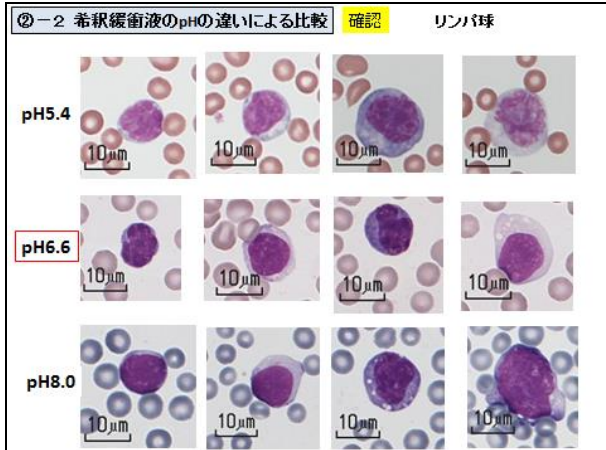
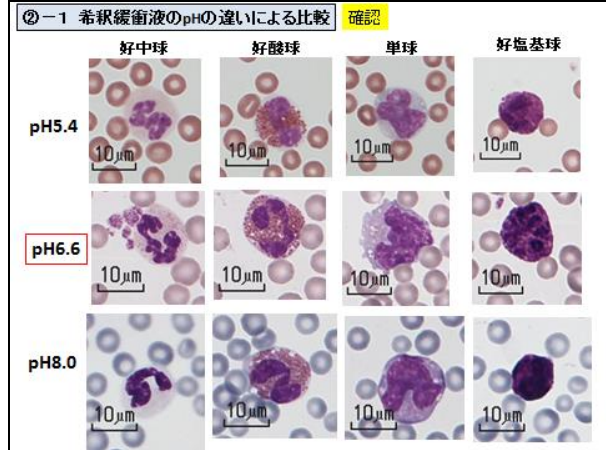
※検体の取り扱いについては、今回は未検証(従来通り)

例えば

採血方法、採血量、採血から検査までの時間、保管状況 など

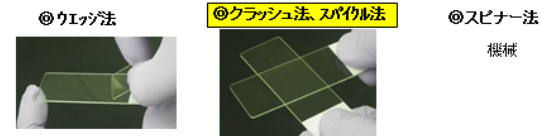
真空採血管の適正量、保冷バックで冷蔵保管・運搬、採血後2~5時間

(医療分野での血液塗抹標本検査を参考)



血液塗抹標本(提出標本)の作製

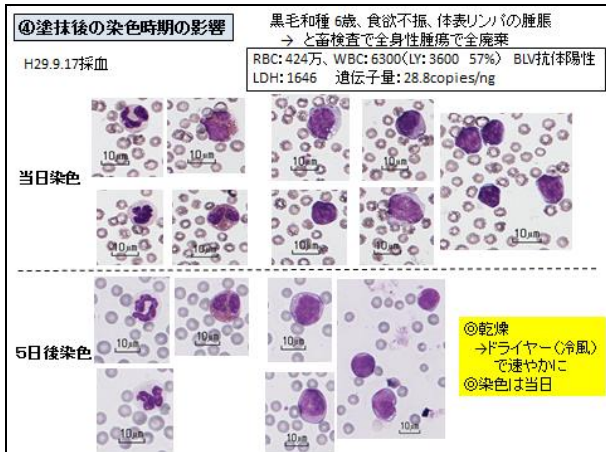
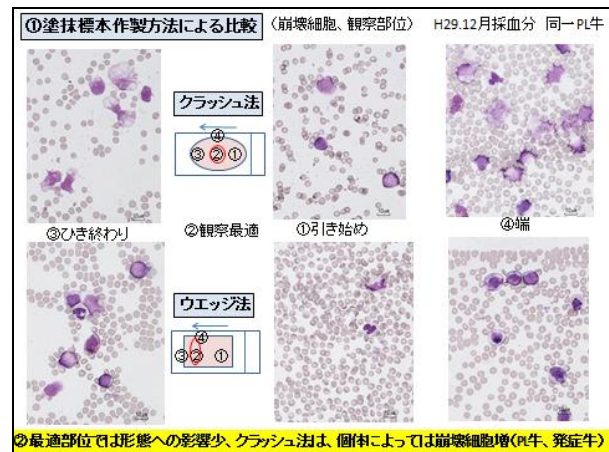
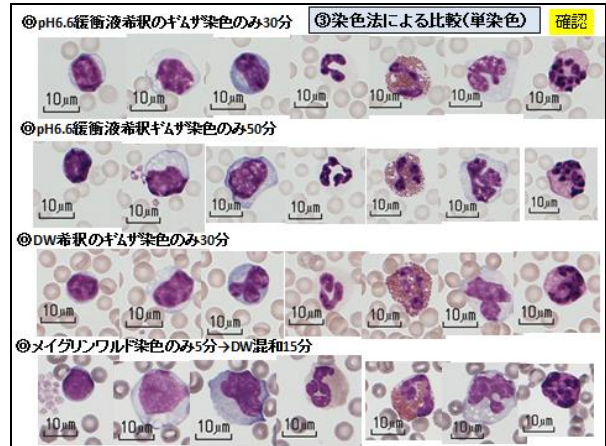
スライドガラス(MATUNAMI S2441) 脱脂:100%エタノール約10分間浸漬



血液量:3μl (医療分野では5~7μl)

メイ・ギムザ(M-G)染色(翌日) 医療分野では、メイグリンワルドとギムザの重染色は必須
 メイグリンワルド 2分 → その上にDW混和 3分 → それを捨て、ギムザ15分 → 水洗・乾燥 → 封入

ギムザ染色液の希釈 ゼーレンのpH緩衝液 pH6.6 (使用時10倍希釈)



リンパ球の鑑別 (医療分野)

正常リンパ球と比べて、
形態に異常、腫瘍性によるものを**異常リンパ球**、
反応性によるものを**異型リンパ球**

異常リンパ球	① N/C比高 ② 顕著な核形不整 ③ 明瞭な核小体 ④ 核網は粗網~粗荒 ⑤ 奇妙な突起 ⑥ 空胞(脂肪)
異型リンパ球	① 大型(16μm以上) ② N/C比低 ③ 核網粗荒 ④ 強好塩基性

白血病やリンパ腫など様々な疾患で見られる。
特徴 ・大リンパ球のような細胞形態
・単球のような細胞形態
・形質細胞のような細胞形態
・核小体を持つもの

観察のポイント

- ① 細胞の大きさ
- ② 核の形状
- ③ 核・細胞質比(N/C比)
- ④ 核クロマチン
- ⑤ 細胞質(色調、顆粒、空胞、封入体など)

18

用語についての整理

引用:「ネットで形態」血液形態自習塾
形態観察の基礎知識
(基準案がないため私見)

異型リンパ球 atypical lymphocyte

‘異型’とは正常のリンパ球と比べると‘**異常に見える**’という意味で腫瘍細胞の性質を持ったリンパ球ではありません。すなわち**反応性の変化として捉えます**。健康小児で10%未満、成人でも3%未満に末梢血に見られると言われています。抗原刺激を受けたリンパ球は大型化し、細胞質には好塩基性一面が広がって見えるか放射状に走るように見えます。

異常(病的)リンパ球 abnormal(pathological) lymphocyte

異常リンパ球は**腫瘍性の形態変化(異型性)**として捉え、大型化、核形不整、明瞭な核小体、細胞質の突起、空胞などの形態所見で、**単一**(同じような細胞が腫瘍性が増加する)様式をとることが多いようです。

「多彩」と「単一」

細胞の出現様式を表現する際に用いる用語で、前者はバリエーションに富むもので、後者は同一細胞が増加するパターンを指すものです。原則として多彩は反応性に、単一(monotonous)は腫瘍性に用いるようにしています。

引用:平成19年度 血液精度管理研修会
特別講演「血液形態検査の標準化」

「反応性」と「腫瘍性」

反応性(良性)と腫瘍性(悪性)の鑑別点は血液細胞の増減による**臨床経過と形態所見**の各々の違いによる。一概には言えない場合があるが次に示す。

○臨床経過

- 一過性:一時的な増加、減少を示す。(反応性)
- 持続性:3か月、6か月と継続的な増加を示す。(腫瘍性)

○形態所見

- 異形成:分化・成熟段階に発生する成熟障害を指す。dysplasia (腫瘍性)
- 異型性:正常細胞とかけ離れた形態異常を指す。atypia (腫瘍性)
- 単一様式:同系、異系細胞の単調性を指す。(腫瘍性)
- 多彩様式:同系、異系細胞の多様性を指す。(反応性)

まとめ

- ◎ PLNの血液塗抹標本を多人数で観察→リンパ球異型率の見解が不一致
- ◎ 塗抹標本の作製方法、染色方法は、形態観察に影響する要因
→ 具体的に確認
- ◎ 家畜衛生分野で使う用語の整理
- ◎ 形態観察のポイント

↓

医療分野に倣った標準化

定法?

- ・塗抹標本作製は**エッパ法**(板血後速やかに)
- ・乾燥は、**ドライヤー**で速やかに
- ・塗抹当日に**メイグリンワルド・ギムザ**染色
- ・希釈緩衝液pHは**明確(6.6)**
- ・形態観察のポイントに基づいた分類

検体の取り扱い、今後の検討課題