ヘムメーターを用いたホルスタイン雌牛の血球数測定

澤崎 徹* 持丸 均* 小山徳義* 小池幸良* 入江 猛* 加納康彦*

(昭和 59 年 3 月 16 日受理)

An Automatic Blood Cell Counter Applied to Holstein Cows
TORU SAWASAKI et al. (Stock Farm, Faculty of Agriculture, University of
Tokyo, Iwama, Ibaraki, 319-02)

SUMMARY

The Hemmeter (Chugai Pharmaceutical Co. Tokyo) is an automatic blood cell counter with which blood cells can be counted by its optical system. It was applied to Holstein cows.

It was found to be superior to the hemocytometer in reproducibility and facility in counting. In the erythrocyte count, the correlation was low ($r=0.551$) between the two methods. In the leukocyte count, the coefficient of correlation was 0.925 between the two methods, but the count with the Hemmeter was approximately 20 % higher than that with the hemocytometer. Therefore, it was difficult to utilize the Hemmeter, with the present adjusting, for the blood cell count especially the erythrocyte count, in Holstein cows.

要 約

ヘムメーター（中外製薬）は、光学的に血球数を測定する自動血球計算器である。著者らは、このヘムメーターが、ホルスタイン雌牛の血球数測定に应用できるか否かについて検討した。

- 1) ヘムメーターの再現性は、視算法に比較し、より優れており、また測定操作も簡便であった。
- 2) 赤血球では、視算法との相関係数は低く、 $r=0.551$ であった。
- 3) 白血球では、相関係数は $r=0.925$ であったが、ヘムメーターによる結果は視算法に比し約 20% 高い値を示した。
- 4) いずれにせよ、とくに赤血球においては、今回使用した設定条件のままでは実用上満足できる成績は得られなかった。

血液性状の諸変化を知ることは、家畜の生理状態を把握するためにきわめて重要であり、その基本的項目の一つとして赤血球数、白血球数 (RBC, WBC) があげられる。血球数算出法としては、各種計算板を用い、顕微鏡下で計測する視算法（顕微鏡法）や、各種の自動血球計算器の利用などがあるが、熟練を要することや、計数器の価格の面などに問題があった。

最近、熟練を要せず、迅速かつ再現性が高く、コンパクトで比較的廉価である自動血球計算器（ヘムメーター、中外製薬、写真1参照）が市販され、ヒトの血球では、十分実用に耐えるという報告がなされており^{1,4)}、また家畜の分野では安田ら⁵⁾の応用例がある。

本器は、視算法を機械化したもので、投影された血球

の像をイメージセンサー（1辺 15 μm 程度の方型太陽電池素子が直線上にならんだもの）で1個1個数え、計

写真1 ヘムメーターの外観

* 東京大学農学部附属牧場（茨城県西茨城郡岩間町安居3145）

算板上の単位体積中の血球数を算出する。血球 1 個ごとの識別は次の原理による。イメージセンサーに光を照射した際、血球像が投影されている素子とされていない素子では、受光面に達する光量が異なり、各素子に異なった電荷を集積する。よって、血球像の投影された素子は低電圧パルスを、影のない素子は高電圧パルスを得るため、血球 1 個 1 個の算定が可能となる。

本報告は、家畜のなかでも血球数を測定する機会が最も多いと考えられる牛の血球数計測に、ヘムメーターの利用が可能か否かを検討したものである。

1. 材料および方法

1) 供試動物

供試したホルスタイン雌牛は、東京大学農学部附属牧場で飼養されている 10 カ月齢から 13 才までの 30 頭である。これらは、牛乳生産を目的として飼養管理されており、その内訳は、泌乳中のもの 15 頭、乾乳期で妊娠中のもの 8 頭、育成中のもの 7 頭である。

採血は、EDTA-2K を含む真空採血管を用い、頸静脈から行った。

2) ヘムメーターによる測定法

血液の希釈は専用希釈液を用いて行った。赤血球希釈液は塩化ナトリウム、ホルマリン等を含み、白血球希釈液は臭化セチルトリメチルアンモニウム、氷酢酸等を含む。使用法に従って希釈すると、赤血球の場合は 2,121 倍、白血球では 21 倍の希釈となる。この血球希釈検体の約 20 μ l を、専用の血球計算板に注入し、本体のスラ

イド台に乗せ計数器の奥へ押し込む。スライド台は徐々に自動的に移動し、この間に計数が行われ数値が表示される。校正は CAL スイッチを押し、ADJUST ダイヤルを回して調整し、校正基準値が設定されたとき STAND BY ランプが点灯する。他の操作としては、RBC, WBC いずれか計測したい項目のスイッチを押すのみである。

3) ヘムメーターの再現性および視算法との相関

ヘムメーターの再現性については、同一計算板での繰り返し測定により行った。また複数の希釈検体を用い、希釈操作をも含めた再現性についても検討を加えた。視算法は、改良型ノイバウエル計算板を用い、常法に従って行い、ヘムメーター法による結果との相関性について検討した。

4) ヘムメーターによる RBC の測定範囲

本器の仕様書に示された RBC 測定範囲の上限、 $650 \times 10^4/\text{mm}^3$ を超えた場合、計測可能か否かを検討した。使用法に従った希釈倍率 2,121 倍をはさみ、5,271 倍と 1,071 倍の希釈列を 5 頭の牛の血液を用いて作り、各々ヘムメーター法によって測定した。

2. 結果

1) ヘムメーターの再現性

乳牛 15 頭の血液を用いて、一測定者が各検体を同一計算板で連続 10 回測定し、ヘムメーターの再現性について検討した。10 回連続測定の RBC の平均値は $403 \sim 557 \times 10^4/\text{mm}^3$ の範囲にあり、変動係数 (CV) は 1.76

表 1 ヘムメーター法の再現性

		希 計 算 板	同一計算板 3 回繰り返し			3 回繰り返しの平均 と変動係数		a. b. c の平均と変動 係数		A. B. C の平均と 変動係数	
			1st	2nd	3rd	mean ± SD	CV(%)	mean ± SD	CV(%)	mean ± SD	CV(%)
赤 血 球 数 10 ⁴ /mm ³	A	a	473	490	485	482.7± 8.7	1.81	460.8±19.3	4.20	461.0±10.5	2.28
		b	452	442	444	446.0± 5.3	1.19				
		c	449	444	468	453.7±12.7	2.79				
	B	a	466	460	446	457.3±10.3	2.24	450.0± 6.5	1.45		
		b	440	446	447	444.3± 3.8	0.85				
		c	462	441	447	450.0±10.8	2.40				
	C	a	479	490	483	483.0± 7.0	1.45	471.6±13.3	2.82		
		b	473	475	476	474.7± 1.5	0.32				
		c	471	456	444	457.0±13.5	2.96				
白 血 球 数 10 ² /mm ²	A	a	86	87	89	87.3± 1.5	1.75	91.1± 3.4	3.69	90.4± 1.9	2.05
		b	91	93	93	92.3± 1.2	1.25				
		c	94	95	92	93.7± 1.5	1.63				
	B	a	88	85	85	86.0± 1.7	2.01	91.8± 5.3	5.73		
		b	94	92	93	93.0± 1.0	1.08				
		c	95	96	98	96.3± 1.5	1.59				
	C	a	87	87	85	86.3± 1.2	1.34	88.3± 1.6	1.79		
		b	89	89	88	88.7± 0.6	0.65				
		c	90	90	89	89.7± 0.6	0.64				

表2 視算法の再現性

			A,B,C の平均と 変動係数	
	希 算 血	a.b の		
	積 室 球	平 均	mean±SD	CV(%)
RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	A	{ a 578	583.0	585.2±8.0 1.37
		{ b 588		
	B	{ a 597	594.0	
		{ b 591		
	C	{ a 592	587.5	
		{ b 565		
WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	A	{ a 64.8	60.2	66.5±5.4 8.12
		{ b 55.5		
	B	{ a 69.8	69.3	
		{ b 68.8		
	C	{ a 67.3	69.9	
		{ b 72.5		

～4.06%の範囲であった。そこで上記の結果をもとに、血液の希釈操作を含めた、ヘムメーター法の再現性について検討を加えた。

RBC, WBCともに3本の希釈検体を用意し、1本ごとに3枚の計算板に希釈液を注入した。同一計算板は3回繰り返し測定した。表1は、こうして得られた1頭の牛の計測例である。表中、3回繰り返しの平均と変動係数の項にみられるように、ヘムメーター自体の再現性は、3%以内であったが、RBCのA、WBCのBに見られるように、同一希釈検体内において3%以上のバラツキが見られた。この傾向は、同一方法で行った、他7頭の牛においても見られ、とくにWBCにおいて顕著であった。

視算法についても同様に再現性について検討した。表2にその1例を示した。供試血液は表1に示したものと同じものである。

8頭の牛について以上の結果をまとめると、RBCについては、ヘムメーターでCVは平均2.1%、最大5.1%、視算法では平均4.3%、最大10.3%、WBCでは、ヘムメーターで平均3.9%、最大8.1%、視算法で平均6.0%、最大15.1%であり、ヘムメーター法の再現性は視算法に優ることは明らかであり、再現性や簡便さに関しては実用上問題はなかった。

2) ヘムメーター法と視算法の相関性

前述したように、ヘムメーター法の再現性が比較的良好であるから、視算法との相関性を検討するに当たっては、次のような方法で行った。

ヘムメーター法では、1検体につき2本の希釈検体を用意し、各々同一計算板で3回連続測定し、平均値を求めた。2つの希釈検体の差が5%以上の場合には、再度希釈から計測を行い、3者の平均を検体の値とした。

視算法では、1検体につき2本のメランジュールで希

釈し、常法に従って各々2回計測し、その平均を求めた。ヘムメーター法と同様に、希釈検体の差が5%以上の場合は、再度希釈操作から改めて計測し、3者の平均を求めた。

ヘムメーター法と視算法との相関性については、図1にRBC、図2にWBCの結果を示した。 x 軸にはヘムメーター法による、また y 軸には視算法による結果を示した。図に示したように、RBCの相関係数は0.551、WBCは0.925であり、回帰直線はそれぞれ、 $y=1.34x-35.7$ および $y=0.813x-0.809$ であった。

3) RBCの測定範囲

ヘムメーターでの、RBCの測定範囲について検討した結果は図3に示すとおりであり、ここで得られた相関係数0.989は、 $800 \times 10^4/\text{mm}^3$ と、本器の仕様書にある測定範囲を超えても、十分に測定可能であることを示している。

図1 赤血球数におけるヘムメーター法と視算法の相関

図2 白血球数におけるヘムメーター法と視算法の相関

図3 ヘムメーター法による希釈列と赤血球数

3. 考 察

ヘムメーターは、視算法を機械化した自動血球計算器であり、ヒトの血球計算には十分実用が可能であることが報告されている^{1,4)}。著者らは、このヘムメーターが牛の血球計測に利用することができるかを、視算法との比較を中心に検討した。

複数の検体を繰り返し測定することにより、再現性について検討を加えた結果、視算法に優る再現性が得られ、操作の簡便さとともに実用上問題はなかった。ただし、同一希釈検体を反復して測定した場合に見られるバラツキは、オートピペットでの希釈操作とともに、いかに均一な希釈検体が得られるかが再現性を左右することを示している(表1)。

ヘムメーター法と視算法の相関性を検討した結果、RBCにおける相関係数は0.551であり、WBCにおいては0.925であった。この結果は、大橋と久米¹⁾、新沼と菅沼⁴⁾のヒトでの報告に比し、WBCについてはほぼ同様であったが、RBCについては相関性はきわめて低かった。

RBCにおいて相関性を低下させる原因として、次の2点が考えられた。

1) 図1に見られるように、ヘムメーター法では、RBCの上限が $600 \times 10^4/\text{mm}^3$ 台であることから、仕様書に示されたRBCの測定範囲の上限 $650 \times 10^4/\text{mm}^3$ を超えた場合の数え落し、および、2) 設定範囲外の直径をもつ血球の数え落し、の2点である。1) については、図3に示したように、 $800 \times 10^4/\text{mm}^3$ と本器の仕様書にある測定範囲を超えても、十分に測定可能であり、視算法との相関性の低さは、数が多すぎた場合の単なる数え

落し、によるものではないことは明らかである。

図4は、相関性を検討するために得られた結果を、年齢別にグラフにしたものである。●印は視算法での、○印はヘムメーター法での測定結果であり、破線は、年齢毎の平均値を結んでいる。ただし、4, 5才および6才以上を各々1群とした。図で見るとおり、視算法では、3才以下では若齢牛ほどRBCが多く、3才以上ではほぼ一定していた。いっぽう、同一検体のヘムメーター法での結果は、平均値では $500 \times 10^4/\text{mm}^3$ の前後であり、視算法での結果ほど年齢との関係は明らかではなかった。両方法での計測結果の差は、3才以上では、約 $100 \times 10^4/\text{mm}^3$ であるが、若齢になるほど差は大きく、1才以下では約 $350 \times 10^4/\text{mm}^3$ となった。

若齢になるほど、視算法とヘムメーター法との計測値の差は大きくなるが、これは、RBCの増加による数え落しでないことは前述した。そこで考慮すべき点は、牛の赤血球の大きさであろう。牛の赤血球の直径は、成牛で $4.0 \sim 8.0 \mu$ 、平均 5.8μ ³⁾、 5.9μ ⁵⁾であり、ヒトでは $7 \sim 8.5 \mu$ ²⁾とされており、牛の赤血球はヒトの赤血球よりも小さい。また若齢牛の平均赤血球容積は成牛に比べて小さいことが知られている³⁾。これらから判断すれば、ヘムメーターはヒトの血球の大きさを基準に測定範囲が設定されており、この設定のまま牛のRBCに応用する場合は、血球の大きさによる測定誤差が大きく、とくに赤血球容積の小さい若齢牛に顕著であると考えられた。しかし、相関性をきわめて低くしている2.5才以下の牛10頭を除いた場合でも、RBCの回帰式は、 $y = 1.15x + 10.14$ 、相関係数は0.703であり、実用上満足できる成績は得られなかった。

図4 赤血球数の年齢および測定法による相連

WBC については、相関係数 0.925, 回帰式 $y=0.813x-0.809$ より、牛への応用が可能であるとも考えられたが、ヘムメーター法では、視算法に比較すると 2 割程高い値を示した。この原因については現在のところ明らかではなく、今後の検討が必要であろう。

いずれにせよ、今回使用した設定条件のままでは、とくに赤血球については実用上満足できる成績を得ることは困難であり、牛の血球数測定のためヘムメーターの利用を計るに当たっては、血球容積の変化にまで対応可能な測定機能を備えるなど、いっそうの改良が望まれる。

参考文献

- 1) 大橋儀光, 久米章司: 臨床検査機器・試薬, 5, 30

- ~34 (1982).
- 2) 佐々木匡秀, 北村元佐, 上田尚紀, ほか: 人体成分のサンプリング 血液, 267, 講談社, 東京 (1978).
- 3) SCHALM, O. W., JAIN, N. C. and CARROLL, E. J.: *Veterinary Hematology*, 3rd ed., 122~127, Lea & Febiger, Philadelphia (1975).
- 4) 新谷和夫, 菅沼 清: 臨床検査, 26, 232~236 (1982).
- 5) SWENSON, M. J.: *Dukes' Physiology of Domestic Animals*, SWENSON, M. J. editor, 8th ed., 35, Cornell University Press Ltd., London (1975).
- 6) 安田 準, 三田久美子, 山我義則, ほか: 北獣会誌, 26, 263~266 (1982).

Simplate を応用した犬の出血時間測定法の検討

林 隆敏* 鬼頭克也* 迫 悟* 山根乙彦*

(昭和 59 年 2 月 17 日受理)

Evaluation of the Simplate for Bleeding Time Determination in Dogs
TAKATOSHI HAYASHI et al. (Faculty of Agriculture,
Tottori University, Tottori 680)

SUMMARY

The Simplate is a device developed for bleeding time determination in man. It was applied to dogs with efficiency. In dogs, bleeding time determination was performed on the dorsum auricularis. In it, pressure on the ear was maintained constant by installing an ear support and a pressure tube devised to eliminate the effect of a blood capillary. As a result, the reproducibility and sensitivity of the Simplate were satisfactory.

In 40 healthy dogs normal bleeding time was 3.6 ± 1.56 minutes, as determined by the Simplate, and 4.9 ± 1.03 minutes, as determined by the Simplate and a pressure device installed.

要 約

ヒトの出血時間測定用に開発された Simplate 装置を用いて、犬の出血時間の測定法を検討したところ、本装置の犬への応用ができることが判った。測定は耳介背面で実施した。また、毛細血管の影響の除去のために考案した耳型およびマンシエットを装着し、一定加圧を行って測定したところ、再現性・鋭敏性で満足のいく結果が得られた。

健康犬 40 例を用いて Simplate による健康値を求めたところ、Simplate 装置単独使用 (Simplate 法) では 3.6 ± 1.56 分、加圧装置装着 (Simplate 変法) では 4.9 ± 1.03 分 (平均 $\pm$ SD) であった。

出血時間の測定は凝固系検査のスクリーニングの一つであり、従来から Duke 法³⁾, Ivy らの方法⁶⁾ および

BORCHGREVINK らの方法²⁾ が知られている。犬における出血時間の測定は、口唇部、鼻背部などで Duke 法を用いて行った報告があるが^{4, 8)}、穿刺刃および穿刺創の大きさなどが一定でないため、出血時間の比較が困難であ

* 鳥取大学農学部 (鳥取市湖山町南4-101)