



自動血球分析項目の精確さ検証と標準化の現状

なが い ゆたか
永 井 豊
Yutaka NAGAI

はじめに

血液検査項目の標準化推進には、外部精度評価 (external quality assessment: EQA) における精確さの評価が重要となる。複数の外部精度評価調査スキーム (EQA scheme: EQAS) で実施される評価法は様々であり、認証標準物質 (certified reference material: CRM) による正確性評価が可能だが、CRM が利用できない血球分析項目では、新鮮血液を利用しなければ、マトリックス効果が生じない正確性保証が困難な状況である¹⁾。新鮮血液標準試料に対する値の付与の取り組みは、国際調和プロトコル (international harmonisation protocols)²⁾ に整合した標準作業手順書 (Standard Operating Procedures: SOP) の提供、および目標値に対する臨床的な許容範囲設定法の実用検討というプロセスが必要となる。日本検査血液学会 (Japanese Society for Laboratory Hematology: JSLH) は、これらの活動を進めている。

本稿では、国内外における自動血球分析項目の精確さ検証および国際標準化スキームとの連携などを、臨床・検査標準協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI)、臨床検査医学におけるトレーサビリティ合同委員会 (Joint Committee On Traceability in Laboratory Medicine: JCTLM) での活動を交えて解説する。

I. 自動血球分析装置の精確さ検証の標準化

1. 目的と種類

臨床検査室が提供する測定値の精密性 (precision) と正確性 (accuracy) を保証するための精確さ検証は、検査室の遂行能力と方法の評価・教育を目的とした EQAS で実施される。EQA には、①外部精度評価プログラム (EQA Program: EQAP)・技能試験 (Proficiency Testing: PT)、②参照値が付与された評価試料を利用した再チェック・再検査、③同一評価試料を用いた検査室間のクロスチェック、④現場で品質要件を満たしていることを確認する直接評価 (On-site evaluation、上述の方法が実施できない場合に採用される) などがある³⁾。

2. 許容範囲判定のための評価法

現在、国内では複数の EQAS が存在しており、各 EQAS が設定している許容範囲の基準は様々である⁴⁾。その評価には、標準偏差指数 (Standard Deviation Index: SDI)、生理学的変動幅、変動係数 (Coefficient of Variation: CV)、技術水準、目標値などが利用されている⁵⁾。評価基準は、調査試料に付与された値に対して、臨床的に許容できる誤差範囲 (clinical allowance interval: CAI) 内であることが望ましい。しかし、SDI・CV などの統計量を基準範

1) 関西医療大学保健医療学部臨床検査学科 客員教授
☎590-0482 大阪府泉南郡熊取町若葉2-11-1
2) 慶應義塾大学医学部臨床検査医学 研究員
☎160-8582 東京都新宿区信濃町35
3) 日本検査血液学会 国際標準化担当幹事
☎160-0016 東京都新宿区信濃町35 信濃町煉瓦館5階

1) *Clinical Laboratory Science, Kansai University of Health Sciences (2-11-1, Wakaba, Kumatori-cho, Sennan-gun Osaka 590-0482)*
2) *Laboratory Medicine, Keio University School of Medicine (35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582)*
3) *International Standardization Secretary, Japanese Society for Laboratory Hematology (Shinanomachi Rengakan 5F, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0016)*

困として利用する場合は、調査対象機器の分析変動 (CV analysis: CV_A) などに影響されて、CAI を適切に反映できない場合もある⁶⁾。CAI は、生理学的変動幅による設定を利用すれば、CV_A の影響を受けずに個体内生理学的変動 (CV_I) および個体間生理学的変動 (CV_G) から算出できる⁷⁾。CV_A の測定結果分布が正規分布とならずに局在している場合には、配布試料のマトリックス効果が排除できていれば、各社が採用している国際調和プロトコル/校正手順/標準化状況などの違いに起因することが推測される。

3. 検査室認定に必要な外部精度管理調査方法の標準化

臨床検査室の認定/認証は、米国 CLIA'88 施行による FDA による認定義務付けから始まり、2000 年前後に米州・豪州・欧州・アジア州で急速に認定制度が定着してきた。その認定/認証を行う際の基礎資料となる EQA は標準化された方法で行うため、共通外部精度管理評価事業 (National EQAS: NEQAS) による統一した EQA が各国で実施されるようになり、日本でも NEQAS が構想された⁸⁾。標準物質・基準測定法・基準測定検査室の開発/認定/認証などの制度整備、および EQAS による調査方法・評価方法などの国内統一が期待された。日本医師会の主導により、日本医師会、日本臨床検査医学会、日本臨床衛生検査技師会、日本臨床衛生検査技師会、および日本衛生検査所協会の各代表により研究班が構成され、検討が行われ、2003 年に結果が報告されたが、設立には至らなかった。

II. 自動血球分析項目における正確性保証

血球分析項目の EQA では、CRM を利用できないため、新鮮血液に値を付与した実試料標準物質を利用しないと、特に測定原理が多様な血球分析装置を網羅した正確性保証が困難となる¹⁾。

1. マトリックス効果

EQA の配布試料は、多くの場合、保存加工処理をした評価試料 (加工血球) が利用されるが、自動血球分析装置の検出原理は各社ごとに異なるため、加工血球の測定値が各社で同じ値を示すことを保証できない⁹⁾。

2. 実試料標準物質

NEQAS 構想における共通精度管理調査実施に関する基本コンセプトには、血液学部門研究班から血球分析項目の正確性評価は新鮮血液で行うことが示されているが、ヒト新鮮血液でのサーベイ準備が整うまでは、加工血球の使用はやむを得ないと記載されている⁸⁾。現在、各社の自動血球分析装置で共通に使用可能な標準物質は供給されていないことから、国際調和プロトコル (改訂前は、国際常用基準測定操作法¹⁰⁾) で値付けした新鮮血液が、唯一各社共通に使用できる実試料標準物質 (新鮮血液キャリブレータ) となる¹¹⁾。

3. 校正階層と国際標準化適合

標準物質等により分析結果の遡源 (トレーサビリティ) を明確にすることを臨床検査機器・試薬製造業者に示した体外診断用医療機器指令 (IVDD)¹²⁾ は、現在、指令から規制 (IVDR)¹³⁾ への移行期間中で、2025 年 5 月の完全移行開始を控えている。2020 年、測定値の正確度保証に関する ISO⁷⁾ は大幅に改訂され、基準測定操作法および参照物質に関する ISO^{14, 15)} は、正確度保証の ISO²⁾ の一部として統合された。値が付与される標準物質は、キャリブレータに加えてヒト試料および真度管理用物質が明記され、精密度検証用のコントロール物質は正確性検証のスコープから外れた。製造業者向けに不確かさの計算方法が全 6 モデルごとに記載された²⁾。血球分析装置の主要な項目の測定系の遡源は SI 単位ではなく、国際調和プロトコルにトレーサブルであることが求められ、「校正階層のモデル 5」により遡源性および不確かさを含めた伝達性 (トランスファラビリティ) の提示が求められている。モデル 5 を対象とした個別の ISO も発行された¹⁶⁾。フローサイトメトリー法を用いた国際調和プロトコルにおいて、伝達性の検証に真度管理用物質が利用できるようになったため、校正検証の実務作業手順に合った校正階層の記載が可能となった。

4. 国際調和プロトコルと標準作業手順書

SOP は、JCTLM の登録審査では、ISO¹⁴⁾ に適合した参照測定手順 (reference measurement procedures: RMP) であることが検証される。国際調和

プロトコルは主に論文での提供が多いため、その記載内容を元に、臨床現場の誰もが再現可能な SOP が作成・検証される。さらに、基準測定操作法の内容と提示に関する要求事項等の ISO¹⁴⁾ に適合するための内容を含む。RMPとして仕上げるプロセスとなる。改訂された校正階層²⁾の国内への普及は始まったばかりであるが、国際調和プロトコル、SOP、RMPを明確に区別した議論が必要である。

III. 自動血球分析装置の精確さ検証条件と基準

1. 自動血球分析装置に必要な併行精度

血球分析項目の標準化が可能となる自動血球分析装置に必要な併行精度 (repeatability) は、CV₁の1/4～1/2と考えられている。それよりも大きいと、臨床的に個人の生理学的変動を捉えることができなからである。また、装置の再現性 (reproducibility) および日内日間の安定性が確保されていないと、校正作業期間は一点では不足となるため、始業時・終業時・週初め・週終わりの期間のデータから校正を実施することが望ましい。この観点では、近年の血球分析装置では高いレベルの再現性が確保されているため、一点での校正が実施されていることが実情である。

2. 国際調和プロトコルによる正確度評価が可能となる条件

実試料標準物質である新鮮血液に国際調和プロトコルで付与した値 (Assay) の CV_A は、自動血球分析装置より収束していれば、該当する血液分析項目の正確度評価が可能となる。

3. 臨床的に必要な精密度の評価基準

CV_A は、最低限 (Minimum)・望ましい (Desirable)・最適 (Optimum) の3段階に分けた評価が提示されており、目安として利用することが可能である^{17,18)}。

最低限 : $CV_A < 0.75 \times CV_I$

望ましい : $CV_A < 0.50 \times CV_I$

最適 : $CV_A < 0.25 \times CV_I$

4. 臨床的に許容できる誤差限界の算出法⁷⁾

CAIの中心は Assay とし、偏り (Bias) は生理学

的変動から算出した偏りの比率 (%Bias) から以下のように算出する。

$$CAI = \text{Assay} \pm \text{Bias},$$

$$\% \text{Bias} = 0.25 \times (CV_G^2 + CV_I^2)^{1/2}$$

5. 血球分析項目の国際標準化スキームと連携

JSLHは、国際標準化の動向を反映した精度保証の向上を図るため、国際血液学標準化協議会 (International Council for Standardization in Haematology: ICSH)、CLSI および JCTLM などの国際標準化スキームと連携しながら、血球分析項目の標準化推進を行っている。ICSHからは論文¹⁹⁾が、CLSIからは有料 SOP 等²⁰⁾が提供される。JCTLMはISO適合の認証機関として機能している²¹⁾。国際検査血液学会 (International Society for Laboratory Hematology: ISLH) では、各国の規格・ガイドライン等をホームページへ掲載している²²⁾。

IV. 標準化の現状と課題

1. 赤血球数 (red blood cell: RBC) および白血球数 (white blood cell: WBC)

国際調和プロトコルは、ICSHで規定されたインピーダンス法による単チャンネル測定法である^{23,24)}。JSLHはICSH国際調和プロトコルのRMPを作成し、国内製造業者のIVDR対応を目的として公開中である²⁵⁾。2023年、ICSH・JCTLM・JSLHで協議を行い、JSLHが公開中のRMPをJCTLMへ登録することで合意した。現在、JCTLMで審査中である。

2. ヘモグロビン (Hemoglobin: Hgb)

国際調和プロトコルは、ICSHとCLSIからシアンメトヘモグロビン法による吸光度測定が提示されている^{26,27)}。正確性保証のために540nmにおける分光光度計の校正および正確な希釈精度の確保が必要であり、4桁の有効数字を保証するために、5桁の希釈精度が必要となる。厳密に温湿度管理された秤量室で、蒸発や静電気の影響等を配慮する必要がある。比色分析法のICSH標準液が提供されており、分光光度計の検証に活用できる²⁸⁾。2023年、新ロット供給に向けたICSH標準液の値付けが4か国で実施され、JSLHはICSHから指名されて参加した。

自動血球分析装置では、反応速度や環境面の配慮から界面活性剤法等が採用され、反応原理と測光波長が異なる。調査試料に保存血球を利用する場合には、機種間差・原理間差を配慮する必要がある。

3. ヘマトクリット (Hematocrit: Hct)

国際調和プロトコルは、ICSH/WHO と CLSI で規定されたマイクロヘマトクリット法 (Packed cell Volume: PCV) である²⁹⁻³¹⁾。PCV 測定は、健常検体の新鮮血液で行うことが規定されているため、低値領域および高値領域では、国際調和プロトコルによる値が付与できない状況である。PCV は遠心後のマイクロキャピラリーチューブ内の赤血球層に含まれる血漿成分 (Trapped Plasma: TP) の影響を受ける。TP は健常検体で 1～3%、患者検体で 1～5% と報告されている³²⁾。TP の影響を受けない全血 Hgb と充填 Hgb の比から PCV を推定する方法が開示されたが、主流にならなかった³³⁾。

自動血球分析装置の容積測定は TP による影響を受けないことから、この差の補正法の違いにより Hct 値に校正差が生じる可能性がある。自動血球分析装置の Hct 値に対する TP 補正の有無は開示されておらず、メーカーや機種によって標準化が不明確である。

4. 平均赤血球容積 (mean corpuscular volume: MCV)

国際調和プロトコルは、CLSI が計算法 ($MCV = PCV/RBC$) を提示している。Hct と同様に、低値領域および高値領域では、国際調和プロトコルによる値が付与できない状況である³¹⁾。

自動血球分析装置の Hct は、個々の赤血球容積を積算して算出される。容積の検出原理は、直接容積を計測するインピーダンス法と、粒子断面積に比例する散乱光強度を計測して容積情報に変換する測定法 (光学法) がある。光学法では赤血球を球状化する前処理が必要であるため、両者の計測結果が各社で一致しない原因となっている³⁴⁾。赤血球は、希釈用試薬の浸透圧や作用 (球状化など) の違いにより、赤血球容積や変形能などが変化するため、各社はそれを考慮した大きさ補正を行い、PCV および RBC の国際調和プロトコルと一致するように整合をとっている。PCV と RBC が一致するように構成した

場合でも、前処理の容積および変形能の変化が機種や原理で異なる場合は、実験体での MCV でバイアスを生じる可能性があり、新鮮血液の Hct が一致しても MCV が一致しない事象が生じることとなる。

5. 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration: MCHC)

国際調和プロトコルは、CLSI が計算法 ($MCHC = Hgb/PCV$) を提示している³¹⁾。Hct および MCV と同様に、低値領域および高値領域では、国際調和プロトコルによる値が付与できない状況である。MCHC 標準化に関わる課題は「MCHC 上限値の推定および計測誤差」に詳細が報告されている³⁵⁾。

6. Hct および赤血球恒数の国際調和プロトコルによる値付与の限定条件

PCV 測定は、TP の影響を避けるため健常検体に限定する必要がある。ICSH は、MCV (86～96fL) かつ MCHC (33.0～34.5g/dL) の範囲内を指定している²³⁾。

7. 用手法からフローサイトメトリー法へ移行した項目

血球分析の基準分析法は、精密度が十分でない用手法 (鏡検法など) から精密度・特異性・均一性が高いフローサイトメトリー法へ移行している³⁶⁾。フローサイトメトリー法で調査試料を値付けする場合、正確性を保証するための SOP は提供されておらず、ICSH または CLSI が引用している文献から、SOP を作成・検証する必要がある。下記 3 項目においては、JSLH が主催する国際調和プロトコル EQA (以降、同 EQA) において、SOP が提供されており、良好な検証結果が得られている³⁷⁾。

1) 白血球分類 (WBC differential: Diff)

国際調和プロトコルは精密度・特異度・均一性の高いフローサイトメトリー法が推奨されており、用手法で検証することが要求されている。用手法はウェッジ法で作成した血液塗抹標本を、ロマノフスキー染色して目視分類する鏡検法である。しかし、精密度の不足、標本上の血球配置の不均一性が解決できないため、正確性評価は困難である。ICSH はフローサイトメトリー候補法を提示したが、CLSI H20-A2³⁸⁾ のスコープである健常検体の精確な白血球分類を目的としたものではなかった³⁹⁾。JSLH は

健常検体の血液キャリブレーションへの値付けや、自動血球分析装置の校正検証に特化した方法を開発し⁴⁰⁾、SOPはICSH候補法および鏡検法の両方法との検証を行い^{41, 42)}、同EQAで運用されている^{43, 44)}。

2) 血小板数 (Platelet: Plt)

国際調和プロトコルは、ICSHおよびCLSIから免疫学的フローサイトメトリー法が、赤血球数との比率で計測する間接法として提示・引用されている^{45~47)}。同EQAにより、次の課題が明らかになった。フローサイトメータの検出感度向上に伴い、サイズ下限の設定が必要となり、国際血栓止血学会が定義した血小板由来マイクロパーティクル (Platelet derived micro particle: PDMP) のサイズ上限を採用した。フローサイトメータの前方散乱光の集光角度は、国際調和プロトコルの条件と一致させた。本法は間接法であるため、測定サンプルは、比重の異なる赤血球と血小板が均一に浮遊している必要があった。そのため、攪拌および測定時間の条件を追加した⁴⁸⁾。Plt標準化に関わる課題は「血小板自動測定の限界と将来展望 -容積と計数の定量限界-」に詳細が報告されている⁴⁹⁾。これらを反映したSOPが検証され、同EQAで運用されている⁵⁰⁾。

3) 網赤血球数 (Reticulocyte: Retic)

国際調和プロトコルは、チアゾールオレンジ (TO) で赤血球内の核酸染色を行い、赤血球を免疫学的に識別するフローサイトメトリー法が、赤血球数との網赤血球数の比率で計測する間接法である。フローサイトメトリー法によりICSHおよびCLSIから提示された^{51~53)}。用手法で検証することが要求されている⁵³⁾。

用手法は、ニューメチレンブルー超生体染色した試料を計算盤とミラーディスクを用いて算定する鏡検法 (NMB法) である。網赤血球の形態観察による識別は、超生体染色の際に現れるアーチファクトである網状構造の顆粒が2つ以上存在する赤血球を、網赤血球として識別することが定義されている⁵³⁾。NMB法による網状構造形成は、染色温度および染色時間に影響を受ける。特に、健常検体領域では影響が大きくNMB法が高値となるため、染色条件はICSHおよびCLSIの規定範囲に従って、室温20℃の環境・染色時間10分に制御する必要があった⁵³⁾。NMB法の検証は、通常の臨床検査現場において、温度管理の面から困難である。

フローサイトメトリー法はICSHおよびCLSIが引用している文献^{54, 55)}に示されている。同EQAにより、次の課題が明らかになった。血小板はTO染色で陽性となるため、成熟赤血球との同時通過および吸着は、網赤血球イベントとして計数される。赤血球をCD235aで標識すると血球同士の非特異吸着などの影響が発生する。JSLHは赤血球識別にCD45/CD61/CD41aを用いたネガティブセレクション法を採用することでこれらの課題を解決した。現在、SOP検証を行い、同EQAで運用されている⁵⁶⁾。

4) 識別量が連続分布を持っている項目の課題

ReticはRNA量の連続分布を持っているが、フローサイトメトリー法における網赤血球と成熟赤血球の閾値は、厳密な環境および時間管理により測定されたNMB法の網赤血球比率と一致するポイントに設定する必要がある。この評価は臨床現場では困難であるため、同EQAではNMB法で検証済みのSOPを参加者へ提供している。また、PltはPDMPとサイズが重複する連続分布となる。自動血球分析装置では、容積2fLを血小板サイズの下限閾値に設定しているため、発現機序から定義された血小板の全てを計数している訳ではなく、大きさの下限以下のものは、血小板数計数値から除外されていることになる。血小板のサイズ下限はインピーダンス法で計測した2fLの容積と一致するポイントに設定する必要がある³⁴⁾。

このように、国際調和プロトコルで得られたヒストグラムや2次元プロットで表示された連続分布に対して閾値を設定する際は、ゲート設定する際に違和感が大きいことが懸念される。連続量に対する血球識別は、定義された閾値によって決定されるため、閾値設定の根拠の明確化および標準化が重要である。

おわりに

自動血球分析項目の精確さ検証および標準化の現状を解説した。全血算項目 (CBC) において、MCVと平均血小板容積 (MPV) の標準化は課題が残ったままである。MCVは貧血診断に重要であるが、容積検出原理の違いおよびPCVの国際調和プロトコルが健常領域に限定されることから、全機種・全原理で一致させることは難しい。MPVは血小板クリット

(Pct)の国際調和プロトコルが無いことから、別の標準化指標が必要となる。CLSIは、容積軸のようなサイズ指標は米国商務省標準化技術研究所(NIST)を利用するように記載があるため、これを元に校正階層を構築することが望ましいと考える⁵³⁾。

近年、レポートابلとなった血球分析項目には、不確かさ付与の観点からは用手法ではなく、フローサイトメトリー法による校正階層の構築が望まれている。有核赤血球、網血小板および幼若顆粒球などの国際調和プロトコルの開発、SOPの構築/検証を加速する必要があると感じる。

血球分析項目の伝達性検証は、新鮮血液キャリブレータが必要となることから難しい現状であるが、診断に利用される項目を優先して取り組むことが重要と考える。

文 献

- 1) 永井 豊, 巽 典之. 血液検査と化学検査の精確さ検証の違い. 生物試料分析. 2008; **31** (5): 307-324.
- 2) ISO 17511:2020, In vitro diagnostic medical devices — Requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples.
- 3) International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine “The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. External Quality Assessment (EQA) or Proficiency Testing in Molecular Diagnostics.”. <https://ifcc.org/ifcc-scientific-division/sd-committees/cmd/externalqualityassessment-proficiencytestinginmoleculardiagnosics/> (引用 2023年12月31日)
- 4) 鈴木隆史. 臨床検査における精度管理. 臨床検査と総合健診. 2019; **46** (2): 226-235.
- 5) 前川真人. わが国の外部精度管理調査のあゆみ. モダンメディア. 2023; **69** (11): 289-296.
- 6) 鈴木隆史. 臨床検査精度管理調査の定量検査評価法と試料に関する日臨技指針. 医学検査. 2008; **57**: 109-117.
- 7) European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, “Biological Variation Database”, <https://biologicalvariation.eu/> (引用 2023年1月13日)
- 8) 河野均也. 「臨床検査室の外部精度評価の統一化事業の推進と臨床検査室の認証/認定システム構築に関する研究. 日医総研ワーキングペーパー 2003 : 90」 <https://www.jmari.med.or.jp/wp-content/uploads/2021/10/WP090.pdf> (引用 2023年12月31日)
- 9) 永井 豊, 近藤 弘, 巽 典之. 計測技術ティーチング: 血球分析基本技術. 東京: 宇宙堂八木書店; 2006: 56-113.
- 10) ISO 17511: 2003, In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in biological samples - Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials.
- 11) 永井 豊, 近藤 弘, 川合陽子. 実試料標準物質の概要 - 血液検査系 -. 臨床化学. 2009; **38** (4): 408-415.
- 12) European Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices.
- 13) Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU (Text with EEA relevance)
- 14) ISO 15193: 2009, In vitro diagnostic medical devices — Measurement of quantities in samples of biological origin — Requirements for content and presentation of reference measurement procedures.
- 15) ISO 15194: 2009, In vitro diagnostic medical devices — Measurement of quantities in samples of biological origin — Requirements for certified reference materials and the content of supporting documentation.
- 16) ISO 21151: 2020, In vitro diagnostic medical devices — Requirements for international harmonisation protocols establishing metrological traceability of values assigned to calibrators and human samples.
- 17) Fraser CG, Petersen PH, Libeer CJ, et al. Proposals for Setting Generally Applicable Quality Goals Solely Based on Biology. Annals of Clinical Biochemistry. 1997; **34**: 8-12.
- 18) Oosterhuis W, Bayat H, Armbruster D, et al. The use of error and uncertainty methods in the medical laboratory. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2018; **56**: 209-219.
- 19) International Council for Standardization Haematology, “Publications: Guidelines, Recommendations, Editorials & Articles”, <https://www.icsh.org/publications> (引用 2024年1月9日)
- 20) Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI Standards: Guidelines for Health Care Excellence. <https://clsi.org/standards/> (引用 2024年1月9日)
- 21) Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine. Analyte Group 2: Blood Cell Counting and Typing Review Team. <https://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/wg/jctlm-rt-blood-cells/members> (引用 2024年1月9日)
- 22) International Society of Laboratory Hematology. <https://www.islh.org/ISLH-Education/guidelines.php> (引用 2024年1月9日)
- 23) International Council for Standardization Haematology. The assignment of values to fresh blood used for calibrating automated blood cell counters. Clin Lab Haematol. 1988; **10**: 203-212.
- 24) International Council for Standardization Haematology. Reference method for the enumeration of erythrocytes and leucocytes, Clin Lab Haematol. 1994; **16**: 131-138.
- 25) 日本検査血液学会標準化委員会. 「赤血球数および白血

- 球数のメーカー基準分析法 (ISO15193 に対応)],
<https://jslh-cs.com/.assets/RMP-for-RBC-and-WBC-enumeration-2022-05-19-rev01-03.pdf> (引用 2024年1月6日)
- 26) International Council for Standardization Haematology. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood. *J Clin Pathol*. 1996; **49**: 271-274.
 - 27) CLSI. Reference and Selected Procedures for the Quantitative Determination of Hemoglobin in Blood. 3rd ed. CLSI standard H15. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2000.
 - 28) International Council for Standardization Haematology. New reference method for haemiglobincyanide for use in standardization of blood haemoglobin measurements. *Intl J Lab Hem*. 2010; **32**: 139-141.
 - 29) International Council for Standardization Haematology. Selected methods for the determination of packed cell volume. In: *Advances in Hematologic Methods: The Blood Count*. van Assendelf OW and England JM, eds. Boca Raton, FL: CRC Press; 1982
 - 30) World Health Organization. ICSH Recommended method for the determination of packed cell volume by centrifugation. WHO/LAB/89.1, 1989.
 - 31) CLSI. Procedure for Determining Packed Cell Volume by the Microhematocrit Method 3rd ed. CLSI standard H07. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2000.
 - 32) Kazuo Niitani. Use of Indocyanine Green for the Determination of Trapped Plasma. *Proceedings of the 5th ISQC-TOKYO*. 1983; 54-61.
 - 33) International Council for Standardization Haematology. ICSH Recommendations for "surrogate reference" method for the packed cell volume. *Lab Hematol* 2003; **9**: 1-9.
 - 34) 永井 豊, 近藤 弘. 血液学検査の国際標準化の動向; 血液学検査を使いこなす. 東京: 宇宙堂八木書店; 2019; **161**: 40-54.
 - 35) 永井 豊, 竹田知広, 近藤 弘. 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) 上限値の推定および計測誤差. *日本検査血液学会雑誌*. 2022; **23** (1): 28-37.
 - 36) 永井 豊, フローサイトメトリーによる血球分類の動向, *Cytometry Research*. 2011; **21** (2): 13-22.
 - 37) 鶴田一人, 竹田知広, 近藤 弘, 他. 新鮮血液を用いた6メーカー基準自動血球分析装置による外部精度管理調査の経年的評価報告. *日本検査血液学会雑誌*, 2021; **22**: 114-125.
 - 38) CLSI. Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods. 2nd ed. CLSI standard H20. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
 - 39) Roussel M, Davis BH, Fest T, et al. on behalf of the International Council for Standardization in Hematology. Toward a reference method for leukocyte differential counts in blood: Comparison of three flow cytometric candidate methods. *Cytometry*. 2012; **81A**: 973-982.
 - 40) Kawai Y, Nagai Y, Kondo et al. Japanese Society for Laboratory Hematology flow cytometric reference method of determining the differential leukocyte count: external quality assurance using fresh blood samples. *Int Jnl Lab Hem*. 2017; **39**: 202-222.
 - 41) 近藤 弘, 永井 豊, 小川恵津子, 他. フローサイトメトリーによる白血球分類のための日本検査血液学会参照法の検討. *日本検査血液学会雑誌*. 2016; **17**: 169-181.
 - 42) 竹田知広, 永井豊, 他. 血液検査領域における外部精度管理調査の現状と課題. *日本検査血液学会雑誌*. 2021; **22**: 407-413.
 - 43) 日本検査血液学会標準化委員会血球計数標準化小委員会, 「フローサイトメトリー法による白血球5分類算定法手順書」,
<https://jslh-cs.com/.assets/JSLH-Diff-SOP-rev1.42e.pdf> (引用 2024年1月9日)
 - 44) Mori S Sayaka, Tsuruda K, Yanagihara K, et al. behalf of JSLH Standardization sub-committee for blood cell counting. Evaluation for convergence of the target assay range for fresh blood calibrators measured by laboratories in external quality assurance survey for leukocyte differentials. *Int J Lab Hematol*. 2023; **45**: 82-83.
 - 45) International Council for Standardization Haematology Expert Panel on Cytometry and the International Society of Laboratory Hematology Task Force on Platelet Counting. Platelet counting by RBC/platelet ratio method. A reference method. *Am J Clin Pathol*. 2001; **115**: 460-464.
 - 46) International Society of Laboratory Hematology Task Force. Reference Platelet Count. *Am J Clin Pathol*. 2001; **115**: 448-459.
 - 47) CLSI. Validation and Quality Assurance of Automated Hematology Analyzers. 2nd ed. CLSI standards H26. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
 - 48) 近藤 弘, 永井 豊, 池田尚隆, 他. 新鮮血サーベイ試料の攪拌および分注方法の検討. *臨床検査*. 2017; **61**: 1497-1501.
 - 49) 永井 豊, 竹田知広, 近藤 弘. 血小板自動測定の限界と将来展望 -容積と計数の定量限界-. *日本検査血液学会雑誌*. 2019: 20193-206.
 - 50) 日本検査血液学会標準化委員会血球計数標準化小委員会, 「フローサイトメトリー法による血小板絶対数算定法 (間接法) 手順書」,
<http://jslh.kenkyuukai.jp/images/sys/information/20190926111409-32FF8C754AD98B70E4D0049CDE7CD4DCDF9F15EA8CD6DDD4E73F12A34403093B.pdf> (引用 2024年1月9日)
 - 51) Schimenti KJ, Lacrna K, Maston L, et al. Reticulocyte analysis: comparison of flow cytometry, image analysis and manual counting. *Cytometry*. 1992; **13**: 853-62.
 - 52) ICSH Expert Panel on Cytometry. Proposed reference method for reticulocyte counting based on the determination of the reticulocyte to red cell ratio. *Clin Lab Haematol*. 1998; **20**: 77-9.
 - 53) CLSI. Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes). 2nd ed. CLSI guideline H44. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004.
 - 54) Lee LG, Chen CH, Chiu LA. Tiazole orange: new dye for

- reticulocyte analysis. *Cytometry*. 1986; 7: 508-17.
- 55) Serke S, Huhn D. Improved specificity of determination of immature erythrocytes (reticulocytes) by multiparameter flow cytometry thiazole orange using combined staining with monoclonal antibody (antiglycophorin-A). *Clin Lab Haematol*. 1993; 15: 33-44.
- 56) Takeda T, Mori S, Tsuruda K, et al. behalf of JSLH Standardization sub-committee for blood cell counting. Evaluation for convergence of the target assay range for fresh blood calibrators measured by laboratories in external quality assurance survey for reticulocyte percentage. *Int J Lab Hematol*. 2023; 45: 110-111.