

白血球数算定 (視算法)

《原理》

血球を希釈液（チュルクTurk液）で一定の割合に希釈し，一定容積中（ $1\mu\ell$ ）の白血球数を顕微鏡を用いて目で算定する。

チュルク液の成分である氷酢酸で算定に邪魔な赤血球を壊し，ゲンチアナ紫で白血球の核を染めて見やすくする。

《試薬》

チュルク液

- | | |
|----------------|--------|
| ①氷酢酸 | 1.0 ml |
| ②1 % ゲンチアナ紫水溶液 | 1.0 ml |

蒸留水を加えて100 ml とする。

《算定方法 (図2-3)》

- (1)白血球数カウントに用いられる改良ノイバウエル型計算板の大区画 ($W_1 \sim W_4$) 及びビュルケル・チュルク計算板の大区画 ($W_1 \sim W_4$) を示す。
- (2)顕微鏡の視野を図中の矢印の方向に移動させながら白血球を数えていく。
- (3)このとき、対向する2辺、例えば上と左線上の白血球 (黒丸) は数えるが、下と右線上の白血球 (白丸) は数えない。
- (4)計算室の四隅にある大区画内の白血球数を、それぞれ W_1, W_2, W_3, W_4 とすると、求める白血球数 (W) は次のようになる。

$$\begin{aligned}
 W &= \frac{(W_1 + W_2 + W_3 + W_4)}{4} \times \frac{(\text{計算室の容積の補正}) \times (\text{メランジュールの希釈倍数})}{1 \mu\text{L} (1 \text{ mm}^3) \text{ に対する } 10^6} \\
 &= \frac{(W_1 + W_2 + W_3 + W_4)}{4} \times 10 \times 10 \quad \text{補正} \\
 &= \frac{(W_1 + W_2 + W_3 + W_4)}{4} \times 100 \text{ (個} / \mu\text{L)}
 \end{aligned}$$

〔計算例〕 $W_1 \sim W_4$ の4つの大区画の白血球数は以下の如くであった。

$$W_1 = 60 \quad W_2 = 88 \quad W_3 = 65 \quad W_4 = 70$$

$$W = \frac{60 + 88 + 65 + 70}{4} \times 10 \times 10$$

$$W = 65.75 \times 100$$

$$\approx 6.6 \times 10^3 \text{ (個} / \mu\text{L)}$$

《注意事項》

- (1) $W_1 \sim W_4$ 内の白血球数の実計数値のパラツキは10個以内とする。
- (2) 検定: A室およびB室で得たWBCを〔A〕および〔B〕とし、両者の値が同一でなく、仮りに〔A〕 > 〔B〕であったとする。

$$[A] - [B] < 2\sqrt{[A] + [B]}$$

式が成立する場合: $\frac{[A] + [B]}{2}$ を信頼できるWBCとして

報告する。

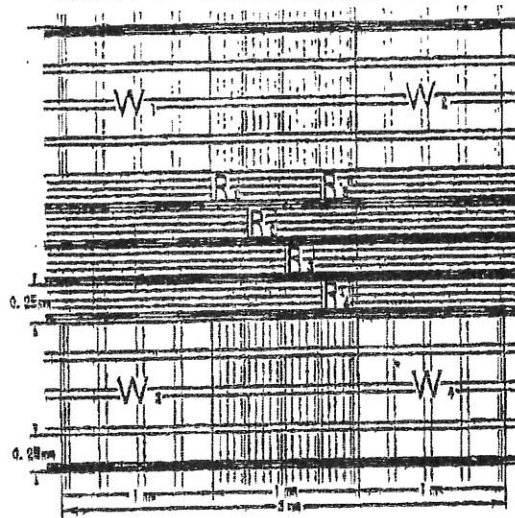
式が不成立の場合: もう一度やり直す。

- (3) 末梢血液中に赤芽球があれば白血球数を補正する。

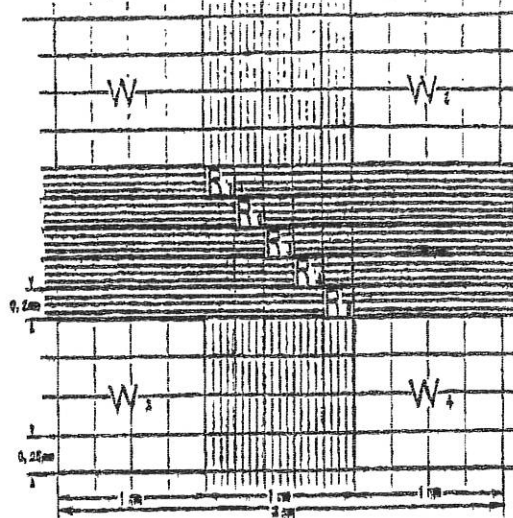
$$\text{真の白血球数} = \text{カウントした白血球数} \times \frac{100}{100 + \text{赤芽球数}(\%)}$$

※赤芽球数(%)は別に作成した血液薄層塗抹標本で白血球 100 個当りに出現する赤芽球の数を算定する。

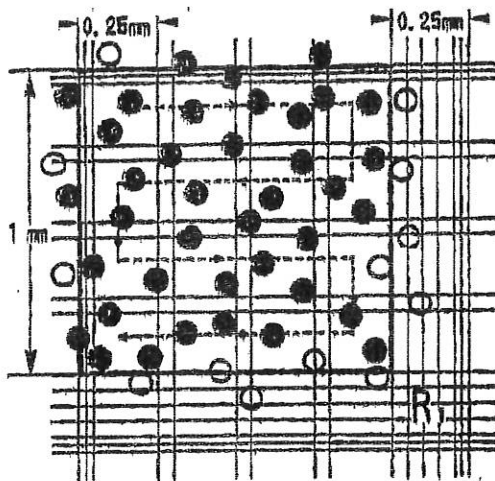
ビュルケル・テュルク型計算板 (全図面)



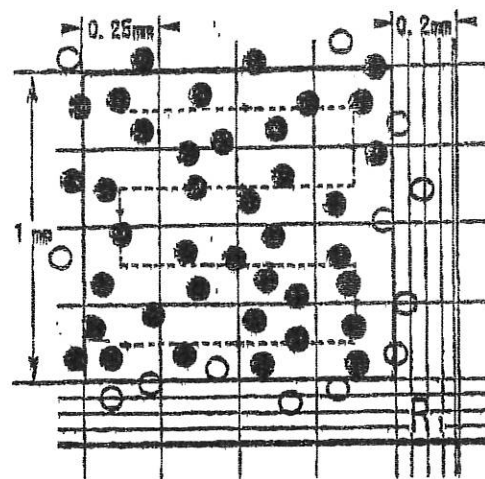
改良ノイバウエル型計算板 (全図面)



白血球数算定 (大区画W1)



白血球数算定 (大区画W1)



白血球数算定例

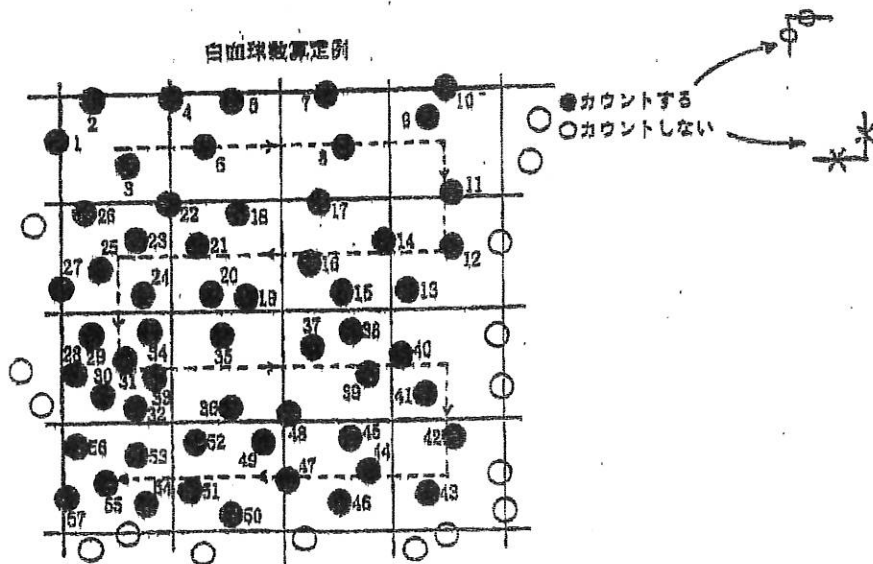


図2-3 白血球数算定区画

赤血球数算定（視算法）

《原理》

血液を希釈液（ホルマリン・クエン酸溶液）で一定の割合に希釈し一定容積中（1 μl ）の赤血球数を顕微鏡を用いて目で算定（視算）する。

希釈液の成分であるホルムアルデヒドは赤血球を固定し、算定しやすくしている。

《試薬》

ホルマリン・クエン酸溶液

①クエン酸ナトリウム2水塩 3. $\overset{3}{2}$ g

加える。

②中性ホルマリン 1 ml

蒸留水を加えて100 ml とする。

《算定方法 (図3-3)》

赤血球数算定に用いられる改良ノイバウエル型計算板の大区画及びビュルケル・チュルク計算板の大区画を示す。(図3-3)

(1)顕微鏡の視野を図中の矢印の方向に移動させながら赤血球を数えていく。

(2)このとき、対向する2辺、例えば上と左線上の赤血球(黒丸)は数える(カウントする)が、下と右線上の赤血球(白丸)は数えない(カウントしない)。

(3)5つの中区画の赤血球数を、それぞれ R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 とすると、求める赤血球数(R)は次のようになる。

* 小区画の面積は $0.05 \times 0.05 \text{ mm}^2$ 、これが16こ集まった中区画を5ヶ所カウントする。

* 計算室の深さ 0.1 mm

赤血球を数えた希釈液の容積は

$$0.05 \times 0.05 \times 16 \times 5 \times \frac{1}{10^3} = \frac{1}{50} \quad (\mu\text{L})$$

希釈血液 $1 \mu\text{L}$ 中の数は実測値を50倍する

* 200 → メランジュールの希釈倍数

$$\begin{aligned} R &= (R_1 + R_2 + R_3 + R_4 + R_5) \times 50 \times 200^* \\ &= (R_1 + R_2 + R_3 + R_4 + R_5) \times 10^4 / \mu\text{L} \end{aligned}$$

〔計算例〕 $R_1 \sim R_5$ の中区画の赤血球数は以下の如くであった。
 $R_1=89, R_2=90, R_3=95, R_4=98, R_5=87$

$$\begin{aligned} R &= (89 + 90 + 95 + 98 + 87) \times 10^4 / \mu\text{L} \\ &= 459 \times 10^4 / \mu\text{L} \end{aligned}$$

(4)マイクロピペット法の希釈倍数は $\times 201$ である。

$$\begin{aligned} R &= (R_1 + R_2 + R_3 + R_4 + R_5) \times 50 \times 201 \\ &= (R_1 + R_2 + R_3 + R_4 + R_5) \times 10050 \end{aligned}$$

許容誤差範囲内にあるため、最終的にはメランジュール法と同じく $R = (R_1 + R_2 + R_3 + R_4 + R_5) \times 10^4 / \mu\text{L}$ とする。

《注意事項》

カウントの際、厳密には白血球は除外すべきで、慣れれば赤血球との区別はできる。

血小板数算定 (プレッカー・クロンカイト法)

《原理》

血液をシュウ酸アンモニウムで希釈し、メランジュールと計算盤を用いて直接血小板を位相差顕微鏡で算定する方法。

この希釈液は赤血球を溶血させ、血小板凝集を防止する作用がある。

《試薬》

① 1 % シュウ酸アンモニウム溶液

② シュウ酸アンモニウム 1.0g

蒸留水を加えて100 ml とする。

2. マイクロピペット法 (図4-1, 4-4)

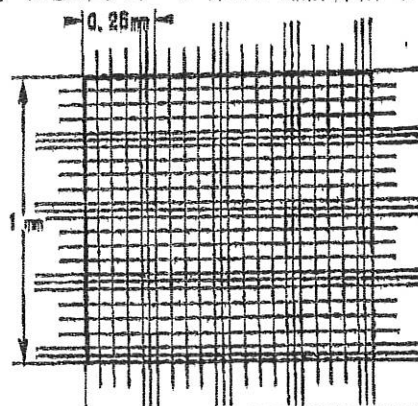
- a. 前準備: (1) ガラスシャーレに水でぬらしたろ紙を敷く。(湿潤室として使用する。)
- (2) 希釈液 2.0 ml をホールピペットで採量し, 2 本の試験管に分注する。
- b. 採量: (1) 抗凝固剤入り静脈血の採血管を上下逆転～下上逆転の往復約 3 秒の速さで 30 回行う。次のリンス法で血液 0.02 ml を加える。
- (2) 終わって血液の中層の中にチップの先を浸し, プッシュボタンを 1 段目までおす。
- (3) プッシュボタンをゆっくり緩めて最初の位置に戻す。
- (4) チップの先端にふれないよう注意してハイゼガーゼで外壁をきれいに拭き取る。
- c. 分注: (1) 希釈液の中にチップの先を 2～3 mm 位浸し, プッシュボタンを 1 段目まで押して, 血液を排出する。
- (2) そのままの位置で, チップの内壁を希釈液でとも洗いして, 血液が残らないようにする。(数回繰り返す)
- (3) 最後にプッシュボタンを 2 段目まで十分に押して, チップを完全に空にする。
- (4) チップを交換して, もう 1 本の試験管に分注する。
- d. 混和: 試料をミキサーで 2～3 分間混和後, 直ちにフィンピペットで採量分注し, 血球計算板の上下 2 個の計算室に入れる。
- e. 放置: 血球計算板を湿潤室に入れて, 15～20 分静置して血小板の静止を待つ。
- f. 鏡検: (1) 位相差顕微鏡のステージにのせ, 安定してから鏡検する。
- (2) 総合倍率 100 倍でビントを合わせ, 400 倍で血小板の数をカウントする。

《算 定 (図4-3)》 大区画 (1 mm²) 中の血小板数を p とすると, 血液 1 μl 中の血小板数 P は,

$$P = p \times (\text{計算室の容積による補正}) \times (\text{血液の希釈倍数})$$

$$= p \times \frac{1.0}{0.1} \times \frac{100}{1} = p \times 1000 \text{ (個/μl)}$$

A. ビュルケル・チュルク型計算板 (大区画 R)



B. 改良ノイバウエル型計算板 (大区画 R)

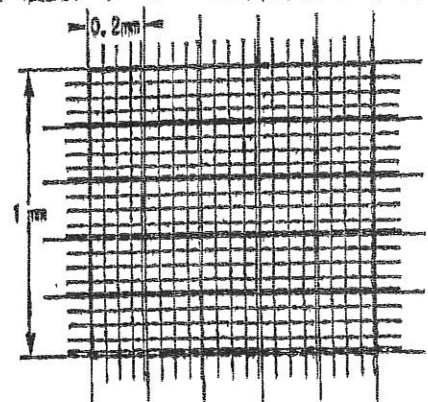
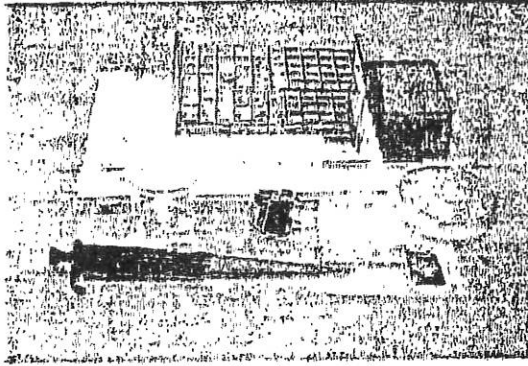
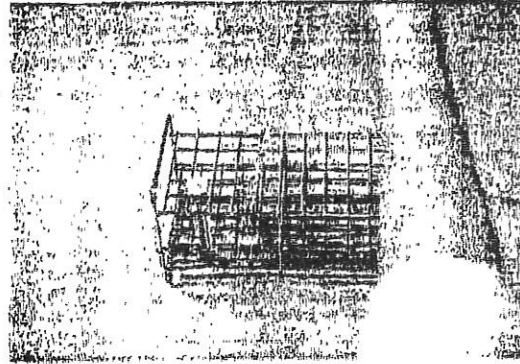


図4-3 血小板数算定区画

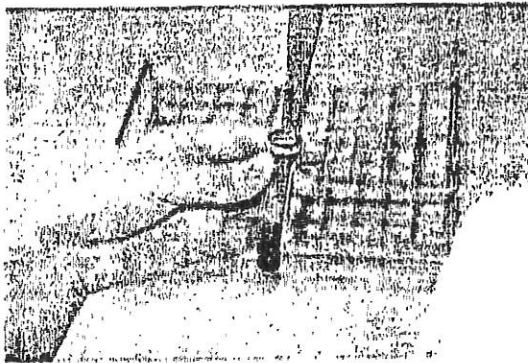
1. 器具の準備



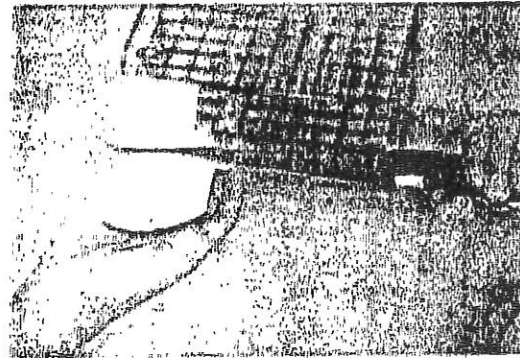
2. 希釈液を採量し試験管に分注



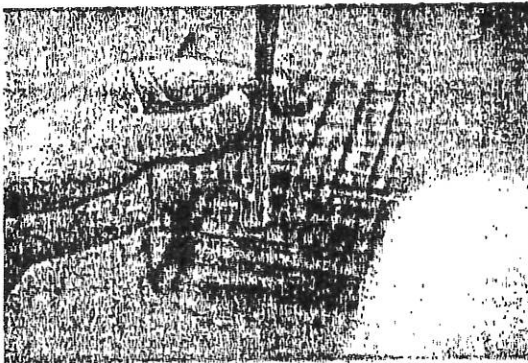
3. 血液を混和後マイクロピペットで採取



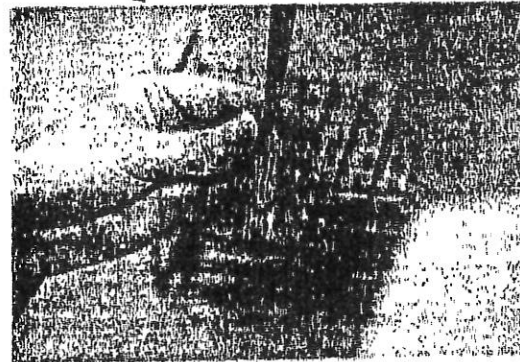
4. チップの管壁を拭く



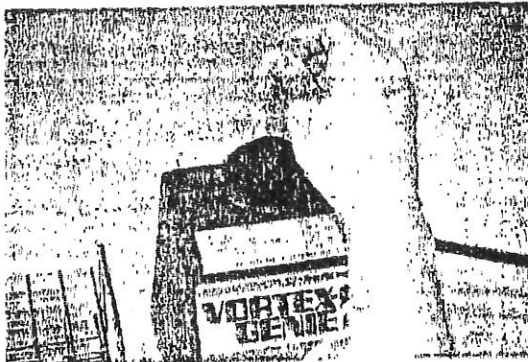
5. 希釈液の中に血液を分注



6. 希釈液で共洗いし、排出



7. ミキサーで混和



8. 計算板に流し、湿潤室に放置後、鏡検



図4-4 血小板数算定—マイクロピペット法

血球計算盤 洗淨方法

- 1) 計算盤よりカバーガラスを外す
- 2) 計算盤・カバーガラスに付着している希釈液を洗いながす
- 3) ハイゼガーゼにて水分を拭きとる
- 4) ビーカー（染色壺）にエーテル／エタノールの等量混合液に5～10分浸す
- 5) ビーカーより取り出しハイゼガーゼにて丁寧に液を拭きとる