

平成 30 年度労災疾病臨床研究事業

職場における化学物質の感作性障害に対する防止措置と
健康管理の有効性に関する研究

平成 31 年 3 月

職場における化学物質の感作性障害に対する防止措置と
健康管理の有効性に関する研究班

職場における化学物質の感作性障害に対する防止措置と
健康管理の有効性に関する研究

研究者一覧

研究代表者	アスベスト疾患ブロックセンター長	岸本 卓巳
研究分担者	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科臨床腫瘍学教授	芦澤 和人
	川崎医科大学衛生学教授	大槻 剛巳
	川崎医科大学放射線医学教授	加藤 勝也
	名古屋市立大学大学院医学研究科環境労働衛生学分野教授	上島 通浩
	名古屋市立大学大学院医学研究科高度医療教育研究センター教授	原 眞咲
	中部労災病院呼吸器内科部長	松尾 正樹
	旭労災病院健康診断部長	横山 多佳子
研究協力者	労働安全衛生総合研究所産業毒性・生体影響研究グループ部長	王 瑞生
	労働安全衛生総合研究所所長代理	甲田 茂樹
	労働安全衛生総合研究所産業疫学研究グループ上席研究員	佐々木 毅
	労働安全衛生総合研究所産業毒性・生体影響研究グループ研究員	豊岡 達士
	労働安全衛生総合研究所産業毒性・生体影響研究グループ	柏木裕呂樹
	川崎医科大学衛生学准教授	西村 泰光

目 次

はじめに	1
1. ベリリウムリンパ球幼若化試験におけるアラマブルー法の応用 - ベリリウム取扱い経験者を対象とした2年間追跡調査 - 豊岡 達士、柏木裕呂樹、佐々木 毅、 王 瑞生、甲田 茂樹	2
2. ベリリウム作業者における平成30年度胸部CT読影結果について 松尾 正樹、芦澤 和人、原 眞咲、 横山多佳子、加藤 勝也、岸本 卓巳	14
3. 平成30年度における低線量CT撮影・再構成条件最適化について 原 眞咲、芦澤 和人、加藤 勝也、 横山多佳子、松尾 正樹、岸本 卓巳	20
4. ベリリウム曝露者の包括的免疫機能解析 - 血清およびCD4+リンパ球を用いた分析結果 - 大槻 剛巳、西村 泰光	25

はじめに

労災疾病臨床研究事業費補助金研究の「職場における化学物質の感作性障害に対する防止措置と健康管理の有効性に関する研究」はベリリウムばく露による慢性ベリリウム症とベリリウムの感作性についての早期診断と防止措置をどのように行うかについて研究することを目標に掲げて取り組み 3 年が経過した。ベリリウムのごく微量のばく露によっても細胞性免疫障害として類上皮細胞肉芽腫病変が肺に発生する慢性ベリリウム症の早期診断は胸部 CT が最も有用であるため、我々は初年度から胸部 CT 画像を用いてきた。ベリリウムの特殊健診として低線量 CT 撮影を用いることを目的としたため、受診者に対して放射線障害が少ない低線量 CT 撮影を使用した。そして、初年度の研究において低線量 CT が通常線量 CT と比較検討した結果、ノイズは少なくないが読影にそれほど支障はないと判断した。しかし、昨年の低線量 CT 撮影に際して線量が若干少なく胸部画像読影に際して非特異的な所見の混入を認めため、今年度は撮影線量を上げて画質の鮮鋭度を良好にし撮影した。その結果 CT 画像の読影に支障はなかった。線量や画質の調整は日本医学放射線学会専門医である原眞咲研究分担者が担当した。

胸部画像の読影には、日本医学放射線学会専門医の原眞咲、芦澤和人、加藤勝也研究分担者と日本呼吸器学会専門医である内科医の岸本卓巳研究代表者、松尾正樹、横山多佳子研究分担者が対象とした。そして、今年度対象とした 79 例を 1 日かけて全員で読影し合議制で最終所見を決定した。画質は過去 3 年間で最も良好であり、**artifact** としてわずかなすりガラス様所見も認められたが、診断を左右するような所見ではなかった。慢性ベリリウム症に特有なすりガラス陰影、結節影及び縦隔リンパ節腫大などの所見について特に注視して読影にあたりるとともに過去の画像との比較検討も行った。画像所見のまとめは松尾正樹研究分担者が担当した。

また、ベリリウムによる感作の状況を的確に知るための検査方法として従来からその有用性が指摘されている末梢血リンパ球幼若化試験はアラマブルー法を用いて昨年のデータと比較検討した。また、慢性ベリリウム症発症に関連性が指摘されている HLA-DPB1 遺伝子多型の解析を行い、リンパ球幼若化試験結果と比較検討した。本研究は王瑞生、豊岡達士、柏木裕呂樹研究協力者が担当した。

さらに慢性ベリリウム症患者の末梢血の免疫担当細胞とサイトカインのうち意義深い項目を選択して検討し、本症に特異的な免疫原性とその反応性について特異性があるかどうか検討した。この研究は大槻剛巳研究分担者と西村泰光研究協力者が担当した。

平成 31 年 3 月 29 日

職場における化学物質の感作性障害に対する防止措置と健康管理の有効性に関する研究班
研究代表者 岸本 卓巳

ベリリウムリンパ球幼若化試験におけるアラマブルー法の応用 - ベリリウム取扱い経験者を対象とした2年間追跡調査 -

豊岡達士・柏木裕呂樹・佐々木毅・王瑞生・甲田茂樹

【背景等】

ベリリウムは、主にベリリウム-銅合金として、精密機器・自動車・産業機器等、金属ベリリウムとして、医療・軍事・航空宇宙・エネルギー産業等、国内外の種々の産業において利用されている重要な金属の一種であるが、その健康影響として、慢性ベリリウム症 (CBD: Chronic Beryllium Disease) を発症する可能性があることが知られている。CBD の発症には、そのきっかけとなる、Be 感作 (BeS: Beryllium Sensitization) と呼ばれる免疫反応が重要である。CBD は、病理学的に肺の肉芽種炎症性病変として特徴付けられ、臨床的には、患者は咳嗽や呼吸困難を示すことが知られている。一方で、BeS は、病理学的な異常はなく、臨床的にも無症状である。BeS から CBD に発展するのは感作者の一部であると考えられており、CBD に発展する平均年数は 6~15 年と推測されているが、数週間以内に感作が成立し、慢性ベリリウム症に発展した例もあれば、逆に、感作後 30~40 年間、CBD に発展しなかった例も報告されている¹⁻⁴

BeS・CBD に関する一貫した疫学知見は、日本国内では乏しい。一方、米国では、1990 年代初頭からエネルギー省 (DOE: U.S. Department of Energy) を主導に疫学情報の収集が始まり、1999 年には、CBD Prevention Program (10 CFR 850) が始動、2002 年に、DOE 関連施設におけるベリリウムばく露の可能性のある全労働者が、ベリリウム関連労働者として登録され (Beryllium-Associated Worker Registry)、現在までに 3 万人近くの BeS・CBD に関する疫学情報が利用できるようになっている (なお、米国においては、推定 6~14 万人超の労働者が、ベリリウムばく露を受けている可能性がある^{5,8})。当該データベースを基にして実施された、ベリリウムを取り扱う様々な業務形態の労働者を対象とした横断的研究では、労働者の 0.9%~14.6% が BeS 状態であり、0.0~7.8% が CBD であるとされる⁴。また、一定集団を長期間追跡した縦断的研究において、ベリリウムばく露を受けた労働者の 1.0~16.2% が生涯に BeS を生じ、0.0~11.0% が CBD であると報告されている⁴。

我が国において、ベリリウム及びその化合物は、特定化学物質障害予防規則 (以下、特化則とする) による第一類化学物質に指定されている (昭和 47 年 9 月 30 日労働省令第 39 号)。特化則に基づく特殊健康診断の受診状況 (平成 29 年) から、我が国のベリリウムを取り扱う事業所数は 130 事業所存在し、ベリリウムばく露の可能性のある労働者数は 849 人とされる⁹。すでにベリリウム取扱い作業から離れた者を含めると、ばく露歴のある者はさらに増えると考えられる。ベリリウムに対する感作は、非常に複雑な免疫応答の上に成り立っており、そこには遺伝的素因も関与していると考えられているが、いずれにせよ、ベリリウムの衛生管理においては、早期の段階で BeS を判定し、ベリリウムばく露を防止することで CBD に発展させないよう職場における衛生管理を徹底させ、そして、CBD に発展してしまった場合、業務歴や臨床所見 BeS の推移などを踏まえて、業務上疾病として適切に認定すると共に、適切な医学的治療を行うことが重要とある。

BeS の判定、及び CBD の診断には、ベリリウムに対するリンパ球幼若化試験 (Be-LPT: Beryllium Lymphocyte Proliferation Test) が決め手の一つとなっている¹⁰⁻¹⁴。Be-LPT では、被験者から分離した末梢血リンパ球に *in vitro* で、ベリリウム (硫酸塩) を抗原として添加し、ベリリウムに対する感作を、リンパ球の増殖 (分裂) を指標に評価する方法である。感作者のリンパ球では、ベリリウムにより

細胞分裂が惹起されるため、その細胞分裂の程度を ^3H チミジンの DNA 取り込み量で測定する (^3H チミジン法)。この ^3H チミジン法による Be-LPT は、1980 年代半ばに米国で開発され¹⁵、1990 年代に BeS・CBD の疫学情報を収集する中で、手法、及び判定基準の標準化がなされてきた。2001 年には、DOE が標準 Be-LPT 法として頒布し、その手法が現行実施されている¹⁶。しかしながら、当該試験法は、測定値のバラツキが大きく、判定を困難にする場合が多々あると認識されている¹⁶⁻¹⁹、例えば、一回のみ ^3H チミジン法による Be-LPT で、陽性結果であっても、その陽性的中率は 39%程度とされる¹⁸。また、当該試験法では、放射性同位元素を用いるため、放射性物質の取得・使用・処分が問題となる場所では実施が制限される。これら背景を踏まえ、ベリリウムを扱う労働者の適切な健康管理のために、現行 Be-LPT の検査成績の向上および放射性同位元素を使用しない代替法の提案が喫緊の課題である。

【これまでの研究経過と本年度の研究実施事項】

平成 28 年度検討

培養リンパ球細胞を用い、現行 ^3H チミジン法のバラツキ原因を追求する共に、その改良法を提案した。同時に放射性同位元素を使用しない代替法として、細胞の蛍光性色素代謝を指標に細胞数を評価するアラマブルー (ALMB) 法がリンパ球幼若化試験に応用できる可能性を示した。加えて、ALMB 法が末梢血リンパ球に応用できるか否かを健康者ボランティア数名で検討し、非特異的にリンパ球幼若化を惹起するコンカナバリン A (ConA) 薬剤に対して、ALMB 法で問題なくそのリンパ球幼若化反応を検出できることを確認した。

平成 29 年度検討

CBD 症患者 4 名の協力を得て、ベリリウムによりリンパ球幼若化を惹起することができる条件を確立し、ALMB 法でその幼若化反応を検出できることを確認した。加えて、過去または現在ベリリウム取り扱い経験がある 85 名を対象に ALMB 法を用いた Be-LPT を実施した。さらに、上記ベリリウム取り扱い経験者の中から現ベリリウム取り扱い者 14 名を対象に、上記 Be-LPT 実施の約 5 か月後に追跡試験を実施した。これら検討において、ALMB 法による Be-LPT では、ベリリウムに対する感作が陽性であると判定する基準 S.I. (Stimulation Index) 値を暫定 1.1 と定め、試験参加者 85 名中 16 名を暫定陽性と判定した。なお、現取扱者 14 名を対象とした追跡調査の結果も一致していた。また、29 年度検討全体を通して、例えば、幼若化反応が惹起される場合における、ベリリウム濃度範囲の見極め等、ALMB 法の試験系特性を把握することができた。

平成 30 年度検討

昨年度までに、ALMB 法がベリリウム感作の検出に実応用の見込みがあることが示されたため、本年度 (平成 30 年度) は、昨年度 Be-LPT を実施した同集団について、さらに追跡試験を実施し ALMB 法の精度を検証すると共に、ベリリウム感作における感受性に関与する可能性があることが報告されている HLA-DPB1 の遺伝子多型についても解析した。

【方法】

1. 対象

本研究の実施に同意した、現在または過去にベリリウム取扱経験を有する 79 名 (全員男性、平均年齢 42.9 歳; 標準偏差 ± 11.4 歳) を対象とした。採血は担当機関において実施され、採血後 24 時間以内に末梢血リンパ球を分離、ALMB 法による Be-LPT を実施した。また、対象者 79 名に

は事前にアンケート調査を実施しており、健康状態、既往歴、飲酒・喫煙等の基本情報に加え、ベリリウム作業に関する大まかな情報を得ている。なお、本研究の実施は平成28年10月に労働安全衛生総合研究所の研究倫理審査委員会において承認されている。

2. ALMB 法による BeLPT

被験者から分離した末梢血リンパ球を 96-well plate に 2.5×10^5 cells/well で播種し、硫酸ベリリウムを各作用濃度 (1, 2, 3, 5, 10, 30, 100 μM) で添加した (各濃度 5 well 使用)。硫酸ベリリウム添加後、インキュベーター内 (37°C, 5% CO_2) で約 132 時間 (5.5 日間) 培養した。培養終了後に各 well に ALMB を添加し、さらにインキュベーター内に 5-6 時間静置した後、蛍光値測定を行った。蛍光値測定終了後に、同一 well に [^3H]チミジンを加え、そのさらに 24 時間後にリンパ球を回収、DNA 抽出を行い、液体シンチレーションカウンターにてベータ線測定を実施した。ALMB 法、及び [^3H]チミジン法における S.I. は、ベリリウム添加 well の実測値平均を、ベリリウム非添加 well の実測値平均で除することで算出した。

3. HLA-DPB1 遺伝子多型解析

遺伝子解析に同意した被験者 77 名について、ルミネックス法による HLA-DPB1 の遺伝子多型解析を実施した。なお、この遺伝子解析の試験実施は平成 30 年 6 月に労働安全衛生総合研究所の研究倫理審査委員会において承認されている。

【結果】

ベリリウム取扱経験者 79 名に対する ALMB 法による Be-LPT

現在または過去にベリリウム取扱経験を有する 79 名 (全員男性、平均年齢 42.9 歳、標準偏差 ± 11.4 歳) を対象に、ALMB 法による Be-LPT を実施した。以下に、① ALMB 法を応用した BeLPT における陰性・陽性判定法について、② 平成 30 年度 ALMB 法暫定基準値に基づいた陰性・陽性判定について、③ 昨年度 ALMB 結果との比較、④ ベリリウム作業内容との関連について記述する。

① ALMB 法による Be-LPT における陰性・陽性判断方法について

[^3H]チミジン法による Be-LPT の陰性・陽性判定は、DOE が公表する「標準 Be-LPT 法¹⁶⁾」による基準を参考に、S.I. が 2.5~3.0 以上を陽性とする場合が多いようである。ただし、この判定は判断主体に依存しており、グレーゾーンが設定されているケースもある²⁰⁻²³⁾。ALMB 法は新しい試験法であるため、本検討の中で、陰性・陽性判定の基準を決定していく必要があった。平成 29 年度検討において、本研究では ALMB 法における陰性・陽性判断基準値として、添加したいずれかの BeSO_4 濃度で、S.I. が 1.1 以上であった場合、暫定的に陽性とした。S.I. >1.1 を一つ基準として設定したのは、次の理由による。

- ベリリウムの取り扱いがない健常者ボランティアでは、 BeSO_4 の濃度範囲 0.1~100 μM で刺激をしても S.I. が 1.1 を超えない
- 臨床上の CBD 患者では、幼若化反応が観察された際の S.I. が 1.1 を有意に超える
- ConA 刺激によるリンパ球幼若化反応では、健常者および臨床上の CBD 患者ともに S.I. が 1.2 以上となる。

また、平成 29 年度検討から S.I. をグラフにプロットすると、ある検体がベリリウム感作している場合、本研究の条件下では BeSO_4 作用濃度 1-5 μM の濃度範囲で、S.I. >1.1 となるピーク値が出現することがわかってきた。従って、この濃度範囲において、 BeSO_4 作用濃度を細かく設定し、

複数作用濃度点の S.I.をもって判定した方が、作用濃度 1 点で判定するよりも、より確実な判定ができると考えられる。実際に平成 29 年度の現役ベリリウム取り扱い作業員 14 名を対象とした追跡調査において、この複数 BeSO₄濃度における S.I.を用いた判定法を応用し、その有効性が確認できた。そこで、平成 30 年度における判定方法は、原則この判定方法に従い、BeSO₄ 濃度 1, 2, 3, 5 μM の 4 点における S.I.の平均値が 1.1 を超えた場合、その被験者を暫定陽性とした。

② ALMB 法暫定基準値に基づいた陰性・陽性判定

上記①に記載する方法をもって、平成 30 年度試験参加者 79 名を判定した結果、13 名を暫定陽性とした。なお、これら暫定陽性者は、同一 well で実施した³Hチミジン法における陽性判定結果、及び顕微鏡観察によるリンパ球細胞形体変化結果ともに一致していた（データ示さず）。一方で、本年度検討においては、判断が難しいケースが 14 例存在した（以降このグループを暫定陽性（疑）とする）。陰性は、52 名であった。図 1 は、これら暫定陽性、暫定陽性（疑）、陰性の S.I.の分布（6 時間後測定）を示すものである。本年度検討において、暫定陽性（疑）グループを設定したのは、当該グループのサンプルでは、ALMB 添加後 6 時間または 24 時間における測定で暫定基準値を超えることがあったものの、主に以下記載の理由から、感作と判定する確信が得られなかったからである。

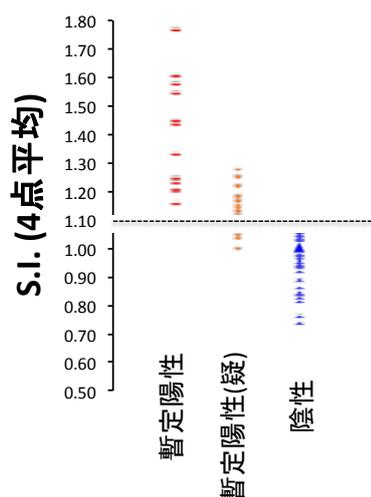


図 1 S.I.の分布 (n=79)

- 暫定陽性（疑）グループの事例は、6 時間時点の ALMB 測定では、4 点平均 S.I が 1.1 を超えていたが、24 時間後には、S.I.が 1.1 以下になっていた（データ示さず）。一方で、暫定陽性グループにおける S.I.は、24 時間後も高値を (>1.1)を維持していた。
- 上記とは逆に、6 時間時点の ALMB 測定では、4 点平均 S.I が 1.1 以下であったが、24 時間後には、S.I.が 1.1 以上になっていた（データ示さず）。
- 暫定陽性（疑）グループでは、同一 well で実施した³Hチミジン法における S.I.が、暫定陽性グループの S.I.と比して、明らかに低い（最大 S.I.=2.1）。なお、暫定陽性グループでは数十倍～数百倍を示す検体が多い（データ示さず）。
- 顕微鏡観察によって、分裂に伴う細胞形体変化をしているリンパ球を見つけるのが困難であった。暫定陽性グループでは容易に見つけることができる（データ示さず）。

暫定陽性（疑）14 例の S.I.については、偶然には出ないと感じられるデータであり（テクニカル問題ではない）、なんらかの生物学的意義がある可能性もあるが、現時点では合理的な説明がつかない。このような暫定陽性（疑）の扱いについては今後の課題である。

③ 昨年度 ALMB 結果との比較

平成 29 年度検討では、89 名が試験に参加し、16 名を暫定陽性としたが、本年度においては、この 16 名のうち 1 名が試験不参加であり、3 名が判断困難（暫定陽性（疑））であった。昨年度、暫定陽性とした残りの 12 名は、本年度の結果も一致していた。一方で、昨年度陰性判定であったが、本年度は、暫定陽性とした者が 1 名いる。この 1 名については、昨年度は当該対象者が服用していた免疫抑制剤であるステロイド影響により、ALMB 法による Be-LPT が陰性となった可能性を

考えていた者であり、本例は、ステロイドに限らず免疫抑制剤を服用している者が Be-LPT を受診した際の結果の取り扱いを考えさせられるものとして留意する必要がある。

④ ベリリウム作業内容との関係

表 1 には、アンケート調査に記載されていた過去または現在に経験したことがあるベリリウム作業を大きく 3 つに分類し、それらに関し ALMB 法による Be-LPT の結果を重ねたものである。なお、表中 A 工程は、主に原材料からベリリウム含有率の高い銅合金を製造する工程、B 工程は、主に A 工程で製造されたものを溶解し製品利用するベリリウム銅合金を製造する工程、C 工程は、B 工程で製造されたものを研磨等加工する工程である。また、複数工程を経験したことがある作業員については、該当する工程ごとにカウントを行なっている。それぞれの作業内容ごとにカイ二乗検定を実施したが、有意差はなく、現時点では作業内容と ALMB 法による判定の間に、統計的な関連性は見いだせていない。ただし、暫定陽性群 13 名のうち、5 名はアンケート無記入だったこと、C 工程経験者の試験参加人数が少なかったことに留意する必要がある。

表 1：平成 30 年までのベリリウム作業と ALMB 法による BeLPT 判定の関係

	陰性		暫定陽性(疑)		暫定陽性		合計		p値
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
H30年までのA工程	18	(69.2)	4	(15.4)	4	(15.4)	26	(100)	p=0.898
H30年までのB工程	24	(70.6)	4	(11.8)	6	(17.6)	34	(100)	p=0.484
過去のC工程	4	(57.1)	3	(42.9)	0	(0.0)	7	(100)	p=0.129

HLA-DPB1 遺伝子多型解析

これまでの疫学調査より、HLA-DPB1 遺伝子多型が、ベリリウムに対する感受性の違いに関与することが示唆されている²⁴⁻²⁹。特に、HLA-DPB1 E (Glutamic acid) 69 の表現型を規定するアリルを有する場合、ベリリウム感作率が高くなることが報告されている。HLA-DPB1 E69 アリルとして、HLA-DPB1 *02:01、*02:02、*06:01、*09:01、*13:01、*17:01 などが知られており、Silveira ら (2012 年) によると、BeS または CBD 群 (502 名) と、健常者コントロール群 (653 名) における HLA-DPB1 E69 アリル保有状況から、ベリリウム感作リスクは、HLA-DPB1 E69 アリルを 2 コピー有する場合、保有なしと比べてオッズ比 22.8 (95%信頼区間 13.3-39.2)、1 コピー有する場合、保有なしと比べてオッズ比 8.4 (95%信頼区間 6.6-11.3) と報告している²⁹。本研究では、遺伝子解析をすることに同意が得られた 77 名対象に HLA-DPB1 アリルについて解析した。以下に、① 77 名の HLA-DPB1 のアリル頻度、② ALMB 法による Be-LPT 結果と HLA-DPB1 E69 の関係について記述する。

① 対象者 77 名における HLA-DPB1 のアリル頻度について

表 2 左に対象者 77 名に観察された HLA-DPB1 のアリルとアリル頻度 (2N) についてまとめた。赤字記載は E69 を規定するアリルであり、黒字が non-E69 アリルである。アリル頻度が高い順から *05:01、*02:01、*09:01 と続いており、この順序は、HLA 研究所が公開する日本人 2966 人

(710 家族)における HLA-DPB1 のアレル頻度順位と一致している (表 2 右)。また、対象者 77 名において、E69 アレルを 1 コピーまたは 2 コピー有するのは 55 名 (71.4%)、E69 アレルなしは 22 名 (28.6%)であった。

表 2 : 対象者 77 名における HLA-DPB1 のアレル頻度

77名のHLA-DPB1のアレルとアレル
頻度 (2N)

* 05:01	29.2%
* 02:01	21.4%
* 09:01	16.2%
* 04:01	9.7%
* 04:02	7.8%
* 03:01	6.5%
* 02:02	5.8%
* 13:01	1.9%
* 06:01	1.3%

HLA研究所公開データ

710 families n=2966

DPB1	Allele frequency	rank
*05:01	38.402%	1
*02:01	24.107%	2
*09:01	9.946%	3
*04:02	9.778%	4
*04:01	5.057%	5
*03:01	3.978%	6
*02:02	3.405%	7
*13:01	1.956%	8
*14:01	1.484%	9
*19:01	0.742%	10
*06:01	0.573%	11
*17:01	0.135%	12
*36:01	0.135%	12

* HLA 研究所公開データ元 (http://hla.or.jp/med/frequency_search/en/allele/search/P/)

② ALMB 法による Be-LPT 結果と HLA-DPB1 E69 の関係

表 3 は対象者 77 名の HLA-DPB1 E69 アレルの保有状況に、ALMB 法による Be-LPT の結果を重ねたものである。ALMB 暫定陽性 13 名全員 (100%) が HLA-DPB1 E69 アレルを有しており、ALMB 暫定陽性 (疑) では 13 名中 10 名 (76.9%)、ALMB 陰性では、51 名中 32 名 (62.7%) が有していた。HLA-DPB1 E69 の保有状況 (アレルなし、1 アレル、2 アレル) と ALMB 法による Be-LPT の結果は、カイ二乗検定により、統計学的な有意差が認められ、両者に関連性があることが明確であった。表 4 には、HLA-DPB1 の各アレルとその頻度を、ALMB 法による Be-LPT の結果別に示した。暫定陽性群における HLA-DPB1 E69 アレルである *02:01、*09:01 等のアレル頻度は ALMB 暫定陽性グループで、陰性グループより高く、逆に、non-E69 アレルである、*05:01、*04:01 等は陰性グループで暫定陽性グループより高いという結果であり、HLA-DPB1 E69 アレルがベリリウムの感受性に関与しているとする過去の報告と一致するものであった。

表3：対象者77名におけるHLA-DPB1 E69アリル保有状況とALMB法によるBe-LPT結果

	陰性		暫定陽性(疑)		暫定陽性		合計		p値
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
HLA-DPB1#									p=0.012 *
0アリル	19	(86.4)	3	(13.6)	0	(0.0)	22	(100)	
1アリル	30	(63.8)	8	(17.0)	9	(19.1)	47	(100)	
2アリル	2	(25.0)	2	(25.0)	4	(50.0)	8	(100)	
合計	51	(66.2)	13	(16.9)	13	(16.9)	77	(100)	

表4：対象者77名におけるHLA-DPB1 E69アリル頻度とALMB法によるBe-LPT結果

アリル	ALMB (暫定陽性) (n=13)		ALMB (暫定陽性(疑)) (n=13)		ALMB (陰性) (n=51)	
	26 (2N)	アリル頻度(%)	26 (2N)	アリル頻度(%)	102(2N)	アリル頻度(%)
*02:01	11	42.3	6	23.1	16	15.7
*02:02	0	0.0	1	3.8	8	7.8
*03:01	0	0.0	0	0.0	10	9.8
*04:01	1	3.8	3	11.5	11	10.8
*04:02	1	3.8	1	3.8	9	8.8
*05:01	4	15.4	7	26.9	34	33.3
*06:01	1	3.8	0	0.0	1	1.0
*09:01	8	30.8	6	23.1	11	10.8
*13:01	0	0.0	1	3.8	2	2.0

【考察】

平成30年度検討では、ベリリウム取り扱い経験を有する79名を対象にALMB法によるBe-LPTを実施したところ、13名が暫定陽性となり、当該集団におけるベリリウム感作率(CBD含む)は16.5%であった。なお、平成29年度検討では、89名が試験に参加し、16名を暫定陽性とし、感作率は18.8%であった。Be-LPTは、現在のところ、ベリリウム感作を発見することができる唯一の方法であるが、米国で実施されてきた³Hチミジン法によるBe-LPTでは、実測値の不安定性に起因する判定の困難性や実施施設間の結果の不一致等が問題となっていた¹⁶⁻¹⁹。本研究における、ALMB法によるBe-LPTでは、脱落者を除き昨年度、暫定陽性とした15名中12名は、本年度の結果も暫定陽性と一致しており、その一致性は高いものと考えられる。このことから、本研究における判定基準として暫定的に設定したS.I.>1.1というのは一つの基準として妥当な線であると考えられるが、本年度検討においては、S.I.>1.1に従って単純に判断することが難しい検体が散見された(暫定陽性(疑):14名)。これらをどのように取り扱うかについては、課題として残るところである。米国で実施されているBe-LPTでは、通常1回の試験において、被験者の同日に採取した血液を、2または3施設に送付し試験することになっており、各施設が判定する際には、陽性、陰性、ボーダー(判断つかず)が設定されている。このボーダーも意義があるものとして扱われており、陽性:2点、ボーダー:1点、陰性:0点と点数化され、合計点数3以上で陽性と判定する方法が主流となっているようである²⁰⁻²³。例えば、3施設実施で、(陽性/ボーダー/陰性)や、(ボーダー/ボーダー/ボーダー)は3点となるため陽性判定になる。ALMB法によるBe-LPTは、³Hチミジン法とは手法が異なるため、米国で実施されている判定手法をそのまま導入することは難しいと考えられるが、いずれにしても、システムティックな判定方法が必要であ

ると同時に、バリデーション試験が必要であると考えられる。

これまでの報告におけるベリリウム作業従事者の感作率は、ベリリウムの取扱い業種および調査年代によって幅があるが、20%以内とするものが多い。例えば、米国における原子力軍事産業関連企業数社では、1~5%の感作率が報告されている⁴。一方、同じく米国における金属ベリリウム・ベリリウム合金・酸化ベリリウム製造関連企業数社では2~15%の感作率が報告されている⁴。いずれも、調査年代が2000年以前では高く、2000年以降に雇用された従業員を対象に検査をした場合は感作率が低い⁴。これらの知見から判断すると、本研究における検査対象者の感作率（今年度16.5%、昨年度18.8%）は、大きく外れてはいないが、やや高めである。今回得られたアンケート調査のベリリウム取扱いに関わる情報だけでは、得られたベリリウム作業内容とALMBの結果からは、感作に直結する作業を結論づけるのは未だ難しい状況である。理由としては、特に暫定陽性グループ13名のうち5名が作業内容の記載がないこと、C工程経験者の試験参加人数が少ないことなどによる。今回の研究結果からみると、ベリリウム取扱いに関する情報（作業内容や作業経験・熟練度、従事年数、防護具の着用状況など）より正確な情報を入手し、ベリリウムの衛生管理に活かすためには、作業場の徹底した調査、ならびに個人ヒアリングの実施等が望ましいものと考えられる。表5には、参考までに、米国呼吸器学会によってまとめられた、米国内におけるベリリウム関連産業と、そのベリリウム作業において感作した割合、CBDを発症した割合を示す⁴。なお、ここでは誤認を避けるために、作業内容については原文（英文）のまま記載する（表の順序等は見易さを考慮して一部変更している）。

表5 Process-related Risk of BeS and CBD by Type of Industry⁴

	Job or Process	BeS (%)	CBD (%)	備考
Nuclear weapons facility (Kreiss et al. 1999)	Machinists	4.7	not applicable	
	Metallurgical operator	4.6		
Nuclear weapons facility (Stange et al. 2001)	Beryllium machinists	11.9	8.5	* Same facility
	Health physics	11.9	4.8	
	Construction trade	10	2.6	
Beryllia ceramics (Kreiss et al. 1993)	Dry pressing	15.8	15.8	
	Process development/engineering	13.6	13.6	
	Ventilation maintenance	11.1	11.1	
Beryllia ceramics (Kreiss et al. 1996)	Lapping	20	not applicable	* Same facility * Lapping is a machining operation, in which two surfaces are rubbed together with a liquid containing an abrasive grit.
	Machining	14.3		
Beryllia ceramics (Henneberger 2001)	Lapping	21.1	not applicable	* (Henneberger 2001) Results are for longer-term workers (employed >6 yr; first surveyed in 1992 but none BeS at that time)
	Machining	17.5		
	Forming	15.6		
	Firing	14.9		
Beryllium metal, alloy and oxide production (Kreiss et al. 1997)	Ceramics production	11.6	9	* Same facility * (Schuler et al. 2012) Results are for shorter-term workers (employed <6 yr). * Results not significant.
	Beryllium metal pebble plant	13.4	5.2	
	Analytic laboratory	20	4 (*)	
Beryllium metal, alloy and oxide production (Schuler et al. 2012)	Be metal pebbles plant	26.9	5 (*)	
	Be oxide Alloy melting and casting	14.8	5.2	
	Maintenance	18	2.4 (*)	
Copper-beryllium alloy finishing (Schuler et al. 2005)	Point and chamfer††	21.4	21.4	Chamfer (here) is the process of putting a beveled edge on a rod.
	Wire pickling and annealing	12.5	10.3	
	Wire drawing	13.6	9.5	

ベリリウム感作の感受性に関連があると考えられているHLA-DPB1 E69 アリルについて、対象者77名におけるその保有状況と、ALMB法によるBeLPTの結果は、統計学的な有意差が認められ、本研究においても、ベリリウム感作とHLA-DPB1 E69の関係は相関性が高いと考えられた。特に本研究では、HLA-DPB1 E69アリルである*02:01及び*09:01のアリル頻度が、ALMB暫定陽性グループで高いことが見受けられた（*02:01:42.3%、*09:01:30.8%）。これは、HLA研究所が公開するHLA-DPB1のアリル頻度データから考えると、*02:01、*09:01はアリル出現頻

度が上位 2 位 (24.107%)、3 位(9.946%)であり、当該アレルを有する母数が大きいことが理由であると考えられる。これまでの疫学知見によると、HLA-DPB1 E69 アレル 02:01、09:01 のベリリウム感作リスクは、02:01/02:02 のいずれかを 2 コピー有する、または 1 コピーずつ保有する場合、保有なしと比べてオッズ比 5.4 (95%信頼区間 2.2-11.3)、いずれかを 1 コピー有する場合、保有なしと比べてオッズ比 2.7 (95%信頼区間 2.1-3.4)であり、E69 *09:01 を 1 コピーまたは 2 コピー有する場合、保有なしと比べてオッズ比 4.4 (95%信頼区間 2.1-9.43)と報告されている²⁹。このように、本研究、及びこれまでの報告においても、ベリリウム感作と HLA-DPB1 E69 の関係に高い相関性が認められたが、遺伝子多型情報を、ベリリウムの衛生管理にどのように考慮すべきかについては、慎重な議論が必要である。米国 NIOSH では、HLA-DPB1 E69 アレルは、一般公衆においても広く見られること、CBD 患者でもその約 1/4 は HLA-DPB1 non-E69 アレルであることを理由に、HLA-DPB1 遺伝子解析は“CBD の発症を予測する”という意味において現時点では有用ではないとしている³⁸。これは、現時点では、HLA-DPB1 E69 アレルを保有していることは、ベリリウムに関する作業に従事する場合においては、ベリリウムに感作する可能性が高まるリスクファクターの一つになりうると解するべきであろう。

【まとめ】

本研究では ALMB 法による Be-LPT を開発し、ベリリウム作業従事者に実応用できる見込みが立ち、研究の当初目標を達成した。一方で、ALMB 法による Be-LPT のシステムティックな判定方法の開発、バリデーション試験、ベリリウム感作に直結する作業内容の同定と適した防護対策、HLA-DPB1 遺伝子多型のベリリウム衛生管理における活用の是非等、新たに出てきた課題も多くある。

米国 OSHA が、昨年発行したベリリウムの衛生管理における Final Rule の中で、ベリリウム取り扱い従事者の健康診断に、Be-LPT と CT 検査を要求するようになった³⁹。我が国におけるベリリウム衛生管理は米国と比すると他国と同様、遅れているのが現状である。我が国の特定化学物質障害予防規則に基づく特殊健康診断の受診対象労働者数は 849 人(平成 29 年)であるが、この中で、有所見者は 15 人 (1.8%)とされているが、現在の特殊健康診断項目にはベリリウム感作の状況に着目した Be-LPT や、CBD 初期病変を検出できる可能性がある CT 検査が要求されていないのが実情である。また、現在特殊健康診断を受診していない、過去のベリリウム作業従事者を考慮すると、ベリリウムばく露を経験した可能性がある労働者は潜在的に相当数存在すると考えられる。我が国においても、特殊健康診断対象者に限定することなく、継続的にベリリウム作業経験者の BeS、CBD 発症状況について情報を集積すると同時に、低線量 CT および Be-LPT の実用化研究を進める必要があると考えられる。また、ベリリウム特殊健康診断のあり方を含め、我が国における、ベリリウムの衛生管理を改めて考え直すべき時期が来ているものと考えられる。

参考文献

1. Newman LS, Lloyd J, Daniloff E. The natural history of beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.* 1996, 104, Suppl 5:937-43.
2. Newman LS. and Maier L. (2001) Beryllium. In: *Clinical environmental health and toxic exposures.* Sullivan J, Krieger G, editors. 2nd ed. Philadelphia: Williams & Wilkins. p. 919-26.

3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Case Studies in Environmental Medicine Beryllium Toxicity. WB1095, 2008
4. An Official American Thoracic Society Statement: Diagnosis and Management of Beryllium Sensitivity and Chronic Beryllium Disease. *Am J Respir Crit Care* 2014, 15;190(10):e34-59
5. Henneberger PK, Goe SK, Miller WE, Doney B, Groce DW. Industries in the United States with airborne beryllium exposure and estimates of the number of current workers potentially exposed. *J Occup Environ Hyg* 2004;1:648–659.
6. OSHA Fact sheet (2015) OSHA's proposed beryllium rule: overview. DTSEM FS-3821 08/2015
7. Chronic beryllium disease prevention program. Office of Environment, Safety and Health, Department of Energy. Final rule. *Fed Regist.* 1999;64(235):68854-68914.
8. US Department of Energy. Office of Health, Safety and Security, Office of Illness and Injury Prevention Programs: US Department of Energy, Illness and Injury Surveillance Program, Worker Health Summary, 1995- 2004.
9. 平成 30 年度 労働衛生のしおり
10. Rossman MD, Kern JA, Elias JA, Cullen MR, Epstein PE, Preuss OP, Markham TN, Daniele RP. Proliferative response of bronchoalveolar lymphocytes to beryllium: a test for chronic beryllium disease. *Ann Intern Med* 1988;108:687–693.
11. Kreiss K, Newman LS, Mroz MM, Campbell PA. Screening bloodtest identifies subclinical beryllium disease. *J Occup Med* 1989;31: 603–608.
12. Mroz MM, Kreiss K, Lezotte DC, Campbell PA, Newman LS. Reexamination of the blood lymphocyte transformation test in the diagnosis of chronic beryllium disease. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:54–60.
13. Newman LS. Significance of the blood beryllium lymphocyte proliferation test. *Environ Health Perspect* 1996;104:953–956.
14. Barna BP, Culver DA, Yen-Lieberman B, Dweik RA, Thomassen MJ. Clinical application of beryllium lymphocyte proliferation testing. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:990–994.
15. Williams WR, Williams WJ. Development of beryllium lymphocyte transformation tests in chronic beryllium disease. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1982;67:175–180.
16. U.S. Department of Energy: Beryllium lymphocyte proliferation testing (BeLPT), DOE SPECIFICATION 1142-2001
17. Stange AW, Furman FJ, Hilmas DE. The beryllium lymphocyte proliferation test: relevant issues in beryllium health surveillance. *Am J Ind Med* 2004;46:453–462.
18. Deubner DC, Goodman M, Iannuzzi J. Variability, predictive value, and uses of the beryllium blood lymphocyte proliferation test (BLPT): preliminary analysis of the ongoing workforce survey. *Appl Occup Environ Hyg* 2001;16:521–526.
19. Smith DE, Golden AP, Stange AW, Barker E, Mroz M, Barón AE, Ghosh D, Maier L, Cragle D, Newman LS. Clinical and laboratory factors contributing to uninterpretable beryllium lymphocyte proliferation tests (BeLPT). *Am J Ind Med.* 2018 Jul;61(7):592-604.

20. Middleton DC, Mayer AS, Lewin MD, Mroz MM, Maier LA. Interpreting borderline BeLPT results. *Am J Ind Med* 2011;54:205–209.□
21. Cher DJ, Deubner DC, Kelsh MA, Chapman PS, Ray RM. Assessment of the beryllium lymphocyte proliferation test using statistical process control. *Inhal Toxicol.* 2006 Oct;18(11):901-10.
22. Middleton DC, Lewin MD, Kowalski PJ, Cox SS, Kleinbaum D. The BeLPT: algorithms and implications. *Am J Ind Med* 2006;49:36–44.
23. Middleton DC, Fink J, Kowalski PJ, Lewin MD, Sinks T. Optimizing BeLPT criteria for beryllium sensitization. *Am J Ind Med* 2008;51: 166–172.
24. Richeldi L, Sorrentino R, Saltini C. HLA-DPB1 glutamate 69: a genetic marker of beryllium disease. *Science* 1993;262:242–244.
25. Maier LA, McGrath DS, Sato H, Lympny P, Welsh K, Du Bois R, Silveira L, Fontenot AP, Sawyer RT, Wilcox E, et al. Influence of MHC class II in susceptibility to beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *J Immunol* 2003;171:6910–6918.
26. McCanlies EC, Ensey JS, Schuler CR, Kreiss K, Weston A. The association between HLA-DPB1Glu69 and chronic beryllium disease and beryllium sensitization. *Am J Ind Med* 2004;46:95–103.
27. Wang Z, Farris GM, Newman LS, Shou Y, Maier LA, Smith HN, Marrone BL. Beryllium sensitivity is linked to HLA-DP genotype. *Toxicology* 2001;165:27–38.
28. Wang Z, White PS, Petrovic M, Tatum OL, Newman LS, Maier LA, Marrone BL. Differential susceptibilities to chronic beryllium disease contributed by different Glu69 HLA-DPB1 and -DPA1 alleles.□*J Immunol* 1999;163:1647–1653.
29. Silveira LJ. et al. (2012) Chronic beryllium disease, HLA-DPB1, and the DP peptide binding groove. *J Immunol.*, 189, 4014-4023.
30. Kreiss K, Mroz MM, Zhen B, Martyny JW, Newman LS. Epidemiology of beryllium sensitization and disease in nuclear workers. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:985–991.
31. Stange AW, Hilmas DE, Furman FJ, Gatcliffe TR. Beryllium sensitization and chronic beryllium disease at a former nuclear weapons facility. *Appl Occup Environ Hyg* 2001;16:405–417.
32. Kreiss K, Wasserman S, Mroz MM, Newman LS. Beryllium disease screening in the ceramics industry. Blood lymphocyte test performance and exposure-disease relations. *J Occup Med* 1993;35: 267–274.
33. Kreiss K, Mroz MM, Newman LS, Martyny J, Zhen B. Machining risk of beryllium disease and sensitization with median exposures below□2 micrograms/m³. *Am J Ind Med* 1996;30:16–25.
34. Henneberger PK, Cumro D, Deubner DD, Kent MS, McCawley M, Kreiss K. Beryllium sensitization and disease among long-term and short-term workers in a beryllium ceramics plant. *Int Arch Occup Environ Health* 2001;74:167–176.
35. Kreiss K, Mroz MM, Zhen B, Wiedemann H, Barna B. Risks of beryllium disease related to work processes at a metal, alloy, and oxide production plant. *Occup Environ Med*

- 1997;54:605–612.
36. Schuler CR, Virji MA, Deubner DC, Stanton ML, Stefaniak AB, Day GA, Park JY, Kent MS, Sparks R, Kreiss K. Sensitization and chronic beryllium disease at a primary manufacturing facility, part 3: exposure-response among short-term workers. *Scand J Work Environ Health* 2012;38:270–281.
 37. Schuler CR, Kent MS, Deubner DC, Berakis MT, McCawley M, Henneberger PK, Rossman MD, Kreiss K. Process-related risk of beryllium sensitization and disease in a copper-beryllium alloy facility. *Am J Ind Med* 2005;47:195–205.
 38. NIOSH ALERT: Preventing sensitization and disease from beryllium exposure. DHHS (NIOSH) Publication number 2011-107
 39. OSHA: Final Rule to Protect Workers from Beryllium Exposure. 29CFR Part 1910 [Docket No. OSHA–2018–0003]

ベリリウム作業者における平成 30 年度胸部 CT 読影結果について

松尾 正樹、芦澤 和人、原 眞咲、
横山多佳子、加藤 勝也、岸本 卓巳

【目的】

本研究において、平成 28 年度よりベリリウム取扱作業者における胸部病変の有無を確認するため、年 1 回の胸部 CT 撮影を行っている。今回は平成 30 年度胸部 CT 読影結果について報告する。

【対象】

現在および過去にベリリウム取り扱い業務に従事したことがあり、本研究の趣旨に同意を得られた 79 名が対象となった。

【方法】

胸部 CT 撮影は Optima CT660Pro Advance (GE 社) で行い、解析は Revolution EVO (GE 社) を使用し、AEC 法併用、Z-filter 最適化のもと、至適撮影条件として、被曝線量 1.2mSv の低線量、最新の ASiRV 法の設定 60%にて逐次近似再構成を使用、Chest 関数 1.25mm、2.5mm、5mm 厚再構成を採用した。画像の読影は研究班員である岸本、芦澤、加藤、原、横山、松尾が独立行政法人労働者健康安全機構本部にて行い、合議制で最終診断を決定した。

【結果】

対象は全例男性で平均年齢は 40.9 歳、中央値は 42 歳だった。胸部 CT にて何らかの所見を有していた症例は 62 例 (78.5%) であった。

表 1~表 4 に具体的な胸部 CT 読影結果を示す。表 1 は主に肺の線維化を示唆しうる所見をまとめている。すりガラス影は 8 例 (10.1%) に認められたが、完成された線維化所見である蜂窩肺は 1 例もなかった。表 2 には肺内病変および胸腔内リンパ節所見についてまとめている。粒状影は 21 例 (26.6%)、結節影は 25 例 (31.6%) と比較的多くの症例で認めていた。結節影は全例境界明瞭であった。肺気腫、肺嚢胞については各々 8 例 (10.1%)、19 例 (24.1%) であった。リンパ節腫大は 8 例 (10.1%) に見られ、うち 3 例に両側肺門リンパ節腫大を伴っていた。表 3 に示した胸水、病変分布の優位性、その他の合併症、大陰影は 1 例もなかった。表 4 では肺癌を疑う所見は 1 例もなく、胸膜病変は 7 例 (8.9%) に認められたが胸膜プラークを有する症例はなかった。何らかの胸部 CT 所見を認めた 62 症例の内訳を表 5 に示す。所見はあるものの経過観察不要とされた症例が 50 例 (80.6%) と最も多かつ

た。これらは炎症性変化や肺内リンパ節、肺嚢胞、気腫性変化などを認めた症例であり、活動性を伴う疾患は否定的と判断されたものである。もともと慢性ベリリウム肺と診断されている2例を除くと、経過観察もしくは要精査とされた症例は10例（16.1%）であった。そのうち2例は感染症など活動性のある炎症性変化の疑いとして、1例はBHLを伴うリンパ節腫大を主たる所見として経過観察等が必要と判断された。また、1例は溶接工肺疑いとして要精査が必要と判断された。他の6例は慢性ベリリウム肺の画像所見として頻度が高く観察されるすりガラス影、粒状影を認めており、研究班での議論の結果を受けて要精査の必要性が指摘されたものである。

表 1. CT 所見①

すりガラス影(線維化関連)	あり	8例	(10.1%)
	なし	71例	(89.9%)
すりガラス影±網状影	あり	1例	(1.3%)
	なし	78例	(98.7%)
胸膜下楔状影 (fibrotic consolidation)	あり	0例	(0%)
	なし	79例	(100%)
牽引性気管支拡張・細気管支拡張	あり	2例	(2.5%)
	なし	77例	(97.5%)
蜂窩肺	あり	0例	(0%)
	なし	79例	(100%)

表 2. CT 所見②

粒状影	あり	21例	(26.6%)
	なし	58例	(73.4%)
* 4例が小葉中心性			
結節影	あり	25例	(31.6%)
	なし	54例	(68.4%)
* あり25例は全例明瞭な結節			
びまん性肺気腫	あり	8例	(10.1%)
	なし	71例	(89.9%)
肺嚢胞	あり	19例	(24.1%)
	なし	60例	(75.9%)
リンパ節腫大	あり	8例	(10.1%)
	なし	71例	(89.9%)
* あり8例中3例で両側肺門リンパ節腫大(BHL)を確認			

表 3. CT 所見③

胸水	あり	0例	(0%)
	なし	79例	(100%)
病変分布の優位性	あり	0例	(0%)
	なし	79例	(100%)
その他の合併症	あり	0例	(0%)
	なし	79例	(100%)
大陰影	あり	0例	(0%)
	なし	79例	(100%)

表 4. CT 所見④

肺癌疑い病変	あり	0例	(0%)
	なし	79例	(100%)
胸膜プラーク	あり	0例	(0%)
	なし	79例	(100%)
胸膜病変	あり	7例	(8.9%)
	なし	72例	(91.1%)

表 5. 胸部 CT 所見あり 62 例の内訳

胸部CT所見あり62例の内訳

➤ 経過観察不要	50例 (80.6%)
➤ 経過観察・要精査	10例 (16.1%)
➤ CBD症例	2例 (3.2%)

次に、本研究の対象者において労働安全衛生総合研究所にて施行されたベリリウム末梢血リンパ球幼若化試験（アラマブルー法）の結果と今回の画像所見について検討を行った。今回アラマブルー法にて暫定陽性と判断されたのは 13 例だった。前項にて画像上、慢性ベリリウム肺を考慮して要精査が必要と判断した 6 例は全例この中に含まれていた。表 6 に検査暫定陽性症例の画像所見を示す。画像所見に異常を認めなかった症例は 1 例のみで、ほとんどの症例が何らかの所見を有していた。慢性ベリリウム肺に頻度が高く観察されると考えられる粒状影やすりガラス影を呈していた症例は 9 例 (69.2%) と多かった。平成 30 年度第 3 回および第 4 回班会議での検討の結果、アラマブルー法にて暫定陽性であることを踏まえて、この 9 例のうち慢性ベリリウム肺 2 例を除いた 7 例に対して画像に関して要精査が必要と判断し、7 例のうち 3 例は詳細な職歴を確認する必要性が指摘された。

表 6. アラマブルー法（ALMB 法）結果と CT 所見

	CT所見	ALMB法
1	すりガラス影、粒状影、結節影	(++)
2	粒状影(小葉中心性)、リンパ節腫大(BHLあり)	(++)
3	結節影、索状影	(++)
4	すりガラス影+網状影、牽引性気管支拡張、リンパ節腫大(BHLあり)、胸膜病変	(++)
5	すりガラス影、粒状影、結節影、肺気腫、肺嚢胞、小葉間隔壁肥厚、肺動脈拡大	(++)
6	所見なし	(++)
7	すりガラス影、結節影、リンパ節腫大、索状影	(++)
8	粒状影(小葉中心性)、結節影、肺嚢胞、リンパ節腫大	(++)
9	肺嚢胞	(++)
10	粒状影、リンパ節腫大(BHLあり)、斑状影(左下葉)	(++)
11	粒状影、結節影、リンパ節腫大、胸膜病変	(++)
12	肺気腫、肺嚢胞	(++)
13	すりガラス影、粒状影(小葉中心性)、リンパ節腫大	(++)

【考察】

今年度の CT 読影結果にて何らかの所見を有していた症例は 62 例（78.5%）であり平成 28 年度 40 例（44.4%）、平成 29 年度は 42 例（48.8%）と比べて増加した。過去 2 年間よりも粒状影、結節影、肺嚢胞といった所見の増加が顕著であった。この結果にはいくつかの原因が考えられる。一点目には CT 画像の撮影条件や解析条件の改善による効果があるだろう。これにより、粒状影や小さな肺嚢胞の検出率が上昇した可能性はあると思われる。二点目としては、多くの症例で 3 年間追跡できたことにより経年的に有所見率が増加したのかもしれない。これはベリリウムばく露や職場環境以外に喫煙や肺疾患の潜在的な罹患など様々な要素が影響した可能性がある。三点目には、今年度の CT 撮影時期は平成 30 年 12 月から平成 31 年 1 月にかけて行われており、インフルエンザ流行期であるなど気道感染をきたしやすい時期であったことが影響した可能性もある。下気道感染を示唆する粒状影や限局的すりガラス影の所見を多く認めたことからこのことが推察される。これらの所見は慢性ベリリウム肺を疑う際に重要な所見でもあるので健診としての CT 撮影時期は考慮したほうがいいのかもわからない。

本研究においてベリリウム作業従事者に対する胸部 CT 検査を開始して本年度で 3 年目となる。この間、低線量 CT での至適条件を検討し微調整を行いながら施行してきた。本年

度は撮影機器、解析機器、逐次近似再構成法は昨年と変更なく、線量のみを 1.0mSv から 1.2mSv にあげて撮影した。線量をあげた目的はベリリウム肺の早期所見として重要である微細な粒状影、すりガラス影の検出出力を向上させるためである。経年的に画質の改善が得られていることは実感され、今年度有所見率が症状したことにも影響していると考えられる。一方で以前より課題とされてきた肺尖部の粒状影やすりガラス影の判定にはいまだ困難を生ずることもあった。今後 CT 健診を導入するにあたってはさらなる条件の改善を要すると考えられた。

今回ベリリウム末梢血リンパ球幼若化試験（アラマブルー法）にて暫定陽性と判断されたのは 13 例（16.5%）だった。そのうち何らかの所見を有していたのは 12 例（92.3%）と高率であった。なかでも慢性ベリリウム症の CT 所見で頻度が高く見られる粒状影、すりガラス影、両側肺門リンパ節腫脹を伴うリンパ節腫大など認めた 7 症例に関しては何らかの形でフォローを推奨する必要性が指摘された。

平成 30 年度胸部 CT 読影結果について報告した。経年的な撮影条件改善の影響もあり多くの有所見者を拾い上げることができた。さらにアラマブルー法の結果を参考にすることで、感作を根拠に経過観察を要する症例の選択も可能となった。今後の課題に関しては、本研究 3 年間の結果を総括して改めて報告する。

平成 30 年度における低線量 CT 撮影・再構成条件最適化について

原 眞咲, 芦澤 和人, 加藤 勝也,
横山多佳子, 松尾 正樹, 岸本 卓巳

背景

ベリリウム肺評価のための画像診断法として、平成 28 年度に単純 X 線写真正面像、通常線量 CT と低線量 CT を採用した。平成 29 年度は被検者の被曝量低減のため、通常線量 CT を省略し、低線量 CT のみでの評価を実施した。

平成 29 年度は、新たに導入された GE 社製 Revolution EVO を用い、逐次近似再構成法として平成 28 年度で使用した ASiR から改良され、streak artifact 低減に有用性の高い ASiRV を使用した。低線量 CT として被曝線量 1mSv を維持した。より微細な病変を検出するため再構成厚は 1.25mm を採用した。画質改善法として、1) 低線量 CT 撮影の際に automatic exposure control (AEC) 法を採用し、画質劣化が目立つ肺尖部と横隔膜周囲の線量を相対的に増加、肺が主体の中部の線量を低減し、総被曝線量を維持したまま画質改善を試みた。さらに、2) 受検者の整位の最適化、3) ASiRV の適応程度最適化、4) GE 社製 Revolution EVO における画像再構成関数の最適化、5) Z-filter の最適化 (1.6→1.2 による、streak noise の低減) といった対策を実施した。

これらの対策により、平成 28 年度と比較し画質は著明に改善したが、平成 29 年度の CT 読影後、両側肺尖部にベリリウム肺の早期病変との鑑別が問題となるアーチファクトと思われるすりガラス状所見が散見され (図 1)、最終平成 30 年度の CT 撮影に際しての改善点として提起された。

平成 30 年度の CT 撮影実施に際してこの問題点への対策を試みた。



図 1. 平成 29 年度撮影条件 1.25mm 厚で認められたすりガラス状アーチファクト (矢印)

被曝線量は 1mSv、AEC 併用、再構成厚 1.25mm、ASiRV 強度 60、再構成関数 Chest、3 名の異なる被検者の画像である。微小すりガラス状所見が散在性に認められる。

方法

肺尖部のすりガラス状所見の改善するためには、S/N 比の向上が有効と考えられ、曝射線量の増加およびより厚い再構成厚の採用が対策として提案された。

1) CT 検診認定機構および肺癌取扱い規約のいずれも、肺癌に対する低線量 CT 検診を実施するには局所の曝射線量である CTDIvol2.5 mGy 以下を推奨している。これを上限とすると DLP (dose-length product) = CTDIvol (computed tomography dose index volume) × スキャンレンジ 35 cm = $2.5 \times 35 = 8.75$ mGy · cm となり、ICRP 勧告で示された胸部 CT の換算係数 0.014 を使用すると実行線量は $8.75 \times 0.014 = 1.225$ mSv が胸部の低線量 CT の上限と考えられた。これを基に平成 30 年度の CT 撮影に際しては、29 年度の 20% 増しの 1.2 mSv を採用することとした。

2) 再構成厚については、平成 28 年度は 2.5mm と 5mm としたが、ベリリウム肺ではより微細なすりガラス状病変が早期病変として出現することが想定されたため、すりガラス状病変をより鋭敏に検出可能と考えられる 1.25mm 厚再構成を採用したが、アーチファクトの存在が指摘されたため、30 年度においては、薄層 CT で増加するノイズによる S/N 比低下への対策として、2.5mm と 5mm 画像も同一データを使用して作成、1.25mm 厚と併せて読影することにより、アーチファクトと病変との識別を試みる事とした。

結果

- 1) 曝射線量 20%増加による画質向上が確認された (図 2, 3)。
- 2) 1.25mm 厚再構成と比較して、2.5mm, 5mm の順に S/N 比は優れており、すりガラス状病変の認識およびアーチファクトとの識別に有用と考えられた (図 4, 5)。
- 3) 一部の被検者で、以前よりすりガラス状所見がむしろ目立った例が観察され、さらなる対策の必要性が示された。

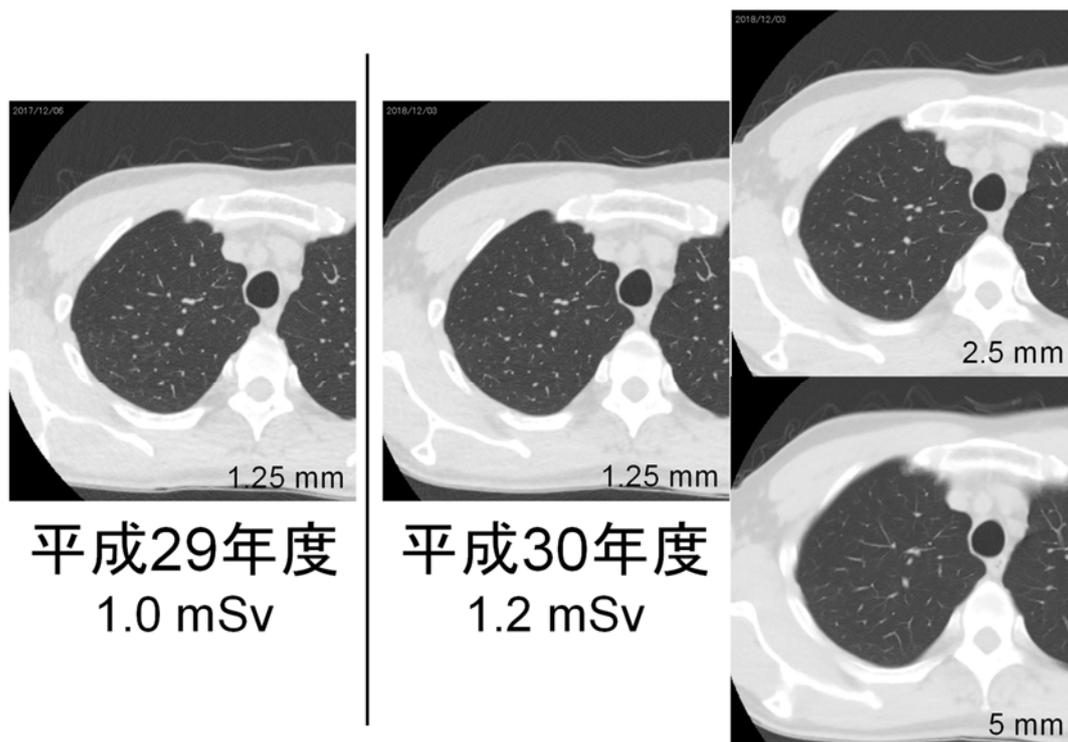


図 2. 平成 30 年度の撮影条件による画質改善

平成 30 年度は被曝線量を 1.2 mSv に増加した。平成 29 年度の再構成厚 1.25mm と比較して、微小すりガラス状所見が減少している。2.5mm 厚, 5mm 厚ではさらに S/N 比が向上しているが、部分体積現象により微細構造の描出には適していない。

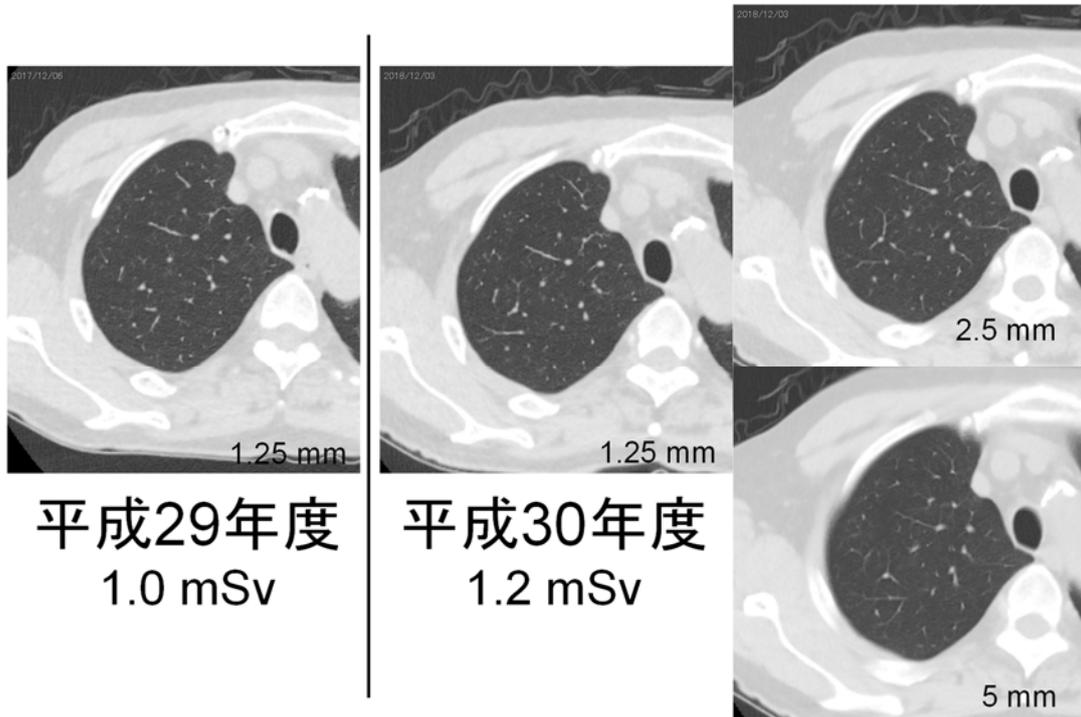


図 3. 平成 30 年度の撮影条件による画質改善

図 2 と同様に平成 29 年度の再構成厚 1.25mm と比較して、微小すりガラス状所見が減少している。

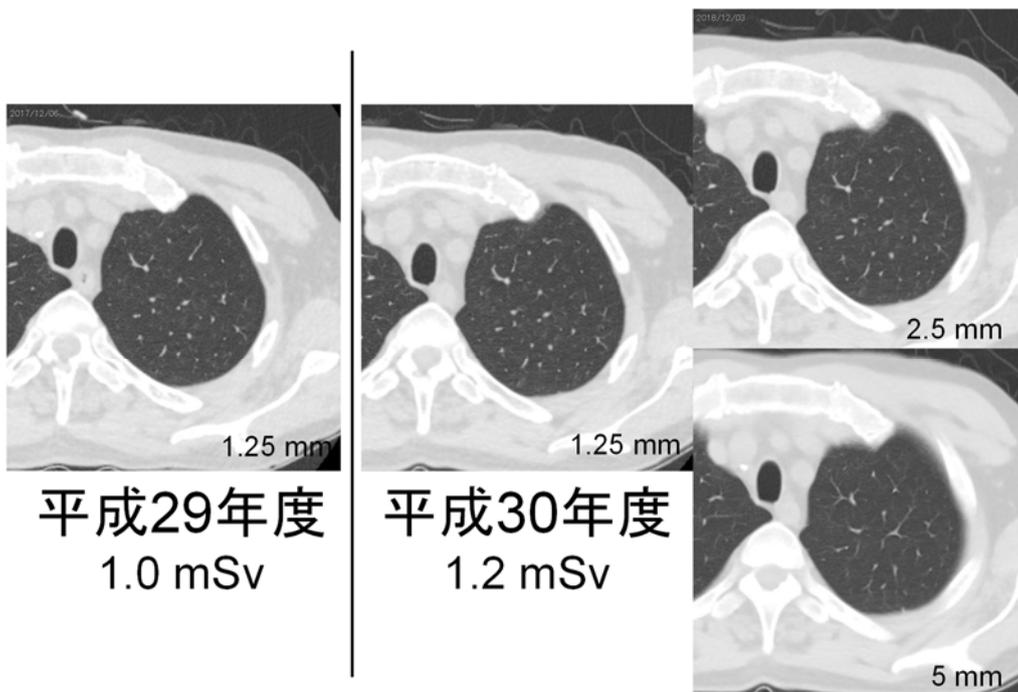


図 4. 平成 30 年度の撮影条件による画質改善不十分例

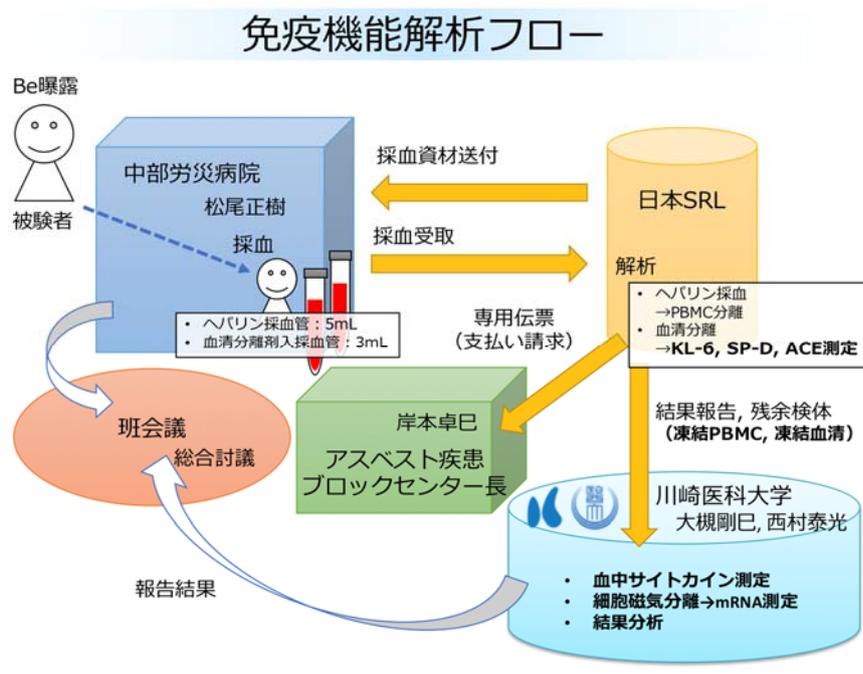
微小すりガラス状所見は変化なし、ないしは若干強調されている。微細すりガラス状病変の検出に適した線量の検討、さらに優れた逐次近似再構成法の採用といった対策の必要性が感じられる。

結論

- 1) 平成 30 年度で実施された GE 社製 Revolution EVO の採用、AEC 法併用、Z-filter 最適化、逐次近似再構成法 ASiRV (60%)、Chest 関数再構成、1.25mm 再構成厚に加えて、平成 30 年度は、低線量 CT 被曝線量を 1mSv → 1.2mSv に 20% 増加、2.5mm, 5mm 再構成厚を追加し、画質向上によるすりガラス状アーチファクトの低減を試みた。
- 2) すりガラス状アーチファクトは低減したが、依然残存例も観察され、さらなる対策が必要と考えられた。
- 3) 低線量 CT の基準として、低線量肺癌 CT 検診のガイドラインを参考にしたが、びまん性のすりガラス状所見の評価には限界も示唆され、びまん性病変を対象とする線量の検討が必要と考えられる。
- 4) よりすぐれた逐次近似再構成法を採用する必要性が示唆された。

【緒言】

前年度までにベリリウム (Be) 曝露者の末梢血を検体として単球比率(%), 単球上 CD86, CD163 発現量および血中 IL-4 濃度を測定し、Be 曝露者内での集団分布を解析した。しかし、所見の有無との明確な関連は見いだせなかった。そこで、Be 曝露者の末梢血より血清および末梢血単核細胞 (PBMC) を分離し包括的免疫機能解析を行うことを計画した。各測定値の所見有無による差異、感作程度との関連を解析し、重回帰分析、主成分分析を実施し、Be 感作予防指標を探索した。

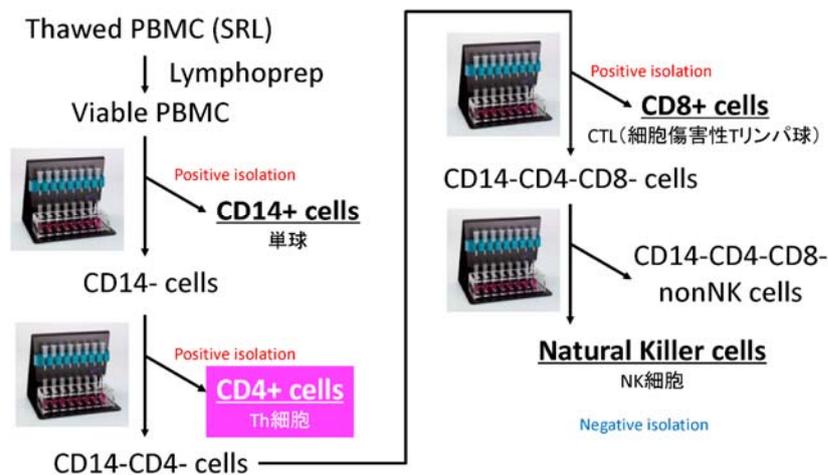


【材料と方法】

採血は中部労災病院にて行われ、79 検体の PBMC と血清の分離、および血清中 KL-6, SP-D, ACE の測定を日本 SRL に委託し実施した。測定結果を得ると共に、残余検体として凍結 PBMC および血清を受領した。血清中 EGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN α 2, IFN γ , IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1RA, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF α , TNF β , VEGF 濃度の測定を Milliplex および

Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel を用いて行った。また凍結 PBMC を融解し Lymphoprep を用いて生細胞を単離した後、MACS 磁気ビーズを用いて CD14+ (単球)、CD4+ (Th 細胞)、CD8+ (細胞傷害性 T リンパ球、CTL) の順に各細胞をポジティブアイソレーションした後、NK 細胞についてはネガティブアイソレーションキットにより単離し、それぞれ-80°Cにて凍結保存した。後日、凍結 CD4+Th 細胞より total RNA を抽出し、cDNA 合成後、リアルタイム PCR 法により各遺伝子 mRNA 相対濃度を gapdh との比較より算出した。また、Milliplex によるサイトカイン測定結果として検出限界以下と判定された検体、およびリアルタイム PCR により適切に遺伝子 cDNA が増幅されなかった検体については欠測値とし、統計解析より除外した。

細胞磁気分離フロー



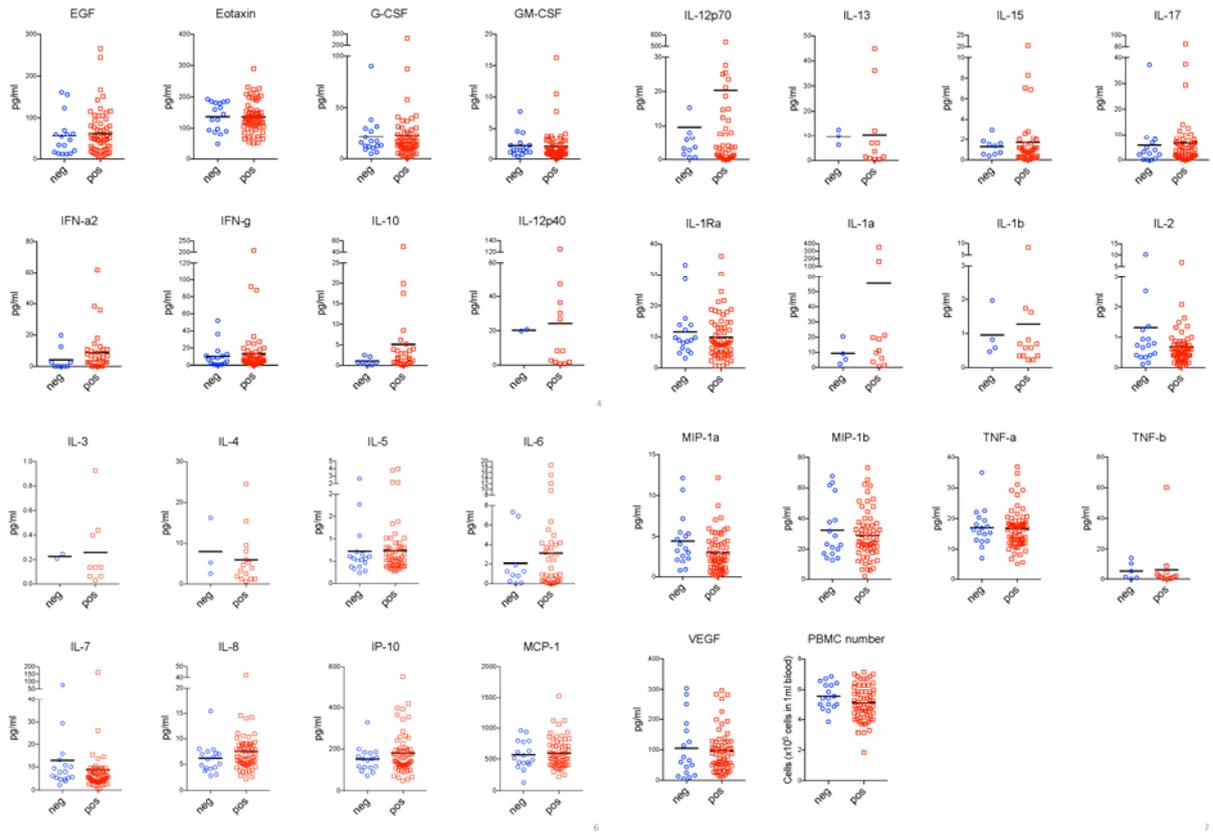
20

【結果】

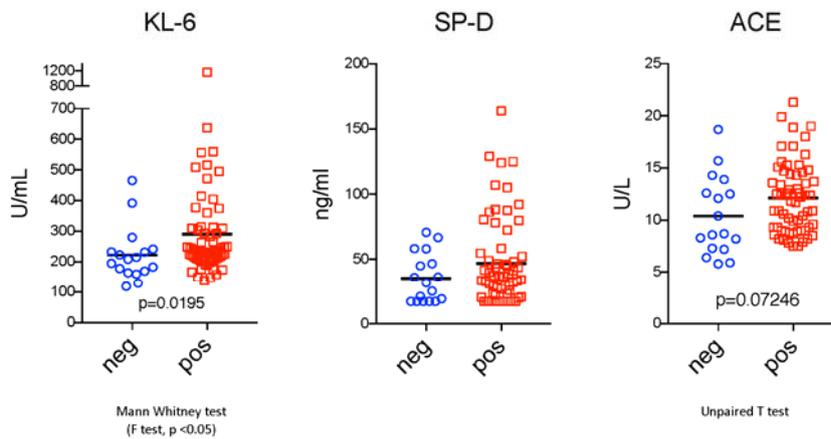
1) サイトカイン濃度およびじん肺関連指標の所見有無による比較

測定した血清中 29 種のいずれのサイトカインも有所見者にて有意な増加や減少は無かった。他方、じん肺関連指標である KL-6 は有所見者で有意に高値であった。

血中サイトカイン - 有所見者の特徴-



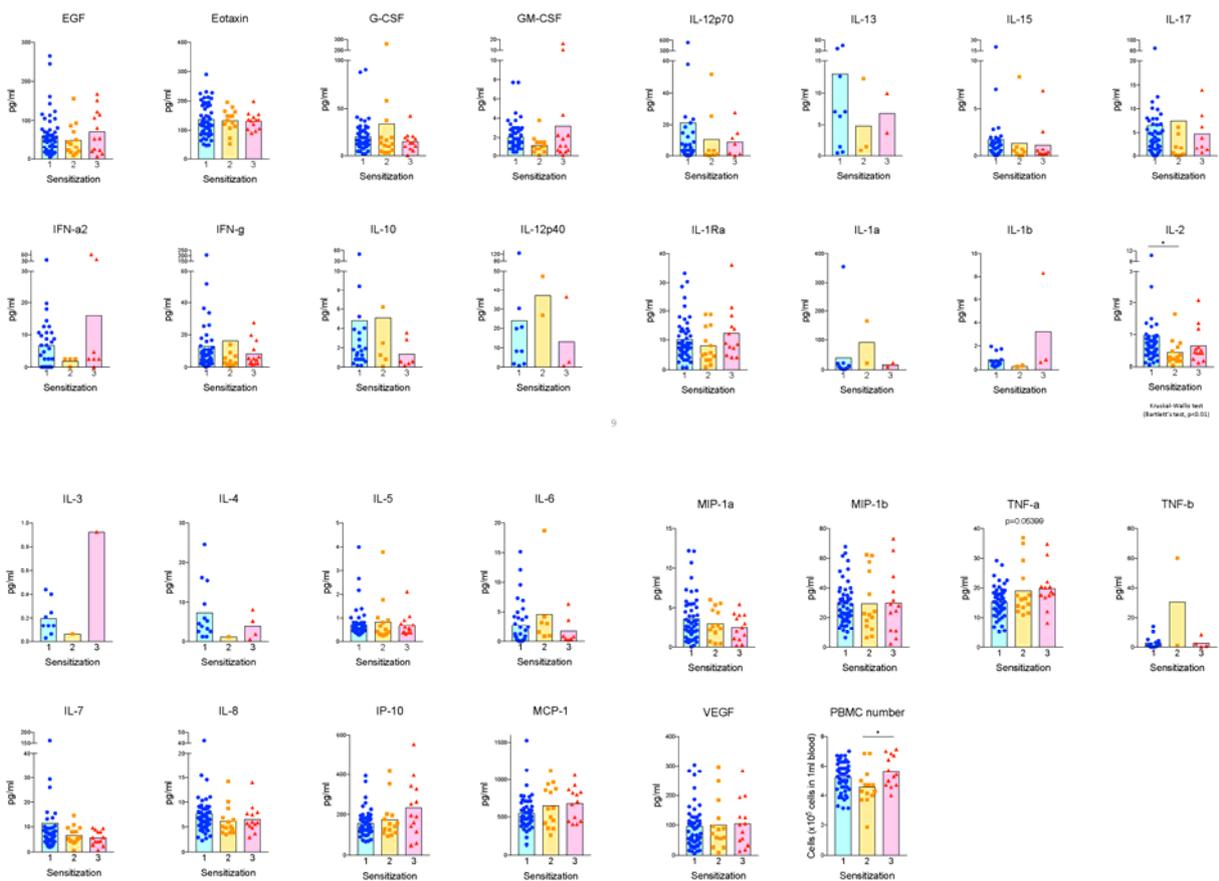
じん肺関連指標 - 有所見者の特徴-



2) サイトカイン濃度およびじん肺関連指標の感作程度による比較

アラマブルー法にて測定されたベリリウムリンパ球幼若化試験の結果（安衛研、豊岡先生）に基づく感作程度の異なる3群（3が暫定陽性, 2が暫定陽性（疑）, 1が陰性（安衛研報告とは数値の昇降を逆順に定義））間の比較では、IL-2濃度は感作第2群で第1群より有意に低値であった。TNF- α 濃度は第2群, 第3群で高い傾向を示したが統計学的有意差は無かった（ $p=0.05399$ ）。また、PBMC細胞数は第3群で2群より高値であった。じん肺関連指標については明確な群間差が見られ、KL-6値は第3群で第1群, 第2群より有意に高値であり、3群のSP-Dは1群より高値であった。さらに、各測定値のlog10変換値と感作程度（=1, 2, 3）との相関性を確認したところ、サイトカインについてはIL-15, IL-2, TNF- α が、じん肺関連指標ではKL-6, SP-Dが正または負の相関性を示した。

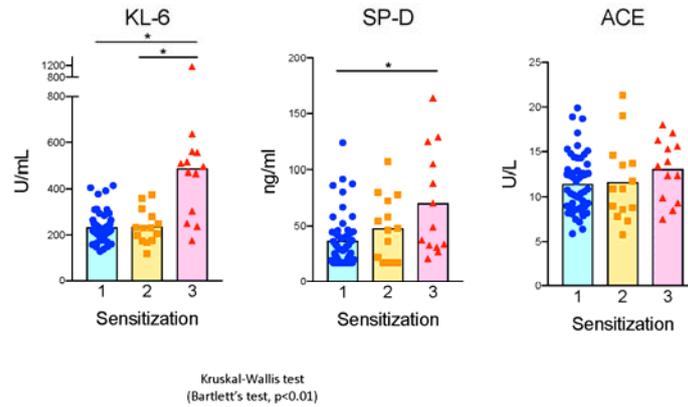
血中サイトカイン -感作との関連-



11

12

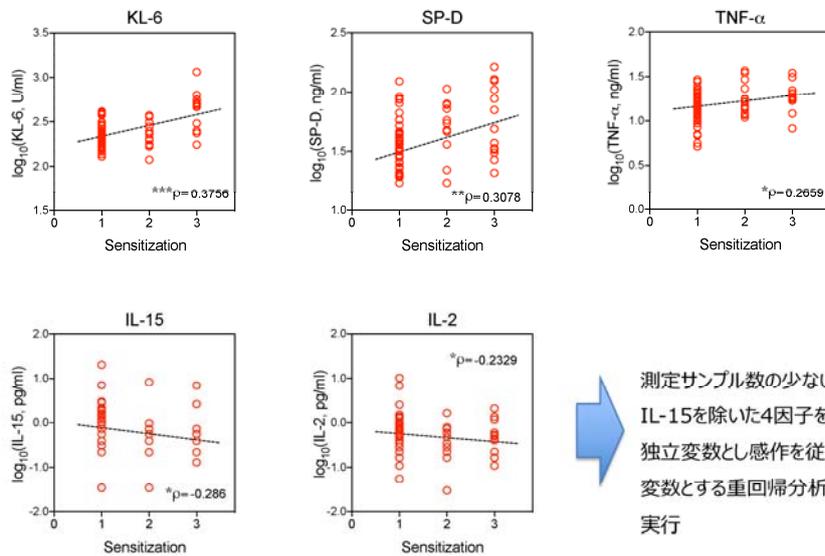
じん肺関連指標 -感作との関連-



13

感作との相関性

Spearman's correlation test



14

3) サイトカイン濃度およびじん肺関連指標の感作程度を従属変数とする重回帰分析

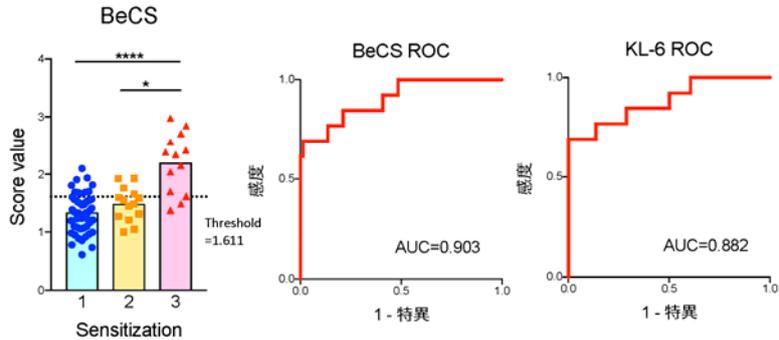
そこで測定サンプル数の少ない IL-15 を除いた 4 因子について、これを独立変数とし感作程度を従属変数とする重回帰分析を行った。その結果、KL-6, SP-D, TNF- α を変数とする予測式とこれに基づくスコア (BeCS) を導くことができた。

感作との重回帰分析

重回帰分析結果：感作との相関性

	標準化されていない係数	標準化係数	有意確率
定数	-5.596		
KL-6 (log10変換値)	2.091	0.473	<0.01
SP-D (log10変換値)	0.622	0.219	0.022
TNF-α (log10変換値)	0.931	0.203	0.030

Beryllium related
Cytokine Score (BeCS)



15

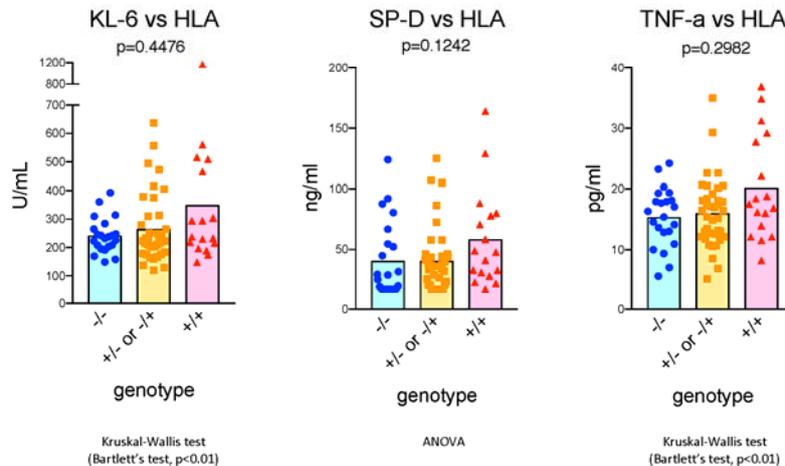
BeCS 値は感作程度 3 群において他群より有意に高値であり、感作程度第 3 群（感作有り）を判別する ROC 曲線において BeCS は KL-6 単独よりも高い AUC 値を示した（AUC=0.903）。また、KL-6 は単独としても感作有りを明瞭に判別した（AUC=0.882）。

4) KL-6, SP-D, TNF-α 濃度と HLA-DPB1 遺伝子型との関連

上記のように、血清中 KL-6, SP-D, TNF-α 濃度は Be 感作と関連することが分かった。そこで、これらについて HLA-DPB1 遺伝子型との関連を調べた。しかし、何れの濃度も -/-, +/- or -/+, +/+ の 3 群間において有意な差は見られなかった。

HLA-DPB1遺伝子型との関連

+ or - for HLA-DPB1 E69-glu allele

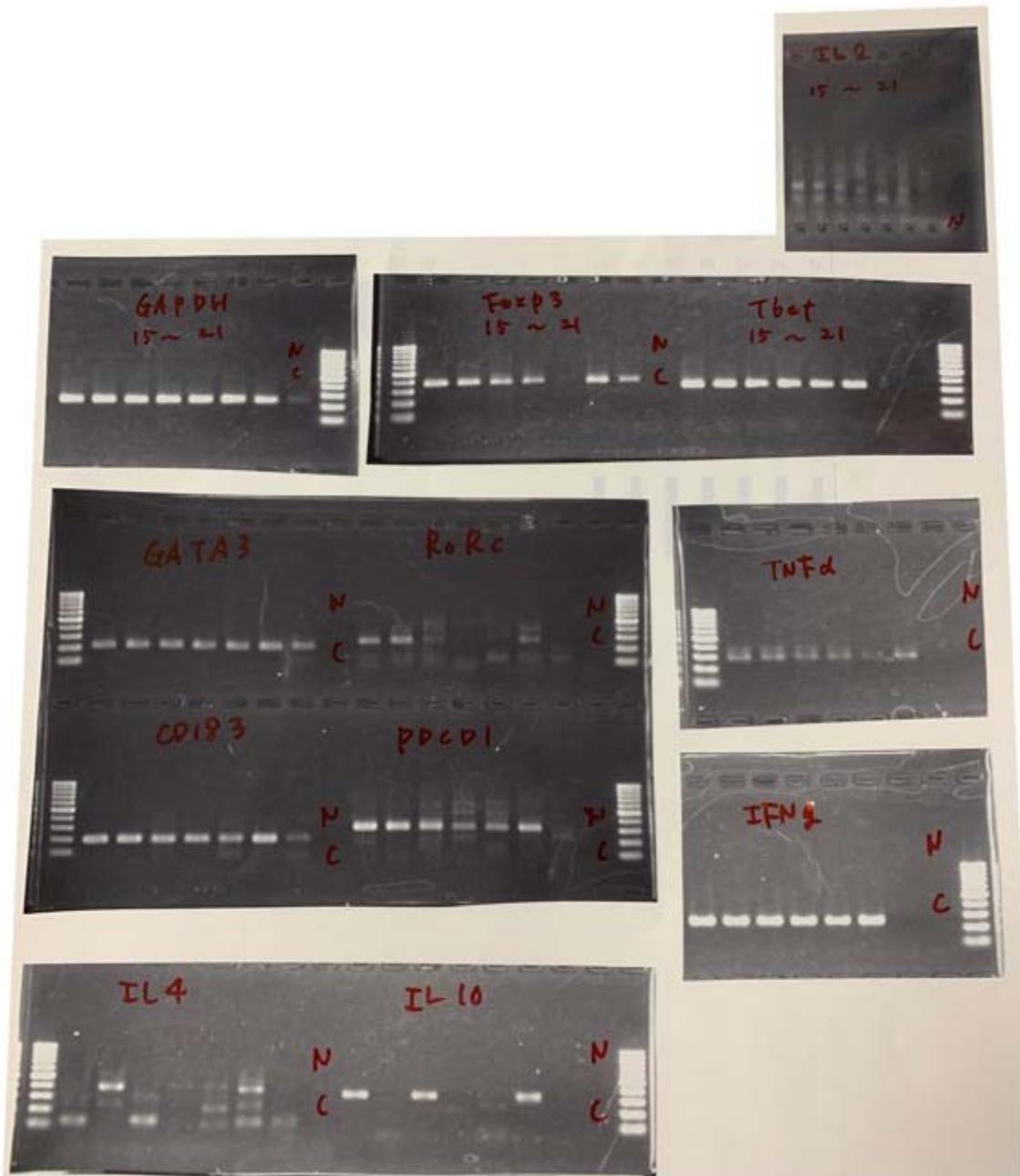


16

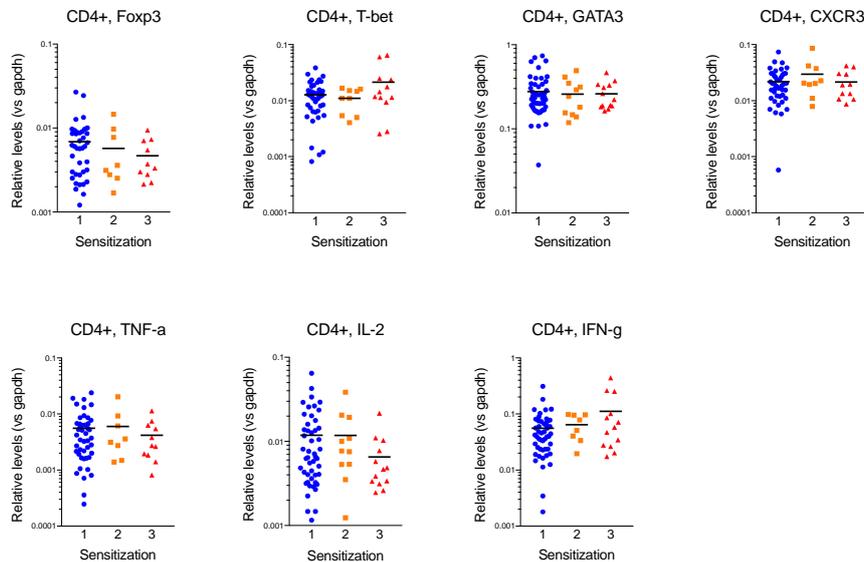
5) CD4⁺ Th 細胞中の遺伝子 mRNA レベルと感作程度との関連

感作程度と免疫機能動態の関わりを調べるため、CD4⁺ Th 細胞中の Foxp3, Tbet, GATA3, RoRc, CD183 (CXCR3), PDCD1, TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 mRNA レベルを相対定量した。しかし、幾つかのサンプルのリアルタイム PCR 反応曲線に異常がみられたことから反応産物を泳動しバンドを確認したところ、多くのサンプルの RoRc, PDCD-1, IL-4 に、またその他の遺伝子についても幾つかの反応産物で、複数のバンドが確認された。そこで、RoRc, PDCD-1, IL-4 については解析不能と判断し、Foxp3, Tbet, GATA3, CD183 (CXCR3), TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-10 について正常な反応曲線を示すサンプルのみを測定結果とし、結果の分析を行った。測定した Foxp3, Tbet, GATA3, CD183 (CXCR3), TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-10 のいずれの遺伝子 mRNA レベルについても感作群間で有意差はみられず、また Be 感作程度との相関性も見られなかった。

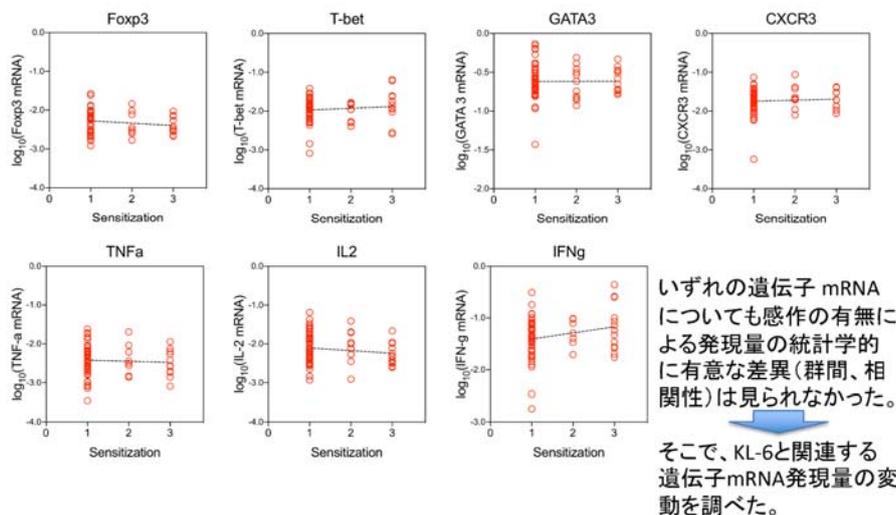
CD4⁺ Th細胞のリアルタイムRT-PCRの結果



CD4⁺ Th細胞の遺伝子mRNAレベル解析



遺伝子mRNAレベルと感作との相関



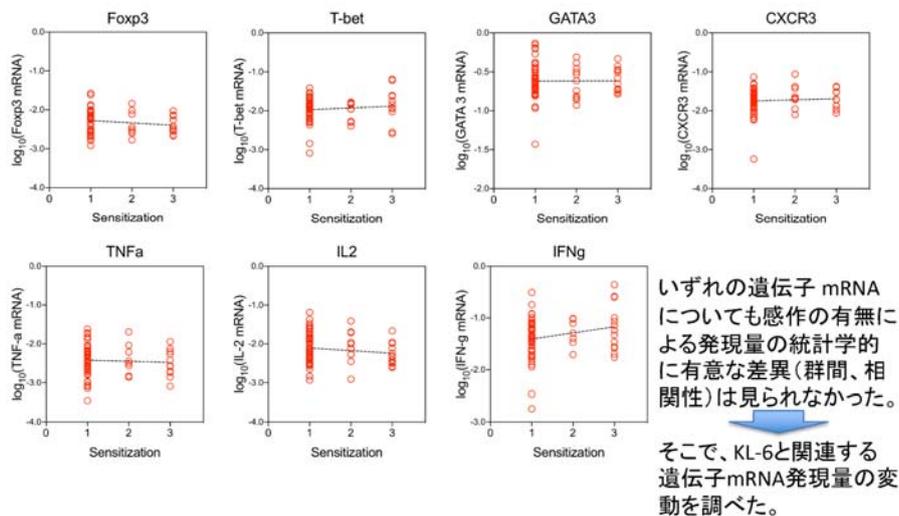
23

6) 血清中 KL-6 濃度と CD4⁺細胞中 mRNA レベルとの相関性、幾つかの遺伝子 mRNA レベルと KL-6, SP-D, TNF- α 濃度による主成分分析

そこで、Be 感作と強く関連する血清中 KL-6 濃度と相関する CD4⁺細胞中 mRNA レベルを調べた。測定した mRNA レベルの中で、IFN- γ mRNA は KL-6 と有意な相関性を示し、IFN- γ mRNA はいくつかの遺伝子の中でも TNF- α mRNA と強く相関した。そこで、血清

中 KL-6, SP-D, TNF- α 濃度および CD4+細胞中 IFN- γ , TNF- α mRNA 相対値 (log10 変換値) の 5 変数の主成分分析 PCA を実行した。PCA の結果、2つの主成分 PC1, PC2 が抽出された。KL-6 濃度は PC1, PC2 両主成分に正の負荷量を示すが、TNF- α mRNA は前者 PC1 には正の、後者 PC2 には負の負荷量を示した。また PC1 には IFN- γ mRNA および血清中 TNF- α が正の負荷量を示した。これら PC1, PC2 は共に感作あり群で有意に高値であり、両主成分の 2D プロットは感作有り群を他と明確に区別することが分かった。

遺伝子mRNAレベルと感作との相関



23

血清中KL-6濃度との相関解析

血清中KL-6とBe感作との明確な関連

血清中KL-6とCD4+細胞中mRNAレベルとの相関解析

各log10変換値との相関解析 (Pearson correlation) *p<0.05

	CD4 ⁺ 細胞中 mRNA						
	Foxp3	T-bet	GATA3	CXCR3	TNF- α	IL-2	IFN- γ
血清中KL-6	-0.185	0.165	0.046	0.025	0.017	-0.107	0.269*
CD4 ⁺ 細胞中 IFN- γ mRNA	-0.085	0.177	0.281*	0.018	0.493**	0.312**	-

KL-6と有意な相関を示すCD4+細胞中mRNAはIFN- γ のみ

IFN- γ mRNAはGATA-3, IL-2, TNF- α mRNAと有意に相関を示し、中でもTNF- α と強く相関

血清中KL-6, SP-D, TNF- α 濃度およびCD4+細胞中 IFN- γ , TNF- α mRNA相対値 (log10変換値) の5変数の主成分分析 PCA を実行

24

主成分分析 (PCA)

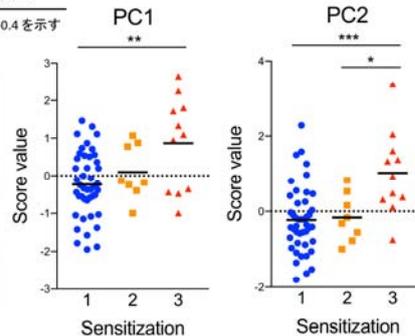
	因子負荷量 (寄与率%)	
	PC1 (35.342)	PC2 (23.504)
CD4+細胞中 IFN- γ mRNA (log10)	0.806	-0.184
CD4+細胞中 TNF- α mRNA (log10)	0.682	-0.545
血清中 TNF α	0.505	-0.096
血清中 SP-D	0.391	0.68
血清中 KL-6	0.496	0.611

血清中KL-6, SP-D, TNF- α 濃度およびCD4+細胞中 IFN- γ , TNF- α mRNA 相対値 (log10変換値)の5変数の主成分分析 PCA を実行

太字は、|因子負荷量|>0.4を示す

血清中KL-6濃度の負荷量は類似するが、特にCD4+細胞中TNF- α mRNA量の負荷量が逆転するPC1 (KL6+, TNF α +)とPC2 (KL6+, TNF α -)が抽出された。

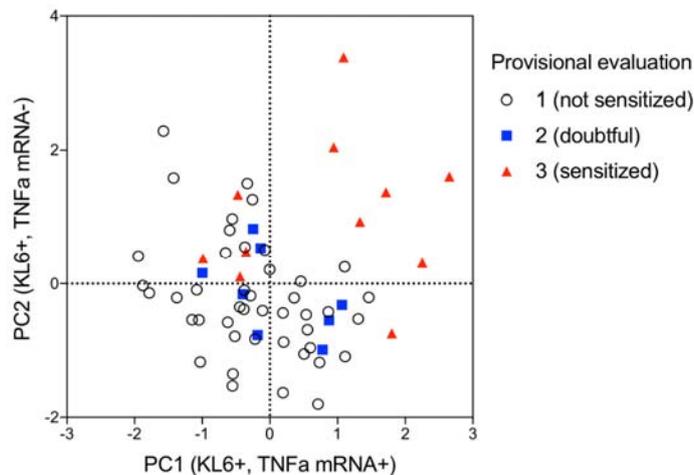
抽出された主成分PC1, PC2ともに感作有り群で有意に高値を示す。



ANOVA with Tukey, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

25

主成分PC2とPC3による散布図



PC2 (KL6+, TNF α mRNA+)とPC3 (KL6+, TNF α mRNA-)の2次元プロットは感作有り群が明確に他と異なる集団であることを示す

23

【結語と考察】

じん肺関連指標である KL-6 は有所見者で有意に高値であり、また感作とも有意に相関することから、血清中 KL-6 濃度がベリリウム曝露者における慢性ベリリウム症 (CBD) の予見指標候補と成り得ることが分かった。また、KL-6 に SP-D, TNF- α 濃度を加えてこ

れら 3 変数からなる数式よりなるスコア式で算出される BeCS 値についても感作有無の判別指標として有効であることを示した。また、CD4+Th 細胞の遺伝子 mRNA の測定結果における PCR 反応の不良については、凍結 PBMC の融解と続く細胞の磁気分離および凍結・再融解の作業により mRNA の劣化が進んだことに起因すると推察される。この結果、解析可能となった Foxp3, Tbet, GATA3, CD183 (CXCR3), TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-10 についても mRNA レベルの感作群間での有意差はみられず、また Be 感作程度との相関性も見られなかった。そこで Be 感作と強く関連する KL-6 濃度と有意な相関性を示す IFN- γ mRNA および、この IFN- γ mRNA と強く相関する TNF- α mRNA を加えた血清中 KL-6, SP-D, TNF- α 濃度および CD4+細胞中 IFN- γ , TNF- α mRNA 相対値 (log10 変換値) の 5 変数の主成分分析 PCA を実行した結果、2 つの主成分 PC1, PC2 が抽出され、それらは共に感作あり群で有意に高値であり、両主成分の 2D プロットは感作有り群を他と明確に区別した。以上の結果は、Be 感作および CBD の予防的スクリーニングにおいて KL-6 測定の重要性を指摘するとともに免疫動態の詳細な把握が Be 感作予見指標の構築に寄与する可能性を示唆し、BeCS 値の結果はその証左といえる。井上らは米国人 CBD 患者の気管支肺胞洗浄液および血液中の KL-6 を測定し、対照者および Be 感作者と比べ有意に KL-6 が高値であることを報告している[1]。本班会議での松尾による胸部 CT 読影結果では、暫定陽性の 11 名は CBD と診断できるほどの所見を持たず、従って本結果は Be 感作と血中 KL-6 濃度上昇との関連を示したという意義がある。既報の結果と本結果との差異は、本研究の対象者が日本人であることに起因しているかもしれない。HLA-DBP1 遺伝子型と KL-6 との関連は見られなかったことから、血清中 KL-6 濃度上昇に関わる未知の遺伝学的背景の存在が示唆される。また一方で、既報の結果との差異には Be 曝露条件の違いに起因する可能性もあり、詳細な分析が必要である。Be 感作測定結果と血清中 TNF- α 濃度の正相関は CD4+Th 細胞中の遺伝子発現の差異を期待させたが、TNF- α を含む測定したいずれの遺伝子 mRNA レベルも感作程度による差を示さなかった。しかし、PCA により抽出された 2 つの主成分は明瞭に感作との関わりを示したことから、リンパ球の遺伝子発現動態解析が Be 感作の予見指標となることを示唆する。更なる分析により免疫学的機能解析に基づく血液を被検体とした Be 感作および CBD の予防診断指標の確立が期待される。

【文献】

- 1) Inoue Y, Barker E, Daniloff E, Kohno N, Hiwada K, Newman LS. Pulmonary epithelial cell injury and alveolar-capillary permeability in berylliosis. *Am J Respir Crit Care Med.*1997;156:109-115.