

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

総括報告書

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
岸本 卓巳		
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 の応用 - 総括報告書 -	．．．．．	2
豊岡 達士、柏木裕呂樹、佐々木 毅、 王 瑞生、甲田 茂樹		
2. ベリリウム作業者での3年間にわたる胸部CT読影所見の 総括	．．．．．	17
松尾 正樹、芦澤 和人、横山多佳子、 原 眞咲、加藤 勝也、岸本 卓巳		
3. 低線量CT撮影および再構成条件の最適化 - 各年度の改善点 -	．．．．．	26
原 眞咲、芦澤 和人、加藤 勝也、 横山多佳子、松尾 正樹、岸本 卓巳		
4. リンパ球の機能検査における3年間の総括	．．．．．	39
大槻 剛巳、西村 泰光		
5. 3年間の研究を通じた総括所見	．．．．．	55
岸本 卓巳、上島 通浩		

はじめに

ベリリウムは、ごく微量のばく露によっても細胞性免疫障害を来し、肺に類上皮細胞肉芽腫病変を主体とした慢性ベリリウム症を発生する。しかし、ベリリウムによる感作性や肺における早期病変の評価については一定の見解は得られていない。また、その機序についてもいまだに明らかとなっていない点も多いため細胞性免疫異常による肺病変のみならず、胸膜及びリンパ節病変の有無についても検討する必要がある。

我々の研究班では、まずベリリウムによる健康障害を研究するため、現在及び過去のベリリウムばく露者を対象として、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するため、初年度に通常線量及び低線量 CT を同時に撮影し、低線量 CT 画像が通常線量 CT と比較して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。その後、2 年間は年に一度、低線量胸部 CT を撮影し、低線量 CT における診断の問題点を提起しつつ、低線量 CT 撮影を意識した読影を心がけた。低線量 CT の撮影条件については過去 3 年間原眞咲研究分担者が担当し、よりよい条件設定に尽力していただいた。また、胸部 CT 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 6 人が同時に読影し、合議制で最終所見を決定した。画像所見の 3 年間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 (Be-LPT) 方法として昨年度の基礎研究で開発したアラマブルー法を用いて末梢血リンパ球幼若化試験を施行し、ベリリウム感作性診断のための評価方法について検討した。その他、慢性ベリリウム症発症に特異性があると報告されている HAL-DPB1 遺伝子多型についての検討も行った。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。

一方、ベリリウム作業者に対する現在及び過去のベリリウム取扱い等の業務内容及びその期間についての調査は佐々木毅研究協力者が担当した。

さらに対象者の末梢血の免疫担当細胞と血清サイトカイン、その他肺の線維化マーカーとして KL-6、SPD、ACE 等の測定を行い、ベリリウムに対する免疫能あるいは血清マーカーの特異性について検討した。そしてベリリウムばく露者の健康診断のバイオマーカーとなるような検査項目があるかどうかについても検討した。細胞性免疫に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、西村泰光研究協力者が担当した。

ベリリウムによる末梢血リンパ球幼若化試験、HLA-DPB1 の結果、胸部画像所見及び末梢血の免疫能とともにベリリウムばく露状況との関連について総合的に検討した。過去 3 年間に集積した研究成果及び本研究結果の意義については上島通浩研究分担者が総合的なまとめを担当した。

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

- 総括報告書 -

豊岡達士、柏木裕呂樹、佐々木毅、王瑞生、甲田茂樹

【はじめに】

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、ベリリウム感作 (BeS: Beryllium Sensitization) に端を発する、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。BeS は、病理学的な異常を生じなく臨床的にも無症状であるが、CBD は、病理学的に肺の肉芽種性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¹⁻⁴。

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) による第一類特定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)。平成 29 年の特化則に基づく特殊健康診断の受診状況から、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 人と報告されている⁵。既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、万が一、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ともに、適切な医療を行うことが重要である。

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⁶⁻¹⁰。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)。なお、リンパ球増殖の測定には、トリチウム(³H)チミジン法を利用することが一般的であり、当該方法は、³H で放射性標識された DNA 前駆体であるチミジンを、細胞分裂中のリンパ球 DNA に取り込ませ、その取り込まれた³Hチミジンから発せられるβ線を液体シンチレーションカウンター等で測定する手法である。³Hチミジン法による Be-LPT は、2001 年に米エネルギー省 (DOE) が標準 Be-LPT 法として頒布し、その手法が現在も汎用されている¹¹。一方で、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ことが認識されている¹¹⁻¹⁴。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の実施制限や、検査実施者の被ばく等が問題となる場合がある。

我が国では、ベリリウム特殊健康診断において、Be-LPT の実施項目が存在しないため、実際には、ベリリウムを取り扱う事業者では、その事業者努力によって Be-LPT を実施する等、従業員の衛生管理を実施しているのが実情である。これらの背景により、ベリリウムを扱う労働者の適切な健康管理、ひいてはベリリウム産業の健全な持続的成長のために、³Hチミジン法による Be-LPT の検査成績の

向上及び放射性同位元素を使用しない代替法の考案とその実用化は、喫緊の課題であるといえる。

本研究は平成 28 年度に開始し、平成 30 年度までの 3 年間に、主に次の 2 項目について検討を進め、特に②について注力してきた。

① $[^3\text{H}]$ チミジン法による Be-LPT のバラツキ原因の究明と改良案の考案

② 放射性同位元素を使用しない代替法の考案とその実用化

以下、各年度における研究実施概要を記述した後、その詳細について示す。

【各年度における研究実施概要】

● 平成 28 年度

培養リンパ球細胞を用い、現行 $[^3\text{H}]$ チミジン法のバラツキ原因を追求するとともに、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法（以下、「ALMB 法」という。）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常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

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、過去又は現在ベリリウム取扱い経験がある 85 名を対象に ALMB 法を用いた Be-LPT を実施した。さらに、上記ベリリウム取扱い経験者の中から現ベリリウム取扱い者 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、現取扱い者 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した。

● 平成 30 年度

平成 29 年度検討において、ALMB 法がベリリウム感作の検出に実用化できる可能性が示されたため、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ともに、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解析した。

【各年度における検討】

平成 28 年度検討事項、及び方法

● $[^3\text{H}]$ チミジン法の見直しに関する検討

ヒトリンパ球モデルとして汎用されている培養細胞である HL-60 (前骨髄球性白血病由来リンパ芽球細胞)をあらかじめ規定した細胞数 ($10^4 \sim 10^6$ cells/well) で 96-well plate に播種し、一定時間後に $[^3\text{H}]$ チミジン法により、細胞数と測定値の対応関係について検証し、 $[^3\text{H}]$ チミジン法の改良点について検討した。

● 放射性同位元素を使用しない代替法の提案

細胞数（細胞増殖）を評価する方法として、観察指標が異なる方法がいくつか存在するが、本

研究では、その研究目的から、できる限り簡便でかつ精度よく細胞数を評価できる方法を選択する必要があった。そこで、細胞の代謝を指標に細胞数を評価する ALMB 法、に着目し、上記、 ^3H チミジン法の見直しに関する検討と同様に、細胞数と測定値の対応関係について検証した。

● 人血液サンプルへの応用

上記、代替法の開発において、我々が提案する方法 (ALMB 法) が人血液サンプルへ応用可能か否かの第一段階目検証を実施した。健康人 5 名の末梢血リンパ球に、コンカナバリン A (ConA) を作用させ幼若化 (細胞分裂) を惹起し、一定時間後に、ALMB 法で ConA による幼若化反応を検出できるか否か検証した。ConA はリンパ球幼若化促進剤としてよく知られている物質であり、Be-LPT の陽性コントロールとして使用されている。

平成 28 年度結果の要点等

● ^3H チミジン法の見直しに関する検討

^3H チミジン法の一般的なプロトコール (表 1) を使用し、細胞数に対応した測定値が得られるか否かを検証した。細胞を多く播種した well ほど、 β 線カウント (CPM) が高く、細胞数に対応した測定値が得られているが、測定値のバラツキが大きいことも否定できない結果であった (図 1)。このバラツキの原因は、人の操作が最も入る DNA 抽出過程であると考え、その過程をカットしたところ、 β 線カウント数のバラツキを顕著に抑制することができた。

ここで、DNA 抽出過程を削除することにより変わってくる検出値の意味合いを検出原理図 (図 2) から考察する。従来からの ^3H チミジン法においては、DNA 抽出をするため、細胞分裂時に DNA に取り込まれた ^3H チミジンからの β 線を測定しているため、細胞分裂をした細胞のみを検出している。一方で、本方法では DNA 抽出過程を削除したことにより、細胞分裂をした細胞と細胞分裂をしていない細胞 (ただし、 ^3H チミジンは細胞内に取り込まれている) の両方を検出していることになる。この違いによって、従来法ではコントラストは高いがバラツキが大きい測定結果になると考えられる。本方法では細胞分裂をした細胞と細胞分裂していない細胞

表 1 : ^3H チミジン法一般的なプロトコール

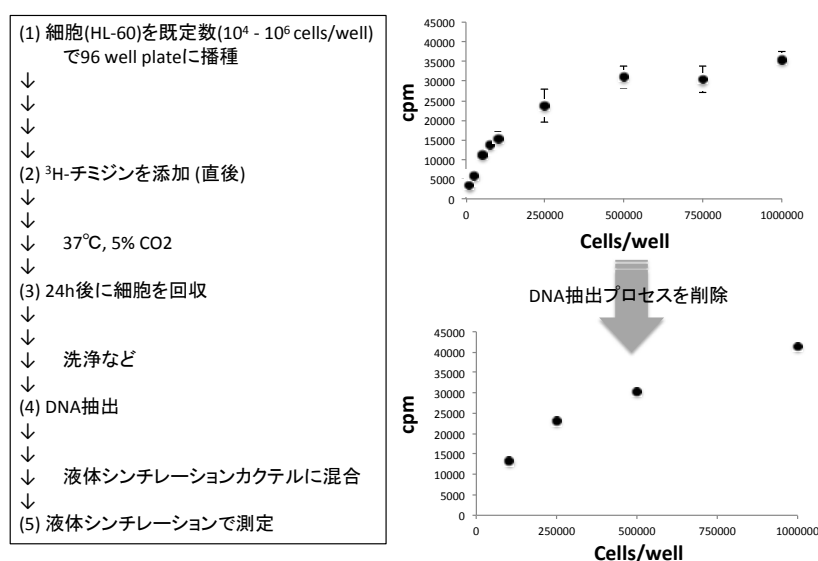


図 1 : ^3H チミジン法の見直し

の両方を検出しているため、コントラストについては従来法と比すると劣るが、実細胞数と相関性が高く、バラツキが少ない値が得られる。また、DNA への取り込み時間が必要ないため、大

幅な時間短縮が可能であり、実際に $[^3\text{H}]$ チミジン作用時間は4時間で十分であった。

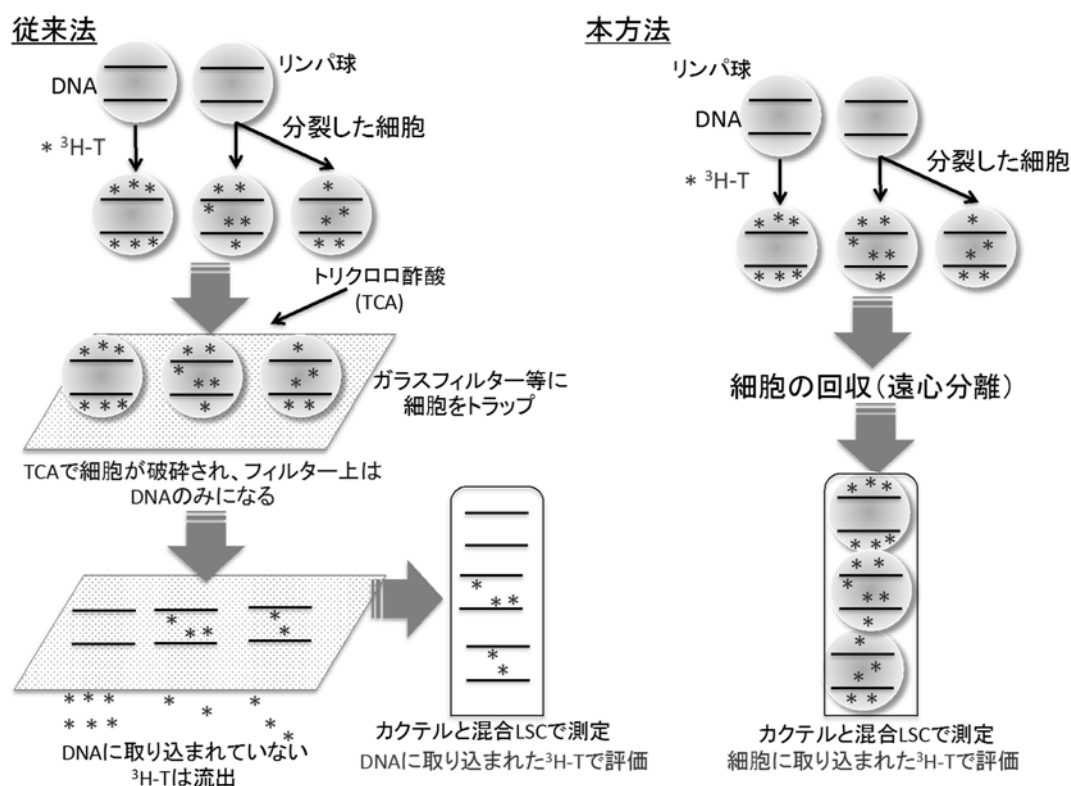


図2： $[^3\text{H}]$ チミジン法の試験系原理

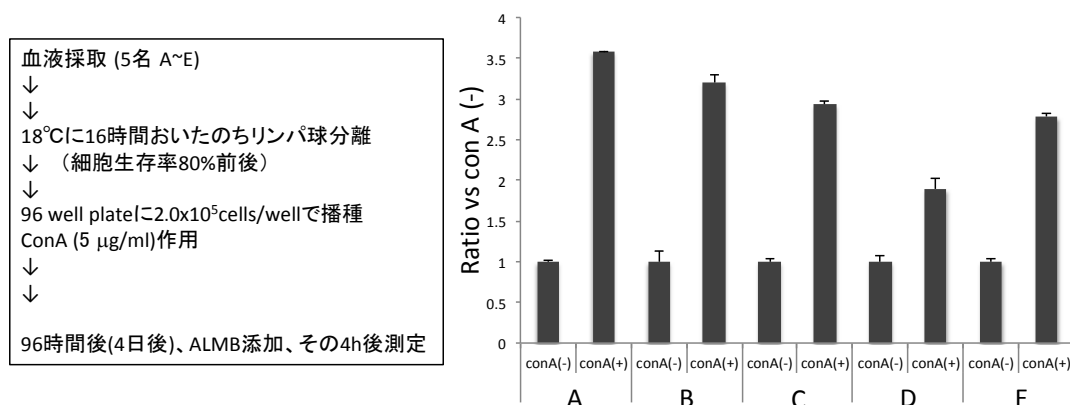
- 放射性同位元素を使用しない代替法の提案

アラマブルー(ALMB)法は、細胞の代謝による色素変化又は蛍光性物質の生成を指標に、吸光度又は蛍光値で測定値を得る方法である。前項と同様に、あらかじめ規定した細胞数を 96-well plate に播種し、4時間後に、細胞数と測定値の対応を検証した。ALMB 法においても、細胞数が多くなるにつれて測定値が高くなっており、細胞数に対応した測定値が得られている（詳細は平成 28 年度報告書を参照）。また、ALMB 法では1つの細胞数条件につき、 $n=6$ (well)で行っているが、その測定値のバラツキが小さく、細胞数に対する測定値の直線性が高いことがわかる。なお、ALMB 添加1時間後の測定においても同様の結果が得られているが、測定値のバラツキは4時間後の方が小さかった。一方、24時間後測定においては、細胞数が多い条件で、細胞数に対する測定値の直線性が悪くなった（データ示さず）。これは、ALMB 法では、細胞の代謝による蛍光物質生成を指標にしているため、未代謝 ALMB が枯渇したためであると考えられる。また、ALMB 法を実施した後に、同一サンプルで $[^3\text{H}]$ チミジン法を実施できることを確認している。このことは、量が限られている人血液サンプルを扱う上で有利である。

- 健康人末梢血リンパ球への ALMB 法の応用

図3にはConA作用4日後におけるALBM法の測定結果を示す。健康者ボランティアから採取したリンパ球はConAにより、全員幼若化が惹起されており、その反応をALBM法で捉えることができた。本検討をもって、ALMB法は、実際のBe-LPTに応用できる可能性を示した。

図3：ALMB法による健康者末梢血リンパ球に対するConA刺激幼若化反応の検出



平成29年度検討事項、及び方法

● CBD患者に対するALMB法によるBe-LPTの応用及び試験条件の最適化

健康者ボランティア3名及びCBD症患者4名の末梢血リンパ球を用いALMB法によるBe-LPTを応用するとともに、本検討を通じて、ALMB法によるBe-LPTの試験条件の最適化を実施した。ここで、試験条件として、培地2種類、血清3種類、血清濃度6段階、硫酸ベリリウム(BeSO_4)調整溶液2種類を検討した。なお、血清の種類における自己血清とはリンパ球を密度勾配遠心法で分離した際に一番上層に分離されてくるものである。牛胎児血清(FBS)およびヒト血清ABは市販品であり、熱処理(54℃、30分)によって、血清に含まれる補体、増殖因子等を不活化している。試験は96-well plate上で実施し、 BeSO_4 の各作用濃度(0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μ M)について、5 well (n=5)を使用した。 BeSO_4 添加後、インキュベーター(37℃、5% CO_2)で5-10日間培養した。幼若化反応の検出には、まずALMB法による蛍光値測定を行った後、同一サンプルに ^3H チミジンを加え、その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 β 線測定を実施した。

● ベリリウム取り扱い経験者85名に対するBe-LPT(第1回目試験)

本研究の実施に同意した、現在又は過去にベリリウム取り扱い経験を有する85名を対象とした。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(詳細は平成29年度報告書参照)。また、対象者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。

● 現ベリリウム取り扱い者14名を対象としたBe-LPT追跡試験(第2回目試験)

第1回目試験参加者85名の内、現在ベリリウムを取り扱っている者14名を対象に、第1回目試験実施の約5か月後に、Be-LPT追跡試験を実施した。

平成29年度結果の要点等

● CBD患者に対するALMB法によるBe-LPTの応用及び試験条件の最適化

ベリリウムによるリンパ球幼若化反応を ALMB 法で検出するということをアウトプットに置いた場合、種々の条件を検討した結果、最終的に、1%ヒト血清 AB を含む培地 GT-T551 で末梢血リンパ球を培養し、幼若化を惹起するために使用する BeSO_4 溶液は水で調整することが最適であると結論した。当該条件において、4名の CBD 患者のリンパ球に対して、ALMB 法による Be-LPT を実施したところ、5日目において、全症例で特定濃度範囲の BeSO_4 溶作用時に、ALMB 蛍光値の上昇がみられた（健常者リンパ球では蛍光値上昇はみられない）（図4：ただし1症例のみ示す）。これをもって、ベリリウムによるリンパ球幼若化反応を ALMB 法で検出可能であると判断できた。なお、ALMB 法と同時に実施した $[\text{H}]$ チミジン法においても ALMB 法と一致する結果が得られており、幼若化反応時にリンパ球が呈する特徴的な細胞形態変化及びコロニー形成も顕微鏡下で確認された。

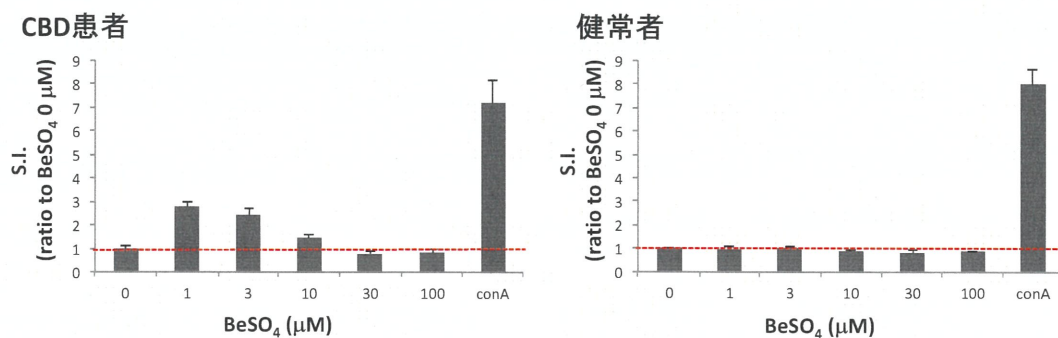


図4： CBD 患者に対する ALMB 法による Be-LPT の応用

● ベリリウム取扱い経験者 85 名に対する ALMB 法による Be-LPT

現在又は過去にベリリウム取扱い経験を有する 85 名（全員男性、平均年齢 39.8 歳（中央値 41 歳））を対象に、ALMB 法及び $[\text{H}]$ チミジン法を同一サンプルに適用した Be-LPT を実施した。 $[\text{H}]$ 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。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 を超えた場合、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。

ALMB 法における陽性判定を S.I. >1.1 とした場合、検査した 85 名中 16 名が暫定陽性と判定された。なお、ALMB 法による暫定陽性判定は、顕微鏡観察による細胞形体変化結果と完全に一致しており、また同一サンプルで実施した $[\text{H}]$ チミジン法における陽性判定ともほぼ一致している。

- **現ベリリウム取扱い者 14 名を対象とした Be-LPT 追跡試験**

ベリリウム取扱い経験者 85 名の内、ベリリウム作業内容等に関するアンケート調査の回答より、現ベリリウム取扱い者 14 名（全員男性、平均年齢 32.2 歳（中央値 31 歳））を対象に、ALMB 法による第 1 回目 Be-LPT 試験（2017 年 11 月）実施の約 5 か月後（2018 年 3 月）に、追跡試験（第 2 回目）を実施した。第 1 回目試験において、暫定陽性判定をした取扱い者は、第 2 回目試験においても暫定陽性判定であった。

平成 30 年度検討事項及び方法

- **ベリリウム取扱い経験者 79 名に対する Be-LPT (第 3 回目試験)**

本研究の実施に同意した、現在又は過去にベリリウム取扱い経験を有する 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。なお、これら試験参加者は平成 29 年度実施の第 1 回目試験と同一集団である。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し、ALMB 法による Be-LPT を実施した。

- **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¹⁹⁻²⁴。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。そこで、第 3 回目 Be-LPT 試験参加者の中で、遺伝子解析にも同意した 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。

平成 30 年度結果等の要点

- **ベリリウム取扱い経験者 79 名に対する Be-LPT (第 3 回目試験)**

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 BeSO₄ 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、BeSO₄ 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、その有効性を確認している。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。本判定法によって試験参加者 79 名を判定し、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 5 は、これら暫定陽性、暫定陽性（疑）、陰性の S.I. の分布を示すものである。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。

- 暫定陽性 (疑) グループの数例は、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。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 を超えていた。
- 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。
- 顕微鏡観察によって、分裂に伴う細胞形態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。

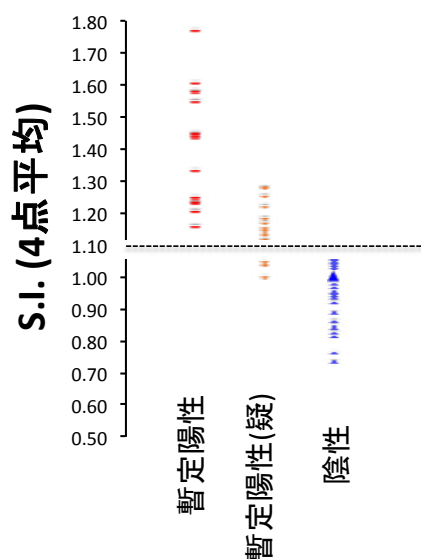


図5 : S.I.の分布 (n=79)

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、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困難である。

● ALMB 法による Be-LPT の判定結果とベリリウム作業内容について

表2には、アンケート調査に記載されていた過去又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出せていない。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 工程加工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2 : 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	
	52 [65.8%] N (%)	14 [17.7%] N (%)	13 [16.5%] N (%)	79 [100%] N (%)	p値
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

表3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のアリル頻度順位と一致していた(表3右)。

表3：対象者77名におけるHLA-DPB1のアリル頻度

77名のHLA-DPB1のアリルとアリル頻度(2N)		HLA研究所公開データ 710 families n=2966		
		DPB1	Allele frequency	rank
* 05:01	29.2%	*05:01	38.402%	1
* 02:01	21.4%	*02:01	24.107%	2
* 09:01	16.2%	*09:01	9.946%	3
* 04:01	9.7%	*04:02	9.778%	4
* 04:02	7.8%	*04:01	5.057%	5
* 03:01	6.5%	*03:01	3.978%	6
* 02:02	5.8%	*02:02	3.405%	7
* 13:01	1.9%	*13:01	1.956%	8
* 06:01	1.3%	*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/)

表4は対象者77名のHLA-DPB1 E69アリルの保有状況に、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アリルを有しており、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(アリルなし、1アリル、2アリル)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、両者に関連性が認められた。

表4：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5には、HLA-DPB1の各アリルとその頻度を、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アリルである*02:01、*09:01等のアリル頻度はALMB暫定陽性グループで、陰性グループより高く、逆に、non-E69アリルである、*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 アリ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5：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】

● Be-LPT の試験系について

Be-LPT の試験系は、大きく①リンパ球培養系、②BeSO₄作用条件、③幼若化反応検出系に分けることができる。従来から実施されている Be-LPT と本研究における Be-LPT の試験系の最大の違いは、③幼若化反応検出系であることはいままでの間もないが、①、②の違いも Be-LPT の試験系の精度等に関与しているものと考えられる。リンパ球培養条件として、従来法との主たる違いは血清濃度である。従来法では血清濃度を 10%とする場合が多いが、本研究では 1%である。細胞培養において、血清は細胞の恒常性の維持や、細胞分裂時のエネルギー源として添加するものであるが、過剰量の血清は逆に細胞毒性を示すことが知られている。これは、血清中に含まれる細胞傷害性のペプチド・タンパク質に起因するものと考えられる。実際に、平成 28 年度検討において、ConA 刺激によるリンパ球幼若化反応を指標に血清種・濃度を検討したところ、血清の種類にかかわらず、濃度 3%, 10%では、濃度 1%以下の場合と比して、ALMB 蛍光値が低く、幼若化反応が抑制されるという結果になった。血清濃度 1%以下における ConA 刺激によるリンパ球幼若化反応では、いずれの血清種においても良好な結果が得られたが、中でも、ヒト血清 AB、濃度 1%を適用したときに、S.I.の値が最も高く良好な S/N 比を示していた。トリチウムチミジン法による Be-LPT の結果の不安定性に関して、血清のロットの違いが原因であることを示唆する報告¹⁴がごく最近なされていることも鑑みると、血清濃度はできる限り低くすべきである。これらのことより、本研究で見出した血清濃度 1%は Be-LPT の試験系の基幹となる条件であると考えられる。次に、BeSO₄作用条件については、従来法では 1, 10, 100μM の 3 点が通常であるが、本研究における BeSO₄作用条件は、低濃度 BeSO₄領域を集中的にみることにした。これは、本研究の試験系では、ある検体がベリリウム感作している場合、BeSO₄の作用濃度が 1～5μM の範囲でリンパ球幼若化反応を示す S.I.ピークが検出され、10μM 以上では感作の有無に関わらず毒性影響が見られたからである。従来法では作用濃度範囲が広い上、感作判定においては、S.I.が最も上昇した単一濃度で実施されている。本試験系のように限定された低濃度 BeSO₄領域の複数作用点をもって感作判断をすることは、誤判定リスクを避けるために重要であると考えられる。また、BeSO₄作用溶液は水で調整することが重要であった。DOE による標準 Be-LPT 法では、BeSO₄を PBS で調整しているが、実際には、PBS で調整した BeSO₄を使用して CBD 患者について Be-

LPTを実施したところ、幼若化反応は惹起したものの、水で調整した BeSO_4 を使用した場合に比して S.I. がばらつく傾向にあった。これは、PBS で調整した場合、ベリリウム (Be^{2+}) と PBS に含まれる、リン酸が反応し不溶性のリン酸塩が生成したためであると考えられた。最後に、幼若化反応検出系に ALMB を応用したことに加えて、リンパ球培養系、 BeSO_4 作用条件を見直したことで従来法による Be-LPT で問題となっていた測定値のバラツキが大きく解消されたと考えられる。

- **ベリリウム取扱い経験を有する集団に対する ALMB 法による Be-LPT の応用**

平成 29 年度検討では、89 名を対象に ALMB 法による Be-LPT を実施し、16 名を暫定陽性とした。平成 30 年度検討では、同一集団 79 名に実施し、13 名が暫定陽性であった。当該集団におけるベリリウム感作率 (CBD 含む) は、それぞれ、18.8%、16.5% であった。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。

- **ALMB 法による Be-LPT の判定暫定基準値について**

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。本研究における、ALMB 法による Be-LPT では、辞退者を除き平成 29 年度に暫定陽性とした 15 名中 12 名は、平成 30 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 $\text{S.I.} > 1.1$ 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、平成 30 年度検討においては、 $\text{S.I.} > 1.1$ 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¹⁵⁻¹⁸。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。

- **ALMB 法による Be-LPT の判定結果とベリリウム作業内容について**

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 工程加工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、ベリリウムの衛生管理

のために、作業場の徹底した調査、ならびに個人ヒアリングの実施し、ベリリウム取扱いに関する正確な情報（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）を入手することが望ましいものと考えられる。表6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6：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	• Same facility
	Metallurgical operator	4.6		
Nuclear weapons facility (Stange et al. 2001)	Beryllium machinists	11.9	8.5	
	Health physics	11.9	4.8	
	Construction trade	10	2.6	
Beryllia ceramics (Kreiss et al. 1993)	Dry pressing	15.8	15.8	• Same facility • Lapping is a machining operation, in which two surfaces are rubbed together with a liquid containing an abrasive grit. • (Henneberger 2001) Results are for longer-term workers (employed >6 yr; first surveyed in 1992 but none BeS at that time)
	Process development/engineering	13.6	13.6	
	Ventilation maintenance	11.1	11.1	
Beryllia ceramics (Kreiss et al. 1996)	Lapping	20	not applicable	
	Machining	14.3		
Beryllia ceramics (Henneberger 2001)	Lapping	21.1	not applicable	• Same facility • (Schuler et al. 2012) Results are for shorter-term workers (employed <6 yr). * Results not significant.
	Machining	17.5		
	Forming	15.6		
	Firing	14.9		
Beryllium metal, alloy and oxide production (Kreiss et al. 1997)	Ceramics production	11.6	9	
	Beryllium metal pebble plant	13.4	5.2	• Same facility • (Schuler et al. 2012) Results are for shorter-term workers (employed <6 yr). * Results not significant.
	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 chamfering	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	

● ALMB 法による Be-LPT の判定結果と HLA-DPB1 E69 アリルの関係について

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、当該アリ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 アリル 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¹⁹。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 アリルは、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 アリルであることを

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²⁰。これは、現時点では、HLA-DPB1 E69 アリ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得ると解するべきであろう。

【おわりに】

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用が見込まれるレベルまでもってこることができ、研究の当初目標を達成した。一方で、ALMB 法による Be-LPT のシステマ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。

BeS 及び 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になっている²¹⁻²⁴。さらに、米国 OSHA が、2018 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²⁵。

このような国際的潮流の中、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。2017 年 (平成 29 年) の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 人であり、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。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. 平成 30 年度 労働衛生のしおり
6. 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.
7. Kreiss K, Newman LS, Mroz MM, Campbell PA. Screening blood test identifies subclinical beryllium disease. *J Occup Med* 1989;31: 603–608.
8. 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.
9. Newman LS. Significance of the blood beryllium lymphocyte proliferation test. *Environ Health Perspect* 1996;104:953–956.
10. 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.
11. U.S. Department of Energy: Beryllium lymphocyte proliferation testing (BeLPT), DOE SPECIFICATION 1142-2001
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Middleton DC, Mayer AS, Lewin MD, Mroz MM, Maier LA. Interpreting borderline BeLPT results. *Am J Ind Med* 2011;54:205–209.□
16. 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.
17. Middleton DC, Lewin MD, Kowalski PJ, Cox SS, Kleinbaum D. The BeLPT: algorithms and implications. *Am J Ind Med* 2006;49:36–44.
18. Middleton DC, Fink J, Kowalski PJ, Lewin MD, Sinks T. Optimizing BeLPT criteria for beryllium sensitization. *Am J Ind Med* 2008;51: 166–172.
19. Richeldi L, Sorrentino R, Saltini C. HLA-DPB1 glutamate 69: a genetic marker of beryllium disease. *Science* 1993;262:242–244.
20. Maier LA, McGrath DS, Sato H, Lympany 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.
21. 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.

22. 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.
23. 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.
24. Silveira LJ. et al. (2012) Chronic beryllium disease, HLA-DPB1, and the DP peptide binding groove. *J Immunol.*, 189, 4014-4023.
25. NIOSH ALERT: Preventing sensitization and disease from beryllium exposure. DHHS (NIOSH) Publication number 2011-107
26. 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.
27. OSHA Fact sheet (2015) OSHA's proposed beryllium rule: overview. DTSEM FS-3821 08/2015
28. Chronic beryllium disease prevention program. Office of Environment, Safety and Health, Department of Energy. Final rule. *Fed Regist.* 1999;64(235):68854-68914.
29. 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.
30. OSHA: Final Rule to Protect Workers from Beryllium Exposure. 29CFR Part 1910 [Docket No. OSHA–2018–0003]

ベリリウム作業者での 3 年間にわたる胸部 CT 読影所見の総括

松尾 正樹、芦澤 和人、横山多佳子
原 眞咲、加藤 勝也、岸本 卓巳

1 はじめに

本研究において、平成 28 年度から平成 30 年度までの 3 年間にわたりベリリウム取扱作業経験者に対して年 1 回の胸部 CT 撮影を施行し、胸部所見に関して調査した。今回は 3 年間の胸部 CT 読影結果および、別途行われたベリリウム感作に関する研究結果や血清マーカーとの関連について報告する。

2 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、年度ごとに本研究の趣旨に同意を得られた被検者を対象とした。

3 方法

胸部 CT は中部労災病院にて施行され、平成 28 年度は通常線量と低線量を同時に撮影し、平成 29 年度、平成 30 年度は被曝量低減のため低線量のみ撮影した。撮影は Optima CT660Pro Advance (GE 社) で行った。低線量 CT に関しては、平成 28 年度は被曝線量を 1mSv とし画像劣化対策に第一世代逐次近似画像再構成法 (ASiR 60%) を用いて処理を行い、2.5mm 厚および 5mm 厚で再構成画像を作成した。平成 29 年度は被曝線量を 1mSv としたが、画質改善の目的に Revolution EVO ES (GE 社) による新たな逐次近似画像再構成法 (ASiRV 60%) で処理を行い 1.25mm 厚で画像作成した。平成 30 年度はさらなる画質改善を目指して被曝線量を 1.2mSv とし、画像処理は平成 29 年度と同様に行い 1.25mm、2.5mm、5mm 厚での再構成を採用した。低線量 CT 撮影条件の最適化に関しては原研究分担者が別途報告する。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おいて行い、合議制で最終診断を決定した。

4 結果

(1) 3 年間にわたる胸部 CT 読影所見について

対象者は、平成 28 年度 90 名、平成 29 年度 86 名、平成 30 年度は 79 名であった。全例男性で平均年齢は平成 28 年度 37.6 歳、平成 29 年度 39.8 歳、平成 30 年度 40.9 歳であり中央値は各々 41 歳、41 歳、42 歳であった。

表 1～表 4 に具体的な胸部 CT 所見の有所見率について年次推移を示す。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（線維化関連）は 10-15%、すりガラス影±網状影は 1-5%であり、すりガラス影の頻度は高くなく経年的にも大きな変化はな

かった。線維化を強く示唆する所見である牽引性気管支拡張は 2.5-4.5%であり、完成された線維化を示す蜂窩肺は 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 3 年間で 10%から 26.6%に、結節影は 7.8%から 31.6%へと年々増加していた。結節影は全例境界明瞭な小結節で肺腫瘍を疑う症例はなかった。肺気腫は大きな変化はなかったが、肺嚢胞については 10.5%から 24.1%に増加していた。リンパ節腫大は 10%-12%で経年変化はないが両側肺門リンパ節腫大を伴っている症例が複数存在した。表 3 に示した胸水、病変分布の優位性、その他の合併症、大陰影についてほとんど有所見症例はなかった。表 4 では肺癌を疑う所見は 1 例もなく、胸膜プラークを有する症例はごくわずかであった。胸膜病変は 1.1%から 8.9%に増加を認めた。

なお、本研究に参加した対象者のなかに慢性ペリリウム症と診断されている方も含まれており、ステロイド治療が開始されたことですりガラス影は改善された症例が認められた。また、ステロイドの投与により所見の改善が見られていたが、ステロイドを中止すると、縮小していた縦隔リンパ節の腫大とすりガラス影の悪化が見られ、ステロイド再投与により所見は改善し、自覚症状も軽快した症例もあった。これらの症例から、ステロイドの投与による早期の治療介入の有用性と、ステロイド継続投与による治療効果が期待できることが示唆された。

表 1 CT 所見別有所見率の推移①

所見	平成28年度	平成29年度	平成30年度
すりガラス影(線維化関連)	14.4%	11.6%	10.1%
すりガラス影±網状影	4.4%	4.7%	1.3%
胸膜下楔状影 (fibrotic consolidation)	1.1%	1.2%	0%
牽引性気管支拡張・細気管支拡張	4.4%	3.5%	2.5%
蜂窩肺	0%	0%	0%

表 2 CT 所見別有所見率の推移②

所見	平成28年度	平成29年度	平成30年度
粒状影	10.0%	11.6%	26.6%
結節影	7.8%	18.6%	31.6%
びまん性肺気腫	11.1%	5.8%	10.1%
肺嚢胞	11.1%	10.5%	24.1%
リンパ節腫大	12.2%	11.6%	10.1%

表 3 CT 所見別有所見率の推移③

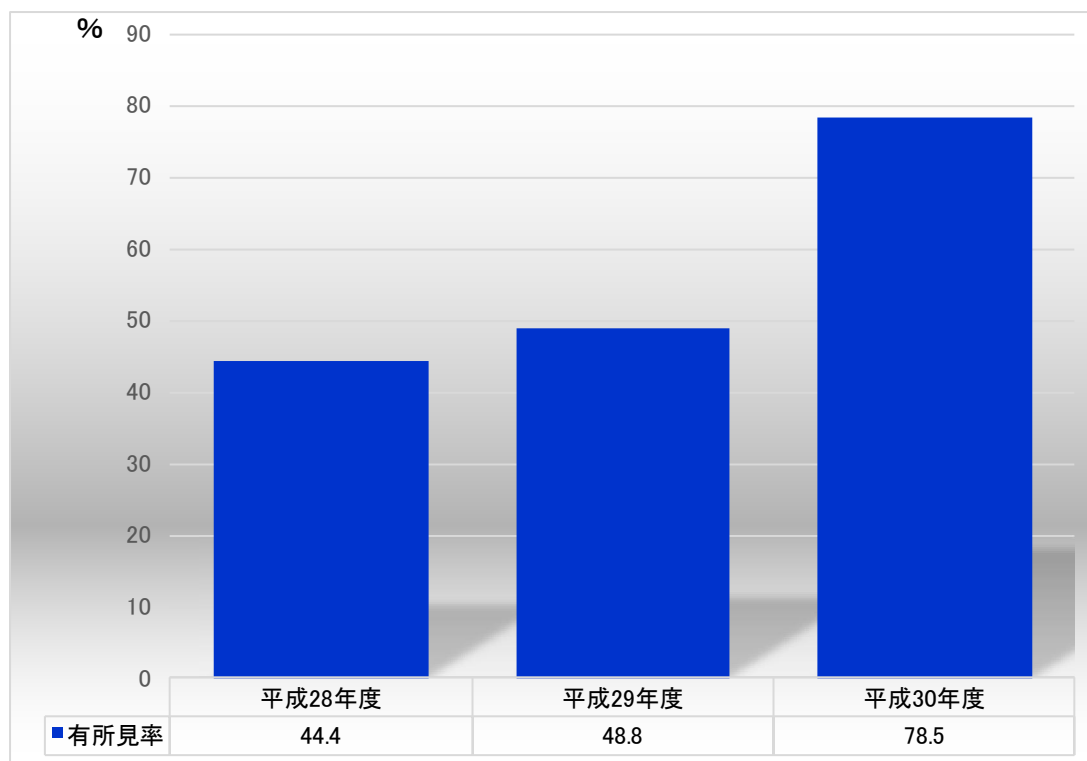
所見	平成28年度	平成29年度	平成30年度
胸水	0%	0%	0%
病変分布の優位性	2.2%	2.3%	0%
その他の合併症	4.4%	0%	0%
大陰影	0%	0%	0%

表 4 CT 所見別有所見率の推移④

所見	平成28年度	平成29年度	平成30年度
肺癌疑い病変	0%	0%	0%
胸膜プラーク	2.2%	1.2%	0%
胸膜病変	1.1%	4.7%	8.9%

以上の結果を総合して、胸部CTでの有所見率を表5に示す。平成28年度は40例(44.4%)、平成29年度は42例(48.8%)、平成30年度62例(78.5%)と経年的に増加していた。これら有所見症例のうち慢性ペリリウム症症例を除いて経過観察を要すると判断された症例は、平成28年度5例(12.5%)、平成29年度15例(35.7%)、平成30年度10例(16.1%)だった。これらの症例には一過性の感染症を疑うものや肺野病変よりもリンパ節腫大を主体として指摘された症例などが含まれており、全例がペリリウムによる肺障害を疑われたわけではない。最終的には、平成30年度報告書に記したようにすりガラス影や粒状影などを呈した10症例に対しては要経過観察又は要精査の必要性が指摘された。

表5 胸部CTでの有所見率の推移



次に、本研究の対象者において施行されたペリリウム末梢血リンパ球幼若化試験（アラマブルー法：ALMB法）で暫定陽性と判断された症例におけるCT画像所見と肺の線維化マーカーであるKL-6値について検討を行った（表6）。KL-6は平成30年度のみ測定されたためALMB法とCT所見は平成30年度の結果を示している。平成30年度CT読影にて要経過観察・要精査とされた10例のうち、要精査の必要性が指摘された9例のうち7例はALMB法暫定陽性であった。KL-6上昇を示す500U/ml以上であった症例は6例であり、全例が慢性ペリリウム症に認めることの多いすりガラス影もしくは粒状影⁵⁾を呈していた。慢性ペリリウム症2例のうち1例はKL-6上昇を示し、もう一例は正常範囲内であった。そこでKL-6と

CT 所見の関連について検討した（表 7）。すりガラス影（上昇群 100% vs 正常範囲群 33.9%, $P=0.021$ ）、粒状影（上昇群 83.3% vs 正常範囲群 21.9%, $P=0.004$ ）、リンパ節腫大（上昇群 83.3% vs 正常範囲群 4.1%, $P<0.001$ ）において、KL-6 上昇群で有意に頻度が高かった。次に ALMB 法の結果と CT 所見の関連について検討した（表 8）。KL-6 と同様に、すりガラス影（暫定陽性群 30.8% vs 陰性群 6.1%, $P=0.022$ ）、粒状影（暫定陽性群 53.8% vs 陰性群 21.2%, $P=0.034$ ）、リンパ節腫大（暫定陽性群 53.8% vs 陰性群 1.5%, $P<0.001$ ）において、ALMB 法暫定陽性群で有意に頻度が高かった。表には示さないが、慢性ペリリウム症症例で上昇することもあるとされるアンギオテンシン変換酵素（ACE）³⁾ は全例正常範囲内（ $<21\text{U/L}$ ）であった。

表 6 平成 30 年度 ALMB 法暫定陽性例における胸部 CT 所見と線維化マーカー

	CT所見	KL-6 (U/ml)
1	すりガラス影、粒状影、結節影	237
2	粒状影（小葉中心性）、リンパ節腫大（BHLあり）	509
3	結節影、索状影	250
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	1160
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	557
6	所見なし	466
7	すりガラス影、結節影、リンパ節腫大、索状影	495
8	粒状影（小葉中心性）、結節影、肺嚢胞、リンパ節腫大	560
9	肺嚢胞	175
10	粒状影、リンパ節腫大（BHLあり）、斑状影（左下葉）	637
11	粒状影、結節影、リンパ節腫大、胸膜病変	516
12	肺気腫、肺嚢胞	304
13	すりガラス影、粒状影（小葉中心性）、リンパ節腫大	427

表 7 平成 30 年度 ALMB 法暫定陽性例における胸部 CT 所見の頻度 (1)

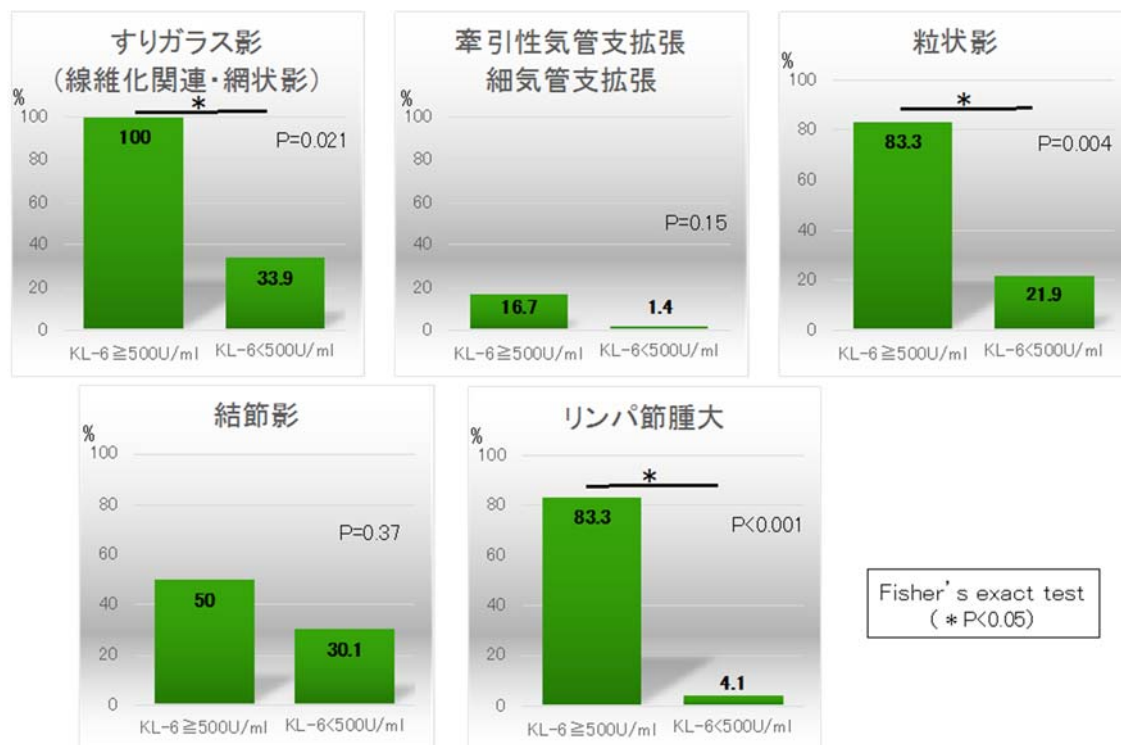
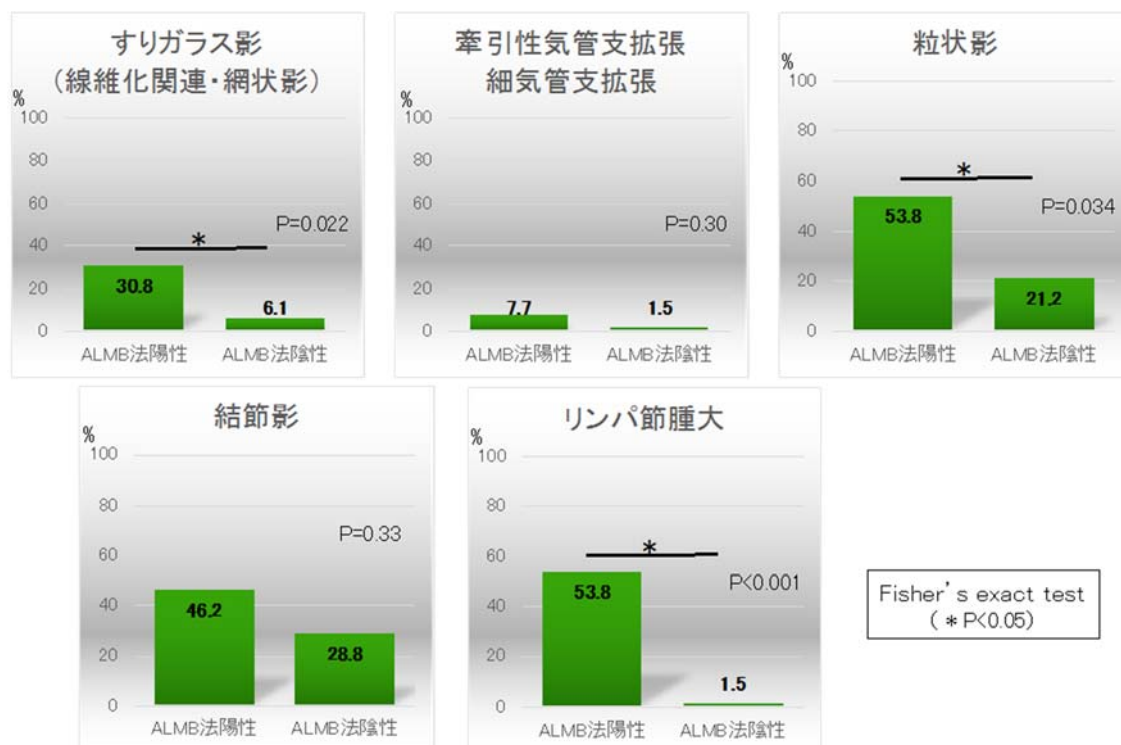


表 8 平成 30 年度 ALMB 法暫定陽性例における胸部 CT 所見の頻度 (2)



5 考察

本研究において、3年間にわたりベリリウム取扱作業経験者に対して年1回の胸部CT撮影を施行し胸部所見に関して調査した。初年度は通常線量と低線量CTを行い、以後の2年間は低線量CTのみ施行した。画質改善を目的に年々撮影条件を変化させていたため、経年的な有所見率の変化を単純に比較することはできないが、比較的小さな病変である粒状影や結節影、肺嚢胞の有所見率が増加したことは撮影条件の最適化が有効であったことを示唆していると考ええる。一方で、本研究における低線量CTの課題とされてきた肺尖部のすりガラス影の判断には困難を伴うことも多かった。ベリリウムによる肺障害を捉えるうえでは重要な所見であるため、今後低線量CTを健診として用いるには改善すべき課題と考えられた。また、平成30年度はインフルエンザ流行期に撮影が行われたため、気道感染を疑う所見を呈した症例を複数認めていた。そのため、CT撮影時期に関しては注意が必要と考えられた。すでに慢性ベリリウム症と診断されている症例を除き、今回の3年間にわたるCT読影結果ではベリリウムによる肺障害を強く疑う症例は見られなかった。しかし、すりガラス影や粒状影を示した7症例に関しては要精査の必要性が指摘された。今後の所見の変化について注意深い観察が必要と思われる。

ベリリウム末梢血リンパ球幼若化試験（ALMB法）にて暫定陽性と判断されたのは平成30年度13例（16.5%）であった。このうち慢性ベリリウム症で生じるすりガラス影や粒状影を呈していた症例は9例（69.2%）であった。そこで、ALMB法とCT所見の関連について検討したところ、暫定陽性群においてすりガラス影、粒状影、リンパ節腫大の有所見率が有意に高かった。これらの所見は慢性ベリリウム症の画像所見として重要であり、ALMB法暫定陽性症例は注意深く画像を観察する必要があると考えられた。また、肺の線維化マーカーであるKL-6が上昇していた6例は全例ALMB法にて暫定陽性であり、すりガラス影や粒状影を伴っていた。そこで、KL-6とCT所見の関連について検討したところ、KL-6上昇群においてもすりガラス影、粒状影、リンパ節腫大の有所見率が有意に高かった。KL-6は主にⅡ型肺胞上皮細胞に発現する糖タンパクであり、間質性肺炎や過敏性肺臓炎にて上昇することが知られている。平成28年度本研究報告書やその他の文献³⁾において、慢性ベリリウム症例でもKL-6が上昇することが示されている。リンパ節腫大は機序としてKL-6と直接関係する可能性は低いが、すりガラス影や粒状影のような肺の炎症に伴って生じたのかもしれない。過去の報告例³⁾や本研究に参加された慢性ベリリウム症例でもリンパ節腫大を認めており重要な所見の一つと考えられる。また、胸腔内リンパ節腫大が複数認められたが、サルコイドーシスを示唆するACEの上昇は認められなかった。

最後に3年間の低線量CT健診読影結果ならびにALMB法、血清マーカーに関する検討を加えて報告した。低線量CTによる健診は胸部レントゲンで捉えることが難しいすりガラス影や粒状影の検出に有効であるが、最適条件の設定には課題が残る結果となった。ALMB法暫定陽性やKL-6上昇は慢性ベリリウム症に生じることの多いCT所見と相関関係があり、ベリリウムによる肺障害のスクリーニングとして活用できる可能性が示唆された。

他方、慢性ベリリウム症のCT所見に関しては、いくつかの報告がみられる⁵⁾⁻⁹⁾。頻度の高い所見として、1) 気管支血管束や小葉間隔壁に沿う粒状・結節、2) 小葉間隔壁の肥厚、3) すりガラス影、4) 気管支壁の肥厚、5) 縦隔・両側肺門リンパ節腫大が挙げられているおり、中でもすりガラス影の病理所見としては、florid granulomaの肺泡毛細血管壁へのびまん性の浸潤⁹⁾、ないし早期の線維化⁷⁾を反映しているとの報告がある。本研究の対象となった症例においても、同様の所見がみられたが、ステロイド治療が開始されすりガラス影は改善していることから、すりガラス影はflorid granulomaの肺泡毛細血管壁への浸潤を反映していると考えの方が妥当なようである。また、ステロイドの投与により所見の改善が見られたが、ステロイドを中止すると、所見の悪化が見られた。しかし、これらの所見はステロイド再投与で改善し、自覚症状も軽快したことがわかった。慢性ベリリウム症患者のステロイド治療は、一般には自覚症状があり肺機能低下が証明された患者において開始されるが、本研究の対象となった症例のように、自覚症状がなくても線維化などの非可逆的な変化を来す前に、ステロイドの投与による早期の治療介入の有用性が示唆されたことに加え、ステロイドを継続して投与することにより、治療効果が期待できることを示唆している。

以上、3年間にわたるCT所見の推移の報告を行なったが、本研究の結果が今後のベリリウム取扱作業経験者の適切な健康管理に寄与できれば幸いである。

【文献】

- 1) Marchand-Adam S, Khatib EL, Guillon F, et al. Short- and long-term response to corticosteroid therapy in chronic beryllium disease. *Eur Respir J*. 2008; 32: 687-693.
- 2) Sharma N, Patel J, Mohammed TL. Chronic beryllium disease: computed tomographic findings. *J Comput Assist Tomogr*. 2010;34 (6): 945-8.
- 3) 樋田和弘, 他. ゴルフクラブ製造業者に発症した慢性ベリリウム症の1例. *日本呼吸器学会誌* 2015; 4: 252-256.
- 4) Aronchick JM. Chronic beryllium disease. *Radiol. Clin. North Am*. 1992;30 (6): 1209-17.
- 5) Newman LS, Buschman DL, Newell JD et al. Beryllium disease: assessment with CT. *Radiology*. 1994;190 (3): 835-40.
- 6) Harris KM, McConnochie K, Adams H. The computed tomographic appearances in chronic berylliosis. *Clin Radiol*. 1993;47 (1): 26-31.
- 7) Maier LA. Clinical approach to chronic beryllium disease and other nonpneumoconiotic interstitial lung diseases. *J Thorac Imaging*. 2002;17(4):273-84.
- 8) Sharma N, Patel J, Mohammed TL. Chronic beryllium disease: computed tomographic findings. *J Comput Assist Tomogr*. 2010;34 (6): 945-8.

- 9) Naccache JM, Marchand-Adam S, Kambouchner M et al. Ground-glass computed tomography pattern in chronic beryllium disease: pathologic substratum and evolution. *J Comput Assist Tomogr.* 2003;27 (4): 496-500.
- 10) Handa T, Nagai S, Kitaichi M, et al. Long-term complications and prognosis of chronic beryllium disease. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2009; 26: 24-31.
- 11) Maier LA, Barker BQ, Rossman MD, et al. Infliximab therapy modulates an antigen-specific immune response in chronic beryllium disease. 2012; 106: 1810-1813
- 12) Mroz MM, Ferguson JH, Faino AV, et al. Effect of inhaled corticosteroids on lung function in chronic beryllium disease. *Respiratory medicine.* 2018; 138: S14-S19 496-500.

低線量 CT 撮影および再構成条件の最適化 - 各年度の改善点 -

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

1 はじめに

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 および低線量 CT を施行した. 平成 29 年度は被検者の被曝量低減のため, 単純 X 線写真, 通常線量 CT を省略し, 低線量 CT のみで評価しその際の注意点について検討した. 肺尖部にまれならず微小な淡いすりガラス状所見が認められ, アーチファクトとの鑑別が問題点としてあげられた. 平成 30 年度においては, S/N 比を改善し, アーチファクトを低減することを目的に, 低線量 CT の基準を満たす最大線量への曝射線量増量と再構成厚 1.25mm に加えて, S/N 比に優れた 2.5mm 厚, 5mm 厚再構成画像を追加作成し, 真の病変とアーチファクトとの識別能の向上を試みた.

2 画質改善への具体的な取り組み

(1) 平成 28 年度

本研究においては, 初年度は単純 X 線写真正面像, 通常の診断用 CT 撮影および低線量 CT 撮影を実施した. CT 再構成厚は, 各々, 2.5mm 厚と 5mm 厚再構成画像を作成した. 急性ベリリウム肺で出現することが推測される, 局所の肉芽腫形成に伴う微小かつ微細なすりガラス状病変の検出には高分解能 CT (再構成厚 3mm 以下かつ高空間分解能用再構成関数) の範疇に入る 2.5mm 厚再構成画像が必要と考えたからである.

平成 28 年度における低線量 CT 検査は検査担当施設で導入されていた GE 社製 OPTIMA 660 (平成 26 年 9 月導入) を使用し, 基本的にメーカー推奨の撮影・再構成条件を使用した. 電流は, 肺癌検診ガイドラインで推奨される 50mA 一定電流撮影を採用した. 再構成関数は高分解能 CT で使用される Bone 関数を使用した. 線量低減に伴う画像ノイズ増加, 画質劣化への対策として, 標準的に使用されてきたフィルタ補正逆投影法 (filtered backprojection:FBP) に換えて, 装置に搭載されていた第 1 世代逐次近似画像再構成法 Adaptive Statistical Iteration Reconstruction (ASiR) をもちい, ノイズとアーチファクトの軽減を試みた. ASiR 法により 50-80% の被曝低減が可能とうたわれている. ASiR の強度により画質が変化するが, メーカー推奨の 60% を採用した.

【結果】

- 1) 被曝線量は, 通常線量 CT が 2.64mSv から 4.38mSv であったのに対し, 低線量 CT は各々 0.97mSv-0.88mSv と 1mSv を下回り 64%, 80% の被曝線量低減が達成された (図 1, 2).
- 2) 画質評価において, 斜走する線状アーチファクトとノイズによる画質低下 (図 1, 2), 特に, 微小あるいは微細病変を対象とする 2.5mm 厚再構成画像で評価困難例 (図 3), 線状病変が消失した偽陰性 (図 4), 偽陽性例としてすりガラス状病変 (図 4), 粒状病変 (図 5) および斑状病変 (図 6) が観察された.

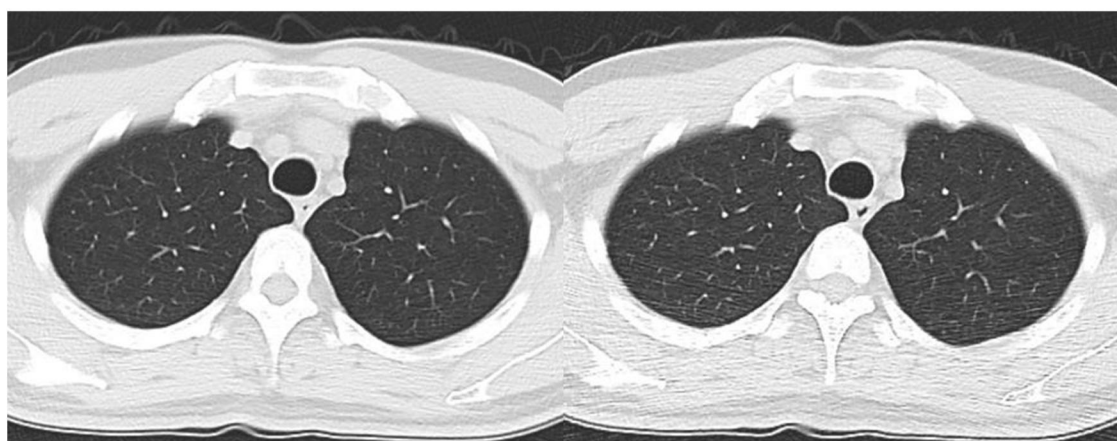
3) 線状、点状アーチファクトは streak artifact が beam-hardening artifact により強調されたものと考えられ、ASiR 単独では除去が困難と考えられ、次年度の課題とされた。

平成 29 年度は、被検者の被曝低減のため、単純 X 線写真と通常線量の診断用 CT とを省略し、低線量 CT のみを使用して、28 年度と比較検討することとなったが、微細かつ微小病変の検出能を向上するためには 1.25mm 厚画像の採用を考慮すべきと考えられた。

一方、ノイズ低減、streak artifact 軽減を合わせた画質改善の可能性につき、技術的観点から、同装置で実施可能な画質改善法として、1) 通常線量で使用された automatic exposure control (AEC) 法を低線量 CT 撮影でも採用し、肺尖部・横隔膜下の画質改善をはかる。2) 受検者の整位精度を向上する。3) 画像再構成関数をの最適化を図るといった対策が考えられた。

A. 通常線量 AEC 使用

B. 低線量 50 mA 定電流



179 mA:

DLP 188.7 = 2.64 mSv

50 mA:

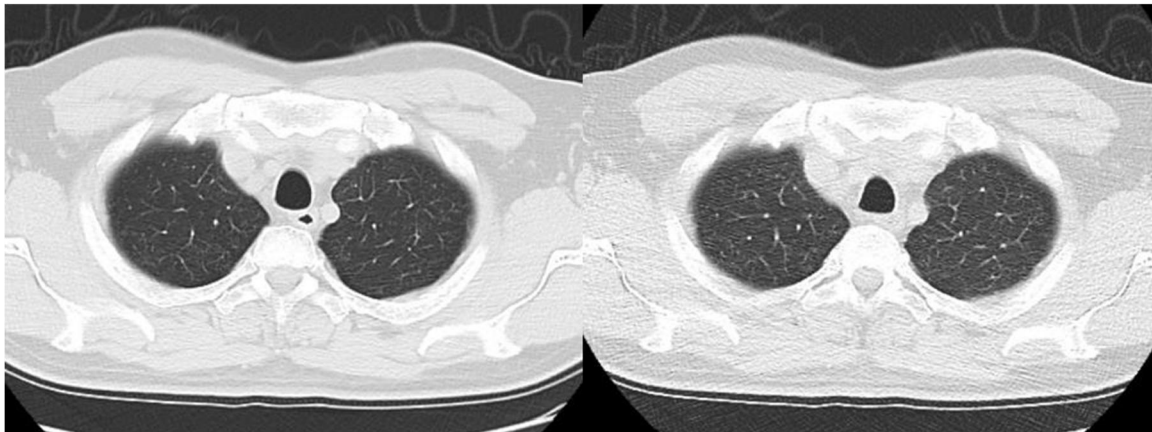
DLP 69.1 = 0.97 mSv

図 1 通常線量 CT と低線量 CT との比較：症例 1

被曝線量は通常染津法 2.64mSv に対し、0.97mSv と 64%低減されている。一方、低線量 CT では両側肺背側に線状のアーチファクトが認められ、画質が低下している。

A. 通常線量 AEC 使用

B. 低線量 50 mA 定電流



315 mA:

DLP 312.9 = 4.38 mSv

50 mA:

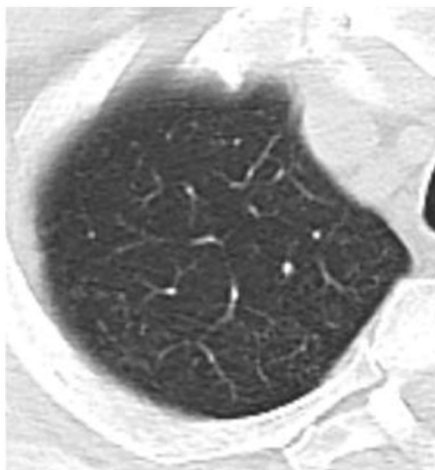
DLP 63.1 = 0.88 mSv

図2 通常線量CTと低線量CTとの比較：症例2

被曝線量は80%低減されている。一方，streak artifactが目立ち，画質が明瞭に低下している。

A. 通常線量 AEC 使用

B. 低線量 50 mA 定電流



315 mA:

DLP 312.9 = 4.38 mSv

50 mA:

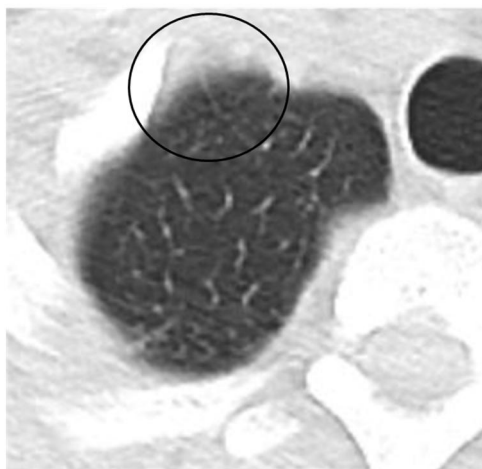
DLP 63.1 = 0.88 mSv

図3 通常線量CTと低線量CTとの比較

評価困難例：症例2

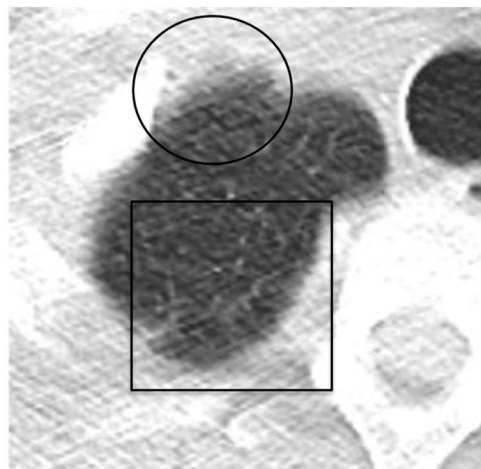
streak artifact および微小すりガラス状病変が全体に出現しており，通常線量との正確な比較は困難である。

A. 通常線量 AEC 使用



406 mA:
DLP 188.7 = 2.64 mSv

B. 低線量 50 mA 定電流



50 mA:
DLP 69.1 = 0.97 mSv

図4 通常線量 CT と低線量 CT との比較

偽陰性（線状）と偽陽性（すりガラス状）：症例 1

通常線量では、右肺尖部腹側に線状病変が認められるが、低線量 CT では指摘できない（○）。一方、低線量 CT のみ限局したすりガラス状病変が指摘でき、偽陽性病変と判断される（□）。

A. 通常線量 AEC 使用



380 mA:
DLP 188.7 = 2.64 mSv

B. 低線量 50 mA 定電流



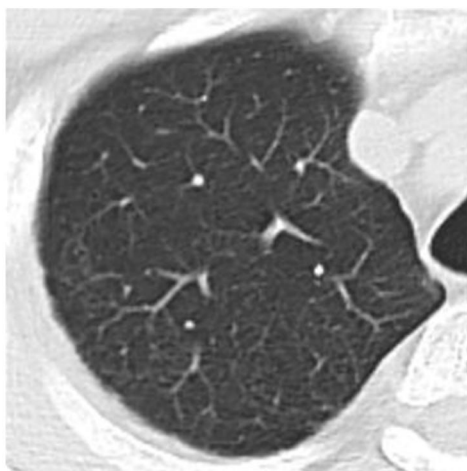
50 mA:
DLP 69.1 = 0.97 mSv

図5 通常線量 CT と低線量 CT との比較

偽陽性（粒状）：症例 1

低線量 CT では streak artifact に起因する、微小粒状病変が指摘される。

A. 通常線量 AEC 使用



315 mA:

DLP 312.9 = 4.38 mSv

B. 低線量 50 mA 定電流



50 mA:

DLP 63.1 = 0.88 mSv

図6 通常線量 CT と低線量 CT との比較

偽陽性（斑状）：症例 2

低線量 CT では小すりガラス状病変が散見され，偽陽性と考えられる（○）。

（2）平成 29 年度

平成 29 年度は，画質改善が大きな問題点としてあげられたが，新たに検査担当施設に導入された GE 社製 Revolution EVO を使用することが可能となった．逐次近似再構成法として平成 28 年度で使用した第 1 世代の ASiR から，新たに搭載された，streak artifact 低減能力が高い新たなソフトである ASiRV を使用した．低線量 CT としての被曝線量は 1mSv を維持した．より微小勝かつ細な病変を検出するため再構成厚は 1.25mm を採用した．

【方法】

画質改善に対する方策として，

- 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．
- 2) 受検者の整位の最適化．
- 3) ASiRV の適応程度の最適化．
- 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．

【結果】

- 1) AEC 法は GE 社製 Revolution EVO に搭載されており全例で併用可能であった．
- 2) iso-center（ガントリーの中心）に被検者を整位することを撮影担当診療放射線技師に徹底し

た。

3) ASiRV 至適条件の検討

ASiRV は ASiR と同様に逐次近似を反映させる強度の設定が可能であり，ASiR 強度 60, 80, 100 の中でどれが今回の目的に最適かを検討した．肺尖部（図 7），肺中部（図 8），肺底部（図 9）での比較では，画像の SN 比は $60 < 80 < 100$ の順に優れ，肺野吸収値の不均等なモアレ状の吸収値むらが $60 < 80 < 100$ と ASiRV100 で最も強く観察された．今回，肺野吸収値の上昇がベリリウム肺の異常所見として出現する可能性があり，偽陽性をできるだけ避けるため，ASiRV60 による再構成が今回の目的にかなうと判断された．

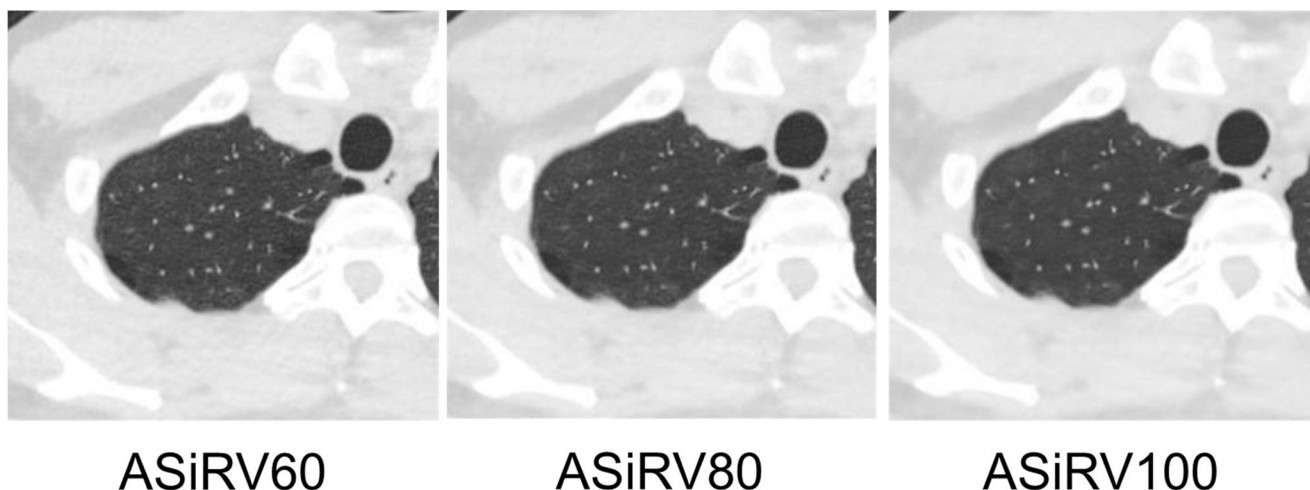


図 7 至適 ASiRV 強度評価 肺尖部

被曝線量は 1mSv，AEC 併用，再構成厚 1.25mm である．ASiRV 強度 60, 80, 100 を比較検討した．画像 SN 比は強度 100 が優れ，肺野吸収値の不均等なむらが ASiRV100 で最も強く観察される．

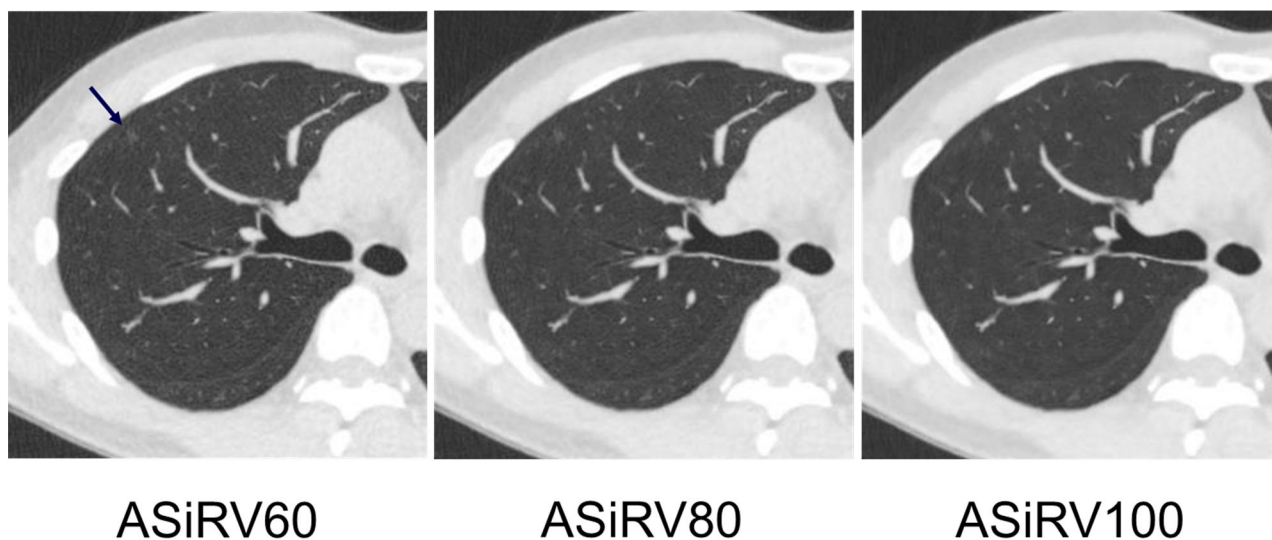


図 8 至適 ASiRV 強度評価 気管分岐部

被曝線量は 1mSv，AEC 併用，再構成厚 1.25mm である．画像 SN 比は強度 100 が優れ，肺野吸収値

の不均等なむらが ASiRV100 で最も強く観察される。腹外側に見られる小すりガラス状病変はいずれの画像でも描出されているが ASiRV60 において周囲とのコントラストが最も明瞭である (→)。

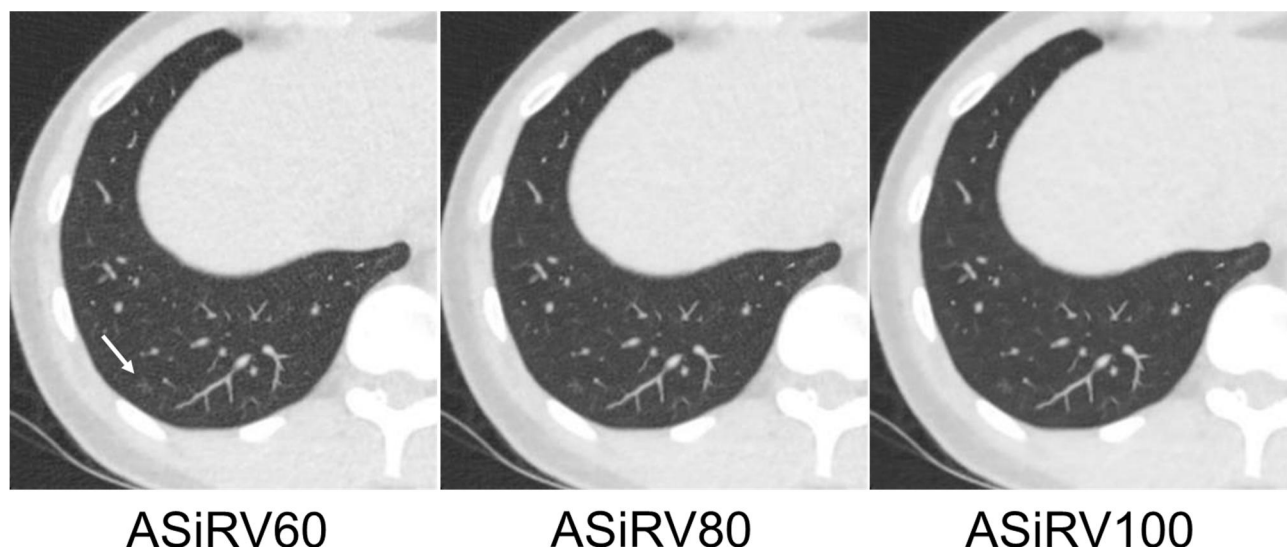


図9 至適 ASiRV 強度評価 肺底部

被曝線量は 1mSv, AEC 併用, 再構成厚 1.25mm である。画像 SN 比は強度 100 が優れ, 肺野吸収値の不均等なむらが ASiRV100 で最も強く観察される。背外側に見られる小すりガラス状病変は ASiRV60 において周囲とのコントラストが最も明瞭である (→)。

4) 再構成関数の最適化

平成 28 年度の再構成関数は, Bone 関数が用いられたが画質の点で不十分との評価であった (図 10)。今回, 1.25mm 厚再構成高分解能 CT での観察を視野に再構成関数を見直した。Lung 関数は今回の低線量では血管辺縁周囲のアーチファクトが強く, 本研究には不適切と判断し (図 10), Chest 関数, Bone 関数, Bone+関数を比較検討した。Streak artifact は Chest 関数で最小, Bone+関数で最大であり。Bone 関数はその中間であった (図 11-13)。血管辺縁の鮮鋭度が Chest 関数で若干劣る印象であった (図 11-13)。SN 比は Chest 関数が最も優れ, 次いで Bone 関数, Bone+関数と評価された (図 11-13)。総合的には本研究においては Chest 関数が最も適すると判断した。

5) 頭尾方向の部分体積現象を改善するため Z-filter を 1.6→1.2 に最適化した。

6) 平成 28 年度の画像と比較し, 画質改善効果は概ね良好であったが, 特に肺尖部におけるすりガラス状病変有無の判定において, アーチファクトとの鑑別が困難な事例が経験され次年度の課題とされた。

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 14), 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。



ASiR Bone 関数



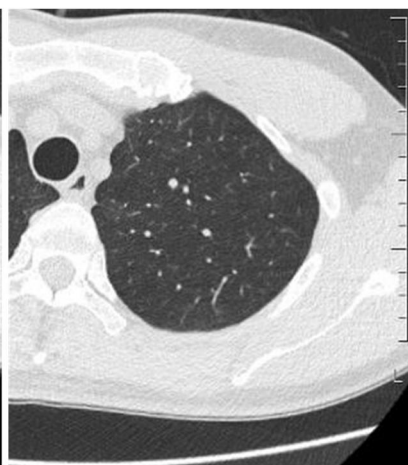
ASiRV Lung 関数

図 10 ASiR, Lung の問題点

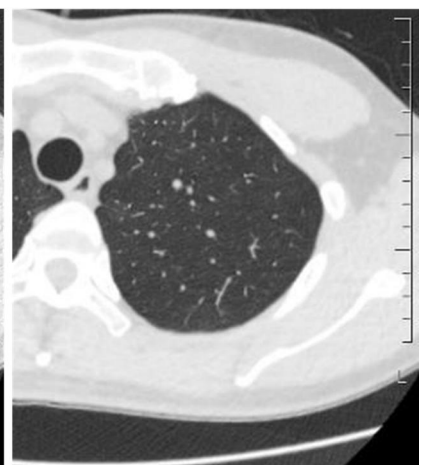
通常線量，AEC 併用，再構成厚 2.5mm である．平成 28 年度の再構成関数は，Bone 関数が用いられたが画質の点で不十分との評価であった．再構成関数におい Lung 関数は血管辺縁周囲のアーチファクトが強く候補からは除外した．



Bone



Bone+



Chest

図 11 至適再構成関数の評価 肺尖部
Bone, Bone+, Chest の比較

被曝線量は 1mSv，AEC 併用，再構成厚 1.25mm，ASiRV 強度 60 である．Streak artifact は Chest 関数で最小，次いで Bone 関数，Bone+関数は最大であった．画像 SN 比は Chest 関数が最も優れ，以下 Bone 関数，Bone+関数の順である．血管辺縁の鮮鋭度は Chest 関数が若干劣りわずかなぼけ像が観察される．



図 12 至適再構成関数の評価 気管分岐部
Bone, Bone+, Chest の比較

被曝線量は 1mSv, AEC 併用, 再構成厚 1.25mm, ASiRV 強度 60 である. Streak artifact は Chest 関数, Bone 関数, Bone+関数の順に増加した. 画像 SN 比は Chest 関数, Bone 関数, Bone+関数の順に優れている. Chest 関数では血管辺縁の鮮鋭度が若干劣っている. 外腹側部胸膜下に小すりガラス状病変が認められる. 周囲とのコントラストは Chest 関数でより明瞭である (→).

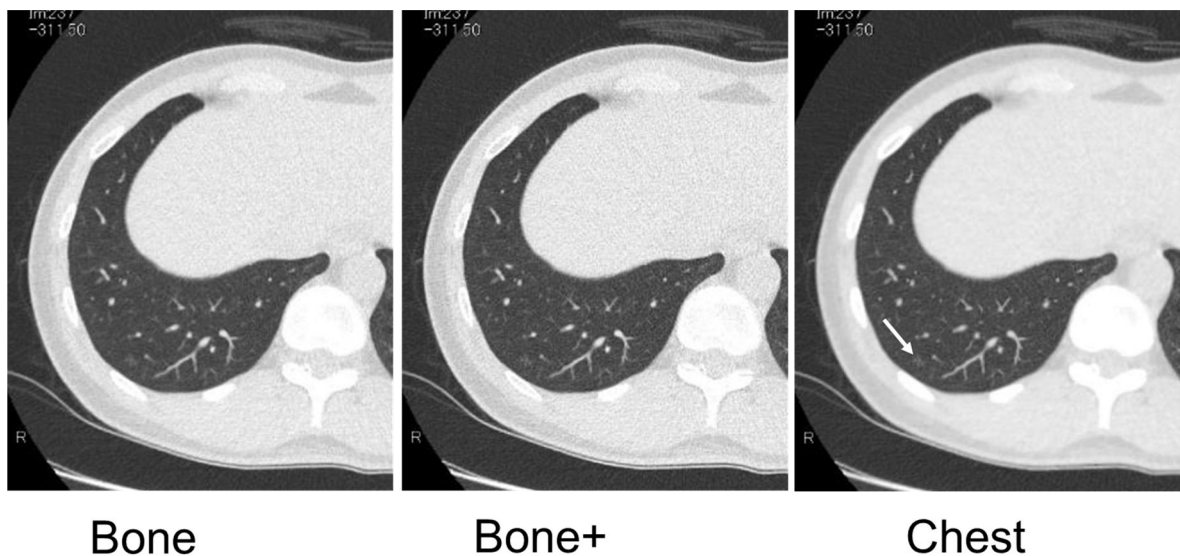


図 13 至適再構成関数の評価 肺尖部
Bone, Bone+, Chest の比較

被曝線量は 1mSv, AEC 併用, 再構成厚 1.25mm, ASiRV 強度 60 である. Streak artifact は Chest 関数, Bone 関数, Bone+関数の順で優れていた. 画像 SN 比は Chest 関数が最も優れ, 以下 Bone 関数, Bone+関数の順である. Chest 関数では血管辺縁若干不鮮明である. 背外側に見られる小すりガラス状病変と背景肺とのコントラストは Chest 関数において最も明瞭である (→).

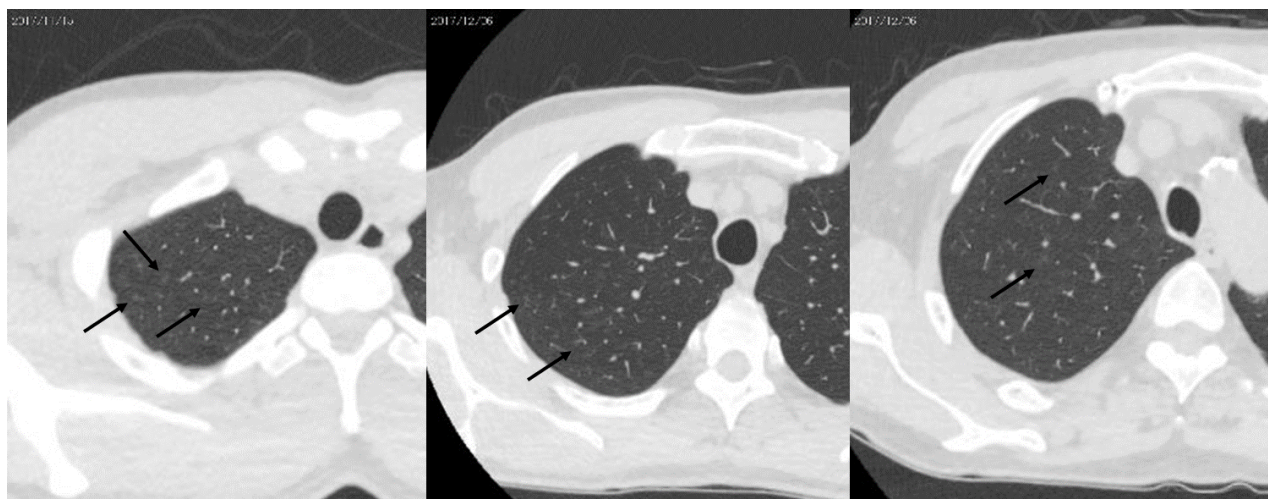


図 14 平成 29 年度撮影条件 1.25mm 厚で認められたすりガラス状アーチファクト

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。微細なすりガラス状所見が散在性に認められる。

(3) 平成 30 年度

平成 30 年度の画質改良のためには S/N 比の向上が必須と考えられた。これに対し曝射線量の増加およびより厚い再構成厚画像の追加作成を対策として実施した。

【方法】

- 1) CT 検診認定機構および肺癌取扱い規約いずれも、肺癌に対する低線量 CT 検診に対しては局所の曝射線量を CTDI (computed tomography dose index volume) vol2.5 mGy 以下とすることを推奨している。今回は曝射線量はこれを上限とし、撮影範囲の DLP (dose-length product) = $CTDI_{vol} \times \text{スキャンレンジ } 35 \text{ cm}$ (肺全体を確実に撮影範囲に含めるため) = $2.5 \times 35 = 8.75 \text{ mGy} \cdot \text{cm}$ 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 $87.5 \times 0.014 = 1.225 \text{ mSv}$ が肺癌を対象とする際の胸部低線量 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 年度から 20% 増加し 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小あるいは吸収値の低い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、平成 29 年度はそれ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。読影実験後、病変と紛らわしいアーチファクトの存在が指摘されたため、平成 30 年度においては、1.25mm 厚の薄層 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 画像も同一撮影データを使用して作成し、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への対策とした。

【結果】

- 1) 曝射線量 20% 増加による画質向上が確認された (図 15-16)。

- 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 15-16)。
- 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 17)

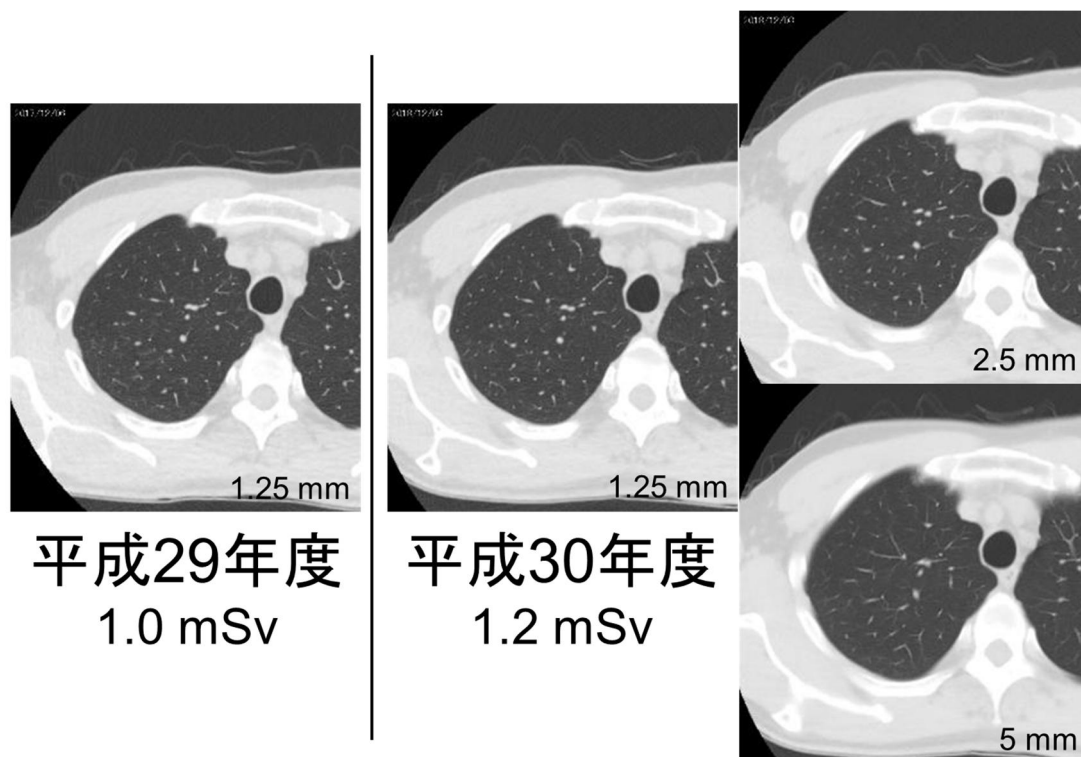


図 15 平成 30 年度の撮影条件による画質改善

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。

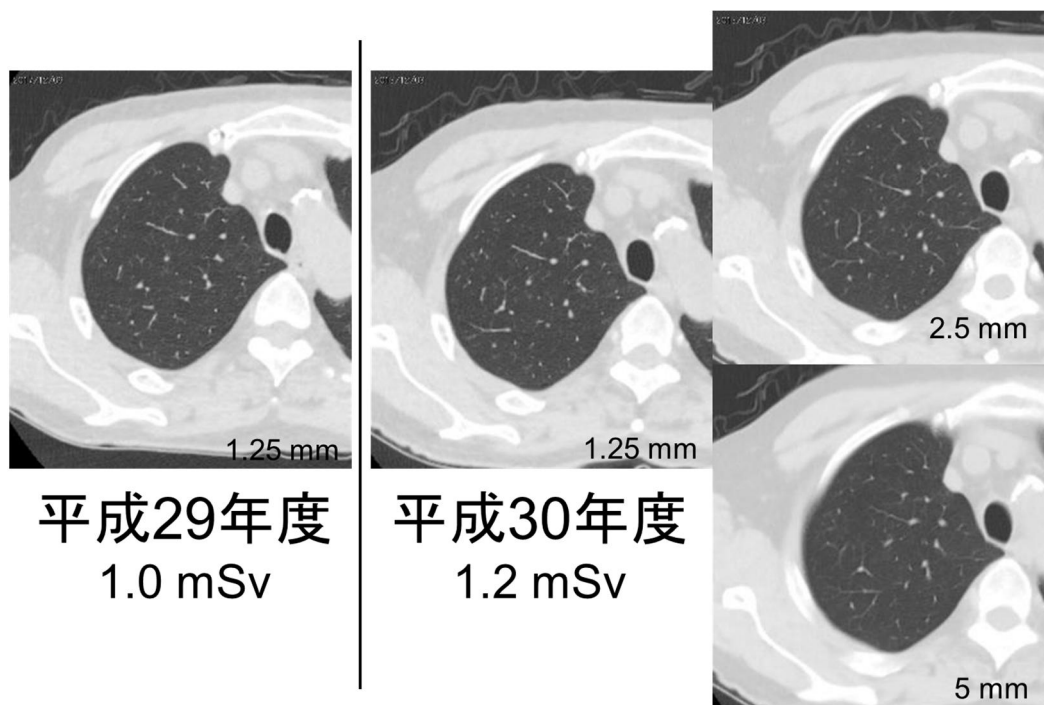


図 16 平成 30 年度の撮影条件による画質改善

図 15 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。

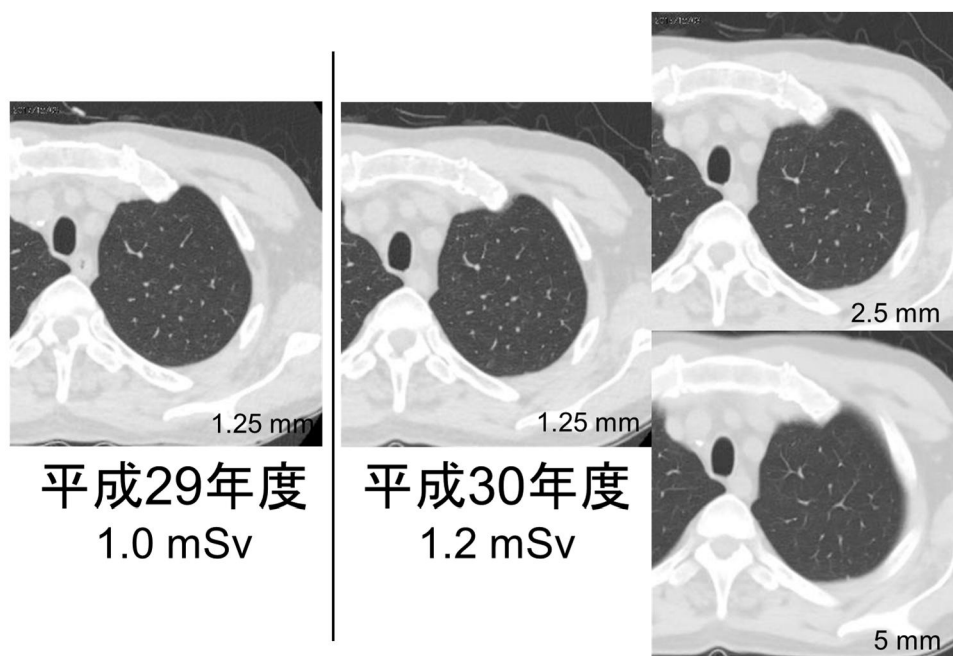


図 17 平成 30 年度の撮影条件による画質改善不十分例

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。

3 おわりに

- 1) 各年度毎に撮影・再構成条件の最適化を図り、画質改善を達成することが出来た（図 18）。
- 2) さらに高性能の逐次近似法の導入やびまん性病変に対する低線量 CT 撮影条件の確立が課題としてあげられた。

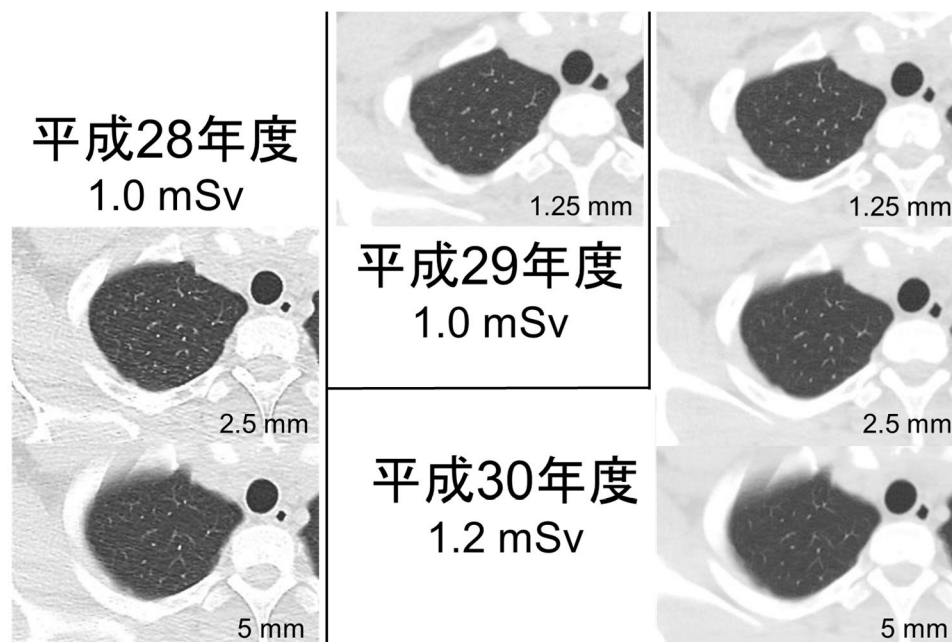


図 18 各年度における低線量 CT の画質向上

S/N 比向上，アーチファクト低減により画質が改善している

リンパ球の機能検査における 3 年間の総括

大槻剛巳、西村泰光

1. はじめに

本研究班は「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」を課題としており、「職場における化学物質」として、ベリリウム (Be) を主たる対象としている。

ベリリウムによる疾病としては、以下に示す”Management Health Effects of Beryllium Exposure” に詳細が記載されているが、1970～80 年代に多くの研究者は、慢性ベリリウム症 (Chronic Beryllium Disease: CBD) の症例の循環血液中や肺のリンパ球が *in vitro* で Be の存在によって増殖することを学び、この事は Be Lymphocyte Proliferation Test (BeLPT)として、Be ばく露者の Be 感受性のスクリーニングや、職場での Be へのばく露のサーベイランスに使用されていると記載されている。この試験は、肺胞洗浄液 (BAL) あるいは末梢血のリンパ球を *in vitro* で Be 塩と混合培養する実験系である。



Managing Health Effects of Beryllium Exposure

Committee on Beryllium Alloy Exposures, Committee on Toxicology, National Research Council

ISBN: 0-309-12533-2, 138 pages, 8 1/2 x 11, (2008)

This free PDF was downloaded from:

<http://www.nap.edu/catalog/12464.html>

図 1 ベリリウムによる疾病を包括的に解説した成書

また Be の刺激に伴って Be 特異的 T 細胞から産生されるサイトカインではインターフェロン (Interferon: IFN) - γ とインターロイキン (Interleukin: IL) -2 が重要としている。

しかしながら、CBD を予測するにあたって、真の陽性結果の境界値は？ 作業者の監視として BeLPT の有用性は？ 陽性作業者にどのようなフォローアップテストをすべきか？ 陽性者が CBD に進展していく過程は？ そして、BeLPT が異なる研究室によって差異がでることにより標準化の方法があるか？ などの疑問もまた記されている。この最後の設問については、この研究班の中で、独立行政法人労働者健康安全機構 労働安全衛生総合研究所の研究協力者のグループによって、検討が行われる。また、個人的素因としての HLA タイプについては、既報告により、Be 感作 (Be sensitivity: BeS) については、HLA-DPB1 が重要で Glu 69 の位置が重要と考えられている。

このような背景の中で、我々は Be ばく露に対する新しい免疫学的視点と観察によって、Be ばく露者の CBD 発症予防などにつながるサーベイランス指標の構築を目指す研究を分担することとした。

この検討を行う中で、以下の手順で進めることとなった。

1. 既に慢性ベリリウム肺（Chronic Beryllium Disease: CBD）を発症している症例の末梢血単核球（Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMCs）の免疫機能解析。
2. ベリリウム取扱い工場勤務作業員における末梢血での単球比率（全白血球中の割合（%））、単球膜表面上の CD86 及び CD163 表面マーカーの発現量及び血清中インターロイキン（Interleukin: IL）-4 濃度の測定。

1) 注 1：【CD86 について】¹⁾

- ① CD86（別名：B7.2）は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する共刺激分子（costimulatory molecule）である。CD86 は、主に B 細胞、樹状細胞、マクロファージを含む抗原提示細胞（APC）上で発現する。CD86 は、T 細胞表面上の 2 つのタンパク質、CD28 抗原及び CTLA4（cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4）のリガンドである。CD86 と CD28 抗原の結合は、T 細胞活性化の共刺激シグナルとなる。CD86 と CTLA4 の結合は、T 細胞活性化を負に調節し、免疫応答を減少させる。

2) 注 2【CD136 について】²⁾

- ① CD163 は、SRCR（scavenger receptor cysteine-rich、スカベンジャー受容体システインリッチ）スーパーファミリーに属する膜貫通タンパク質である。CD163 は、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体のスカベンジャー受容体であり、単球及びマクロファージのマーカーとされている。マクロファージの炎症活性化過程で外部ドメインが脱落することで生じ、血液中を循環する可溶性 CD163（sCD163）は、血漿/血清中のマクロファージ活性マーカーである。

3. ベリリウム取扱い工場勤務作業員における血清中サイトカイン濃度（29 種類）、KL-6、SP-D および ACE とともに、凍結保存 PBMCs より磁気分離後、再度、凍結保存した CD4 陽性細胞（ヘルパー T 細胞）における遺伝子発現解析を実施。

1) 注 1：【KL-6 について】³⁾

- ① KL-6 は、分子量 100 万以上と巨大な分子量をもつ、シアル化糖蛋白である。通常、肺のⅡ型肺胞上皮細胞、呼吸細気管支上皮細胞などや、腺管、乳管などの腺細胞で産生されている。間質性肺炎では炎症に伴って、Ⅱ型肺胞上皮細胞の障害や再生により、KL-6 が過剰産生され血中で高値となる。健康者やその他の肺疾患では高値を示さないため、間質性肺炎の診断マーカー、活動性の指標として使用されている。

2) 注 2：【SP-D について】⁴⁾

- ① SP-D：肺サーファクタントプロテイン D は、肺のⅡ型肺胞上皮細胞より産生・

分泌される肺特異的な蛋白の一種である。KL-6 は肺胞上皮以外の細胞でも認められるが、SP-D や SP-A はⅡ型肺胞上皮細胞に特異的と考えられている。間質性肺炎の診断マーカー、活動性の指標として使用されている。

3) 注3:【ACE について】⁵⁾

- ① ACE:アンギオテンシン変換酵素は、主に肺に存在しており、アンギオテンシンⅠを、強力な昇圧作用を持つアンギオテンシンⅡに転換する酵素である。同時に血管拡張作用を持つブラジキニンの昇圧作用を増強する。
- ② 異常値を示す主な疾患・状態
 - 1. 異常高値：サルコイドーシス、甲状腺機能亢進症、肝硬変、糖尿病
 - 2. 異常低値：Crohn 病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、慢性閉塞性肺疾患、甲状腺機能低下症

4) 注4:【ヘルパーT細胞】⁶⁾

- ① 抗原で刺激された B 細胞に作用して、B 細胞の抗体産生細胞への分化を補助する T 細胞。生体内で免疫反応を行なうリンパ球は複数の細胞種より成るが、未分化な B 細胞が抗体産生能を持つためには、特異抗原で刺激された後に T 細胞からシグナルが伝達されなければならない。ヘルパーT細胞は、マクロファージが提示する抗原により活性化し、インターロイキン 2 などのリンホカイン（サイトカイン）を産生し、B 細胞に分化を誘導するためのシグナルを与える。

2. CBD 症例 PBMCs の免疫機能解析

CBD の 3 症例の BMCs を収集し、免疫機能解析に供した。なお、解析手段は、CD4+T 細胞（ヘルパーT細胞）、CD8+T 細胞（細胞傷害性 T 細胞）、ナチュラルキラー（Natural Killer: NK）細胞（CD56 陽性細胞を NK 細胞として分離）及び単球（Monocyte：単球については、フローサイトメトリーの FSC/SSC～FSC(前方散乱光 forward scatter)は細胞の大きさを表し、SSC(側方散乱光 side scatter)は細胞の内部構造の複雑さを表す。細胞内の核や顆粒を反映する～によって他のリンパ球と明白に分離できる細胞集団）における膜表面発現分子について解析した。

それぞれの細胞集団における解析した膜表面分子について、陽性細胞におけるフローサイトメトリーでの平均蛍光強度（Mean Fluorescent Intensity: MFI）及びカットオフ値からの陽性細胞数の割合（%）について、これまでのびまん性胸膜肥厚（アスベストばく露者:DP）および悪性中皮腫症例（MM）の平均値と、また、今回の検体での健常人及び CBD 症例の結果を比較検討した。

これらの結果の中で、興味深い点は、図 2 に示す単球の解析であった。CBD の 3 例に共通する所見として、単球において CD86 の低発現及び CD163 の高発現が認められた。加えて、MFI で検討した 3 症例の CD86/CD163 発現の相対比は、健常人のそれよりも明瞭に低

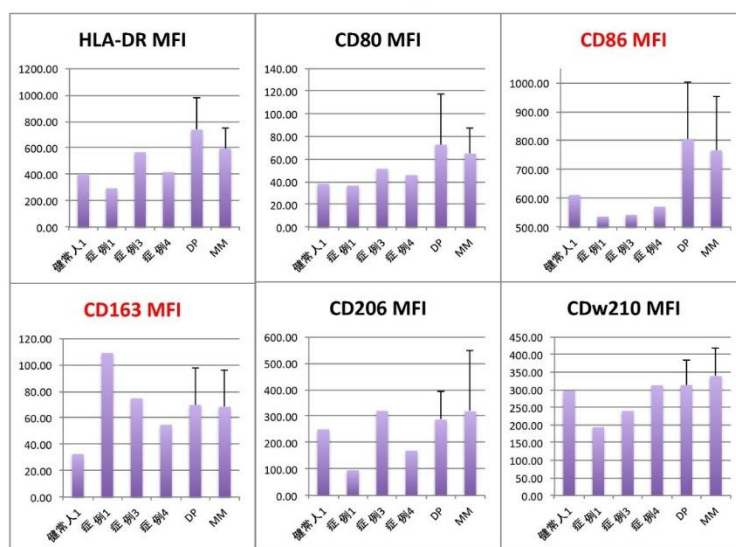
く、アスベストばく露症例である DP の 13 例、MM の 10 例と比べても、低い傾向を示した (図 3)。

興味深い点は、CD86 及び CD163 表面マーカーは、それぞれ、M1 マクロファージ及び M2 マクロファージの指標分子であり、CBD 症例で CD163 の相対的高発現、CD86 の相対的低発現という結果から、CBD 症例では、マクロファージ (今回の検討では、末梢血を循環する単球で解析しているが、単球が組織に至り分化することでマクロファージとなる) は、M2 マクロファージへと分化していると考えられることである。

M1 マクロファージは、炎症応答を惹起し、最近やウイルス感染に対する宿主防御に中心的な役割を担っていると考えられている、一方、M2 マクロファージは、抗炎症応答、寄生虫感染、組織再生、繊維化及び腫瘍の転移や浸潤に関与していると考えられている⁷⁾。

加えて、ベリリウム感作及び CBD 発症の症例の肺胞マクロファージで CD16 陽性の細胞が多いという報告⁸⁾と、CD16 陽性のマクロファージが M2 タイプへの極性化が生じている可能性を論じる報告もあり⁹⁾、今回の解析と合致する考案になると想定される。ただし、肺胞マクロファージの報告では、末梢血の単球では、健康人対照に比し割合が減少しているとも記されており、今後も、詳細な検討を要する事項であろうと考えられる。

Monocyte



8

図 2 CBD の 3 症例、PBMCs の単球分画における各種表面マーカーの発現度合い

CBD 症例では、肺の線維化像が認められる¹⁰⁾。また、国際がん研究機関 International Agency for Research on Cancer, IARC) では、IARC 発がん性リスク一覧において、ベリリウムをグループI、すなわちヒトに対する発がん性が確実な物質として分類している⁹⁾。またベリリウムばく露と肺がんについての総説も認められる^{12,13)}。これらのことより、CBD 症例において、上記の M2 マクロファージの関与としての「線維化、及び腫瘍の転移や浸潤」

に関与という観点において、CBD 症例の末梢血単球の極性化が、M2 マクロファージに傾いていることは、免疫機能解析の観点からも、十分に理解可能な結果であった。

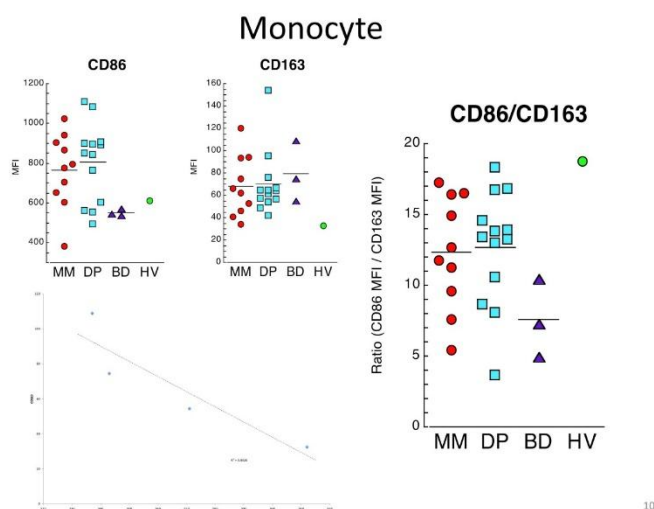


図 3 CBD (図中 BD) 単球における CD86 及び CD163 発現とその比。健常人 (HV) ,びまん性胸膜肥厚 (DP:アスベストばく露症例) 及び中皮腫 (MM) との比較

なお、血清を用いたサイトカイン測定では、CBD で IL-4、IL-3 及び IL-15 が、DP 症例あるいは MM 症例と比較すると高値であった (図 4)。この結果は、PBMCs のうち、CD4+ヘルパー T 細胞を、収集後一晩活性化した後に測定した遺伝子発現においても、従来、我々が検討してきた DP や MM 症例に比して、IL-4、IFN- γ 及び PD-1 (Programed Cell Death-1、CD4+細胞の活性化の指標であるとともに、昨今は、PD-1 に結合するリガンドである PD-L1 及び PD-L2 が、抗原提示細胞の表面や血管内皮、一部のがん細胞等に発現し、T 細胞を抑制させ自己への攻撃を抑制する役割を担っている反面、免疫による癌細胞への攻撃回避を促進させてしまうことで知られている) が高発現であったこととも合致する所見であった。

IL4 は、通常 Th2 と呼ばれる B 細胞に刺激を加えて、抗体産生を促すような T 細胞の亜群から産生されるサイトカインで、Th2 からは他に IL-5、IL-13 など産生され、液性免疫に効いている。一方、IFN- γ は、Th1 亜群から産生され、他には IL-2 など同様に、これは T 細胞自体や、細胞傷害性 T 細胞などを活性化させ、細胞性免疫に効いており、ここには高値であった IL-15 も含まれてくる。

IL-4 も IFN- γ も高値であったことを考える場合に、Th1 と Th2 のバランスという観点からは解釈が困難になる。そこで PD-1 の発現も高値であったことを鑑みると、そこには、例えば慢性のウイルス感染などによって T 細胞が活性化が続きすぎて疲弊してしまう場合に、この PD-1 は高発現となることも分かっており、いわゆる「疲弊 T 細胞」の状態になっているとも考えられる。

Plasma cytokines

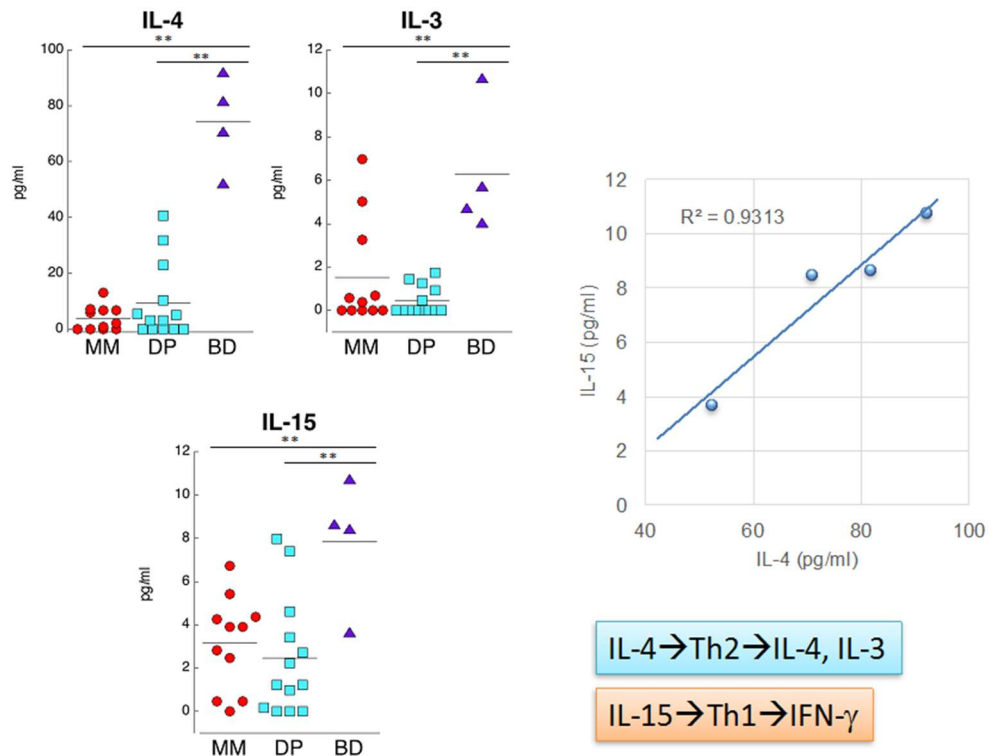


図 4 CBD 症例 4 例における血清サイトカイン：IL-4、IL-3 及び IL-15 の高値

背景としては、慢性継続性のベリリウムばく露と、感作の結果生じた線維化など、また、そこには慢性炎症が継続的に存在し、循環 T 細胞も、継続的、反復的にベリリウムと邂逅して、刺激を受け続ける。ならばこそ、その結果で、Th1 への極性であろうが Th2 への極性であろうがサイトカイン産生が過剰となった上で、PD-1 発現高度で示される疲弊が生じていると考えられる。

おそらくこれらの現象は、ベリリウム取扱い工場作業者のうち、感作を受けた症例、さらにそこから CBD を発症した場合に、病態形成の後に進展の処に影響をもたらす免疫機能ではないかと考察される。

3. ベリリウム取扱い工場勤務作業における末梢血での単球比率（全白血球中の割合〈%〉）、単球膜表面上の CD86 及び CD163 表面マーカーの発現量及び血清中インターロイキン（Interleukin: IL）-4 濃度の測定

続いて、ベリリウム取扱い工場作業者 85 例より、末梢血を、ヘパリン採血管と血清分離剤入り採血管にそれぞれ採血した。前者では、白血球全体に対する単球の広津（%）、およ

いないと考えられる群) とで比較しても、有意差は認められなかった。

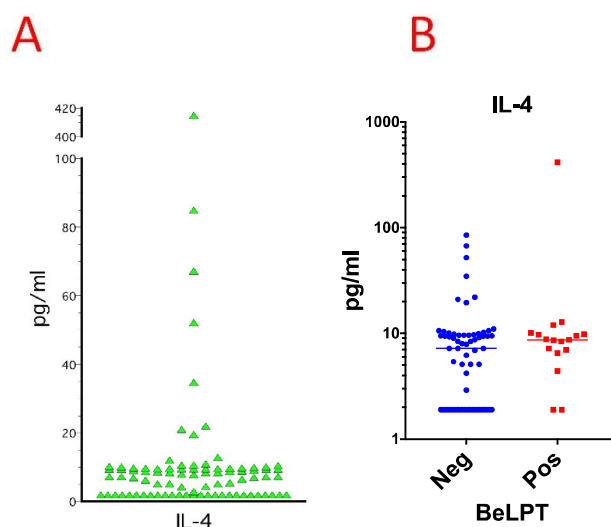


図 5 ベリリウム取扱い工場作業員の血清 IL-4 濃度 (A) 及び BeLPT 試験で 2017 年度データとして、感作が暫定陽性 (Pos) 及び陰性 (Neg) と判定された群での比較。

この結果は、Be による感作のみでは、十分な血清 IL-4 の上昇までは至らないことを示唆している。あるいは、CBD となって疲弊 T 細胞としての様相を呈した後に、血清 IL-4 の上昇が認められると理解すべきかも知れない。この考察を基盤とすると、比較的高値であった 8 例、中でも非常に高かった 1 例については、CBD への進展 (肺の線維化という捉え方にて) が生じている可能性も考慮されるべきである。今回の検証では、個々の症例についての照合までには至っていないものの、今後、ベリリウム取扱い作業員の中で、感作ありと想定された群に対して、CBD への進展の早期診断の中での IL-4 の役割は、更に検討を要する課題であろう。

一方、単球分画の中での CD86 と CD163 の発現については、どうであったか。図 7A で示すように、MFI の絶対量としては、CBD 症例で検証した時と同様に CD163 の発現度が高かった。なお、図 2 及び 3 と比して、MFI の値に差が認められるのは、フローサイトメトリー解析時の抗体や設定条件の差であって、測定時期が異なるために致し方ない処である。

ただし、CD86/CD163 比を、感作 Pos 群と Neg 群で比較すると (図 7B)、有意な差は認められなかった。しかし、この比に IL-4 濃度を乗ずることによって、統計学的に有意な差を示すスコア化は可能であった (図 7C)。

これらの結果は、単球の M2 マクロファージへの極性化は、感作の結果ではなく、もし、上記の解析で考察したとおり、CBD 発症、すなわち、肺の線維化などが生じた後の免疫機能としての変化と捉えることが、理解しやすいと判断されるし、このことは、IL-4 も然りである。さらに、IL-4 を加味することによって、感作群 (感作群の中から、一部症例が CBD に進展するとすると) と非感作群での差が認められた (オーバーラップする例も多いのでは

あるが) と考えると、単球の極性化の前に、IL-4 の動きが生じている可能性が高いと思われる。

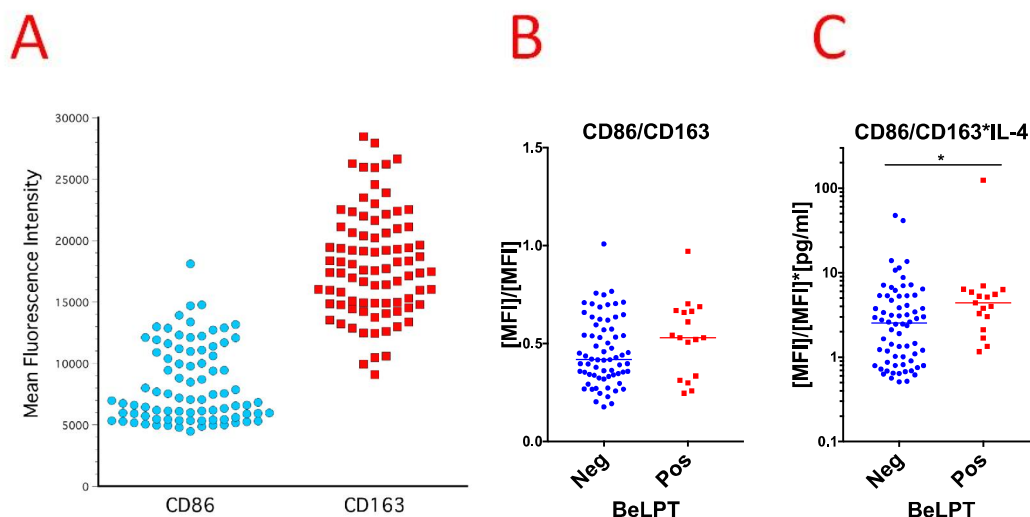


図 6 ベリリウム取扱い工場作業者の末梢血単球における CD86 及び CD163 の MFI (A)、CD86/CD163 の MFI 比の感作が暫定陽性 (Pos) 及び陰性 (Neg) と判定された群での比較 (B)、及び MFI 比に IL-4 濃度も乗じてスコアとしたものの Pos 群と Neg 群での比較 (C)。C のスコア値は統計学的有意差をもって Pos 群で高値。

4. ベリリウム取扱い工場勤務作業における血清中サイトカイン濃度 (29 種類)、KL-6、SP-D 及び ACE とともに、凍結保存 PBMCs より磁気分離後、再度、凍結保存した CD4 陽性細胞 (ヘルパー T 細胞) における遺伝子発現解析

改めて、ベリリウム取扱い工場作業において、上記で分類した感作の有無判定によって、29 種類のサイトカイン、及び臨床で利用されている肺の線維化のマーカーである KL-6 並びに SP-D、並びに放射線診断学的に時に鑑別が困難となる肺サルコイドーシスの血清指標である ACE (ACE の活動性肺病変において 80%以上で、高値となる¹⁴⁾) の測定を行った。

図 7 に示すように、KL-6 が感作有群で有意に高値、さらに ACE は感作有群で高値の傾向を示したものの、SP-D は有意差は認められなかった。なお、29 種類のサイトカインでは、いずれも感作の有無での差は認められなかった。

Be-LPD の検証にあたっては、その後、陰性、暫定陽性 (疑)、暫定陽性の 3 群に分ける指標が提示された。よって、改めて、3 群におけるサイトカインと、KL-6 などの血清線維化マーカーの検討を行った。

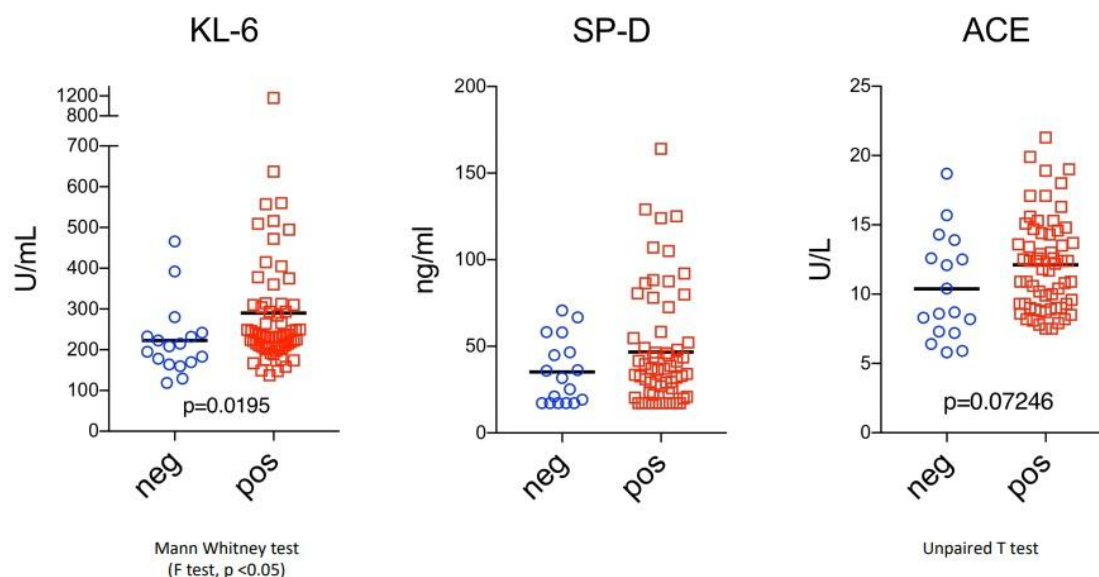


図 7 ベリリウム取扱い上場作業における血清 KL-6、SP-D 及び ACE の Be 感作の有無での比較。KL-6 は感作有群で有意に高値。なお、ACE は、感作有群で高値の傾向が示された。

その結果、図 8A で示すごとく、サイトカインでは IL-2 は、陰性群が暫定陽性（疑）群より優位に高値、腫瘍壊死因子（Tumor Necrosis Factor: TNF） α は、有意ではないものの、陰性群で低値の傾向が認められた。図 8B で示すように、KL-6 は、暫定陽性群が、他の 2 群より高値、SP-D でも、暫定陽性群が、陰性群より高値を示し、ACE は 3 群間での差は認められなかった。

この解析では、凍結保存 PBMCs より磁気分離後、再度、凍結保存した CD4 陽性細胞（ヘルパー T 細胞）における遺伝子発現解析を加味した。

ここまでの結果で、暫定陽性を検出する重回帰分析による公式策定を試みた。この場合に、図 9 で示すように、KL-6、SP-D および TNF α のそれぞれ対数変換値をもって、策定に当たった（なお、TNF α の場合には、PCR 法を用いた遺伝子発現であるので、対数表示は適切であろうと考えられるが、他の 2 項目については、臨床的にも、病態とは比較的にニアに変動する項目であり、対数表示の是非については、今後も検討する必要がある）。

その結果、図 9 に BeCS として表示するスコアが提示された。この ROC 曲線を描出してみると、AUC (Area under an ROC curve: 1.0 に近いほど、性能が高く、ランダムの場合に、すなわち、そのスコアを用いても診断的価値が無い場合には、0.5 となる) は、0.903 と十分に評価しうる値であった。

ただし、KL-6 単独でも、0.882 と十分に評価に耐える値であったことも付記せざるを得ない。

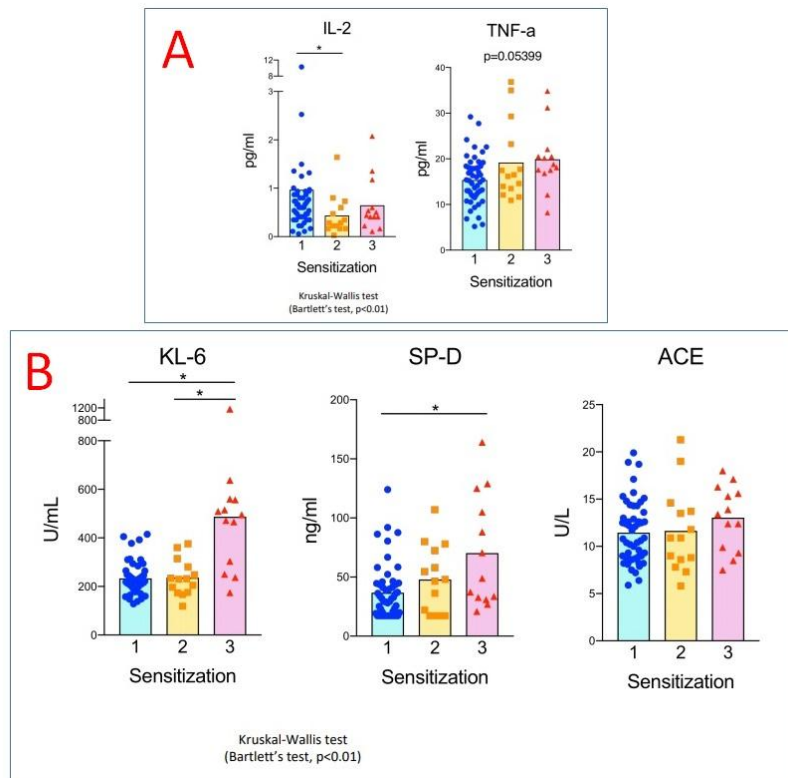


図 8 ベリリウム取扱い上場作業者のサイトカイン、KL-6、SP-D 及び ACE を感作の有無を 3 群（陰性・暫定陽性（疑）・暫定陽性）に分けて比較。

今回は、残念ながら IL-4 あるいは RORC、PD-1 遺伝子発現については、実験の精度の問題で、実施し得なかったものの、ヘルパー T 細胞が、Th1、Th2、制御性 T 細胞というそれぞれ役割の異なる亜画分への分化に重要な転写因子（それぞれ T-bet、GATA3 及び FoxP、さらにサイトカインとして、IL-2、TNF α 、CXCR3（ケモカイン受容体の一種）、IFN- γ について検討した。

しかし、感作の 3 群で発現度の有意差を示す因子は見つからなかった。

よって、暫定陽性が他の 2 群と有意差を示した KL-6 と、遺伝子発現 log10 変換値（PCR 法を用いるため対数表示も検証可能となる）との間での相関解析を実施した（図 10）。この場合に、遺伝子発現解析の中から抽出された因子は IFN γ であった。さらに、工夫を加えるために、遺伝子発現の中で、IFN γ との相関が強い因子として、TNF α も選択した。

そして、これらの因子（血清 KL-6、血清 SP-D、血清 TNF α 、及び CD4+T 細胞における IFN γ と TNF α の遺伝子発現）における主成分分析を実施した。

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)

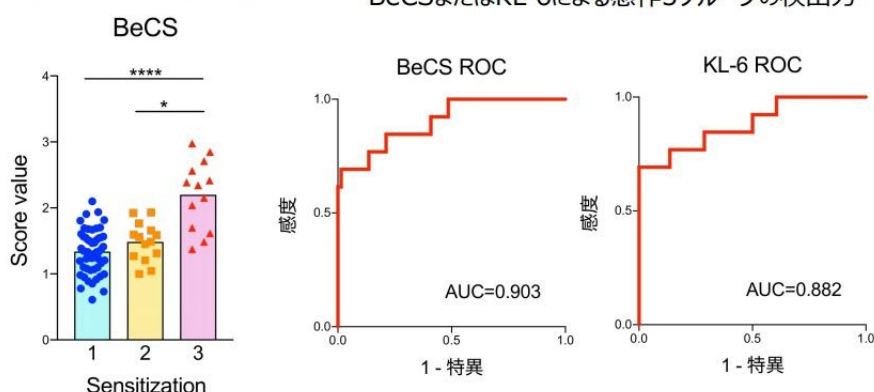


図 9 ベリリウム取扱い工場作業者を感作の度合いで 3 群に分け、暫定陽性群を他の 2 群と選別するスコアを構築。図中の BeCs では、ROC 曲線における AUC は 0.9 以上となり良好である。ただし、KL-6（対数値）単独でも良好な AUC 値となっている。

血清中KL-6濃度との相関解析

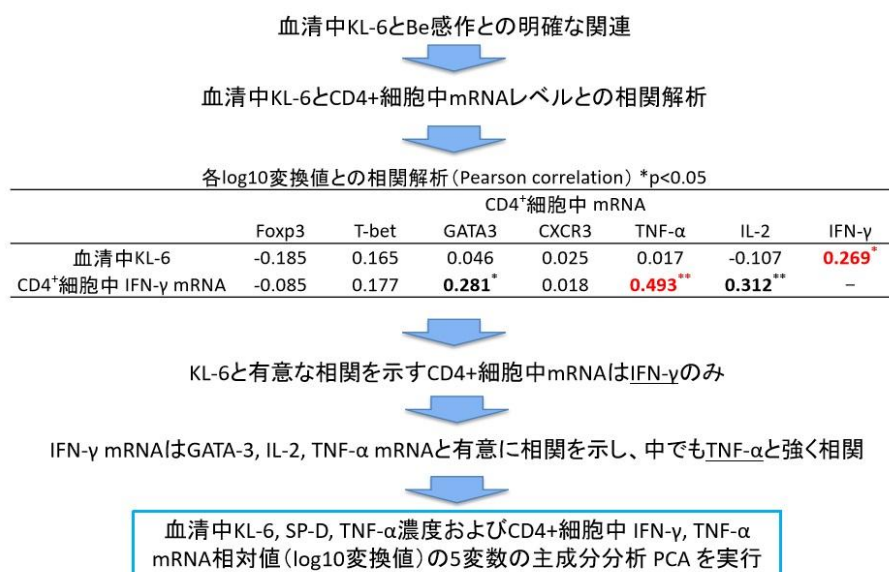


図 10 血清中 KL-6 濃度と CD4+T 細胞における遺伝子発現の相関から IFN γ の抽出。さらに、IFN γ との相関が強い TNF α を因子として抽出

PC1 成分と PC2 成分が「抽出されたが、その違いは、TNF α の遺伝子発現量が正方向 (PC1 の値を形成するのに、他の因子と同様、TNF α の遺伝子発現も高く向く方向になる) か負の方向かの違いであった (図 11)。

この PC1 及び PC2 を構築する数式に、各例の実測値を代入してみると、PC1 では、陰性群と、PC2 では、陰性及び暫定陽性 (疑) の 2 群との有意差をもって、高値を示した。この結果は、暫定陽性群の中に、TNF α 遺伝子発現の差によって分別される亜群の存在を示唆しており、それは、暫定陽性群の中での、CBD への進展の中で、CD4+T 細胞における TNF α 遺伝子発現の強弱によって、病態の変化が導かれる可能性がある。あるいは、前述の疲弊 T 細胞に移行していく中で、TNF α 発現が重要な因子となることを示唆しているのかも知れない。ただし、今回の T 細胞は、PBMCs としての凍結後に、解凍して分離、さらに実験スケジュールの都合で、再凍結後に再び解凍して遺伝子抽出を行ったため、今後は精度の高い分析が必要になってくると思われる。

また、図 12 に示すように、PC1 と PC2 で 2 次元プロットを行うと、オレンジ三角印の暫定陽性群の過半数が、他の 2 群あるいは、一部の暫定陽性群の例とは重複しない位置にプロットされた。

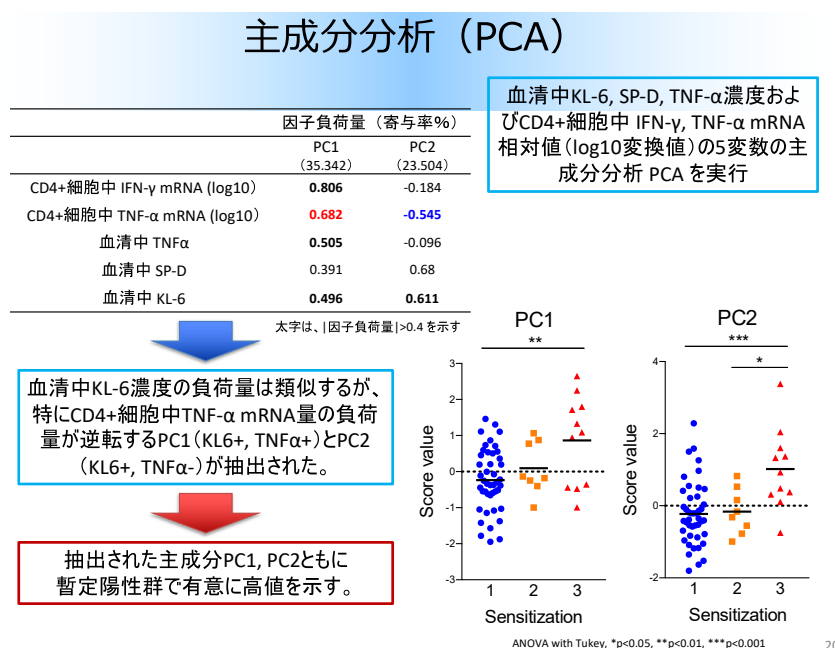
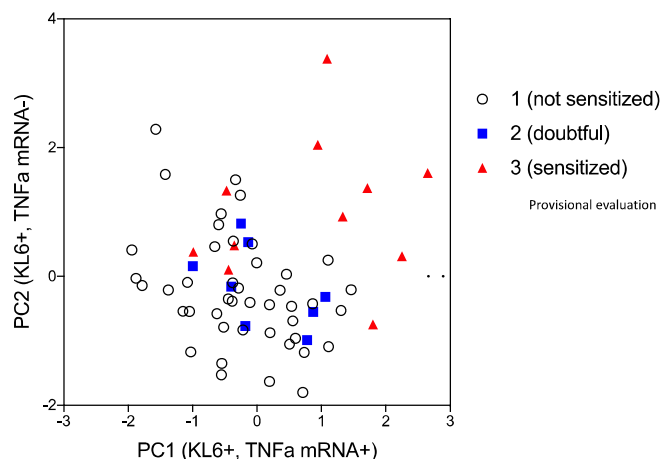


図 11 ベリリウム取扱い工場作業における 5 つの因子での主成分分析。PC1 と PC2 の 2 群が抽出された。違いは CD4+T 細胞での TNF α の遺伝子発現の負荷量の正負であるが、どちらの成分も暫定陽性群は高値を示した。

このことも、PC1 あるいは PC2 を導き出したスコアを暫定陽性として捉えることの有用性を示唆しているようである。ただし、やはり遺伝子発現検討自体の精度の問題もあり、新鮮 PBMCs を分離後すぐに遺伝子抽出する場合とは、異なってくる可能性もあるため、そう

いった実験的な精度向上もまた、課題である。

主成分PC2とPC3による散布図



PC2 (KL6+, TNFα mRNA-)とPC3 (KL6+, TNFα mRNA-)の2次元プロットは
暫定陽性群が明確に他と異なる集団であることを示す

21

図 12 PC1 (TNF α 遺伝子発現が正方向：すなわち、他の因子と同様に PC1 成分では TNF α の発現も高い方向を向く) と PC 2 (TNF α 遺伝子発現のみ負方向) で、感作の 3 群でプロットを実施すると暫定陽性群の過半数のみ他の 2 群とは異なる位置にプロットされる。

5. まとめ

今回の研究班では、ベリリウム取扱い工場作業員において、

- 1) 感作の有無についての放射性同位元素などを用いない新手法の開発とその精度管理
- 2) ベリリウムばく露に伴う免疫機能の解析と、感作から CBD 進展への免疫指標の抽出
- 3) 作業員におけるレントゲン像と低線量 CT を用いたスクリーニング検査の有用性の検討

といった、内容のうち、我々は 2) で提示されている部分を担った。

既にベリリウムについて報告されている中に、感作と CBD 発症の感受性因子として、HLA-DPB1 Glu69 が存在することが高い相関性を示しており、労働安全衛生総合研究所による研究結果もこれを支持する成果が得られている。さらに、TNF α の遺伝子多型については、感作の有無、あるいは感作ありから CBD への移行について、関連があったとする報告と、無かったとする報告の両者が認められている。

この点について、今回の我々の解析の最後に、TNF α の発現度合いが、暫定陽性群の中での、まだ不詳の亜群の存在を示唆する所見が得られたことと照合すると、TNF α の遺伝子多型などの中で、発現度に影響するもの、あるいは、日本人によっては、HLA-DPB1 Glu69 の存在の上で、TNF α の多型によって、感作に対して抑制的に働くものと、促進的に作用す

るものと混在している可能性もある。

なお、HLA を含めた遺伝情報について、それによって職業選択の自由を排除するものではないが、例えば、がん治療においては、ゲノム情報を有効に利用することで、テーラーメイド治療、個別化治療などと呼ばれる、症例一人ひとりで異なった治療戦略、薬剤選択を推進する方向が定まってきた¹⁵⁾。さらに、がん治療のみならず、出生前診断、あるいはゲノム編集技術による疾病治療などの包括的なゲノム医学において、「自民党や国民民主党など野党の超党派でつくる「適切な遺伝医療を進めるための社会的環境の整備を目指す議員連盟」（会長・尾辻秀久元厚生労働相）が、DNA に含まれる遺伝情報に基づきがんなどの最適な治療を行う「ゲノム医療」を推進するための議員立法を検討している」とのとの報道もなされている（読売新聞 WEB ニュース 2019 年 3 月 14 日）。

しかし、現状においては遺伝情報を以って、職業選択の自由を奪うことは、倫理的に合意が得られていないため、では、ベリリウム取扱い工場作業員においてどのような健診における経過観察が必要であろうか。また、一般的な慢性中毒ではなく（この場合には、量・影響曲線も、量・反応曲線も、S 字カーブは呈するものの、ある程度ばく露量と並行して動く）、感作の場合には、量の蓄積ではなく、比較的少量ばく露であっても、素因を有する人は感作を受けてしまうことが想定され、また、その割合は、量・反応曲線でも、100%まで達することはなく、一定の割合（因子を有している人数の割合）で固定される可能性がある。

このため、以下の手順が必要ではないだろうか。さらに、その手順の確定には、以下に記載のごとく、いくつかの課題が抽出され、かつ、解決を待っていると思われる。

1) ばく露から定期的（半年から 1 年）の BeLPD 検査

- ① この場合に、その手法の安全性（放射性同位元素を使用しない）や精度の向上を目指す、今回の研究班のような取組の継続性が重要。
- ② 明瞭なカットオフ値を得られる手法がベター

2) 感作が確実な症例において、管理区分 3 として職場転換を勧奨すべきか否か

- ① この場合に、CBD への移行へのバイオマーカーの確定が必須。
 - [1] KL-6 は今回の検討で、レントゲン診断上（低線量 CT）の肺線維化の確証の前でも動きが出る可能性がある（少なくとも正常上限を超えるか？）。
 - [2] あるいは KL-6 は、正常範囲内であっても絶対値としての推移が、マイクロレベルで生じてきている肺・線維化の進展を予測させるか？
- ② 候補バイオマーカーとして、血清 IL-4、単球膜表面の CD86 及び CD163 の有効性の検討が必要
- ③ TNF α がマーカー候補となるか？
- ④ レントゲンによるスクリーニングの時期を KL-6 あるいは IL-4 などのバイオマーカー候補（特異 KL-6 の場合には正常範囲内の推移であっても）の利用で、長短を決めることが可能か？

- 3) 何をもって CBD の確定診断とし、職場転換を義務付けるか？
 - ① CT 所見を含む画像診断
 - ② IL-4 や KL-6 などの持続的な上昇
 - ③ TNF α が CBD 発症後のマーカーとなるか？
 - ④ 単球の CD86 及び CD163 も進展のマーカーとなるか？
- 4) CBD 確定後、職場転換した上で、ベリリウムばく露起因性の肺がんの発症について、どのようにフォローアップするか？
 - ① 上記と同様に、画像・IL-4 や TNF α などのサイトカイン、単球の表面マーカー、及び、通常の肺がんの腫瘍マーカー（腺がんなら CEA、扁平上皮癌なら CYFRA など）の組合せか？
 - ② ベリリウム惹起肺がんの細胞学的特性はどうか？
 - ③ 最初のばく露からどの程度の年数の経過観察を必要とするのか？

今回の研究課題は、感作を惹起するという通常の慢性ばく露による慢性中毒とは異なる概念のばく露による疾病の免疫病態さらに感作検出手法や画像診断を多面的に観察したものと思われるが、まだまだ課題も多い。取扱い工場作業者の健康を衛り、疾病発症を予防する観点からも、更に詳細で多視点の観察や実験的な検討が必要となるであろう。

引用

- 1) Engel P, Gribben JG, Freeman GJ, Zhou LJ, Nozawa Y, Abe M, Nadler LM, Wakasa H, Tedder TF. The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen. *Blood*. 1994;84:1402-7.
- 2) Angeloni D1, Danilkovitch-Miagkova A, Ivanov SV, Breathnach R, Johnson BE, Leonard EJ, Lerman MI. Gene structure of the human receptor tyrosine kinase RON and mutation analysis in lung cancer samples. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000 Oct;29(2):147-56.
- 3) Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M, Akiyama M. New serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6. *Chest*. 1989 Jul;96(1):68-73.
- 4) Persson A, Chang D, Crouch E. Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem*. 1990 Apr 5;265(10):5755-60.
- 5) Huggins CG, Thampi NS. A simple method for the determination of angiotensin I converting enzyme. *Life Sci*. 1968 Jun 15;7(12):633-9.
- 6) Schreier MH, Tees R, Nordin AA, Benner R, Bianchi AT, van Zwieten MJ. Functional aspects of helper T cell clones. *Immunobiology*. 1982 Mar;161(1-2):107-38
- 7) Biswas SK1, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010 Oct;11(10):889-96. doi: 10.1038/ni.1937.

- 8) van den Bosch TP1, Caliskan K2, Kraaij MD1, Constantinescu AA2, Manintveld OC2, Leenen PJ3, von der Thüsen JH4, Clahsen-van Groningen MC4, Baan CC1, Rowshani AT1. CD16+ Monocytes and Skewed Macrophage Polarization toward M2 Type Hallmark Heart Transplant Acute Cellular Rejection Front Immunol. 2017 Mar 24;8:346. doi: 10.3389/fimmu.2017.00346.
- 9) Li L, Hamzeh N, Gillespie M, Elliott J, Wang J, Gottschall EB, Mroz PM, Maier LA. Beryllium increases the CD14(dim)CD16+ subset in the lung of chronic beryllium disease. PLoS One. 2015 Feb 17;10(2):e0117276. doi: 10.1371/journal.pone.0117276.
- 10) Balmes JR, Abraham JL, Dweik RA, Fireman E, Fontenot AP, Maier LA, Muller-Quernheim J, Ostiguy G, Pepper LD, Saltini C, Schuler CR, Takaro TK, Wambach PF; ATS Ad Hoc Committee on Beryllium Sensitivity and Chronic Beryllium Disease. An official American Thoracic Society statement: diagnosis and management of beryllium sensitivity and chronic beryllium disease. Am J Respir Crit Care Med. 2014 Nov 15;190(10):e34-59. doi: 10.1164/rccm.201409-1722ST.
- 11) Beryllium and beryllium compounds. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum. 1980;23:143-204.
- 12) Hollins DM, McKinley MA, Williams C, Wiman A, Fillos D, Chapman PS, Madl AK. Beryllium and lung cancer: a weight of evidence evaluation of the toxicological and epidemiological literature. Crit Rev Toxicol. 2009;39 Suppl 1:1-32. doi: 10.1080/10408440902837967.
- 13) Boffetta P, Fryzek JP, Mandel JS. Occupational exposure to beryllium and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. Crit Rev Toxicol. 2012 Feb;42(2):107-18. doi: 10.3109/10408444.2011.631898.
- 14) Lieberman J. Enzymes in sarcoidosis. Angiotensin-converting-enzyme (ACE). Clin Lab Med. 1989 Dec;9(4):745-55.
- 15) 国立がん研究センター がん情報サービス
WEBhttps://ganjoho.jp/public/dia_tre/treatment/genomic_medicine/genmed02.html

3年間の研究を通じた総括所見

岸本卓巳、上島通浩

慢性ペリリウム症は類上皮細胞肉芽腫を主徴とする職業性疾病である。慢性ペリリウム症はペリリウムに対する感作に端を発するため、量-反応関係が明瞭なじん肺症などとは異なり、ごく微量のペリリウムばく露によっても発症する可能性がある。一方で、本物質を扱う作業者の健康管理方法については簡便で有効な方法が少ないのが現状である。

本研究において、我々は簡便かつ精度よくペリリウム感作を検出できる手法として、アラマブルー法によるリンパ球幼若化試験 (Be-LPT) を新たに考案した。平成 30 年度は、当該手法を、過去及び現在ペリリウムにばく露した作業者 79 名に対して Be-LPT を実施し、13 名の暫定陽性と、14 名の暫定陽性 (疑)、52 名の陰性の結果を得た。また、ペリリウム感作に関連する遺伝子 HLA-DPB1 E69 について検討したところ、上述の BeLPT 暫定陽性者における HLA-DPB1 E69 遺伝子保有率は 100%であった。これら 13 名のうち低線量胸部 CT 上で所見がなかったのはわずか 1 名のみであり、その他 12 名には肺ならびに縦隔肺門リンパ節に注意の必要な所見を認めた。その内訳は、すりガラス影 5 名、粒状影 8 名、リンパ節腫大 7 名であった。これら 3 所見については Be-LPT 暫定陽性者においては陰性者に対して有意に多い所見であるとともに、慢性ペリリウム症に特徴的な所見である。これら 12 名中 2 名は既に慢性ペリリウム症と診断をうけており、その他の 10 名のうち 7 名については要精査と判断した。要精査と判断した根拠として前述のすりガラス影、粒状影、リンパ節腫大の所見を重要視した。また、これら 79 名の末梢血免疫担当細胞、血清サイトカイン、線維化マーカーとしての KL-6、SPD 等の結果については、アラマブルー法による Be-LPT 陽性者では KL-6 が高値を示した。KL-6、SP-D、TNF α を独立変数とした感作との重回帰分析では、Area under an ROC curve (AUC) が 0.903 と十分高い結果が得られた。

平成 29 年のペリリウム取扱作業者は 130 事業所、849 名であることが報告されており、多くの労働者における労働衛生上の課題である。慢性ペリリウム症は、胸部 CT において上述のすりガラス影あるいは粒状影が徐々に進展して、強い線維化病変である蜂窩肺あるいは牽引性気管支拡張を来して最後には慢性呼吸不全を来す疾病である。そのため、早期診断かつ早期治療、そして職場における事後措置が重要である。

慢性ペリリウム症早期診断のためにアラマブルー法による Be-LPT 検査、血清 KL-6 測定とともに胸部低線量 CT 撮影を併用することは有用な健康診断項目ではないかと考えられる。