



A simple quantitative analysis of asbestos body using the sediment of formalin injected into surgically resected lung cancers

酒井, 康裕

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-01-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3085

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003085>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	酒井 康裕
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 3085 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	平成 22 年 1 月 12 日

【 学位論文題目 】

A simple quantitative analysis of asbestos body using the sediment of formalin injected into surgically resected lung cancers (原発性肺癌切除例で伸展固定のために肺内注入したホルマリンの沈渣を使ったアスベスト小体の簡易計測方法の検討)

審 査 委 員

主 査	教 授	伊藤 智雄
	教 授	西尾 久英
	准教授	西村 善博

A simple quantitative analysis of asbestos body using the sediment of formalin injected into surgically resected lung cancers

原発性肺癌切除例で伸展固定のために肺内注入したホルマリンの沈渣を
使ったアスベスト小体の簡易計測方法の検討

(指導教員：神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻病理学講座がん病理学

分野 大林千穂教授)

酒井 康裕

背景・目的

特に1960年以降の高度経済成長に伴うアスベストの使用量の増加に並行して、20～40年後の現在、日本ではアスベスト関連肺癌や悪性中皮腫が増加しつつある。2005年のいわゆるクボタショックによって、悪性中皮腫とアスベスト曝露の関係が広く知れ渡ることとなり、2006年日本政府は石綿による健康被害の救済に関する法律（以下救済法）を施行して、アスベスト曝露歴の不明確な労働者ないし元労働者、アスベスト関連工場の近隣住民に対しても、アスベスト関連健康被害の補償対象とした。その後、補償の申請者が年々急増している。

アスベスト関連肺癌の患者が補償を申請するには、可能な限り肺組織内のアスベスト濃度の計測証明書が必要であるが、吸引濾過法と濾過膜の位相差顕微鏡観察を用いた高度な技術（以下溶解法）を要するため、限られた医療機関でしか行われておらず患者には不便である。

市中医療機関でも日常業務として実施可能であることに主眼を置いたこの研究では、我々は肺癌外科的切除材料の伸展固定のために肺内注入したホルマリンの沈渣を用いてアスベスト小体の簡易な計測方法（以下沈渣法）を実施し、溶解法との相関関係を検討した。

方法

10%中性緩衝ホルマリンを用いて伸展固定した原発性肺癌連続 88 症例を対象に、切り出し時に手で搾り取ったホルマリン 10~50ml と 1~3cm² かつ 5mm 厚の湿肺組織 (1~3g) をサンプルとした。

我々の沈渣法では、まず採取したホルマリン 50ml の沈渣に対して、医療器具用洗剤であるクリーン 99-K200 (30%次亜塩素酸ナトリウム、4%水酸化カリウム、界面活性剤を含む) を 50ml (未消化の場合、適宜増量可) 加えて凝集赤血球やマクロファージ等を一晚室温で消化した。セルロース混合エステル型濾過膜 (孔径 0.8μm、膜径 25mm) を用いた吸引濾過システムで、消化液をそのまま濾過し、濾過膜を乾燥後半切し、スライドガラスに裏返して乗せ、数滴のアセトンで湿らせ貼り付けてから封入し、スライドガラスの裏から光学顕微鏡対物 100 倍で濾過膜上のアスベスト小体数を数えた。ホルマリン 1ml あたりのアスベスト小体数 ($C_{AB/SED}$) を算出した。

一方、溶解法では細切した湿肺組織を 110°C、2~4 時間で乾燥後、30ml のクリーン 99-K200 を加え (湿肺組織が 2g を超える場合は 15ml/g 増量)、60°C、4~10 時間で消化した。消化液の遠心分離後の沈渣に対して 30ml の蒸留水を加えて攪拌し、遠心して再び沈渣を得るといった洗浄操作を 3 回施行し、最後に蒸留水 50ml を加えて定容液を作製した。定容液 5ml (稀に 2ml) を蒸留水 20~40ml で希釈後、セルロース混合エステル型濾過膜を用いた吸引濾過システムで濾過し、濾過膜を 40°C、2 時間以上で乾燥した。半切し裏返してス

ライドガラスに乗せ、アセトン蒸圧で貼り付け透明化し、封入後スライドガラスの裏から位相差顕微鏡対物 400 倍で濾過膜上のアスベスト小体数を数えた。乾燥肺組織 1g あたりのアスベスト小体数 ($C_{AB/DLT}$) 及び 1 本のアスベスト小体が検出された場合の濃度 (検出下限値、DL) を算出した。

結果

対象 88 症例の臨床病理学的データは、性別は男 60 人、女 28 人で全員アジア人、年齢は 67.4 ± 17.6 歳 (40~50 歳代が 16 人、60 歳代が 31 人、70 歳代が 34 人、80 歳代が 7 人)、喫煙者ないし元喫煙者は 61 人、非喫煙者は 27 人、アスベストの職業曝露歴は有りが 11 人、無しが 77 人、組織型は腺癌が 57 件、扁平上皮癌が 18 件、大細胞癌ないし大細胞神経内分泌癌が 7 件、その他 6 件、TNM 進行期は 0~I 期が 65 件、II 期が 11 件、III~IV 期が 12 件、発生部位は右上葉 27 件、右中葉 8 件、右下葉 18 件、左上葉 23 件、左下葉 12 件であった。喫煙歴の有る男性が統計学的に有意に多く、アスベストの曝露歴が有る患者は、全員男性で喫煙者ないし元喫煙者であった。年齢、組織型、TNM 進行期、発生部位については、アスベストの職業曝露、喫煙歴の有無でその度数分布に統計学的有意差はなかった。

$C_{AB/SED}$ は 0.68 ± 3.60 /ml、 $C_{AB/DLT}$ は 3191 ± 40790 /g 乾燥肺組織、DL は 145 ± 165 /g 乾燥肺組織であったが、1 例 $C_{AB/DLT}$ が 3637 /g 乾燥肺組織にも拘らず

$C_{AB/SED}$ が 0 /ml であり、逆に 1 例は $C_{AB/SED}$ が 5.24 /ml にも拘らず $C_{AB/DLT}$ が 0 /g 乾燥肺組織であった。男性は女性に比べて $C_{AB/SED}$ (男 0.99 ± 4.23 /ml、女 0.02 ± 0.10 /ml)、 $C_{AB/DLT}$ (男 4534 ± 49297 /g 乾燥肺組織、女 314 ± 688 /g 乾燥肺組織) 共に統計学的に有意に高値であった。相対的により高齢の患者 (40-50 歳代 0.02 ± 0.11 /ml、60 歳代 0.70 ± 2.86 /ml、70 歳代 0.87 ± 4.60 /ml、80 歳代 1.16 ± 4.91 /ml) や有喫煙歴の患者 (有 0.98 ± 4.20 /ml、無 0.02 ± 0.10 /ml) は、 $C_{AB/SED}$ は統計学的に有意に高値であったが、 $C_{AB/DLT}$ では有意差が出なかった。アスベストの職業曝露歴や組織型、TNM 進行期、発生部位の各因子内では $C_{AB/SED}$ 、 $C_{AB/DLT}$ 、DL に統計学的な有意差はなかった。

労災及び救済法でアスベスト曝露による肺癌の判断基準となる、アスベスト小体数 5000 /g 乾燥肺組織を境界とすると、それ以上のときは $C_{AB/SED}$ は 4.60 ± 6.42 /ml、それ未満のときは 0.46 ± 2.85 /ml であり、両者に統計学的有意差が認められた。またアスベスト曝露の可能性が有る 1000~5000 /g 乾燥肺組織の中間値である 3000 /g 乾燥肺組織を境界とすると、それ以上のときは $C_{AB/SED}$ は 3.48 ± 7.36 /ml、それ未満のときは 0.29 ± 1.65 /ml であり、同様に両者に統計学的有意差が認められた。特に $C_{AB/SED}$ が 3.5 /ml 以上の場合は、 $C_{AB/DLT}$ が 3000 /g 乾燥肺組織以上である可能性が高かった。

$C_{AB/SED}$ と $C_{AB/DLT}$ の全相関係数は 0.4576 で、統計学的に有意な弱い相関を示した。特にアスベスト曝露歴の有る患者では相関係数は 0.7341 であった。

考察

性別による $C_{AB/SED}$ と $C_{AB/DLT}$ の統計学的有意差は、アスベストの職業曝露歴者が全員男性であったことを除いても、肺癌発症までの間、男性は女性よりも非職業性ないし低濃度のアスベスト曝露をより多く受けていることを示唆している。相対的により高齢の患者や有喫煙歴患者において $C_{AB/SED}$ だけに統計学的有意差が出た理由として、有喫煙歴者に高齢者が多かったことと共に、曝露当時に流通していたアスベストの種類が関係していると推定された。すなわち、高齢者ほどアスベスト小体を形成しやすいクロシドライトやアモサイトへの曝露の可能性が高く、その結果光学顕微鏡でもアスベスト小体を計測しやすい一方で、若年者ほどアスベスト小体を形成しにくいクリソタイルへの曝露の可能性が高く、位相差顕微鏡による計測を要するためと思われた。

沈渣法と溶解法の相関関係があまり強くない理由として、 $C_{AB/SED}$ と $C_{AB/DLT}$ の強い離開のある症例が存在したことが挙げられ、さらなる分析が必要であるが、主な理由として 1) 検者が手で絞ってホルマリンを収集するときの時期、強さ、量の相違 (絞り始めより絞り終わり方が、また絞り方が弱いよりは強い方が、より多くのアスベスト小体が含まれているかもしれない。)、2) 湿肺組織の採取部位の相違 (アスベスト小体やアスベスト繊維の分布は、同じ業内でさえも異なるという報告がある。)、3) 曝露したアスベストの種類相違

(アスベスト小体の形成や体外排泄のしやすさの違い)、4) アスベスト曝露からの経過時間の相違(体外排泄)が推定された。溶解法は主に限局した肺組織内のアスベスト小体数を反映する一方で、沈渣法は溶解法より広範囲の肺組織が対象となるものの、気腔内だけのアスベスト小体数を反映しているという違いもある。それ故に、沈渣法と溶解法の高い相関係数を得ることは難しいかもしれないが、補償申請にアスベスト濃度の計測証明書を要する、アスベストの職業曝露歴の有る患者においては0.7341であり、安価で実用的な沈渣法は有用と言えよう。

アスベストの職業曝露の可能性を患者が自己評価する方法は十分ではないことやアスベスト関連健康被害の一部は非職業性曝露によることを考慮すると、沈渣法は有意なアスベスト曝露を検出するスクリーニング法としても有用であるかもしれない。 $C_{AR/SED}$ が3.5 /mlを超える場合は、 $C_{AR/DLT}$ が3000 /g乾燥肺組織を超える可能性が高い。それは一定以上の累積アスベスト曝露を示唆しており、その時は費用と労力がかかるものの、患者に専門機関での溶解法による計測を薦める指標となるかもしれない。

日本では今後40年の間におよそ10万人の悪性胸膜中皮腫による死亡が推測されている。アスベスト関連肺癌も今後増加していくと思われる。我々の開発した沈渣法の様な、アスベスト小体の簡易計測方法が確立されるべきである。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	乙 第 2066号	氏 名	酒 井 康 裕
論 文 題 目 Title of Dissertation	A simple quantitative analysis of asbestos body using the sediment of formalin injected into surgically resected lung cancers 原発性肺癌切除例で伸展固定のために肺内注入したホルマリンの沈 渣を使ったアスベスト小体の簡易計測方法の検討		
審 査 委 員 Examiner	主 査 伊藤 智雄 Chief Examiner 副 査 西尾 久英 Vice-examiner 副 査 西村 善博 Vice-examiner		

日本ではアスベスト関連肺癌や悪性中皮腫が増加しつつある。アスベスト関連肺癌の患者が補償を申請するには、可能な限り肺組織内のアスベスト濃度の計測証明書が必要であるが、吸引濾過法と濾過膜の位相差顕微鏡観察を用いた高度な技術（以下溶解法）を要するため、限られた医療機関でしか行われておらず患者には不便である。申請者は肺癌外科的切除材料の伸展固定のために肺内注入したホルマリンの沈渣を用いてアスベスト小体の簡易な計測方法（以下沈渣法）を実施し、溶解法との相関関係を検討した。

中性緩衝ホルマリンを用いて伸展固定した原発性肺癌連続 88 症例を対象に、切り出し時に手で搾り取ったホルマリン 10～50ml と 1～3cm² かつ 5mm 厚の湿肺組織（1～3g）をサンプルとした。まず採取したホルマリン 50ml の沈渣に対して、クリーン 99-K200 を 50ml（未消化の場合、適宜増量可）加えて凝集赤血球やマクロファージ等を一晚室温で消化した。セルロース混合エステル型濾過膜（孔径 0.8μm、膜径 25mm）を用いた吸引濾過システムで、消化液をそのまま濾過し、濾過膜を乾燥後半切し、スライドガラスに裏返して乗せ、数滴のアセトンで湿らせ貼り付けてから封入し、スライドガラスの裏から光学顕微鏡対物 100 倍で濾過膜上のアスベスト小体数を数えた。ホルマリン 1ml あたりのアスベスト小体数（CAB/SED）を算出した。

一方、溶解法では細切した湿肺組織を 110℃、2～4 時間で乾燥後、30ml のクリーン 99-K200 を加え（湿肺組織が 2g を超える場合は 15ml/g 増量）、60℃、4～10 時間で消化した。消化液の遠心分離後の沈渣に対して 30ml の蒸留水を加えて攪拌し、遠心して再び沈渣を得るといった洗浄操作を 3 回施行し、最後に蒸留水 50ml を加えて定容液を作製した。定容液 5ml（稀に 2ml）を蒸留水 20～40ml で希釈後、セルロース混合エステル型濾過膜を用いた吸引濾過システムで濾過し、濾過膜を 40℃、2 時間以上で乾燥した。半切し裏返してスライドガラスに乗せ、アセトン蒸圧で貼り付け透明化し、封入後スライドガラスの裏から位相差顕微鏡対物 400 倍で濾過膜上のアスベスト小体数を数えた。乾燥肺組織 1g あたりのアスベスト小体数（CAB/DLT）及び 1 本のアスベスト小体が検出された場合の濃度（検出下限値、DL）を算出した。

その結果、労災及び救済法でアスベスト曝露による肺癌の判断基準となる、アスベスト小体数 5000 /g 乾燥肺組織を境界とすると、それ以上のときは CAB/SED は 4.60 ± 6.42 /ml、それ未満のときは 0.46 ± 2.85 /ml であり、両者に統計学的有意差が認められた。またアスベスト曝露の可能性が有る 1000～5000 /g 乾燥肺組織の中間値である 3000 /g 乾燥肺組織を境界とすると、それ以上のときは CAB/SED は 3.48 ± 7.36 /ml、それ未満のときは 0.29 ± 1.65 /ml であり、同様に両者に統計学的有意差が認められた。特に CAB/SED が 3.5 /ml 以上の場合は、CAB/DLT が 3000 /g 乾燥肺組織以上である可能性が高かった。CAB/SED と CAB/DLT の全相関係数は 0.4576 で、統計学的に有意な弱い相関を示した。特にアスベスト曝露歴の有る患者では相関係数は 0.7341 であった。

アスベストの職業曝露の可能性を患者が自己評価する方法は十分ではないことやアスベス

ト関連健康被害の一部は非職業性曝露によることを考慮すると、沈渣法は有意なアスベスト曝露を検出するスクリーニング法としても有用である可能性がある。

以上、本研究は、アスベスト小体の簡易計測法について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったアスベスト小体のスクリーニング法の開発に関して重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。