

2. 職業的暴露（印刷業）による胆管・胆道癌の病理学的特徴および推定発癌メカニズムの解析

研究分担者 中沼安二（静岡県立がんセンター 病理診断科）
久保正二（大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵外科学）
研究協力者 佐藤保則（金沢大学医薬保険研究域医学系・形態機能病理学）
木下正彦（大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵外科学）

研究要旨

1, 2-ジクロロメタンとジクロロメタンに長時間、高濃度暴露をうけた印刷労働者において発症した胆管癌 17 症例の病理学的検討を行った。その結果、17 例は腫瘍形成型肝内胆管癌、胆管内発育型肝内胆管癌、乳頭型肝外胆管癌のいずれかに分類され、17 例全例で、総肝管から肝内第三次分枝までの比較的大型の胆管が原発部位と考えられた。8 例の手術症例の検索を行ったが、全例の肝内大型胆管で Biliary intraepithelial neoplasia (BilIN)-2/3 が認められた。また、胆管周囲付属腺にも BilIN-2/3 病変が認められた。また、大型胆管を観察し得た 7 例において、胆管内に Intraductal neoplasm of the bile duct (IPNB) が認められ、明らかに IPNB からの浸潤性病変も認められた。一般の胆管癌あるいは肝内結石症に合併する胆管癌例に比べ、IPNB が高率にみられたことが、特徴の 1 つと考えられる。これらの所見から先行病変 (BilIN、IPNB) を経過した多段階発癌過程を経ることが示唆された。

次いで、免疫組織化学的な方法で、CYP2E1 経路、GST T1-1 経路に関連する酵素の発現をヒト組織 (正常および胆管癌)、ラット組織、マウス組織で検討した。その結果、CYP2E1 は、ヒト、ラット、マウスの肝細胞でコンスタントに発現し、胆道系では、胆管周囲付属腺と胆嚢上皮にわずかな発現がみられたが、肝内外の胆管上皮には発現が見られなかった。また、職業性胆管癌症例の胆管異型上皮である BilIN や胆管癌にも、CYP2E1 の発現が見られなかった。一方、GST T1-1 の発現は、ヒト、ラット、マウスの肝細胞および肝内外の胆管上皮で明瞭な発現が見られ、胆管周囲付属腺にも発現がみられた。ヒトとマウスでは、胆嚢上皮にも発現がみられた。また、職業性胆管癌症例の BilIN や胆管癌にも発現が見られた。胆管系には CYP2E1 の発現はなく GST T1-1 が分布しているので、肝門部胆管や肝内大型胆管が、高濃度で流入して来た DPC や DCM に曝露し、ここに局在する GST T1-1 が発癌性や遺伝子障害作用のある中間代謝産物が形成され、胆管癌の発生に関連したと思われる。

さらに、 γ -H2AX の免疫染色を行ったが、職業性胆管癌症例の BilIN および IPNB、および非腫瘍性の障害胆管上皮で、高率に γ -H2AX の発現が認められた。一方、肝内結石症での障害胆管や BilIN 病変では発現がみられなかった。このことから、職業性胆管癌症例では、発癌に先行して、DNA 障害が高率、広汎に発生し、発癌に関連していることと考えられた。

これらの結果、広範囲の胆管に DNA 障害がみられ、その広範囲の胆管から BilIN や IPNB

などの前癌病変が発生、さらに進行胆管癌に進展していく多段階発育を示すことが特徴であると考えられた。

A. 研究目的

最近、大阪の某印刷所のオフセット校正印刷部門の従業員で、塩素系有機溶剤である1,2-ジクロロメタン 1,2-dichloropropane (1,2-DCP) と ジ ク ロ ロ メ タ ン dichloromethane (DCM)に長時間、高濃度暴露を受けた印刷労働者において胆管癌が多発していたことが報告された。いずれも 50 歳以前の発症であり、1,2-DCP と DCM ばく露に関連した労務災害の可能性が強く示唆されている。これら症例の病理学的な特徴および発癌への関与が推定されている1,2-DPC と DCM の胆管癌発癌機序に関して検討した。

B. 研究方法

大阪の印刷事業場 S 社従業員にみられた胆管癌 17 例の切除標本および病理解剖標本の病理学的検討を行い、同時に臨床的検討の結果を勘案し、胆管癌発癌機序を推定した。

C. 研究結果

1. 胆管癌の病理

1) 病理形態 画像や外科切除材料を考慮すると、17 例は腫瘤形成型肝内胆管癌、胆管内発育型肝内胆管癌、乳頭型肝外胆管癌のいずれかに分類され、17 例全例で、総肝管から肝内第三次分枝までの比較的大型の胆管が原発部位と考えられた。病理組織像の検索し得た 16 例では、いずれも浸潤性の

管状腺癌がみられた。さらに後述する様に前癌病変あるいは前浸潤性の病変が同時に認められ、これらの病変が先行した可能性が高い。

2) 前癌病変、前浸潤性病変: BiLIN/IPNB

慢性胆管障害に発生する胆管癌症例では、intraductal papillary neoplasm (IPNB) および平坦型の異型病変である胆管上皮内異型病変 intraepithelial biliary neoplasm (BiLIN) の 2 種類の前癌病変、前浸潤性病変が知られている。今回の検討で、8 例の手術症例の検索を行ったが、全例で肝内大型胆管に BiLIN-2/3 病変が認められた。また、胆管周囲付属腺にも BiLIN-2/3 病変が認められた。また、大型胆管を観察し得た 7 例において、胆管内に IPNB が認められ、明らかに IPNB からの浸潤性病変も認められた。一般の胆管癌あるいは肝内結石症に合併する胆管癌例に比べ、IPNB が高率にみられたことが、特徴の 1 つと考えられる。

今回の、印刷所に多発した胆管癌は、これらの先行病変を経過した多段階発癌過程を経ることが示唆された。

3) 背景病変としての慢性胆管傷害

大阪印刷所に多発した胆管癌症例の 17 例中 5 例で、主腫瘍とは無関係な限局性胆管拡張像がみられ、これらの像は原発性硬化性胆管炎 に類似していた。肝内の大型胆管を観察し得た症例では、高率に胆管周囲線維化および胆管上皮傷害像がみられた。

この像は、肝門部胆管癌、肝外胆管癌症例にみられる肝側の二次的な胆管傷害の程度を超えたものと理解された。そして、胆管癌発生以前から、すでに画像で胆管傷害像がみられるので、原因と推定されている塩素系有機溶剤による胆道傷害の可能性があり、胆管癌発生に先行した可能性がある。

なお、肝実質には、二次的な傷害である胆汁うっ滞や非特異的な線維化が見られたが、肝硬変や慢性肝実質傷害は見られなかった。また、小葉間胆管や細胆管などの肝内小型胆管には著変は見られなかった。

2. ジクロロメタン、ジクロロプロパンの関与

1) DCM および DCP の代謝経路

DCM の代謝は cytochrome P450 (CYP) 2E1 (CYP2E1) 経路 および theta-class glutathione S-transferase (GST) T1-1 (GST T1-1) 経路により、主に肝実質細胞である肝細胞で行われる。まず、CYP2E1 経路が利用される、CYP 経路が飽和するような高濃度のばく露の条件下で、初めて GST T1-1 経路が活性化し、DCM が代謝される。CYP2E1 経路では、発がん性のある中間体産物は産生されないが、GST T1-1 代謝過程では、反応性の高い中間代謝産物であるホルムアルデヒドと S-クロロメチルグルタチオンが産生され、これらが遺伝子障害あるいは発癌に関連するとされている。従って、GST T1-1 が発癌に関連するとされている。

一方、DPC の代謝に関しては、酸化代謝

や CYP2E1 経路を介した代謝が関与することが知られているおり、1, 2-DPC の代謝においても、DCM と同じく GST T1-1 経路の関与が推定されている。

2) 胆管癌発生の推定機序

a. なぜ、胆管癌の多発なのか

大阪の印刷所での DCM、DPC への高濃度、長期間ばく露で、胆管癌が多発したが、肝細胞癌やその他の悪性腫瘍の多発は知られていない。上述の如く、DCM, 1, 2-DPC を代謝する酵素である CYP2E1 や GST T1-1 と胆管癌多発との関連性は不明である。もし、肝細胞で代謝される過程で発生した、反応性の高い中間代謝産物であるホルムアルデヒドと S-クロロメチルグルタチオンが胆汁中に排泄されると仮定しても、これらの物質を高濃度に含むであろう胆汁に最初に曝露する細胆管や肝内小型胆管に著明な障害がなく、むしろ上述の如く、肝内大型胆管に高度の障害が出現している。また末梢型の肝内胆管癌の発生も、今回の多発例の特徴としては知られておらず、むしろ肝門部や肝内大型胆管での癌化が目立つ。従って、1, 2-DPC および DCM が肝細胞で代謝されるとすると、何故これが胆管癌多発に関連するのか、説明出来なかった。

b. 肝・胆道系(肝細胞および胆道上皮)での CYP2E1, GST T1-1 の発現

従来、肝での CYP2E1, GST T1-1 は、主に肝細胞での研究が主体であり、胆管系の検討は殆どなされていなかった。そこで、我々は免疫組織化学的な方法で、CYP2E1 経路、

GST T1-1 経路に関連する酵素の発現をヒト組織(正常および胆管癌)、ラット組織、マウス組織で検討した。

その結果、CYP2E1 は、ヒト、ラット、マウスの肝細胞でコンスタントに発現し、胆道系では、胆管周囲付属腺と胆嚢上皮にわずかな発現がみられたが、肝内外の胆管上皮には発現が見られなかった。また、大阪印刷所の胆管癌症例の胆管異型上皮である BilIN や胆管癌にも、CYP2E1 の発現が見られなかった。

一方、GST T1-1 の発現は、ヒト、ラット、マウスの肝細胞および肝内外の胆管上皮で明瞭な発現が見られ、胆管周囲付属腺にも発現がみられた。ヒトとマウスでは、胆嚢上皮にも発現がみられた。また、大阪印刷所の胆管癌症例の胆管異型上皮である BilIN や胆管癌にも発現が見られた。

c. 胆管系は肝動脈血で支配されている

胆管上皮は、特異的に胆汁に接しており、当初、胆汁中に GST T1-1 代謝に関連する発がん物質が流れ、胆管癌が発生すると考えられていた。しかし、上述の如く、肝細胞には豊富な CYP2E1 の発現の発現があり、DCM や DPC は、まずは肝細胞で CYP 経路で十分に代謝された後で、過飽和となった後で、漸く GST T1-1 代謝が作動すると思われる。さらに、胆管傷害像や胆管癌の発生が、主に肝門部や肝内大型胆管を巻き込むことから、胆汁を介した胆管上皮の発癌物質へのばく露は、考えにくいと考えられる。

胆管は、肝動脈に由来する胆管周囲血管

叢で栄養されている。肺で吸引された 1,2-DPC や DCM は、肺循環系から心臓に至り、そこから動脈を介して全身に散布されると思われる。胆管系、特に肝門部胆管や肝内大型胆管は、高濃度の 1,2-DPC や DCM に最初にばく露すると思われ、次第に希釈され、肝内小型胆管、そして肝細胞に達すると思われる。上述の如く、胆管系には CYP2E1 の発現はなく GST T1-1 が分布しているので、肝門部胆管や肝内大型胆管が、高濃度で流入して来た 1,2-DPC や DCM にばく露し、ここに局在する GST T1-1 が発がん性や遺伝子障害作用のある中間代謝産物が形成され、胆管癌の発生に深く関連したと思われる。

d. DNA 傷害像

γ -H2AX は、DNA 傷害を示唆する所見として知られている。今回、 γ -H2AX の免疫染色を行ったが、職業性胆管癌症例の BilIN および IPNB、および非腫瘍性の障害胆管上皮で、高率に γ -H2AX の発現が認められた。一方、肝内結石症での傷害胆管や BilIN 病変では発現がみられなかった。このことから、職業性胆管癌症例では、発癌に先行して、DNA 傷害が高率、広汎に発生し、発癌に関連していることと考えられ、上記仮説を支持するものである。このことは、印刷所を退職してから 6 年あるいは 9 年後の従業員に胆管癌が発生しているが、既に DNA 障害が発生しているため、1,2-DCP あるいは DCM に暴露中でなくても、癌化のプロセスが進展し、発癌に至ったと推定され、興味

深い。

e. 癌関連遺伝子産物の発現

癌抑制遺伝子産物 *p53* の発現が、職業性胆管癌の早期の段階から既に、認められた。*p53* は、通常型胆管癌の発生においては、後期の段階で出現することが知られており、今回の印刷所に多発した癌では、早期の段階で *p53* の遺伝子異常が発生し、通常の胆管癌の発癌機序とは異なる可能性が示唆される。

E. 結論

印刷事業場で多発した胆管癌症例の切除標本などの病理学的検討を行ったところ、広範囲の胆管に DNA 傷害がみられ、その広範囲の胆管から BilIN や IPNB などの前癌病変が発生、さらに進行胆管癌に進展していく多段階発育を示すことが特徴であると考えられた。

G. 研究発表

1. Kubo S, Nakanuma Y, Takemura S, Sakata C, Urata Y, Nozawa A, Nishioka T, Kinoshita M, Hamano G, Terajima H, Tachiyama G, Matsumura Y, Yamada T, Tanaka H, Nakamori S, Arimoto A, Kawada N, Fujikawa M, Fujishima H, Sugawara Y, Tanaka S, Toyokawa H, Kuwae Y, Ohsawa M, Uehara S, Sato KK, Hayashi T, Endo G. Case series of 17 patients with cholangiocarcinoma among young adult workers of a printing company in Japan. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2014

2. Kubo S, Takemura S, Sakata C, Urata Y, Nishioka T, Nozawa A, Kinoshita M, Hamano G, Nakanuma Y, Endo G. Changes in Laboratory Test Results and Diagnostic Imaging Presentation before the Detection of Occupational Cholangiocarcinoma. J Occup Health 2014;56:317-322

3. Tanaka S, Fukumoto N, Ohno K, Tanaka S, Ohsawa M, Yamamoto T, Nakanuma Y, Kubo S. Cholangiocarcinoma in a middle-aged patient working at a printing plant. Osaka City Med J 2014; 60:39-44.

4. Kubo S, Kinoshita M, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Nishioka T, Hamano G, Ito T, Abue M, Aoki M, Nakagawa K, Unno M, Hijioka S, Fujiyoshi T, Shimizu Y, Mizuguchi T, Shirabe K, Nishie A, Oda Y, Takenaka K, Kobara T, Hisano T, Saiura A, Numao H, Toda M, Kuwae Y, Nakanuma Y, Endo G. Characteristics of printing company workers newly diagnosed with occupational cholangiocarcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2014

5. Sato Y, Kubo S, Takemura S, Sugawara Y, Tanaka S, Fujikawa M, Arimoto A, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y. Different carcinogenic process in cholangiocarcinoma cases epidemically developing among workers of a printing company in Japan. Int J Clin Exp Pathol 2014 15;7(8):4745-54.

6. 印刷労働者における胆管癌多発事例：新

たな職業癌。久保正二、竹村茂一、坂田親治、浦田順久、野沢彰紀、西岡孝芳、木下正彦、濱野玄弥、田中肖吾、菅原寧彦、中沼安二、圓藤吟史。日本消化器病学会雑誌 2014;111(3):50-9

7. 職業的暴露(印刷業)における胆管・胆道癌の特徴：病理所見および発癌メカニズムを中心に。中沼安二、角田優子、佐藤保則、

久保正二 肝胆膵 2014;69:1079-1085

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

労災疾病臨床研究事業費補助金
分担研究報告書

3. 胆管癌症例のメタボロームおよびトランスクリプトーム解析

研究分担者 河田則文（大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学）
研究協力者 村上善基（大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学）

研究要旨

肝内胆管癌は早期発見が困難で予後不良である、また発生母体は胆管上皮より発生するが発癌因子などは十分に解明されていない。一般的に発症は高齢者が多いが、大阪市の印刷工場では若年齢での発症例が散見されたために印刷工場の有機溶剤が発癌に影響している可能性が示唆された。今回印刷工場従事し肝内胆管癌を発症した症例と印刷工場従事していない症例それぞれの代謝物質、遺伝子発現解析を行い、化学物質由来胆管癌特異的な代謝物質、遺伝子発現異常の同定を試みた。その結果、統計的に有意差のある特徴的なメタボローム、トランスクリプトームは認められなかった。主成分分析によって、肝内胆管癌とその非癌部、肝細胞癌とその非癌部の四群を分別したところ、14種の化合物、62種のmRNA、17種のmicro RNAが肝内胆管癌に関与していることが明らかになった。

A. 研究目的

肝内胆管癌は胆管上皮由来の悪性腫瘍である、リスクファクターとしては、胆石、胆嚢炎、膵胆管合流異常などが考えられている他に、胆管胆嚢粘膜への物理化学的、細菌学的刺激を与えてがん発生母地をつくると考えられている。本研究班ではジクロロメタン、1,2-ジクロロプロパン暴露が新たな胆管癌リスクファクターになることを報告した。今回印刷工場従事者発症の胆管癌（以下 P-ICC）組織と、非従事者の胆管癌（NP-ICC）組織の遺伝子発現を比較し、

印刷工場特異的な化学発癌に関与する遺伝子発現異常を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

対象

対象は当院ならびに関連施設において外科的に切除した胆管癌の癌組織と周辺部非癌部組織 10 例（印刷工場関連はそのうち 3 例）と比較対象として HBV と HCV に感染していない肝細胞癌（以下 HCC）の癌部と周辺部非癌部組織 6 例を用いた。

解析方法

(1) 組織より total RNA を抽出しアジレント社のマイクロ RNA 用のマイクロアレイ (Human microRNA Microarray Kit (Rel 12.0)) とメッセンジャーRNA 解析用マイクロアレイ (SurePrint G3 Human GE Microarray Kit (Ver 2.0)) を用いて遺伝子発現解析を行った。

(2) 組織を液体窒素下で粉末にし、メタボローム解析には Agilent CE-TOFMS system を用いカチオンモード (陽イオン) 413、アニオンモード (陰イオン) 170 の測定を行った。

(3) 遺伝子発現と癌特異的物質解析結果について主成分分析 (PCA) を用いて行い、NP-ICC 発癌に関係のある分子 (物質、遺伝子) の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

この臨床研究はヘルシンキ宣言を遵守し、GCP に基づいて実施している。被検者の個人情報については、個人情報保護法に基づいて適切に取り扱う。また既に大阪市立大学医学研究科の倫理申請を行い、承認を受けている (受付番号 1358)。

C. 結果

(1) P-ICC 特異的なメタボローム、トランスクリプトーム解析
統計的に有意差のある NP-ICC 特徴的なメタボローム、トランスクリプトームは認められなかった。

(2) ICC と HCC におけるメタボローム、トランスクリプトーム解析

主成分分析によって、ICC とその非癌部、HCC とその非癌部の四群を分別したところ、14種の化合物、62種の mRNA、17種の miRNA が ICC に関与していることが明らかになった。化合物、mRNA、miRNA 別に四群間分別を行ったところ図 1 に示すように ICC がそれ以外の三群と発現、量とも異なっていることが判る。

D. 考察

国立がん研究センターの報告では P-ICC は NP-ICC と比較して特異的なメチル化サイトを持っているなど DNA レベルでの遺伝子異常を報告している (日本癌学会学術集会 2014)。このことをふまえてトランスクリプトームやメタボロームレベルでは P-ICC 特異的なパターンを有すると想定していたが、今回我々の結果は P-ICC と NP-ICC の間にトランスクリプトームやメタボロームレベル有意差は認められなかった。この理由として二点想定されるものがある。

(1) P-ICC は若年者での発癌例が多かったのに対し、NP-ICC では比較的高齢者での症例が多かった。そのため発癌に対する背景が異なっているが、発癌そのものに関与する遺伝子は共通しており、またその結果癌部で蓄積、または欠乏する物質は同じ程度であった可能性がある。(2) 解析数が P-ICC が 3 例で NP-ICC が 7 例であったため、統計学的な有意差を出すまでの解析数ではなかったことが想定される。

今後個々の症例の解析を詳細に行い、化学物質暴露に関係する発癌因子を明らかに

する。また現在大阪市立大学の胆管癌外来通院患者の経時的な観察をおこない、発癌症例が現れた場合、遺伝子解析を行う。また平行して胆管癌は特異的な腫瘍マーカーがなく、診断に苦慮するために、新たな診断ツールの開発を行う。

E. 結論

今回の解析では P-ICC 特異的なメタボローム、トランスクリプトームは明らかに出来なかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Murakami Y, Kubo S, Tamori A, Itami S, Tanaka S, Takemura S, Taguchi Y-h, and Kawada N. Transcriptome and metabolome analysis in cholangiocarcinoma of printing company 第73回 日本癌学会学術総会 2014年9月25-27日

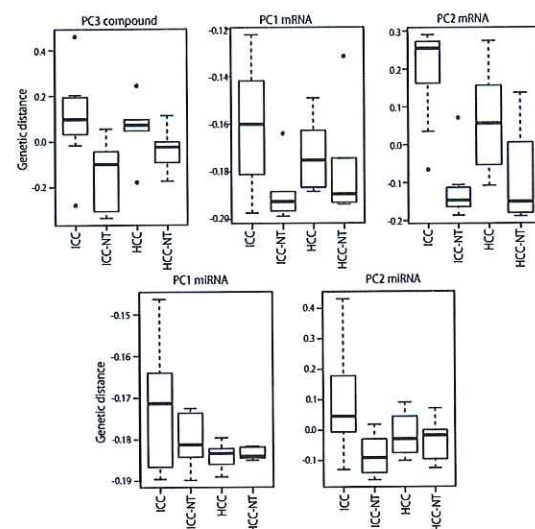
H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

図1 主成分分析による ICC、ICC の非癌部、HCC、HCC の非癌部 4 群間分別



上段 左:物質、中、mRNA 発現量、右: mRNA 発現量 (中と右はそれぞれ主成分分析のないようが異なる)、下段左:miRNA 発現、右:miRNA 発現 (右と左は主成分分析のないようが異なる、縦軸は遺伝子発現または物質の量をもとにした相対的な差を示す。

労災疾病臨床研究事業費補助金
分担研究報告書

4. 職業性胆管癌に対する総合的診断法の確立（分子生物学的検討）に関する研究

研究分担者 土原 一哉 （国立がん研究センター早期・探索臨床研究センタートランスレーショナルリサーチ分野）

研究要旨

大阪市内の印刷労働者に多発した職業性胆管癌症例 4 例の全エクソン解析により、通常型胆管癌ゲノムと著しく異なる①きわめて高頻度の体細胞変異、②一塩基置換のセンス・アンチセンス鎖間のバイアスが認められた。今後これらの特徴が職業性胆管癌の原因物質と考えられている有機溶剤に起因するか、他地域の類似症例にも共通するものかなどを明らかにすることで、職業性胆管癌の診断補助に有用なゲノムバイオマーカーが開発される可能性が示唆された。

A. 研究目的

大阪市内の印刷労働者に多発した職業性胆管癌に生じた体細胞変異を網羅的に解析し、発症の原因と推定されている高濃度の有機溶媒暴露や各症例の臨床病理学的な特徴との因果関係を明らかにする。これらの結果から職業性胆管癌が疑われる症例の診断を補助するゲノムバイオマーカーの探索を行う。

B. 研究方法

大阪市立大学等で外科切除が施行された4例の職業性胆管癌組織及び対照となる非癌組織のゲノムDNAを用い国立がん研究センターで実施した全エクソンシーケンスデータを解析し、体細胞変異を同定した。各症例の有機溶媒被曝歴、臨床病理所見と体細胞変異プロファイル（変異数、DNA塩基置換パターン）との相関を検討した。

（倫理面への配慮）

「胆管がん等の職業性発がんの原因解明とバイオマーカーの開発」のためヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則

り研究を計画し、国立がん研究センター研究倫理審査委員会の承認（2014-072）を得て実施した。

C. 研究結果

解析を行った4例全例に1, 2-ジクロロプロパンの曝露歴があり、うち1例のみジクロロメタンにも曝露していた。組織病理学的にはすべての症例のゲノムDNAを抽出した癌部周辺に既報の通り胆管硬化像と炎症細胞浸潤が認められた。ホルマリン固定組織のゲノムDNAを用いた全エクソンシーケンスの品質は良好で、通常のがんゲノム解析を実施するのに十分であった。タンパク質をコードする遺伝子領域約3100万塩基対に対し1例あたり平均1451ヶ所の癌部特異的な一塩基置換が認められた。これは既報の胆管癌ゲノムに認められる体細胞変異の数十倍の頻度であった。通常型の胆管癌で高頻度に認められるKRAS等のがん遺伝子、がん抑制遺伝子の変異は4例で散発的に確認されたが、4例で共通した既知あるいは新規のがん関連遺伝子は認められなかった。各症例における塩基置換は

C:GからT:Aへのトランジションが主であり、通常型胆管癌の塩基置換パターンと類似していた。ただし職業性胆管癌ゲノムではセンス鎖とアンチセンス鎖における変異頻度の有意差を認めた。

D. 考察

本研究開始時点で解析が可能だった職業性胆管癌ゲノムにおいて、①きわめて高頻度の体細胞変異、②一塩基置換のセンス・アンチセンス鎖間のバイアスは4例に共通して認められ、高濃度の環境変異原の曝露歴を示唆する結果であった。これらのゲノム変化が大阪市内の印刷労働者に多発した職業性胆管癌の原因物質と想定されている1,2-ジクロロプロパンおよびジクロロメタンに起因するものか今後慎重に検討する必要がある。従来実験レベルではこれらの有機化合物の変異原性が比較的軽度とされていたことから、生体内ではさらに複雑なメカニズム（化合物間の相互作用、胆管上皮における化合物代謝機構、炎症等宿主因子との相互作用など）も考慮すべきである。これらの点を加味した実験モデルでの有機化合物の変異原性の比較検討から特徴的な塩基置換プロファイルのバイオマーカーとしての評価を行うべきである。また臨床例の解析は大阪市の一事業所で発症した症例に限られており、職

業性胆管癌が疑われる他の地域の症例や、発症原因が不明な胆管癌症例との比較も実施すべきである。

E. 結論

網羅的ゲノム解析から職業性胆管癌に特徴的な遺伝子変異プロファイルを見出した。今後バイオマーカーとしての実用可能性を検討する。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. Tsuchihara K. Hypermuation in cholangiocarcinoma of offset color proof-printing workers. 4th Asian Conference on Environmental Mutagens. Dec 10, 2014. Kolkata, India

2. 三牧幸代, 戸塚ゆ加里, 鈴木 穰, 中井智嘉子, 柴田龍弘, 江角浩安, 落合淳志, 中釜 斉, 久保正二, 中森正二. 印刷工胆管癌の全エクソンシーケンス解析. 第73回日本癌学会学術集会 2014

2. 論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

労災疾病臨床研究事業補助金
分担研究報告書

5. 職業性胆管がん患者の化学物質曝露に関する研究

研究分担者 熊谷 信二（産業医科大学産業保健学部安全衛生マネジメント学）
研究協力者 圓藤 吟史（大阪市立大学大学院医学研究科産業医学）
山田 憲一（中央労働災害防止協会・労働衛生調査分析センター）

研究要旨

印刷労働者に発生した胆管癌の原因は、洗浄剤に含まれていた 1,2-ジクロロプロパン（1,2-DCP）あるいはジクロロメタン（DCM）と考えられているが、今後の発生を予防するためには、当該労働者におけるこれらの物質への曝露濃度および曝露期間を明らかにすることが重要である。本研究では、厚生労働省が職業性胆管癌と認定した印刷労働者 7 人について、使用した化学物質の種類を特定するとともに、各種の情報を基にして曝露濃度を推定することを目指した。

対象者は厚生労働省により職業性胆管癌と認定された印刷労働者 7 人である。診断年齢は 30 歳代が 3 人、40 歳代が 3 人、60 歳代が 1 人である。これらの労働者が使用した化学物質を同定するとともに、曝露濃度を推定するために、厚生労働省が収集した情報（印刷作業場の気積と換気量、印刷機の種類、ブランケットとインキロールの洗浄剤の化学成分と使用量、洗浄時間）を取得した。さらにそれらの情報を基にして曝露濃度を推定した。

7 人中 4 人は 1,2-DCP および DCM に曝露されており、最高曝露濃度は 1,2-DCP が 230～420 ppm、DCM が 58～720 ppm と推定され、1 日労働時間の時間荷重平均濃度は 1,2-DCP が 0～210 ppm、DCM が 15～270 ppm と推定された。一方、残りの 3 人は DCM への曝露はあるが、1,2-DCP への曝露はなかった。DCM の最高曝露濃度は 600～1300 ppm と推定され、1 日労働時間の時間荷重平均濃度は 84～440 ppm と推定された。これらの結果は、1,2-DCP 曝露だけでなく、DCM 曝露もヒトに胆管癌を引き起こす可能性を示唆している。

A. 研究目的

印刷労働者に発生した胆管癌の原因は、洗浄剤に含まれていた 1,2-ジクロロプロパン（1,2-DCP）あるいはジクロロメタン（DCM）と考えられているが、今後の発生を予防するためには、当該労働者におけるこれらの物質への曝露濃度および曝露期間を明らかにすることが重要である。本研究では、厚生労働省が職業性胆管癌と認定した印刷労働者 7 人について、使用した化学物

質の種類を特定するとともに、各種の情報を基にして曝露濃度を推定することを目指した。なお、本研究は大阪市立大学大学院医学研究科の倫理委員会の承認を得て行った。

B. 研究方法

1. 対象者

対象者は厚生労働省により職業性胆管癌と認定された印刷労働者 7 人である。診断

年齢は 30 歳代が 3 人、40 歳代が 3 人、60 歳代が 1 人である。7 人中 5 人は従業員が 50 人未満の小規模事業所の労働者であり、残りの 2 人は従業員が 50～299 人の中規模事業所の労働者である。

2. 情報収集

これらの労働者が使用した化学物質を同定するとともに、曝露濃度を推定するために、厚生労働省が収集した情報（印刷作業場の気積と換気量、印刷機の種類、ブランケットとインキロールの洗浄剤の化学成分と使用量、洗浄時間）を取得した。

3. 曝露濃度の推定

印刷作業場の 1,2-DCP および DCM の作業環境濃度を推定するために、完全混合モデルにおける定常状態での濃度（下式）を用いた。

$$C_{En} = \frac{1000 G_T}{Q} \times \frac{24.47}{M}$$

ここで、 C_{En} は作業環境濃度（ppm）、 G_T は印刷作業場全体における化学物質の発生速度（g/h）、 Q は印刷作業場全体の換気速度（m³/h）、そして M は化学物質の分子量である。使用した 1,2-DCP と DCM の全量が蒸発すると仮定し、 G_T は 1 日使用量（g）を 1 日の労働時間（h）で割って求めた。

洗浄作業中の作業者の曝露濃度を推定するために、近接場-遠隔場モデルにおける定常状態での濃度（下式）を用いた。このモデルにおける近接場は発生源を中心とする

球と仮定し、洗浄作業中の発生源と作業者の呼吸位置との距離を考慮して、球の半径 r を 0.5m とした。

$$C_{Ex} = \left(\frac{1000 G_{Re}}{Q} + \frac{1000 G_{Re}}{\beta} \right) \times \frac{24.47}{M}$$

ここで、 C_{Ex} は洗浄作業中の作業者の曝露濃度（ppm）である。また、 G_{Re} は洗浄作業中の化学物質の発生速度（g/h）であり、洗浄作業中の化学物質の使用量（g）を洗浄作業時間（h）で割って求めた。 β は近接場と遠隔場の間の空気の交換速度（m³/h）であり、下式で求めた。

$$\beta = v \times 3600 \times 2\pi r^2$$

ここで、 v は近接場と遠隔場の境界面を通過する気流の速度（m/sec）である。ただし、事業所 XI の印刷機はブランケットが上下にあり、下のブランケットは半密閉であったので、 β （m³/h）は下式で求めた。

$$\beta = v \times 3600 \times \pi r^2$$

なお、近接場と遠隔場の境界面に直接的に当たる気流はなかったため、 v は 0.1 m/sec とした。

さらに洗浄作業以外の時間帯の曝露濃度は作業環境濃度と同一と仮定して、1 日の労働時間における時間荷重平均濃度（TWAs）を算出した。

G. 研究結果

症例 G

1976 年生まれの男性である。1997 年から 2001 年まで事業所 IV においてオフセット校正印刷に従事し、2009 年に胆管癌と診断された。その他には化学物質の使用歴はない。

事業所 IV では 2 つの作業場で働いたが、作業場 1 の気積は 1600 m³、換気量は 4500 m³/h、作業場 2 の気積は 1000 m³、換気量は 3000 m³/h であった。印刷機には局所排気装置は設置されていなかった。ブランケット洗浄剤には 1,2-DCP、DCM、ノナンおよびガソリンを使用した。作業場全体で使用した 1,2-DCP は 460-500 g/h、DCM は 60 g/h であった。また洗浄作業中に使用した 1,2-DCP は 730 g/h、DCM は 90-100 g/h であった。

作業環境濃度は 1,2-DCP が 24-33 ppm、DCM が 4-6 ppm と推定された。洗浄作業中の曝露濃度は 1,2-DCP が 320-330 ppm、DCM が 51-58 ppm と推定された。1 日の労働時間は 11.5 時間であり、時間荷重平均濃度は 1,2-DCP が 92-100 ppm、DCM が 15-18 ppm と推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

症例 H

1974 年生まれの男性である。1995 年から 1998 年まで事業所 V においてオフセット校正印刷に従事し、1998 年から 2000 年まで事業所 VI においてオフセット校正印刷に

従事したが、2010 年に胆管癌と診断された。その他には化学物質の使用歴はない。

いずれの事業所にも印刷作業場は 1 つであった。作業場 3 の気積は 230 m³、換気量は 9800 m³/h、作業場 4 の気積は 250 m³、換気量は 2400 m³/h であった。印刷機には局所排気装置は設置されていなかった。ブランケット洗浄剤には、1995 年から 1997 年までは 1,2-DCP、DCM、ミネラルスピリットおよび 2-ブタノールを、1998 年は DCM およびミネラルスピリットを、1998 年から 2000 年までは DCM を使用した。作業場全体で使用した 1,2-DCP は 0-180 g/h、DCM は 210-350 g/h であった。また洗浄作業中に使用した 1,2-DCP は 0-700 g/h、DCM は 820-1000 g/h であった。

作業環境濃度は 1,2-DCP が 0-4 ppm、DCM が 6-42 ppm と推定された。洗浄作業中の曝露濃度は 1,2-DCP が 0-280 ppm、DCM が 440-630 ppm と推定された。1 日の労働時間は 7.5 時間であり、時間荷重平均濃度は 1,2-DCP が 0-29 ppm、DCM が 25-94 ppm と推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

症例 I

1971 年生まれの男性である。1991 年から 1994 年までと 1996 年から 2008 年まで事業所 VII においてオフセット印刷に従事したが、2008 年に胆管癌と診断された。その他には化学物質の使用歴はない。

事業所 VII には 2 つの印刷作業場があっ

たが、1,2-DCP および DCM を使用したのは作業場 5 のみであった。作業場 5 の気積は 9470 m³、換気量は 20300 m³/h であった。印刷機には局所排気装置は設置されていなかった。ブランケット洗浄剤には、1991 年から 1996 年までは 1,2-DCP、DCM、ミネラルスピリットおよび鉱油を、1997 年から 2001 年までは DCM、ミネラルスピリットおよび鉱油を使用した。作業場全体で使用した 1,2-DCP は 0-380 g/h、DCM は 330-920 g/h であった。また洗浄作業中に使用した 1,2-DCP は 0-580 g/h、DCM は 570-1390 g/h であった。

作業環境濃度は 1,2-DCP が 0-4 ppm、DCM が 5-13 ppm と推定された。洗浄作業中の曝露濃度は 1,2-DCP が 0-230 ppm、DCM が 570-720 ppm と推定された。1 日の労働時間は 11 時間であり、時間荷重平均濃度は 1,2-DCP が 0-17 ppm、DCM が 20-56 ppm と推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

症例 J

1963 年生まれの男性である。1990 年から 2009 年まで事業所 VIII においてオフセット印刷および凸版印刷に従事したが、2009 年に胆管癌と診断された。別の印刷事業所でも勤務したが、洗浄剤にはガソリンを使用していた。その他には化学物質の使用歴はない。

事業所 VIII には印刷作業場は 1 つであり、作業場 6 の気積は 1820 m³、換気量は 1500

m³/h であった。印刷機には局所排気装置は設置されていなかった。ブランケット洗浄剤には、1990 年から 2009 年までは DCM を使用した。またインキロール洗浄剤にも、DCM および 1,2-DCP を使用した。作業場全体で使用した 1,2-DCP は 0-1100 g/h、DCM は 110-1050 g/h であった。また洗浄作業中に使用した 1,2-DCP は 0-790 g/h、DCM は 310-760 g/h であった。

作業環境濃度は 1,2-DCP が 0-160 ppm、DCM が 21-200 ppm と推定された。洗浄作業中の曝露濃度は 1,2-DCP が 0-420 ppm、DCM が 220-530 ppm と推定された。1 日の労働時間は 10 時間であり、時間荷重平均濃度は 1,2-DCP が 0-210 ppm、DCM が 31-270 ppm と推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

症例 K

1961 年生まれの男性である。1984 年から 2002 年まで事業所 IX においてオフセット印刷に従事したが、2002 年に胆管癌と診断された。また、1979 年から 1984 年までは別の事業所において職業訓練として印刷に従事しているが、使用した化学物質の情報が得られなかった。その他には化学物質の使用歴はない。

事業所 IX には 2 つの印刷作業場があったが、DCM を使用したのは作業場 7 のみであった。作業場 7 の気積は 1420 m³、換気量は 22300 m³/h であった。印刷機には局所排気装置は設置されていなかった。ブランケッ

ト洗浄剤には、1984 年から 1995 年までは DCM および 1, 1, 1-トリクロロエタンを、1995 年から 2002 年まではメチルシクロヘキサン、エタノール、イソプロピルアルコールおよび 1-プロパノールを使用した。作業場全体で使用した DCM は 3700 g/h、洗浄作業中に使用した DCM は 990-1140 g/h であった。

DCM の作業環境濃度は 48 ppm、洗浄作業中の曝露濃度は 520-600 ppm と推定された。1 日の労働時間は 8.7 時間であり、DCM の時間荷重平均濃度は 84-90 ppm と推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

症例 L

1963 年生まれの男性である。1984 年から 1995 年まで事業所 X においてオフセット印刷に従事したが、2007 年に胆管癌と診断された。また別の会社で 1 カ月の化学物質の使用経験があるが、その他には使用歴はない。

事業所 X には印刷作業場は 1 つであり、作業場 8 の気積は 600 m³、換気量は 4500 m³/h であった。印刷機には局所排気装置は設置されていなかった。ブランケット洗浄剤には、DCM、1, 1, 1-トリクロロエタン、ガソリンおよび灯油を使用した。作業場全体で使用した DCM は 2600 g/h、洗浄作業中に使用した DCM は 1670 g/h であった。

DCM の作業環境濃度は 170 ppm、洗浄作業中の曝露濃度は 960 ppm と推定された。1

日の労働時間は 11.5 時間であり、DCM の時間荷重平均濃度は 440 ppm と推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

症例 M

1949 年生まれの男性である。2001 年から 2009 年まで事業所 XI においてオフセット印刷に従事したが、2011 年に胆管癌と診断された。また 1968 年から 1970 年まで別の印刷会社で勤務したが、使用した化学物質に関する情報は得られなかった。その他には化学物質の使用歴はない。

事業所 XI には印刷作業場は 1 つであり、作業場 9 の気積は 2400 m³、換気量は 9000 m³/h であった。印刷機には局所排気装置は設置されていなかった。ブランケット洗浄剤には、DCM、ミネラルスピリットおよび石油系溶剤を使用した。作業場全体で使用した DCM は 480-660 g/h、洗浄作業中に使用した DCM は 870-1200 g/h であった。

DCM の作業環境濃度は 15-21 ppm、洗浄作業中の曝露濃度は 470-1300 ppm と推定された。1 日の労働時間は 11 時間であり、DCM の時間荷重平均濃度は 77-110 ppm と推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

まとめ

完全混合モデルでは、作業場内で発生した化学物質は瞬間的に拡散混合し、気中濃度は均一であると仮定している。また、近接場-遠隔場モデルでは、2 つの場の内部の

気中濃度は均一であると仮定している。現実には、気中濃度には空間的な変動があるので、これらの仮定は正しくない。しかしながら、対象者が勤務した作業場内の気中濃度の空間的な変動に関する情報はないので、これらのモデルを使用することとした。したがって、本研究で算出された濃度は粗い推定値である。

本研究の対象者 7 人の中で、4 人は 1,2-DCP および DCM の高濃度長期間曝露を受けており、これまで報告された事例と同様であることが確認された。一方、残りの 3 人は DCM の高濃度曝露を受けているが、1,2-DCP の曝露は受けていなかった。したがって、DCM のみの曝露であっても、高濃度長期間曝露であれば、胆管がんを発症する可能性のあることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamada K, Kumagai S, Nagoya T, Endo G. Chemical exposure levels in printing workers with cholangiocarcinoma. J Occup Health 2014;56:332-338
2. Yamada K, Kumagai S, Endo G. Chemical exposure levels in printing workers with cholangiocarcinoma (second report). J Occup Health (in press).

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kubo S, Nakanuma Y, Takemura S, Sakata C, Urata Y, Nozawa A, Nishioka T, Kinoshita M, Hamano G, Terajima H, Tachiyama G, Matsumura Y, Yamada T, Tanaka H, Nakamori S, Arimoto A, Kawada N, Fujikawa M, Fujishima H, Sugawara Y, Tanaka S, Toyokawa H, Kuwae Y, Ohsawa M, Uehara S, Sato KK, Hayashi T, Endo G	Case-series of 17 patients with cholangiocarcinoma among young adult workers of a printing company in Japan	Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	21(7)	479-488	2014
Sato Y, Kubo S, Takemura S, Sugawara Y, Tanaka S, Fujikawa M, Arimoto A, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y	Different carcinogenic process in cholangiocarcinoma cases epidemically developing among workers of a printing company in Japan	International Journal of Clinical and Experimental Pathology	7(8)	4745-4754	2014
Kubo S, Kinoshita M, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Nishioka T, Hamano G, Ito T, Abue M, Aoki M, Nakagawa K, Unno M, Hijioka S, Fujiyoshi T, Shimizu Y, Mizuguchi T, Shirabe K, Nishie A, Oda Y, Takenaka K, Koburai T, Hisano T, Saiura A, Numao H, Toda M, Kuwae Y, Nakanuma Y, Endo G	Characteristics of printing company workers newly diagnosed with occupational cholangiocarcinoma	Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	21(11)	809-817	2014

久保正二、竹村茂一、坂田親治、浦田順久、野沢彰紀、西岡孝芳、木下正彦、濱野玄弥、田中肖吾、菅原寧彦、中沼安二、圓藤吟史	印刷労働者における胆管癌多発事例：新たな職業癌	日本消化器病学会雑誌	111(8)	500-509	2014
久保正二	胆管癌におけるトピックスー印刷事業場での胆管癌集中発生を含めて	胆膵の病態生理	30(1)	1-4	2014
久保正二、竹村茂一、坂田親治、田中肖吾、中沼安二、圓藤吟史	印刷労働者に多発した胆管癌	胆道	28(8)	763-771	2014
中沼安二、角田優子、佐藤保則、久保正二	職業的暴露（印刷業）による胆管・胆道癌の特徴：病理所見および発癌メカニズムを中心に	肝胆膵	69(6)	1079-1085	2014
Tanaka S, Fukumoto N, Ohno K, Tanaka S, Ohsawa M, Yamamoto T, Nakanuma Y, Kubo S	Cholangiocarcinoma in a middle-aged patient working at a printing company	Osaka City Medical Journal	60(1)	39-44	2014
Kubo S, Takemura S, Sakata C, Urata Y, Nishioka T, Nozawa A, Kinoshita M, Hamano G, Nakanuma Y, Endo G	Changes in laboratory test results and diagnostic imaging presentation before the detection of occupational cholangiocarcinoma	Journal of Occupational Health	56(4)	317-322	2014

虻江 誠、鈴木雅貴、塚本啓祐、青木優、久保正二、印刷会社勤務歴を有する肝内胆管癌の1例	印刷会社勤務歴を有する肝内胆管癌の1例	胆道	28(4)	696-702	2014
Yamada K, Kumagai S, Nagoya T, Endo G.	Chemical exposure levels in printing workers with cholangiocarcinoma	J Occup Health	56(5)	332-338	2014
Kubo S	Re:Occupational cholangiocarcinoma	J Hepatobiliary Pancreat Sci	22	E2-E3	2015
中川 圭、片寄 友、石田和之、林 洋毅、森川孝則、吉田 寛、元井冬彦、内藤 剛、久保正二、海野倫明	印刷業職業性胆管癌に対する化学放射線療法と根治的肝切除の経験	日本消化器病学会雑誌		印刷中	
Yamada K, Kumagai S, Endo G	Chemical exposure levels in printing workers with cholangiocarcinoma (second report)	J Occup Health		in press	