

目次

I. 総合研究報告

職業性胆管癌に対する総合的診断法の確立
研究代表者氏名 久保正二

II. 分担研究報告

1. 検診結果と職業性胆管癌の臨床病理学的特徴

研究代表者 久保正二

研究分担者 石河 修、平川弘聖、河田則文、首藤太一

研究協力者 竹村茂一、田中肖吾、新川寛二、西岡孝芳、木下正彦、
濱野玄弥、伊藤得路、倉島夕紀子、青田尚哲、江田将樹、
村上善基、川村悦史、打田佐和子、榎本 大、萩原淳司、
藤井英樹、小塚立蔵、元山宏行、寺西優雅、森川浩安、
佐藤恭子、圓藤吟史、小山孝一、三木幸雄、佐藤保則、
金子麗奈、南山幸子

2. 職業性胆管癌の病理学的特徴および発癌機序の解明

研究分担者 中沼安二、久保正二

研究協力者 佐藤保則、木下正彦

3. 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

研究協力者 三牧幸代

4. メタボローム、トランスクリプトーム複合解析による肝内胆管癌の診断法

研究分担者 河田則文

研究協力者 村上善基、河村悦史

5. 職業性胆管癌患者の化学物質曝露に関する研究

研究分担者 熊谷信二、久保正二

研究協力者 圓藤吟史、山田憲一

6. 印刷労働者における洗浄剤累積使用量別胆管癌罹患リスク

研究分担者 祖父江友孝

研究協力者 牧内 武

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

労災疾病臨床研究事業費補助金
総合研究報告書

職業性胆管癌に対する総合的診断法の確立

研究代表者	久保正二（大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵外科学）
研究分担者	石河 修（大阪市立大学医学部附属病院） 平川弘聖（大阪市立大学医学部附属病院） 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） 首藤太一（大阪市立大学大学院医学研究科総合医学教育学・ 医学部附属病院総合診療センター） 中沼安二（福井済生会病院病理診断科） 土原一哉（国立がん研究センター早期・探索研究センター） 熊谷信二（産業医科大学産業保健学部環境マネジメント学） 祖父江友孝（大阪大学大学院医学系研究科環境医学）
研究協力者	竹村茂一、田中肖吾、新川寛二、西岡孝芳、木下正彦、 濱野玄弥、伊藤得路、倉島夕紀子、青田尚哲、江田将樹 （大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵外科学） 村上善基、川村悦史、打田佐和子、榎本 大、萩原淳司、 藤井英樹、小塚立蔵、元山宏行、寺西優雅（大阪市立大学 大学院医学研究科肝胆膵病態内科学） 森川浩安（大阪市立大学大学院医学研究科先端予防医療学） 佐藤恭子、圓藤吟史（大阪市立大学大学院医学研究科産業医学） 小山孝一、三木幸雄（大阪市立大学大学院医学研究科放射線診 断学・IVR学/放射線腫瘍学） 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） 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） 三牧幸代（国立がん研究センター早期・探索研究センター） 金子麗奈（関東労災病院消化器内科） 南山幸子（京都府立大学大学院生命環境科学研究科） 牧内 武（大阪大学大学院医学系研究科社会環境医学）

内容要旨

I 職業性胆管癌の特徴

(1) 胆管癌特別外来と検診結果

大阪市立大学医学部附属病院に胆管がん特別外来を設置以降、大阪の印刷事業場 S 社の元および現従業員 72 名の検診を行った。平成 25 年 10 月の労災認定以降は 16 名の健康管理手帳交付者およびその他の 16 名の元あるいは現従業員の検診作業を行っている。この検診等において、これまでに 4 例が職業性胆管癌と診断された。また、S 社において胃癌 2 名、皮膚ポアエン病 1 名および腎癌 1 名が存在したことが判明した。ジクロロメタン (DCM) や 1,2-ジクロロプロパン (1,2-DCP) などの塩素系有機溶剤曝露時に、頭痛、嘔気、嘔吐、皮膚炎、飲酒時の発赤増強などの症状がみられた。

(2) 職業性胆管癌症例の臨床検査値

職業性胆管癌症例では胆管癌診断時、 γ -GTP、AST、ALT 値が上昇していた。臨床検査値の経時的変化が可能であった症例をみると、胆管癌診断の数年前より γ -GTP が上昇し、引き続いて AST や ALT 値が上昇していた。腫瘍マーカーをみると、血清 CEA 値は 36 例中 17 例、CA19-9 値は 36 例中 23 例、DUPAN-2 値 (基準値を 30 U/mL とすると) は 12 例中全例で上昇しており、血清 DUPAN-2 値の成績が最も良好であった。

(3) 職業性胆管癌症例の画像所見

職業性胆管癌症例の画像診断 (腹部超音波検査、CT、MRI) 上、肝内腫瘤像、胆管内腫瘤像、癌による胆管閉塞とその末梢胆管の拡張像に加えて、癌による胆管狭窄を伴わない限局性肝内胆管拡張像が特徴的であった。この特徴的な所見は原発性硬化性胆管炎 (PSC) と類似していた。したがって、職業性胆管癌症例では通常型胆管癌症例に見られる像と PSC 症例に見られる像の両者がみられることが特徴であった。また、S 社の職業性胆管癌 18 例全例で、腹部超音波検査上、異常所見が確認された。これらから職業性胆管癌のスクリーニングには腹部超音波検査が、CT、MRI は腫瘤像や特徴的な胆管像の検出に有用であると考えられた。FDG-PET は職業性胆管癌のステージングには有用であるが、前癌病変あるいは早期癌病変に対する有用性は乏しいと考えられた。

(4) 職業性胆管癌の臨床診断

職業性胆管癌の臨床診断には、腹痛、黄疸などの自覚症状や血液検査や腹部超音波検査、CT、MRI などの画像診断検査で異常所見がみられる場合、生検や細胞診による確定診断や FDG-PET による進行度診断が必要となると考えられた。

(5) 職業性胆管癌症例の病理学的所見

職業性胆管癌症例の病理所見では、広範囲の胆管に慢性胆管傷害、前癌病変や早期癌病変である Biliary intraepithelial neoplasia (BilIN)、Intraductal papillary neoplasm of the bile duct (IPNB) がみられた。DNA 傷害を示す γ -H2AX による免疫組織学的検討を行うと、ほぼ正常にみえる胆管、慢性胆管傷害、BilIN、IPNB および浸潤癌の部位に陽性であった。癌化を示す S100P による免疫組織学的検討を行うと、BilIN、IPNB と浸潤癌で陽性

であり、BiIN や IPNB の段階で癌化がみられることが判明した。すなわち、職業性胆管癌症例では広範囲の胆管で DNA 傷害がみられ、慢性胆管傷害から BiIN や IPNB の前癌病変を経て、浸潤癌に至る多段階発癌過程を示していると考えられた。

胆管周囲の線維化は、PSC や閉塞性黄疸に比較して、職業性胆管癌では線維化が緻密で強かった。職業性胆管癌の胆管周囲には α -SMA 陽性細胞が多く分布していた。したがって、職業性胆管癌の胆管硬化は胆管狭窄や閉塞に伴う 2 次性線維化とは異なることが示唆され、DCM や 1,2-DCP の曝露終了から長期間を経ても胆管および胆管周囲に慢性炎症が持続していると考えられた。

(6) 職業性胆管癌における DNA メチル化

DNA methyltransferase (DNMT) 3A および 3B の発現は胆管周囲付属腺、BiIN および浸潤癌において亢進していた。また、非癌部の大型胆管上皮においても DNMT3A の発現が亢進していた。したがって、職業性胆管癌では DNA メチル化が亢進していると考えられた。職業性胆管癌の多段階発癌の過程において DNA メチル化異常が蓄積し、エピジェネティックな発癌の素地が形成されていると考えられた。

(7) CYP2E1 と GST T1-1 の分布

正常の肝胆道系において、DCM の代謝関連酵素である cytochrome P450 (CYP) 2E1 と theta-class glutathione S-transferase (GST) T1-1 の発現を免疫染色で検討した。CYP2E1 は肝細胞に恒常的に発現し、肝内外の胆管上皮に発現は認められなかった。GST T1-1 は肝細胞に加えて肝内外の胆管上皮に明瞭な発現がみられたことから、GST T1-1 により胆管で DCM の有害な中間代謝物が形成され、胆管癌発生に関連したことが示唆された。

(8) 職業性胆管癌症例と通常型胆管癌症例との比較

職業性胆管癌症例の臨床病理学的所見と通常型胆管癌や若年性胆管癌のそれらを比較したところ、若年、 γ -GTP 高値、癌を伴わない限局性胆管拡張像や乳頭状増殖像、胆管内發育型肝内胆管癌、BiIN、IPNB、慢性胆管傷害像などの臨床病理学的所見は職業性胆管癌に特徴的であることが判明した。

(9) 職業性胆管癌の治療成績

職業性胆管癌切除例では術後合併症は高頻度に発症し、慢性胆管傷害が影響している可能性が考えられた。また、高発癌ポテンシャルと関連して術後多中心性再発をきたす症例がみられたが、再発巣に対しても再切除を含む積極的な治療が有効であるとともに、長期間の経過観察が必要であると考えられた。

(10) 胆汁中成分の分析

胆汁中チオール分析では酸化型グルタチオンが多く、酸化ストレスや慢性炎症を反映している可能性があった。また、2 次胆汁酸が多い傾向にあった。

(11) メタボロームおよびトランスクリプトーム解析

職業性胆管癌と通常型胆管癌のメタボロームおよびトランスクリプトーム解析を比較したが、職業性胆管癌に特徴的な所見は得られなかった。

(12) 職業性胆管癌症例の分子生物学的検討

職業性胆管癌 4 例の全エクソンシーケンスを行い、体細胞変異の特徴を解析した。その結果、体細胞変異数は通常型胆管癌と比較して平均約 30 倍と高かった。また、C:G-to-T:A トランジション変異が優位で、通常型胆管癌では見られない転写共役修復を示唆するストランドバイアスが観察された。さらに、変異部位前後 1 ベースペアを含めた三塩基配列の変異頻度を集計したところ (trinucleotide mutational pattern)、C:G-to-T:A 変異は GpCpY 配列 (アンダーラインは変異部位を示す、Y=C or T) に最も集中していることがわかり、変異誘発における配列特異性が観察された。ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 株を用いた再現実験により、1,2-DCP 曝露株において NpCpC to NpTpC 変異が高頻度に観察され、臨床例で観察された変異パターンの一部を再現した。さらに、前癌病変を含む多数の病変の網羅的ゲノム解析を行ったところ、ほとんどの病変で共通の変異プロファイルが確認された。したがって、職業性胆管癌の発症は共通の強い変異原物質曝露による、高頻度突然変異誘発に起因する可能性を明らかとし、その特徴的な変異プロファイルが本疾患を特徴づけるゲノムバイオマーカーになり得ると考えられた。

(13) 職業性胆管癌の癌免疫病態

腫瘍免疫の回避に関与する programmed death-1 (PD-1) と programmed death-ligand 1 (PD-L1) の発現を免疫染色で検討した。職業性胆管癌では PD-L1 の発現亢進がみられ、腫瘍間質に浸潤する PD-1 陽性を示すリンパ球数も多かった。職業性胆管癌は PD-1/PD-L1 を介して腫瘍免疫を回避しており、抗 PD-1 抗体を用いたがん免疫療法の効果が期待できると考えられた。

II 職業性胆管癌症例の曝露状況と標準化罹患比

(14) 職業性胆管癌症例の化学物質曝露

職業性胆管癌症例のうち印刷労働者 29 例および IC カード製造労働者 1 例における 1,2-DCP および DCM 曝露濃度を推定した。S 社 17 例における 1,2-DCP への曝露期間、曝露濃度および累積曝露量はそれぞれ平均 9.5 年 (範囲 6.2~15.1 年)、214 ppm (85~276 ppm) および 2044 ppm-年 (646~3409 ppm-年) と推定された。また DCM 曝露を受けた 11 例における DCM への曝露期間、曝露濃度および累積曝露量はそれぞれ平均 5.1 年 (範囲 1.3~8.3 年)、191 ppm (80~268 ppm) および 864 ppm-年 (355~1282 ppm-年) と推定された。その他 12 例のうち 9 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 190~560 ppm、DCM が 58~980 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 0~230 ppm、DCM が 15~470 ppm と推定された。3 例の 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。IC カード製造労働者 1 例の 1,2-DCP の最高曝露濃度は 150 ppm と推定され、1 日労働時間の時間荷重平均濃度は 5~19 ppm と推定された。また、FID 付のガスクロマトグラフ (GC-FID) を用いて 1,2-DCP を測定できる方法を確立した。

(15) 塩素系有機溶剤累積使用量別胆管癌罹患リスク

S社における従事期間別に標準化罹患比（SIR）を計算したところ、胆管癌 17 例の SIR は 1132.5 (95%信頼区間 659.7-1813.2)であった。1,2-DCP および DCM 累積使用量別の SIR は、概ね DCM、1,2-DCP とともに正の量反応関係が観察された。潜伏期 5 年として、1,2-DCP の累積使用量別を 0-39999kg、40000-59999kg、60000kg と分けた場合の胆管がん罹患相対リスクは、1.00（基準群）、12.68(95%信頼区間 6.67-22.03)、51.68 (95%信頼区間 31.11-81.07)となった。

III 職業性胆管癌などに関する疫学的調査

(16) 日本肝胆膵外科学会によるアンケート調査結果

全国アンケート調査の結果、50 歳未満の胆道癌症例のうち、印刷関係が 1.9%、機械関係が 1.8%であった。したがって、有機溶剤や化学薬品の曝露患者の頻度は高くなかったものの、これらが危険因子となりうることが示唆された。

IV 胆管癌の病態と診断

(17) 胆管癌に対する腫瘍マーカー

胆道癌の腫瘍マーカーを検討したところ、血清 DUPAN-2 値の精度が最も良好であった。職業性胆管癌症例でも DUPAN-2 値は測定された全例で陽性であり、血清 DUPAN-2 値の測定が職業性胆管癌のスクリーニングと診断に有用であると考えられた。

(18) 肝内胆管癌の危険因子

肝内胆管癌の危険因子を検討した結果、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）が肝内胆管癌の危険因子であることが明らかとなった。一方、生活習慣病を有する症例では年 2 回以上の γ -GTP 値や CA19-9 値の測定と画像診断が、早期の肝内胆管癌発見に有用であると考えられた。

(19) 胆管癌発癌における BillIN 病変の意義

上皮内腫瘍性病変を一括して *intraepithelial neoplasms of the bile duct (IENBs)* と呼び、IENBs を異型度別に *group A* (腫瘍性と考えられるが、悪性とは言えない病変)、*group B* (腫瘍性と考えられ、高異型度デスプラジアスあるいは上皮内癌と考えられる病変)、および *group C* (明らかな癌で、種々の分化度を示す)の 3つのカテゴリーに分類したところ、この分類は通常型胆管癌の発癌過程を病理学のおよび病態的に検討する上で有用であると考えられた。

V 職業性胆管癌に対する総合的診断法

以上の所見から、職業性胆管癌の診断には、1,2-DCP や DCM の曝露歴、自覚症状などの病歴、肝機能障害 (γ -GTP、AST、ALT など) と腫瘍マーカー (CA19-9、DUPAN-2) の上昇、腫瘍像に加えて限局性肝内胆管拡張像などの PSC に類似した特徴的な画像、胆管

内発育型肝内胆管癌や乳頭型肝外胆管癌、DNA 傷害を伴う慢性胆管傷害、BiIN および IPNB 病変などの病理所見、胆管周囲の高度の線維化、DNA メチル化亢進、高頻度の体細胞変異、ストランドバイアス、特徴的な三塩基配列の変異などの遺伝子異常などが重要な所見となると考えられる。

職業性胆管癌のスクリーニングには肝機能検査、腫瘍マーカーの測定および腹部超音波検査が有用で、それらに異常所見が見られた場合、続いて行われる CT や MRI による画像診断と、生検や細胞診による定診断と FDG-PET による進行度診断が必要となる。

職業性胆管癌の治療においては術後合併症が多いことと、広範囲の胆管の高い発癌ポテンシャルに起因する再発が問題となる。高体細胞変異数などの遺伝子学的特徴に関連して、職業性胆管癌は PD-1/PD-L1 を介して腫瘍免疫を回避していると考えられ、抗 PD-1 抗体を用いたがん免疫療法が新たな治療法として期待される。

A. 研究目的

1,2-ジクロロプロパン (1,2-DCP) やジクロロメタン (DCP) の曝露によると推定されている職業性胆管癌の臨床像、臨床検査所見、病理学的所見および分子生物学的特徴を検討し、通常の胆管癌症例のそれらと比較することにより、職業性胆管癌の特徴を明らかにする。また、分子生物学的検討により職業性胆管癌の発癌メカニズムの解明と新規バイオマーカーを検討する。さらに、臨床病理学的所見、分子生物学的所見、曝露状況やそれに関連した標準化罹患比 (SIR) の算出、健康診断結果の解析により、職業性胆管癌の総合的診断法を解明する。一方、治療成績や上記の検討から、職業性胆管癌に対する適切な治療法や新たな治療法について検討する。

B. 研究方法

I 職業性胆管癌の特徴

(1) 大阪の印刷事業場 S 社の元あるいは現従業員のうち DCM や 1,2-DCP に曝露したと考えられる従業員および健康管理手帳交付者 (1,2-DCP 業務従事者) に対して、

胆管がん特別外来で行った検診結果を検討した。

(2) 職業性胆管癌症例の臨床検査値の特徴や経時的変動について検討した。さらに DUPAN-2 を含めた胆管癌の腫瘍マーカーについて検討した。

(3) 職業性胆管癌症例における CT、MRI (Magnetic resonance cholangiopancreatography:MRCP を含む)、内視鏡的逆行性胆道造影、¹⁸F-Fluorodeoxy Glucose- Positron Emission Tomography (FDG-PET) などの画像所見の特徴について検討した。その際、これまでの研究で報告されている広範囲胆管の狭窄像や拡張像に着目した。また、FDG-PET 所見を検討した。

(4) 職業性胆管癌症例の臨床診断について後方視的に検討した。

(5) 職業性胆管癌症例の切除標本や病理解剖標本を用いた免疫組織学的検討を含む病理学的検討において、職業性胆管癌の発癌過程を検討した。

(6) 職業性胆管癌症例の切除標本を用いて、DNA メチル化について、免疫組織染色

によって DNA methyltransferase の発現を検討した。

(7) 胆管や肝細胞における CYP2E1 と GST T1-1 の分布について検討した。

(8) 職業性胆管癌症例の臨床病理学的所見と通常型胆管癌のそれらの所見を比較、検討した。

(9) 職業性胆管癌の外科治療成績と臨床病理学的所見の検討から、適切な治療法について考察した。

(10) 職業性胆管癌を含む胆管癌症例の胆汁中チオールと胆汁酸分析の検討から、職業性胆管癌症例の特徴を検討した。

(11) 職業性胆管癌症例と通常型胆管癌症例の癌部および非癌部標本を用いてメタボロームおよびトランスクリプトーム解析を行った。

(12) 職業性胆管癌症例の浸潤癌病変および他の病変（同時・異時多発病変、前癌病変）の FFPE 組織検体より DNA を抽出し、全エクソンシーケンス解析から体細胞変異プロファイル（変異数、DNA 塩基置換パターン）を解析した。

(13) 職業性胆管癌の切除標本を用いて、抗 PD-L1 抗体 (Abcam, clone 28-8), 抗 PD-1 抗体, 抗 CD8 抗体, 抗 CD163 抗体, 抗 S100 抗体を用いた免疫染色を行った。癌細胞のアポトーシスは TUNEL 法で評価した。これらの結果から、職業性胆管癌の癌免疫病態の解析と新たな治療法について考察した。

II 職業性胆管癌症例の曝露状況と標準化罹患比

(14) 職業性胆管癌患者の曝露濃度および曝露期間の推定と FID 付のガスクロマトグラフ (GC-FID) による 1,2-DCP の個人

曝露測定法について検討した。

(15) 1,2-DCP と DCM の月ごとの塩素系有機溶剤使用量と従事期間から 1,2-DCP と DCM の累積使用量を計算し、累積使用量別に標準化罹患比 (SIR) を算出した。

III 職業性胆管癌などに関する疫学的研究

(16) 日本肝胆膵外科学会による職業性胆管癌に関する疫学的研究が行われた。

IV 胆管癌の病態と診断

(17) 職業性胆管癌および通常型胆道癌の腫瘍マーカー、特に Duke Pancreatic Monoclonal Antigen Type 2 (DUPAN-2) の臨床的意義について検討した。(18) 胆管癌症例全体の検討から、職業性胆管癌以外の胆道癌発癌の危険因子を検討した。(19) 胆管癌の前癌病変である BiIIN の病態の解明を行うため、多数の通常型胆管癌(結節型/びまん型)症例を用い、BiIIN およびその関連病変の検討を行った。

V 職業性胆管癌に対する総合的診断法の確立

上記の結果から、職業性胆管癌に対する総合的診断法について検討した。

なお、本研究は、「印刷労働者にみられる胆管癌発症の疫学研究」(承認番号 2368)として大阪市立大学医学部倫理委員会および「ゲノム異常解析に基づく胆管癌の発生・進展の分子機構の解明」(承認番号 2840)として大阪市立大学ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理委員会の承認を得て行った。また、胆管癌等の職業性発癌の原因解明とバイオマーカー開発」のためヒトゲノ

ム・遺伝子解析に関する倫理指針に則り研究を計画し、国立癌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

（1）胆管がん特別外来と検診結果

大阪市立大学医学部附属病院では S 社での胆管癌多発事例を踏まえて、平成 24 年 8 月に胆管がん特別外来を設置し、1,2-DCP や DCM に曝露されたと推定される S 社従業員の検査や健診事業を開始した。次いで、平成 25 年 10 月に 1,2-DCP や DCM の曝露が原因と考えられる胆管癌が労災認定され、いわゆる職業性胆管癌と分類されるようになった。同時に 1,2-DCP に長期間曝露された従業員に対して健康管理手帳が交付され、それらの従業員に対する検診作業を開始した。

胆管癌がん特別外来設置以降、これまでに 72 名の元あるいは現従業員の検診および他院からの紹介患者の検査を行った。S 社の元および現従業員は 106 名と推定され、当院で検査された 72 名（うち 4 名は職業性胆管癌と診断）、すでに胆管癌を発症していた 13 名、他疾患ですでに死亡 1 例および他医療機関で検査を受けている 2 名の計 88 名の現在の医学的状況を把握しえた。他の従業員には通知はしたものの、連絡不能あるいは検診拒否などの種々の理由により当院での検診を行えなかった。労災認定された平成 25 年 10 月以降は 16 名の健康管理手帳交付者と 16 名の元あるいは現従業員の検診作業を継続している。

受診者の就業時の自覚症状として、頭痛、嘔気、嘔吐、皮膚炎などがみられ、同社で

の就業開始後、「お酒が飲めなくなった」、「飲酒すると、すぐに発赤がでるようになった」など肝での代謝障害（おそらく cytochrome P450 経路が飽和状態にあった）が考慮される訴えが複数例でみられた。また、 γ -GTP、AST、ALT などの肝機能異常や腹部超音波検査で胆管拡張像がみられた例では、CT や MRCP が行われた。この結果、平成 25 年 10 月までに当院において 3 例（15～17 例目）が職業性胆管癌と診断され、平成 25 年 10 月以降に 1 例（18 例目）が新たに職業性胆管癌と診断された。すなわち、胆管がん特別外来設置以降、4 例が新たに職業性胆管癌と診断された。

平成 25 年 10 月以降の検診において、健康管理手帳交付者のうち 4 例で職業性胆管癌の特徴である γ -GTP 持続高値例がみられ、うち 2 例では MRCP や CT による精査を行ったが、明らかな胆管癌の所見はみられなかった。一方、健康管理手帳交付対象ではない元あるいは現従業員に対する検診は 16 名に行われ、血清 γ -GTP 高値は 1 名にみられたが、血清 CA19-9 高値例はみられなかった。腹部超音波検査において脂肪肝、肝嚢胞、肝血管腫、胆石症や胆嚢ポリープなどがみられたが、胆管癌を示唆する異常所見はみられなかった。現在も引き続き検診を実施している。

これまでの S 社従業員に対する調査や検診の結果、同社従業員において胃癌 2 名（1 例はすでに死亡、1 例は検診実施中）、皮膚ポーエン病 1 名（検診実施中）および腎癌 1 名（他院で経過観察中）の既往を有する従業員が判明した。なお、腎癌の 1 名は、少量であったが、2014 年に International Agency for Research on Cancer (IARC) に

において発癌リスクが group 1 と改定されたトリクロロエチレンの曝露歴を有する可能性を否定できなかった。さらにトリクロロエチレンが原因と考えられた重症肝炎既往を有する 1 例がみられた (Kubo S, et al. J Occup Health 2015;57:87-90)。

(2) 職業性胆管癌症例の臨床検査値

S 社における職業性胆管癌 18 例の胆管癌診断時の臨床検査値 (表 1) をみると、全例で血清 γ -GTP 値が上昇し、AST および ALT 値は 18 例中 13 例で上昇していた (Kubo S, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2014;21:79-88)。総ビリルビン値は 18 例中 8 例で上昇していた。腫瘍マーカーでは血清 CA19-9 値が 13 例で上昇、CEA 値は 11 例で上昇していた。血清 DUPAN-2 値は基準値を 150 U/mL とすると DUPAN-2 が測定された 7 例中 5 例で上昇、後述するように 30 U/mL とすると 7 例全例で上昇していた。HBs 抗原および HCV 抗体陽性例はみられなかった。S 社以外の全国での職業性胆管癌症例では γ -GTP は 18 例全例、AST は 18 例中 14 例、ALT は 18 例中 15 例、CA19-9 は 18 例中 10 例、CEA は 18 例中 6 例で上昇していた。(Kubo S, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2014;21:809-817)

職業性胆管癌 9 例 (S 社 6 例および他の事業場 3 例) において、胆管癌診断までの連続した検診成績を検討した結果、胆管癌診断の数年前より γ -GTP の上昇がみられ、同時あるいはそれに遅れて AST、ALT が上昇していた (図 1) (Kubo S, et al. Surg Today 2016;46:705-712, Kubo S, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci

2014;21:809-817)。このような結果は、後述する病理所見等を考慮すると、慢性胆管傷害が胆管癌発症数年前より惹起されていたことを示すと考えられ、通常の胆管癌症例ではみられない職業性胆管癌の特徴と考えられる。

職業性胆管癌全例の腫瘍マーカーをまとめると (表 2)、CEA は 36 例中 17 例 (47.2%)、CA19-9 は 36 例中 23 例 (63.9%)、DUPAN-2 (基準値を 30 U/mL とすると) は 12 例中 12 例 (100%) で上昇しており、DUPAN-2 の成績が最も良好であったことから、血清 DUPAN-2 値の測定が職業性胆管癌の診断に有用であると考えられた。

これらの結果から、現時点では、総ビリルビン、AST、ALT、 γ -GTP 値に加えて腫瘍マーカーとして CA19-9 値の測定が職業性胆管癌のスクリーニングや診断に有用であると考えられるが、今後、血清 DUPAN-2 値の測定も考慮されてよいと考えられた。

(3) 職業性胆管癌症例の画像所見

職業性胆管癌の画像診断 (腹部超音波検査、CT、MRI) 上、肝内腫瘍像、胆管内腫瘍像、癌による胆管閉塞とその末梢胆管の拡張像に加えて、癌による胆管狭窄を伴わない限局性肝内胆管拡張像が特徴的であった (図 2)。2 例において経時的な画像診断の評価が可能であったが、胆管癌診断の数年前より限局性肝内胆管拡張像が出現し、徐々にその程度が増悪していたことが判明した (Kubo S, et al. J Occup Health 2014;56:317-322)。また、この癌による胆管狭窄を伴わない限局性肝内胆管拡張像は原発性硬化性胆管炎 (PSC) と類似した所見であった。この胆管像の描出には MRCP や

内視鏡的逆行性膵管胆道造影 (ERCP) が有用であった (図3)。このうち癌による胆管狭窄を伴わない限局性肝内胆管拡張像はS社の職業性胆管癌18例中7例にみられた。S社以外の職業性胆管癌症例においても同様の所見がみられる症例が存在した (Kubo S, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2014;21:809-817)。そこで、職業性胆管癌5例、通常型胆管癌8例、PSC6例および健常者8例のMRI像を比較・検討すると、腫瘤像は職業性胆管癌5例全例と通常型胆管癌4例に確認された (表3)。異常胆管像は職業性胆管癌とPSCの全例にみられたが、通常型胆管癌症例や健常者ではみられなかった。職業性胆管癌全例と通常型胆管癌8例中7例では1cm以上の胆管狭窄像が、PSC6例中5例では1cm未満の胆管狭窄像がみられた。肝内外両者の胆管狭窄像は職業性胆管癌2例とPSC3例にみられた。したがって、職業性胆管癌症例では、通常型胆管癌症例に見られる像とPSC症例に見られる像の両者がみられることが特徴であった (Koyama K, et al. Jpn J Radiology 2017;35:233-241)。

また、S社の職業性胆管癌18例全例で、腹部超音波検査上、腫瘤像、限局性肝内胆管拡張像を含む胆管拡張像、高輝度の胆管壁 (胆管壁の硬化像) や胆管内腫瘤像が確認された (図4)。これらの所見から職業性胆管癌のスクリーニングには非侵襲的な腹部超音波検査を含む) は腫瘤像や特徴的な胆管像の検出に有用であると考えられた。

S社の職業性胆管癌のうち、10例における治療前FDG-PET像を検討した。このうち7例では切除標本における病理像と比較検討した。その結果、主腫瘍は10例中6例において、リンパ節転移は5例中4例で

集積像がみられた (図3)。しかし、後述するように職業性胆管癌の特徴である Biliary intraepithelial neoplasia (BillIN) や Intraductal papillary neoplasm of the bile duct (IPNB) などの前癌病変あるいは早期癌病変は描出されなかった。したがって、FDG-PETは職業性胆管癌のステージングには有用であるが、前癌病変あるいは早期癌病変の診断に対する有用性は乏しいと考えられた。

なお、術中胆道内視鏡検査において、胆管内のポリポーシスや乳頭状増殖性病変が確認された症例がみられた (図5) (Kubo S, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2014;21:79-88)。

(4) 職業性胆管癌の臨床診断

S社の職業性胆管癌18例の受診のきっかけをみると、腹痛、黄疸などの自覚症状5例、検診での異常12例 (肝機能異常11例、画像診断での肝腫瘤2例)、他疾患加療中の肝機能異常1例であった。他の事業場の職業性胆管癌のうち詳細が判明している18例では、自覚症状14例、肝機能異常4例であった。

S社の職業性胆管癌18例では、腹部超音波検査、CTやMRIで異常所見がみられ、11例ではERCPや経皮経肝胆道ドレナージ (PTBD) が行われ、このうち9例では胆汁あるいは擦過細胞診などによって胆管癌と、4例では肝生検によって胆管癌と、2例では画像診断で胆管癌と確定診断された。他の1例では術中所見で胆管癌と確定診断された。他の事業場の18例中13例がERCPやPTBDによって、5例が画像診断によって胆管癌と確定診断された。したがって、

職業性胆管癌の診断には肝機能検査を含む血液検査や腹部超音波検査や CT などの画像診断での異常所見に続く ERCP、PTBD による細胞診や生検によって胆管癌の確定診断に至ると考えられた。以上から、職業性胆管癌では肝内腫瘤像、胆管内腫瘤像、癌の閉塞に伴う末梢側肝内胆管拡張および癌による胆管狭窄を伴わない限局性肝内胆管拡張像など PSC に類似したの所見がみられる場合、ERCP などによる細胞診や生検による確定診断 (図 6) や PET による進行度診断が必要となると考えられた (Kubo S, et al. Surg Today 2016;46:705-712)。

(5) 職業性胆管癌症例の病理学的所見

S 社の職業性胆管癌 18 例のうち、10 例が肝内胆管癌、6 例が肝外胆管癌、2 例が肝内および肝外胆管癌で、他の事業場の 19 例のうち、7 例が肝内胆管癌、8 例が肝門部胆管癌、4 例が肝外胆管癌であった (図 7)。いずれも総胆管から肝内第 3 次分枝までの比較的大型胆管が原発部位であった。

現在、職業性胆管癌と認定されている症例のうち、病理学的検討が可能であった 17 例の病理学的所見を解析した (Kinoshita M, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2016;23:92-101)。そのうち、切除標本の全断面 (最大 124 切片) を解析しえた 3 例において、全断面の病理学的所見と画像診断における胆管像を比較し、マッピングを施行した。この際、胆管や付属線の腫瘍性増殖、胆管消失像、胆管周囲の著明な硬化像 (線維化) などの慢性胆管傷害像と BilIN および IPNB 病変に着目した。その結果、主腫瘍は高分化から低分化腺癌を示す腫瘍形成型肝内胆管癌や胆管内発育型肝内胆管

癌であった。また、全例で主腫瘍以外に慢性胆管傷害像や BilIN 病変がみられ、多くの症例で IPNB 病変がみられた。切除標本の全断面を検討しえた 3 例では比較的大型胆管 (肝外胆管から肝内第 3 次分枝) のほとんどの部位で、慢性胆管傷害像、BilIN や IPNB 病変がみられた (図 8)。特に、以前より職業性胆管癌の画像的特徴と指摘されてきた PSC の胆管像に類似した、癌による胆管狭窄を伴わない限局性肝内胆管拡張像を示す胆管では BilIN と IPNB 病変や胆管癌の伸展がみられ、これらの病理学的変化が画像上での特徴と関連していると考えられた。

さらに、DNA 傷害を示す γ -H2AX による免疫組織学的検討を行うと、ほぼ正常に見える胆管、慢性胆管傷害、BilIN、IPNB および浸潤癌の部位に陽性であり、広範囲の胆管に DNA 傷害が生じていることが判明した。また、癌化を示す S100P による免疫組織学的検討を行うと、BilIN、IPNB と浸潤癌で陽性であり、BilIN や IPNB の段階で癌化がみられることが判明した (図 9)。すなわち、職業性胆管癌症例では広範囲の胆管で DNA 傷害がみられ、慢性胆管傷害から BilIN や IPNB の前癌病変を経て、浸潤癌に至る多段階発癌過程を示していると考えられた (Sato Y, et al. J Clin Experiment Pathol 2014;7:4745-4754, Kinoshita M, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2016; 23:92-101)。また、肝細胞には進行性の肝病変はみられなかった。

全国の職業性胆管癌症例のうち外科治療あるいは病理解剖が行われ、大型胆管の病理学的検討が可能であった 17 例では、全例に慢性胆管傷害像および BilIN 病変がみら

れ、IPNB 病変が多く症例で確認された。すなわち、広範囲の胆管に慢性胆管傷害や前癌病変が認められることが、事業場に関わらず DCM や 1,2-DCP の曝露による職業性胆管癌の病理学的特徴であることが判明した (Kinoshita M, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2016;23:92-101)。

職業性胆管癌症例の胆管硬化について、組織標本に含まれる主に隔壁レベルの肝内胆管を検討した。 α -smooth muscle actin (α -SMA) を用いた免疫染色では、職業性胆管癌の硬化した胆管周囲に α -SMA 陽性の紡錘形細胞を多数認め、この α -SMA 陽性細胞の分布状況は PSC に類似していた。対照とした閉塞性黄疸とウイルス性肝炎/肝硬変では胆管周囲に散在性に α -SMA 陽性細胞を認めるのみであった。肝実質の α -SMA 陽性細胞の分布は同一症例でも不均一であったが、ウイルス性肝炎/肝硬変で最も多くの陽性細胞を認めた。職業性胆管癌の肝実質での α -SMA 陽性細胞の分布は PSC と比較的類似しており、実質内の局所的に肝星細胞の活性化を認めた。閉塞性黄疸は検討した 4 群の中で最も肝星細胞の活性化が目立たなかった。シリウスレッド染色では、職業性胆管癌と PSC、閉塞性黄疸で胆管周囲に輪状の線維化を認め、これはウイルス性肝炎/肝硬変ではみられなかった。線維化の程度を比較すると、PSC と閉塞性黄疸では胆管周囲にほぼ同程度の膠原線維の沈着を認めたが、職業性胆管癌ではこの 2 つの疾患群より膠原線維化が明らかに緻密で、胆管硬化がより強い傾向にあった (図 10)。なお、S 社での職業性胆管癌 1 例が、胆管癌に対する外科治療後、胆管癌の再発はみられないものの肝不全で死亡したが、病理解剖の結果、胆管周囲を含む肝線維化の著明な進行がみられた (Tomimaru Y, et al.

Hepatol Res 2015;45:488-493)。したがって、DCM や 1,2-DCP の曝露終了から長期間を経ても胆管および胆管周囲の慢性炎症が持続していると考えられた。なお、胆嚢には前癌病変や浸潤癌はみられなかった。

(6) 職業性胆管癌における DNA メチル化の検討

DNA メチル化について DNMT3A、DNMT3B、DNMT1) の発現を非腫瘍部 (大型胆管上皮、胆管周囲付属腺)、および腫瘍部 (BiIN、IPNB、浸潤部) のそれぞれについて評価した。新規メチル化に関与する DNMT3A、DNMT3B の発現は、職業性胆管癌の胆管周囲付属腺、BiIN、浸潤癌の部位において対照群より有意に亢進していた。特に職業性胆管癌の胆管周囲付属腺における DNMT3A、DNMT3B の陽性頻度が高く、DNMT3A は職業性胆管癌の 86%、対照群の 27% の症例が陽性 ($p < 0.01$)、DNMT3B は職業性胆管癌の 86%、対照群の 7% の症例が陽性を示した ($p < 0.01$)。また、職業性胆管癌の非癌部の大型胆管上皮において、DNMT3A の陽性率は職業性胆管癌 50%、対照群 13% ($p = 0.056$) であり、対照群より高い傾向にあった (図 11)。メチル化維持に関与する DNMT1 の発現は、検討した疾患群のいずれにおいても非腫瘍部、腫瘍部とも陽性率は低かったが、職業性胆管癌の BiIN の部位において対照群より高い発現を示す傾向にあった (陽性率は職業性胆管癌 29%、対照群 0%; $p = 0.060$)。したがって、職業性胆管癌では DNA メチル化が亢進していると考えられた。すなわち、職業性胆管癌の多段階発癌の過程において DNA メチル化異常が蓄積し、エピジェネティックな発癌の素地が形

成されていると考えられた。

(7) 胆管や肝細胞における CYP2E1 および GST T1-1 の分布

正常の肝胆道系において、ジクロロメタンの代謝関連酵素である cytochrome P450 (CYP) 2E1 と theta-class glutathione S-transferase (GST) T1-1 の発現を免疫染色で検討した。CYP2E1 は肝細胞に恒常的に発現し、肝内外の胆管上皮に発現は認めなかった (図 12)。GST T1-1 は肝細胞に加えて肝内外の胆管上皮に明瞭な発現がみられたことから、GST T1-1 により胆管で 1,2-ジクロロプロパンやジクロロメタンの有害な中間代謝物が形成され、胆管癌の発生に関連したことが示唆された。

(8) 職業性胆管癌症例と通常型胆管癌症例との比較

当科および関連病院で切除された職業性胆管癌 (肝内胆管癌) 5 例と通常型で肝門型肝内胆管癌 46 例の臨床病理学的所見および治療成績を比較した。その結果、通常型肝内胆管癌に比較し、職業性肝内胆管癌では若年で、 γ -GTP 高値例、ICG15 分値低値例、血小板高値例が多かった。また、画像診断上、限局性肝内胆管拡張像や乳頭状増殖像が多くみられた。病理学的には、職業性肝内胆管癌において胆管内発育型が多く、BillIN、IPNB および慢性胆管傷害像が多くみられた (表 4)。切除後予後にはついては差がみられなかったが、観察期間が短く、今後の検討が必要である (Hamano G, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2016;2:389-396)。

過去の職業歴が検索可能な全国の労災病

院のデータベースを用いて、若年性胆管癌 (50 歳未満) と S 社の職業性胆管癌の臨床病理学的所見を比較した。労災病院のデータベースでは胆管癌の集団発生はみられなかった。若年性胆管癌症例に比較して、職業性胆管癌では肝内胆管癌が多く、臨床検査値異常を示す症例が多かった。また、職業性胆管癌で特徴的である限局性肝内胆管拡張像は、若年性胆管癌症例ではみられなかった (Kaneko R, et al. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:7195-7200)。

(9) 職業性胆管癌の治療成績

S 社の職業性胆管癌 18 例のうち、13 例では外科的治療が行われた。この 13 例のうち 4 例では胆管断端陽性であったため根治術は困難であった。13 例中 11 例ではリンパ節郭清あるいは領域リンパ節のサンプリングが行われ、4 例ではリンパ節転移が認められた。ゲムシタビンや TS-1 などを用いた補助化学療法は 9 例に、このうち胆管断端陽性であった 2 例では同部位に対して放射線治療が行われた。18 例中 5 例では進行癌の状態での胆管癌と診断されたため、外科的治療の適応はなく、化学療法あるいは保存的治療が行われたものの、5 例全例が癌死した。外科的治療が行われた 13 例のうち 6 例が癌死、1 例が胆管癌再発はみられなかったものの肝線維化の進行のより肝不全死した (Tomimaru Y, et al. *Hepatol Res* 2015;45:488-493)。残り 6 例中 3 例は再発がみられたもののそれぞれ加療され、現在、生存中である。

外科的治療が行われた全国の職業性胆管癌症例のうち、患者あるいは患者家族の承諾を得ることができた 20 例の外科治療成

績を検討した (Kubo S, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2016;2:556-564)。肝切除が 6 例、胆道再建を伴う肝切除が 9 例、膵頭十二指腸切除が 3 例、肝切除および膵頭十二指腸切除が 1 例、肝外胆管切除が 1 例に行われた。しかし、4 例が胆管断端癌陽性であり、そのうち 3 例では同部に放射線照射が行われた。術前および術後補助化学療法が 1 例に、術後補助化学療法が 12 例に行われた。術後、腹腔内感染 (9 例)、胆管空腸吻不全 (3 例)、胆汁漏 (1 例)、膵液瘻 (3 例)、術後出血 (2 例) などの合併症がみられた。比較的高い頻度の術後合併症の発症に、慢性胆管傷害が影響している可能性が考えられた。20 例中 13 例に胆管癌再発がみられたが、肝内多発再発が 2 例に、胆管断端再発が 5 例にみられた。他の 6 例では、原発部位とは異なる部位に単発の再発病巣がみられた。このうち 4 例に再切除やラジオ波焼灼術が施行されたが、再発部位と原発巣に連続性はみられず、多中心性再発が疑われた。また、詳細に検討した 1 例では胆管癌周囲に BilIN 病変がみられた (図 13)。再発 5 例中 2 例では再々発がみられ、再々切除が行われた。そのうち 1 例では腺癌に加えて、その周囲の胆管には胆管癌の前癌病変である BilIN が認められた。すなわち、この再々発病巣も多中心性発癌と考えられた。なお、この 5 例は現在、生存中である。職業性胆管癌の特徴として、広範囲の大型胆管の発癌ポテンシャルが亢進している病態から、根治手術後も多中心性再発のリスクが高いと考えられる。職業性胆管癌の経過から、再発巣に対しても積極的な治療が奏功する可能性が示唆されるとともに、長期間の経

過観察が必要であると考えられた。

(10) 胆汁中成分の分析

職業性胆管癌を含む胆道癌、総胆管結石、膵癌、肝癌症例において胆汁中チオール分析と胆汁酸濃度測定を行った。チオール分析ではほぼ全例において methionine と cystathione の割合は逆相関しており、メチオニン代謝過程において S-Adenosyl-methionine から homocysteine や cystathione への代謝動態を示していた。職業性胆管癌では 3 例中全例で酸化型 glutathione (glutathione disulfide) が全体の 40%を超えていたが、他の患者では低かった。これは酸化ストレスの亢進や慢性炎症を反映している可能性があり、職業性胆管癌の特徴と考えられた。胆汁酸分析では、職業性胆管癌症例では胆汁中 2 次胆汁酸が多い傾向にあった。

(11) メタボロームおよびトランスクリプトーム解析

職業性胆管癌と通常型胆管癌のメタボロームおよびトランスクリプトーム解析を比較したが、職業性胆管癌に特徴的な所見は得られなかった。

胆管癌発癌寄与していると考えられる分子を探索した。その結果、主成分分析によって、14 種の化合物、62 種の mRNA、17 種の miRNA が胆管癌、胆管癌非癌部、肝細胞癌、肝細胞癌非癌部の 4 群で発現パターンが異なっていた。それぞれの化合物、遺伝子の関連を明らかにするために、KEGG, RECTOME を用いて代謝経路解析を行ったところ (1) tRNA の合成、(2) amino acid 合成、(3) lipoprotein 合成

経路に関係していることがあきらかになった。特に aminoacyl t-RNA biosynthesis (ARS)が最も関与している可能性が高いことが明らかになった。

exosome 中の miRNA の発現パターンを解析したところ、胆管癌 Hiseq によって肝内胆管癌と肝細胞癌、正常肝それぞれのエクソソーム中の塩基は平均 770 万、880 万、800 万リード得られた。得られたリード数は 49 で、Q20 の精度であった (Q20=読み違い率は 1%)。解析に使用した miRNA は 36 種で診断率は 74.5%であった。lysyl-tRNA synthetase (KARS) および methionyl-tRNA synthetase (MARS) の上記 2 種の ARS を解析対象とした。miRNA による ARS の制御については、let-7b-5p、miR-29a-3p の過剰発現は細胞株によらず KARS, MARS の発現が亢進し、胆管癌細胞株で miR-122-5p の過剰発現は KARS の発現を抑制した。また、ARS に対する siRNA による細胞増殖効果は低容量の KARS で抑制効果があることが判明した。

(11) 職業性胆管癌症例の分子生物学的検討

職業性胆管癌 4 例の胆管癌や前癌病変の全シーケンス解析を行い、体細胞変異を同定した。また、体細胞変異データから体細胞変異プロファイルを解析した。

胆管癌は 1 メガベースペアのゲノムあたり平均 44.8 個 (44.8/Mb、範囲:7.8-80.5/Mb) の体細胞変異を有しており、通常型胆管癌 (平均 1.6/Mb、範囲:1.2-2.4/Mb) と比較して約 30 倍と高頻度に変異が誘発されていた (図 14)。胆道癌で高頻度に変異が見つかることから、胆道癌関連遺伝子として示唆さ

れている遺伝子群にも変異を有しており、ゲノム変異が発癌へ寄与していることを示す結果であった。一塩基置換変異の種類を集計すると C:G-to-T:A トランジション変異が優位で、これは通常型胆管癌と同様であったが、C:G-to-T:A 変異には、通常型胆管癌では見られない、転写共役修復を示唆するストランドバイアスが観察された。また、変異誘発における配列特異性を調べるため、変異部位前後 1 ベースペアを含めた三塩基配列の変異頻度を集計したところ (trinucleotide mutational pattern)、C:G-to-T:A 変異は GpCpY 配列 (アンダーラインは変異部位を示す、Y=C or T) に最も集中していることがわかり (GpCpY to GpTpY 変異)、この配列特異性は 4 症例すべてで共通していた (図 15)。最も突出していた GpCpY to GpTpY 変異を除いて集計を行うと、次点においても共通して変異が集中している配列があり、それは C:G-to-A:T 変異の NpCpY 配列、C:G-to-T:A 変異の NpCpY 配列 (アンダーラインは変異部位を示す、N=A or C or G or T、Y=C or T) であった (NpCpY to NpTpY or NpApY 変異)。ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 株を用いた再現実験により、1,2-DCP 曝露株において NpCpC to NpTpC 変異が高頻度に観察され、臨床例で観察された変異パターンの一部を再現した (図 16)。

前癌を含む別病変の解析においても、前癌、浸潤癌病変にかかわらず高頻度に変異が誘発されていた (平均 71.6/Mb、範囲:6.3-214.4/Mb)。同一症例の各病変間の体細胞変異の多くはそのほとんどが重複せず、各病変が異なるクローン起源、すなわち多中心性発癌であることが示唆された。また、

変異頻度のストランドバイアスが11病変中10病変で認められ、高濃度の変異原物質の曝露歴が示唆された。さらに、職業性胆管癌に特徴的な変異パターンである GpCpY to GpIpY 変異は11病変中9病変で共通に認められ、共通の変異原性ストレスが各病変に変異を誘発していることが示唆された。これらの結果は職業性胆管癌の病態を分子生物学的に明らかにするとともに、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。

(13) 職業性胆管癌の癌免疫病態

職業性胆管癌の10病変すべてにおいて癌細胞の細胞膜に PD-L1 の発現を認めた(図16)。対照とした肝内胆管癌では23例中1例(4%)、肝外胆管癌は45例中4例(8%)が PD-L1 陽性であった。癌細胞が PD-L1 陽性となる症例数は、職業性胆管癌が対照群より有意に多かった($p < 0.01$)。職業性胆管癌の初発と再発の手術材料を用いた検討では、癌における PD-L1 の発現強度は再発時の検体で明らかに強く、癌の陽性細胞の割合も再発時に高い傾向があった。職業性胆管癌では前癌/前浸潤性病変(BilIN, IPNB)もしばしば PD-L1 陽性を示した(図17)。BilIN 病変は7例中4例、IPNB 病変は4例中2例が PD-L1 陽性で、これは対照群より有意に高率であった($p < 0.05$)。PD-L1 は癌部に浸潤する単核細胞にも陽性となった。抗 CD163 抗体を用いた2重免疫染色で PD-L1 陽性単核細胞の多くは CD163 陽性を示し、PD-L1 発現細胞は腫瘍関連マクロファージと考えられた。また、少数だが PD-L1 と S100 に2重陽性を示す細胞もみられ、樹状細胞も PD-L1 を発現している可能性が示唆された。腫瘍間質に浸潤する PD-L1 陽性単核細胞

をカウントした結果、職業性胆管癌における PD-L1 陽性単核細胞数は肝内胆管癌、肝外胆管癌より有意に多かった($p < 0.01$)。

PD-1 の発現は癌部に浸潤する単核細胞に認めた。2重免疫染色による検討で PD-1 陽性細胞はほぼ全てが CD3 陽性を示し、Tリンパ球が PD-1 を発現していた。腫瘍間質に浸潤する PD-1 陽性リンパ球および CD8 陽性リンパ球をカウントすると、職業性胆管癌における腫瘍間質の PD-1 陽性リンパ球数、CD8 陽性リンパ球数はともに肝内胆管癌、肝外胆管癌より有意に多かった($p < 0.01$)。

職業性胆管癌(10病変)と肝外胆管癌(10例)を対象として、癌細胞のアポトーシスを TUNEL 法で検討した。癌細胞の TUNEL 標識率は職業性胆管癌 $0.6 \pm 0.5\%$ 、肝外胆管癌 $2.2 \pm 1.8\%$ であり、職業性胆管癌において癌細胞のアポトーシスは有意に抑制されていた($p < 0.05$)。

II 職業性胆管癌症例の曝露状況と標準化罹患比

(14) 厚生労働省が職業性胆管癌と認定した印刷労働者29人およびICカード製造労働者1人における1,2-DCP および DCM 曝露濃度を推定した。そこで対象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、洗浄剤の化学成分と使用量、洗浄時間、印刷機あるいはコーティング機の台数、作業場の換気量などに関する情報を、厚生労働省あるいは当該会社から収集し、それらの情報を基にした。

S社で胆管癌を発症した17人における1,2-DCP への曝露期間、曝露濃度および累積曝露量はそれぞれ平均9.5年(範囲6.2~15.1年)、214 ppm (85~276 ppm) お

よび 2044 ppm-年 (646~3409 ppm-年) と推定された。また DCM 曝露を受けた 11 人における DCM への曝露期間、曝露濃度および累積曝露量はそれぞれ平均 5.1 年(範囲 1.3~8.3 年)、191 ppm (80~268 ppm) および 864 ppm-年 (355~1282 ppm-年) と推定された(表 5)。

残りの 13 人中 12 人は印刷労働者であり、そのうち 9 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 190~560 ppm、DCM が 58~980 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 0~230 ppm、DCM が 15~470 ppm と推定された。一方、残りの印刷労働者 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。

他の 1 人は IC カードに接着剤および帯電防止剤をコーティングする業務に従事しており、コーティング機のロール洗浄に 1,2-DCP を使用していた。1,2-DCP の最高曝露濃度は 150 ppm と推定され、1 日労働時間の時間荷重平均濃度は 5~19 ppm と推定された。

2013 年に日本産業衛生学会は 1,2-DCP の許容濃度を 1ppm と定めた。本研究では、許容濃度の 1/10 の 0.1ppm から 10 倍の 10ppm までの標準ガスを作成し、FID 付のガスクロマトグラフ (GC-FID) を用いて測定できる方法を確立した。

(15) 塩素系有機溶剤累積使用量別胆管癌罹患リスク

胆管癌多発事例のみられた印刷会社の従

事者において、使用洗浄剤累積使用量を考慮した従事期間別に標準化罹患比 (SIR) を計算した。従業員 106 名を対象とし、観察開始は 1985 年 1 月またはそれ以降入社年月、観察終了は 2012 年 12 月またはそれ以前の胆管癌罹患年月とした。期待罹患数の計算には、地域癌登録のデータを基にした性年齢別罹患率全国推計値を使用した。対象部位は肝内胆管癌及び肝外胆管癌とした。2 種の洗浄剤 (DCM、1,2-DCP) の月ごとの使用量と従事期間から洗浄剤の累積使用量を計算し、累積使用量別に SIR を算出した。潜伏期間は 0 年、3 年、5 年の 3 通りを設定した。

従事者コホート全体 (胆管癌罹患 17 例) の SIR は 1132.5 (95% 信頼区間 659.7-1813.2) であった。DCM 累積使用量 0kg 群、1-19999kg 群、20000-kg 群における SIR は、潜伏期間なしとした場合、それぞれ 981.4、566.1、3822.8 と、DCM 累積使用量が多くなるほど高い傾向があり、潜伏期間 3 年および 5 年の場合も、947.9、721.0、3436.4 および 919.8、1019.4、2468.5 と同様の傾向であった。DCP 累積使用量 0kg 群、1-19999kg 群、20000-39999kg 群、40000-59999kg 群、60000kg 以上群における SIR は、潜伏期間なしとした場合、それぞれ 0.0、0.0、0.0、3590.7、14632.1 と、DCP 累積使用量が多くなるほど高い傾向があり、潜伏期間 3 年および 5 年の場合も、0.0、0.0、641.6、4158.6、14595.0 および 0.0、221.8、729.5、3690.7、15047.9 と同様の傾向であった。DCP、DCM の双方の累積使用量別の SIR は、胆管癌症例が少ないために 0.0 となるセルが出現するが、概ね DCM、DCP とともに正の量反応関係が観

察され、いずれの潜伏期においてもほぼ同様の結果となった。

潜伏期 5 年として、1,2-DCP の累積使用量別を 0-39999kg、40000-59999kg、60000kg と分けた場合の胆管癌罹患相対リスクは、1.00 (基準群)、12.68(95%信頼区間 6.67-22.03)、51.68 (95 % 信頼区間 31.11-81.07)となった。

III 職業性胆管癌などに関する疫学的調査

(16) 日本肝胆膵外科学会によるアンケート調査結果

S社従業員の職業性胆管癌症例が 50 歳未満であったこと、および一般的に 50 歳未満の胆道癌は頻度が少ないことから、日本肝胆膵外科学会では 1997 年から 2011 年までの 50 歳未満の胆道癌症例について全国アンケート調査を行った。その結果、1472 例の 50 歳未満の胆道癌が集計され、これは胆道癌全体の 3.8%であった。このうち、777 例についてその詳細な情報を得た。777 例中、164 例が肝内胆管癌、310 例が肝外胆管癌、88 例が乳頭部癌、213 例が胆嚢癌、2 例が不明であり、652 例に対して外科的治療が行われた。背景因子をみると、肝内胆管癌には C 型肝炎、B 型肝炎、肝内結石症が多く、胆嚢癌、肝外胆管癌には膵・胆管合流異常、先天性胆道拡張症や胆嚢結石が多くみられた。職業歴をみると、印刷関係 15 例 (1.9%)、機械関係 14 例 (1.8%) が多くみられた。有機溶剤の曝露は 20 例 (2.6%) にみられ、5 年以上が 16 例と多数を占めた。また、化学薬品の曝露が 17 例 (2.2%) にみられ、農薬の曝露が 18 例 (2.3%) にみられた。したがって、50 歳未満の胆道癌症例のうち、有機溶剤や化学薬

品の曝露患者の頻度は高くなかったものの、これらが危険因子となりうる可能性が示唆された。

ちなみに当科における 1997 年から 2011 年までの胆道癌切除例は 256 例で、このうち 12 例 (4.7%) が 50 歳未満であり、その背景因子は膵・胆管合流異常、アルコール性肝障害、慢性 B 型肝炎、胆石症、胆嚢ポリープおよび印刷事業場であった。

IV 胆管癌の病態と診断

(17) 胆管癌に対する腫瘍マーカー

胆道癌における腫瘍マーカーである血清 CEA、CA19-9 および DUPAN-2 値の臨床的意義について検討した。胆道癌 83 例および良性胆道疾患 24 例において、血清 CEA、CA19-9 および DUPAN-2 値を測定した。それらの腫瘍マーカーの精度を検討すると、CEA の AUC は 0.660 (95%CI は 0.556-0.764) 、 CA19-9 は 0.7 (0.693-0.867) 、 DUPAN-2 は 0.818 (0.742-0.893) で、DUPAN-2 が最も良好であった。DUPAN-2 のカットオフ値を 30 U/ml とすると、胆道癌診断の sensitivity は 74.8%、specificity は 83.3%であった。CA19-9 および CEA の sensitivity と specificity は 54.2%、88.6%と 24.1%、91.4%であった。また、CA19-9 (>37 U/ml) と DUPAN-2 を組み合わせると、sensitivity は 81.9%、specificity は 74.3%となり、従来の CEA と CA19-9 の組み合わせの sensitivity 59.0%、specificity 85.7%より良好であった。なお、職業性胆管癌症例では、CEA は 36 例中 17 例 (47.2%)、CA19-9 は 36 例中 23 例 (63.9%)、DUPAN-2 は 12 例中 12 例 (100%) で上昇しており、

DUPAN-2 の成績が最も良好であった。以上から、血清 DUPAN-2 値の測定が職業性胆管癌のスクリーニングと診断に有用であると考えられた。

(18) 肝内胆管癌の危険因子

肝内胆管癌の危険因子を検討した結果、肝内胆管癌切除 88 例のうち、C 型肝炎が 28 例、アルコール多飲が 11 例、B 型肝炎が 6 例、肝内結石症が 5 例、塩素系有機溶剤曝露（職業性胆管癌）が 4 例、残りの 34 例が原因不明であった。その 34 例中 15 例に病理学的に非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）が確認された。転移性肝癌を対照として、胆管癌に対する危険因子について多変量解析を行うと、NASH は Odds ratio 3.36 (95% CI, 1.15-10.2)、 $p = 0.269$ であり、NASH が肝内胆管癌の危険因子であることが明らかとなった (Kinoshita M, et al. *J Surg Oncology* 2016;113:779-783)。

一方、糖尿病、高血圧、脂質異常症の生活習慣病に対して定期的な経過観察をされていた 16 例では、他の群と比較して、比較的早期の段階で肝内胆管癌が発見され、術後成績も良好であった。したがって、生活習慣病を有する症例では年 2 回以上の γ -GTP 値や CA19-9 値の測定と画像診断が、早期の肝内胆管癌発見に有用であると考えられた (Nishioka T, et al. *Liver Cancer* 2016;5:107-120)。

(19) 胆管癌発癌における BiIN 病変の意義

上皮内腫瘍性病変を一括して intraepithelial neoplasms of the bile duct (IENBs) と呼び、種々の形態学的、免疫組織

化学的検討を行った。IENBs を異型度別に Group A (腫瘍性と考えられるが、悪性とは言えない病変)、group B (腫瘍性と考えられ、高異型度デスプラジアあるいは上皮内癌と考えられる病変)、および group C (明らかな癌で、種々の分化度を示す)の 3つのカテゴリーに分類した。IENB は通常型胆管癌 57 例中 31 例にみられた。Group C が 26 例に、group B が 22 例に、group A が 16 例にみられた。MIB-1 指数や癌関連マーカーの発現は、group A と group B に比べ、浸潤性癌部および group C で高値であった。Group A と group B は前浸潤性病変である BiIN に相当すると考えられ、group C は cancerization に相当する病変と考えられた。この分類は、いわゆる通常型胆管癌の発癌過程を病理学のおよび病態的に検討する上で、貴重な分類と考えられた。

V 職業性胆管癌に対する総合的診断法の確立

以上の所見から、職業性胆管癌の診断には、1,2-DCP や DCM の曝露歴、自覚症状などの病歴、肝機能障害 (γ -GTP、AST、ALT など) と腫瘍マーカー (CA19-9、DUPAN-2) の上昇、腫瘍像に加えて限局性肝内胆管拡張像などの PSC に類似した特徴的な画像、胆管内発育型肝内胆管癌や乳頭型肝外胆管癌、DNA 傷害を伴う慢性胆管傷害、BiIN および IPNB 病変などの病理所見、胆管周囲の高度の線維化、DNA メチル化亢進、高頻度の体細胞変異、ストランドバイアス、特徴的な三塩基配列の変異などの遺伝子異常などが重要な所見となると考えられる。

職業性胆管癌のスクリーニングには肝機

能検査、腫瘍マーカーの測定および腹部超音波検査が有用で、それらに異常所見が見られた場合、続いて行われる CT や MRI による画像診断と、生検や細胞診による確定診断と FDG-PET による進行度診断が必要となる。

D. 考察

平成 25 年 10 月、厚生労働省は閉ざされた空間での作業によって、1,2-DCP や DCM の高濃度、長期間曝露によって発症したと推定される胆管癌をいわゆる労災認定し、これらの胆管癌が職業性胆管癌と認識されるに至った。本研究においては、胆管癌罹患リスクが 1,2-DCP や DCM の累積使用量に従って上昇することを示し、疫学的観点からもこれらの溶剤が職業性胆管癌の原因である根拠が明確となった。また、このことは 1,2-DCP や DCM の曝露状況の把握は職業性胆管癌の認定や発症リスクの推定に重要であることを示した。

大阪市立大学では早い段階で胆管がん特別外来を設置し、引き続いて 1,2-DCP に曝露された従業員に対する検診を行うことにより、4 例の新たな職業性胆管癌患者の治療にあたりるとともにハイリスク従業員の経過観察が可能となった。

職業性胆管癌症例では就業中、嘔気、嘔吐、食欲不振、皮膚炎などの一般的な症状に加えて飲酒時の発赤増強などの特徴的な症状がみられた。また、診断時、 γ -GTP、AST、ALT などの肝機能検査値の異常がみられたが、過去の検診結果を評価し得た従業員では数年前からこれらの異常が指摘されており、慢性胆管傷害を反映していると考えられた。腫瘍マーカーでは血清 CA19-9

や DUPAN-2 値が上昇していた症例が多かった。また、同時に数年前より画像診断においても PSC に類似した限局性肝内胆管拡張像を確認しえた症例があり、職業性胆管癌診断における極めて重要な所見と考えられた。画像診断では腹部超音波検査、CT、MRI が有効であったが、なかでも腹部超音波検査は全例で異常所見がみられ、非侵襲的であることから、健康管理手帳による検診において、 γ -GTP、AST、ALT、CA19-9 値や腹部超音波検査が行われていることは妥当であると考えられる。本研究では血清 DUPAN-2 値の測定も有効であることが示されたので、今後、検診における DUPAN-2 値測定の意義についても検討し、その結果で血清 DUPAN-2 値の追加を検討してもよいかもしれない。

病理学的所見においては、浸潤癌に加えて広範囲の胆管に慢性胆管傷害や前癌病変や早期癌病変である BiIN や IPNB 病変がみられ、それらの病変では DNA 傷害がみられることが判明した。また、症例数は少ないものの同部では同様の遺伝子変異がみられることも明らかとなった。すなわち、同一の原因によって広範囲の胆管上皮に遺伝子変異が惹起され、それが前癌病変を経て浸潤癌に致る多段階発癌過程を示すと考えられまた。また、同一患者でも複数の病変や異時性の病変によっても同一の遺伝子変異がみられるとともに、他の塩基配列は異なることから、多中心性発癌を来していると考えられた。このことが、職業性胆管癌における最も重要な所見であり、バイオマーカーとなるとともに、術後合併症発症や多中心性再発などの治療を困難にする大きな要因となっていると考えられた。ただ

し、検討し得た症例は限られており、このような所見が職業性胆管癌に普遍的にみられるものか今後の検討が必要である。

以上の所見から、職業性胆管癌の診断には、1,2-DCP や DCM の曝露歴、自覚症状などの病歴、肝機能障害 (γ -GTP、AST、ALT など) と腫瘍マーカー (CA19-9、DUPAN-2) の上昇、腫瘍像に加えて限局性肝内胆管拡張像などの PSC に類似した特徴的な画像、胆管内発育型肝内胆管癌や乳頭型肝外胆管癌、DNA 傷害を伴う慢性胆管傷害、BilIN および IPNB 病変などの病理所見、胆管周囲の高度の線維化、DNA メチル化亢進、高頻度の体細胞変異、ストランドバイアス、特徴的な三塩基配列の変異などの遺伝子異常などが重要な shokenn となると考えられる。

職業性胆管癌症例では高頻度に遺伝子異常がみられることと関連して、多くの職業性胆管癌症例で抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体陽性であることから、免疫チェックポイント阻害剤が新たな治療として期待される。職業性胆管癌の治療に大きく貢献する可能性があり、今後の検討課題である。

E. 研究発表

1. 論文発表

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-se-

ries of 17 patients with cholangiocarcinoma among young adult workers of a printing company in Japan. *Journal of Hepatobiliary Pancreatic Sciences* 2014;21:479-488

2. 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* 2014;7:4745-4754

3. 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, Kobayashi 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 Hepatobiliary Pancreatic Sciences* 2014;21:809-817

4. 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* 2014;60:39-44

5. 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* 2014;56:317-322
6. Kumagai S, Kurumatani N, Arimoto A, Ichihara G. Time course of blood parameters in printing workers with cholangiocarcinoma. *J Occup Health*. 2014;56:279-284
7. Yamada K, Kumagai S, Nagoya T, Endo G. Chemical exposure levels in printing workers with cholangiocarcinoma. *J Occup Health* 2014;56:332-338
8. Kubo S, Matsuzaki K, Seki T, Ohsawa M, Kumagai S, Endo G. Severe acute hepatitis in a printing company worker: a case study. *J Occup Health* 2015;57:87-90
9. Yamada K, Kumagai S, Endo G. Chemical exposure levels in printing workers with cholangiocarcinoma (second report). *J Occup Health* 2015;57:245-252
10. Sobue T, Utada M, Makiuchi T, Ohno Y, Uehara S, Hayashi T, Sato KK, Endo G. Risk of bile duct cancer among printing workers exposed to 1,2-dichloropropane and/or dichloromethane. *J Occup Health* 2015;57:230-236
11. Yamada K, Kumagai S, Kubo S, Endo G. Chemical exposure levels in printing and coating workers with cholangiocarcinoma (Third report). *J Occup Health* 2015;57:565-571
12. Kubo S. Re:Occupational cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2015;22:E2-E3
13. Kaneko R, Kubo S, Sato Y. Comparison of Clinical Characteristics between Occupational and Sporadic Young-Onset Cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16:7195-7200
14. Murakami Y, Kubo S, Tamori A, Itami S, Kawamura E, Iwaisako K, Ikeda K, Kawada N, Ochiya T and Y-h Taguchi. Comprehensive analysis of transcriptome and metabolome analysis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma Scientific Report 2015;5:16294
15. Kinoshita M, Kubo S, Nakanuma Y, Sato Y, Takemura S, Tanaka S, Hamano G, Ito T, Terajima H, Yamada T, Nakamori S, Arimoto A, Fujikawa M, Sugawara Y, Yamamoto T, Abue M, Nakagawa K, Unno M, Mizuguchi T, Takenaka K, Shirabe K, Shibata T. Pathological spectrum of bile duct lesions from chronic bile duct injury to invasive cholangiocarcinoma corresponding to bile duct imaging findings of occupational cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2016;23:92-101
16. Mimaki S, Totsuka Y, Suzuki Y, Nakai C, Goto M, Kojima M, Arakawa H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Kinoshita M, Matsuda T, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Kubo S, Nakamori S, Esumi H, Tsuchihara K. Hypermutation and unique mutational si

- gnatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. *Carcinogenesis* 2016;37:545-552
17. Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Nishioka T, Kinoshita M, Hamano G, Ito T, Yamamoto T, Abue M, Aoki M, Nakagawa K, Hijioka S, Miyamoto A, Osaki Y, Endo G, Kumagai S. Screening and surveillance for occupational cholangiocarcinoma in workers exposed to organic solvents. *Surg Today* 2016;46:705-712
18. Hamano G, Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Kinoshita M, Ito T, Yamamoto T, Wakasa K, Shibata T. Comparison of clinicopathological characteristics between patients with occupational and non-occupational intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2016;23:389-396
19. Kumagai S, Sobue T, Makiuchi T, Kubo S, Uehara S, Hayashi T, Sato KK, Endo G. Relationship between cumulative exposure to 1,2-dichloropropane and incidence risk of cholangiocarcinoma among offset printing workers. *Occupational and Environmental Medicine* 2016;73:545-552
20. Kinoshita M, Kubo S, Tanaka S, Takemura S, Nishioka T, Hamano G, Ito T, Koda M, Aota T, Tanaka S, Kuwae Y, Osawa M, Shibata T. The association between non-alcoholic steatohepatitis and intrahepatic cholangiocarcinoma: A hospital based case-control study. *Journal of Surgical Oncology* 2016;113:779-783
21. Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Kinoshita M, Hamano G, Ito T, Koda M, Aota T, Yamamoto T, Terajima H, Tachiyama G, Yamada T, Nakamori S, Arimoto A, Fujikawa M, Tomimaru Y, Sugawara Y, Nakagawa K, Unno M, Mizuguchi Y, Takenaka K, Kimura K, Shirabe K, Saiura A, Uesaka K, Taniguchi H, Fukuda A, Chong JM, Kuwae Y, Ohsawa M, Sato Y, Nakanuma Y. Outcomes after resection of occupational cholangiocarcinoma. *Journal of Hepato-Biliary Pancreatic Sciences* 2016;23:556-564
22. Nishioka T, Kubo S, Tanaka S, Wakasa K, Takemura S, Kinoshita M, Hamano G, Kuwae Y, Shibata T, Suehiro S. Outcomes of hepatic resection in intrahepatic cholangiocarcinoma patients with diabetes, hypertension, and dyslipidemia: significance of routine follow-up. *Liver Cancer* 2016;5:107-120
23. Sato Y, Kinoshita M, Takemura S, Tanaka S, Hamano G, Nakamori S, Fujikawa M, Sugawara Y, Yamamoto T, Arimoto A, Yamamura M, Sasaki M, Harada K, Nakanuma Y, Kubo S. The PD-1/PD-L1 may be aberrantly activated in occupational cholangiocarcinoma. *Pathology International* 2017;67:163-170
24. Koyama K, Kubo S, Ueki A, Shimono T, Takemura S, Tanaka S, Kinoshita M, Hamano G, Miki Y. MR imaging of

occupational cholangiocarcinoma developing in printing company workers. *Japanese Journal of Radiology* 2017;35:233-241

25. 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* 2014;111:500-509

26. 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一. 胆膵の病態生理 2014;30:1-4

27. 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* 2014;28:763-771

28. 中沼安二、角田優子、佐藤保則、久保正二. 職業性暴露（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* 2014;69:1079-1085

29. 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. *胆道* 2014;28:696-702

30. 久保正二、竹村茂一、田中肖吾、木下正彦、濱野玄弥、伊藤得路、青田尚哲、江田将樹、中沼安二、圓藤吟史. 職業性胆管癌症例の臨床的特徴. *産業医学レビュー* 2015;28:139-146

31. 久保正二、竹村茂一、田中肖吾、新川寛二、木下正彦、濱野玄弥、伊藤得路、青田尚哲、江田将樹、佐藤保則、中沼安二. 腫瘍性コランギオパチー（胆道腫瘍）職業性胆管癌の病態とその特徴. *肝胆膵* 2015;71:877-885

32. 久保正二、竹村茂一、田中肖吾、新川寛二、木下正彦、濱野玄弥、伊藤得路、青

田尚哲、江田将樹、上西崇弘. 肝内胆管癌の疫学的動向と危険因子。外科 2016;78:115-121

33. 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* 2015;112:1341-1347

34. 木村光一、調 憲、久保正二、伊藤心二、播本憲史、山下洋市、吉住朋晴、相島慎一、小田義直、前原喜彦. 印刷業勤務を背景に発症した肝内胆管癌の1例. *胆道* 2015;29:972-977

35. 久保正二、竹村茂一、田中肖吾、新川寛二、西岡孝芳、木下正彦、濱野玄弥、伊藤得路、中沼安二、圓藤吟史. 職業性胆管癌の臨床的特徴. *日本職業・災害医学会会誌* 2016;64:1-5

2. 学会発表

1. Kinoshita M, Takemura S, Sakata C, Tanaka S, Urata Y, Nishioka T, Nozawa A, Hamano G, Ito T, Nakanuma Y, Arimoto A, Nakamori S, Terajima H, Kubo S. Outcomes of treatment intrahepatic cholangiocarcinoma among young workers at a printing company. Daegu-Kansai HBP Surgeons Joint Meeting 2014

2. Tsuchihara K, Hypermuation in cholangiocarcinoma of offset color proof-printing workers. 4th Asian Conference on Environmental Mutagens. 2014

3. 木下正彦、竹村茂一、坂田親治、浦田順久、西岡孝芳、野沢彰紀、濱野玄弥、伊藤

- 得路, 中森正二, 豊川秀吉, 有本 明, 田中省吾, 久保正二. 印刷労働者関連胆管癌症例における FDG-PET 像. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014
4. 浦田順久, 祝迫恵子, 西岡孝芳, 野沢彰紀, 木下正彦, 濱野玄弥, 伊藤得路, 坂田親治, 竹村茂一, 久保正二. オフセット校正印刷会社関連胆管癌切除例の病理組織学的検討. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014
5. 佐藤保則, 原田憲一, 佐々木素子, 久保正二, 中沼安二. 胆道癌とその前癌病変における DNA 損傷に関する病理的検討. 第 50 回日本肝癌研究会 2014
6. 木下正彦, 竹村茂一, 坂田親治, 田中肖吾, 新川寛二, 浦田順久, 西岡孝芳, 野沢彰紀, 濱野玄弥, 伊藤得路, 中沼安二, 有本 明, 中森正二, 寺嶋宏明, 久保正二. 印刷事業場関連肝内胆管癌の治療成績. 第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2014
7. 吉田 寛, 海野倫明, 久保正二, 宮川秀一, 山上裕機. 若年者胆道癌の発症要因に関する研究-日本肝胆膵外科学会プロジェクト委員会 胆 04 研究-. 第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2014
8. 木下正彦, 中沼安二, 竹村茂一, 坂田親治, 浦田順久, 西岡孝芳, 野沢彰紀, 濱野玄弥, 伊藤得路, 久保正二. 印刷労働者関連胆管癌症例における画像所見および病理組織像の検討. 第 69 回日本消化器外科学会総会 2014
9. 濱野玄弥, 竹村茂一, 坂田親治, 浦田順久, 西岡孝芳, 野沢彰紀, 木下正彦, 伊藤得路, 久保正二. 印刷労働者関連胆管癌と他の胆管癌の臨床病理学的比較. 第 69 回日本消化器外科学会総会
10. 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
11. 木下正彦, 中沼安二, 竹村茂一, 坂田親治, 田中肖吾, 新川寛二, 浦田順久, 西岡孝芳, 野沢彰紀, 濱野玄弥, 伊藤得路, 江田将樹, 水口 徹, 久保正二. 印刷労働者関連胆管癌症例における病理学的特徴. 第 50 回日本胆道学会学術集会 2014
12. 久保正二, 竹村茂一, 田中肖吾, 中沼安二, 熊谷信二, 圓藤吟史. 職業性胆管癌の臨床的特徴. 第 62 回日本職業・災害医学会学術大会 2014
13. Hamano G, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Nishioka T, Kinoshita M, Ito T, Koda M, Aota T, Yamamoto T, Wakasa K, Kubo S. Comparison of clinicopathological characteristics between in the patients with occupational and non-occupational intrahepatic cholangiocarcinoma. The 2nd Kansai-Yeungnam HBP Surgeons Joint Meeting 2015
14. Kinoshita M, Nakanuma Y, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Nishioka T, Hamano G, Ito T, Koda M, Kubo S. Radiological and pathological characteristics in occupational cholangiocarcinoma developing among young workers at a printing company in Japan. The 2nd Kansai-Yeungnam HBP Surgeons Joint Meeting 2015
15. 久保正二. 職業性胆管癌の現況. 第 43 回近畿肝臓外科研究会 2015

16. 木下正彦, 中沼安二, 竹村茂一, 田中肖吾, 新川寛二, 西岡孝芳, 濱野玄弥, 伊藤得路, 江田将樹, 久保正二. これまでの職業性胆管癌症例の検討-大阪での 17 例と新規労災認定 9 例の比較-第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015
17. 久保正二, 上西崇弘, 竹村茂一. 肝内胆管癌の治療成績と戦略. 第 51 回日本肝臓学会総会 2015
18. 久保正二. 職業性胆管癌の病態と対策. 第 70 回日本消化器外科学会総会 2015
19. 三牧幸代, 戸塚ゆ加里, 落合淳志, 久保正二, 中森正二, 中釜 斉, 江角浩安, 土原一哉. 印刷業従業員胆管癌のゲノム変異より明らかとなった変異原物質の特徴. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015
20. 木下正彦, 中沼安二, 竹村茂一, 佐藤保則, 田中肖吾, 新川寛二, 西岡孝芳, 濱野玄弥, 伊藤得路, 青田尚哲, 江田将樹, 久保正二. 当科における職業性胆管癌切除症例の病理学的検討. 第 13 回日本消化器外科学会大会 2015
21. 久保正二. 職業性胆管癌の臨床的および病理学的検討. 第 18 回大阪胆道疾患研究会 2015
22. 土原一哉. 網羅的ゲノム解析よりあきらかになった印刷工場関連胆管癌遺伝子変異の特徴. フォーラム2015衛生薬学・環境トキシコロジー. 2015
23. Kinoshita M, Takemura S, Tanaka S, Hamano G, Ito T, Koda M, Aota T, Tanaka S, Ohsawa M, Kubo S. The association between non-alcoholic steatohepatitis and intrahepatic cholangiocarcinoma. 25th Annual Conference of Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2016
24. Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Kinoshita M, Hamano G, Nakanuma Y, Sato Y, Mimaki S, Tsuchihara K. The 7th Asia-Pacific Primary Liver Cancer Expert Meeting. 2016
25. 久保正二. 職業性胆管癌の臨床と対策. 第 52 回日本肝臓学会 2016
- 濱野玄弥, 竹村茂一, 田中肖吾, 新川寛二, 木下正彦, 伊藤得路, 青田尚哲, 江田将樹, 山本隆嗣, 久保正二. 職業性肝内胆管癌と非職業性肝内胆管癌との臨床病理学的比較. 第 71 回日本消化器外科学会総会 2016
26. 木下正彦, 竹村茂一, 田中肖吾, 濱野玄弥, 伊藤得路, 江田将樹, 青田尚哲, 田中さやか, 大澤政彦, 久保正二. 肝切除症例からみた肝内胆管癌と非アルコール性脂肪性肝炎の関連性. 第 71 回日本消化器外科学会総会 2016
27. 伊藤得路, 竹村茂一, 田中肖吾, 木下正彦, 濱野玄弥, 青田尚哲, 石原 敦, 新川寛二, 久保正二. 胆道癌に対する DUPAN-II 測定の有効性について. 第 71 回日本消化器外科学会総会 2016
28. 三牧幸代, 中森正二, 久保正二, 木下正彦, 戸塚ゆ加里, 中釜 斉, 落合淳志, 江角浩安, 土原一哉. 職業性胆管癌症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較. 第 75 回日本癌学会学術集会 2016
29. 木下正彦, 竹村茂一, 田中肖吾, 新川寛二, 濱野玄弥, 伊藤得路, 江田将樹, 青田尚哲, 久保正二. 職業性胆管癌の手術成績. 第 14 回日本消化器外科学会大会 2016
30. Ito T, Tanaka S, Takemura S, Hamano G, Kurashima Y, Koda M, Aota T,

Kubo S. The clinical significance of the serum concentration of Dupan-2 in biliary tract cancer. The 4th Kansai-Yeungnam HBP Surgeons Joint Meeting 2017

F. 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**

1. 検診結果と職業性胆管癌の臨床病理学的特徴

研究代表者	久保正二（大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵外科学）
研究分担者	石河 修（大阪市立大学医学部附属病院） 平川弘聖（大阪市立大学医学部附属病院） 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） 首藤太一（大阪市立大学大学院医学研究科総合医学教育学・ 医学部附属病院総合診療センター） 中沼安二（福井済生会病院病理診断科）
研究協力者	竹村茂一、田中肖吾、新川寛二、西岡孝芳、木下正彦、 濱野玄弥、伊藤得路、倉島夕紀子、青田尚哲、江田将樹 （大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵外科学） 村上善基、川村悦史、打田佐和子、榎本 大、萩原淳司、 藤井英樹、小塚立蔵、元山宏行、寺西優雅（大阪市立大学 大学院医学研究科肝胆膵病態内科学） 森川浩安（大阪市立大学大学院医学研究科先端予防医療学） 佐藤恭子、圓藤吟史（大阪市立大学大学院医学研究科産業医学） 小山孝一、三木幸雄（大阪市立大学大学院医学研究科放射線診 断学・IVR学/放射線腫瘍学） 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） 金子麗奈（関東労災病院消化器内科） 南山幸子（京都府立大学大学院生命環境科学研究科）

内容要旨

（1）大阪市立大学医学部附属病院に胆管がん特別外来を設置以来、大阪の印刷事業場 S 社の元および現従業員 72 名の検診を行った。平成 25 年 10 月の労災認定以降は 16 名の健康管理手帳交付者および 16 名の元あるいは現従業員の検診作業を行っている。この検診等において、これまでに 4 例が職業性胆管癌と診断された。また、S 社において胃癌 2 名、皮膚ボーエン病 1 名および腎癌 1 名が存在したことが判明した。塩素系有機溶剤曝露時に、頭痛、嘔気、嘔吐、皮膚炎などがみられた。

（2）職業性胆管癌症例の臨床検査値では γ -GTP、AST、ALT 値が上昇していた。CEA は 36 例中 17 例、CA19-9 は 36 例中 23 例、DUPAN-2（基準値を 30 U/mL とすると）は 12 例中全例で上昇しており、血清 DUPAN-2 値の成績が最も良好であった。

(3) 職業性胆管癌の画像診断（腹部超音波、CT、MRI）上、肝内腫瘤像、胆管内腫瘤像、癌による胆管閉塞とその末梢胆管の拡張像に加えて、癌による胆管狭窄を伴わない限局性肝内胆管拡張像が特徴的であった。この特徴的な所見は原発性硬化性胆管炎（PSC）と類似した所見であった。したがって、職業性胆管癌症例では通常型胆管癌症例に見られる像と PSC 症例に見られる像の両者がみられることが特徴であった。また、S 社の職業性胆管癌 18 例全例で、腹部超音波検査上、異常所見が確認された。このことは職業性胆管癌のスクリーニングには非侵襲的な腹部超音波検査が、CT、MRI は腫瘤像や特徴的な胆管像の検出に有用であると考えられた。FDG-PET は職業性胆管癌のステージングには有用であるが、前癌病変あるいは早期癌病変である Biliry intraepithelial neoplasia（BiIIN）、intraductal papillary neoplasm of the bile duct（IPNB）に対する有用性は乏しいと考えられた。以上から、前述の血液検査や画像診断検査で異常所見がみられる場合、生検や細胞診による確定診断や PET による進行度診断が必要となると考えられた。

(4) 職業性胆管癌の病理所見では、広範囲の胆管に慢性胆管傷害や前癌病変あるいは早期癌病変である BiIIN、IPNB がみられた。DNA 傷害を示す γ -H2AX による免疫組織学的検討を行うと、ほぼ正常にみえる胆管、慢性胆管傷害、BiIIN、IPNB および浸潤癌の部位に陽性であった。癌化を示す S100P による免疫組織学的検討を行うと、BiIIN、IPNB と浸潤癌で陽性であり、BiIIN や IPNB の段階で癌化がみられることが判明した。すなわち、職業性胆管癌症例では広範囲の胆管で DNA 傷害がみられ、慢性胆管傷害から BiIIN や IPNB の前癌病変を経て、浸潤癌に至る多段階発癌過程を示していると考えられた。

(5) 通常型胆管癌や若年性胆管癌と比較したところ、これらの臨床病理学的所見は職業性胆管癌に特徴的であった。

(6) 職業性胆管癌切除例では術後合併症は高頻度に発症し、慢性胆管傷害が影響している可能性が考えられた。また、高発癌ポテンシャルと関連して多中心性再発をきたす症例があり、長期間の経過観察が必要であると考えられた。

(8) 胆汁中チオール分析では酸化型グルタチオンが多く、酸化ストレスや慢性炎症を反映している可能性があった。また、2 次胆汁酸が多い傾向にあった。

(9) 日本肝胆膵外科学会の調査では若年性胆管癌症例に印刷関係や機械関係の職業例がみられる症例があり、有機溶剤や化学薬品の曝露患者の頻度は高くなかったものの、これらが危険因子となりうることが示唆された。

(10) 胆道癌の腫瘍マーカーを検討したところ、血清 DUPAN-2 値の精度が最も良好であった。職業性胆管癌症例でも DUPAN-2 は測定された全例で陽性であり、血清 DUPAN-2 値の測定が職業性胆管癌のスクリーニングに有用であると考えられた。

(11) 肝内胆管癌の危険因子を検討した結果、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）が肝内胆管癌の危険因子であることが明らかとなった。一方、生活習慣病を有する症例では年 2 回以上の γ -GTP 値や CA19-9 値の測定と画像診断が、早期の肝内胆管癌発見に有用であると考えられた。

A. 研究目的

1,2-ジクロロプロパン (1,2-DCP) の曝露を受けた S 社元あるいは現従業員の検診結果、職業性胆管癌の臨床像、病理学的所見および治療経過の検討および通常胆管癌や健康者のそれらとの比較から、職業性胆管癌の特徴を明らかにする。また、これらの結果から職業性胆管癌のスクリーニングや改定診断などの総合的診断法を確立する。

B. 研究方法

(1) S 社の元あるいは現従業員のうちジクロロメタン (DCM) や 1,2-DCP に曝露したと考えられる従業員および健康管理手帳交付者 (1,2-DCP 業務従事者) に対して行った検診結果を検討した。

(2) 職業性胆管癌の臨床検査値の特徴や経時的変動について検討した。さらに血清 Duke Pancreatic Monoclonal Antigen Type 2 (DUPAN-2) 値を含めた胆管癌の腫瘍マーカーについて検討した。

(3) 職業性胆管癌症例における CT、MRI (magnetic resonance cholangiopancreatography; MRCP を含む)、内視鏡的逆行性胆道造影、¹⁸F-Fluorodeoxy Glucose Positron Emission Tomography (FDG-PET) などの画像所見の特徴について検討した。特に、職業性胆管癌の特徴である癌による胆管狭窄を伴わない限局性の肝内胆管拡張像に着目し、病理学的所見との関連を検討した。

(4) 職業性胆管癌症例の臨床診断について後方視的に検討した。

(5) 切除標本を中心に、職業性胆管癌の病理学的特徴を検討した。特に慢性胆管傷害、前癌病変や早期癌病変である Biliary

intraepithelial neoplasia (BillIN) や intraductal papillary neoplasm of the bile duct (IPNB)、DNA 傷害に着目した。また、画像所見との関連を検討した。

(6) 外科的治療施行例を中心に、治療成績を検討し、再発形式とその病理所見から、再発に対する治療法についても検討した。

(7) 職業性胆管癌症例を中心に胆汁中成分について検討した。

(8) 日本肝胆膵外科学会において行われた職業歴や有機溶剤曝露からみた若年性胆管癌の全国調査結果を解析した。

(9) 職業性胆管癌およびそれ以外の胆道癌の腫瘍マーカー、特に DUPAN-2 の臨床的意義について検討した。

(10) 胆管癌症例全体の検討から、職業性胆管癌以外の胆道癌発癌の危険因子を検討した。

これらの結果を踏まえて、職業性胆管癌に対する臨床的診断法について検討した。

C. 結果

(1) 胆管癌特別外来と検診結果

大阪市立大学医学部附属病院では S 社での胆管癌多発事例を踏まえて、平成 24 年 8 月に胆管がん特別外来を設置し、DCM や 1,2-DCP に曝露されたと推定される印刷事業場 S 社従業員の検査や健診事業を開始した。次いで、平成 25 年 10 月に DCM や 1,2-DCP の曝露が原因と考えられる胆管癌が労災認定され、いわゆる職業性胆管癌と分類されるようになった。同時に 1,2-DCP に長期間曝露された従業員に対して健康管理手帳が交付され、それらの従業員に検診作業を開始した。

胆管がん特別外来の設置以来、これまで

に 72 名の元あるいは現従業員の検診および他院からの紹介患者の検査を行った。S 社の元および現従業員は 106 名と推定され、当院で検査された 72 名（うち 4 名は職業性胆管癌と診断）、すでに胆管癌を発症していた 13 名、他疾患ですでに死亡 1 例および他医療機関で検査を受けている 2 名の計 88 名の現在の医学的状況を把握しえた。他の従業員には通知はしたものの、連絡不能あるいは検診拒否などの種々の理由により当院での検診を行えなかった。労災認定された平成 25 年 10 月以降は 16 名の健康管理手帳交付者と 16 名の元あるいは現従業員の検診作業を継続している。

受診者の就業時の自覚症状として、頭痛、嘔気、嘔吐、皮膚炎などがみられ、同社での就業開始後、「お酒が飲めなくなった」、「飲酒すると、すぐに発赤がでるようになった」など肝での代謝障害（おそらく CYP 経路が飽和状態にあった）が考慮される訴えが複数例でみられた。また、 γ -GTP、AST、ALT 値などの肝機能異常や腹部超音波検査で胆管拡張像がみられた例では、CT や MRCP が行われた。この結果、労災認定される平成 25 年 10 月までに当院において 3 例（15～17 例目）が職業性胆管癌と診断され、平成 25 年 10 月以降に 1 例（18 例目）が新たに職業性胆管癌と診断された。すなわち、胆管がん特別外来設置以降、4 例が職業性胆管癌と診断された。

平成 25 年 10 月以降の検診において、健康管理手帳交付者のうち 4 例で職業性胆管癌の特徴である γ -GTP 持続高値例がみられ、うち 2 例では MRCP や CT による精査を行ったが、明らかな胆管癌の所見はみられなかった。一方、健康管理手帳交付対象

ではない元あるいは現従業員に対する検診は 16 名に行われ、血清 γ -GTP 高値は 1 名にみられた。血清 CA19-9 高値例はみられず、腹部超音波検査において脂肪肝、肝嚢胞、肝血管腫、胆石症や胆嚢ポリープなどがみられたが、胆管癌を示唆する異常所見はみられなかった。現在も引き続き検診を実施している。

これまでの S 社従業員に対する調査や検診の結果、同社従業員において胃癌 2 名（1 例はすでに死亡、1 例は検診実施中）、皮膚ボーエン病 1 名（検診実施中）および腎癌 1 名（他院で経過観察中）の既往を有する従業員が判明した。なお、腎癌の 1 名は、少量であったが、2014 年に International Agency for Research on Cancer (IARC)において発癌リスクが group 1 と改定されたトリクロロエチレンの曝露歴を有する可能性を否定できなかった。さらにトリクロロエチレンが原因と考えられた重症肝炎既往を有する 1 例がみられた (Kubo S, et al. J Occup Health 2015;57:87-90)。

(2) 職業性胆管癌症例の臨床検査値

S 社における職業性胆管癌 18 例の胆管癌診断時の臨床検査値（表 1）をみると、全例で血清 γ -GTP 値が上昇し、AST および ALT 値は 18 例中 13 例で上昇していた (Kubo S, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2014;21:79-88)。総ビリルビン値は 18 例中 8 例で上昇していた。腫瘍マーカーでは血清 CA19-9 値が 13 例で上昇、CEA 値は 11 例で上昇していた。血清 DUPAN-2 値は基準値を 150 U/mL とすると、測定しえた 7 例中 5 例で、後述するように 30 U/mL とすると 7 例全例で上昇していた。

HBs 抗原および HCV 抗体陽性例はみられなかった。S 社以外の全国での職業性胆管癌症例では γ -GTP は 18 例全例、AST は 18 例中 14 例、ALT は 18 例中 15 例、CA19-9 は 18 例中 10 例、CEA は 18 例中 6 例で上昇していた。(Kubo S, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2014;21:809-817)

職業性胆管癌 9 例 (S 社 6 例および他の事業場 3 例) において、胆管癌診断までの連続した検診成績を検討した結果、胆管癌診断の数年前より γ -GTP 値の上昇がみられ、同時あるいはそれに遅れて AST、ALT 値が上昇していた (図 1) (Kubo S, et al. Surg Today 2016;46:705-712, Kubo S, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2014;21:809-817)。このような結果は、後述する病理所見等を考慮すると、慢性胆管傷害が胆管癌発症数年前より惹起されていたことを示すと考えられ、通常の胆管癌症例ではみられない職業性胆管癌の特徴と考えられた。

職業性胆管癌全例の腫瘍マーカーをまとめると (表 2)、CEA は 36 例中 17 例 (47.2%)、CA19-9 は 36 例中 23 例 (63.9%)、DUPAN-2 (基準値を 30 U/mL とすると) は 12 例中 12 例 (100%) で上昇しており、血清 DUPAN-2 値の成績が最も良好であったことから、血清 DUPAN-2 値の測定が職業性胆管癌の診断に有用であると考えられた。これらの結果から、総ビリルビン、AST、ALT、 γ -GTP に加えて腫瘍マーカーとして CA19-9 の測定が職業性胆管癌のスクリーニングや診断に有用であると考えられるが、今後、血清 DUPAN-2 値の測定も考慮されてよいと考えられた。

(3) 職業性胆管癌症例の画像所見

職業性胆管癌の画像診断 (腹部超音波検査、CT、MRI) 上、肝内腫瘤像、胆管内腫瘤像、癌による胆管閉塞とその末梢胆管の拡張像に加えて、癌による胆管狭窄を伴わない限局性肝内胆管拡張像が特徴的であった (図 2)。この特徴的な所見は原発性硬化性胆管炎 (PSC) と類似した所見であった。この胆管像の描出には MRCP や内視鏡的逆行性膵管胆道造影 (ERCP) が有用であった (図 3)。このうち癌による胆管狭窄を伴わない限局性肝内胆管拡張像は S 社の職業性胆管癌 18 例中 7 例にみられた。特に職業性胆管癌 5 例、通常型胆管癌 8 例、PSC 6 例および健常者 8 例の MRI 像を比較・検討すると、腫瘤像は職業性胆管癌 5 例全例と通常型胆管癌 4 例に確認された。異常胆管像は職業性胆管癌と PSC の全例にみられたが、通常型胆管癌症例や健常者ではみられなかった (表 3)。職業性胆管癌全例と通常の胆管癌 8 例中 7 例では 1cm 以上の胆管狭窄像が、PSC 6 例中 5 例では 1cm 未満の胆管狭窄像がみられた。肝内外両者の胆管狭窄像は職業性胆管癌 2 例と PSC 3 例にみられた。したがって、職業性胆管癌症例では、通常型胆管癌症例に見られる像と PSC 症例に見られる像の両者がみられることが特徴であった (Koyama et al. Jpn J Radiology, 2017;35:233-241)。

また、S 社の職業性胆管癌 18 例全例で、腹部超音波検査上、腫瘤像、限局性肝内胆管拡張像を含む胆管拡張像、高輝度の胆管壁 (胆管壁の硬化像) や胆管内腫瘤像が確認された (図 4)。このことは職業性胆管癌のスクリーニングには非侵襲的な腹部超音

波検査が、また、CT、MRI は腫瘍像や特徴的な胆管像の検出に有用であると考えられた。

S 社の職業性胆管癌 10 例における FDG-PET 像を検討した。このうち 7 例では切除標本における病理像と比較検討した。その結果、主腫瘍は 10 例中 6 例において、リンパ節転移は 5 例中 4 例で集積像がみられた (図 3)。しかし、BillIN や IPNB などの前癌病変あるいは早期癌病変は描出されなかった。したがって、FDG-PET は職業性胆管癌のステージングには有用であるが、前癌病変あるいは早期癌病変診断に対する有用性は乏しいと考えられた。

なお、術中胆道内視鏡検査において、胆管内のポリポーシスや乳頭状増殖性病変が確認された症例がみられた (図 5) (Kubo S, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2014;21:79-88)。

(4) 職業性胆管癌の臨床診断

S 社従業員の職業性胆管癌 18 例の受診のきっかけをみると、腹痛、黄疸などの自覚症状 5 例、検診での異常 12 例 (肝機能異常 11 例、画像診断での肝腫瘍 2 例)、他疾患加療中の肝機能異常 1 例であった。他の事業場の職業性胆管癌のうち詳細が判明している 18 例では、自覚症状 14 例、肝機能異常 4 例であった。

S 社の職業性胆管癌 18 例では、腹部超音波検査、CT や MRI で異常所見がみられ、11 例では ERCP や経皮経肝胆道造影 (PTBD) が行われ、このうち 9 例では胆汁あるいは擦過細胞診などによって胆管癌と、4 例では肝生検によって胆管癌と、2 例では画像診断で胆管癌と確定診断された。

他の 1 例では術中所見で胆管癌と確定診断された。他の事業場の 18 例中 13 例が ERCP や PTBD によって、5 例が画像診断によって胆管癌と確定診断された。したがって、職業性胆管癌の診断は肝機能検査を含む血液検査や腹部超音波検査、CT などの画像診断での異常所見に続いて行われた ERCP、PTBD や生検によって胆管癌と確定診断された。以上から、前述の血液検査 (肝機能異常や腫瘍マーカーの上昇) や画像診断上、肝内腫瘍像、胆管内腫瘍像、癌の閉塞に伴う末梢側肝内胆管拡張および癌による胆管狭窄を伴わない限局性肝内胆管拡張像など PSC に類似した所見がみられる場合、ERCP、PTCD や生検による確定診断および PET による進行度診断が必要となると考えられた (図 6) (Kubo S, et al. *Surg Today* 2016;46:705-712)。

(5) 職業性胆管癌症例の病理学的所見

S 社の職業性胆管癌の 18 例のうち、10 例が肝内胆管癌、6 例が肝外胆管癌、2 例が肝内および肝外胆管癌で、他の事業場の 19 例のうち、7 例が肝内胆管癌、8 例が肝門部胆管癌、4 例が肝外胆管癌であった。いずれも総胆管から肝内第 3 次分枝までの比較的大胆管が原発部位であった。

現在、職業性胆管癌と認定されている症例のうち、病理学的検討が可能であった 17 例の病理学的所見を解析した (Kinoshita M, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2016;23:92-101)。そのうち、切除標本の全断面 (最大 124 切片) を解析しえた 3 例において、全断面の病理学的所見と画像診断における胆管像を比較し、マッピングを施行した。この際、胆管や付属線の腫瘍性増

殖、胆管消失像、胆管周囲の著明な硬化像（線維化）などの慢性胆管傷害像と胆管癌の前癌病変あるいは早期癌病変と考えられている BilIN および IPNB 病変に着目した。病理学的検討の結果、主腫瘍は高分化から低分化腺癌を示す腫瘤形成型肝内胆管癌や胆管内発育型肝内胆管癌であった。また、全例で主腫瘍以外に慢性胆管傷害像や BilIN 病変がみられ、多くの症例で IPNB 病変がみられた。切除標本の全断面を検討しえた 3 例では、比較的大型胆管（肝外胆管から肝内第 3 次分枝）のほとんどの部位で、慢性胆管傷害像、BilIN や IPNB 病変がみられた（図 7）。特に、以前より職業性胆管癌の画像的特徴と指摘してされてきた PSC の胆管像に類似した、癌による胆管狭窄を伴わない限局性肝内胆管拡張像を示す胆管では BilIN と IPNB 病変や胆管癌の伸展がみられ、これらの病理学的変化が画像上での特徴と関連していると考えられた。

さらに、DNA 傷害を示す γ -H2AX による免疫組織学的検討を行うと、ほぼ正常に見える胆管、慢性胆管傷害、BilIN、IPNB および浸潤癌の部位に陽性であり、広範囲の胆管に DNA 傷害が生じていることが判明した。また、癌化を示す S100P による免疫組織学的検討を行うと、BilIN、IPNB と浸潤癌で陽性であり、BilIN や IPNB の段階で癌化がみられることが判明した。すなわち、職業性胆管癌症例では広範囲の胆管で DNA 傷害がみられ、慢性胆管傷害から BilIN や IPNB の前癌病変を経て、浸潤癌に至る発癌過程を示していると考えられた（Sato Y, et al. *J Clin Experiment Pathol* 2014;7:4745-4754, Kinoshita M, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*

2016;23:92-101）。また、肝細胞には進行性の肝病変はみられなかった。S 社での職業性胆管癌 1 例が、胆管癌に対する外科治療後、胆管癌の再発はみられないものの肝不全で死亡したが、病理解剖の結果、胆管周囲を含む肝線維化の著明な進行がみられた（Tomimaru Y, et al. *Hepatol Res* 2015;45:488-493）。

全国の職業性胆管癌症例のうち、大型胆管の病理学的検討が可能であった外科治療あるいは病理解剖が行われた 16 例では、全例に慢性胆管傷害および BilIN がみられ、IPNB が多くの症例で確認された。すなわち、広範囲の胆管に慢性胆管傷害や前癌病変が認められることが、事業場に関わらず DCM や 1,2-DCP に曝露による職業性胆管癌の病理学的特徴であることが判明した（Kinoshita M, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2016;23:92-101）。なお、胆嚢には前癌病変や浸潤癌はみられなかった。

（6）職業性胆管癌症例と通常の胆管癌症例との比較

当科および関連病院で切除された職業性胆管癌（肝内胆管癌）5 例と通常型で肝門型肝内胆管癌 46 例の臨床病理学的所見および治療成績を比較した。その結果、通常型肝内胆管癌に比較し、職業性肝内胆管癌では若年で、 γ -GTP 高値例、ICG15 分値低値例、血小板高値例が多かった（表 4）。また、画像診断上、癌を伴わない限局性肝内胆管拡張像や乳頭状増殖像が多くみられた。病理学的には、職業性肝内胆管癌において胆管内発育型が多く、BilIN、IPNB および慢性胆管傷害像が多くみられた。切除後予後にはについては差がみられなかったが、

観察期間が短く、今後の検討が必要である (Hamano G, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2016;23:389-396)。

過去の職業歴が検索可能な全国の労災病院のデータベースを用いて、若年性胆管癌 (50歳未満) と大阪 S 社の職業性胆管癌の臨床病理学的所見を比較した。労災病院のデータベースでは胆管癌の全国的な集団発生はみられなかった。若年性胆管癌症例に比較して、職業性胆管癌では肝内胆管癌が多く、臨床検査値異常を示す症例が多かった (表 5)。また、職業性胆管癌で特徴的である限局性肝内胆管拡張像は、若年性胆管癌症例ではみられなかった (Kaneko R, et al. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:7195-7200)。

(7) 職業性胆管癌の治療成績

S 社の職業性胆管癌 18 例のうち、13 例では外科的治療が行われた。この 13 例のうち 4 例では胆管断端陽性であったため根治術は困難であった。13 例中 11 例ではリンパ節郭清あるいは領域リンパ節のサンプリングが行われ、4 例ではリンパ節転移が認められた。ゲムシタビンや TS-1 などを用いた補助化学療法は 9 例に、このうち胆管断端陽性であった 2 例では同部位に対して放射線治療が行われた。18 例中 5 例では進行癌の状態と診断されたため、外科的治療の適応はなく、化学療法あるいは保存的治療が行われたものの、5 例全例が癌死した。外科的治療が行われた 13 例のうち 6 例が癌死、1 例が胆管癌再発はみられなかったものの肝線維化の進行により肝不全死した (Tomimaru Y, et al. *Hepatol Res* 2015;45:488-493)。残り 6 例中 3 例は再発

がみられたもののそれぞれ加療され、現在、生存中である。

外科的治療が行われた全国の職業性胆管癌症例のうち、患者あるいは患者家族の承諾を得ることができた 20 例の外科治療成績を検討した (Kubo S, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 201;2:556-564)。肝切除が 6 例、胆道再建を伴う肝切除が 9 例、膵頭十二指腸切除が 3 例、肝切除および膵頭十二指腸切除が 1 例、肝外胆管切除が 1 例に行われた。しかし、4 例が胆管断端癌陽性であり、そのうち 3 例では同部に放射線照射が行われた。術前および術後補助化学療法が 1 例に、術後補助化学療法が 12 例に行われた。術後、腹腔内感染 (9 例)、胆管空腸縫合不全 (3 例)、胆汁漏 (1 例)、膵液瘻 (3 例)、術後出血 (2 例) などの合併症がみられ、これらの術後合併症の発症に慢性胆管傷害が影響している可能性が考えられた。20 例中 13 例に胆管癌再発がみられたが、肝内多発再発が 2 例に、胆管断端再発が 5 例にみられた。他の 6 例では、原発部位とは異なる部位に単発の再発病巣がみられた。また、詳細に検討した 1 例では胆管癌周囲に BilIN 病変がみられた (図 8)。6 例中 4 例に再切除やラジオ波焼灼術が施行されたが、再発部位と原発巣に連続性はみられず、多中心性再発が疑われた。さらに 2 例では再々発がみられ、再々切除がおこなわれた。そのうち 1 例では腺癌に加えて、その周囲の胆管には BilIN 病変が認められた。すなわち、この再々発病巣も多中心性発癌と考えられた。なお、この 5 例は現在、生存中である。職業性胆管癌の特徴として、広範囲の大型胆管の発癌ポテンシャルが亢進している病

態から、根治手術後も多中心性再発のリスクが高いと考えられる。職業性胆管癌の経過から、積極的な治療が奏功する可能性が示唆されるとともに、長期間の経過観察が必要であると考えられた。

(8) 胆汁中チオール分析および胆汁酸分析

職業性胆管癌を含む胆道癌、総胆管結石、膵癌、肝癌症例において胆汁中チオール分析と胆汁酸濃度測定を行った。チオール分析ではほぼ全例において methionine と cystathione の割合は逆相関しており、メチオニン代謝過程において S-Adenosyl-methionine から homocysteine や cystathione への代謝動態を示していた。職業性胆管癌では 3 例中全例で酸化型 glutathione (glutathione disulfide) が全体の 40%を超えていたが、他の患者では低かった (図 9)。これは酸化ストレスの亢進や慢性炎症を反映している可能性があり、職業性胆管癌の特徴と考えられた。胆汁酸分析では、職業性胆管癌症例では胆汁中 2 次胆汁酸が多い傾向にあった (図 10)。

(9) 職業性胆管癌などに関する疫学的調査

一方、S 社従業員の職業性胆管癌症例が 50 歳未満であったこと、および一般的に 50 歳未満の胆道癌は頻度が少ないことから、日本肝胆膵外科学会では 1997 年から 2011 年までの 50 歳未満の胆道癌症例についてアンケート調査を行った。その結果、1472 例の 50 歳未満の胆道癌が集計され、これは胆道癌全体の 3.8%であった。このうち、777

例についてその詳細な情報を得た。777 例中、164 例が肝内胆管癌、310 例が肝外胆管癌、88 例が乳頭部癌、213 例が胆嚢癌、2 例が不明であり、652 例に対して外科的治療が行われた。背景因子をみると、肝内胆管癌には C 型肝炎、B 型肝炎、肝内結石症が多く、胆嚢癌、肝外胆管癌には膵・胆管合流異常、先天性胆道拡張症や胆嚢結石が多くみられた。職業歴をみると、印刷関係 15 例 (1.9%)、機械関係 14 例 (1.8%) が多くみられた。有機溶剤の曝露は 20 例 (2.6%) にみられ、5 年以上が 16 例と多数を占めた。また、化学薬品の曝露が 17 例 (2.2%) に、農薬の曝露が 18 例 (2.3%) にみられた。したがって、50 歳未満の胆道癌症例のうち、有機溶剤や化学薬品の曝露患者の頻度は高くなかったものの、これらが危険因子となりうる可能性が示唆された。ちなみに当科における 1997 年から 2011 年までの胆道癌切除例は 256 例で、このうち 12 例 (4.7%) が 50 歳未満であり、その背景因子は膵・胆管合流異常、アルコール性肝障害、慢性 B 型肝炎、胆石症、胆嚢ポリープおよび印刷事業場であった。

(9) 胆管癌に対する腫瘍マーカー

胆道癌における腫瘍マーカーである血清 CEA、CA19-9 および DUPAN-2 の臨床的意義について検討した。胆道癌 83 例および良性胆道疾患 24 例において、血清 CEA、CA19-9 および DUPAN-2 を測定した。それらの腫瘍マーカーの精度を検討すると、CEA の AUC は 0.660 (95%CI は 0.556-0.764) 、 CA19-9 は 0.7 (0.693-0.867) 、 DUPAN-2 は 0.818 (0.742-0.893) で、DUPAN-2 が最も良好

であった。DUPAN-2 のカットオフ値を 30 U/ml とすると、胆道癌診断の sensitivity は 74.8%、specificity は 83.3%であった。CA19-9 および CEA の sensitivity と specificity は 54.2%、88.6%と 24.1%、91.4%であった。また、CA19-9 (>37 U/ml) と DUPAN-2 を組み合わせると、sensitivity は 81.9%、specificity は 74.3%となり、従来の CEA と CA19-9 の組み合わせの sensitivity 59.0%、specificity 85.7%より良好であった。なお、職業性胆管癌症例では、CEA は 36 例中 17 例 (47.2%)、CA19-9 は 36 例中 23 例 (63.9%)、DUPAN-2 は 12 例中 12 例 (100%) で上昇しており、DUPAN-2 の成績が最も良好であった。以上から、血清 DUPAN-2 値の測定が職業性胆管癌のスクリーニングと診断に有用であると考えられた。

(10) 胆管癌の危険因子

肝内胆管癌の危険因子を検討した結果、肝内胆管癌切除 88 例のうち、C 型肝炎が 28 例、アルコール多飲が 11 例、B 型肝炎が 6 例、肝内結石症が 5 例、塩素系有機溶剤曝露（職業性胆管癌）が 4 例、残りの 34 例が原因不明であった。その 34 例中 15 例に病理学的に非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）が確認された。転移性肝癌を対照として、胆管癌に対する危険因子について多変量解析を行うと、NASH は Odds ratio 3.36 (95% CI, 1.15-10.2)、 $p = 0.269$ であり、NASH が肝内胆管癌の危険因子であることが明らかとなった (Kinoshita M, et al. *J Surg Oncology* 2016;113:779-783)。

一方、糖尿病、高血圧、脂質異常症の生活習慣病に対して定期的な経過観察をされ

ていた 16 例では、他の群と比較して、比較的早期の段階で肝内胆管癌が発見され、術後成績も良好であった。したがって、生活習慣病を有する症例では年 2 回以上の γ -GTP 値や CA19-9 値の測定と画像診断が、早期の肝内胆管癌発見に有用であると考えられた (Nishioka T, et al. *Liver Cancer* 2016;5:107-120)。

D. 考察

大阪市立大学では胆管がん特別外来を設置し、引き続いて 1,2-DCP に曝露された従業員に対する検診を行うことにより、4 例の新たな職業性胆管癌患者の治療にあたるとともにハイリスク従業員の経過観察が可能となった。

職業性胆管癌症例では就業中、嘔気、嘔吐、食欲不振、皮膚炎などの一般的な症状に加えて飲酒時の発赤増強などの特徴的な症状がみられた。また、診断時、 γ GTP、AST、ALT などの肝機能検査値の異常がみられたが、過去の検診結果を評価し得た従業員では数年前からこれらの異常が指摘されており、慢性胆管傷害を反映していると考えられた。腫瘍マーカーでは血清 CA19-9 や DUPAN-2 値が上昇していた症例が多かった。また、同時に数年前より画像診断においても PSC に類似した限局性肝内胆管拡張像を確認しえた症例があり、職業性胆管癌診断における極めて重要な所見と考えられた。画像診断では腹部超音波検査、CT、MRI が有効であったが、なかでも腹部超音波検査は全例で異常所見がみられ、非侵襲的であることから、健康管理手帳による検診において、 γ -GTP、AST、ALT、CA19-9 値や腹部超音波検査が行われていることは

妥当であると考えられる。本研究では血清 DUPAN-2 値の測定も有効であることが示されたので、今後、検診における DUPAN-2 値測定の意義についても検討し、その結果で血清 DUPAN-2 値の追加を検討してもよいかもかもしれない。

胆汁中チオール分析では、職業性胆管癌症例での病理所見でみられたように酸化ストレスや慢性炎症を反映していると考えられた。また、職業性胆管癌症例では胆汁中 2 次胆汁酸が多い傾向にあった。近年、2 次胆汁酸は大腸癌や肝癌の危険因子であることが報告されており、発癌との関係が注目される。

日本肝胆膵外科学会の全国アンケート調査では、若年性胆管癌（50 歳未満）症例に印刷関係や機械関係の職業歴が見られる症例があり、有機溶剤や化学薬品の曝露患者の頻度は高くないものの、これらが危険因子となりうる可能性が示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

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. *Journal of Hepatobiliary Pancreatic Sciences* 2014;2

1:479-488

2. 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* 2014;7:4745-4754

3. 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, Kobayashi 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 Hepatobiliary Pancreatic Sciences* 2014;21:809-817

4. 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* 2014;60:39-44

5. 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 H*

- health 2014;56:317-322
6. Kubo S, Matsuzaki K, Seki T, Ohsawa M, Kumagai S, Endo G. Severe acute hepatitis in a printing company worker: a case study. *J Occup Health* 2015;57:87-90
 7. Kubo S. Re:Occupational cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2015;22:E2-E3
 8. Kaneko R, Kubo S, Sato Y. Comparison of Clinical Characteristics between Occupational and Sporadic Young-Onset Cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16:7195-7200
 9. Kinoshita M, Kubo S, Nakanuma Y, Sato Y, Takemura S, Tanaka S, Hamano G, Ito T, Terajima H, Yamada T, Nakamori S, Arimoto A, Fujikawa M, Sugawara Y, Yamamoto T, Abue M, Nakagawa K, Unno M, Mizuguchi T, Takenaka K, Shirabe K, Shibata T. Pathological spectrum of bile duct lesions from chronic bile duct injury to invasive cholangiocarcinoma corresponding to bile duct imaging findings of occupational cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2016;23:92-101
 10. Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Nishioka T, Kinoshita M, Hamano G, Ito T, Yamamoto T, Abue M, Aoki M, Nakagawa K, Hijioka S, Miyamoto A, Osaki Y, Endo G, Kumagai S. Screening and surveillance for occupational cholangiocarcinoma in workers exposed to organic solvents. *Surg Today* 2016;46:705-712
 11. Hamano G, Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Kinoshita M, Ito T, Yamamoto T, Wakasa K, Shibata T. Comparison of clinicopathological characteristics between patients with occupational and non-occupational intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2016;23:389-396
 12. Kinoshita M, Kubo S, Tanaka S, Takemura S, Nishioka T, Hamano G, Ito T, Koda M, Aota T, Tanaka S, Kuwae Y, Osawa M, Shibata T. The association between non-alcoholic steatohepatitis and intrahepatic cholangiocarcinoma: A hospital based case-control study. *Journal of Surgical Oncology* 2016;113:779-783
 13. Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Kinoshita M, Hamano G, Ito T, Koda M, Aota T, Yamamoto T, Terajima H, Tachiyama G, Yamada T, Nakamori S, Arimoto A, Fujikawa M, Tomimaru Y, Sugawara Y, Nakagawa K, Unno M, Mizuguchi Y, Takenaka K, Kimura K, Shirabe K, Saiura A, Uesaka K, Taniguchi H, Fukuda A, Chong JM, Kuwae Y, Ohsawa M, Sato Y, Nakanuma Y. Outcomes after resection of occupational cholangiocarcinoma. *Journal of Hepato-Biliary Pancreatic Sciences* 2016;23:556-564
 14. Nishioka T, Kubo S, Tanaka S, Wakasa K, Takemura S, Kinoshita M, Hamano G, Kuwae Y, Shibata T, Suehiro S. Outcomes of hepatic resection in intrahepatic cholangiocarcinoma patients

with diabetes, hypertension, and dyslipidemia: significance of routine follow-up. *Liver Cancer* 2016;5:107-120

15. Koyama K, Kubo S, Ueki A, Shimono T, Takemura S, Tanaka S, Kinoshita M, Hamano G, Miki Y. MR imaging of occupational cholangiocarcinoma developing in printing company workers. *Japanese Journal of Radiology* (in press)

16. 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* 2014;111:500-509

17. 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一. 胆膵の病態生理 2014;30:1-4

18. 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* 2014;28:763-771

19. 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. *胆道* 2014;28:696-702

20. 久保正二、竹村茂一、田中肖吾、木下正彦、濱野玄弥、伊藤得路、青田尚哲、江田将樹、中沼安二、圓藤吟史. 職業性胆管癌症例の臨床的特徴. *産業医学レビュー* 2015;28:139-146

21. 久保正二、竹村茂一、田中肖吾、新川寛二、木下正彦、濱野玄弥、伊藤得路、青田尚哲、江田将樹、佐藤保則、中沼安二. 腫瘍性コランギオパチー（胆道腫瘍）職業性胆管癌の病態とその特徴. *肝胆膵* 2015;71:877-885

22. 久保正二、竹村茂一、田中肖吾、新川

寛二、木下正彦、濱野玄弥、伊藤得路、青田尚哲、江田将樹、上西崇弘. 肝内胆管癌の疫学的動向と危険因子. *外科* 2016;78:115-121

23. 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* 2015;112:1341-1347

24. 木村光一、調 憲、久保正二、伊藤心二、播本憲史、山下洋市、吉住朋晴、相島慎一、小田義直、前原喜彦. 印刷業勤務を背景に発症した肝内胆管癌の1例. *胆道* 2015;29:972-977

25. 久保正二、竹村茂一、田中肖吾、新川寛二、西岡孝芳、木下正彦、濱野玄弥、伊藤得路、中沼安二、圓藤吟史. 職業性胆管癌の臨床的特徴. *日本職業・災害医学会会誌* 2016;64:1-5

2. 学会発表

1. Kinoshita M, Takemura S, Sakata C, Tanaka S, Urata Y, Nishioka T, Nozawa A, Hamano G, Ito T, Nakanuma Y, Arimoto A, Nakamori S, Terajima H, Kubo S. Outcomes of treatment intrahepatic cholangiocarcinoma among young workers at a printing company. *Daegu-Kansai HBP Surgeons Joint Meeting 2014*

2. 木下正彦、竹村茂一、坂田親治、浦田順久、西岡孝芳、野沢彰紀、濱野玄弥、伊藤得路、中森正二、豊川秀吉、有本 明、田中省吾、久保正二. 印刷労働者関連胆管癌症例におけるFDG-PET像. 第114回日本外科学会定

期学術集会 2014

3. 浦田順久, 祝迫恵子, 西岡孝芳, 野沢彰紀, 木下正彦, 濱野玄弥, 伊藤得路, 坂田親治, 竹村茂一, 久保正二. オフセット校正印刷会社関連胆管癌切除例の病理組織学的検討. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014

4. 木下正彦, 竹村茂一, 坂田親治, 田中肖吾, 新川寛二, 浦田順久, 西岡孝芳, 野沢彰紀, 濱野玄弥, 伊藤得路, 中沼安二, 有本 明, 中森正二, 寺嶋宏明, 久保正二. 印刷事業場関連肝内胆管癌の治療成績. 第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2014

5. 吉田 寛, 海野倫明, 久保正二, 宮川秀一, 山上裕機. 若年者胆道癌の発症要因に関する研究-日本肝胆膵外科学会プロジェクト委員会 胆 04 研究-. 第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2014

6. 木下正彦, 中沼安二, 竹村茂一, 坂田親治, 浦田順久, 西岡孝芳, 野沢彰紀, 濱野玄弥, 伊藤得路, 久保正二. 印刷労働者関連胆管癌症例における画像所見および病理組織像の検討. 第 69 回日本消化器外科学会総会 2014

7. 濱野玄弥, 竹村茂一, 坂田親治, 浦田順久, 西岡孝芳, 野沢彰紀, 木下正彦, 伊藤得路, 久保正二. 印刷労働者関連胆管癌と他の胆管癌の臨床病理学的比較. 第 69 回日本消化器外科学会総会

8. 木下正彦, 中沼安二, 竹村茂一, 坂田親治, 田中肖吾, 新川寛二, 浦田順久, 西岡孝芳, 野沢彰紀, 濱野玄弥, 伊藤得路, 江田将樹, 水口 徹, 久保正二. 印刷労働者関連胆管癌症例における病理学的特徴. 第 50 回日本胆道学会学術集会 2014

9. 久保正二, 竹村茂一, 田中肖吾, 中沼安二, 熊谷信二, 圓藤吟史. 職業性胆管癌の臨床的特徴. 第 62 回日本職業・災害医学会学術大会 2014

10. Hamano G, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Nishioka T, Kinoshita M, Ito T, Koda M, Aota T, Yamamoto T, Wakasa K, Kubo S. Comparison of clinicopathological characteristics between in the patients with occupational and non-occupational intrahepatic cholangiocarcinoma. The 2nd Kansai-Yeungnam HBP Surgeons Joint Meeting 2015

11. Kinoshita M, Nakanuma Y, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Nishioka T, Hamano G, Ito T, Koda M, Kubo S. Radiological and pathological characteristics in occupational cholangiocarcinoma developing among young workers at a printing company in Japan. The 2nd Kansai-Yeungnam HBP Surgeons Joint Meeting 2015

12. 久保正二. 職業性胆管癌の現況. 第 43 回近畿肝臓外科研究会 2015

13. 木下正彦, 中沼安二, 竹村茂一, 田中肖吾, 新川寛二, 西岡孝芳, 濱野玄弥, 伊藤得路, 江田将樹, 久保正二. これまでの職業性胆管癌症例の検討-大阪での 17 例と新規労災認定 9 例の比較-. 第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015

14. 久保正二, 上西崇弘, 竹村茂一. 肝内胆管癌の治療成績と戦略. 第 51 回日本肝臓学会総会 2015

15. 久保正二. 職業性胆管癌の病態と対策. 第 70 回日本消化器外科学会総会 2015

16. 木下正彦, 中沼安二, 竹村茂一, 佐藤保則, 田中肖吾, 新川寛二, 西岡孝芳, 濱野玄弥, 伊藤得路, 青田尚哲, 江田将樹, 久保正二. 当科における職業性胆管癌切除症例の病理学的検討. 第13回日本消化器外科学会大会 2015
17. 久保正二. 職業性胆管癌の臨床的および病理学的検討. 第18回大阪胆道疾患研究会 2015
18. Kinoshita M, Takemura S, Tanaka S, Hamano G, Ito T, Koda M, Aota T, Tanaka S, Ohsawa M, Kubo S. The association between non-alcoholic steatohepatitis and intrahepatic cholangiocarcinoma. 25th Annual Conference of Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2016
19. Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Kinoshita M, Hamano G, Nakanuma Y, Sato Y, Mimaki S, Tsuchihara K. The 7th Asia-Pacific Primary Liver Cancer Expert Meeting. 2016
20. 久保正二. 職業性胆管癌の臨床と対策. 第52回日本肝癌研究会 2016
濱野玄弥, 竹村茂一, 田中肖吾, 新川寛二, 木下正彦, 伊藤得路, 青田尚哲, 江田将樹, 山本隆嗣, 久保正二. 職業性肝内胆管癌と非職業性肝内胆管癌との臨床病理学的比較. 第71回日本消化器外科学会総会 2016
21. 木下正彦, 竹村茂一, 田中肖吾, 濱野玄弥, 伊藤得路, 江田将樹, 青田尚哲, 田中さやか, 大澤政彦, 久保正二. 肝切除症例からみた肝内胆管癌と非アルコール性脂肪性肝炎の関連性. 第71回日本消化器外科学会総会 2016
22. 伊藤得路, 竹村茂一, 田中肖吾, 木下正彦, 濱野玄弥, 青田尚哲, 石原 敦, 新川寛二, 久保正二. 胆道癌に対するDUPAN-II測定の有効性について. 第71回日本消化器外科学会総会 2016
23. 木下正彦, 竹村茂一, 田中肖吾, 新川寛二, 濱野玄弥, 伊藤得路, 江田将樹, 青田尚哲, 久保正二. 職業性胆管癌の手術成績. 第14回日本消化器外科学会大会 2016
24. Ito T, Tanaka S, Takemura S, Hamano G, Kurashima Y, Koda M, Aota T, Kubo S. The clinical significance of the serum concentration of Duke pancreatic monoclonal antigen type 2 (DUPAN-2) in biliary tract cancer. The 4th Kansai-Yeungnam HBP Surgeons Joint Meeting 2017
- F. 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
総括研究報告書

2 職業性胆管癌の病理学的特徴および発癌機序の解明

研究分担者	中沼安二(静岡がんセンター病理診断科, 現 福井県済生会病院病理診断科) 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(金沢大学医薬保健研究域医学系人体病理学) 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

職業性胆管癌は胆管内乳頭状腫瘍 *intraductal papillary neoplasm of bile duct* (IPNB) や平坦型異型病変 *biliary intraepithelial neoplasm* (BilIN) を高率に合併し、多段階の過程を経て発癌に至ると考えられる。2014-2016年の研究期間内において、本分担者は職業性胆管癌の病理学的特徴ならびに発癌機序の解明を目的とした検討を行った。得られた研究成果は以下のごとく要約される。

(1) 静岡がんセンターの胆管癌手術症例を用い、IPNB症例を膵 *intraductal papillary mucinous neoplasm* (IPMN) への類似性から病理学的に検討した結果、膵IPMNに類似する症例とあまり類似しない症例とがあり、後者は従来乳頭状胆管癌と呼ばれていた症例に相当した。職業性胆管癌のIPNB症例にこれら2種類の分類を適用することで、IPNBの成因解明に役立つ可能性がある。

(2) 同施設の胆管癌手術症例で、平坦型の胆管上皮内腫瘍性病変を一括して *intraepithelial neoplasms of the bile duct* (IENBs) と呼び、異型度別に3つのカテゴリーに分類して検討したところ、前浸潤性病変であるBilINの異型度や癌の *cancerization* をより明確に区別できた。胆管癌の発癌過程を検討する上で有用な分類であり、職業性胆管癌の発癌機序を考察する上でも有用と思われた。

(3) 正常の肝胆道系において、ジクロロメタンの代謝関連酵素である *cytochrome P450* (CYP) 2E1 と *theta-class glutathione S-transferase* (GST) T1-1 の発現を免疫染色で検討した。CYP2E1は肝細胞に恒常的に発現し、肝内外の胆管上皮に発現は認めなかった。GST T1-1は肝細胞に加えて肝内外の胆管上皮に明瞭な発現がみられたことから、GST T1-1により胆管で1,2-ジクロロプロパンやジクロロメタンの有害な中間代謝物が形成され、胆管癌の発生に関連したことが示唆された。

(4) 職業性胆管癌症例のBilINやIPNBでは、DNA損傷を示唆する γ -H2AXの免疫組織化学的な発現が高頻度にみられ、非腫瘍性の傷害胆管上皮や胆管周囲付属腺にもしばしばその発現を認めた。また、p53の過剰発現も早期の段階から認められ、通常の胆管癌の発癌過程とは明らかに異なる結果を示した。

(5) 職業性胆管癌では、腫瘍部だけでなく非腫瘍部においてもDNAメチル化を媒介す

る DNA methyltransferase (DNMT) の免疫組織化学的な発現が亢進していた。多段階発癌の過程において DNA メチル化異常が蓄積し、エピジェネティックな発癌の素地が形成されている可能性が考えられた。

(6) 職業性胆管癌の背景肝にしばしば認める胆管硬化を原発性硬化性胆管炎 (PSC)、閉塞性黄疸症例と病理学的に比較した。胆管周囲の線維化は PSC と閉塞性黄疸は同程度で、職業性胆管癌はそれより線維化が緻密で強い傾向にあった。職業性胆管癌の胆管周囲には α -SMA 陽性細胞が多く分布し、その分布状況は PSC と類似し、陽性細胞は閉塞性黄疸より職業性胆管癌と PSC で多かった。職業性胆管癌の胆管硬化は、単に胆管狭窄や閉塞に伴う 2 次性線維化とは異なることが示唆された。

(7) 腫瘍免疫の回避に関与する programmed death-1 (PD-1) と programmed death-ligand 1 (PD-L1) の発現を免疫染色で検討した。職業性胆管癌では PD-L1 の発現亢進がみられ、腫瘍間質に浸潤する PD-1 陽性を示すリンパ球数も多かった。職業性胆管癌は PD-1/PD-L1 を介して腫瘍免疫を回避しており、抗 PD-1 抗体を用いたがん免疫療法の効果が期待できると考えられた。

A. 目的

印刷事業場のオフセット印刷関係者において胆管癌（職業性胆管癌）が多発していたことが報告された。これらの従業員は、塩素系有機溶剤である 1,2-ジクロロプロパン（dichloropropane, DCP）やジクロロメタン（dichloromethane, DCM）に長期間、高濃度ばく露を受けていた。本分担者は、オフセット印刷関係者に発生したと考えられる胆管癌の外科的切除肝や剖検肝を検討し、これら症例では、胆管癌、胆道癌の前浸潤性病変で、胆管内に肉眼的に乳頭状発育を示す胆管内乳頭状腫瘍 *intraductal papillary neoplasm of bile duct* (IPNB) および顕微鏡下で同定できる平坦型異型病変 *biliary intraepithelial neoplasm* (BilIN) がしばしばみられることを報告してきた。

分担者は、職業性胆管癌の発癌機序を病理学的に明らかにするため、2014年-2016年の研究期間内で、胆管癌、特に通常型胆管癌の前癌あるいは前浸潤性病変である IPNB と BilIN の病理学的、免疫組織化学的検討を行った。そして、これらの病変検索により職業性胆管癌の発癌機序解明に応用しようと試みた。加えて、2014年には生体内における DCM 代謝関連酵素である cytochrome P450 (CYP) 2E1 と theta-class glutathione S-transferase (GST) T1-1, ならびに DNA 損傷 (2 本鎖切断) を示唆する γ -H2AX の発現に関する検討、2015年には DNA メチル化異常に関与する DNA methyltransferase (DNMT) の発現、ならびに職業性胆管癌の背景肝にみられる胆管硬化に関する病理学的検討、2016年には腫瘍免疫の回避に関連する programmed death-1 (PD-1) と programmed death-ligand 1 (PD-L1) の発現に関する検討を行った。以下、それぞれの検討項目に関する研究成果を個別に記載する。

I. 職業性胆管癌にしばしばみられる胆管内乳頭状腫瘍 *intraductal papillary neoplasm of bile duct* (IPNB) および平坦型異型病変 *biliary intraepithelial neoplasm* (BilIN) に関する病理学的検討

それぞれの研究成果を、(1) IPNB の病理像とその発生機序と (2) BilIN の病理像とその発生機序に分けて報告する。

(1) IPNB の病理像とその発生機序

B. 研究目的

IPNB は、肉眼的に同定される胆管内乳頭状腫瘍であり、高分化な被覆上皮と狭い線維性血管芯からなる間質を特徴とする。しばしば粘液を過剰産生し、膵の *intraductal papillary mucinous neoplasm* (IPMN) との類似性が注目されている。しかし、粘液産生に乏しい症例やまた比較的悪性度の高い症例も経験され、IPNB の多様性が注目されている。従来、胆道系では乳頭状胆管癌の報告があり、高分化であり、膵 IPMN とはやや異なる組織像を示すとされている。

最近、膵では GNAS の突然変異がしばしば経験されることが報告されており、IPNB でも少なからず GNAS の変異が検出されたとの報告もある。そこで、IPNB 多数例を膵 IPMN との関連性で検討し、職業性胆管癌での IPNB の病態を把握するための基礎資料とすることを目的に、この研究を企画した。

B. 研究方法

静岡がんセンターで 2002-2014 年の間に外科的手術の行われた 326 例の胆管癌をサーベイした。これらの中で、拡張した胆管内で乳頭状の増生を示す症例で、高分化な腫瘍 52 例を抽出し、検討した。これら症例の乳頭状腫瘍部および背景の胆管から、多数の標本を作成し、ホルマリン固定後、パラフィン包埋を行い、HE 染色、アザン染色、PAS 染色などを行い以下の検討を行った。

また、膵 IPMN に準拠し、IPNB を病理組織学的に、腸型、胃型、胆膵型、それに好酸型の 4 型に亜型分類した。また MUC1, MUC2, MUC5AC, MC6, CK7, CK20, CDX2, CD10 の免疫染色を行い、亜型分類の参考とした。

C. 研究成果, D. 考察

a. 膵 IPMN への類似性

組織学的に、IPMN への類似性から group A (極めて類似している群), group B (類似している群), group C (あまり類似していない群), group D (全く類似していない群) に分類された。52 例を検討した結果、19 例が group A に、18 例が group B に、5 例が group C に、10 例が group D に分類された。これら 4 群の性別や年齢はほぼ同じで、A 群と B 群は、肝内胆管や肝門部胆

管に発生する傾向があり、また C 群と D 群は肝外胆管に発生する傾向があった。A 群と B 群は、非浸潤例が多く、胃型、腸型、好酸型が多く、C 群と D 群は浸潤例が多く、腸型、胆嚢型が多くみられた。

b. 乳頭状胆管癌と IPNB

今回、単一病院での胆管癌手術症例の多数を用い、IPNB 症例を、膵 IPMN への類似性から検討した結果、膵の IPMN に類似する症例（膵 IPMN 型）とあまり類似しない症例の存在することが明らかとなった。膵 IPMN に類似していない症例は、従来、乳頭状胆管癌と呼ばれていた症例に相当することが明らかとなった。

E. 結論

今後、職業性胆管癌での IPNB 症例で、これら 2 種類の分類を行い、IPNB の成り立ちの機序の解明を行う必要があると考えられた。

(2) BilIN の病理像とその発生機序

A. 研究目的

BilIN は、顕微鏡下で同定される前浸潤性腫瘍性病変であり、その異型度により BilIN-1~BilIN-3 に分類され、BilIN-3 はいわゆる上皮内癌として知られている。職業性胆管癌では、特に BilIN-3 に高度の DNA 損傷の発生することが注目されており、発癌過程での BilIN 病変を検討することは重要と考えられる。そこで、今回、その前段階として、通常型胆管癌（いわゆる結節型および浸潤型胆管癌）症例を用い、BilIN 病変を検討した。

B. 研究方法

2010 年-2014 年に、静岡がんセンターで外科切除された 57 例の通常型胆管癌を用い、検討を行った。ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、薄切片を作成し、HE 染色、PAS 染色、線維染色を行い、残りの標本で、S100P, vimentin, S100A4, E-cadherin, MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, CDX2, CK7, CK20, CDX2, CD10, p53, Ki-67 の発現を免疫染色で行い、癌関連マーカーや増殖活性の検討を行った。これら症例の癌部および背景の胆管病変の病理学的検討を行った。

C. 研究成果, D. 考察

a. Intraepithelial neoplasms of the bile duct (IENBs)

今回、上皮内腫瘍性病変を一括して intraepithelial neoplasms of the bile duct (IENBs) と呼び、種々の形態学的、免疫組織化学的検討を行った。IENB は、胆管上皮層内を連続性分布を示す腫瘍性上皮で、その形態として平坦型、微小乳頭型、それに乳頭管状型に分類される。

IENBs の異型度分類：異型度別に、IENB を 3 つのカテゴリーに分類した。group A（腫瘍性と考えられるが、悪性とは言えない病変）、group B（腫瘍性と考えられ、高異型度デスプラジアあるいは上皮内癌と考えられる病変）、および group C（明らかな癌で、種々の分化度を示す）。

b. IENB の出現と意義（表 1, 表 2）

IENB は通常型胆管癌の背景胆管にしばしば認められ、異型度からの検討で、3 つのカテゴリーに分類された。group A と group B は、前浸潤性病変である BilIN に相当すると考えられ、group C は cancerization に相当する病変と考えられた。この分類は、いわゆる通常型胆管癌の発癌過程を病理学および病態的に検討する上で、貴重な分類と考えられた。IENB は 57 例中 31 例にみられた。group C が 26 例に、group B が 22 例に、group A が 16 例にみられた。MIB-1 指数や癌関連マーカーの発現は、group A と group B に比べ、浸潤性癌部および group C で高値であった。

従来、職業性胆管癌では、高率にかつ広範囲に BilIN の出現することが知られている。通常型胆管癌でも、癌周囲の胆管粘膜にしばしば BilIN 病変が認められたことから、職業性胆管癌の発生機序に類似した機序が、通常型胆管癌の背景胆管粘膜に発生しうることが示唆された。

E. 結論

今後、職業性胆管癌での BilIN と通常型胆管癌での BilIN 病変を比較検討することにより、職業性胆管癌の BilIN を介した発癌機序が明らかになると期待される。

II. CYP2E1 経路と GST T1-1 経路の関連

酵素の発現

A. 研究目的

DCMの代謝はCYP2E1経路および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、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、1,2-DCPの代謝に関しては、酸化的代謝や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-DCP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。

従来、肝組織でのCYP2E1とGST T1-1は主に肝細胞での研究が主体であり、胆管系の検討はほとんどなされていなかった。そこで今回、CYP2E1とGST T1-1の発現を特に胆管系に着目して検討した。

B. 研究方法

ヒト肝組織(正常および胆管癌)、ラット肝組織、マウス肝組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、CYP2E1、GST T1-1の発現を免疫組織化学的な方法で検討した。

C. 研究成果

CYP2E1はヒト、ラット、マウスの肝細胞で恒常的に発現し、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みられなかった(図1、表3)。また、大阪印刷所の胆管癌症例の胆管異型上皮であるBillINや胆管癌にもCYP2E1の発現はみられなかった。

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みられ、胆管周囲付属腺にも発現を認めた。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BillINや胆管癌にも発現がみられた。

D. 考察

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1,2-DCP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、胆管障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がん物質へのばく露は考えにくいと思われる。

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-DCP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-DCP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-DCP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。

E. 結論

胆管系にCYP2E1の発現はなくGST T1-1が分布しており、GST T1-1により有害な1,2-DCPやDCMの中間代謝産物が形成され、胆管癌の発生に関連した可能性が示唆された。

Ⅲ. 職業性胆管癌の発生におけるDNA損傷の関与

A. 研究目的

職業性胆管癌の発癌メカニズムを推定する目的で、DNA損傷(2本鎖切断)を示唆

する γ -H2AX の発現, ならびに p53 の発現を検討した。

B. 研究方法

職業性胆管癌・外科的切除材料のホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用し, γ -H2AX と p53 の免疫染色を行った。対照として BilIN, 浸潤癌を合併した肝内結石症, および通常の IPNB の外科的切除材料を使用した。

C. 研究成果

職業性胆管癌症例の BilIN および IPNB で, 高率に γ -H2AX の発現を認め, 非腫瘍性の傷害胆管上皮 (大型～隔壁胆管, 胆管周囲付属腺) にもしばしばその発現を認めた (図 2)。一方, 肝内結石症での障害胆管に γ -H2AX の発現はみられず, 対照群の BilIN 病変, IPNB 病変における γ -H2AX の発現もわずかであった。

癌抑制遺伝子産物 p53 の発現は, 職業性胆管癌で早期の段階から既に認められた。職業性胆管癌では非癌部の胆管上皮 (大型～隔壁胆管, 胆管周囲付属腺) にも p53 の発現をみる例があったが, 対照群でこうした所見は認めなかった。

D. 考察

職業性胆管癌では, 発癌に先行して DNA 損傷が高率, 広汎に発生し, 発癌に関連していると考えられた。印刷事業場を退職してから 6 年あるいは 9 年後の従業員に胆管癌が発生した例があるが, 既に DNA 損傷が発生しているため, 1,2-DCP あるいは DCM にばく露中でなくても, 癌化のプロセスが進展し発癌に至ったことが推定される。

通常型胆管癌の発生において, p53 は後期の段階で出現することが知られている。今回の検討で, 職業性胆管癌では早期の段階で p53 の遺伝子異常が発生していることが示唆され, 通常胆管癌とは明らかに異なる成績が得られた。

職業性胆管癌の非腫瘍部の胆管, 胆管周囲付属腺に γ -H2AX や p53 の発現をしばしば認めたが, こうした細胞は DNA 損傷から細胞老化を起こしている可能性がある。老化細胞は senescence-associated secretory phenotype (SASP) を分泌することが知ら

れており, SASP には炎症や線維化, 発癌に関連した分子も多い。例えば, SASP である IL-6 や MCP-1 は胆管細胞から分泌されるが, これらは肝星細胞を活性化する作用を有するとされている。また, 従来から IL-6 は胆管癌の発癌に関連が深いことが知られている。

職業性胆管癌では末梢側の小型胆管に γ -H2AX や p53 の発現は通常みられないが, 肝門側において 1,2-DCP や DCM などへのばく露により胆道系の上皮細胞が傷害され, 傷害上皮の胆汁への接触などが誘因となり徐々に細胞老化を生じ, それにより分泌された SASP が一連の症例の胆管病変の病態形成に関与している可能性もあると思われる。

E. 結論

職業性胆管癌では, 早期の段階から DNA 損傷や遺伝子異常がみられ, 通常胆管癌とは発癌機序が異なる可能性が示唆された。

IV. 職業性胆管癌の発生における DNA メチル化異常の関与

A. 研究目的

DNA メチル化を媒介する DNMT を介した遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化異常は, 癌抑制遺伝子を不活性化し発癌に寄与する。膵癌では, 膵管内上皮内腫瘍 (pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN) を介した多段階発癌の過程において, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 の発現が段階的に亢進し, これら DNMT の高発現群の膵癌は低発現群より予後不良であることが報告されている。また, 膵癌での DNMT1 発現はがん関連遺伝子の DNA メチル化の蓄積と有意に相関することが示されている。

今回, 職業性胆管癌における DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 を検討した。

B. 研究方法

職業性胆管癌 (n = 8), 対照として BilIN を合併した肝内結石合併胆管癌 (n = 16), 通常胆管癌 (n = 14) の外科的切除材料, ホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。DNMT のうち新規メチル化に関与する DNMT3A と DNMT3B, 細胞分裂時のメ

チル化維持に関与する DNMT1 に対する免疫染色を行った。染色結果を非腫瘍部（大型胆管上皮，胆管周囲付属腺），および腫瘍部（BillN，IPNB，浸潤部）のそれぞれについて評価した。陽性染色の程度を半定量的に評価し，統計学的解析を行った。

C. 研究成果

DNMT3A，DNMT3B の発現は，職業性胆管癌の胆管周囲付属腺，BillN，浸潤癌の部位において対照群より有意に亢進していた（図 3）。特に職業性胆管癌の胆管周囲付属腺における DNMT3A，DNMT3B の陽性頻度が高く，DNMT3A は職業性胆管癌の 86%，対照群の 27%の症例が陽性（ $p < 0.01$ ），DNMT3B は職業性胆管癌の 86%，対照群の 7%の症例が陽性を示した（ $p < 0.01$ ）。また，職業性胆管癌の非癌部の大型胆管上皮において，DNMT3A の発現が対照群より高い傾向にあった（陽性率は職業性胆管癌 50%，対照群 13%； $p = 0.056$ ）。

DNMT1 の発現は，検討した疾患群のいずれにおいても非腫瘍部，腫瘍部とも陽性率は低かったが，職業性胆管癌の BillN の部位において対照群より高い発現を示す傾向にあった（陽性率は職業性胆管癌 29%，対照群 0%； $p = 0.060$ ）。

D. 考察

これまで胆管癌の多段階発癌過程における DNMT の発現は検討されていなかったが，今回の検討結果から，職業性胆管癌では腫瘍部だけではなく非腫瘍部においても DNMT の発現が亢進していることが明らかとなった。このことは，職業性胆管癌の多段階発癌過程において DNA メチル化異常が蓄積し，エピジェネティックな発癌の素地が形成されている可能性を示唆する。

近年，胆管周囲付属腺にステム細胞ニッチが存在することが報告され，胆管周囲付属腺の組織再生や胆管癌発癌における関与が注目されている。職業性胆管癌では，特に胆管周囲付属腺において DNMT3A，DNMT3B の発現亢進を顕著に認めたことは興味深い。

E. 結論

職業性胆管癌の多段階発癌過程において化学物質へのばく露や慢性炎症などにより

DNA メチル化異常が蓄積し，エピジェネティックな発癌の素地が形成されている可能性が示唆された。

V. 職業性胆管癌の背景肝にみられる胆管硬化に関する病理学的検討

A. 研究目的

職業性胆管癌では背景病変として胆管上皮障害や胆管硬化をしばしば認めるが，その機序については未解明な点が多い。今回，胆管硬化の病態に関して病理学的な検討を行った。

B. 研究方法

職業性胆管癌（非癌部），対照として原発性硬化性胆管炎（PSC），閉塞性黄疸，ウイルス性肝炎/肝硬変のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い， α -smooth muscle actin（SMA）に対する免疫染色を行った。線維化の程度はシリウスレッド染色で評価した。胆管は組織標本に含まれる主に隔壁レベルの肝内胆管を評価対象とした。

C. 研究成果

α -SMA の免疫染色では，職業性胆管癌の硬化した胆管周囲に α -SMA 陽性の紡錘形細胞を多数認め，この α -SMA 陽性細胞の分布状況は PSC に類似していた（図 4）。対照とした閉塞性黄疸とウイルス性肝炎/肝硬変では胆管周囲に散在性に α -SMA 陽性細胞を認めるのみであった。

肝実質の α -SMA 陽性細胞の分布は同一症例でも不均一であったが，ウイルス性肝炎/肝硬変で最も多くの陽性細胞を認めた。職業性胆管癌の肝実質での α -SMA 陽性細胞の分布は PSC と比較的類似しており，実質内の局所的に肝星細胞の活性化を認めた。閉塞性黄疸は検討した 4 群の中で最も肝星細胞の活性化が目立たなかった。

シリウスレッド染色では，職業性胆管癌と PSC，閉塞性黄疸で胆管周囲に輪状の線維化を認め，これはウイルス性肝炎/肝硬変ではみられなかった。線維化の程度を比較すると，PSC と閉塞性黄疸では胆管周囲にほぼ同程度の膠原線維の沈着を認めたが，職業性胆管癌ではこの 2 つの疾患群より膠原線維化が明らかに緻密で，胆管硬化がより強い傾向に

あった (図 4)。

D. 考察

職業性胆管癌の胆管周囲線維化の組織学的特徴として、胆管周囲に α -SMA 陽性の紡錘形細胞を多く認めた所見は PSC に類似していた。しかし、PSC より膠原線維沈着が緻密で胆管硬化がより強い傾向にあり、職業性胆管癌の胆管周囲線維化は PSC と同質なものではなかった。一方で、職業性胆管癌の α -SMA 陽性細胞の分布状況や胆管周囲線維化の程度は閉塞性黄疸とは異なっており、単に胆管狭窄や閉塞に伴う 2 次性線維化とは異なることが示唆された。

E. 結論

職業性胆管癌の背景にみられる胆管硬化において、PSC や閉塞性黄疸との間にいくつかの組織学的な相違が見出された。

VI. 職業性胆管癌における PD-1/PD-L1 の発現

A. 研究目的

腫瘍浸潤リンパ球が PD-1 を発現すると、インターフェロン等のサイトカイン産生を介して腫瘍細胞に PD-L1 の発現が誘導される。PD-L1 を発現した腫瘍細胞は PD-1 を介して T 細胞の活性化を抑制し、宿主の免疫監視機構を回避する。現在、全身のさまざまな腫瘍で PD-1/PD-L1 の発現が検討されている。今回、職業性胆管癌におけるその発現を検討した。

B. 研究方法

職業性胆管癌 (大阪 S 社) 9 例 10 病変のホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した (1 例は同一患者の初発と再発時の手術材料)。10 病変について浸潤癌を含む切片を使用した。これらの切片では浸潤癌に加えて 7 例に BilIN 病変、4 例に IPNB 病変を認めた。対照として肝内胆管癌、肝外胆管癌、BilIN 病変を伴う肝内結石症、通常の IPNB を使用した。PD-L1, 抗 PD-1, CD8, CD163, S100 蛋白に対する免疫染色を行った。癌細胞のアポトーシスは TUNEL 法で評価した。

C. 研究成果

職業性胆管癌の 10 病変すべてにおいて癌細胞の細胞膜に PD-L1 の発現を認めた (図 5A)。PD-L1 の陽性染色は切片上で癌の一部に限局した。対照とした肝内胆管癌、肝外胆管癌では癌細胞が陽性となる症例はいずれも 10%未満であった (表 4)。PD-L1 陽性となる症例数は、職業性胆管癌が対照群より有意に多かった ($p < 0.01$)。

職業性胆管癌では前癌/前浸潤性病変 (BilIN, IPNB) もしばしば PD-L1 陽性を示した (図 5B,C)。BilIN 病変は 7 例中 4 例 (57%), IPNB 病変は 4 例中 2 例 (50%) が PD-L1 陽性で、これは対照群より有意に高率であった ($p < 0.05$)。

PD-L1 は癌部に浸潤する単核細胞 (多くはマクロファージ) にも陽性となった (図 5A)。腫瘍間質に浸潤する PD-L1 陽性単核細胞をカウントした結果、職業性胆管癌における PD-L1 陽性単核細胞数は肝内胆管癌、肝外胆管癌より有意に多かった ($p < 0.01$) (図 6A)。

PD-1 の発現は癌部に浸潤する単核細胞 (T リンパ球) に認めた (図 5D)。腫瘍間質に浸潤する PD-1 陽性リンパ球および CD8 陽性リンパ球をカウントすると、職業性胆管癌における腫瘍間質の PD-1 陽性リンパ球数、CD8 陽性リンパ球数はともに肝内胆管癌、肝外胆管癌より有意に多かった ($p < 0.01$) (図 6B,C)。

職業性胆管癌 (10 病変) と肝外胆管癌 (10 例) を対象として、癌細胞のアポトーシスを TUNEL 法で検討した結果、癌細胞の TUNEL 標識率は職業性胆管癌 $0.6 \pm 0.5\%$ 、肝外胆管癌 $2.2 \pm 1.8\%$ であり、職業性胆管癌において癌細胞のアポトーシスは有意に抑制されていた ($p < 0.05$)。

D. 考察

今回の結果から職業性胆管癌では PD-L1 の発現亢進があり、癌細胞が PD-1/PD-L1 を介して腫瘍免疫を回避している可能性が示唆された。職業性胆管癌では BilIN や IPNB でも PD-L1 の発現をみる例があり、腫瘍免疫の回避は多段階発癌の初期の段階から生じている可能性が考えられた。

PD-1/PD-L1 阻害療法は、① がん細胞の突然変異が多く免疫原性の高いがんで、② PD-1/PD-L1 を介した抗腫瘍 T 細胞応答が誘導され、③ 腫瘍内に抗腫瘍 CD8+T 細胞が

多数浸潤している症例で高い治療効果を示すことが報告されている。職業性胆管癌はこうした条件を満たしていると思われた。

E. 結論

職業性胆管癌は PD-1/PD-L1 を介して腫瘍免疫を回避し、抗 PD-1 抗体を用いたがん免疫療法が有効である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Pathology of bile duct. Yasuni Nakanuma, Ed. Springer Pub., 2017.

2. Biliary disease with pancreatic counterparts. Yasuni Nakanuma, Ed. Nova Pub., 2017.

3. Nakanuma Y, Uchida T, Sato Y, Uesaka K. An S100P-positive biliary epithelial field is a pre-invasive intraepithelial neoplasm in nodular-sclerosing cholangiocarcinoma. Hum Pathol 2017 (in press).

4. Nakanuma Y, Sudo Y. Biliary tumors with pancreatic counterparts. Semin Diagn Pathol 2017 (in press).

5. Sato Y, Kinoshita M, Takemura S, Tanaka S, Hamano G, Nakamori S, Fujikawa M, Sugawara Y, Yamamoto T, Arimoto A, Yamamura M, Sasaki M, Harada K, Nakanuma Y, Kubo S. The PD-1/PD-L1 axis may be aberrantly activated in occupational cholangiocarcinoma. Pathol Int 2017 (in press).

6. Nakanuma Y, Kakuda Y, Uesaka K, Miyata T, Yamamoto Y, Fukumura Y, Sato Y, Sasaki M, Harada K, Takase M. Characterization of intraductal papillary neoplasm of bile duct with respect to histopathologic similarities to pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasm. Hum Pathol 2016;51:103-13.

7. Nakanuma Y, Miyata T, Uchida T, Uesaka K. Intraductal papillary neoplasm of bile duct is associated with a unique intraepithelial spreading neoplasm. Int J Clin Exp Pathol 2016;9:11129-38.

8. Nakanuma Y, Kakuda Y. Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2015;29:277-93.

9. 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;7:4745-54.

2. 学会発表

1. 佐藤保則, 佐々木素子, 竹村茂一, 久保正二, 中沼安二. 印刷事業場における胆管癌の集団発生. 第60回日本病理学会秋期特別総会 2014

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

表1 Group A, B, Cおよび浸潤性胆管癌(iCCA)における各種マーカー発現

		Group A (n=16)	Group B (n=22)	Group C (n=26)	iCCA (n=31)
CK7	(+)	0	0	0	0
	(++~+++)	16 (100%)	22 (100%)	26 (100%)	31 (100%)
MUC1	(+)	2 (12.5%)	4 (18.2%)	5 (19.2%)	12 (3.2%)
	(++~+++)	4 (25%)	9 (40.9%)	15 (57.7%)	30 (96.8%)
MUC2	(+)	4 (25%)	2 (9.1%)	4 (15.4%)	9 (29%)
	(++~+++)	0	0	0	0
CDX2	(+)	2 (12.5%)	3 (13.6%)	2 (7.7%)	6 (19.4%)
	(++~+++)	0	0	1 (2.8%)	1 (3.2%)
CK20	(+)	1 (12.5%)	1 (4.5%)	4 (15.4%)	6 (19.4%)
	(++~+++)	0	0	0	2 (6.4%)
CD10	(+)	7 (43.8%)	8 (36.4%)	7 (26.9%)	11 (35.5%)
	(++~+++)	0	0	0	2 (6.4%)
MUC5AC	(+)	1 (12.5%)	3 (13.6%)	14 (53.8%)	13 (41.9%)
	(++~+++)	7 (43.8%)	7 (31.8%)	4 (15.4%)	9 (29%)
MUC6	(+)	3 (18.8%)	8 (36.4%)	10 (38.5%)	21 (67.7%)
	(++~+++)	0	0	0	2 (6.4%)

(+), focal expression; (++~+++), moderate to extensive expression.

表2 Group A, B, Cおよび浸潤性胆管癌(iCCA)における癌関連分子の発現

	Group A (n=16)	Group B (n=22)	Group C (n=26)	iCCA (n=31)
P53 (+ ^a)	1 (6.3%) ^a	5 (22.7%) ^a	10 (38.5%)	16 (51.6%)
S100A (+~++)	3 (18.8%) ^b	5 (22.7%) ^b	15 (57.7%)	26 (83.9%)
E-cadherin (+~+ ^{**})	0 ^b	5 (22.7%) ^a	10 (38.5%) ^a	18 (58.1%)
MUC1 (+ ^{***})	4 (25%)	9 (40.9%)	15 (57.7%)	30 (96.8%)

+*, positive; +, mild positive; ++, moderate or extensive positive; +~+^{**}, reduction of E-cadherin; +^{***}, apical membrane expression; a, p < 0.05 (vs. iCCA) and b, p < 0.01 (vs. iCCA).

表3 正常マウス, ラット, ヒトの肝胆道系におけるCYP2E1, GST-T1-1の発現

Enzyme	Species	Hepatocyte	Small bile duct	Large bile duct	Peribiliary gland	Gallbladder
CYP2E1	Mouse	+	-	-	-	-
	Rat	+	-	-	-	-
	Human	+	-	-	~+	~+
GST T1-1	Mouse	+	~+	+	+	++
	Rat	+~++	+~++	++	++	++
	Human	+	+~++	+~++	+~++	+~++

-, negative; +, positive (weak to moderate); ++, positive (marked).

表4 胆管癌細胞におけるPD-L1の発現

Subject	n	Positive		
		< 5%	5-10%	> 10%
Occupational cholangiocarcinoma	10	4 (40%)	4 (40%)	2 (20%)
Intrahepatic cholangiocarcinoma	23	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)
Extrahepatic cholangiocarcinoma	45	2 (4%)	1 (2%)	1 (2%)

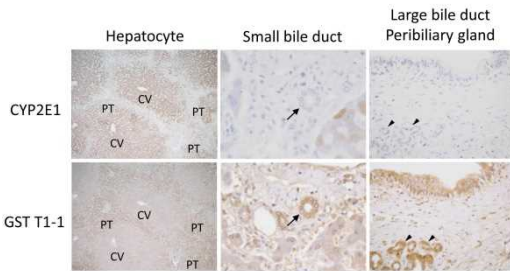


図1 ヒト正常肝におけるCYP2E1, GST T1-1の発現
矢印は小型胆管, 矢頭は胆管周囲付属腺. CV, central vein; PT, portal tract.

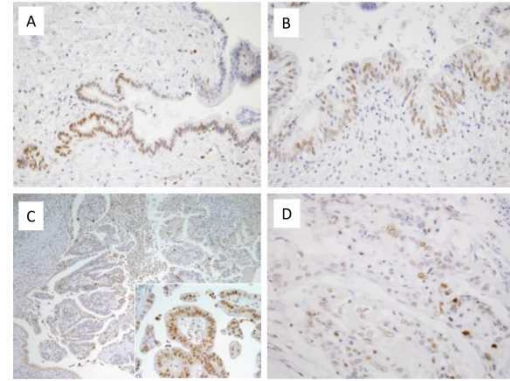


図2 職業性胆管癌におけるγ-H2AXの発現
A, 非癌部胆管上皮. B, Billin, C, IPNB, D, 浸潤癌.

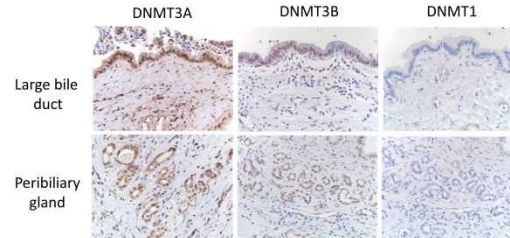


図3 職業性胆管癌(非癌部)におけるDNMTの発現

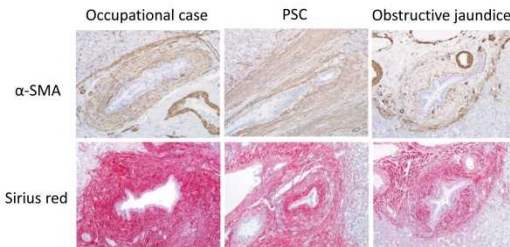


図4 職業性胆管癌における胆管硬化
上段はα-SMA免疫染色, 下段はシリウスレッド染色.

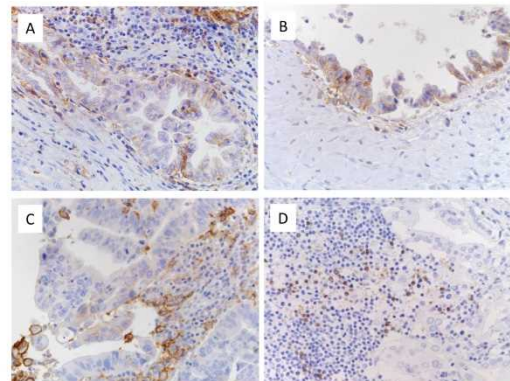


図5 職業性胆管癌におけるPD-L1, PD-1の発現
A, PD-L1(浸潤癌). B, PD-L1(Billin), C, PD-L1(IPNB), D, PD-1(浸潤癌)

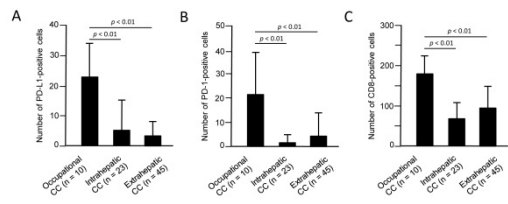


図6 腫瘍間質に浸潤するPD-L1, PD-1, CD8陽性細胞数
 A, PD-L1陽性単核細胞数, B, PD-1陽性リンパ球数, C, CD8陽性リンパ球数.

労災疾病臨床研究事業補助金

分担研究報告書

3 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先端医療開発センターゲノムトランスレーショナルリサーチ分野長）

研究協力者 三牧 幸代 （国立がん研究センター先端医療開発センター）

研究要旨

4 症例の職業性胆管癌の全エクソンシーケンスを行い、体細胞変異の特徴を解析した。その結果、体細胞変異数は1メガベースペアのゲノムあたり平均44.8個(44.8/Mb)であり、通常型胆管癌と比較して平均約30倍と高かった。また、C:G-to-T:A トランジション変異が優位で、通常型胆管癌では見られない、転写共役修復を示唆するストランドバイアスが観察された。さらに、変異部位前後1ベースペアを含めた三塩基配列の変異頻度を集計したところ (trinucleotide mutational pattern)、C:G-to-T:A 変異は GpCpY 配列（アンダーラインは変異部位を示す、Y=C or T）に最も集中していることがわかり、変異誘発における配列特異性が観察された。ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 株を用いた再現実験により、1,2-ジクロロプロパン (1,2-dichloropropane : 1,2-DCP) 曝露株において NpCpC to NpTpC 変異が高頻度に観察され、臨床例で観察された変異パターンの一部を再現した。本研究により、職業性胆管癌の発症は、共通の強い変異原物質曝露による、高頻度突然変異誘発に起因する可能性を明らかとし、さらに、その特徴的な変異プロファイルが本疾患を特徴づけるゲノムバイオマーカーになり得ることが期待された。このゲノムバイオマーカーが、本疾患の特徴である、広範な前癌病変にも適応され得るかを確認するため、前癌病変を含む多数の病変の網羅的ゲノム解析を行ったところ、ほとんどの病変で共通の変異プロファイルが確認され、網羅的ゲノム解析により得られる変異プロファイルが、前癌病変を含めた本疾患を特徴づけるゲノムバイオマーカーになり得ることが期待できた。

A. 研究目的

印刷事業場 S 社の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

の有機溶媒曝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

職業性胆管癌 4 症例の癌部、非癌部より DNA を抽出し、全エクソンシーケンスを行い、体細胞変異を同定した。通常型胆管癌の変異パターンを対照として比較するため、通常型胆管癌 7 症例（高齢発症 4 症例、若年発症 3 症例）の全エクソンシーケンスも行った。同定した体細胞変異の個数の評価、塩基変化パターンの解析、変異頻度のストランドバイアスの解析を行い、職業性胆管癌の変異パターンの特徴を解析した。職業性胆管癌で観察された突然変異パターンを再現するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 株をモデル生物として用い、原因化学物質として示唆されている、1,2-ジクロロプロパン (1,2-dichloropropane : 1,2-DCP)、ジクロロメタン (dichloromethane : DCM) を曝露し、エームズ試験法 (Ames test) による変異原性試験と、全ゲノムシーケンスによる突然変異パターンの解析を行い、臨床例の突然変異パターンとの類似性を判別した。

また、先の 4 症例で同時・異時的に観察された別病変、計 11 病変（同時・異時多発病変、前癌病変）の全エクソンシーケンス解析を行い、体細胞変異を同定した。得られた体細胞変異データから体細胞変異プロファイル（変異数、DNA 塩基置換パターン）を解析し、先の 4 病変の変異プロファイルと比較した。

（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

4 症例の職業性胆管癌は 1 メガベースペアのゲノムあたり平均 44.8 個 (44.8/Mb、範囲 : 7.8-80.5/Mb) の体細胞変異を有しており、通常型胆管癌（平均 1.6/Mb、範囲 : 1.2-2.4/Mb）と比較して約 30 倍と高頻度に変異が誘発されていた (Figure 1)。胆道癌で高頻度に変異が見つかることから、胆道癌関連遺伝子として示唆されている遺伝子群にも変異を有しており、ゲノム変異が発癌へ寄与していることを示す結果であった。一塩基置換変異の種類を集計すると C:G-to-T:A トランジション変異が優位で、これは通常型胆管癌と同様であったが、C:G-to-T:A 変異には、通常型胆管癌では見られない、転写共役修復を示唆するストランドバイアスが観察された。また、変異誘発における配列特異性を調べるため、変異部位前後 1 ベースペアを含めた三塩基配列の変異頻度を集計したところ (trinucleotide mutational pattern)、C:G-to-T:A 変異は GpCpY 配列（アンダーラインは変異部位を示す、Y=C or T）に最も集中していることがわかり (GpCpY to

GpTpY 変異)、この配列特異性は 4 症例すべてで共通していた (Figure 2)。最も突出していた GpCpY to GpTpY 変異を除いて集計を行うと、次点においても共通して変異が集中している配列があり、それは C:G-to-A:T 変異の NpCpY 配列、C:G-to-T:A 変異の NpCpY 配列 (アンダーラインは変異部位を示す、N=A or C or G or T, Y=C or T) であった (NpCpY to NpTpY or NpApY 変異)。ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 株を用いた再現実験により、1,2-DCP 曝露株において NpCpC to NpTpC 変異が高頻度に観察され、臨床例で観察された変異パターンの一部を再現した (Figure 3)。

前癌を含む別病変の解析においても、前癌、浸潤癌病変にかかわらず高頻度に変異が誘発されていた (平均 71.6/Mb、範囲: 6.3-214.4/Mb)。同一症例の各病変間の体細胞変異の多くはそのほとんどが重複せず、各病変が異なるクローン起源であることが示唆された。また、変異頻度のストランドバイアスが 11 病変中 10 病変で認められ、高濃度の変異原物質の曝露歴が示唆された。さらに、職業性胆管癌に特徴的な変異パターンである GpCpY to GpTpY 変異は 11 病変中 9 病変で共通に認められ、共通の変異原性ストレスが各病変に変異を誘発していることが示唆された。

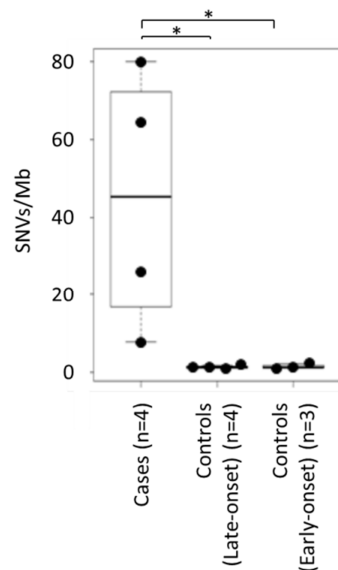


Figure 1. Number of single-nucleotide variants (SNVs) in the printing workers' and control cholangiocarcinoma cases (* $p < 0.05$; Student's t-test). The printing workers' cholangiocarcinomas share a high mutation burden.

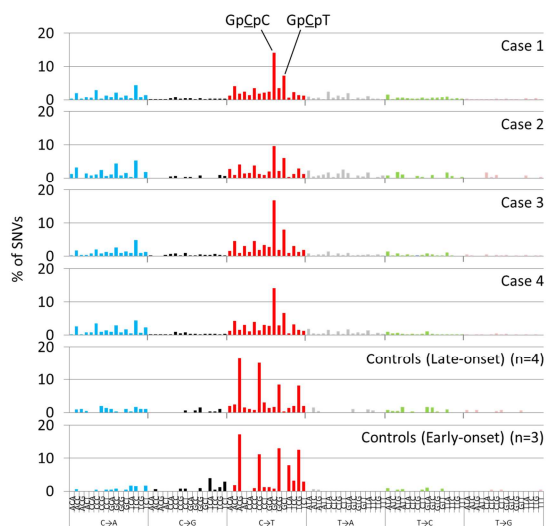


Figure 2. Trinucleotide mutational patterns in the printing workers' and control cholangiocarcinoma samples. The printing workers' cholangiocarcinomas share a unique trinucleotide mutational signature.

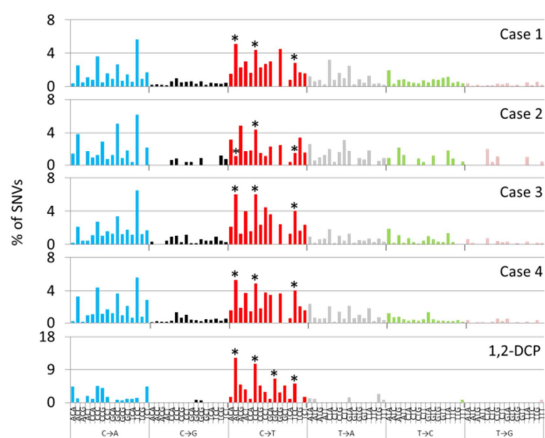


Figure 3. Overlapping mutational signatures among 1,2-DCP-exposed bacteria and occupational cholangiocarcinoma genomes. The trinucleotide mutational signatures of *S. typhimurium* TA100 exposed to 1,2-DCP revealed preferential mutational changes of NpCpC to NpTpC (lower panel), which overlapped with the secondary predominant trinucleotide mutational signature observed in the printing workers' cholangiocarcinoma (Cases 1 to 4) (the NpCpC to NpTpC changes are indicated by the asterisks).

D. 考察

職業性胆管癌4症例すべてで観察された、高頻度変異、変異頻度のストランドバイアス、配列特異的変異誘発（ユニークな trinucleotide mutational pattern）は、この癌が共通の強い変異原に曝されていたことを示唆しており、このような環境が胆管癌関連遺伝子に変異をもたらす機会を増加させ、胆管癌発症に至ったということを予想させた。この結果は、職業性胆管癌の発症が、作業場で高頻度で使用されていた化学物質の、高濃度、長時間曝露によるものである

うと結論付けていた疫学的調査結果を強く補強、証明するものである。原因物質として疑われている 1,2-DCP、DCM を曝露したモデル生物での再現実験と、臨床例の変異パターンの類似性の比較から、臨床例の変異形成において、1,2-DCP がその一部を担っている可能性が示唆された。1,2-DCP 曝露株において一部再現された NpCpC to NpTpC 変異は、アルキル化剤の変異様式に類似していた。テモゾロマイド等、トリアゼン化合物として知られているアルキル化剤は、化学式 N_3H_3 を母構造とする窒素化合物であることが知られている。これら物質から遊離されるジアゾニウムイオン ($R-N^+ \equiv N$) が DNA アルキル化の機能を発揮する。1,2-DCP の化学式は $C_3H_6Cl_2$ でトリアゼン化合物とは構造的に異なっており、1,2-DCP、あるいはその代謝産物が DNA アルキル化の機能を持つか否かは今後さらに解析が必要である。最も変異が集中していた GpCpY to GpTpY 変異パターンは新規のパターンで、現在のところ、癌の臨床例においては類似パターンの報告はない。唯一、activation-induced cytidine deaminase (AID) (DNA 中のシチジンの脱アミノ反応を触媒し、C から U の変異を誘発する酵素) を高発現させたマウス胎児由来線維芽細胞で観察された変異パターンが類似していた。AID は活性化 B 細胞において、免疫グロブリン遺伝子の可変領域の多様化プロセスに携わっており、体細胞超変異やクラススイッチ組み換えに関与していることが知られている。近年、B 細胞以外での異所性発現と細

胞癌化との関連、その発現が炎症により誘導されるとする報告や胆管癌発症との関連を示唆する報告もある。今回の職業性胆管癌の組織では、強い線維化や炎症細胞浸潤が観察され、炎症が起きていた可能性が示唆されている。この炎症反応が曝露化学物質によるものか否かは未だ不明であるが、GpCpY to GpTpY 変異が炎症による AID 誘導により誘発される可能性が示唆された。

このような強い線維化や炎症細胞浸潤に加え、職業性胆管癌では、胆管全域にわたり前癌病変、早期癌病変が認められ、多中心性発癌が示唆されている。今回、前癌を含む多病変の網羅的ゲノム解析を行い、前癌を含めたほとんどの病変が特徴的な共通の遺伝子変異プロファイルを見出した。前癌の段階で多くの遺伝子変異が蓄積していることから、胆管全域の前癌病変では浸潤癌に移行するポテンシャルが、ゲノム変異の蓄積という点で高まっていると予想できた。

E. 結論

職業性胆管癌の発症が、共通の強い変異原物質曝露による、高頻度突然変異誘発に起因する可能性を明らかとした。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。この変異プロファイルが、前癌病変を含めた本疾患を特徴づけるゲノムバイオマーカーになり得ることが期待できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mimaki S, Totsuka Y, Suzuki Y, Nakai C, Goto M, Kojima M, Arakawa H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Kinoshita M, Matsuda T, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Kubo S, Nakamori S, Esumi H, Tsuchihara K. *Carcinogenesis*. 2016 Aug;37(8):817-26.

2. 学会発表

1. 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回日本癌学会学術総会 2014

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

3. 土原一哉. 網羅的ゲノム解析よりあきらかになった印刷工場関連胆管癌遺伝子変異の特徴. フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2015.9.17. 神戸市

4. 三牧幸代, 戸塚ゆ加里, 落合淳志, 久保正二, 中森正二, 中釜斉, 江角浩安, 土原一哉. 印刷業従業者胆管癌のゲノム変異より明らかとなった変異原物質の特徴. 第74回日本癌学会学術総会 2015

5. 三牧幸代, 戸塚ゆ加里, 落合淳志, 中釜斉, 久保正二, 中森正二, 江角浩安, 土原一哉. 職業性胆管がんゲノム共通に認められた高頻度変異と特徴的な変異パターン. 第27回日本消化器癌発生学会総会 2016

6. 三牧幸代, 中森正二, 久保正二, 木下正彦, 戸塚ゆ加里, 中釜斉, 落合淳志, 江角浩安, 土原一哉. 職業性胆管がん一症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較. 第75回日本癌学会学術総会 2016

G. 知的財産権の出願・登録状況

特記なし

労災疾病臨床研究事業補助金

分担研究報告書

4 メタボローム、トランスクリプトーム複合解析による 肝内胆管癌の診断法

研究分担者 河田則文（大阪市立大学大学院肝胆膵病態内科学）

研究協力者 村上善基（大阪市立大学大学院肝胆膵病態内科学）

川村悦史（大阪市立大学大学院肝胆膵病態内科学）

研究要旨

肝内胆管癌は肝原発腫瘍の中で肝細胞癌に比較して早期発見が困難で予後不良である。我々は胆管細胞癌組織のメタボローム、トランスクリプトームによる包括的な解析を行ない、胆管癌特異的な遺伝子発現異常を明らかにし、胆管癌特異的な分子標的マーカーの探索とその解析に基づいた創薬を試みた。

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癌発生母地をつくると考えられている。肝内胆管癌の治療は外科的切除が第一選択であるが、早期発見が困難で発見時には外科的切除の適応ではないことが多い。

胆管細胞癌と肝細胞癌のそれぞれの癌部組織と非癌部組織より包括的にメタボローム、トランスクリプトーム解析を行ない、まず胆管細胞癌特異的な遺伝子発現異常を明らかにすることを試みた。またこの知見をもとに胆管癌特異的な pathway を明らかにし、分子標的マーカーと創薬の試みを行な

った。

細胞間情報伝達物質としてエクソソームの臨床応用の試みが近年注目されている。エクソソームは体液中に存在しあらゆる細胞が放出しており、中にサイトカインや non coding RNA などが含まれている。エクソソームに含まれる情報を明らかにすることは生体内で起こっている状態を把握することが可能で、細胞や組織を採取する生検に匹敵する情報が得られ、なおかつ血液、尿、唾液を回収する程度の低侵襲で検体を回収できることがメリットである。我々はエクソソームに含まれるマイクロ RNA を解析し、肝内胆管癌の早期診断に利用できるか否かを検討した。

B. 研究方法

対象

胆管癌分子標的マーカー探索

対象は当院外科にて切除した胆管細胞癌 10 例と肝細胞癌 6 例のそれぞれ癌部と非癌部を対象に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 の測定を行なった。またトランスクリプトーム解析には Human microRNA Microarray Kit (Rel 12.0) と SurePrint G3 Human GE Microarray Kit (Ver 2.0) を用い miRNA と mRNA の発現解析を行なった。発現解析結果は主成分分析(PCA)を行い、胆管癌に関係のある分子の同定を行なった。

exosome を用いたバイオマーカー探索

当院ならびに関連施設において外科的に切除した肝内胆管癌 17 例、肝細胞癌 20 例、正常肝 9 例の血清を用いエクソクイックにてエクソソーム画分を濃縮し、total RNA を抽出し次世代シーケンサー(NGS) Hiseq にてデータ採取を行ない、解析は miRDeep2 にて行なった。解析の再現性を確認するために、生データを miRDeep* にて再度解析を行なった。

分子標的薬創薬

(1) 細胞株

JCRB 細胞株バンクより分与を受けた肝癌 (HCC) 細胞株 (Huh7, HepG2), 胆管癌 (ICC) 細胞株 (KKU-100, KKU-M156) を用いた。

(2) 細胞増殖活性とアポトーシスの評価
それぞれ $2 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}$ の細胞を 96 well dish に巻き XTT の取り込みと評価はイン

ストラクション通りに行なった (Roche)

(https://roche-biochem.jp/catalog/category_33585/product_3.5.3.21.1.6) 。また同様に細胞数で Caspase-9 の活性(Promega) を 観 察 し た (http://www.promega.co.jp/jp/jp_tech/FAQs/Q&A_Caspase-Glo.html) 。また caspase-9 の活性は XTT 活性と回収した細胞量の両者を用い標準化した。

(3) siRNA による分子標的薬候補の機能解析

13nM と 52nM の siRNA (KARS, MARS) (FrexiTube siRNA Qiagen) を Lipofectamine RNAiMAX (lifetechnology) を用いて $8 \times 10^4 / 24\text{well}$ の細胞に導入し、48 時間後 Sepasol I を用い total RNA を抽出した。

(4) 逆転写とリアルタイム PCR

cDNA の合成 Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis Kit (Roche) を用い、real-time PCR は FastStart Universal SYBR Green Master mix (Roche) を用いた、また使用した primer 配列は以下の通りである。

MARS

Forward 5'-

CCTGCAGTATCCTGCTGACA-3'

Reverse 5'-

TCCATCAGCGCTTGTATCTG-3'

KARS

Forward 5'-

CAGAGAAGGAGGCCAAACAG-3'

Reverse 5'-

TCTTCCCCATTGACCTTCAG-3'

(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

胆管癌発癌寄与していると考えられる分子の探索

主成分分析によって、14種の化合物、62種の mRNA、17種の miRNA が胆管癌、胆管癌非癌部、肝細胞癌、肝細胞癌非癌部の4群で発現パターンが異なっていた。それぞれの化合物、遺伝子の関連を明らかにするために、KEGG, RECTOME を用いて代謝経路解析を行ったところ(1) tRNA の合成、(2) amino acid 合成、(3) lipoprotein 合成経路に関係していることがあきらかになった。特に aminoacyl t-RNA biosynthesis (ARS) が最も関与している可能性が高いことが明らかになった。

exosome 中の miRNA の発現パターン解析
胆管癌 Hiseq によって肝内胆管癌と肝細胞癌、正常肝それぞれのエクソソーム中の塩基は平均 770 万、880 万、800 万リード得られた。得られたリード数は 49 で、Q20 の精度であった (Q20=読み違い率は 1%)。解析に使用した miRNA は 36 種で診断率は 74.5%であった。

ARS の機能解析

lysyl-tRNA synthetase

(KARS) : laminin receptor と複合体を作り細胞の移動 (腫瘍の転移) に関与する (Kim DG, et al. FASEB J 2012)。

methionyl-tRNA synthetase (MARS): メチオニンを tRNA に転位させる

(Kwon et al, Proc Natl Acad Sci USA2011)。腫瘍抑制効果のある tRNA multi-synthetase complex (MSC) p18 を制御する (Park et al, Cell 2005)。

の上記二種の ARS を解析対象とした。miRNA による ARS の制御については、let-7b-5p, miR-29a-3p の過剰発現は細胞株によらず KARS, MARS の発現が亢進し、胆管癌細胞株で miR-122-5p の過剰発現は KARS の発現を抑制した。

また ARS に対する siRNA による細胞増殖効果は低容量の KARS で抑制効果があることが解った。

D. 考察

(1) NGS を利用した胆管癌診断は多くのパラメータが必要であるが、CEA や CA19-9 のみで胆管癌と肝細胞癌が区別できない現状に比べると血液中の情報のみで診断することが期待できる。

(2) miRNA によるアポトーシス誘導効果は肝細胞株の方が感受性が高い。let-7b-5p, miR-29a-3p は癌部で発現が亢進しているが、これらの過剰発現は細胞株によらず KARS, MARS の発現が亢進する。癌部で発

現の低い miR-122-5p は胆管癌細胞株で KARS の発現を抑制する。

(3) siRNA による細胞増殖効果は高容量より低容量の KARS で抑制効果がある。

E. 結論

今回の解析では NGS 解析によるエクソソーム中マイクロ RNA は胆管癌診断マーカーとして使用できることを示した。また ARS の機能を抑制すると癌由来細胞の増殖効率が低下したため、癌抑制の機能を持つと考えられる。今後細胞に対する影響を明らかにし、抗癌剤としての有用性を検討する。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Murakami Y, Kubo S, Tamori A, Itami S, Kawamura E, Iwaisako K, Ikeda K, Kawada N, Ochiya T and Y-h Taguchi. Comprehensive analysis of transcriptome and metabolome analysis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma Scientific Report 5: 16294 (2015)

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 平成 26 年 9 月 26 日 横浜市

2. 村上善基、田守昭博、久保正二. 循環血中 miRNA 発現解析による肝細胞がん術後再発予測マーカー作成. 第 20 回日本肝臓学会大会 平成 28 年 11 月 4 日神戸市

3.

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

1. 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)
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 圓藤 吟史 (中央労働災害防止協会大阪労働衛生総合センター)
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がんの原因は、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がんと認定した印刷労働者 29 人および IC カード製造労働者 1 人における 1,2-DCP および DCM 曝露濃度を推定することを目的とした。そこで対象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、洗浄剤の化学成分と使用量、洗浄時間、印刷機あるいはコーティング機の台数、作業場の換気量などに関する情報を、厚生労働省あるいは当該会社から収集し、それらの情報を基にして曝露濃度を推定した。

同一の印刷会社で胆管がんを発症した 17 人における 1,2-DCP への曝露期間、曝露濃度および累積曝露量はそれぞれ平均 9.5 年 (範囲 6.2~15.1 年)、214 ppm (85~276 ppm) および 2044 ppm-年 (646~3409 ppm-年) と推定された。また DCM 曝露を受けた 11 人における DCM への曝露期間、曝露濃度および累積曝露量はそれぞれ平均 5.1 年 (範囲 1.3~8.3 年)、191 ppm (80~268 ppm) および 864 ppm-年 (355~1282 ppm-年) と推定された。

残りの 13 人中 12 人は印刷労働者であり、そのうち 9 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 190~560 ppm、DCM が 58~980 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 0~230 ppm、DCM が 15~470 ppm と推定された。一方、残りの印刷労働者 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。

他の 1 人は IC カードに接着剤および帯電防止剤をコーティングする業務に従事しており、コーティング機のロール洗浄に 1,2-DCP を使用していた。1,2-DCP の最高曝露濃度は 150 ppm と推定され、1 日労働時間の時間荷重平均濃度は 5~19 ppm と推定された。

2013年に日本産業衛生学会は1,2-DCPの許容濃度を1ppmと定めた。本研究では、許容濃度の1/10の0.1ppmから10倍の10ppmまでの標準ガスを作成し、FID付のガスクロマトグラフ (GC-FID) を用いて測定できる方法を確立した。

A. 研究目的

印刷労働者に発生した胆管がんの原因は、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がん

と認定した印刷労働者 29 人および IC カード製造労働者 1 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。

2013年に日本産業衛生学会は1,2-DCPの許容濃度を1ppmと定めた。したがって、1,2-DCPの曝露濃度を許容濃度の10分の

1 である 0.1ppm まで測定できる方法の確立が望まれる。そこでもっとも普及している FID 付のガスクロマトグラフ (GC-FID) を用いて測定可能か否かを検討した。

B. 研究方法

B-1. 職業性胆管がん患者の曝露レベルの推定

1. 対象者

対象者は厚生労働省により職業性胆管がんと認定された 30 人である。診断年齢は 20 歳代が 2 人、30 歳代が 14 人、40 歳代が 11 人、50 歳代が 2 人、60 歳代が 1 人である。30 人中 17 人は同一の中規模 (従業員 50-299 人) の校正印刷会社の従業員である。残りの 13 人中 9 人は小規模 (従業員 50 人未満) の印刷会社の従業員、3 人は中規模の印刷会社の従業員、1 人は小規模の IC カード製造会社の従業員である。

2. 情報収集

対象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、洗浄剤の化学成分と使用量、洗浄時間、印刷機あるいはコーティング機の台数、作業場の換気量などに関する情報を、厚生労働省あるいは当該会社から収集した。

3. 曝露濃度の推定

1) 同一会社の 17 人の場合 作業場 1

2012 年に労働安全衛生総合研究所が同社の作業場 1 で再現実験を行い、1,2-DCP および DCM の曝露濃度を測定している。それによると、1,2-DCP および DCM をそれぞれ 940 g/hr および 1250 g/hr で使用した場合、曝露濃度はそれぞれ 60-210 ppm (平均 110 ppm) および 130-360 ppm (平均 240 ppm) であった。本研究では、この再現実験結果を基に、曝露濃度が使用量に比例すると仮定して、同作業場での各年の使用量 (購入量の記録から算出、ただし記録がない期間はその後 3 年間の平均を使用) から曝露濃度を推定した。

作業場 2, 3, 4

作業場 2, 3 および 4 は、再現実験は実施されていないため、1,2-DCP および DCM の使用量、印刷機の台数、換気速度

を変数とした数理モデルを用いて曝露濃度を推定した。すなわち、対象者の曝露濃度を、本人が実施した洗浄作業に由来する部分 ($C_{\text{自己}}$ (ppm)) と、他の作業者が実施した洗浄作業に由来する部分 ($C_{\text{他人}}$ ppm)) に分けて推定し、その合計を曝露濃度とした。 $C_{\text{自己}}$ の推定には近接場-遠隔場モデルを、 $C_{\text{他人}}$ の推定には完全混合モデルを用いた。なお $C_{\text{自己}}$ は洗浄作業時のみの曝露濃度ではなく、洗浄作業時を含む 1 シフトの平均曝露濃度である。

2) 他の 13 人の場合

1,2-DCP および DCM の使用量、洗浄作業時間、換気速度を変数とした数理モデルを用いて曝露濃度を推定した。すなわち、対象者の曝露濃度を、洗浄作業時間帯の曝露濃度 ($C_{\text{洗浄}}$ (ppm)) と、それ以外の時間帯の曝露濃度 ($C_{\text{非洗浄}}$ ppm)) に分けて推定し、その時間荷重平均を曝露濃度とした。 $C_{\text{洗浄}}$ の推定には近接場-遠隔場モデルを用い、 $C_{\text{非洗浄}}$ の推定には完全混合モデルを用いた。

B-2. 1,2-DCP の個人曝露測定法の確立

1. 標準ガスの作成

2L のガスバッグに空気 2 L を入れ、その後 1,2-DCP 10 μ L あるいは 100 μ L を注入し気化させて、1250 ppm あるいは 12500 ppm の標準原ガスを作成した。次いで標準原ガス 1250 ppm を清浄空気で希釈して 0.1 ppm の標準ガス 100 L を、また標準原ガス 12500 ppm を清浄空気で希釈して 1.0 ppm および 10 ppm の標準ガス 100 L をガスバッグ内に作成した。

2. サンプルングおよび脱着

活性炭管 (前層 100mg, 後層 50mg) を用いて、標準ガスを 0.1L/min で 4 時間吸引捕集した。サンプルング後は、前層と後層の活性炭を別々にバイアル瓶に入れ、2mL の二硫化炭素を注入して、時々振り混ぜながら 1 時間以上かけて脱着した。

3. 分析

パックドカラム (ガラス製、内径 3.2mm×長さ 2m、PEG20M 10%) を装着した GC-FID に、脱着液 2 μ L を注入して、

1,2-DCP 濃度を測定した。注入口温度、カラム温度および検出器温度はそれぞれ 150℃、80℃および 180℃とした。キャリアガスは He で流量 20mL/min とした。

4. 保存性の確認

1 ppm の標準ガスを上記の手順で作成し、活性炭管 4 本を用いて吸引捕集 (0.1 L/min、4 時間) し、活性炭管を冷凍保存した。翌日 2 本を GC-FID で分析し、さらに 38 日後に残りの 2 本も同様に分析することで、保存性の確認を行った。

C. 研究結果

C-1. 職業性胆管がん患者の曝露レベル

1. 同一会社の 17 人

1) 推定曝露濃度

図 1 に 1,2-DCP 曝露濃度 (年間平均) および DCM 曝露濃度 (年間平均) の推移を示す。印刷作業では、1987年から 1996 年 2 月までの 1,2-DCP 曝露濃度が 130–210 ppm、DCM 曝露濃度が 65–270 ppm、1996 年 3 月から 2006 年までの 1,2-DCP 曝露濃度が 84–346 ppm と推定された。また前室作業 (印刷の進行管理、製版、紙の準備) では、1991 年から 1996 年 2 月までの 1,2-DCP 曝露濃度が 51–76 ppm、DCM 曝露濃度が 45–100 ppm、1996 年 3 月から 2006 年までの 1,2-DCP 曝露濃度が 55–130 ppm と推定された。

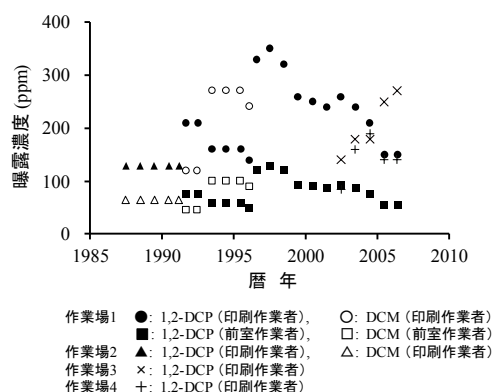


図1. 1,2-ジクロロプロパンおよびジクロロメタンの推定曝露濃度

2) 胆管がん患者の曝露状況

表 1 に対象者の 1,2-DCP および DCM への曝露状況を示す。全 17 人における 1,2-DCP への曝露期間、曝露濃度 (曝露期間中の平均) および累積曝露量はそれぞれ 6.2–15.1 年 (平均 9.5 年)、85–276 ppm (平均 214 ppm) および 646–3409 ppm-年 (平均 2044 ppm-年) と推定された。また DCM 曝露を受けた 11 人における DCM への曝露期間、曝露濃度および累積曝露量はそれぞれ 1.3–8.3 年 (平均 5.1 年)、80–268 ppm (平均 191 ppm) および 355–1282 ppm-年 (平均 864 ppm-年) と推定された。なお呼吸保護具は使用しなかった。

表1. 同一会社の胆管がん患者17人の1,2-ジクロロプロパンおよびジクロロメタン曝露状況

	1,2-DCP曝露 (17人)			DCM曝露 (11人)		
	曝露期間 (年)	曝露濃度 (ppm)	累積曝露量 (ppm-年)	曝露期間 (年)	曝露濃度 (ppm)	累積曝露量 (ppm-年)
平均	9.5	214	2044	5.1	191	864
標準偏差	2.7	45	737	2.8	63	398
最小値	6.2	85	646	1.3	80	355
中央値	9.1	226	1873	4.9	162	890
最大値	15.1	276	3409	8.3	268	1282

1,2-DCP: 1,2-ジクロロプロパン, DCM: ジクロロメタン

2. 他の 13 人

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 年に胆管がんと診断された。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 年に胆管がんと診断された。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 年に胆管がんと診断された。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年に胆管がんと診断された。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年に胆管がんと診断された。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 年に胆管がんと診断された。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 年に胆管がんと診断された。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。

症例 N

1953 年生まれの男性である。1989 年から 2002 年まで事業所 II においてオフセット校正印刷に従事し、2002 年に胆管がんと診断された。この事業所では、他に 2 人が胆管がんを発症し、業務上認定を受けている。

事業所 II では 2 つの作業場で働いたが、作業場 1 の気積は 170 m³、換気量は 1790 m³/h、作業場 2 の気積は 180 m³、換気量は 1100 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、1,1-ジクロロ-1-フルオロエタンおよびミネラルスピリットを使用した。作業場全体で使用した 1,2-DCP は 230–400 g/h、DCM は 56–310 g/h であった。また洗浄作業中に使用した 1,2-DCP は 330–630 g/h、DCM は 100–500 g/h であった。

作業環境濃度は 1,2-DCP が 28–78 ppm、DCM が 15–50 ppm と推定された。洗浄作業中の曝露濃度は 1,2-DCP が 170–370 ppm、DCM が 77–330 ppm と推定された。1 日の労働時間は 9 時間であり、時間荷重平均濃度は 1,2-DCP が 74–170 ppm、DCM が 35–140 ppm と推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

症例 O

1949年生まれの男性である。1982年から1983年まで事業所XII、1983年から1986年まで事業所XIII、1986年から1994年まで事業所XIVにおいてオフセット校正印刷に従事し、1993年に胆管がんと診断された。

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210 m³、作業場4の気積は240 m³、作業場4の気積は130 m³であった。全体換気装置は設置されていなかったため、換気回数を1時間当たり1回とし、換気量をそれぞれ210 m³/h、240 m³および130 m³/hと仮定した。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およびDCMを使用した。作業場全体で使用した1,2-DCPは90–180 g/h、DCMは110–210 g/hであった。また洗浄作業中に使用した1,2-DCPは260 g/h、DCMは300 g/hであった。

作業環境濃度は1,2-DCPが160–170 ppm、DCMが240–250 ppmと推定された。洗浄作業中の曝露濃度は1,2-DCPが340–560 ppm、DCMが520–850 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200–230 ppm、DCMが300–350 ppmと推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

症例 P

1971年生まれの男性である。1991年から2014年まで事業所XVにおいてオフセット校正印刷に従事したが、2013年に胆管がんと診断された。

事業所XVには1つの印刷作業場があり、

気積は350 m³であった。全体換気装置は設置されていなかったため、換気量を350 m³/hと仮定した。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、鉱油およびノナンを使用した。作業場全体で使用した1,2-DCPは0–210 g/h、DCMは200–450 g/hであった。また洗浄作業中に使用した1,2-DCPは0–280 g/h、DCMは240–720 g/hであった。

作業環境濃度は1,2-DCPが0–130 ppm、DCMが160–370 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320–950 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0–160 ppm、DCMが240–470 ppmと推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

症例 Q

1970年生まれの男性である。1998年から2013年まで事業所XVIにおいてオフセット校正印刷に従事したが、2012年に胆管がんと診断された。

事業所XVIには印刷作業場は2つであり、作業場7の気積は250 m³、換気量は600 m³/h、作業場8の気積は290 m³であった。作業場8には全体換気装置は設置されていなかったため、換気量を290 m³/hと仮定した。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、1,1-ジクロロ-1-フルオロエタン、トリクロロエチレン、トルエン、キシレン、ヘキサンおよび灯油を使用した。またインキロール洗浄剤も同じものを使用した。作業場全体で使用した1,2-DCPは

19–120 g/h、DCM は 21–130 g/h であった。また洗浄作業中に使用した 1,2-DCP は 110–260 g/h、DCM は 130–300 g/h であった。

作業環境濃度は 1,2-DCP が 7–42 ppm、DCM が 10–66 ppm と推定された。洗浄作業中の曝露濃度は 1,2-DCP が 83–190 ppm、DCM が 120–300 ppm と推定された。1 日の労働時間は 9–9.5 時間であり、時間荷重平均濃度は 1,2-DCP が 13–65 ppm、DCM が 20–98 ppm と推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

症例 R

1956 年生まれの男性である。1981 年から 2011 年まで事業所 XVII においてオフセット印刷に従事したが、2011 年に胆管がんと診断された。

事業所 XVII には 4 つの印刷作業場があり、そのうち 3 つの作業場で 1,2-DCP と DCM を使用した。作業場 10 の気積は 510 m³、換気量は 9540 m³/h、作業場 11 の気積は 910 m³、作業場 12 の気積は 710 m³、換気量は 1620 m³/h であった。作業場 11 には全体換気装置が設置されていなかったため、換気回数を 1 時間当たり 1 回とし、換気量を 910 m³/h と仮定した。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、トリクロロエチレンおよび 1,1,1-トリクロロエタンを使用した。作業場全体で使用した 1,2-DCP は 0–96 g/h、DCM は 200–1880 g/h であった。また洗浄作業中に使用した 1,2-DCP は 0–370 g/h、DCM は 780–1600 g/h であった。

作業環境濃度は 1,2-DCP が 0–13 ppm、

DCM が 28–99 ppm と推定された。洗浄作業中の曝露濃度は 1,2-DCP が 0–190 ppm、DCM が 530–980 ppm と推定された。1 日の労働時間は 9.5 時間であり、時間荷重平均濃度は 1,2-DCP が 0–59 ppm、DCM が 170–370 ppm と推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

症例 S

1958 年生まれの男性である。1996 年から 2001 年まで事業所 XVIII において、2001 年から 2005 年まで事業所 XIX において、IC カードに接着剤および帯電防止剤をコーティングする業務に従事したが、2008 年に胆管がんと診断された。

事業所 XVIII にはコーティング作業場は 1 つであり、作業場 13 の気積は 510 m³、換気量は 300 m³/h であった。事業所 XIX にはコーティング作業場は 1 つであり、作業場 14 の気積は 160 m³、換気量は 1650 m³/h であった。局所排気装置は設置されていなかった。コーティング機のロール洗浄剤には、1,2-DCP および 1,1-ジクロロ-1-フルオロエタンを使用した。作業場全体で使用した 1,2-DCP は 8–16 g/h、洗浄作業中に使用した 1,2-DCP は 140 g/h であった。1,2-DCP の作業環境濃度は 1–11 ppm、洗浄作業中の曝露濃度は 72–150 ppm と推定された。1 日の労働時間は 9 時間であり、1,2-DCP の時間荷重平均濃度は 5–19 ppm と推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

C-2. 1,2-DCP の個人曝露測定法

1. 検量線の直線性

4.6~1200µg/mL の範囲で検量線の直線

性が確認できた。

2. 脱着率および回収率

最終試料液 4.6~1200 μ g/mL の範囲で、脱着率の平均($n=3$)は 97~102%であり、標準偏差は 1~2%であった。また 0.1、1.0、10 ppm の標準ガスの回収率は、平均($n=3$)がそれぞれ 95%、105 および 98%、標準偏差がそれぞれ 3、3 および 2%であった。

3. 保存性

サンプリング翌日の回収率は 110%および 115%、1 ヶ月後の回収率は 113%および 106%と良好であった。

D. 考察

D-1. 曝露濃度の推定について

1 つの作業場では、再現実験の結果を基に、実際の 1,2-DCP および DCM の使用量のデータを用いて曝露濃度を推定したので、適切に推定できていると考えられる。一方、他の作業場では、完全混合モデルおよび近接場-遠隔場モデルを用いて曝露濃度を推定した。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。

対象者 30 人中 20 人は 1,2-DCP および DCM の長期間高濃度曝露を、7 人は

1,2-DCP の長期間高濃度曝露を、3 人は DCM の長期間高濃度曝露を受けていた。

Yamada らが報告した患者 6 人の場合、4 人は 1,2-DCP および DCM の長期間高濃度曝露を、2 人は 1,2-DCP の長期間高濃度曝露を受けていた (J Occup Health 2014; 56: 332-338)。これらを合わせると、2015 年 2 月までに厚生労働省により職業性胆管がんと認定された患者 36 人の中で、24 人は 1,2-DCP および DCM の曝露を、9 人は 1,2-DCP の曝露を、3 人は DCM の曝露を受けていたことになる。

D-2. 個人曝露測定法について

市販の活性炭管を用いて 4 時間サンプリングし、作業環境測定機関に普及している GC-FID により分析することで、許容濃度 1 ppm の 1/10 の 0.1 ppm から 10 倍の 10 ppm までの範囲で、個人曝露濃度を適切に測定できる方法を確立できた。

これまで中村らが GC-MS を使用して 1,2-DCP を測定する方法を報告(中村ら. 活性炭捕集による 1,2-ジクロロプロパンの捕集条件と破過時間に関する調査. 第 53 回日本労働衛生工学会抄録集:162-163)しているが、作業環境測定機関では GC-MS は十分には普及しておらず、より一般的な GC-FID を用いた本研究は有用であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada K, Kumagai S, Endo G. Chemical exposure levels in printing workers with cholangiocarcinoma (second report). J Occup Health 2015;54:245-252.

- 2) Yamada K, Kumagai S, Kubo S, Endo G. Chemical exposure levels in printing and coating workers with cholangiocarcinoma (third report). J Occup Health 2015;54:565–571.
- 3) Kumagai S, Sobue T, Makiuchi T, Kubo S, Uehara S, Hayashi T, Sato KK, Endo G. Relationship between cumulative exposure to 1,2-dichloropropane and incidence risk of cholangiocarcinoma among offset printing workers. Occup Environ Med 2016;73:545–552.
2. 学会発表
なし
- F. 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

6 印刷労働者における洗浄剤累積使用量別胆管がん罹患リスク

研究分担者 祖父江友孝（大阪大学大学院医学系研究科社会環境医学）
牧内 武（大阪大学大学院医学系研究科社会環境医学）

研究要旨

胆管がん多発事例のみられた印刷会社の従事者において、使用洗浄剤累積使用量を考慮した従事期間別に標準化罹患比（SIR）を計算した。従業員 106 名を対象とし、観察開始は 1985 年 1 月またはそれ以降入社年月、観察終了は 2012 年 12 月またはそれ以前の胆管がん罹患年月とした。期待罹患数の計算には、地域がん登録のデータを基にした性年齢別罹患率全国推計値を使用した。対象部位は肝内胆管がん及び肝外胆管がんとした。2 種の洗浄剤ジクロロメタン（DCM）、1,2-ジクロロプロパン（1,2-DCP）の月ごとの使用量と従事期間から洗浄剤の累積使用量を計算し、累積使用量別に SIR を算出した。潜伏期間は 0 年、3 年、5 年の 3 通りを設定した。従事者コホート全体（胆管がん罹患 17 例）の SIR は 1132.5（95%信頼区間 659.7-1813.2）であった。1,2-DCP および DCM 累積使用量別の SIR は、概ね DCM、1,2-DCP とともに正の量反応関係が観察された。潜伏期 5 年として、1,2-DCP の累積使用量別を 0-39999kg、40000-59999kg、60000kg と分けた場合の胆管がん罹患相対リスクは、1.00（基準群）、12.68（95%信頼区間 6.67-22.03）、51.68（95%信頼区間 31.11-81.07）となった。

A.

研究目的

大阪府の印刷会社オフセット校正印刷部門の元従業員および現従業員において、高頻度の胆管がん罹患および死亡が報告された。

本研究班では、この発症状況をさらに詳細に検討するために、使用洗浄剤を考慮した従事期間別に標準化罹患比（SIR）を計算し、昨年度報告。今年度は、月ごとの洗浄剤使用量と従事期間から洗浄剤の累積使用量を計算し、累積使用量別に SIR を計算した。

B. 研究方法

（1）対象者

印刷会社社員名簿に記載されている大阪の校正部 116 人（男性 94 人、女性 22 人）を観察集団とした。このうち、生年月、入社年月又は退職年月のいずれかが不明な者（8 人）、及び消息が不明なもの（2 名）を除外し、106 名を解析対象とした。

（2）標準罹患率

期待罹患患者数の計算に用いる標準罹患率

は、宮城、山形、福井、長崎の地域がん登録のデータを基にした全国推計値（1985-2007年）を使用した。全国推計値の計算方法は、厚生労働省第3次対がん総合戦略研究事業「がん罹患・死亡動向の実態把握に関する研究」班と同じ方法を用いたが、数値を安定させるため、3年累積罹患率を用いた。対象部位は肝内胆管がん及び肝外胆管がん（1994年以前は1551及び1561、1995年以降はC221及びC240）とした。なお、2008年から2012年については地域がん登録のデータがないため、2008年から2012年については最新（2005-07年）の数値を使用した。

（3）累積使用量別人年計算

人年計算の起点は、(1)観察開始年月（1985年1月）か、(2)それ以降の入社年月、終点は(1)追跡終了年月（2012年12月）か、(2)それ以前の胆管がん罹患年月とした。

洗浄剤DCMと1,2-DCPの使用状況、それぞれの累積使用量に対応した人年を算出した。当該印刷会社オフセット校正印刷部門におけるDCMおよび1,2-DCPの使用期間は、それぞれ、1987年11月-1996年2月、1987年11月-2006年10月であった（図1）。累積使用量は、1985年1月またはそれ以降の入社年月から(1)胆管がん罹患年月か(2)退社年月日か(3)追跡終了年月（2012年12月）のいずれかまでの期間における、校正印刷部門でのそれぞれの洗浄剤使用量の月別使用量の合計として計算した。潜伏期間はなし、3年、5年の3通りを設定した。さらに、潜伏期5年として、1,2-DCPの累積使用量別を0-39999kg、40000-59999kg、

60000kgと分けた場合の胆管がん罹患相対リスクを、0-39999kg群を基準群として算出した。

本研究は「疫学研究に関する倫理指針」に従い、大阪市立大学医学部倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

従事者コホート全体（胆管がん罹患17例）のSIRは1132.5（95%信頼区間659.7-1813.2）であった。DCM累積使用量0kg群、1-19999kg群、20000-kg群におけるSIRは、潜伏期間なしとした場合、それぞれ981.4、566.1、3822.8と、DCM累積使用量が多くなるほど高い傾向があり、潜伏期間3年および5年の場合も、947.9、721.0、3436.4、および、919.8、1019.4、2468.5と同様の傾向であった。1,2-DCP累積使用量0kg群、1-19999kg群、20000-39999kg群、40000-59999kg群、60000kg以上群におけるSIRは、潜伏期間なしとした場合、それぞれ0.0、0.0、0.0、3590.7、14632.1と、1,2-DCP累積使用量が多くなるほど高い傾向があり、潜伏期間3年および5年の場合も、0.0、0.0、641.6、4158.6、14595.0および、0.0、221.8、729.5、3690.7、15047.9と同様の傾向であった。1,2-DCP、DCMの双方の累積使用量別のSIRは、胆管がん症例が少ないために0.0となるセルが出現するが、概ねDCM、1,2-DCPともに正の量反応関係が観察され、いずれの潜伏期においてもほぼ同様の結果となった。

潜伏期5年として、1,2-DCPの累積使用量別を0-39999kg、40000-59999kg、60000kgと分けた場合の胆管がん罹患相対

リスクは、1.00（基準群）、12.68(95%信頼区間 6.67-22.03)、51.68（95%信頼区間 31.11-81.07）となった。

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

D. 考察

1,2-DCP および DCM 累積使用量別の SIR は、概ね DCM、1,2-DCP とともに正の量反応関係が観察された。熊谷らは、DCM、1,2-DCP の使用量から作業環境曝露濃度を推定して、累積曝露量別に胆管がん罹患リスクを検討している（Kumagai S et al. *Occup Environ Med* 2016）。その結果、潜伏期5年として場合の1,2-DCP 累積曝露量別の SIR は、500-999 ppm-年で 846 (95% CI:275-1975)、1000-1999 ppm-年で 13,714 (95% CI: 4,451-32,007)、2000-3999 ppm-年で 21,894 (95% CI: 8,802-45,102) となった。また、1-1,199 ppm-年を基準群とした場合の相対リスクは、1,200-2049 ppm-年群で 11.4(95%CI: 3.3-39.6)、2,050-3,499 ppm-年群で 32.4 (95%CI: 6.4-163.9)となり、本解析と同様の結果であった。

E. 結論

印刷会社オフセット校正印刷部門の従事者において 1132.5 と極めて高い SIR を観察した。洗浄剤の累積使用量別にみた場合、DCM、1,2-DCP とともに累積使用量が多いほど SIR が高い傾向にあった。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)